

Aus dem Institut für Physiologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. W. Jelkmann

**Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors Hepatocyte Nuclear
Factor-4 α für die Repression des Erythropoietin-Gens durch
Interleukin-1 β**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
-Aus der medizinischen Fakultät-

vorgelegt von
Jochen Christian Krajewski
aus Mainz

Lübeck 2006

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. W. Jelkmann

2. Berichterstatter:

Priv. Doz. Dr. rer. nat. O. Jöhren

3. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. A. Kurtz

Tag der mündlichen Prüfung:

10.4.2007

Zum Druck genehmigt, Lübeck, den 10.4.2007

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis:	IV
1. Einleitung.....	1
1.1 <i>Erythropoietin (EPO)</i>	1
1.1.1 Indikationen für den medizinischen Einsatz von EPO.....	2
1.2 <i>Anämie chronischer Erkrankungen (ACD)</i>	3
1.2.1 Pathogenese der ACD.....	3
1.2.2 Molekulare Ursachen der ACD	4
1.3 <i>Molekularbiologische Grundlagen: Initiation der Transkription</i>	5
1.4 <i>Regulatorische Elemente des EPO-Gens</i>	6
1.4.1 Enhancer	7
1.4.2 Promotor	8
1.4.3 Interaktion des 3´-Enhancers mit dem basalen Transkriptionsapparat des Promotors.....	9
1.5 <i>Ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren (NHRs) und ihre Co-Aktivatoren</i>	11
1.5.1 Hepatocyte nuclear factor – 4 (HNF-4)	13
1.5.2 Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF)	15
1.6 <i>Zielsetzung der Arbeit</i>	16
2. Material und Methoden	17
2.1 <i>Zellkultur</i>	17
2.1.1 Kulturbedingungen	17
2.1.2 Passagieren	17
2.1.3 Versuchsdurchführung.....	18
2.2 <i>Herstellen von Kernextrakten</i>	18
2.3 <i>Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford</i>	19
2.4 <i>Proteinnachweis im Western-Blot</i>	19
2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	19
2.4.2 Western-Blot (semi-dry blot).....	21
2.4.3 Antikörperinkubation.....	21
2.4.4 Nachweis der Peroxidaseaktivität mit dem ECL-Detektionssystem.....	22
2.4.5 Densitometrische Auswertung der Western-Blot-Röntgenfilme	22

2.5 Gelverzögerungstest (EMSA)	22
2.5.1 Markierung der Oligonukleotide mit [³² P]	23
2.5.2 Bindungsreaktion und Elektrophorese	24
2.5.3 Auswertung auf dem Phosphorimager	24
2.6 mRNA-Isolierung und reverse-Transkription (cDNA-Synthese)	25
2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	25
2.7.1 Reverse-Transkription (RT)-PCR	25
2.7.2 Realtime-PCR	26
2.8 Reporter-Gen-Untersuchungen	28
2.8.1 Konstruktion der EPO-Enhancer-Reporterplasmide	29
2.8.2 Transiente Transfektion von HepG2-Zellen	33
2.8.3 Luciferase Assay	33
2.9 Konstruktion des HNF-4 α -dsRed2-Expressionsplasmids	34
2.10 Bestimmung der EPO-Konzentration im ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay)	35
2.11 Succinatdehydrogenase Aktivitäts-Messung (MTT-Test)	36
2.12 Anhang	37
2.12.1 Lösungen und Puffer	37
2.12.2 Kulturmedien für <i>E. coli</i>	38
2.12.3 Elektrophoresegeüllösungen	38
2.12.4 Oligonukleotide	39
2.12.5 Zytokine	40
2.12.6 Fibrat	40
2.12.7 Proteasom-Inhibitor MG132	40
2.12.8 Actinomycin D	40
3. Ergebnisse	41
3.1 Western-Blot	41
3.1.1 Expression von HNF-4 α -Kernprotein in HepG2- und U2OS-Zellen	41
3.1.2 Einfluss von IL-1 β auf die Menge von HNF-4 α -Kernprotein	41
3.1.3 Einfluss des Proteasom-Inhibitors MG132 auf die Menge von HNF-4 α -Kernprotein	43
3.1.4 Einfluss von IL-1 β auf die Menge von HIF-1 α -Kernprotein	45
3.2 Realtime-PCR	46
3.2.1 Einfluss von IL-1 β auf die Menge von HNF-4 α -mRNA	46
3.3 Gelverzögerungstests (EMSA)	47

3.3.1 Einfluss von IL-1 β auf die DNA-Bindungsaktivität des DR2-Elementes des EPO-Enhancers.....	47
3.3.2 Einfluss von IL-1 β auf die DNA-Bindung von HNF-4 α an das DR2-Element.....	47
3.4 <i>Reportergen-Untersuchungen</i>	49
3.4.1 Einfluss von IL-1 β auf die Aktivität des EPO-Enhancer-wt-Plasmids	50
3.4.2 Einfluss von IL-1 β auf die Aktivität des EPO-Enhancer-dHIF-Plasmids.....	51
3.4.3 Einfluss von IL-1 β auf die Aktivität des EPO-Enhancer-dHIFdCACA-Plasmids.....	52
3.5 <i>ELISA</i>	53
3.5.1 Einfluss von Fibraten auf die EPO-Sekretion von HepG2-Zellen	53
4. Diskussion	55
4.1 <i>Molekulare Mechanismen der Pathogenese der ACD</i>	55
4.1.1 Das hepatische Peptid Heparin als Mediator der Eisentransportstörung.....	55
4.1.2 Verminderung der EPO-Produktion durch proinflammatorische Zytokine	57
4.2 <i>Modulation der Aktivität des EPO-Enhancers durch IL-1β</i>	57
4.2.1 Der Einfluss von IL-1 β auf den Transkriptionsfaktor HNF-4 α	58
4.2.2 Die Bedeutung von HNF-4 α für die Modulation der Aktivität des EPO-Enhancers durch IL-1 β	59
4.3 <i>Schlussfolgerungen</i>	62
4.4 <i>Die Pathogenese der ACD: Ein Modell auf molekularer Ebene</i>	62
4.5 <i>Ausblick: Einfluss von Fibratderivaten auf die EPO-Expression</i>	64
4.5.1 Mögliche Signalwege für die Beeinflussung der EPO-Sekretion durch Fibrate.....	64
5. Zusammenfassung.....	66
6. Literaturverzeichnis	68
7. Danksagung	79
8. Lebenslauf	80
9. Vorträge und Publikationen.....	81

Abkürzungsverzeichnis:

Abb.	Abbildung
ACD	anemia of chronic disease / Anämie chronischer Erkrankungen
ATF	allgemeine Transkriptionsfaktoren
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
CO ₂	Kohlendioxid
COUP-TF	chicken ovalbumin upstream promoter transcriptionfactor
CT	threshold cycle
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR2	direct repeat of two hexanucleotides seperated by two basepairs
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia Coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
EMSA	electrophoretic mobility shift assay / Gelverzögerungstest
engl	englisch
EPO	Erythropoietin
FCS	fetal calf serum
g	Erdbeschleunigung
Hac	Essigsäure
HAT	Histon-Acetyltransferase
HIF	hypoxia inducible factor
HNF-4	hepatocyte nuclear factor - 4
HRE	hypoxia response element
IFN	Interferon
IL-1	Interleukin-1
IU	international unit
Kac	Kaliumacetat
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
KCL	Kaliumchlorid
kD	Kilodalton
LBD	Ligandenbindungsdomäne
L-PK	Leber-Pyruvatkinase

MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MODY-1	maturity onset diabetes of the young -1
MTT	Diphenyltetrazoliumbromid
n	Stichprobengröße
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NFκB	nukleärer-Faktor-KappaB
NHR	nuclear hormone receptor / ligandenaktivierter Transkriptionsfaktor
O ₂	Sauerstoff
PBS	phosphate buffered saline
PBS-T	phosphate buffered saline - Tween
PCR	polymerase chain reaction
PEPCK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PPAR	peroxisome proliferator activated receptor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAR	retinoid acid receptor
RE	response element / Reaktionselement
RES	retikuloendotheliales System
r-HuEPO	rekombinantes, humanes Erythropoietin
rlu	relative light units
RNA	Ribonukleinsäure
RNA-PII	RNA-Polymerase II
RXR	retinoid x receptor
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SRC-1	steroid receptor coactivator - 1
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris – EDTA
TF	Transkriptionsfaktor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRE	thyroid responsive element

1. Einleitung

1.1 Erythropoietin (EPO)

Erythropoietin (EPO) ist ein Glykoprotein-Hormon, das die Differenzierung von Erythrozyten aus Vorgängerzellen im Knochenmark steuert.

Bei Erwachsenen wird EPO hauptsächlich in der Niere gebildet und zwar in den interstitiellen, peritubulären Zellen der Nierenrinde. Geringere Mengen werden von Leberzellen und auch im Gehirn synthetisiert. Anders ist das Verhältnis beim Fetus. Hier ist die Leber der primäre Ort der EPO-Synthese. Kurz nach der Geburt wird die Produktion dort jedoch reduziert.

Der Stimulus für die Produktion von EPO ist ein vermindertes Sauerstoffangebot in den Nierenarterien. Unter Hypoxie erhöht sich die EPO-Produktion bis auf das 1000- fache des Basalwertes. Nachdem EPO in den Blutstrom ausgeschüttet worden ist, bindet es im Knochenmark an EPO-Rezeptoren auf der Membranoberfläche von erythrozytären Vorläuferzellen, was zur deren Proliferation und Reifung führt. Außerdem verhindert EPO den programmierten Zelltod (Apoptose) dieser Zellen, wodurch die weitere Differenzierung bis zu den Erythrozyten ermöglicht wird. So wird die Sauerstoffbindungskapazität und damit auch der Sauerstoffpartialdruck im Gewebe erhöht - der physiologische Stimulus für die Produktion von EPO entsprechend verringert. EPO ist also Glied eines klassischen Regelkreises mit negativer Rückkopplung (Erslev, 1991; Jelkmann, 2004) (Abb. 1).

1.2 Anämie chronischer Erkrankungen (ACD)

Die ACD ist eine der in der Klinik am häufigsten gesehenen Anämieformen. Es handelt sich um eine hypoproliferative Anämie mit erniedrigten Konzentrationen von Serumeisen und Transferrin bei gleichzeitig normalen oder erhöhten Serumferritinwerten (Weiss und Goodnough, 2005). Nachdem bereits einige Arbeiten über die bei Entzündungszuständen auftretende Anämie erschienen waren, wurde die ACD im Jahr 1966 schließlich als eigenständige Entität etabliert - ursprünglich assoziiert mit drei großen Krankheitsgruppen: neoplastischen-, autoimmun/entzündlichen- und infektiösen Erkrankungen (Cartwright, 1966).

1.2.1 Pathogenese der ACD

Das wichtigste gemeinsame Merkmal der mit der ACD verbundenen Grunderkrankungen ist die erhöhte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-1 (IL-1), Tumor Nekrosefaktor (TNF) und Interferonen (INF). Tumorzellen, Infektionen und chronische Autoimmunprozesse stimulieren Monozyten und Makrophagen, die wiederum durch IL-1 T-Lymphozyten aktivieren. Die freigesetzten Zytokine beeinflussen die Erythropoiese auf mindestens drei Stufen:

Durch proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β und TNF α wird die Produktion von EPO direkt herabgesetzt (Jelkmann et al., 1990; Jelkmann, 1998). Verglichen mit der normalen Situation bei Blutungsanämie oder Hämolyse, bei der die EPO-Produktion in einem festen umgekehrten Verhältnis zur Anämie steht, ist die EPO-Produktion bei der ACD also relativ vermindert, d.h. nicht adäquat angestiegen.

Andererseits kommt es zu einer Eisentransportstörung mit verminderter intestinaler Eisenresorption und Eisenretention in retikuloendothelialen Makrophagen. Normalerweise wird beim Gesunden das Eisen der im retikuloendothelialen System (RES) abgebauten Erythrozyten wieder verwertet und der Hämoglobinsynthese zur Verfügung gestellt. Dieser Mechanismus ist bei der Anämie chronischer Erkrankungen eingeschränkt, es kommt zu dem so genannten retikuloendothelialen Block (Alvarez-Hernandez et al., 1989; Ganz, 2005).

Darüber hinaus wird die Proliferation von erythrozytären Vorläuferzellen durch Interferon- β und - γ gehemmt (Mamus et al., 1985; Means und Krantz, 1993) (Abb. 2).

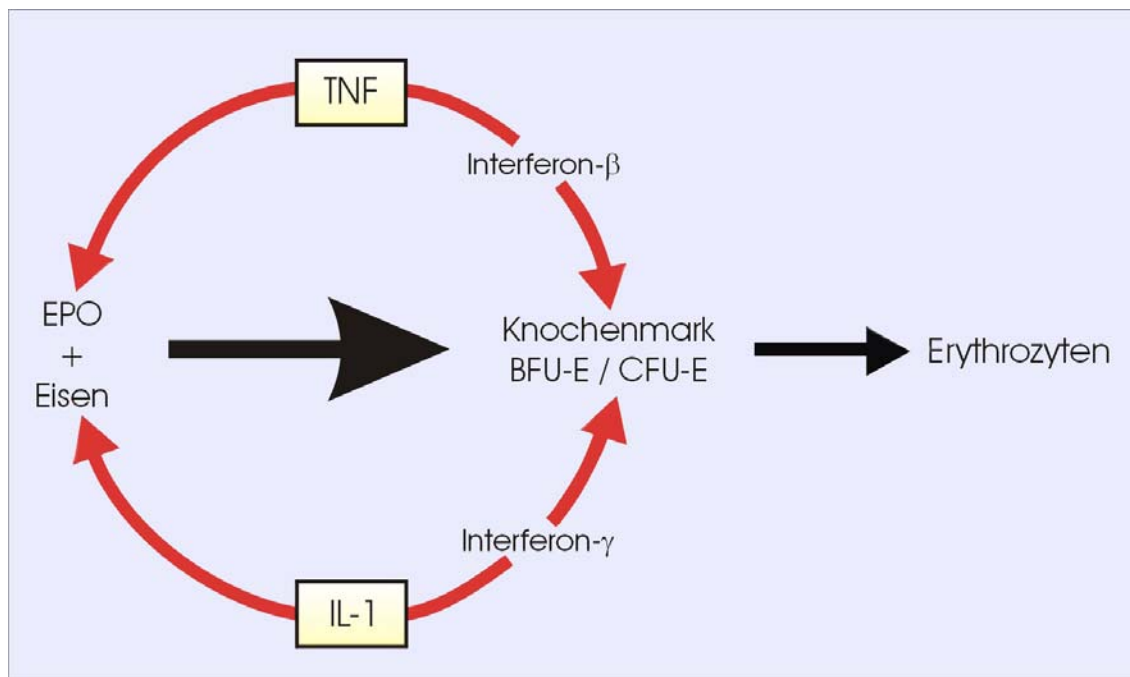


Abbildung 2:

Hemmung der Erythropoese durch proinflammatorische Zytokine: Die roten Pfeile weisen auf die Angriffspunkte der inhibitorischen Effekte proinflammatorischer Zytokine hin. Die EPO-Bildung sowie die Freisetzung von Eisen aus dem retikuloendothelialen System werden durch IL-1 und TNF gehemmt. TNF und IL-1 wirken über die Freisetzung von Interferonen inhibitorisch auf die Reifung von erythrozytären Vorläuferzellen im Knochenmark. BFU-E = engl. burst forming unit erythroid, CFU-E = engl. colony forming unit erythroid. (Abb. modifiziert nach: Hillmann RS, 1999)

1.2.2 Molekulare Ursachen der ACD

Die molekularen Mechanismen der Pathogenese der ACD sind weiterhin unklar. In letzter Zeit wird das hepatische Peptid Heparin als wichtigster Mediator der Eisentransportstörung diskutiert (Means, 2004). Die Ursache der herabgesetzten EPO-Produktion wird ausgehend von dem Effekt proinflammatorischer Zytokine auf mehrere, bei der EPO-Expression beteiligte Transkriptionsfaktoren untersucht (Hellwig-Burgel et al., 1999; La Ferla et al., 2002; Imagawa et al., 2003).

1.3 Molekularbiologische Grundlagen: Initiation der Transkription

Die Transkription ist der erste Schritt der Proteinbiosynthese. Gemeint ist das Umschreiben der statischen DNA in mobile mRNA. Dies geschieht durch das Enzym RNA-Polymerase. Die Steuerung des Transkriptionsstartes ist bei den meisten Genen der wichtigste Schritt der Genregulation. Hier wird die generelle Entscheidung getroffen, ob das Gen exprimiert, also abgelesen wird oder nicht. Diese Entscheidung wird an regulatorischen DNA-Sequenzen gefällt, die selbst nicht transkribiert werden (Abb. 3):

Der *Promotor* liegt in unmittelbarer Nähe des Startpunktes der Transkription. In dieser Region bindet die RNA-Polymerase. Die meisten Promotoren besitzen eine als TATA-Box bezeichnete Sequenz, die in der Regel etwa 25 Basenpaare (bp) stromaufwärts des Startpunktes liegt. Ihre Consensussequenz umfasst acht A·T-Basenpaare. Die Minderheit der Promotoren, die kein TATA-Element enthalten nennt man TATA-lose Promotoren.

DNA-Abschnitte, die über eine beträchtliche Entfernung vom Startpunkt an der Steuerung des Transkriptionsstarts beteiligt sind, werden *Enhancer* (= engl. Verstärker) genannt. Die Wirkung eines Enhancers ist unabhängig von dessen Polarität oder davon, ob er stromaufwärts oder stromabwärts des entsprechenden Promotors liegt.

An diese regulatorischen Sequenzen können Proteine binden, die die Transkription aktivieren oder hemmen. Diese Schlüsselproteine heißen Transkriptionsfaktoren (TF). Sie lassen sich in drei Hauptgruppen einteilen. *Allgemeine Transkriptionsfaktoren* (ATF) sind an allen Promotoren zur Einleitung der RNA-Synthese notwendig und rekrutieren die RNA-Polymerase. *Upstream-Faktoren* sind DNA-bindende Proteine, die bestimmte kurze Consenselemente stromaufwärts des Startpunktes erkennen. *Induzierbare Transkriptionsfaktoren* werden zu bestimmten Zeiten und in bestimmten Geweben synthetisiert und ermöglichen es der Zelle, bestimmte Gene an- oder abzuschalten. Die Sequenzen, an die sie binden, werden Reaktionselemente (engl. response element, RE) genannt (Beyersmann, 2000; Gill, 2001).

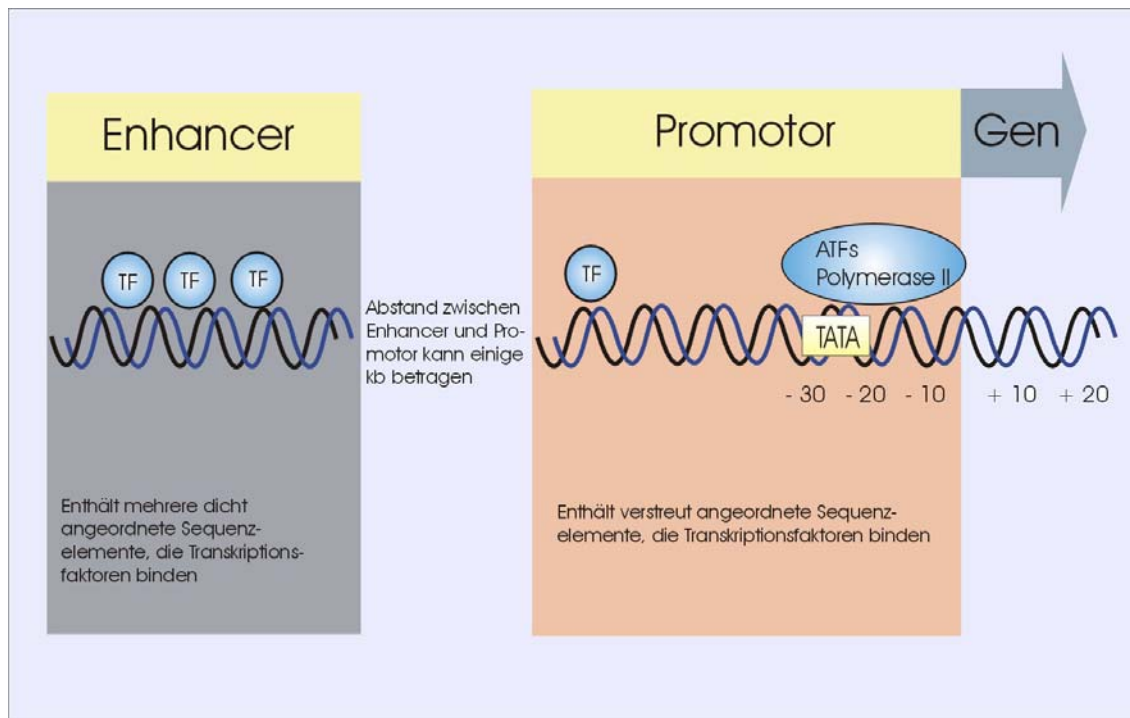


Abbildung 3:

Schematische Darstellung der regulatorischen Elemente eines eukaryontischen Gens. TF = Transkriptionsfaktor. ATF = allgemeine Transkriptionsfaktoren. kb = Kilobasen (Abb. modifiziert nach: Lewin, 2002)

1.4 Regulatorische Elemente des EPO-Gens

Erste Hinweise über die Lokalisation der regulatorischen Elemente des EPO-Gens ergab der Vergleich der humanen Sequenz des Gens mit der der Maus. Drei hochkonservierte, jedoch nicht kodierende Bereiche konnten identifiziert werden: der Promotor, das erste Intron sowie eine 140 bp umfassende Region 3' der Polyadenylierungsstelle (Shoemaker und Mitsock, 1986; Galson et al., 1993). Ein 50 bp großes Element dieser 3' angrenzenden Region konnte später durch Analysen mit Reporter-Gen-Experimenten als hypoxisch induzierbarer Enhancer identifiziert werden. Wie es für Enhancer eukaryontischer Gene typisch ist, ist die Aktivität dieses Elementes unabhängig von dessen Polarität und Abstand zum Promotor (Beck et al., 1991; Pugh et al., 1991; Semenza et al., 1991) (Abb. 4).

1.4.1 Enhancer

Genauere Analysen des Enhancers offenbarten drei für die hypoxische Induzierbarkeit notwendige Elemente:

Eine am 5'-Ende gelegene Sequenz (engl. hypoxia response element, HRE) bindet den hypoxisch-induzierbaren-Faktor-1 (HIF-1). Unter Hypoxie, aber auch durch proinflammatorische Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ wird die Bindung von HIF-1 an dieser Stelle induziert (Semenza und Wang, 1992; Hellwig-Burgel et al., 1999).

Von der HIF-Bindungsstelle 4 bp weiter in 3'-Richtung liegt ein zweites Element mit der Sequenz CACA. Die Mutation dieses CACA-Elementes hebt die hypoxische Induzierbarkeit des Enhancers auf. Bisher sind jedoch keine Proteine bekannt, die diese Sequenz binden (Pugh et al., 1994).

Das dritte Element folgt der Consensussequenz eines DR2-Elementes (DR2 = engl. direct repeat of two hexanucleotides separated by two base pairs). Es handelt sich dabei um eine imperfekte, durch 2 bp getrennte, direkte Wiederholung zweier Halbelemente und damit um ein typisches Reaktionselement ligandenaktivierter Transkriptionsfaktoren (Blanchard et al., 1992). DR2-Elemente werden von einer Reihe von ligandenaktivierten Transkriptionsfaktoren als Homo- oder auch als Heterodimere gebunden. Bisher wurde die Bindung von HNF-4 α (= engl. hepatocyte nuclear factor 4 α) und COUP-TF-1 (= engl. chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor 1) als Homodimer, sowie die des Heterodimers RXR/RAR (= engl. retinoid x receptor/retinoic acid receptor) an dieses Element des EPO-Enhancers beschrieben. Die Bindung erfolgt jeweils sauerstoffunabhängig (Galson et al., 1995; Kambe et al., 2000; Makita et al., 2001). Die Mutation dieses DR2-Elementes hebt die hypoxische Induzierbarkeit des EPO-Enhancers auf (Semenza und Wang, 1992) (Abb. 4).

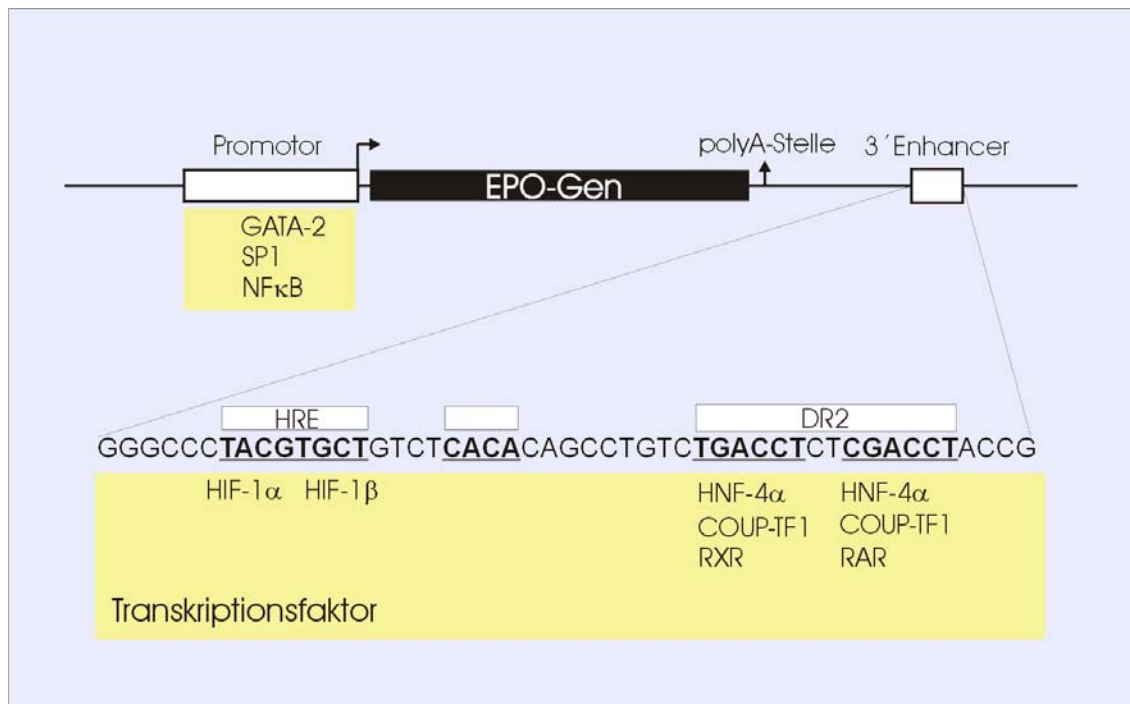


Abbildung 4:

Schematische Darstellung des EPO-Gens. Der EPO-Enhancer ist zur detaillierteren Darstellung vergrößert. Gelb unterlegt sind die bei der Expression des EPO-Gens beteiligten Transkriptionsfaktoren dargestellt.

