

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main
Zentrum der Inneren Medizin

**Modulation der Erythropoetinsynthese in HepG2-Zellen durch das
Immunsuppressivum Mycophenolat Mofetil *in vitro***

DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereiches Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Rafael Marc Reuter
aus Bonn-Bad Godesberg

Frankfurt am Main, 2005

Dekan:	Prof. Dr. med. Josef Pfeilschifter
Referentin:	Prof. Dr. med. Ingeborg Hauser
Korreferent:	Prof. Dr. med. Wolf Otto Bechstein
Tag der mündlichen Prüfung:	6. November 2007

In großer Dankbarkeit meiner Familie und Freunden.

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen	III
1 Einleitung	1
1.1 Einführung	1
1.1.1 Transplantation und Immunsuppression	1
1.1.2 Immunsuppressiva	2
1.1.3 Erythropoese und Erythropoetin	8
1.1.4 Limitationen der Zellkulturmodelle	11
1.2 Zielsetzung	13
2 Material und Methoden	15
2.1 Zellkultur	15
2.1.1 Kultivierung der HepG2-Zellen	15
2.1.2 Behandlung mit Immunsuppressiva	15
2.1.3 Zellmorphologie	16
2.2 Erythropoetin ELISA	17
2.3 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität	18
2.3.1 Direkte Zellzählung nach Trypanblaufärbung	18
2.3.2 Zellzählung mittels Aktivitätsbestimmung der Hexosami- nidase	18
2.3.3 Proteinbestimmung nach Lowry	19
2.3.4 Bestimmung des α_1 -Fetoproteins	20
2.3.5 Bestimmung der Laktat-Dehydrogenase	21
2.4 Western Blot	21
2.5 Isolierung von RNA	22
2.6 Northern Blot	23
2.7 Elektro Mobility Shift DNA-Binding Assay	25
2.8 Auswertungsverfahren und Statistik	26
2.9 Reagenzien	27

3	Ergebnisse	29
3.1	Erythropoetinsekretion	29
3.1.1	Konzentrationsabhängiger Effekt von MMF auf die EPO-Sekretion	29
3.1.2	Zeitabhängigkeit der EPO-Sekretion unter MMF	30
3.2	Bestimmung der Zytotoxizität	32
3.2.1	Laktat-Dehydrogenase	33
3.2.2	Bestimmung der Vitalität über Trypanblaufärbung	34
3.2.3	Bestimmung der Zellzahl durch Hexosaminidase Assay	35
3.3	Guanosinabhängigkeit des Effekts von Mycophenolat Mofetil auf die Erythropoetin-Synthese	36
3.4	Spezifische Modulation der Sekretion von Erythropoetin durch Mycophenolat Mofetil	37
3.5	Einfluß von Mycophenolat Mofetil auf die EPO-mRNA Expression	39
3.6	Einfluß von Mycophenolat Mofetil auf die Glykolisierung von Erythropoetin	41
3.7	HIF-1 Bindung in HepG2-Zellen nach MMF Behandlung	42
3.8	Effekte der Immunsuppressiva Azathioprin, Cyclosporin A und Tacrolimus auf die EPO-Sekretion <i>in vitro</i>	43
4	Diskussion	45
4.1	Auswahl der Versuchsbedingungen	45
4.1.1	Immunsuppressiva	45
4.1.2	HepG2-Zellen	46
4.1.3	Bestimmung und Eingrenzung der Effekte auf die Sekretion von Erythropoetin	47
4.2	Ergebnisse	53
5	Zusammenfassung / Summary	61
5.1	Zusammenfassung	61
5.2	Summary	62
6	Literaturverzeichnis	65

Verzeichnis der Abkürzungen

AFP	α_1 -Fetoprotein
AZA	Azathioprin
BSA	Bovines Serumalbumin
CSA	Cyclosporin A
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat
EGTA	Ethylen-Glycol-bis[β -Aminoethylether]N,N,N',N'-Tetraessigsäure
EPO	Erythropoetin
EMSA	Elektro Mobility Shift DNA-Bindungs Assay
FK506	Tacrolimus (FK506)
FKBP12	FK-bindendes Protein 12
FCS	fötales Kälberserum
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GUA	Guanosin
HBS	HIF Bindungsstelle
HEPES	2[4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin]-Ethansulfonsäure
HIF	Hypoxie-Induzierbarer Faktor
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
IMPDH	Inosinmonophosphatdehydrogenase
LDH	Laktat-Dehydrogenase
MMF	Mycophenolat Mofetil
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
MPA	Mycophenolsäure
N.S.	nicht signifikant
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung

1 Einleitung

1.1 Einführung

Die Nierentransplantation hat sich in den letzten 40 Jahren zu einem Routineeingriff bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz entwickelt. Nachdem die erste erfolgreiche Nierentransplantation zwischen eineiigen Zwillingen 1954 in Boston gelang, etablierte sich die Methode ab 1963 auch in Deutschland als Alternative zur finanziell aufwendigeren und den Patienten sehr viel mehr belastenden Hämodialyse. Falls keine Kontraindikation vorliegt, wird sie heute bei allen Patienten mit terminaler Nierenerkrankung angestrebt, da sie nicht nur eine bessere Langzeitprognose, sondern auch eine wesentlich höhere Lebensqualität für den Patienten bietet [48].

Dabei sind die limitierenden Faktoren, im Hinblick auf den Langzeiterfolg, akute und chronische Abstoßungsreaktionen, welche durch Gabe von Immunsuppressiva verhindert werden sollen. Die eingesetzten Immunsuppressiva sind hinsichtlich der Wirkungsweise, aber auch der Nebenwirkungen verschieden. So führen die Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A (CSA) und Tacrolimus vor allem zur Nephrotoxizität und Neurotoxizität. Die Purinsynthesehemmer Mycophenolat Mofetil (MMF) und Azathioprin (AZA) lösen neben unerwünschten gastrointestinalen Effekten in vielen Fällen Anämie aus. Während die Anämie unter Azathioprin zur Zeit auf eine unspezifische antiproliferative Wirkung zurückgeführt wird, gibt es bislang keine Daten zur anämiefördernden Wirkungsweise von MMF. In klinischen Studien an Nierentransplantierten traten Anämien unter MMF häufiger auf als in der Placebogruppe [5]. Da Erythropoetin ein Schlüsselfaktor bei der Entstehung sein könnte, war es das Ziel der durchgeführten Arbeit, die Effekte von MMF und anderer Immunsuppressiva auf die Erythropoetinproduktion *in vitro* zu untersuchen.

1.1.1 Transplantation und Immunsuppression

Die Abstoßung des Allotransplantats ist das Problem der Transplantation. Grundlegend hierfür ist die Eigenschaft des Immunsystems, zwischen körpereigenem und

körperfremdem Gewebe zu unterscheiden. Dieses beruht auf HLA-Inkompatibilitäten zwischen Spenderorgan und Empfängerimmunsystem. Antikörper und T-Zellen erkennen Zellen mit HLA-inkompatiblen Oberflächenantigenen als fremd und zerstören sie, entweder durch antikörper- oder zellvermittelte Zytotoxizität. Die Schwere der Abstoßungsreaktion ist durch verschiedene Faktoren bestimmt. Dazu zählen das Maß der HLA-Inkompatibilität, die Intensität der HLA-Expression des Transplantats und die Immunkompetenz des Empfängers. Letztere kann durch Immunsuppressiva beeinflusst werden [22]. Entscheidend für die Prognose einer Transplantation ist eine möglichst gute Übereinstimmung der HLA-Antigene A, B, und DR [98, 113, 15] sowie AB0-Blutgruppenkompatibilität.

Regime der immunsuppressiven Erhaltungstherapie zur Verhinderung einer Abstoßungsreaktion sind in der Regel Kombinationstherapien aus verschiedenen Immunsuppressiva wie Cyclosporin A, Kortikosteroide, Azathioprin, Mycophenolat Mofetil oder Rapamycin. In der sogenannten „Triple Therapie“, einem gängigen Therapieschema, wird Cyclosporin A durch Steroide und ein weiteres Immunsuppressivum ergänzt, welches einen anderen immunsuppressiven Wirkmechanismus hat. Dafür kommen Mycophenolat Mofetil oder Azathioprin in Frage. Kombinationen sind deswegen günstig, weil von jedem Immunsuppressivum nur eine geringe Dosis benötigt wird, um ausreichende immunsuppressive Wirkung zu erzielen. Im günstigsten Fall können so Abstoßungsreaktionen verhindert werden, ohne daß es zu inakzeptablen toxischen Effekten kommt.