1.4.2 Promotor

Obwohl sich im EPO-Promotor keine HIF-Bindungsstellen finden, weist er auch für sich alleine betrachtet eine hypoxische Induzierbarkeit auf. Ein in Hep3B-Zellen transient transfizierter Reporter mit Elementen des Promotors zeigte unter hypoxischen Bedingungen eine 10fache Induktion. Synergistisch mit den Elementen des 3'-Enhancers wurde jedoch eine ungefähr 50fache hypoxische Induktion beobachtet (Blanchard et al., 1992).

Der Minimalpromotor umfasst 117 bp in 5'-Richtung des Startpunktes der Transkription. Es handelt sich um einen TATA-losen Promotor. Anstatt der bei Eukaryonten typischerweise an dieser Stelle vorkommenden TATA-Box liegt 30 bp stromaufwärts des Startpunktes ein GATA-Motiv. An dieses Motiv bindet GATA-2, ein negativ regulierender Transkriptionsfaktor. Bei hohem pO_2 wurde in Hep3B-Zellen eine erhöhte Proteinmenge sowie eine verstärkte DNA-Bindungsaktivität von GATA-2 gefunden. Überexpression von GATA-2 verminderte die EPO-Expression hingegen (Imagawa et al., 1997).

Für die hypoxische Induzierbarkeit des Promotors wird insbesondere ein 17 bp umfassendes Segment zwischen den Positionen -61 und -45 verantwortlich gemacht (Gupta und Goldwasser, 1996). Kürzlich wurde gezeigt, dass an dieses Segment der Transkriptionsfaktor SP1 bindet. Dieser Faktor scheint bei der Interaktion des Promotors mit dem weiter in 3'-Richtung liegenden Enhancer beteiligt zu sein (Sanchez-Elsner et al., 2004).

Weiter in 5'-Richtung gelegen finden sich mehrere Bindungsstellen für NF κ B (Lee-Huang et al., 1993). NF κ B ist an der Transkription vieler akute-Phase-Proteine beteiligt und daher ein zentraler Transkriptionsfaktor bei der Vermittlung von Entzündungsreaktionen. In Bezug auf die Transkription des EPO-Gens wird die Funktion von NF κ B kontrovers beurteilt (Figueroa et al., 2002; La Ferla et al., 2002).

1.4.3 Interaktion des 3'-Enhancers mit dem basalen Transkriptionsapparat des Promotors

Für die vollständige hypoxische Induzierbarkeit des EPO-Gens ist ein kooperativer Effekt zwischen dem 3'-Enhancer und dem basalen Transkriptionsapparat des in 5'-Richtung gelegenen Promotors notwendig. Vermittelt wird dieser Effekt unter anderem durch das Co-Aktivatorprotein p300 (Abb. 5).

Der Co-Aktivator p300 ist selbst kein DNA-bindendes Protein, bildet jedoch mit HIF-1 und HNF-4 α einen Komplex (Arany et al., 1996). Einerseits vermittelt p300 den Kontakt zum weiter entfernt liegenden Startpunkt der Transkription, also dem Promotor und stabilisiert dort den Multikomponentenkomplex aus allgemeinen und induzierbaren Transkriptionsfaktoren. Andererseits bewirkt p300 über eine intrinsische Histon-Acetyltransferase-(HAT)-Aktivität eine Veränderung der Chromatinstruktur. Diese beiden Vorgänge sind eng miteinander verbunden: Es wurde beschrieben, dass die Bindung von HIF-1, HNF-4 α und SP1 an p300 dessen HAT-Aktivität zusätzlich erhöht (Soutoglou et al., 2001; Sanchez-Elsner et al., 2004).

Als weiteres bei der Transkription des EPO-Gens beteiligtes Co-Aktivatorprotein wurde SRC-1 (= engl. steroid receptor coactivator - 1) beschrieben (Carrero et al., 2000). SRC-1 gehört mit einigen verwandten Proteinen zu der Familie der p160-Co-Aktivatoren. Auch SRC-1 vermittelt eine intrinsische HAT-Aktivität und ist so an der Formierung des HAT-Komplexes beteiligt. SRC-1 scheint jedoch nicht an einen DNA-bindenden

Transkriptionsfaktor, sondern direkt an den oben beschriebenen Co-Aktivatoren p300 zu binden (Ruas et al., 2004).

Die Funktionsweise der ligandenaktivierten Transkriptionsfaktoren und ihrer Co-Aktivatoren wird im folgenden Kapitel detailliert besprochen.

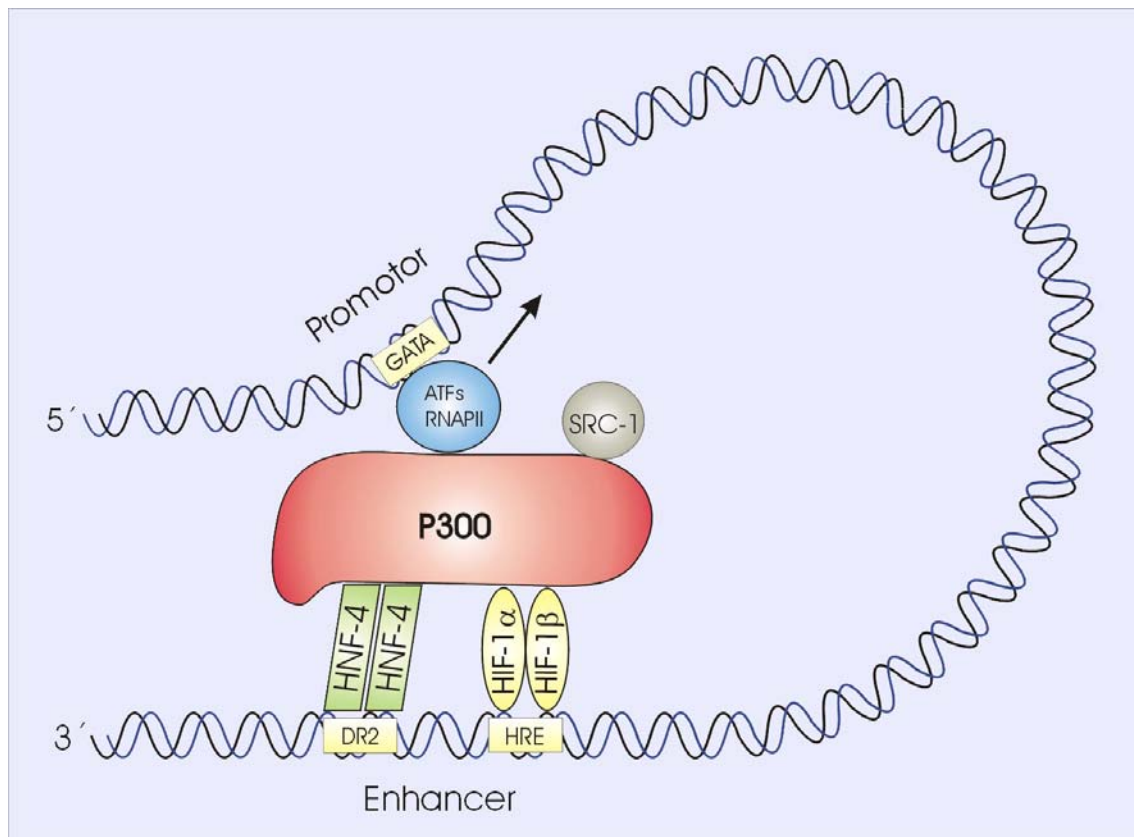


Abbildung 5:

Modell für die Kooperation des EPO-Promotors mit dem 3'-gelegenen Enhancer bei der Initiierung der Transkription. Der Kontakt wird durch das Co-Aktivatorenprotein p300 hergestellt. ATF = allgemeine Transkriptionsfaktoren, RNAPII = RNA-Polymerase-II, HRE = engl. hypoxia response element

1.5 Ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren (NHRs) und ihre Co-Aktivatoren

In vieler Hinsicht sind ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren (engl. nuclear hormone receptors, NHR) nicht von anderen Transkriptionsfaktoren zu unterscheiden. Sie binden als Homo- oder Heterodimere über zwei charakteristische Zinkfingerdomänen selektiv an bestimmte DNA-Sequenzen, so genannte Reaktionselemente (=engl. response element, RE). Dort regulieren sie die Transkription von spezifischen Genen. Der wesentliche Unterschied zu anderen Transkriptionsfaktoren liegt darin, dass ihr Potential zur Transaktivierung über die Bindung eines spezifischen Liganden an eine Ligandenbindungsdomäne (LBD) gesteuert wird (Freedman, 1999; Chen et al., 2003).

In Abwesenheit eines Liganden liegt der NHR in einem Komplex mit einem Repressorprotein vor. Die Ligandenbindung ändert jedoch die Konformation des NHR, wodurch der Co-Repressor dissoziiert. Nun kann ein Co-Aktivatorprotein an den freien NHR binden (Glass und Rosenfeld, 2000).

Ursprünglich wurden Co-Aktivatoren als Proteine identifiziert, die nicht selbst DNA binden, jedoch den Kontakt zwischen Upstream-Faktoren und dem basalen Transkriptionsapparat des Promotors herstellen. Dieses Konzept wurde durch die Entdeckung erweitert, dass viele Co-Aktivatoren, so auch p300 und SRC-1, intrinsische Histon-Acetyltransferase-(HAT)-Aktivität besitzen (Utley et al., 1998). Co-Aktivatoren mit intrinsischer HAT-Aktivität sind in der Lage, weitere Proteine mit HAT-Aktivität zu einem HAT-Komplex zu formieren. Gebunden an ein spezifisches DNA-Reaktionselement werden durch diesen Komplex Histone im Bereich eines bestimmten Promotors acetyliert. Dadurch wird wiederum die Konformation des Chromatins verändert und die Transkription des entsprechenden Gens aktiviert (Cheung et al., 2000).

NHR sind also sowohl ligandenabhängige als auch reaktionselementspezifische Transkriptionsfaktoren, die über die Rekrutierung von Co-Repressor- oder Co-Aktivatorproteinen die Transkription beeinflussen (Abb. 6).

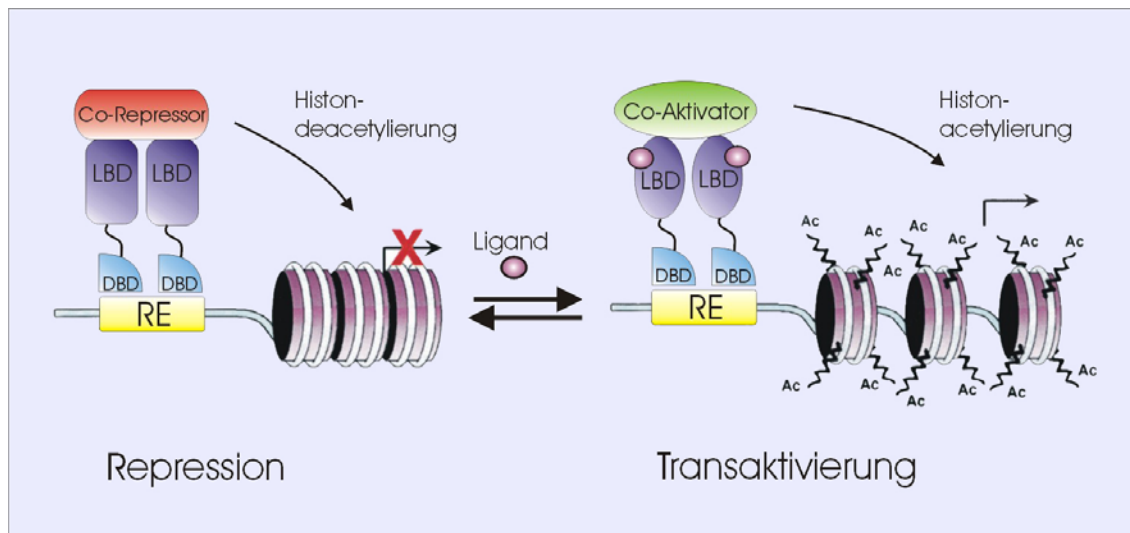


Abbildung 6:

Acetylierung von Histonen geht mit einer verstärkten Promotoraktivität einher. Co-Aktivatoren verändern die Chromatinstruktur durch Histonacetylierung. Co-Repressoren vermindern die Promoteraktivität durch Deacetylierung. DBD = DNA-Bindungsdomäne, LBD = Ligandenbindungsdomäne, Ac = Acetyl, RE = Reaktionselement

Die Liganden von NHR sind kleine, hydrophobe Signalmoleküle, die direkt durch die Plasmamembran der Zielzelle diffundieren und dann einen NHR binden. Zu diesen Signalmolekülen gehören Steroidhormone, Schilddrüsenhormone, Retinoide (Derivate von Vitamin A) und Vitamin D. Die Superfamilie der NHR enthält jedoch auch einige Rezeptorproteine, die eher von intrazellulären Metaboliten als von sezernierten Signalmolekülen aktiviert werden. Viele Familienmitglieder wurden nur durch DNA-Sequenzierung identifiziert und ihr Ligand ist bisher noch nicht gefunden worden. Sie werden deshalb den *Orphan-* (= engl. Waise) Rezeptoren zugewiesen (Aranda und Pascual, 2001).

Das DR2-Element des EPO-Enhancers ist ein typisches Reaktionselement ligandenaktivierter Transkriptionsfaktoren. In den beiden folgenden Kapiteln werden NHR, die nach Literaturangaben das DR2-Element des EPO-Enhancers binden, detailliert besprochen.

1.5.1 Hepatocyte nuclear factor – 4 (HNF-4)

HNF-4 (= engl. hepatocyte nuclear factor-4) wurde erstmals als DNA-bindendes Protein in Leberzellextrakten beschrieben. Die DNA-Bindung erfolgte dabei an regulatorische Abschnitte, welche für die Transkription zweier leberspezifischer Gene notwendig sind: Transthyretin und Apolipoprotein CIII (Costa et al., 1989). Nach Proteinaufreinigung und Klonierung wurde festgestellt, dass HNF-4 ein Mitglied der Superfamilie der NHRs ist (Sladek et al., 1990). Die Frage, ob inzwischen ein Ligand für HNF-4 identifiziert wurde oder ob HNF-4 weiterhin als *Orphan*-Rezeptor zu bezeichnen werden sollte, wird momentan kontrovers diskutiert: Zwar wurden 1998 Acyl-CoA-Thioester als endogener Ligand für HNF-4 beschrieben (Hertz et al., 1998), jedoch beeinflussen diese Verbindungen nicht die Bindung von Co-Aktivator- oder Co-Repressorproteinen an HNF-4. Sie scheinen also keine Liganden im Sinne des oben beschriebenen Modells über die Funktionsweise von NHRs zu sein (Bogan et al., 2000; Sladek, 2002). Darüber hinaus wurde beschrieben, dass die zur Behandlung der Hyperlipidämie eingesetzten Fibrate an HNF-4 binden und so dessen Aktivität herabsetzen. Sie scheinen also als synthetischer, antagonistischer Ligand zu wirken (Hertz et al., 2001).

Das erste identifizierte HNF-4-Gen wird inzwischen als HNF-4 α bezeichnet, da zwei ähnliche Gene, HNF-4 β und HNF-4 γ , beschrieben worden sind (Drewes et al., 1996; Holewa et al., 1997). Über diese beiden Gene ist bisher jedoch noch deutlich weniger bekannt als über HNF-4 α selbst.

1.5.1.1 Gewebeverteilung und Zielgene

HNF-4 α ist nicht, wie zunächst angenommen, ein Transkriptionsfaktor, der ausschließlich hepatische Gene reguliert. Zusätzlich zu relativ hohen mRNA- und Proteinmengen in der Leber wurde HNF-4 α -Expression auch in Niere, Dünndarm, Colon, Magen und Pankreas gefunden (Sladek, 1993; Miquerol et al., 1994). Jedoch werden die meisten der inzwischen über 55 identifizierten Zielgene hauptsächlich in der Leber exprimiert. Obwohl gerade auch in der Niere große HNF-4 Proteinmengen gefunden werden, ist EPO das bisher einzig bekannte HNF-4 α -Zielgen, welches überwiegend dort exprimiert wird (Galson et al., 1995).

Nach ihrer Funktion können die Zielgene in verschiedenen Gruppen eingeteilt werden. Abgesehen von dem EPO-Gen sind die am besten untersuchten Zielgene an

Glukosestoffwechsel (z.B. Phosphoenolpyruvatkinase, Aldolase B), Lipidtransport (z.B. Apolipoprotein-Gene) und Blutgerinnung (Gerinnungsfaktoren) beteiligt. Bei den meisten HNF-4 α -Bindungsstellen dieser Zielgene handelt sich um eine durch ein oder zwei bp getrennte, direkte Wiederholung zweier Hexanukleotide, so genannte DR1- bzw. DR2-Elemente. HNF-4 α ist hauptsächlich im Zellkern lokalisiert und bindet diese Elemente ausschließlich als Homodimer (Fraser et al., 1998).

1.5.1.2 Zusammenhang zwischen HNF-4 α , Zielgenen und Erkrankungen

Mutationen der HNF-4 α -Bindungsstellen wurden direkt mit verschiedenen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Am besten untersucht ist in diesem Zusammenhang die Bluterkrankheit Hämophilie B Leyden (Reijnen et al., 1992). Hingegen stellen Mutationen im HNF-4 α -Gen selbst die molekulare Ursache des MODY-1 (=engl. maturity onset diabetes of the young) dar (Yamagata et al., 1996). Andere Zielgene lassen einen Beziehung mit weiteren Erkrankungen wie z.B. Atherosklerose und Anämie vermuten (Abb. 7).

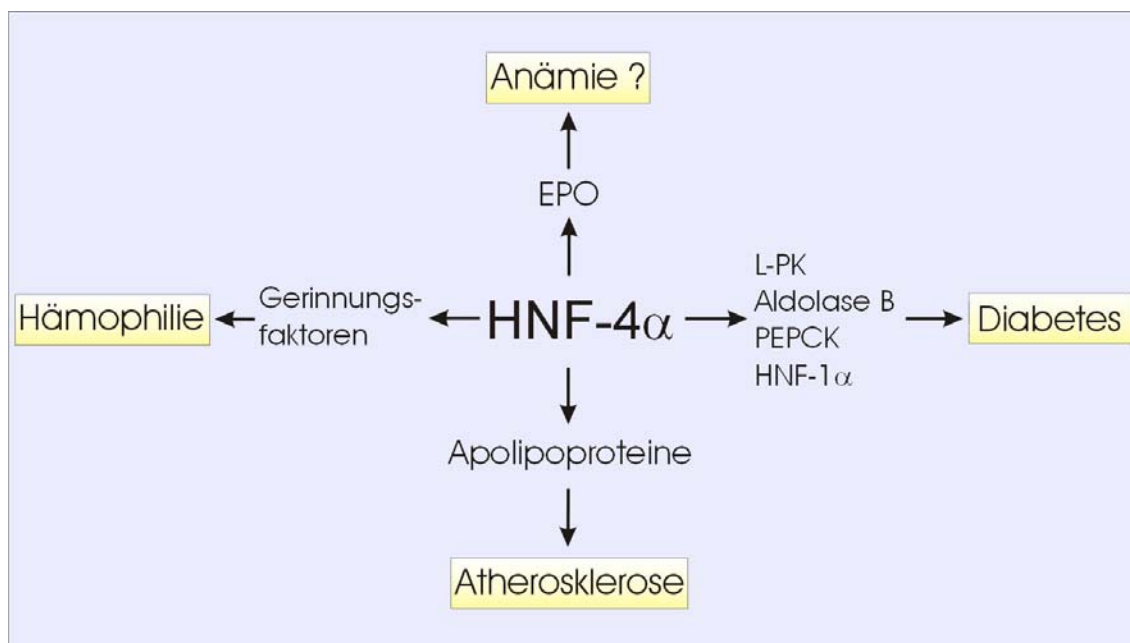


Abbildung 7:

Der Zusammenhang zwischen HNF-4 α , ausgewählten Zielgenen und bestimmten Erkrankungen. L-PK = Leber-Pyruvatkinase, PEPCK = Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase, HNF-1 α = hepatocyte nuclear factor-1 α .

1.5.2 Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF)

Auch COUP-TFs werden zu den *Orphan*-Rezeptoren der NHR-Superfamilie gezählt (Wang et al., 1989). Erstmals wurde COUP-TF als Aktivator des Ovalbumin-Gens beschrieben (Pastorcic et al., 1986). Inzwischen sind zwei COUP-TF-Gene identifiziert worden, die untereinander große Homologien aufweisen und als COUP-TF1 und COUP-TF2 bezeichnet werden (Ladiaz und Karathanasis, 1991; Wang et al., 1991).

In den meisten Fällen fungieren COUP-TFs jedoch als transkriptionelle Repressoren. COUP-TFs binden als Homodimere kompetitiv an bestimmte DNA-Sequenzen und verdrängen dort andere NHRs wie HNF-4 α , retinoic acid receptor (RAR), retinoic x receptor (RXR) und peroxisome proliferator acitvated receptors (PPARs). Dieser Vorgang wird als *passive Repression* bezeichnet. Ein weiterer Mechanismus der passiven Repression besteht darin, dass COUP-TFs Heterodimere mit RXR bilden und so die Verfügbarkeit von RXR für andere NHRs wie z.B. PPARs und RAR vermindern. Diese NHRs benötigen RXR als Dimerisierungspartner, um an ihren Reaktionselementen binden zu können. Durch Konkurrenz um DNA-Bindungsstellen oder um RXR als Dimerisierungspartner vermindern COUP-TFs also indirekt die Fähigkeit einer Untergruppe von NHRs, ihre Zielgene zu aktivieren (Park et al., 2003).

Darüber hinaus verfügen COUP-TFs über eine *aktive* Repressionsdomäne. Diese Repressionsdomäne ist in der Lage Co-Repressorproteine zu binden, die ihrerseits Histondeacetylaseaktivität an Promotoren rekrutieren und so Transkription vermindern (Park et al., 2003).

COUP-TFs bindet das DR2-Element des EPO-Enhancers. Auch in Bezug auf die Transkription des EPO-Gens scheinen COUP-TFs eine negativ modulierende Rolle zu spielen: In Hep3B- und Hela-Zellen resultierte die Co-Transfektion eines EPO-Reporterplasmids zusammen mit einem COUP-TF1-Expressionsplasmid in einer stark verminderten hypoxischen Induzierbarkeit des Reporters. Co-Transfektion eines HNF-4 α -Expressionsplasmids hingegen verstärkte die hypoxische Induzierbarkeit des Reporters (Galson et al., 1995).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die EPO-Expression wird durch proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β vermindert, was als ein wesentlicher Pathomechanismus der Anämie chronischer Erkrankungen (ACD) angesehen wird. Auf molekularer Ebene ist dieser Vorgang weitgehend unklar.

Für die Funktion des EPO-Enhancers ist ein Zusammenspiel von mehreren Transkriptionsfaktoren, insbesondere von HIF-1 und HNF-4 α notwendig (Kap. 1.4.1). Vor einiger Zeit wurde in unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass die DNA-Bindungsaktivität von HIF-1 α durch IL-1 β erhöht wird (Hellwig-Burgel et al., 1999). Da HIF-1 α die EPO-Expression aktiviert, konnte durch diesen überraschenden Befund die Verminderung der EPO-Expression durch proinflammatorische Zytokine nicht erklärt werden.

Die Wirkung von IL-1 β auf die Aktivität des EPO-Enhancers ist bisher unbekannt. Diese Arbeit soll klären, ob IL-1 β die Verminderung der EPO-Expression über eine Herabsetzung der Aktivität des EPO-Enhancers bewirkt. Insbesondere die Bedeutung des Transkriptionsfaktors HNF-4 α soll untersucht werden. HNF-4 α wird bisher als ein konstitutiver, für die Gewebespezifität der EPO-Expression verantwortlicher Transkriptionsfaktor angesehen; eine Regulation der EPO-Expression über HNF-4 α ist bisher nicht beschrieben worden.

Die Hypothese, dass die Stimulation mit IL-1 β über eine Verminderung der Aktivität von HNF-4 α die Wirkung des EPO-Enhancers trotz der gegensätzlichen Auswirkung auf HIF-1 α herabsetzt, soll in dieser Arbeit mit Hilfe molekularbiologischer Methoden an einem Zellkulturmodell untersucht werden (Abb. 8).

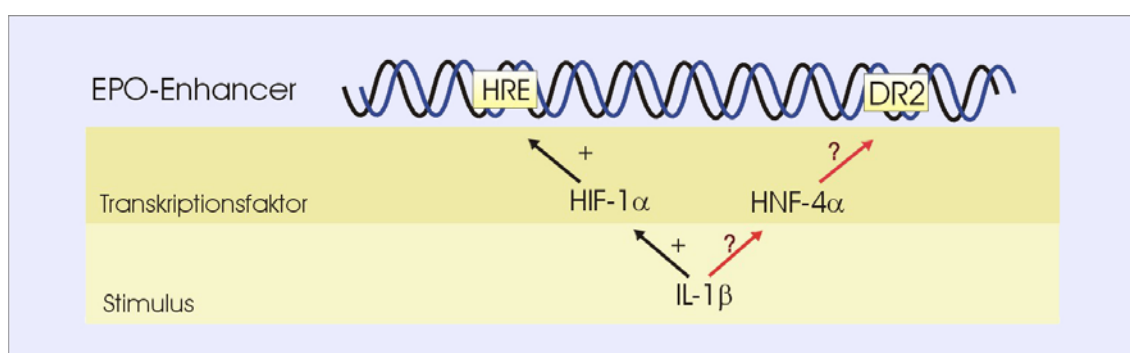


Abbildung 8:

Mögliche Angriffspunkte von IL-1 β bei der Modulation der Aktivität des EPO-Enhancers. Die in dieser Arbeit zu untersuchenden Beziehungen sind durch rote Pfeile dargestellt.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Als Modell wurde die humane Hepatomzelllinie HepG2 verwendet, die von der Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ GmbH, Braunschweig) erworben wurde. Diese adhärent wachsende Zelllinie wurde aus einem hepatozellulären Karzinom isoliert (Aden et al., 1979). Die Zellen produzieren nicht nur unter normoxischen Bedingungen EPO, sondern reagieren darüber hinaus unter Hypoxie mit einer dreifachen Steigerung der EPO-Produktion sowie einer Erhöhung des EPO-mRNA-Spiegels (Goldberg et al., 1987).

Für Reporter-Gen-Untersuchungen wurde zusätzlich die humane Osteosarkomzelllinie U2OS verwendet, die von der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland, USA) erworben wurde.

2.1.1 Kulturbedingungen

Für HepG2-Zellen wurde als Nährmedium RPMI-1640-Medium (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) unter Zusatz von 10 % fötalem Kälberserum (FCS, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen) verwendet. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einer CO₂-Konzentration von 5 % in einem Inkubator (Heraeus, Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold).

U2OS-Zellen wurden unter gleichen Bedingungen in Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM, Invitrogen GmbH) unter Zusatz von 10% FCS kultiviert.

Die Versuche wurden entweder bei 20 % (Normoxie) oder 1-3 % Sauerstoff (Hypoxie) durchgeführt. Normobare, hypoxische Versuchsbedingungen wurden durch Erhöhen des Stickstoffanteils auf Kosten des Sauerstoffs im Gasgemisch erreicht.

2.1.2 Passagieren

Kultiviert wurden die Zellen in 75 cm²-Zellkulturflaschen (Nalge Nunc, Hamburg). Konfluent gewachsene Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen passagiert: Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen wurden mit 0,05 % Trypsinlösung (Sigma-

Aldrich GmbH) bei 37°C inkubiert. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von frischem Medium gestoppt. Daraufhin wurde die Zellsuspension im Verhältnis 1:4 subkultiviert.

2.1.3 Versuchsdurchführung

Für die Herstellung von Kernextrakten wurden die Zellen für 48 h auf Petrischalen mit 15 cm Durchmesser kultiviert (Greiner Bio-One AG, Frickenhausen). 16 h vor dem Versuch erhielten die Zellen nochmals frisches Medium ohne FCS-Zusatz.

Für Reporter-Gen-Versuche und zur EPO-Bestimmung im ELISA wurden die Zellen 24 h vor Versuchsdurchführung auf „6-well-Platten“ (Nalge Nunc) ausgesät.

Zur mRNA-Isolierung wurden die Zellen auf „24-well-Platten“ kultiviert.

2.2 Herstellen von Kernextrakten

Um DNA-bindende Proteine im Western-Blot (Kap. 2.4) oder im Gelverzögerungstest (Kap. 2.5) untersuchen zu können, wurden Kernextrakte aus den verwendeten Zellen hergestellt. Hierzu wurde die von Semenza und Wang 1992 beschriebene Methode modifiziert angewendet (Semenza und Wang, 1992). Die Zellen wurden nach der Entnahme aus dem Inkubator sofort auf Eis gestellt, zweimal mit eiskaltem PBS (engl. Phosphate Buffered Saline, Kap. 2.9.1) gewaschen, daraufhin mit einem Zellschaber von den Petrischalen abgelöst und mit einer 4-ml-Pipette in auf Eis lagernde 15-ml-Röhrchen (Greiner Bio-One AG) überführt. Anschließend wurde die Zellsuspension 5 min bei 4 °C und 400x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Um die Zellmembranen zu zerstören, wurde das Sediment in 1 ml hypotonem Puffer A (10 mM Tris pH 7,8; 1,5 mM MgCl₂; 10 mM KCl) durch Vortexen resuspendiert, die Zellsuspension in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und für 15 min auf Eis gelagert. Die Zellyse wurde durch Anfärben einer kleinen Probe mit Trypan-Blau unter dem Mikroskop überprüft. Es wurde erneut bei 3500x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert und der Überstand möglichst vollständig verworfen. Um die Kernproteine in wässrige Lösung zu bringen wurden jeweils 150 µl hochmolarer Puffer C (20 mM Tris pH 7,8; 420 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 20 % Glycerin) zugegeben, der Niederschlag darin vorsichtig gelöst und die Suspension 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellkerne wurden bei 12000x g abzentrifugiert, die Überstände mit den gelösten Kernproteinen abgenommen und bei -80 °C gelagert.

Um die Stabilität der Kernproteine zu gewährleisten, wurden zu beiden Puffern kurz vor der Verwendung Protease- und Phosphataseinhibitoren (2 µg/ml Aprotinin, 10 µg/ml Leupeptin; 20 µg/ml Pepstatin; 0,5 mM Benzamidin; 0,4 mM PMSF; 1 mM Natrium-ortho-Vanadat; 10 mM β-Glycerolphosphat; 2 mM Levamisol), sowie 0,5 mM DTT als Reduktionsmittel zugegeben.

2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Diese Methode (Bradford, 1976) basiert auf einer Verschiebung des Absorptions-Maximum von Comassie Blue G250 von 465 nm nach 595 nm, welche durch Bindung dieses Farbstoffs an Proteine hervorgerufen wird.

Der Test wurde auf einer 96-Well-Mikrotiterplatte als Doppelbestimmung durchgeführt. Als Proteinstandardreihe wurden 0 bis 10 µg BSA (Sigma-Aldrich GmbH) vorgelegt. Dann wurden jeweils 2 µl Kernextrakt bzw. Gesamtzelllysate in die Vertiefungen pipettiert. Zu jeder Vertiefung wurden 200 µl Bradford-Reagenz zugegeben. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Durch Vergleich der gemittelten Messwerte mit der anhand der Proteinstandards erstellten Kalibriergeraden konnte die Proteinkonzentration der Kernextrakte ermittelt werden.

2.4 Proteinnachweis im Western-Blot

2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Molekulargewichtsbestimmung wurde die SDS-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) unter Verwendung der Mini-PROTEAN-II-Elektrophoresekammer (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) genutzt. Die Proteine werden dabei in einer wässrigen Lösung aufgenommen, die ein negativ geladenes Detergens, das Natriumdodecylsulfat (engl. Sodium Dodecyl Sulfate oder SDS) enthält. SDS lagert sich an Proteine an und denaturiert diese. Die resultierenden Komplexe erhalten durch die Sulfatgruppen eine gleichmäßig verteilte negative Ladung. Die Laufgeschwindigkeit der Proteine im Gel ist nun vor allem von der relativen Molekülmasse abhängig.

Als Träger der Elektrophorese dient ein hochvernetztes Polyacrylamidgel. Um eine schärfere Bandentrennung zu erreichen, wird über das Trenngel ein Sammelgel gegossen. Die Matrix im Sammelgel besitzt größere Poren und einen anderen pH-Wert als das Trenngel. Im Sammelgel wandern die Proteine schnell und ohne eine Auftrennung als scharfe Bande. Mit Erreichen der Grenzfläche zum Trenngel wird ihre Geschwindigkeit drastisch, und nun abhängig von der Größe, verringert.

2.4.1.1 Herstellung der Gele

Zur Herstellung der selbstgegossenen Polyacrylamidgele wurde das mit der Mini-PROTEAN-II-Elektrophoresekammer gelieferte Material verwendet. Zur Detektion von HNF-4 α wurden ein 7,5 %iges, von HIF-1 α ein 5 %iges Trenngel gewählt, wodurch eine gute Auftrennung der Proteine erreicht wurde.

Die Trenngellösung wurde in die Apparatur gefüllt und anschließend mit 2-Butanol überschichtet. Nach der Polymerisation (ca. 45 min) wurde das 2-Butanol entfernt, die Sammelgellösung auf das Trenngel geschichtet und ein Probenkamm zur Ausformung der Taschen eingesteckt.

2.4.1.2 Probenvorbereitung

Zur Detektion von HNF-4 α wurden 8 μ g Protein je Probe, zur Detektion von HIF-1 α jeweils 20 μ g Protein mit Ladepuffer im Verhältnis 1:1 bis 1:3 versetzt, so dass ein Gesamtvolumen von 30-40 μ l je Probe entstand. Der Ladepuffer enthielt β -Mercaptoethanol zur Denaturierung der Proteine. Die mit Ladepuffer vermischten Proben wurden auf einem Heizblock für 5 min bei 95 °C erhitzt, kurz anzentrifugiert und mit Bromphenolblau semiquantitativ angefärbt, um Hinweise auf das elektrophoretische Verhalten der Proteine im Gel zu erhalten.

2.4.1.3 Durchführung der Gelelektrophorese

In der Mini-PROTEAN-II-Kammer wurde die Elektrophorese bei einer Spannung von 70 V über einen Zeitraum von ca. 2 Stunden durchgeführt. Zur Abschätzung der molekularen Masse diente ein handelsüblicher Längenmarker mit den Standardmassen 250 kD, 160 kD, 105 kD 75 kD und 50 kD (BioRad Laboratories).

2.4.2 Western-Blot (semi-dry blot)

Um die über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese getrennten Proteine immunologischen Nachweisverfahren zugänglich machen zu können, mussten die Proteine zunächst aus dem Gel auf eine geeignete Membran überführt werden.

Als proteinbindende Membran wurde eine PVDF-Membran gewählt, die kurz vor dem Transfer mit Methanol benetzt und daraufhin 5 min in Blot-Puffer äquilibriert wurde. Das Sammelgel wurde verworfen, das Trenngel vorsichtig aus der Apparatur entfernt und auf die vorbereitete PVDF-Membran gelegt. Gel und Membran wurden beidseits mit jeweils drei Schichten in Blot-Puffer getränkten Filterpapieren eingerahmt, die bei der Elektrophorese als Ionen-Reservoir dienten. Der Transfer erfolgte auf elektrophoretischem Weg im „Semi-dry“-Verfahren (Trans-Blot SD, Semidry Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad Laboratories). Die angelegte Stromstärke wurde entsprechend der Fläche des Blots zwischen den Elektroden eingestellt. Es wurde eine konstante Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ verwendet. Der Blotting-Vorgang wurde nach 45 min beendet.

2.4.3 Antikörperinkubation

Zur Kontrolle des erfolgreichen Proteintransfers wurden die Proteine auf der Membran mit Ponceau-S-Lösung angefärbt. Danach wurde die Membran dreimal für 5 min in 0,05 % Tween/PBS gewaschen und über Nacht in 5 % Trockenmilch/PBS bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ blockiert. Die Proteine der Trockenmilch binden an die Membran und verhindern so ein unspezifisches Binden des zur Detektion verwendeten Antikörpers. Am nächsten Tag wurde dreimal für 10 min mit PBS-T gewaschen und die Membran anschließend für 1,5 h bei Raumtemperatur mit dem jeweiligen Erstantikörper inkubiert: anti-HNF-4 α (Santa Cruz Biotechnology, INC., CA, USA) in einer Verdünnung von 1:200, anti-HIF-1 α (BD Bioscience, Heidelberg) in einer Verdünnung von 1:2000 bzw. anti-SP1 (Santa Cruz Biotechnology, INC) in einer Verdünnung von 1:1000. Danach wurde wiederum dreimal für 10 min mit PBS-T gewaschen und die Membran anschließend mit dem jeweiligen Zweitantikörper für 45 min inkubiert. Als Zweitantikörper wurden ein Rind-Anti-Ziege-Peroxidase-Konjugat für HNF-4 α und ein Rind-Anti-Kaninchen-Peroxidase-Konjugat für HIF-1 α und SP1 jeweils in der Verdünnung von 1:2000 verwendet (beide Santa Cruz Biotechnology, INC).

2.4.4 Nachweis der Peroxidaseaktivität mit dem ECL-Detektionssystem

Das ECL-Western-Blot-Detektionssystem (ECL Western Blotting Kit, Amersham Biosciences Europe, Freiburg) dient dem Nachweis der Aktivität von antikörpergekoppelter Peroxidase. Dabei wird Luminol peroxidasevermittelt durch H_2O_2 oxidiert. Das Reaktionsprodukt befindet sich in einem angeregten Zustand und emittiert bei Rückkehr in den Grundzustand Licht. Diese Chemilumineszenz wird durch Anwesenheit von als Verstärker wirkenden Phenolen um etwa das 1000fache verstärkt. Zur Detektion der Peroxidaseaktivität wurden die Detektionslösungen 1 und 2 im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Membran wurde für 5 min mit dem Gemisch überschichtet, anschließend zwischen zwei durchsichtige Plastikfolien und so auf einen Röntgenfilm gelegt (Agfa-Gevaert AG, Leverkusen). Die Expositionszeit betrug zwischen 1 und 5 min.

2.4.5 Densitometrische Auswertung der Western-Blot-Röntgenfilme

Die entwickelten Western-Blot-Röntgenfilme wurden mit einem Densitometer (Herolab E.A.S.Y., Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch) ausgewertet.

2.5 Gelverzögerungstest (EMSA)

Der Gelverzögerungstest (engl. electrophoretic mobility shift assay, EMSA) wird angewendet, um sequenzspezifisch die DNA-Bindung von Proteinen qualitativ und quantitativ nachzuweisen (Fried und Crothers, 1981; Garner und Revzin, 1981). In diesem Verfahren wird ein kurzes DNA-Fragment bestimmter Länge und Sequenz radioaktiv markiert und dann mit Zellextrakt gemischt. Die Mischung wird auf ein nicht denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Da DNA-Moleküle hochgradig negativ geladen sind, wandern sie in Richtung der positiven Elektrode. Wird das DNA-Fragment von einem Protein gebunden, wird es in Abhängigkeit von der Proteingröße im Gel zurückgehalten.

Spezifität wird entweder in einem Kompetitionsexperiment durch Zugabe von unmarkierten DNA-Fragmenten gleicher Sequenz (Carthew et al., 1985) oder durch die Zugabe von spezifischen Antikörpern (Kristie und Roizman, 1986) nachgewiesen.

Wird ein unmarkiertes DNA-Fragment mit Bindungsstelle für das zu untersuchende Protein (spezifisch) im Überschuss zugegeben, verschwindet die spezifische Bande. Bei Zugabe der gleichen Menge eines Oligonukleotids ohne Bindungsstelle für das DNA-bindende Protein (unspezifisch) bleibt diese Bande unverändert.

Wird ein spezifisch gegen das zu untersuchende Molekül gerichteter Antikörper während der Bindungsreaktion zugegeben, kann es zu zwei Phänomenen kommen: Bindet der Antikörper an den für die DNA-Bindung zuständigen Abschnitt des Proteins, findet keine DNA-Bindung statt. Die spezifische Bande verschwindet, weil die markierte Sequenz nicht mehr durch das DNA-bindende Protein im Gel-Lauf zurückgehalten wird. Bindet der Antikörper jedoch an einen anderen Teil des zu untersuchenden Proteins, verhindert er die Bindung dieses Proteins an die markierte DNA-Sequenz nicht. Er verlangsamt jedoch den Gel-Lauf dieses Komplexes, es entsteht ein so genannter „supershift“.

Die Oligonukleotide wurden von MWG bezogen (MWG Biotech AG, Ebersberg). Die DR2 Sequenz entstammt dem EPO-Enhancer. Für Kompetitionsexperimente wurden die HNF-4 α -Bindungsstelle eines regulatorischen Elementes für Schilddrüsenhormone (Thyroid Hormone Response Element, TRE) verwendet (Hall et al., 1995).

Für Supershift-Experimente wurde ein anti-HNF-4 α -Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, INC) verwendet. Das polyklonale COUP-TF Antiserum war ein Geschenk von Prof. Ming Jer Tsai, Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA.

2.5.1 Markierung der Oligonukleotide mit [^{32}P]

Um die 5'-Enden der Oligonukleotide radioaktiv zu markieren, wurden 2 pmol einzelsträngige DNA mit 1 μl T4-Polynukleotidkinase (MBI Fermentas GmbH, St Leon-Rot), Polynukleotidkinasepuffer und 1,1 MBq γ [^{32}P] ATP (New England Nuclear, Köln) in einem Gesamtvolumen von 10 μl bei 37 °C für 30 min inkubiert. Danach wurde das Enzym über 5 Minuten bei 90 °C inaktiviert. Es wurden 2 pmol des gegensträngigen Oligonukleotids und 1 μl MgCl_2 (10 mM) zugegeben und der Ansatz über Nacht auf Raumtemperatur abgekühlt.

Die gewählten Reaktionsbedingungen erlaubten ausschließlich die vorwärts-Reaktion der T4-Polynukleotidkinase. Da der größte Teil des [^{32}P] nicht in das Nukleotid eingebaut wurde, musste die ungebundene Radioaktivität durch Zentrifugieren in einer mit Sephadex G25 (Pharmacia-Pfizer, Uppsala, Schweden) gefüllten Säule entfernt werden. Der radioaktive Einbau wurde mit einem Szintillationszähler überprüft (Wallac 1409 DAS

Liquid Scintillation Counter, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA, USA)

2.5.2 Bindungsreaktion und Elektrophorese

Jeder Reaktionsansatz enthielt das mit [^{32}P] markierte Oligonukleotid in einer Aktivität von 10^4 cpm, 4 μg Protein aus HepG2 Kernextrakten, 1 μg poly(dIdC), 3,75 μg BSA, 5 % (V/V) Glycerin, 5 mM Tris pH 7,5, 50 mM NaCl, 0,375 mM MgCl_2 , 105 mM KCl, 1 mM EDTA und 1 mM DTT in einem Gesamtvolumen von 20 μl . Nach 15 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben in einem 6%igen Polyacrylamidgel mit 0,3 x Tris-Borsäure-EDTA (TBE) als Laufpuffer bei Raumtemperatur elektrophoretisch aufgetrennt (150 V/2 h).

Für Konkurrenzexperimente wurden vor der Zugabe des markierten Oligonukleotids unmarkierte doppelsträngige Oligonukleotide in 250fachem Überschuss zugegeben.

Für Supershift-Experimente wurde die Bindungsreaktion wie oben beschrieben durchgeführt. Nach der Inkubation des markierten Oligonukleotids wurden 1 μl anti-HNF-4 α oder 1 μl COUP-TF-Antiserum zugegeben und zusätzlich für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert.

2.5.3 Auswertung auf dem Phosphorimager

Das Gel wurde auf einem Vakuumtrockner (Slab Gel Dryer SGD 2000, Werner Hassa GmbH, Lübeck) getrocknet und über Nacht auf einer „Imaging Plate“ (BAS-MS2340, Fujifilm Europe, Düsseldorf) exponiert. Diese wurde dann mit einem Phosphorimager (BAS 1000 Phosphorimager, Fujifilm Europe) untersucht.

2.6 mRNA-Isolierung und reverse-Transkription (cDNA-Synthese)

Für die Isolierung der mRNA wurden HepG2-Zellen auf „24-well-Platten“ kultiviert. Die mRNA wurde mit der ABI Prism 6100 Nucleic Acid PrepStation (Applied Biosystems, Darmstadt) nach Herstellerangaben extrahiert.

Jeweils 1 µg der gewonnenen RNA wurde mit Hilfe von *Transcriptor reverse transcriptase* (Roche, Mannheim) gemäß Herstellerangaben in einem Ansatz von 25 µl in cDNA umgeschrieben. Die Reaktionszeiten betragen 45 min bei 42 °C, 45 min bei 55 °C und 10 min bei 99 °C. Anschließend wurde das Reaktionsprodukt auf 4 °C abgekühlt.

2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Standardmethode, welche zur selektiven Vervielfältigung bestimmter DNA-Abschnitte verwendet wird (Saiki et al., 1985).

2.7.1 Reverse-Transkription (RT)-PCR

Um mRNA quantifizieren zu können, wird bei dieser Methode RNA mittels einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die synthetisierte cDNA wird als Template für eine PCR verwendet (Sellner et al., 1992).

2.7.1.1 Primer

HNF-4α-5for-Kpn I

5' - GGG GTA CCA TGG CCG ACT ACA GTG CTG CAC TG -3'

HNF-4α-3rev-BamH I

5' - CGG GAT CCC GAT AAC TTC CTG CTT GGT GAT GG -3'

2.7.1.2 Reaktionsbedingungen

Isolierung von mRNA aus HepG2-Zellen und reverse-Transkription wurden wie in Kap. 2.6 beschrieben durchgeführt. Die PCR-Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 50 μ l angesetzt. Die verwendete Taq-Polymerase mit entsprechendem Reaktionspuffer wurde von Invitrogen GmbH bezogen. Die Endkonzentration von $MgCl_2$ im Reaktionsansatz wurde auf 3 mM eingestellt.

Das PCR-Programm beinhaltete folgende Schritte: Denaturierung bei 95 °C für 2,5 min, anschließend 35 Amplifikationszyklen bestehend aus Annealing bei 56 °C für 45 sec, Elongation bei 72 °C für 1,5 min und Denaturierung bei 95 °C für 45 sec.

2.7.2 Realtime-PCR

Die Realtime-PCR-Technologie erlaubt eine quantitative Echtzeitanalyse der PCR über die Messung von induzierten Fluoreszenzsignalen. Im Gegensatz zu herkömmlichen PCR-Methoden, bei denen lediglich eine Endpunktanalyse stattfindet, wird bei der Realtime-PCR das Reaktionsprodukt jeder Probe kontinuierlich quantifiziert, wodurch ein Rückschluss auf die Ausgangsmenge an DNA möglich ist (Gibson et al., 1996; Bustin, 2002).

2.7.2.1 Messprinzipien

SYBR-Green:

SYBR-Green-I ist ein interkalierender Fluoreszenzfarbstoff. Bindet SYBR-Green an doppelsträngige DNA, wird die emittierte Fluoreszenz bei gleicher Anregungsintensität um ein vielfaches verstärkt. Die Intensität des Fluoreszenzsignals ist direkt proportional zu der Menge an doppelsträngiger DNA.

Schließt man an die Amplifikation noch ein so genanntes Schmelzprogramm an, kann ein PCR-Produkt an Hand seines spezifischen Schmelzpunktes identifiziert werden. Die Temperatur wird hierbei sukzessive erhöht und gleichzeitig kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen. Schmilzt der DNA-Doppelstrang, dissoziiert SYBR-Green von der DNA, sodass die Intensität des SYBR-Green-Fluoreszenzsignals stark abnimmt. Auf diese Weise kann das Verhältnis von spezifischem Produkt zu unspezifischen Amplifikaten abgeschätzt werden.

TaqMan:

Eine Möglichkeit, während der PCR gezielt nur das gewünschte PCR-Produkt nachzuweisen, bieten so genannte TaqMan-Sonden, die mit einem mittleren Bereich der Template-DNA hybridisieren. Sie tragen an ihrem einen Ende einen fluoreszierenden Reporterfarbstoff und am anderen Ende einen Quencher. Quencher sind Moleküle, welche die Fluoreszenz von Farbstoffen in ihrer Nähe abfangen. Wenn die intakte Sonde durch Licht einer Wellenlänge von 488 nm angeregt wird, wird die Fluoreszenz-Emission des Reporterfarbstoffs durch die räumliche Nähe zu dem Quencherfarbstoff unterdrückt. Während der PCR-Reaktion wird die hybridisierte DNA-Sonde durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase zerschnitten. Durch die Sondenhydrolyse wird die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher unterbrochen und der Reporterfarbstoff kann das Fluoreszenzlicht emittieren. Auf diese Weise wird die Fluoreszenz des Farbstoffes nur sichtbar, wenn die Polymerase tatsächlich den gewünschten DNA-Strang kopiert hat.

2.7.2.2 Primer und Sonden

Zur Amplifikation und Quantifizierung von EPO- und HNF-4 α -cDNA wurden kommerziell erhältliche *Assay-on-Demand gene expression reagents* (Applied Biosystems) verwendet. Jeder Assay-on-Demand bestand aus Forward- und Reverse-Primer sowie einer spezifischen TaqMan®-Sonde. Folgende Assays wurden verwendet:

HS00230853_m1 für HNF-4 α

HS00171267_m1 für EPO

Primersequenzen für L28:

L28forward48: 5'- ATG GTC GTG CGG AAC TGC T -3'

L28reverse149: 5'- TTG TAG CGG AAG GAA TTG CG -3'

2.7.2.3 Reaktionsbedingungen

Isolierung von mRNA aus HepG2-Zellen sowie reverse-Transkription wurden wie in Kapitel 2.6 beschrieben durchgeführt. 5 μ l der so gewonnenen cDNA wurden als Template für die PCR-Reaktion eingesetzt. Für die Quantifizierung von EPO- und HNF-4 α -cDNA

wurden Primer sowie TaqMan-Sonden der kommerziell bezogenen *Assay-on-Demand gene expression reagents* (Applied Biosystems) verwendet. Der Reaktionsansatz wurde gemäß Herstellerangaben mit dem TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) in einem Gesamtvolumen von 25 µl hergestellt.

Zur Normalisierung wurde das *Houskeeping*-Gen L28 quantifiziert, welches für ein ribosomales Protein kodiert. Der PCR-Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 25 µl mit einem kommerziell erhältlichen SYBR-Green-Kit (Eurogentech, Seraing, Belgien) den Herstellerangaben entsprechend angesetzt. Dazu wurden 5 µl einer 1:5000 Verdünnung der entsprechenden cDNA als Template eingesetzt.

Es wurde eine 2-Stufen-PCR mit einem ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) durchgeführt. Nach 2 min bei 50°C wurde die cDNA über 10 min bei 95°C denaturiert. Die Amplifikation erfolgte während 40 Zyklen bestehend aus Denaturierung bei 95°C für 15 sec und Primer-Annealing bei 60°C für 1 min.

Anschließend wurde zur Kontrolle der Spezifität in einer Schmelzpunkanalyse die Dissoziationskurve für SYBR-Green aufgenommen sowie eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

2.7.2.4 Quantifizierung

Die Auswertung der Analyse erfolgte semiquantitativ über den so genannten CT-Wert (= engl. threshold cycle) nach der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode. Der CT-Wert drückt die Zyklenzahl aus, bei der zum ersten Mal ein Anstieg der Reporter-Fluoreszenz über das Grundrauschen ermittelt wird.

2.8 Reporter-Gen-Untersuchungen

Genetische Reporter-Systeme werden dazu genutzt, eukaryontische Genexpression und -regulation zu untersuchen. Typischerweise wird ein Expressionsvektor in Zellen transfiziert, auf dem sich ein Reporter-Gen zusammen mit einem Promotor befindet.

2.8.1 Konstruktion der EPO-Enhancer-Reporterplasmide

Als Vektor wurde das pGL3-Promotor-Plasmid (pGL3-Promoter-Vector, Promega GmbH, Mannheim) gewählt (Abb.9). Dieses Plasmid enthält die cDNA des Luciferase-Gens von Photinus Pyralis (de Wet et al., 1985), einen SV40-Promotor sowie mehrere Schnittstellen, an denen das Plasmid spezifisch mit bestimmten Enzymen geschnitten werden kann. Die im Luciferase-Assay (Kap. 2.8.3) gemessene Enzymaktivität der exprimierten Luciferase lässt Rückschlüsse über die Transkriptionsaktivität zu.

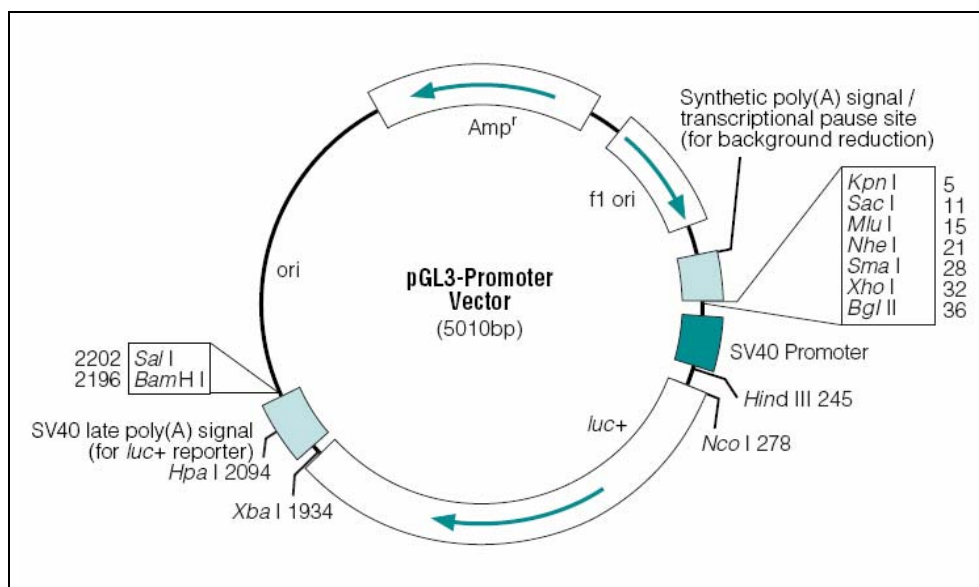


Abbildung 9:

pGL3-Promoter-Vector, schematische Darstellung (Promega GmbH)

2.8.1.1 Ligation regulatorischer Elemente des EPO-Enhancers in das pGL3-Promotor-Plasmid

Als Insert wurden synthetische Oligonukleotide verwendet, deren Sequenzen der des regulatorischen Abschnittes des EPO-Enhancers entsprechen. Ein Oligonukleotid entsprach genau dieser Sequenz (EPO-wt), bei weiteren Oligonukleotiden wurde die HIF-Bindungsstelle (EPO-dHIF) sowie zusätzlich noch ein CACA-Element (EPO-dHIFdCACA) bei sonst gleicher Sequenz deletiert. Die Oligonukleotide wurden entsprechend der Stellung des EPO-Enhancers *downstream* des Reporters in den Vektor ligiert.

10 µg des Vektors wurden mit 10 Einheiten Sal I und BamH I (MBI Fermentas GmbH, St Leon-Rot) MBI bei 37 °C über 4 h in einem Gesamtvolumen von 20 µl verdaut. Der Ansatz enthielt 1 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM MgCl₂, 0,002 % Triton X-100 und 0,01 mg/ml BSA. Der Verdau wurde anschließend mittels Agarosegelelektrophorese überprüft (Kap. 2.8.1.5.)

Im Ligationsansatz lag das Insert in 5fachem Überschuss zum Vektor vor. Die Fusion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 10 Einheiten T4-DNA-Ligase und entsprechendem Puffer (MBI Fermentas GmbH) bei 4° C über Nacht.

2.8.1.2 Transformation von kompetenten DH5α-*E.coli*-Bakterien

Bakterien, die in der Lage sind, Fremd-DNA aufzunehmen, werden als kompetent bezeichnet. Mit Kalziumchlorid behandelte (Cohen et al., 1972) und so kompetent gewordene *E. coli* DH5α (Gibco BRL, Life Technologies GmbH, Karlsruhe) wurden zur Transformation verwendet.

Die bei -80° C gelagerten, kompetenten DH5α-*E.coli*-Bakterien wurden über 20 min auf Eis aufgetaut. Zu jeweils 50 µl der Bakteriensuspension wurden 5 ng DNA zugegeben. Anschließend wurden die Ansätze für 30 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte mit einem Hitzeschock bei 42° C für 45 sec und anschließender Kühlung für 2 min auf Eis. Nach Zugabe von 450 µl SOC-Medium wurden die Ansätze für 1 h unter leichtem Schütteln in einem Thermomixer (Thermoshake THO 5, Gerhardt GmbH&Co. Kg, Königswinter) bei 37 °C inkubiert. Jeweils 150 µl der Ansätze wurden auf "Lenox broth" (LB)-Agar-Platten mit Ampicillinzusatz (50 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Erfolgreich transformierte Bakterien wurden mittels der Ampicillinresistenz des Plasmids selektiert. Einzelkolonien wurden in 5-6 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin überimpft und über Nacht bei 37 °C als Vorkultur inkubiert. Von den Vorkulturen wurden Glyzerin-Stammkulturen angesetzt und bei -80 °C gelagert.

Daraufhin wurde die Plasmid-DNA isoliert und das Vorhandensein des klonierten Plasmids mittels DNA-Restriktionsanalyse überprüft (Kap. 2.8.1.5).

2.8.1.3 Plasmid-DNA-Minipräparation

Die Aufarbeitung der Plasmid-DNA erfolgte mittels alkalischer Lyse (Birnboim und Doly, 1979): Die Bakterien werden dabei durch eine SDS- und NaOH-haltige Lösung lysiert. Durch Zugabe von Natriumazetat wird die Lösung neutralisiert: Chromosomale DNA, denaturierte Proteine und zuvor zugegebenes SDS fallen aus und können abzentrifugiert werden. Die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA kann daraufhin mit Isopropanol gefällt und in TE-Puffer resuspendiert werden.

Jeweils 1,5 ml der Vorkulturen wurden für 1-2 min bei 4020x g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde der Niederschlag in 200 µl eiskalter Lösung 1 (50 mM D-Glukose, 25 mM Tris pH 8,0, 10 mM EDTA) durch Invertieren gelöst. Sodann wurden 200 µl Lösung 2 zugefügt (0,2 M NaOH, 1 % SDS) und wieder durch Invertieren gemischt. Nach Zufügen von 200 µl Lösung 3 (3 M KAc, 5 M HAc) und fünfmaligem Invertieren wurden die Ansätze für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze für 15 min bei 9170x g zentrifugiert und der Überstand mit der gelösten Plasmid-DNA in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgte durch Zugabe von 600 µl Isopropanol, Inkubation auf Eis für 15 min und anschließender Zentrifugation für 5 min bei 9170x g. Anschließend wurde das Sediment mit 70 % Ethanol gewaschen und für 5 min mit einem Vakuum-Exsikkator getrocknet. Das getrocknete Sediment wurde in jeweils 50 µl Wasser mit 100 µg/ml RNase (Sigma-Aldrich GmbH) gelöst. Nachdem die Ansätze 30 min bei 37° C verdaut worden waren, wurden 50 µl NH₄Ac zugegeben und die DNA mittels Phenol/Chloroform-Extraktion isoliert: Zu den Proben wurde das gleiche Volumen Phenol/Chloroform gegeben, 10 sec durch Vortexen gemischt und daraufhin 15 sec mit höchster Geschwindigkeit zentrifugiert. Die wässrige, obere Phase enthielt die DNA und wurde in ein anderes Reaktionsgefäß überführt, die organische Phase enthielt die Proteine und wurde verworfen. Anschließend wurde die DNA mit Ethanol gefällt: Nachdem das 2,5fache Volumen eiskalten Ethanols (100%) zugegeben und für 10 min auf Eis inkubiert worden war, wurden die Proben für 20 min bei 12490x g zentrifugiert. Die entstandenen Pellets wurden nochmals mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 10 µl TE-Puffer resuspendiert. Die DNA-Konzentration wurde spektralphotometrisch bestimmt (Kap. 2.8.1.4).

2.8.1.4 Messung der DNA-Konzentration mittels Spektralphotometrie

1 µl der in TE Puffer gelösten DNA wurde mit 99 µl NaH₂PO₄ gelöst und die Extinktion bei 260 nm und 280 nm mit einem Spektralphotometer (Pharmacia Gene Quant II, Pharmacia-Pfizer) bestimmt. In Wasser gelöste DNA, deren optische Dichte (OD) bei 260 nm = 1 ist, enthält 50 µg DNA / ml. Der Quotient (OD 260 nm / OD 280 nm) lässt Aussagen über die Reinheit der Präparation zu. Ein Wert über 1,8 lässt auf eine saubere DNA-Präparation schließen.

2.8.1.5 Charakterisierung der Plasmid-DNA mittels Restriktionsfragmentanalyse

Die Restriktionsfragmentanalyse stellt während der Plasmidkonstruktion ein hilfreiches Element zur Prüfung der hergestellten Plasmide dar. Die aus einer Plasmidminipräparation (Kap. 2.8.1.3) gewonnene DNA wurde auf das Vorhandensein des Inserts überprüft, indem spezifische Schnittorte in der Sequenz mit den entsprechenden Restriktionsenzymen aufgesucht wurden. Die aus dem Verdau entstandenen Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und auf ihre spezifische Größe hin untersucht.

Zur Restriktion der Plasmid-DNA wurde 0,5 µg DNA mit jeweils 10 Einheiten *Sal* I und *Bam*H I (MBI Fermentas GmbH) 1 h bei 37 °C in einem 10 µl Reaktionsansatz unter Verwendung des entsprechenden 10x Reaktionspuffers (MBI Fermentas GmbH) verdaut.

Die Auftrennung der DNA-Fragmente wurde elektrophoretisch auf 0,8%igen, ethidiumbromidhaltigen, horizontalen Agarosegelen mit einfach konzentriertem TBE als Laufpuffer durchgeführt (100 V / 1,5 h). Die DNA wurde mittels ultravioletter Strahlung dargestellt und fotografiert.

2.8.1.6 Plasmid-DNA-Präparation mit dem Qiagen Plasmid Maxi Kit

Die Präparation größerer Plasmid-DNA-Mengen erfolgte den Herstellerangaben entsprechend mit dem Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen GmbH, Hilden). Das Prinzip dieser Methode beruht auf der alkalischen Lyse der Bakterien und darauf folgender Bindung der DNA an ein Anionenaustauscherharz. Das Aufreinigen der DNA erfolgt durch Waschen des Harzes mit einem „medium salt“-Puffer. Dadurch wurden RNA, Proteine und niedermolekulare Verunreinigungen entfernt. Die DNA wurde anschließend in einem „high salt“-Puffer gelöst und durch Fällung mit Isopropanol konzentriert. Die

gewonnene Plasmid-DNA wurde in 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 resuspendiert. Anschließend wurde die DNA-Konzentration spektralphotometrisch bestimmt (Kap. 2.8.1.4).

2.8.2 Transiente Transfektion von HepG2-Zellen

Die transiente Transfektion ist ein schnelles Verfahren, durch das fremde DNA, meist Plasmid-DNA, in Zellen eingebracht und so die vorübergehende Expression eines Gens erreicht werden kann. Da der eingebrachte Vektor jedoch durch Nukleasen wieder abgebaut wird, ist die Kultivierbarkeit auf maximal 60 h begrenzt.

Für Transfektionen wurde das kommerziell erhältliche Transfektionsreagenz FuGENE 6 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) verwendet. FuGENE besteht aus einer Mischung verschiedener, nicht liposomenbildender Lipide. Prinzipiell gilt, daß Lipid-DNA-Komplexe endozytotisch mit der Zellmembran verschmelzen, wobei die Plasmide zunächst ins Zytoplasma und daraufhin in den Zellkern gelangen, wo sie transkribiert werden können. Die Transfektionseffizienz wird durch die Wachstumsphase der Zellen mitbestimmt. Dabei zeigen vollständig konfluent gewachsene Zellen eine schlechtere Transfektionseffizienz.

Nach dem Passagieren wurden U2OS-Zellen auf 6-well-Platten ausgesät und 24 h inkubiert, bis sie zu 50 % konfluent gewachsen waren. Die Transfektion mit dem FuGENE-Reagenz wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Pro Vertiefung einer 6-well-Platte wurden dabei 3 µl FuGENE-Reagenz und 1 µg Plasmid-DNA eingesetzt.

Nach 12 h Inkubation mit dem Medium/DNA/FuGENE-Gemisch erhielten die Zellen frisches Medium und wurden über einen Zeitraum von 24 h mit Zytokinen stimuliert.

2.8.3 Luciferase Assay

Das Enzym Luciferase katalysiert die Oxidation von Luciferin unter Abgabe eines Photons. Das emittierte Licht wird in rlu (relative light units) angegeben und entspricht der Menge der exprimierten Luciferase im Zellextrakt. Die rlu-Werte sind demnach ein Maß für die transkriptionelle, aber eventuell auch posttranskriptionelle Regulation der Expression des Reporterkonstruktes in den transfizierten Zellen.

Der Nachweis der Luciferase-Aktivität erfolgte dem *Luciferase Detection Kit* (Promega). Nachdem das Medium abgenommen und die Zellen mit 1x PBS gewaschen worden waren,

wurden die Zellen direkt mit 250 µl Lysepuffer (Promega) überschichtet. Nach einer Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur wurden die abgelösten Zellen in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und anschließend 15 sec bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. 10 µl des Überstandes wurden mit 50 µl Luciferase-Substrat (Promega) gemischt und die Luciferase-Aktivität über einen Zeitraum von 10 sec mit einem Luminometer bestimmt (MicroLumat LB 96P, Berthold EG & G, Bad Wildbach). Die Luciferase-Enzymaktivität in rlu wurde in Relation zu der Gesamtzellproteinmenge gesetzt (Kap. 2.3).

2.9 Konstruktion des HNF-4 α -dsRed2-Expressionsplasmids

Als Vektor wurde das pDsRed2-N1-Plasmid verwendet (BD Biosciences Clontech, Heidelberg) (Abb. 10). Wird ein Gen in die *multiple-cloning-site* dieses Vektors kloniert, wird das entsprechende Protein als n-terminale Fusion mit DsRed2 exprimiert. Es ist möglich, dieses Fusionsprotein in vivo mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar zu machen.

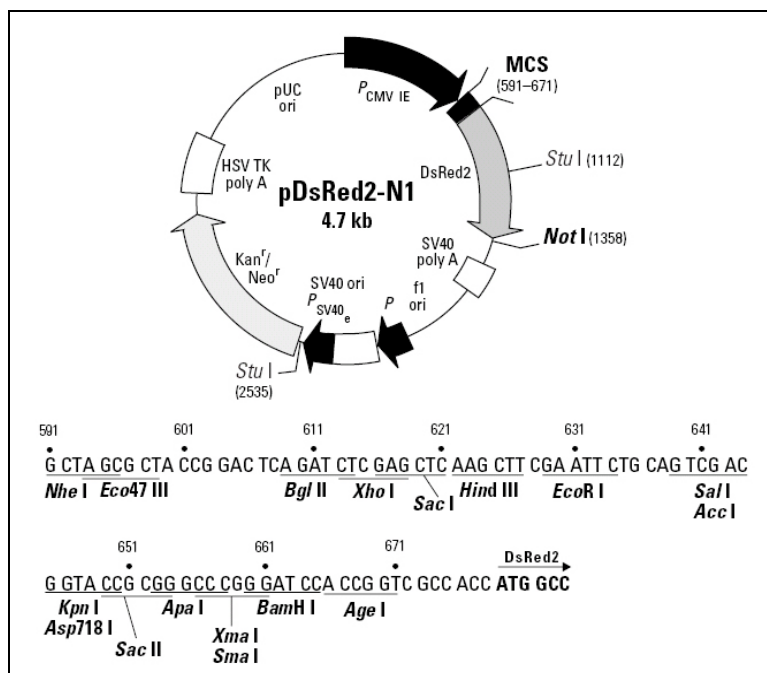


Abbildung 10:

Schematische Darstellung des pDsRed2-N1-Vektors (BD Biosciences Clontech) und Restriktions-Karte der *multiple cloning site* (MCS)

HNF-4 α wurde mittels RT-PCR amplifiziert (Kap. 2.7.1). Das PCR-Produkt sowie der Vektor wurden mit 10 Einheiten BamH I und Kpn I (MBI Fermentas GmbH) verdaut. Verdau und Ligation des PCR-Produktes in den Vektor wurden unter den gleichen Bedingungen wie in Kap. 2.8.1.1 beschrieben durchgeführt.

JM110-*E.coli*-Bakterien wurden mit dem Ligationsansatz transformiert. Die Transformation von kompetenten JM110-*E.coli* erfolgte analog der in Kap. 2.8.1.2 beschriebenen Transformation von DH5 α -*E.coli*-Bakterien. Erfolgreich transformierte Bakterien wurden anhand der durch das pDsRed2-N1-Plasmid vermittelten Kanamycinresistenz selektiert. Dazu wurden (LB)-Agar-Platten mit Kanamycinzusatz (50 μ g/ml) verwendet.

Nach der Minipräparation (Kap. 2.8.1.3) wurde das Plasmid mittels Restriktionsanalyse untersucht. Zur Restriktion der Plasmid-DNA wurde 0,5 μ g DNA mit jeweils 10 Einheiten BamH I und Kpn I während 1 h bei 37 °C in einem 10 μ l Reaktionsansatz unter Verwendung des entsprechenden 10x Reaktionspuffers (MBI Fermentas GmbH) verdaut. Die Auftrennung der DNA-Fragmente wurde elektrophoretisch auf 0,8%igen, ethidiumbromidhaltigen, horizontalen Agarosegelen mit einfach konzentriertem TBE als Laufpuffer durchgeführt (100 V / 1,5 h). Die DNA wurde mittels ultravioletter Strahlung dargestellt und fotografiert. Anschließend wurde das Plasmid sequenziert, um die korrekte Sequenz des Inserts zu überprüfen.

2.10 Bestimmung der EPO-Konzentration im ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay)

EPO-Konzentrationen im Zellkulturüberstand wurden mit einem kommerziell erhältlichen ELISA-Kit gemäß Angaben des Herstellers gemessen (Medac GmbH, Wedel). Bei diesem ELISA-Kit handelt es sich um einen Enzym-Immunoassay des *Sandwich*-Typs. Es enthält Mikrotiterplatten, die mit monoklonalen Antikörpern gegen EPO beschichtet sind.

Proben und Standards wurden in den jeweils zugewiesenen Vertiefungen inkubiert. In den Proben vorkommendes EPO band an die feste Phase, ungebundenes EPO wurde durch Waschen entfernt. In einem zweiten Inkubationsschritt wurde ein alkalischer Phosphatase konjugiertes EPO-Antiserum in jede Vertiefung gegeben. Nach Inkubation wurde ungebundenes Konjugat abermals durch Waschen entfernt. Daraufhin wurde p-

Nitrophenylphosphat als chromogenes Substrat zugefügt. P-Nitrophenylphosphat wird durch die alkalische Phosphatase zu p-Nitrophenol umgewandelt, was einen Farbumschlag bewirkt. Die Intensität des Farbumschlags im letzten Reaktionsschritt korrelierte mit der Menge an initial gebundenem Protein. Nach dem zweiten Inkubationsschritt wurde die optische Dichte OD bei 405 nm mit einem ELISA-Reader bestimmt (Tecan Spectra & Rainbow Reader, TECAN Deutschland GmbH, Crailsheim)

2.11 Succinatdehydrogenase Aktivitäts-Messung (MTT-Test)

Der MTT-Test misst die mitochondriale Aktivität von Zellen. Er gibt somit eine Aussage über Zellproliferation und –aktivierung, aber auch über antiproliferative oder zytotoxische Effekte. Der Test basiert auf dem Umbau des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs Diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in ein violette, wasserunlösliches Produkt (MTT-Formazan). Dieser Umbau erfolgt überwiegend durch das mitochondriale Enzym Succinatdehydrogenase.

HepG2-Zellen wurden über 72 h mit Fibraten (30 μ M bis 300 μ M) bzw. DMSO (= engl. dimethyl sulfoxide, Kontrolle) im Kulturmedium inkubiert. 5 h vor Ende der Inkubation wurden jeweils 20 μ l MTT-Lösung (Promega GmbH) in jede Vertiefung pipettiert. Nachdem die Zellen weitere 5 h inkubiert worden waren, wurden das Medium abgesaugt und die Formazan-Kristalle in 200 μ l DMSO gelöst. Die 96-Well-Platte wurde für weitere 5 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die OD bei 550 nm mit einem ELISA-Reader (Tecan Spectra & Rainbow Reader, TECAN Deutschland GmbH) gemessen.

2.12 Anhang

2.12.1 Lösungen und Puffer

<u>PBS (phosphate buffered saline):</u>	136,9 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	8,1 mM	Na ₂ HPO ₄ * H ₂ O
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄
<u>T-PBS (Tween/PBS)</u>	PBS	
	0,05 %	Tween 20
<u>10x TBE (Tris-Borsäure-EDTA)</u>	90 mM	Tris pH 8,3
	2,5 mM	EDTA
	90 mM	Borsäure
	auf 1 Liter Gesamtvolumen mit A. bidest auffüllen	
<u>TE-Puffer (Tris-EDTA)</u>	10 mM	Tris-HCl
	1 mM	Na ₂ EDTA pH 8,0
<u>Bradford-Reagenz</u>	100 mg	Comassie Brilliant Blue G250
	50 ml	95 % Ethanol
	100 ml	85 % Phosphorsäure
	Auf 1 Liter Gesamtvolumen mit A. bidest auffüllen	
<u>5x Laufpuffer (Western-Blot)</u>	125 mM	Tris Base
	960 mM	Glycin
	5 %	SDS
<u>Blot-Puffer (Western-Blot)</u>	25 mM	Tris Base
	192 mM	Glycin
	20 %	Methanol

Probenpuffer (Western-Blot) : 16 ml A. bidest
 3,2 ml 0,5 M Tris pH 6,8
 6,4 ml 10 % SDS
 1,6 ml β -Mercaptoethanol
 0,8 ml Bromphenolblau

MTT-Lösung: 5 mg/ml MTT in PBS, sterilfiltriert

2.12.2 Kulturmedien für *E. coli*

LB-Medium ("Lenox broth"): 10 g Tryptan
 5 g NaCl
 5 g Hefeextrakt
 1 ml 1 M NaOH
 auf 1 Liter mit A. bidest auffüllen und autoklavieren

SOC Medium: LB-Medium
 20 mM Glukose

Für Kulturplatten wurde dem Medium 15 g/l Agar zugesetzt. Ampicillin als sterilfiltrierte Lösung wurden dem abgekühlten Medium nach Bedarf zugesetzt.

2.12.3 Elektrophoresegelelösungen

EMSA 7 ml Acrylamidlösung 30 %
 2,1 ml 5x TBE
 25,6 ml A. bidest
 260 μ l APS 10 %
 26 μ l Temed

DNA-Restriktionsanalyse 100 ml 1x TBE
 0,8 g Agarose

	5 µl	Ethidiumbromid	
<u>Western-Blot-Sammelgel</u>	10 % SDS	100 µl	
	Tris 1,5 M pH 6,8	2,5 ml	
	Acrylamidlösung 30 %	1,3 ml	
	APS 10 %	50 µl	
	Temed	10 µl	
	A. bidest	6,1 ml	
<u>Western-Blot-Trenngel</u>		<u>5 %</u>	<u>7,5 %</u>
	10 % SDS	250 µl	250 µl
	Tris 1,5 M pH 8,8	6,3 ml	6,3 ml
	Acrylamidlösung 30 %	4,3 ml	6,3 ml
	APS 10 %	125 µl	125 µl
	Temed	12,5 µl	125 µl
	A. bidest	14,2 ml	12,1 ml

2.12.4 Oligonukleotide

Sequenzen für EMSA:

DR2:

5`-CGGTAGGTCGAGAGGTCAGACAGGCTG-3`

5`-CAGCCTGTCTGACCTCTCGACCTACCG-3`

TRE:

5`-CCTGTCAGGTCATGACCTACCG-3`

5`-CGGTAGGTCATGACCTGACAGG-3`

Sequenzen der Inserts der Reporterplasmide:*EPO-wt:*

5'-GATCCCTACGTGCTGTCTCACACAGCCTGTCTGACCTCTCGACCTACCG-3'
5'-TCGACGGTAGGTCGAGAGGTCAGACAGGCTGTGTGAGACAGCACGTAGG-3'

EPO-dHIF:

5'-GATCCCTACGTGCTGTCTCACACAGCCTGTCACC-3'
5'-TCGAGGTGACAGGCTGTGTGAGACAGCACGTAGG-3'

EPO-dHIFdCACA:

5'-GATCCCGTCTCAGCCTGTCTGACCTCTCGACCTACCG-3'
5'-TCGACGGTAGGTCGAGAGGTCAGACAGGCTGAGACGG-3'

2.12.5 Zytokine

Rekombinantes IL-1 β war ein Geschenk der Ciba-Geigy AG (Basel, Schweiz).

2.12.6 Fibrate

Clofibrat wurde von Calbiochem (Calbiochem, Merck Biosciences GmbH, Schwalbach), Bezafibrat wurde von Sigma-Aldrich erworben (Sigma-Aldrich Chemie GmbH). Von beiden Fibraten wurden Stammlösungen in einer Konzentration von 0,1 M in DMSO angesetzt, welche bei -80 °C gelagert wurde.

2.12.7 Proteasom-Inhibitor MG132

Der Proteasom-Inhibitor MG132 wurde von Calbiochem (Calbiochem, Merck Biosciences GmbH) bezogen.

2.12.8 Actinomycin D

Der RNA-Synthese-Inhibitor Actinomycin D wurde von Sigma-Aldrich Chemie GmbH bezogen.

3. Ergebnisse

3.1 Western-Blot

3.1.1 Expression von HNF-4 α -Kernprotein in HepG2- und U2OS-Zellen

In unbehandelten HepG2-Zellen konnte HNF-4 α -Protein nachgewiesen werden (Abb. 11, Bahn 1), wohingegen in Kernextrakten aus U2OS-Zellen kein HNF-4 α -Protein gefunden wurde (Abb. 11, Bahn 2). Wurden U2OS-Zellen mit dem HNF-4 α -dsRed2-Expressionsplasmid transient transfiziert, wurde das immunoreaktive HNF-4 α -dsRed2-Fusionsprotein sichtbar (Abb.11, Bahn 3).

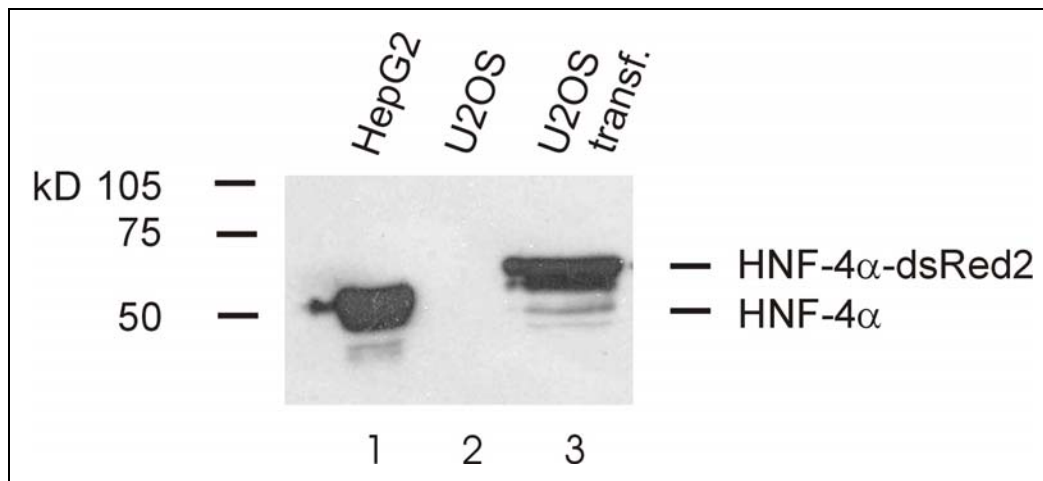
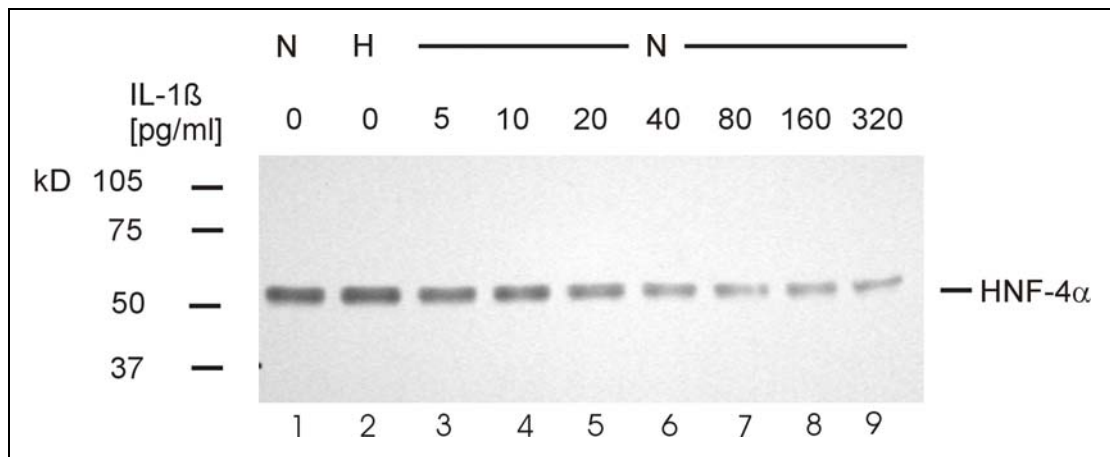


Abbildung 11:

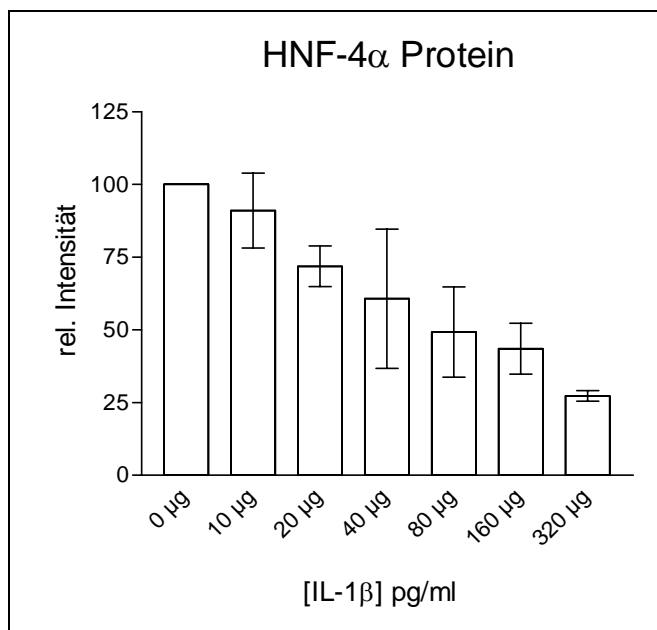
HNF-4 α -Westernblot aus Kernextrakten von HepG2-Zellen (Bahn 1), U2OS-Zellen (Bahn 2) und mit dem HNF-4 α -dsRed2-Expressionsplasmid transfizierten U2OS-Zellen (Bahn 3).

3.1.2 Einfluss von IL-1 β auf die Menge von HNF-4 α -Kernprotein

Der Einfluss von IL-1 β auf die Menge von HNF-4 α -Protein in Kernextrakten von HepG2 Zellen wurde mittels Western-Blot-Analysen untersucht. HepG2-Zellen wurden über einen Zeitraum von 4 h mit IL-1 β stimuliert. Dies führte zu einer dosisabhängigen Reduktion von HNF-4 α -Kernprotein. Inkubation unter hypoxischen Bedingungen (3 % O₂) veränderte die HNF-4 α -Menge im Kernextrakt hingegen nicht (Abb. 12 & 13).

**Abbildung 12:**

HNF-4 α -Western-Blot aus Kernextrakten von HepG2-Zellen, die über 4 h unter normoxischen Bedingungen (20 % O₂) mit verschiedenen IL-1 β -Konzentrationen im Kulturmedium stimuliert wurden. Inkubation der Kontrolle auch unter hypoxischen Bedingungen (3 % O₂). N = Normoxie, H = Hypoxie.

**Abbildung 13:**

Densitometrische Auswertung von HNF-4 α -Western-Blots. Normoxische Kontrolle = 100. Dargestellt sind Mittelwerte sowie die Standardabweichung (n=3).

3.1.3 Einfluss des Proteasom-Inhibitors MG132 auf die Menge von HNF-4 α -Kernprotein

Der Wirkung des Proteasom-Inhibitors MG132 auf die HNF-4 α -Proteinmenge wurde mittels Western-Blot-Analysen untersucht. HepG2-Zellen wurden wie in Abb. 14 bezeichnet mit IL-1 β , MG132 oder beidem im Kulturmedium inkubiert. Der Proteasom-Inhibitor MG132 wurde in einer Endkonzentration von 1 μ mol/l im Kulturmedium zugegeben.

Wurden HepG2-Zellen 4 bzw. 8 h mit IL-1 β stimuliert, führte das im Vergleich zu der unstimulierten Kontrolle wie in Kap. 3.1.2 beschrieben zu einer verminderten Menge von HNF-4 α -Protein. Die Inkubation mit MG132 alleine führte im Vergleich zu unstimulierten Zellen nur zu einer leichten Zunahme der HNF-4 α -Proteinmenge. In Zellen, die sowohl mit MG132 als auch mit IL-1 β inkubiert wurden, war der Effekt von IL-1 β auf die HNF-4 α -Proteinmenge aufgehoben; im Vergleich zu mit IL-1 β , aber ohne MG132 inkubierten Zellen war die HNF-4 α -Proteinmenge erhöht (Abb.14).

Um die gleichmäßige Ladung der einzelnen Bahnen zu verifizieren wurde anschließend dieselbe Membran auf die SP1-Proteinmenge untersucht.

Als zusätzliche Kontrolle wurde die Wirkung des Proteasom-Inhibitors MG132 überprüft, indem HIF-1 α -Protein detektiert wurde. In der Literatur ist beschrieben, dass HIF-1 α unter normoxischen Bedingungen durch das Proteasom degradiert wird (Salceda und Caro, 1997). In mit MG132 inkubierten Zellen wurden wie erwartet erhöhte HIF-1 α -Proteinmengen gemessen. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Inkubation mit MG132 die Funktion des Proteasoms wirksam herabgesetzt hat. Wurden die Zellen zusätzlich mit IL-1 β inkubiert, wurde eine nochmals höhere HIF-1 α -Proteinmenge gemessen (Abb. 14).

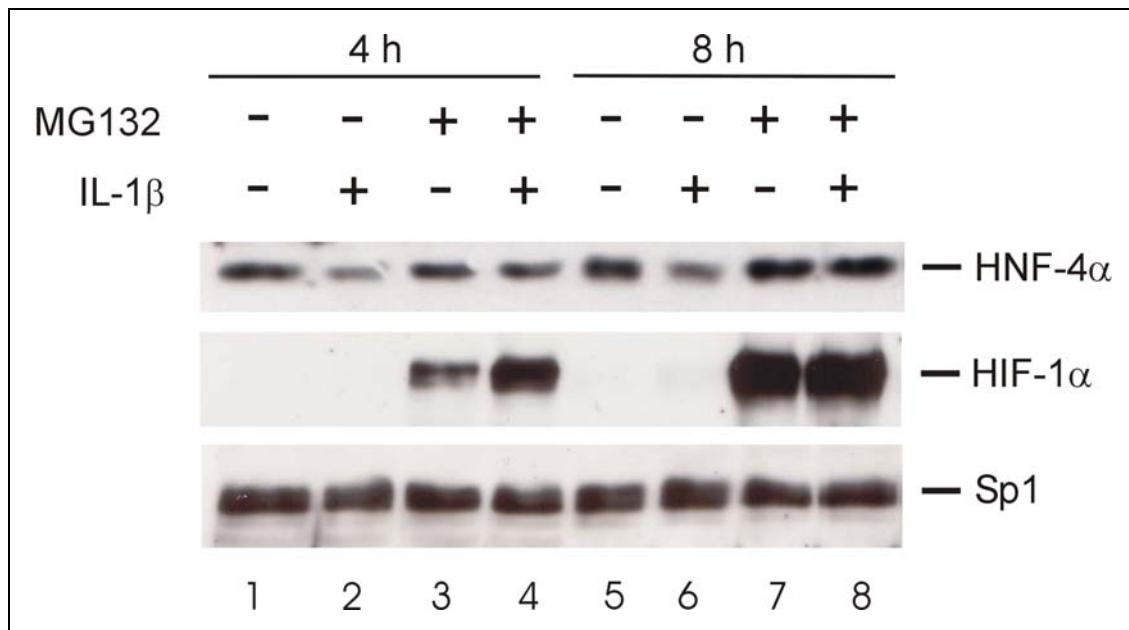


Abbildung 14:

Western-Blot. HepG2-Zellen wurden 4 h (Bahn 1-4) bzw. 8 h (Bahn 5-8) wie bezeichnet ausschließlich mit Medium (Kontrolle) und mit IL-1 β , MG132 oder beidem im Kulturmedium inkubiert. HNF-4 α -, HIF-1 α und Sp1-Protein wurde in Kernextrakten dieser Zellen im Western-Blot detektiert.

3.1.4 Einfluss von IL-1 β auf die Menge von HIF-1 α -Kernprotein

Stimulation mit IL-1 β führt *in vitro* zu erhöhten Proteinmengen von HIF-1 α (Hellwig-Burgel et al., 1999). Um zu überprüfen, ob dieser Effekt auch bei den für diese Arbeit verwendeten Zellen auftritt und um weitere Informationen über die Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen der Stimulation mit IL-1 β und der HIF-1 α -Proteinmenge zu erhalten, wurden Western-Blots durchgeführt. Dafür wurden dieselben Kernextrakte verwendet, mit denen auch Western-Blot-Analysen auf HNF-4 α -Protein wurden (Kap. 3.1.2).

Bei Stimulation mit IL-1 β konnte eine dosisabhängige Erhöhung der HIF-1 α -Proteinmenge im Kernextrakt nachgewiesen werden (Abb. 15).

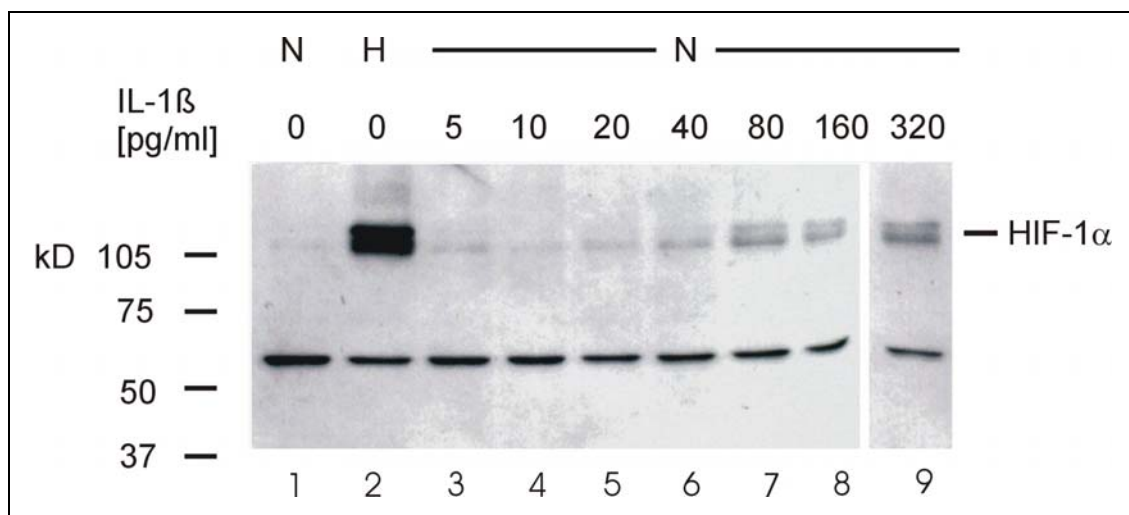


Abbildung 15:

HIF-1 α -Western-Blot. Geblottet wurden dieselben Kernextrakte, die auch auf HNF-4 α -Protein untersucht worden sind. Inkubation der Kontrolle sowohl unter normoxischen, als auch unter hypoxischen Bedingungen. Die Stimulation mit IL-1 β erfolgte unter normoxischen Bedingungen. Alle Bahnen wurden auf demselben Gel aufgetrennt. N = Normoxie, H = Hypoxie.

3.2 Realtime-PCR

3.2.1 Einfluss von IL-1 β auf die Menge von HNF-4 α -mRNA

Der Einfluss von IL-1 β auf die Menge von HNF-4 α -mRNA wurde in HepG2 Zellen mittels Realtime-PCR untersucht.

Der HNF-4 α -mRNA-Spiegel war in HepG2 Zellen bereits nach 2 h Inkubation mit IL-1 β im Kulturmedium auf ungefähr 20 % des Wertes der Kontrolle reduziert (frühere Zeitpunkte wurden nicht untersucht). Der HNF-4 α -mRNA-Spiegel verblieb für wenigstens 6 weitere Stunden erniedrigt. Actinomycin D, ein Antibiotikum, das an doppelsträngige DNA bindet und so unspezifisch die RNA-Synthese hemmt, reduzierte die HNF-4 α -mRNA-Menge sowohl in Bezug auf die absoluten Werte als auch in Bezug auf den Zeitverlauf auf eine sehr ähnliche Weise (Abb. 16).

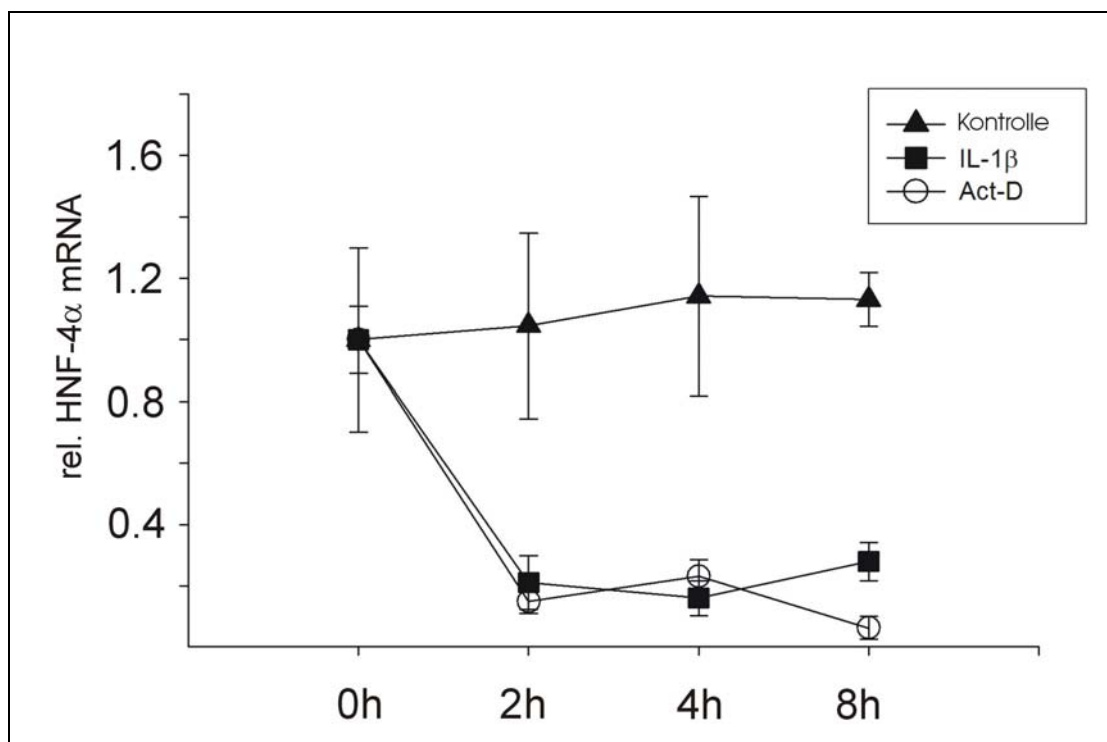


Abbildung 16:

Realtime-PCR-Quantifizierung der HNF-4 α -mRNA-Expression. HepG2-Zellen wurden mit IL-1 β , Actinomycin D oder ausschließlich mit Kulturmedium (Kontrolle) für die angegebenen Zeiträume inkubiert. HNF-4 α -mRNA wurde auf die mRNA von L28, einem Houskeeping Gen, das für ein ribosomales Protein kodiert, normalisiert und in Relation zu der entsprechenden 0-Stunden-Gruppe gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte sowie die Standardabweichung (n = 5).

3.3 Gelverzögerungstests (EMSA)

3.3.1 Einfluss von IL-1 β auf die DNA-Bindungsaktivität des DR2-Elementes des EPO-Enhancers

Ein mit [32 P] markiertes Oligonukleotid, welches das DR2-Element des EPO-Enhancers enthielt, wurde mit Kernextrakten von unter normoxischen Bedingungen gewachsenen HepG2-Zellen inkubiert. Im Gelverzögerungstest bildeten sich zwei mit unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilität wandernde DNA-Protein-Komplexe (Abb. 17A, Bahn 1). Da Galson und Mitarbeiter gezeigt haben, dass das DR2-Element des EPO-Enhancers sowohl HNF-4 α als auch den antagonistisch zu HNF-4 α wirkenden Transkriptionsfaktor COUP-TF bindet (Galson et al., 1995), konnte angenommen werden, dass die beiden im Gelverzögerungstest beobachteten Komplexe durch diese beiden Transkriptionsfaktoren gebildet worden sind. Tatsächlich führte die Zugabe von Antikörpern gegen COUP-TF und HNF-4 α zu Supershifts (Abb. 17A, Bahnen 2 und 3).

In Kernextrakten von für 4 h mit IL-1 β stimulierten Zellen fand sich im Vergleich zu Kernextrakten von unbehandelten Zellen eine insgesamt reduzierte DNA-Bindungsaktivität an dem markierten DR2-Oligonukleotid (Abb. 17B, vergleiche Bahn 2 und 5).

3.3.2 Einfluss von IL-1 β auf die DNA-Bindung von HNF-4 α an das DR2-Element

Um die Frage der Spezifität des Einflusses von IL-1 β auf die DNA-Bindungsaktivität an dem DR2-Element des EPO-Enhancers weiter zu klären, wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt. In der Literatur ist beschrieben, dass COUP-TF, aber nicht HNF-4 α spezifisch an ein „thyroid-responsive-element“ (TRE) bindet. Tatsächlich wurde die spezifische Bindung von COUP-TF, aber nicht diejenige von HNF-4 α , auch unter den in dieser Arbeit gewählten experimentellen Bedingungen beobachtet (Abb. 17A, Bahnen 4-6).

Um in den Proben vorhandenes COUP-TF zu binden und so die verbleibende Aktivität von HNF-4 α isoliert beurteilen zu können, wurde das TRE-Oligonukleotid in 250fachem Überschuss als Kompetitor der Bindungsreaktion zugesetzt. Dies führte bei Kernextrakten unstimulierter Zellen zu einem vollständigen Verschwinden des COUP-TF repräsentierenden Komplexes; weiterhin nachweisbar war die Bindungsaktivität von HNF-

4 α (Abb. 17B, Bahn 4). Wurde das TRE-Oligonukleotid hingegen als Kompetitor zu Kernextrakten von mit IL-1 β stimulierten Zellen zugegeben, war keine spezifische DNA-Bindungsaktivität mehr nachweisbar (Abb. 17B, Bahn 7). Dieses Ergebnis machte deutlich, dass Stimulation mit IL-1 β insbesondere die Bindungsaktivität von HNF-4 α reduziert.

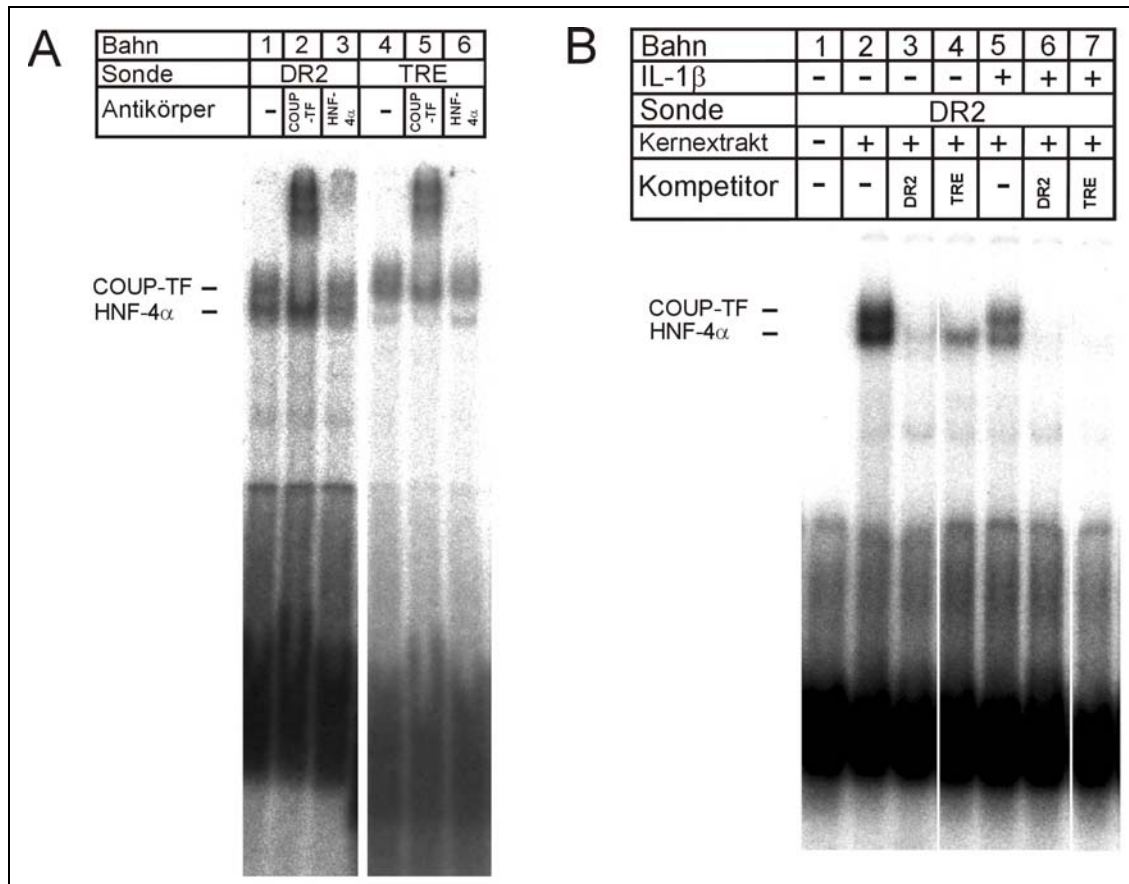


Abbildung 17:

(A) EMSA mit HepG2-Kernextrakten und einem als Sonde markierten Oligonukleotid, welches die DR2-Sequenz des EPO-Enhancers enthält. Mittels Supershift-Experimenten wurde die Bindung der beiden Transkriptionsfaktoren COUP-TF und HNF-4 α untersucht (Bahn 1-3). Zusätzlich wurden Supershift-Experimente mit einem markierten TRE-Oligonucleotid durchgeführt, um die spezifische Bindung von COUP-TF an dieser Sequenz zu zeigen (Bahn 4-6). Alle Proben wurden auf demselben Gel aufgetrennt. (B) Vergleich der DNA-Bindungsaktivität zwischen Kernextrakten aus unbehandelten- (Bahn 1-4) und mit IL-1 β stimulierten (Bahn 5-7) HepG2-Zellen. Als Sonde wurde das markierte DR2-Oligonukleotid verwendet. Das TRE-Oligonukleotid wurde wie bezeichnet in 250fachem Überschuss als Kompetitor verwendet. Alle Proben wurden auf demselben Gel aufgetrennt.

3.4 Reporteragen-Untersuchungen

Die Wirkung von proinflammatorischen Zytokinen wurde im Hinblick auf die Aktivität von drei EPO-Enhancer-Reporterplasmiden untersucht. Ein Plasmid enthielt die unveränderte Sequenz der regulatorischen Elemente des EPO-Enhancers (EPO-wt), bei einem weiteren Plasmide wurde die HIF-Bindungsstelle deletiert (EPO-dHIF), sowie bei einem dritten Plasmid zusätzlich das CACA-Element mutiert (EPO-dHIFdCACA) (Abb. 18).

Als Zellkulturmodell wurden U2OS-Zellen verwendet, die selbst kein HNF-4 α -Protein exprimieren (Kap. 3.1.1). Zusätzlich wurden deshalb entweder ein HNF-4 α -dsRed2-Expressionsplasmid oder ein unverändertes, also leeres pcDNA3-Expressionsplasmid (Invitrogen GmbH) als Kontrollvektor co-transfiziert. Die transient transfizierten Zellen wurden über 24 h kultiviert. Anschließend wurde, wenn bezeichnet, IL-1 β in einer Endkonzentration von 300 pg/ml im Kulturmedium zugesetzt. Daraufhin wurden die Zellen für weitere 4 h unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen inkubiert.

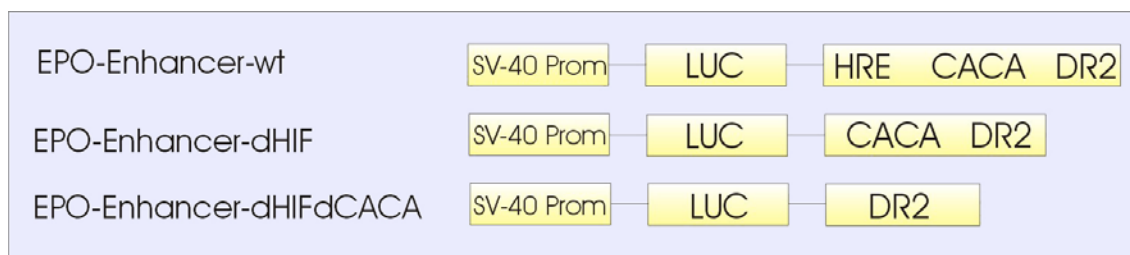


Abbildung 18:

Schematische Darstellung der verwendeten Reporterplasmide. SV-40 Prom = SV-40 Promotor, LUC = Luciferase, HRE = hypoxia response element

3.4.1 Einfluss von IL-1 β auf die Aktivität des EPO-Enhancer-wt-Plasmids

Die mit dem EPO-Enhancer-wt-Plasmid transfizierten Zellen zeigten bei Co-Transfektion des HNF-4 α -dsRed2-Expressionsplasmids im Vergleich zu normoxisch inkubierten Zellen eine 15fache hypoxische Induktion der Reporterogenaktivität. Diese hypoxische Induktion wurde durch Stimulation mit IL-1 β vollständig unterdrückt. Auch unter normoxischen Bedingungen führte die Stimulation mit IL-1 β verglichen mit der unstimulierten Kontrolle zu einer Verminderung der Reporterogenaktivität.

Wurde anstatt des HNF-4 α -dsRed2-Expressionsplasmids der pcDNA3-Kontrollvektor co-transfiziert, wurden weder eine hypoxische Induktion des Reporterplasmids noch ein signifikanter Effekt von IL-1 β auf dessen Aktivität gemessen (Abb. 19).

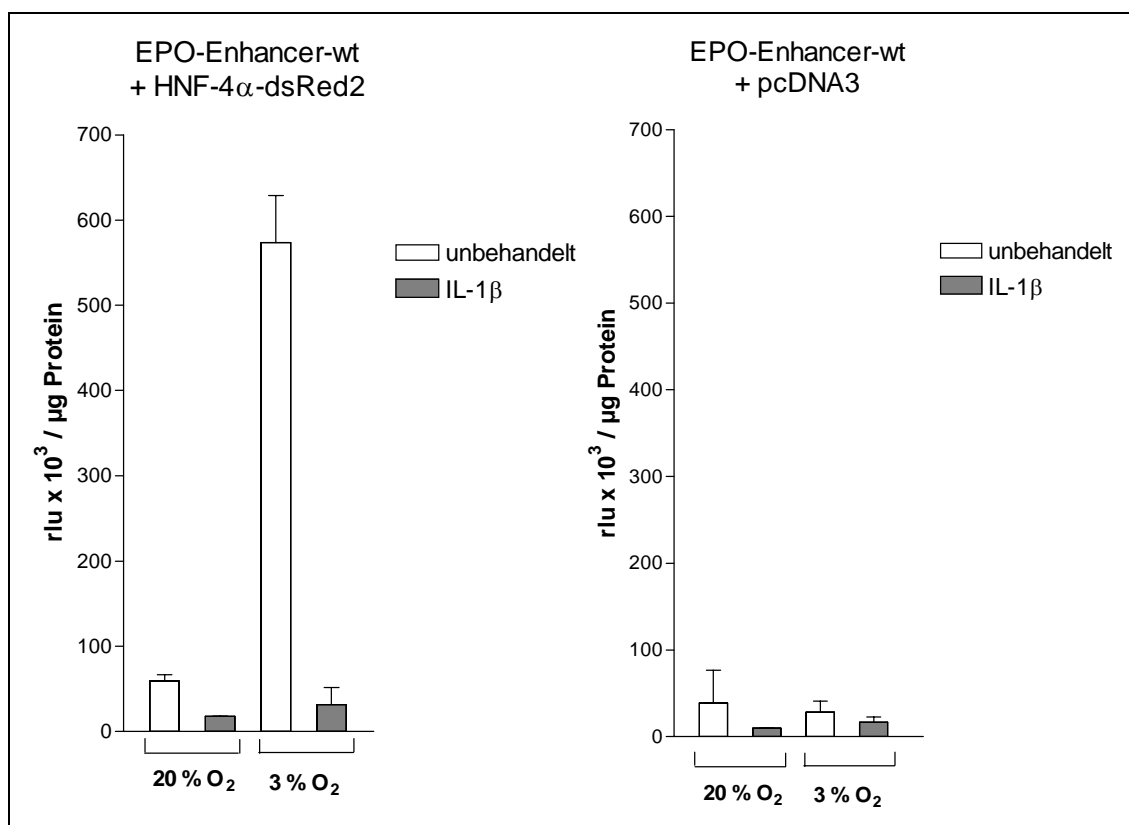


Abbildung 19:

Luciferase-Assay. U2OS-Zellen wurden mit dem EPO-Enhancer-wt-Plasmid und entweder mit dem HNF-4 α -dsRed2-Expressionsplasmid oder mit dem pcDNA3-Kontrollvektor co-transfiziert. Die Zellen wurden wie bezeichnet mit IL-1 β stimuliert und unter normoxischen (20 % O₂) oder hypoxischen (3 % O₂) Bedingungen inkubiert. Die Luziferase-Aktivität wurde auf Gesamtzellprotein normiert. Dargestellt sind Mittelwerte sowie die Standardabweichung (n=4). rlu = relative light unit.

3.4.2 Einfluss von IL-1 β auf die Aktivität des EPO-Enhancer-dHIF-Plasmids

Mit dem EPO-Enhancer-dHIF-Plasmid transfizierte Zellen zeigten weder bei Co-Transfektion des HNF-4 α -dsRed2-Expressionsplasmids noch bei Co-Transfektion des pcDNA3-Kontrollvektors eine hypoxisch induzierbare Reporterogenaktivität im Luciferase-Assay.

Auch die Stimulation mit IL-1 β führte zu keiner signifikant veränderten Reporterogenaktivität im Vergleich zu der unstimulierten Kontrolle (Abb. 20).

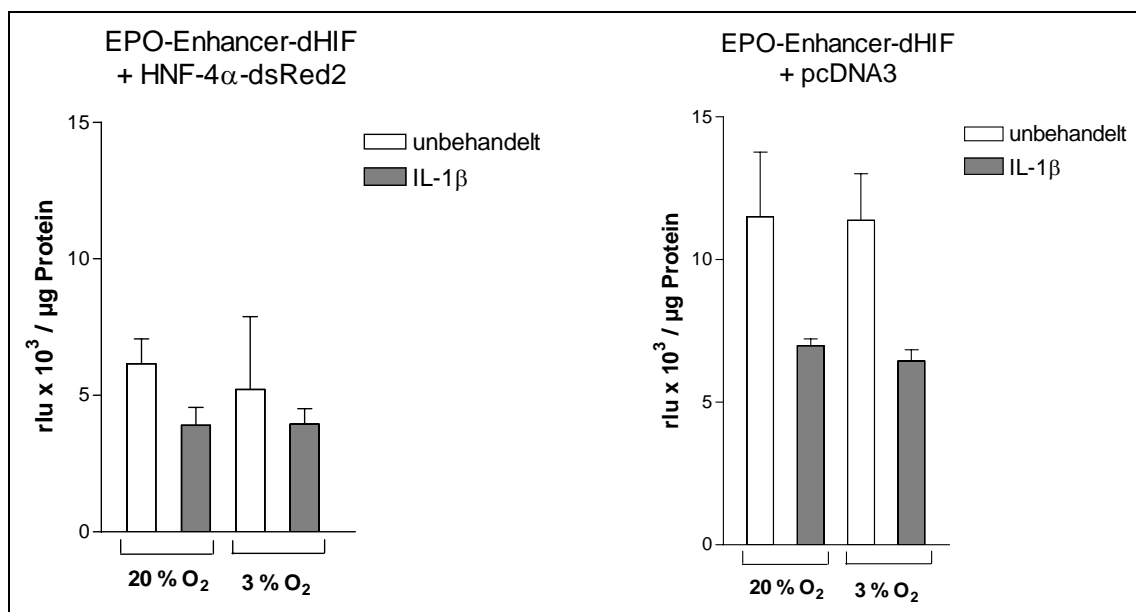


Abbildung 20:

Luciferase-Assay. U2OS-Zellen wurden mit dem EPO-Enhancer-dHIF-Plasmid und entweder mit dem HNF-4 α -dsRed2-Expressionsplasmid oder mit dem pcDNA3-Kontrollvektor co-transfiziert. Die Zellen wurden wie bezeichnet mit IL-1 β stimuliert und unter normoxischen (20 % O₂) oder hypoxischen (3 % O₂) Bedingungen inkubiert. Die Luziferase-Aktivität wurde auf Gesamtzellprotein normiert. Dargestellt sind Mittelwerte sowie die Standardabweichung (n=4). rlu = relative light unit.

3.4.3 Einfluss von IL-1 β auf die Aktivität des EPO-Enhancer-dHIFdCACA-Plasmids

U2OS-Zellen wurden mit dem EPO-Enhancer-dHIFdCACA-Reporterplasmid und entweder dem HNF-4 α -dsRed2-Expressionsplasmid oder mit dem pcDNA3-Kontrollvektor co-transfiziert. Auch hier wurde bei unter hypoxischen Bedingungen kultivierten Zellen im Vergleich zu der normoxischen Kontrolle keine signifikante Induktion der Reporterogenaktivität gefunden.

Stimulation mit IL-1 β reduzierte bei Co-Transfektion des HNF-4 α -dsRed2-Expressionsplasmids die Reportergen-Aktivität auf 41 % (normoxische Bedingungen) bzw. 31 % (hypoxische Bedingungen) des Wertes der unstimulierten Kontrolle. Allerdings wurde auch bei mit dem pcDNA3-Kontrollvektor co-transfizierten Zellen nach Stimulation mit IL-1 β eine auf 50 % (Normoxie) bzw. 57 % (Hypoxie) des Kontrollwertes verminderte Reportergenaktivität gemessen (Abb. 21).

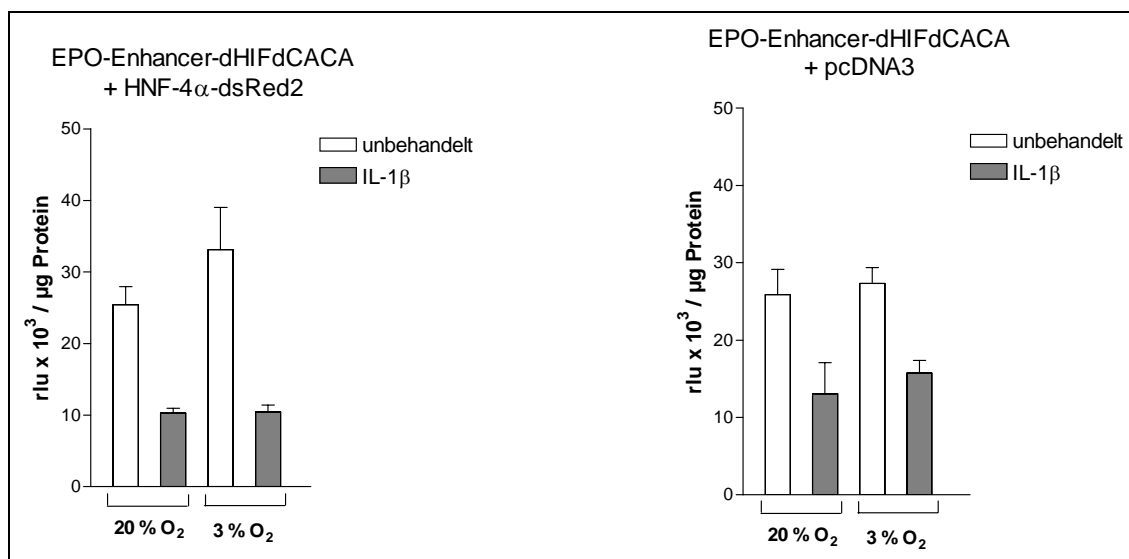


Abbildung 21:

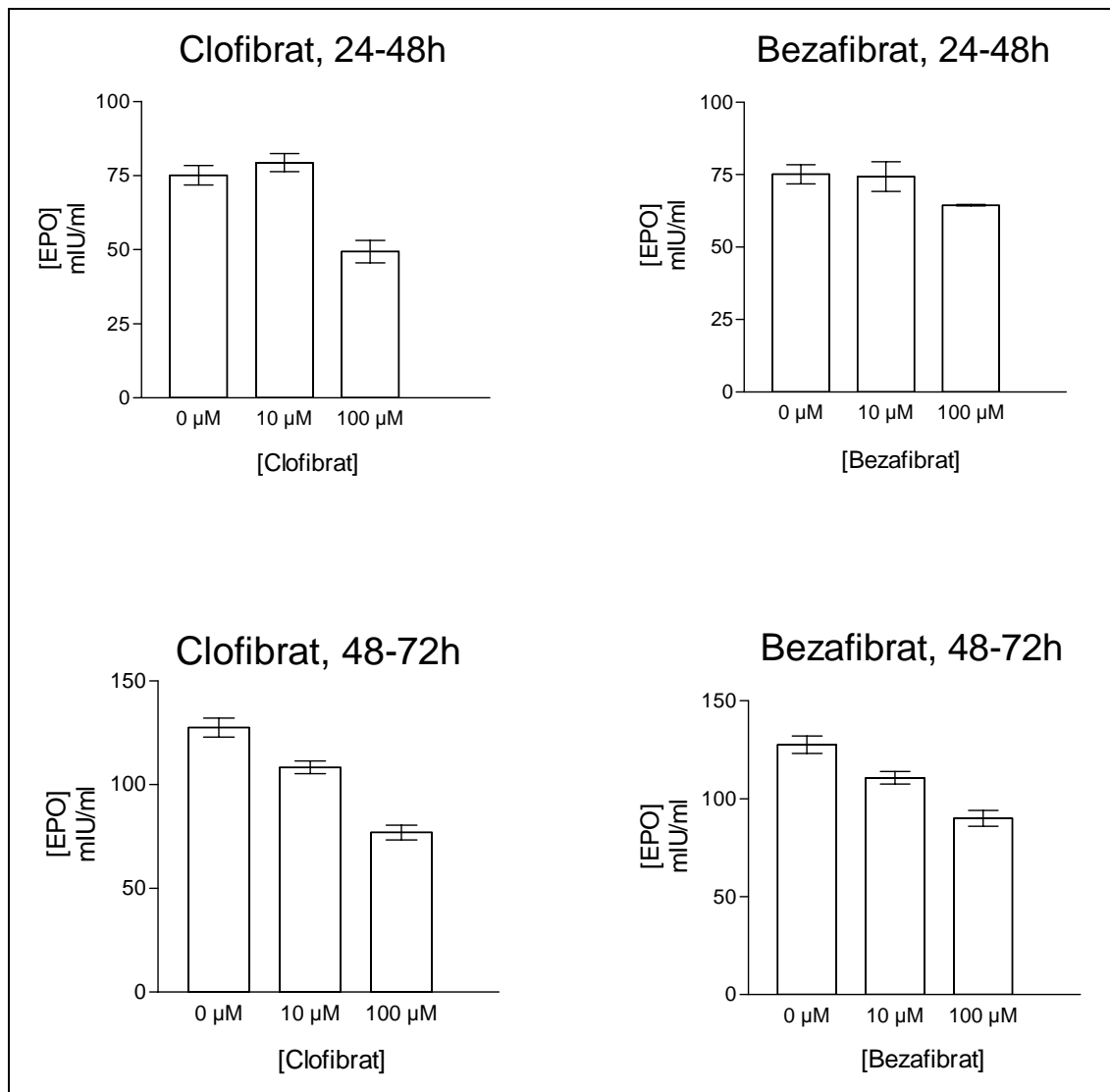
Luciferase-Assay. U2OS-Zellen wurden mit dem EPO-Enhancer-dHIFdCACA-Plasmid und dem HNF-4 α -dsRed2-Expressionsplasmid bzw. dem pcDNA3-Kontrollvektor co-transfiziert. Die Zellen wurden wie bezeichnet mit IL-1 β stimuliert und unter normoxischen (20 % O₂) oder hypoxischen Bedingungen (3 % O₂) inkubiert. Die Luciferase-Aktivität wurde auf Gesamtzellprotein normiert. Dargestellt sind Mittelwerte sowie die Standardabweichung (n=4). rlu = relative light unit.

3.5 ELISA

3.5.1 Einfluss von Fibraten auf die EPO-Sekretion von HepG2-Zellen

HepG2-Zellen wurden in „6-Well-Platten“ inkubiert und anschließend mit 10 bzw. 100 μM Clofibrat oder Bezafibrat im Kulturmedium über drei aufeinander folgende Zeiträume von 24 h inkubiert. Die Fibrate waren in DMSO gelöst. Die Kontrolle erhielt im gleichen Volumen DMSO, wie die mit Fibraten stimulierten Zellen. Alle 24 h wurde das Medium gewechselt. Nach der zweiten und dritten Periode wurde das Medium im ELISA auf EPO untersucht. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt. Zytotoxische Effekte der verwendeten Fibratkonzentrationen wurden in einem zusätzlich durchgeführten MTT-Test nicht beobachtet.

Sowohl Clofibrat als auch Bezafibrat verminderten die 24-Stunden-Produktionsrate von EPO zeitabhängig. Im dritten 24-Stunden-Abschnitt reduzierten 100 μM Clofibrat im Kulturmedium die EPO-Produktion im Vergleich zu der Kontrolle um 39,8 %. Entsprechend führte die Stimulation mit 100 μM Bezafibrat zu einer Verringerung der 24-h-Produktionsrate von EPO um 29,5 % (Abb. 22).

**Abbildung 22:**

EPO-ELISA. Stimulation von HepG2-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Clofibrat bzw. Bezafibrat über drei aufeinander folgende 24-h-Zeiträume. Die Zellen erhielten alle 24 h frisches Medium. Die EPO-Konzentration im Kulturmedium wurde im ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte sowie die Standardabweichung (n=3). IU = international unit.

4. Diskussion

4.1 Molekulare Mechanismen der Pathogenese der ACD

Die ACD ist eine in der Klinik häufig gesehene Anämieform. Pathogenetisch liegt die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β und TNF α zugrunde. Zwei Angriffspunkte proinflammatorischer Zytokine auf die Erythropoiese stehen momentan im Mittelpunkt wissenschaftlicher Arbeiten: Erstens wird die Produktion von EPO direkt herabgesetzt. Zweitens verursachen proinflammatorische Zytokine eine Eisentransportstörung mit verminderter intestinaler Eisenresorption und Eisenretention in retikuloendothelialen Makrophagen und Hepatozyten (Kap. 1.2.1).

4.1.1 Das hepatische Peptid Heparin als Mediator der Eisentransportstörung

Bei der Entschlüsselung der molekularen Ursache der Eisentransportstörung wird in letzter Zeit das von Leber und Niere (Kulaksiz et al., 2005) sezernierte Peptid Heparin diskutiert. Die Heparin-Synthese wird durch proinflammatorische Zytokine wie IL-1 und IL-6, aber auch durch Hypoxie induziert (Nicolas et al., 2002; Lee et al., 2005).

Frühere Berichte hatten gezeigt, dass *hohe Heparinspiegel* einen Abfall der Eisenspiegel hervorrufen und zur Anämie führen können, denn Heparin vermindert die intestinale Eisenabsorption und den plazentaren Eisentransport. Auch die Freisetzung von wiederverwertetem Eisen aus Makrophagen des RES wird durch Heparin gehemmt, was die Verfügbarkeit von Eisen für sich ausdifferenzierende Erythrozyten des Knochenmarks reduziert (Nicolas et al., 2002). Dagegen führen sehr *niedrige Heparinspiegel* zur erhöhten Eisenaufnahme und können in einer Erkrankung durch Eisenüberladung enden (Nicolas et al., 2001).

Trotz der Kenntnisse über die Eigenschaften von Heparin und die Ursachen für seine Sekretion war der Mechanismus, der eigentlich zur Senkung der Eisenspiegel durch Heparin führt, lange nicht bekannt. Vor kurzem wurde festgestellt, dass Heparin an Ferroportin bindet, ein Protein, das bisher auf der Oberfläche von absorbierenden Enterozyten, Makrophagen des RES, Hepatozyten und Plazentazellen nachgewiesen wurde. Ferroportin ist ein Transmembranprotein, das Eisen aus der Zelle exportiert. Die Bindung von Heparin führt zur Aufnahme und zum Abbau von Ferroportin und verhindert

so wirksam den Transport zellulären Eisens aus der Zelle (Nemeth et al., 2004). Dieses aktuelle Modell macht Hepcidin zu dem lange gesuchten, zentralen Regulator des Eisenstoffwechsels. Über die Induktion von Hepcidin durch proinflammatorische Zytokine lassen sich die meisten Veränderungen des Eisenstoffwechsels erklären, die im Rahmen der ACD auftreten (Abb. 23).

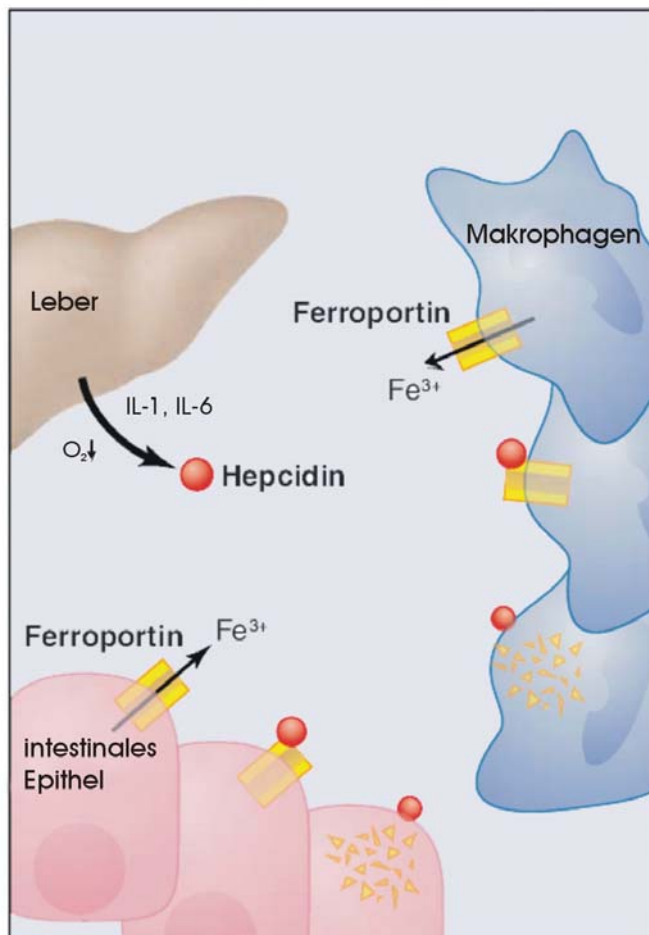


Abbildung 23:

Vereinfachtes Modell der Regulation des Eisenhaushaltes durch Hepcidin (Beutler, 2004).

4.1.2 Verminderung der EPO-Produktion durch proinflammatorische Zytokine

Verglichen mit den Fortschritten, die in der letzten Zeit bei der Erforschung der Eisentransportstörung gemacht wurden, ist über den zweiten zentralen Aspekt der Pathogenese der ACD deutlich weniger bekannt. Zwar wurde schon vor einiger Zeit gezeigt, dass proinflammatorische Zytokine die EPO-Expression hemmen (Jelkmann et al., 1990), wie dieser Effekt auf molekularer Ebene vermittelt wird, ist jedoch weitgehend ungeklärt.

Einige Arbeiten untersuchten den Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen auf GATA-2 und NF κ B, zwei an den EPO-Promotor bindende Transkriptionsfaktoren. GATA-2 wird in Bezug auf die Transkription des EPO-Gens eine negativ regulierende Funktion zugewiesen (Imagawa et al., 1997). Nach Stimulation mit IL-1 β und TNF α konnte in HepG2-Zellen mittels EMSA-Untersuchungen eine vermehrte DNA-Bindungsaktivität von GATA-2 nachgewiesen werden. Eine funktionelle Beteiligung von GATA-2 bei der durch proinflammatorische Zytokine verursachten Repression des EPO-Gens wird durch den Befund gestützt, dass in einem Zellkulturmodell die Stimulation mit einem GATA-spezifischen Inhibitor den negativen Effekt von proinflammatorischen Zytokinen auf die EPO-Expression zumindest teilweise wieder aufhebt (Imagawa et al., 2003).

Widersprüchliche Ergebnisse sind bezüglich der Rolle von NF κ B für die EPO-Expression beschrieben worden. NF κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der in vielen Zelltypen unter anderem durch proinflammatorische Zytokine aktiviert wird. Der aktivierte Faktor NF κ B führt zu einer schnellen Induktion von Genen, die für eine frühe Abwehr- bzw. Entzündungsreaktion verantwortlich sind. Ob die Aktivierung von NF κ B auf die EPO-Expression einen verstärkenden oder hemmenden Einfluss hat, wird in der Literatur jedoch kontrovers beurteilt (Figueroa et al., 2002; La Ferla et al., 2002).

4.2 Modulation der Aktivität des EPO-Enhancers durch IL-1 β

Zwar wurde von mehreren Arbeitsgruppen der Einfluss von IL-1 β und TNF α auf Elemente des EPO-Promotors untersucht (Kap. 4.1.2), die Wirkung von proinflammatorischen Zytokinen auf die Aktivität des EPO-Enhancers ist jedoch unbekannt.

Für die Funktion des EPO-Enhancers ist ein Zusammenspiel von mehreren Transkriptionsfaktoren notwendig (Kap. 1.4.1). Vor einiger Zeit wurde in unserer

Arbeitsgruppe gezeigt, dass die DNA-Bindungsaktivität von HIF-1 α durch Stimulation mit IL-1 β und TNF α erhöht wird (Hellwig-Burgel et al., 1999). Dieser zunächst überraschende Befund legte nahe, dass die Aktivierung von HIF-1 α ein wichtiger Vorgang im Rahmen der Entzündungsreaktion ist, stand jedoch im Widerspruch mit der Repression des EPO-Gens durch proinflammatorische Zytokine. Die Wirkung von proinflammatorischen Zytokinen auf HNF-4 α , einen weiteren den EPO-Enhancer bindenden Transkriptionsfaktor war hingegen unbekannt.

4.2.1 Der Einfluss von IL-1 β auf den Transkriptionsfaktor HNF-4 α

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit IL-1 β zu einer dosisabhängigen Reduktion von HNF-4 α -Kernprotein in HepG2-Zellen führt (Kap. 3.1.2). Dies war ein Hinweis darauf, dass der Transkriptionsfaktor HNF-4 α an der durch IL-1 β hervorgerufenen Verminderung der EPO-Expression ursächlich beteiligt ist.

Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Effekt von IL-1 β auf die HNF-4 α -Proteinmenge stark abgeschwächt wird, wenn die stimulierten Zellen gleichzeitig mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 inkubiert werden (Kap. 3.1.3). Dies lässt vermuten, dass HNF-4 α -Protein mittels eines durch IL-1 β induzierten Mechanismus verstärkt im Proteasom abgebaut wird. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Befunden einer anderen Arbeitsgruppe (Wang et al., 2001). Wang et al. behandelten die verwendeten Zellen jedoch mit deutlich höheren Konzentrationen von IL-1 β in Höhe von 10 ng/ml. Im Gegensatz dazu wurden im Rahmen dieser Arbeit die Zellen mit einer maximalen IL-1 β -Konzentration von 300 pg/ml im Kulturmedium stimuliert. Diese Konzentration hatte in vorangegangenen Experimenten die Menge an von HepG2-Zellen sezerniertem EPO vermindert, auf die Zellen selbst jedoch nicht zytotoxisch gewirkt. Ein signifikanter Effekt von IL-1 β auf HNF-4 α -Kernprotein konnte sogar bei noch deutlich niedrigeren Konzentrationen gemessen werden. Die von Wang et. al. verwendete Konzentration von 10 ng/ml hat nach Erkenntnissen unserer Arbeitsgruppe bereits einen zytotoxischen Effekt.

Erstmals konnte im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass IL-1 β schon auf mRNA-Ebene einen Einfluss auf die Expression von HNF-4 α hat: Der HNF-4 α -mRNA-Spiegel war in HepG2 Zellen bereits nach zweistündiger Inkubation mit IL-1 β im Kulturmedium auf ungefähr 20 % des Wertes der Kontrolle reduziert (frühere Zeitpunkte wurden nicht untersucht). Der HNF-4 α -mRNA-Spiegel verblieb für wenigsten 6 weitere Stunden erniedrigt. Ob diese deutliche Abfall der HNF-4 α -mRNA aufgrund von einer

durch IL-1 β induzierten Verminderung der HNF-4 α -mRNA-Synthese oder aufgrund von einem gesteigerten Abbau von neu synthetisierter mRNA verursacht worden ist, bleibt durch weitere Experimente zu klären. Die durch IL-1 β induzierte Reduktion von HNF-4 α -mRNA ähnelte jedoch stark der Reduktion nach Zugabe des RNA-Synthese-Inhibitors Actinomycin D. Diese Beobachtung unterstützt eher die Hypothese, dass durch IL-1 β die HNF-4 α -mRNA-Expression vermindert wird. Der L28-mRNA-Spiegel wurde weder durch IL-1 β noch durch Actinomycin D beeinflusst (Daten nicht gezeigt), was als Hinweis auf eine hohe Stabilität der L28-mRNA gewertet werden kann (Kap. 3.2.1).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es nach Stimulation mit IL-1 β sowohl durch transkriptionelle als auch durch posttranskriptionelle Mechanismen zu einer Verminderung des HNF-4 α -Spiegels kommt.

4.2.2 Die Bedeutung von HNF-4 α für die Modulation der Aktivität des EPO-Enhancers durch IL-1 β

Nachdem in dieser Arbeit sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene ein negativer Einfluss von IL-1 β auf HNF-4 α dargestellt werden konnte, wurden funktionelle Experimente durchgeführt. Mittels Gelverzögerungstests wurde die DNA-Bindungsaktivität von HNF-4 α an der DR2-Sequenz des EPO-Enhancers untersucht (Kap. 3.3). In Proben aus mit IL-1 β stimulierten Zellen fand sich im Vergleich zu Proben aus unstimulierten Zellen eine insgesamt reduzierte DNA-Bindungsaktivität an dem markierten DR2-Oligonukleotid (Kap. 3.3.1). Da die DR2-Stelle des EPO-Enhancers jedoch nicht ausschließlich HNF-4 α sondern auch COUP-TF bindet, wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt: Um in den Proben vorhandenes COUP-TF zu binden und so die verbleibende Aktivität von HNF-4 α isoliert beurteilen zu können, wurde ein spezifisch COUP-TF, aber nicht HNF-4 α bindendes Oligonukleotid unmarkiert als Kompetitor verwendet. Geschah dies mit Kernextrakten von mit IL-1 β -stimulierten Zellen, war an dem DR2-Oligonukleotid keine Bindungsaktivität mehr nachweisbar (Kap. 3.3.2). So konnte gezeigt werden, dass die durch IL-1 β hervorgerufene Verminderung der DNA-Bindungsaktivität an dem DR2-Oligonukleotid insbesondere aus einer verminderten Aktivität von HNF-4 α resultiert. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die nach Stimulation mit IL-1 β verminderte Menge an HNF-4 α -Kernprotein auch einen funktionellen Einfluss auf die Aktivität des EPO-Enhancers hat.

Um die Relevanz dieser verminderten Bindungsaktivität von HNF-4 α für die Expression des EPO-Gens zu verdeutlichen, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Reporterplasmide konstruiert, die die regulatorischen Elemente des EPO-Enhancers enthalten. So konnte der Einfluss von IL-1 β auf die Aktivität des gesamten EPO-Enhancers untersucht werden (Kap. 3.4). Denn nach den bisherigen Ergebnissen dieser Arbeit war zwar bekannt, dass die DNA-Bindungsaktivität an der DR2-Stelle des EPO-Enhancers durch IL-1 β vermindert wird, jedoch wird gleichzeitig die DNA-Bindung des aktivierenden Transkriptionsfaktors HIF-1 α an der zweiten wichtigen Bindungsstelle des EPO-Enhancers, dem HRE-Element, durch proinflammatorische Zytokine induziert (Hellwig-Burgel et al., 1999). Da das EPO-Enhancer-wt-Plasmid beide Bindungsstellen enthält, konnte erstmals der Effekt von IL-1 β auf diese beiden Bindungsstellen in Relation gesetzt und so die Gesamtaktivität des Enhancers untersucht werden. Mit dem EPO-Enhancer-wt-Plasmid durchgeführte transiente Transfektionen in HepG2-Zellen sowie die entsprechenden Luciferase-Assays wurden von der Doktorandin Bathmunk Chimidtsere durchgeführt. Frau Chimidtsere konnte zeigen, dass die Luciferase-Aktivität des EPO-Enhancer-Reporterplasmids in HepG2-Zellen durch IL-1 β vermindert wird (bisher unpubliziert, Daten in dieser Arbeit nicht gezeigt). Dieses Ergebnis gibt Hinweise darauf, dass der Einfluss von IL-1 β auf die DR-2 Stelle anscheinend denjenigen auf das HRE-Element überwiegt. Dabei muss beachtet werden, dass die entsprechenden Versuche in Hepatozyten durchgeführt worden sind. Hepatische Zelllinien sind ein gängiges Modell für die Untersuchung der EPO-Expression, da bisher keine renale Zelllinie bekannt ist, die sauerstoffabhängig EPO produziert. Weil HNF-4 α in Hepatozyten in sehr großen Mengen vorliegt, kann jedoch vermutet werden, dass ein durch IL-1 β verminderter HNF-4 α -Spiegel in Zellen mit niedrigerem basalen HNF-4 α -Spiegel einen noch größeren Effekt hätte.

In Western-Blot-Experimenten wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass U2OS-Zellen kein HNF-4 α exprimieren (Kap. 3.1.1). Um die Rolle von HNF-4 α in Hinblick auf die Aktivität der Reporterplasmide noch genauer beurteilen zu können, wurden EPO-Enhancer-Reporterplasmide in U2OS-Zellen transfiziert. So konnte die Aktivität der Plasmide in einem HNF-4 α -freien Zellkulturmodell untersucht und bei Co-Transfektion eines HNF-4 α -Expressionsplasmids direkt mit einem Modell verglichen werden, in dem HNF-4 α exprimiert wird (Kap. 3.4).

Die mit dem EPO-Enhancer-wt-Plasmid transfizierten U2OS-Zellen zeigten bei Co-Transfektion des HNF-4 α -dsRed2-Expressionsplasmids im Vergleich zu normoxisch inkubierten Zellen eine 15fache hypoxische Induktion der Reporteraktivität. Diese

hypoxische Induktion wurde durch Stimulation mit IL-1 β vollständig unterdrückt. Auch unter normoxischen Bedingungen führte die Stimulation mit IL-1 β verglichen mit der unstimulierten Kontrolle zu einer Verminderung der Reporterogenaktivität. Wurde anstatt des HNF-4 α -dsRed2-Expressionsplasmids das leere pcDNA3-Expressionsplasmid als Kontrolle co-transfiziert, wurden weder eine hypoxische Induktion des Reporterplasmids, noch ein signifikanter Effekt von IL-1 β auf dessen Aktivität gemessen (Kap. 3.4.1). Dieses Ergebnis macht deutlich, dass HNF-4 α nicht nur wie bereits beschrieben für die hypoxische Induktion des EPO-Gens notwendig (Galson et al., 1995), sondern auch der verantwortliche Transkriptionsfaktor für die durch IL-1 β hervorgerufene Verminderung der Aktivität des EPO-Enhancers ist. Weiterhin unterstützen diese Experimente die Annahme, dass die Verminderung der Aktivität von HNF-4 α auch auf Proteinebene, also posttranskriptionell stattfindet: Es ist unwahrscheinlich, dass die Expression des HNF-4 α -dsRed2-Expressionsplasmids durch IL-1 β beeinflusst wird. Schließlich wurde nur die kodierende Sequenz von HNF-4 α ohne die entsprechenden regulatorischen Elemente in den Expressionsvektor kloniert. Ein durch IL-1 β induzierter Abbau von HNF-4 α Protein durch das Proteasom scheint in diesem Zusammenhang wahrscheinlicher zu sein.

Für diese Arbeit wurden weitere Reporterplasmide konstruiert. Bei einem zweiten Plasmid wurde die HIF-Bindungsstelle (EPO-dHIF) sowie bei einem dritten Plasmid zusätzlich das CACA-Element (EPO-dHIFdCACA) deletiert. Mit diesen Plasmiden transfizierte U2OS-Zellen zeigten weder bei Co-Transfektion mit dem HNF-4 α -dsRed2-Expressionsplasmid noch bei Co-Transfektion mit dem leeren pcDNA3-Kontrollvektor eine hypoxisch induzierbare Reporterogenaktivität im Luciferase-Assay. Auch die Stimulation mit IL-1 β führte zu keiner signifikant veränderten Reporterogenaktivität im Vergleich zu der unstimulierten Kontrolle (Kap. 3.4.2 und 3.4.3). Dieses Ergebnis macht deutlich, dass für die Funktion des EPO-Enhancers sowohl die HIF-Bindungsstelle als auch das DR2-Element nötig sind. Interessanterweise ist auch der durch HNF-4 α vermittelte Effekt von IL-1 β auf die Aktivität des EPO-Enhancers auf eine intakte HIF-Bindungsstelle angewiesen. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass beide Bindungsstellen notwendig sind, damit sich ein Komplex aus HIF-1, HNF-4 α , p300 und SRC-1 bilden kann (Kap. 1.4.3). Dafür spräche auch, dass die gemessenen rlu-Werte bei Transfektion des EPO-dHIF-Plasmid um ein vielfaches niedriger waren, als bei Transfektionen mit dem EPO-wt-Plasmid.

4.3 Schlussfolgerungen

Nach den in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnissen wird durch Stimulation mit IL-1 β die Transkription von HNF-4 α herabgesetzt. Zusätzlich wird wahrscheinlich ein verstärkter Abbau von HNF-4 α -Protein durch das Proteasom induziert. Durch IL-1 β wird die HNF-4 α -Proteinmenge also anscheinend sowohl durch transkriptionelle als auch durch posttranskriptionelle Mechanismen vermindert.

Dadurch wird die DNA-Bindungsaktivität von HNF-4 α am EPO-Enhancer vermindert und so die hypoxische Induzierbarkeit des Enhancers unterdrückt. Dies lässt vermuten, dass HNF-4 α ein Transkriptionsfaktor ist, über den die Repression des EPO-Gens durch proinflammatorische Zytokine vermittelt wird.

4.4 Die Pathogenese der ACD: Ein Modell auf molekularer Ebene

Oftmals wird kontrovers diskutiert, ob die über Hepcidin vermittelte Eisentransportstörung oder die Verminderung der EPO-Expression der wesentlichere Aspekt für die Pathogenese der ACD ist. Die Anämie wird hierbei meist isoliert betrachtet.

Betrachtet man die ACD jedoch als eine Abwehrstrategie des Körpers, um die zugrunde liegende Infektion oder Tumorerkrankung zu bekämpfen, ergibt sich ein anderes Bild: Da Eisen ein essentieller Faktor für alle Lebewesen ist, hemmt die Limitierung der Eisenverfügbarkeit, wie sie bei der ACD beobachtet wird, das Wachstum von eindringenden Mikroorganismen und Tumorzellen (Weinberg, 1984; Weiss, 2005). Zudem sind rasch wachsende Gewebe auf ein adäquates Sauerstoffangebot angewiesen, welches sich im Rahmen einer Anämie reduziert (Weiss, 2002).

Bringt man die Ergebnisse dieser Arbeit mit den jüngsten Erkenntnissen auf dem Gebiet des Eisenstoffwechsels zusammen, liegt die Vermutung nahe, dass diese Vorgänge auf molekularer Ebene *gemeinsam* über die Induktion von Hepcidin und eine Verminderung der Aktivität von HNF-4 α realisiert werden. Bindet Hepcidin an Ferroportin kommt es zu dessen Internalisierung und Abbau in der Zelle. Die Folge ist eine verminderte Eisenresorption durch die Enterozyten des Darms und eine verringerte Eisenfreisetzung aus Hepatozyten und den Makrophagen des RES. Durch diesen Vorgang sinkt das extrazelluläre Eisenangebot, es wird aber auch das der Erythropoese zur Verfügung stehende Eisen reduziert. Da über eine verminderte Aktivität von HNF-4 α gleichzeitig die

EPO-Expression herabgesetzt wird, sinkt der Eisenverbrauch durch die Erythropoiese entsprechend.

Neben der EPO-Produktion ist bei Patienten mit ACD auch das Serum-Transferrin vermindert. Transferrin ist ein vor allem in der Leber gebildetes und für den Eisentransport zuständiges negatives Akutphaseprotein. Da auch die Expression des Transferrin-Gens von HNF-4 α abhängig ist, liegt die Vermutung nahe, dass auch dieser Teilaspekt der Pathogenese der ACD über eine durch IL-1 β verminderte Aktivität von HNF4 α vermittelt werden könnte. Unterstützt wird diese Vermutung dadurch, dass die Stimulation mit IL-1 β in HepG2-Zellen zu einer verminderten Sekretion von Transferrin führt (Hirayama et al., 1993), in Zellen, die kein HNF-4 α exprimieren, jedoch gegensätzlich wirkt: Nach Literaturangaben wird die Transferrinexpression in Sertolizellen durch IL-1 β induziert (Hoeben et al., 1996; Huleihel et al., 2002). Die Wirkung von IL-1 β auf den Transkriptionsfaktor HNF-4 α scheint demnach für die Pathogenese der ACD eine über die Repression des EPO-Gens hinausgehende Bedeutung zu haben.

Durch ein Zusammenspiel von durch HNF-4 α und Hepcidin vermittelten Abläufen kommt es bei der ACD also zu einer koordinierten Verminderung von Eisenaufnahme, Eisentransport und Eisenverbrauch (Abb. 24).

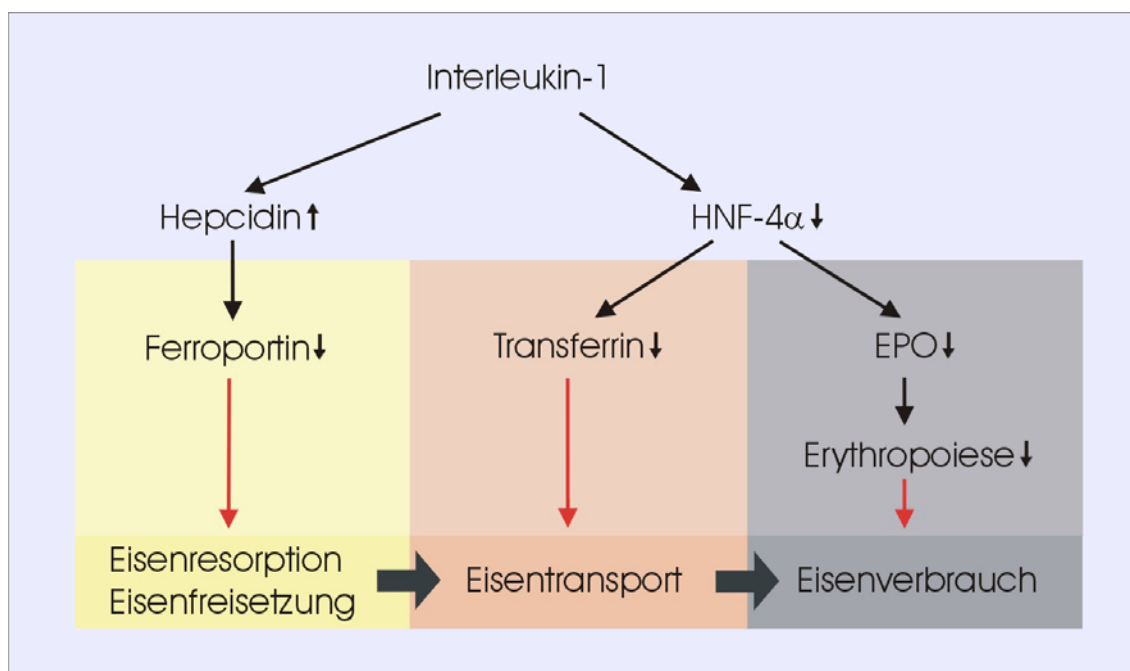


Abbildung 24:

Die Pathogenese der ACD: Ein Vorschlag für ein Modell auf molekularer Ebene. Die roten Pfeile stellen inhibitorische Wirkungen auf den Eisenstoffwechsel dar.

4.5 Ausblick: Einfluss von Fibratderivaten auf die EPO-Expression

Über die ursprünglichen Fragestellung hinausgehend wurde in dieser Arbeit zusätzlich der Einfluss von Fibratderivaten auf die EPO-Expression untersucht.

Nachdem in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass HNF-4 α in Bezug auf die Repression des EPO-Gens durch IL-1 β nicht nur ein konstitutioneller Transkriptionsfaktor ist, sondern auch regulatorische Funktionen übernimmt (Kap. 4.2), stellte sich die Frage, ob außer IL-1 β noch weitere Stimuli existieren, die über eine veränderte Aktivität von HNF-4 α die EPO-Expression beeinflussen. Nach Literaturangaben vermindern Fibrate in vitro die Aktivität von HNF-4 α (Hertz et al., 1995; Hertz et al., 2001).

Die Inkubation von HepG2-Zellen mit Clofibrat und Bezafibrat im Kulturmedium führte zu einer verminderten Menge an sezerniertem EPO (Kap. 3.5.1). Bisher ist ein Einfluss von Fibraten auf die EPO-Expression nicht beschrieben worden. Für die lipidsenkenden Fibratderivate, die schon seit mehreren Jahren erfolgreich in der Therapie der Hyperlipidämie eingesetzt werden (Forman et al., 1997), ist jedoch die Anämie als unerwünschte Nebenwirkung bekannt. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen ersten Daten legen nahe, dass diese Anämie das Resultat einer verminderten EPO-Expression ist.

4.5.1 Mögliche Signalwege für die Beeinflussung der EPO-Sekretion durch Fibrate

Grundsätzlich sind zwei Signalwege denkbar, über die Fibrate die EPO-Expression beeinflussen könnten: Erstens ist wie oben erwähnt eine durch Fibrate verminderte Aktivität von HNF-4 α als Ursache für die herabgesetzte EPO-Sekretion denkbar. Zweitens sind Fibrate synthetischer Ligand von peroxisomen proliferator activated receptor α (PPAR α), einem ligandenaktivierten Transkriptionsfaktor, der bisher mit der EPO-Expression noch nicht in Zusammenhang gebracht worden ist (Abb. 25).

Nachdem PPARs anfänglich als Rezeptoren für bestimmte lipidsenkende Substanzen identifiziert worden sind, die in der Leber von Nagern zu Vermehrung und Vergrößerung von Peroxisomen führen (Lazarow und De Duve, 1976), haben neuere Arbeiten PPARs als nukleäre Transkriptionsfaktoren beim Menschen charakterisiert (Sher et al., 1993). Der Name „PPAR“ ist für diese Gruppe von NHRs allerdings irreführend, da das Phänomen der Peroxisomenproliferation im humanen System nie gezeigt werden konnte. Nach Aktivierung durch einen Liganden bilden PPARs Heterodimere mit RXR und binden an

definierte PPAR response elements (PPRE). Diese PPRE gehören zu der Kategorie der DR1- und DR2-Elemente (Guan und Breyer, 2001; Marx et al., 2004). Aktivatoren von PPAR α sind vielfach ungesättigte Fettsäuren, Eicosanoide sowie die lipidsenkende Fibratderivate.

Es erscheint aus mehreren Gründen viel versprechend, eine Beteiligung von PPAR α bei der EPO-Expression zu untersuchen: Erstens bietet sich das DR2-Element des EPO-Enhancers als mögliche Bindungsstelle an. Zweitens wird PPAR α in Leber und Niere, den beiden wichtigsten Produktionsorten für EPO, in großen Mengen exprimiert (Su et al., 1998). Auch wurde in der Literatur eine Interaktion von PPAR α mit HNF-4 α und COUP-TFs beschrieben: Für andere Zielgene ist bereits bekannt, dass PPAR α diese beiden Transkriptionsfaktoren von der gemeinsamen Bindungsstelle verdrängt und so die Genexpression vermindert (Hertz et al., 1995; Shimamoto et al., 2004). Weitere Experimente sind in Planung, um die Wirkung von Fibraten auf die EPO-Expression besser zu verstehen und eine mögliche Beteiligung des Transkriptionsfaktors PPAR α zu untersuchen.

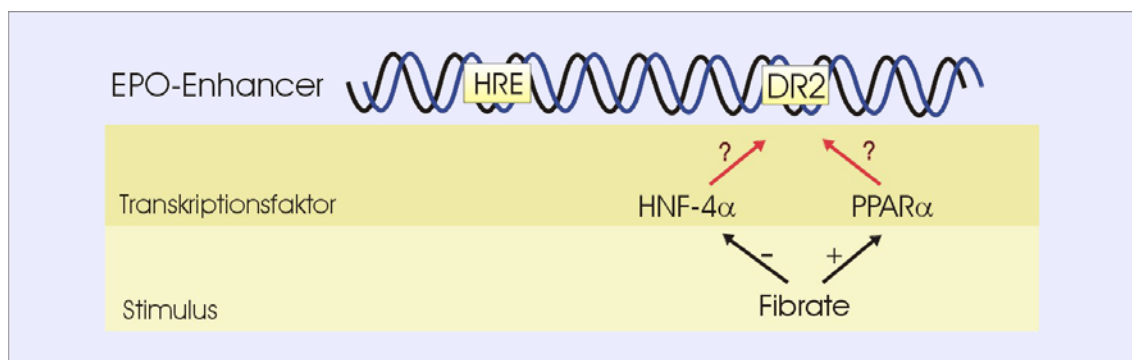


Abbildung 25

Zwei Signalwege, über die Fibrat die in dieser Arbeit erstmals gezeigte Verminderung der EPO-Expression verursachen könnten.

5. Zusammenfassung

Die Erythropoiese wird durch das Hormon Erythropoietin (EPO) gesteuert. Die EPO-Expression wird durch proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 β (IL-1 β) vermindert. Dies wird als ein wesentlicher Pathomechanismus der bei Patienten mit entzündlichen und neoplastischen Erkrankungen häufig auftretenden „Anämie chronischer Erkrankungen“ (ACD) angesehen. Auf molekularer Ebene ist dieser Vorgang weitgehend unklar. Diese Arbeit sollte klären, ob IL-1 β die Verminderung der EPO-Expression über eine Beeinflussung der Aktivität des EPO-Enhancers bewirkt. Insbesondere die Rolle des den EPO-Enhancers bindenden Transkriptionsfaktors HNF-4 α sollte untersucht werden.

Mittels Western-Blot-Experimenten wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Stimulation mit IL-1 β in HepG2-Zellen zu einer dosisabhängigen Reduktion von HNF-4 α -Protein führt. Auch die mittels Realtime-PCR gemessene HNF-4 α -mRNA-Menge war nach Stimulation mit IL-1 β vermindert. Wurden HepG2-Zellen zusätzlich mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 inkubiert, war der Effekt von IL-1 β auf die HNF-4 α -Proteinmenge aufgehoben; IL-1 β induziert also wahrscheinlich einen verstärkten Abbau von HNF-4 α -Protein durch das Proteasom. Aus diesen Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass IL-1 β sowohl durch transkriptionelle als auch durch posttranskriptionelle Mechanismen die HNF-4 α -Proteinmenge vermindert.

Anschließend wurden funktionelle Experimente durchgeführt: Mittels Gelverzögerungstests (EMSA) konnte gezeigt werden, dass nach Stimulation mit IL-1 β die DNA-Bindungsaktivität von HNF-4 α an der DR2-Sequenz des EPO-Enhancers vermindert ist. Um die Relevanz dieses Ergebnisses für die Expression des EPO-Gens zu verdeutlichen, wurden Reporterplasmide konstruiert, die die regulatorischen Elemente des EPO-Enhancers enthalten. Diese Reporterplasmide wurden in U2OS-Zellen, welche kein HNF-4 α exprimieren, transfiziert. So konnte die Reporterogenaktivität der Plasmide in einem HNF-4 α -freien Zellkulturmodell untersucht und bei Co-Transfektion eines HNF-4 α -Expressionsplasmids direkt mit einem Modell verglichen werden, in dem HNF-4 α exprimiert wird. Mit dem EPO-Enhancer-Reporterplasmid transfizierte U2OS-Zellen zeigten bei Co-Transfektion des HNF-4 α -Expressionsplasmids im Vergleich zu normoxisch inkubierten Zellen eine 15fache hypoxische Induktion der Reporterogenaktivität. Diese hypoxische Induktion wurde durch Stimulation mit IL-1 β vollständig unterdrückt. Ohne Co-Transfektion des HNF-4 α -Expressionsplasmids wurden weder eine hypoxische Induktion des Reporterplasmids noch ein signifikanter Effekt von

IL-1 β auf dessen Aktivität gemessen. Dieses Ergebnis macht deutlich, dass HNF-4 α nicht nur für die hypoxische Induktion des EPO-Gens notwendig ist, sondern auch der verantwortliche Transkriptionsfaktor für die durch IL-1 β hervorgerufene Verminderung der Aktivität des EPO-Enhancers ist.

Ausgehend von diesen auf einem Zellkultur-Modell basierenden Daten kann angenommen werden, dass HNF-4 α ein Transkriptionsfaktor ist, über den die Repression des EPO-Gens durch IL-1 β auch in vivo vermittelt wird.

Neben EPO ist bei Patienten mit ACD außerdem das Serum-Transferrin vermindert. Auch die Expression des Transferrin-Gens ist von HNF-4 α abhängig. Die Wirkung von IL-1 β auf den Transkriptionsfaktor HNF-4 α scheint demnach für die Pathogenese der ACD eine über die Repression des EPO-Gens hinausgehende Bedeutung zu haben.

Über die ursprüngliche Fragestellung hinausgehend wurde der Einfluss von Fibraten auf die EPO-Expression untersucht, denn nach Literaturangaben reduzieren Fibrate in vitro die Aktivität von HNF-4 α . In dieser Arbeit konnte erstmals enzym-immunologisch gezeigt werden, dass mit Fibraten stimulierte HepG2-Zellen vermindert EPO sezernieren. Weitere Experimente sind notwendig, um den Wirkmechanismus von Fibraten auf die EPO-Expression besser zu verstehen.

6. Literaturverzeichnis

- Aden D, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I und Knowles B: Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 282, 615-616 (1979)
- Alvarez-Hernandez X, Liceaga J, McKay IC und Brock JH: Induction of hypoferremia and modulation of macrophage iron metabolism by tumor necrosis factor. *Lab Invest* 61, 319-22 (1989)
- Aranda A und Pascual A: Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 81, 1269-304 (2001)
- Arany Z, Huang LE, Eckner R, Bhattacharya S, Jiang C, Goldberg MA, Bunn HF und Livingston DM: An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12969-73 (1996)
- Beck I, Ramirez S, Weinmann R und Caro J: Enhancer element at the 3'-flanking region controls transcriptional response to hypoxia in the human erythropoietin gene. *J Biol Chem* 266, 15563-6 (1991)
- Beutler E: Cell biology. "Pumping" iron: the proteins. *Science* 306, 2051-3 (2004)
- Beyersmann D: Regulation of mammalian gene expression. *Exs* 89, 11-28 (2000)
- Birnboim HC und Doly J: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-23 (1979)
- Blanchard KL, Acquaviva AM, Galson DL und Bunn HF: Hypoxic induction of the human erythropoietin gene: cooperation between the promoter and enhancer, each of which contains steroid receptor response elements. *Mol Cell Biol* 12, 5373-85 (1992)
- Bogan AA, Dallas-Yang Q, Ruse MD, Jr., Maeda Y, Jiang G, Nepomuceno L, Scanlan TS, Cohen FE und Sladek FM: Analysis of protein dimerization and ligand binding of orphan receptor HNF4alpha. *J Mol Biol* 302, 831-51 (2000)

- Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-54 (1976)
- Bustin SA: Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 29, 23-39 (2002)
- Carrero P, Okamoto K, Coumailleau P, O'Brien S, Tanaka H und Poellinger L: Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell Biol* 20, 402-15 (2000)
- Carthew RW, Chodosh LA und Sharp PA: An RNA polymerase II transcription factor binds to an upstream element in the adenovirus major late promoter. *Cell* 43, 439-48 (1985)
- Cartwright GE: The anemia of chronic disorders. *Semin Hematol* 3, 351-75 (1966)
- Chen T, Xie W, Agler M und Banks M: Coactivators in assay design for nuclear hormone receptor drug discovery. *Assay Drug Dev Technol* 1, 835-42 (2003)
- Cheung P, Allis CD und Sassone-Corsi P: Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell* 103, 263-71 (2000)
- Cohen SN, Chang AC und Hsu L: Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69, 2110-4 (1972)
- Costa RH, Grayson DR und Darnell JE, Jr.: Multiple hepatocyte-enriched nuclear factors function in the regulation of transthyretin and alpha 1-antitrypsin genes. *Mol Cell Biol* 9, 1415-25 (1989)
- de Wet JR, Wood KV, Helinski DR und DeLuca M: Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 7870-3 (1985)
- Drewes T, Senkel S, Holewa B und Ryffel GU: Human hepatocyte nuclear factor 4 isoforms are encoded by distinct and differentially expressed genes. *Mol Cell Biol* 16, 925-31 (1996)

- Erslev AJ: Erythropoietin. *N Engl J Med* 324, 1339-44 (1991)
- Figueroa YG, Chan AK, Ibrahim R, Tang Y, Burow ME, Alam J, Scandurro AB und Beckman BS: NF-kappaB plays a key role in hypoxia-inducible factor-1-regulated erythropoietin gene expression. *Exp Hematol* 30, 1419-27 (2002)
- Forman BM, Chen J und Evans RM: Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4312-7 (1997)
- Fraser JD, Martinez V, Straney R und Briggs MR: DNA binding and transcription activation specificity of hepatocyte nuclear factor 4. *Nucleic Acids Res* 26, 2702-7 (1998)
- Freedman LP: Increasing the complexity of coactivation in nuclear receptor signaling. *Cell* 97, 5-8 (1999)
- Fried M und Crothers DM: Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 9, 6505-25 (1981)
- Galson DL, Tan CC, Ratcliffe PJ und Bunn HF: Comparison of the human and mouse erythropoietin genes shows extensive homology in the flanking regions. *Blood* 82, 3321-6 (1993)
- Galson DL, Tsuchiya T, Tendler DS, Huang LE, Ren Y, Ogura T und Bunn HF: The orphan receptor hepatic nuclear factor 4 functions as a transcriptional activator for tissue-specific and hypoxia-specific erythropoietin gene expression and is antagonized by EAR3/COUP-TF1. *Mol Cell Biol* 15, 2135-44 (1995)
- Ganz T: Heparin-a regulator of intestinal iron absorption and iron recycling by macrophages. *Best Pract Res Clin Haematol* 18, 171-82 (2005)
- Garner MM und Revzin A: A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the Escherichia coli lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res* 9, 3047-60 (1981)
- Gibson UE, Heid CA und Williams PM: A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 6, 995-1001 (1996)

- Gill G: Regulation of the initiation of eukaryotic transcription. *Essays Biochem* 37, 33-43 (2001)
- Glass CK und Rosenfeld MG: The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 14, 121-41 (2000)
- Goldberg MA, Glass GA, Cunningham JM und Bunn HF: The regulated expression of erythropoietin by two human hepatoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 7972-6 (1987)
- Guan Y und Breyer MD: Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): novel therapeutic targets in renal disease. *Kidney Int* 60, 14-30 (2001)
- Gupta M und Goldwasser E: The role of the near upstream sequence in hypoxia-induced expression of the erythropoietin gene. *Nucleic Acids Res* 24, 4768-74 (1996)
- Hall RK, Sladek FM und Granner DK: The orphan receptors COUP-TF and HNF-4 serve as accessory factors required for induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription by glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 412-6 (1995)
- Hellwig-Burgel T, Rutkowski K, Metzen E, Fandrey J und Jelkmann W: Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood* 94, 1561-7 (1999)
- Henry DH: The evolving role of epoetin alfa in cancer therapy. *Oncologist* 9, 97-107 (2004)
- Hertz R, Bishara-Shieban J und Bar-Tana J: Mode of action of peroxisome proliferators as hypolipidemic drugs. Suppression of apolipoprotein C-III. *J Biol Chem* 270, 13470-5 (1995)
- Hertz R, Magenheimer J, Berman I und Bar-Tana J: Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4alpha. *Nature* 392, 512-6 (1998)
- Hertz R, Sheena V, Kalderon B, Berman I und Bar-Tana J: Suppression of hepatocyte nuclear factor-4alpha by acyl-CoA thioesters of hypolipidemic peroxisome proliferators. *Biochem Pharmacol* 61, 1057-62 (2001)

- Hillmann RS: Eisenmangel und andere hypoproliferative Anämien.
in: Fauci AS, Martin JB, Braunwald E, Kasper DL, Isselbacher KJ, Hauser SL, Wilson JD, Longo DL: *Harrisons Innere Medizin, Übersetzung der 14. Auflage, Band 1, Kapitel 106, 765 - 73, Mc Graw-Hill International, Berkshire (1999)*
- Hirayama M, Kohgo Y, Kondo H, Shintani N, Fujikawa K, Sasaki K, Kato J und Niitsu Y:
Regulation of iron metabolism in HepG2 cells: a possible role for cytokines in the hepatic deposition of iron. *Hepatology* 18, 874-80 (1993)
- Hoeben E, Van Damme J, Put W, Swinnen JV und Verhoeven G: Cytokines derived from activated human mononuclear cells markedly stimulate transferrin secretion by cultured Sertoli cells. *Endocrinology* 137, 514-21 (1996)
- Holewa B, Zapp D, Drewes T, Senkel S und Ryffel GU: HNF4beta, a new gene of the HNF4 family with distinct activation and expression profiles in oogenesis and embryogenesis of *Xenopus laevis*. *Mol Cell Biol* 17, 687-94 (1997)
- Huleihel M, Zeyse D, Lunenfeld E, Zeyse M und Mazor M: Induction of transferrin secretion in murine Sertoli cells by FSH and IL-1: the possibility of different mechanism(s) of regulation. *Am J Reprod Immunol* 47, 112-7 (2002)
- Imagawa S, Nakano Y, Obara N, Suzuki N, Doi T, Kodama T, Nagasawa T und Yamamoto M: A GATA-specific inhibitor (K-7174) rescues anemia induced by IL-1beta, TNF-alpha, or L-NMMA. *Faseb J* 17, 1742-4 (2003)
- Imagawa S, Yamamoto M und Miura Y: Negative regulation of the erythropoietin gene expression by the GATA transcription factors. *Blood* 89, 1430-9 (1997)
- Jelkmann W: Proinflammatory cytokines lowering erythropoietin production. *J Interferon Cytokine Res* 18, 555-9 (1998)
- Jelkmann W: Molecular biology of erythropoietin. *Intern Med* 43, 649-59 (2004)
- Jelkmann W, Wolff M und Fandrey J: Modulation of the production of erythropoietin by cytokines: in vitro studies and their clinical implications. *Contrib Nephrol* 87, 68-77 (1990)

- Kambe T, Tada-Kambe J, Kuge Y, Yamaguchi-Iwai Y, Nagao M und Sasaki R: Retinoic acid stimulates erythropoietin gene transcription in embryonal carcinoma cells through the direct repeat of a steroid/thyroid hormone receptor response element half-site in the hypoxia-response enhancer. *Blood* 96, 3265-71 (2000)
- Kristie TM und Roizman B: Alpha 4, the major regulatory protein of herpes simplex virus type 1, is stably and specifically associated with promoter-regulatory domains of alpha genes and of selected other viral genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 3218-22 (1986)
- Kulaksiz H, Theilig F, Bachmann S, Gehrke SG, Rost D, Janetzko A, Cetin Y und Stremmel W: The iron-regulatory peptide hormone hepcidin: expression and cellular localization in the mammalian kidney. *J Endocrinol* 184, 361-70 (2005)
- La Ferla K, Reimann C, Jelkmann W und Hellwig-Burgel T: Inhibition of erythropoietin gene expression signaling involves the transcription factors GATA-2 and NF-kappaB. *Faseb J* 16, 1811-3 (2002)
- Ladias JA und Karathanasis SK: Regulation of the apolipoprotein AI gene by ARP-1, a novel member of the steroid receptor superfamily. *Science* 251, 561-5 (1991)
- Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5 (1970)
- Lazarow PB und De Duve C: A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 2043-6 (1976)
- Lee-Huang S, Lin JJ, Kung HF, Huang PL, Lee L und Huang PL: The human erythropoietin-encoding gene contains a CAAT box, TATA boxes and other transcriptional regulatory elements in its 5' flanking region. *Gene* 128, 227-36 (1993)
- Lee P, Peng H, Gelbart T, Wang L und Beutler E: Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2005)

Lewin B: Initiation der Transkription.

in Lewin B: Molekularbiologie der Gene. Aus dem Englischen übersetzt,
28. Kapitel, 651 – 79, Spektrum Akad. Verl., Heidelberg (2002)

Maccougall IC: Erythropoietin and renal failure. *Curr Hematol Rep* 2, 459-64 (2003)

Makita T, Hernandez-Hoyos G, Chen TH, Wu H, Rothenberg EV und Sucov HM: A developmental transition in definitive erythropoiesis: erythropoietin expression is sequentially regulated by retinoic acid receptors and HNF4. *Genes Dev* 15, 889-901 (2001)

Mamus SW, Beck-Schroeder S und Zanjani ED: Suppression of normal human erythropoiesis by gamma interferon in vitro. Role of monocytes and T lymphocytes. *J Clin Invest* 75, 1496-503 (1985)

Marx N, Duez H, Fruchart JC und Staels B: Peroxisome proliferator-activated receptors and atherogenesis: regulators of gene expression in vascular cells. *Circ Res* 94, 1168-78 (2004)

Means RT, Jr.: Hepcidin and anaemia. *Blood Rev* 18, 219-25 (2004)

Means RT, Jr. und Krantz SB: Inhibition of human erythroid colony-forming units by tumor necrosis factor requires beta interferon. *J Clin Invest* 91, 416-9 (1993)

Miquerol L, Lopez S, Cartier N, Tulliez M, Raymondjean M und Kahn A: Expression of the L-type pyruvate kinase gene and the hepatocyte nuclear factor 4 transcription factor in exocrine and endocrine pancreas. *J Biol Chem* 269, 8944-51 (1994)

Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T und Kaplan J: Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 306, 2090-3 (2004)

Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, Beaumont C, Grandchamp B, Kahn A und Vaulont S: Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8780-5 (2001)

- Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, Mativet S, Beaumont C, Grandchamp B, Sirito M, Sawadogo M, Kahn A und Vaulont S: Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4596-601 (2002)
- Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, Danan JL, Bigard X, Devaux I, Beaumont C, Kahn A und Vaulont S: The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest* 110, 1037-44 (2002)
- Park JJ, Tsai SY und Tsai MJ: Molecular mechanism of chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor (COUP-TF) actions. *Keio J Med* 52, 174-81 (2003)
- Pastorcic M, Wang H, Elbrecht A, Tsai SY, Tsai MJ und O'Malley BW: Control of transcription initiation in vitro requires binding of a transcription factor to the distal promoter of the ovalbumin gene. *Mol Cell Biol* 6, 2784-91 (1986)
- Pugh CW, Ebert BL, Ebrahim O und Ratcliffe PJ: Characterisation of functional domains within the mouse erythropoietin 3' enhancer conveying oxygen-regulated responses in different cell lines. *Biochim Biophys Acta* 1217, 297-306 (1994)
- Pugh CW, Tan CC, Jones RW und Ratcliffe PJ: Functional analysis of an oxygen-regulated transcriptional enhancer lying 3' to the mouse erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 10553-7 (1991)
- Reijnen MJ, Sladek FM, Bertina RM und Reitsma PH: Disruption of a binding site for hepatocyte nuclear factor 4 results in hemophilia B Leyden. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6300-3 (1992)
- Ruas JL, Poellinger L und Pereira T: Role of CBP in regulating HIF-1-mediated activation of transcription. *J Cell Sci* (2004)
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA und Arnheim N: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-4 (1985)
- Salceda S und Caro J: Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its

- stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 272, 22642-7 (1997)
- Sanchez-Elsner T, Ramirez JR, Sanz-Rodriguez F, Varela E, Bernabeu C und Botella LM: A cross-talk between hypoxia and TGF-beta orchestrates erythropoietin gene regulation through SP1 and Smads. *J Mol Biol* 336, 9-24 (2004)
- Schreiber S, Howaldt S, Schnoor M, Nikolaus S, Bauditz J, Gasche C, Lochs H und Raedler A: Recombinant erythropoietin for the treatment of anemia in inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 334, 619-23 (1996)
- Sellner LN, Coelen RJ und Mackenzie JS: Reverse transcriptase inhibits Taq polymerase activity. *Nucleic Acids Res* 20, 1487-90 (1992)
- Semenza GL, Nejfelt MK, Chi SM und Antonarakis SE: Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5680-4 (1991)
- Semenza GL und Wang GL: A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 12, 5447-54 (1992)
- Sher T, Yi HF, McBride OW und Gonzalez FJ: cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. *Biochemistry* 32, 5598-604 (1993)
- Shimamoto Y, Hirota K und Fukamizu A: Effect of peroxisome proliferator-activated receptor alpha on human angiotensinogen promoter. *Int J Mol Med* 13, 729-33 (2004)
- Shoemaker CB und Mitscock LD: Murine erythropoietin gene: cloning, expression, and human gene homology. *Mol Cell Biol* 6, 849-58 (1986)
- Sladek F: Desperately seeking something. *Mol Cell* 10, 219-21 (2002)
- Sladek FM: Orphan receptor HNF-4 and liver-specific gene expression. *Receptor* 3, 223-32 (1993)

- Sladek FM, Zhong WM, Lai E und Darnell JE, Jr.: Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily. *Genes Dev* 4, 2353-65 (1990)
- Soutoglou E, Viollet B, Vaxillaire M, Yaniv M, Pontoglio M und Talianidis I: Transcription factor-dependent regulation of CBP and P/CAF histone acetyltransferase activity. *Embo J* 20, 1984-92 (2001)
- Su JL, Simmons CJ, Wisely B, Ellis B und Winegar DA: Monitoring of PPAR alpha protein expression in human tissue by the use of PPAR alpha-specific MAbs. *Hybridoma* 17, 47-53 (1998)
- Uteley RT, Ikeda K, Grant PA, Cote J, Steger DJ, Eberharter A, John S und Workman JL: Transcriptional activators direct histone acetyltransferase complexes to nucleosomes. *Nature* 394, 498-502 (1998)
- Wang B, Cai SR, Gao C, Sladek FM und Ponder KP: Lipopolysaccharide results in a marked decrease in hepatocyte nuclear factor 4 alpha in rat liver. *Hepatology* 34, 979-89 (2001)
- Wang LH, Ing NH, Tsai SY, O'Malley BW und Tsai MJ: The COUP-TFs compose a family of functionally related transcription factors. *Gene Expr* 1, 207-16 (1991)
- Wang LH, Tsai SY, Cook RG, Beattie WG, Tsai MJ und O'Malley BW: COUP transcription factor is a member of the steroid receptor superfamily. *Nature* 340, 163-6 (1989)
- Weinberg ED: Iron withholding: a defense against infection and neoplasia. *Physiol Rev* 64, 65-102 (1984)
- Weiss G: [Iron, infection and anemia--a classical triad]. *Wien Klin Wochenschr* 114, 357-67 (2002)
- Weiss G: Modification of iron regulation by the inflammatory response. *Best Pract Res Clin Haematol* 18, 183-201 (2005)
- Weiss G und Goodnough LT: Anemia of chronic disease. *N Engl J Med* 352, 1011-23 (2005)

Yamagata K, Furuta H, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Cox NJ, Fajans SS, Signorini S, Stoffel M und Bell GI: Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). *Nature* 384, 458-60 (1996)

7. Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn **Prof. Dr. Jelkmann** danke ich für die ständige Diskussionsbereitschaft, die Förderung meines wissenschaftlichen Werdegangs sowie die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Mein besonderer Dank gilt Herrn **Dr. Hellwig-Bürgel** für die interessante Fragestellung, die vorbildliche experimentelle Betreuung und die Geduld, mit der er mir die Grundlagen der Molekularbiologie vermittelt hat.

Ebenfalls möchte ich **Frau Gabriele Huck, Frau Rita Meurer** und **Frau Tanja Svensson** für die tatkräftige Unterstützung bei dem experimentellen Teil dieser Arbeit danken.

Herrn **Prof. Dr. Wenger** danke ich für die vielen Tipps, die mir bei der Laborarbeit sehr geholfen haben.

Mein Dank gilt auch Herrn **Prof. Dr. Tsai** für das zur Verfügung gestellte COUP-TF-Antiserum.

Schließlich gilt mein herzlichster Dank **meinen Eltern Edith und Christian Krajewski**, ohne deren Unterstützung diese Arbeit so nicht hätte entstehen können.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Jochen Krajewski
Geburtsdatum/ -ort: 26.09.1976 in Mainz

Schulbildung

1983 - 1996 Besuch der Martinus Grundschule sowie des Gymnasiums Theresianum in Mainz
1993 - 1994 Holmes County High School, Bonifay, Florida, USA
1996 Abitur

Zivildienst

1996 - 1997 Mobiler sozialer Dienst, Malteser Hilfsdienst Mainz

Hochschulbildung

10 / 1997 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
09 / 1999 Physikum
03 / 2000 Beginn des experimentellen Teils der Doktorarbeit am Institut für Physiologie
07 / 2000 1. Staatsexamen „gut“ 2,0
03 / 2003 2. Staatsexamen „gut“ 2,0
10 / 2004 3. Staatsexamen „sehr gut“ 1,0
Gesamtnote „gut“ 1,66

Ärztliche Weiterbildung

04 – 07 / 2005 Assistenzarzt Klinik für Neurochirurgie,
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck
Prof. Dr. med. V. Tronnier
seit dem 01.08.2005 Assistenzarzt chirurgische Universitäts- und Poliklinik,
Berufsgenossenschaftliche Kliniken Bergmannsheil Bochum
Prof. Dr. med. G. Muhr

9. Vorträge und Publikationen

9.1 Aus der vorliegenden Arbeit hervorgegangene Veröffentlichungen

Originalarbeiten:

Interleukin-1 β inhibits the hypoxic inducibility of the erythropoietin enhancer by suppressing hepatocyte nuclear factor - 4 α .

Krajewski J, Batmunkh C, Jelkmann W, Hellwig-Bürgel T.

Cellular and Molecular Life Sciences (2007)

Abstracts:

Krajewski J, Jelkmann W, Hellwig-Bürgel T: Interleukin-1 β suppresses hypoxic inducibility of the erythropoietin gene enhancer by inhibiting hepatocyte nuclear factor-4 α . Turkish Journal of Haematology Supp to Vol 22, 2 (2005)

Krajewski J, Jelkmann W, Hellwig-Bürgel T: Downregulation of erythropoietin (Epo) production by proinflammatory cytokines: The role of hepatic nuclear factor-4 (HNF-4). Pflugers Arch, Supp to Vol 441, 267 (2001)

Vorträge:

Interleukin-1beta suppresses hypoxic inducibility of the erythropoietin enhancer by inhibiting hepatocyte nuclear factor - 4alpha.

XXXth World Congress of the International Society of Hematology, Istanbul, Türkei, 09/2005

Modulation der Aktivität des Erythropoietin-Enhancers durch proinflammatorische Zytokine.

Molekularbiologische Vortragsreihe des SFB 367, Lübeck 07/2002

Hemmung der Erythropoietin-Synthese durch proinflammatorische Zytokine – die Rolle von HNF-4.

Physiologentreffen im Ostseeraum, Kiel 05/2002

Poster:

Downregulation of erythropoietin (Epo) production by proinflammatory cytokines:

The role of hepatic nuclear factor-4 (HNF-4).

Krajewski J, Jelkmann W, Hellwig-Bürgel T.

Joint Congress of the Scandinavian and the German Physiological Societies, Berlin

03/2001

9.2 Weitere Veröffentlichungen:

Originalarbeiten:

Erythropoietin production: Molecular mechanisms of the antagonistic actions of cyclic adenosine monophosphate and interleukin-1.

Batmunkh C, Krajewski J, Jelkmann W, Hellwig-Bürgel T.

FEBS Letters 13, 3153 – 60 (2006)

Multiphoton excitation of autofluorescence for microscopy of glioma tissue.

Leppert J, Krajewski J (Co-Erstautorschaft Lepper u. Krajewski), Kantelhardt SR, Schlaffer S, Petkus N, Reusche E, Hüttmann G, Giese A.

Neurosurgery 58, 759 – 67 (2006)

Imaging of brain and brain tumor tissue by time-resolved multiphoton excitation microscopy.

Kantelhardt SR; Leppert J, Krajewski J, Petkus N, Reusche E, Hüttmann G, Giese A.

Neuro-Oncology 9,103-12 (2007)

Poster:

Die Stabilisierung der chronischen acromioclaviculären Instabilität nach Weaver-Dunn – Langzeitergebnisse in Bezug auf die Arbeitsfähigkeit in schulterbelastenden Berufen.

Krajewski J, Geckle C, Muhr G, Seybold D.

Gemeinsamer Kongress der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie und der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie, Berlin 10/2006.

Traumatische Schulterluxation beim Kleinkind.

Krajewski J, Geckle C, Muhr G, Seybold D.

Gemeinsamer Kongress der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie und der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie, Berlin 10/2006.