1.1.2 Immunsuppressiva

Cyclosporin A und Tacrolimus (FK506) sind strukturell nicht miteinander verwandt, (siehe Abb. 1), jedoch supprimieren sie die Immunantwort auf ähnliche Weise. Cyclosporin A und Tacrolimus binden an die Immunophilinen Cyclophilin A und FK-bindendes Protein 12 (FKBP12) [77, 76]. Der Komplex aus Immunsuppressivum und Immunophilin bindet mit hoher Affinität an den Calcineurin/Calmodulin-Komplex in der T-Zelle und hemmt die Funktion der Ca^{2+} /Calmodulin-regulierten Phosphatase Calcineurin. Calcineurin ist ein Schlüsselenzym in der Signaltransduktionskette, die der T-Zell-Aktivierung folgt. Durch die Inhibition von Calcineurin können verschiedene in ihrer phosphory-

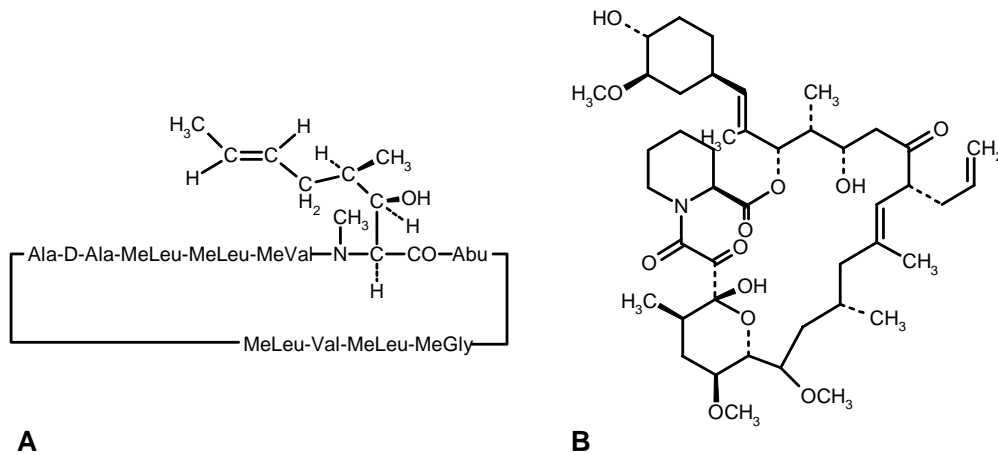


Abbildung 1: (A) Chemische Struktur von Cyclosporin A und (B) von Tacrolimus. (Nach [102]).

lierten Form inaktive Transkriptionsfaktoren, wie NFAT, nicht mehr durch Dephosphorylierung aktiviert werden. Die Translokation dieser Transkriptionsfaktoren aus dem Zytoplasma in den Zellkern wird unterbunden und sie können ihre promotoraktivierende Funktion nicht ausüben. So wird eine Transkription ihrer Zielgene verhindert. Cyclosporin A und Tacrolimus unterdrücken auf diese Weise spezifisch die Transkription von Interleukin-2, das für die Proliferation aktivierter T-Zellen von Bedeutung ist. Des Weiteren wird die Synthese einer großen Zahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, wie IL-1, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, TNF- α und Interferon- γ gehemmt [62]. Tacrolimus hemmt zusätzlich den Wachstumsfaktor TGF β .

Aus der Hemmung dieser Zytokine lassen sich verschiedene begleitende Effekte auch im Rahmen von akuten und chronischen Abstoßungen erklären. TGF β spielt zum Beispiel eine wichtige Rolle bei der Fibrogenese, die bei der chronischen Abstoßung beobachtet wird. Interleukin 8 löst Leukozytenmigration aus, die am Anfang einer akuten Abstoßung steht.

Das Nebenwirkungsprofil von Tacrolimus ähnelt dem des Cyclosporin A. Beide sind nephrotoxisch. Tacrolimus führt zu einem Anstieg des renalen Gefäßtonus und damit zu einer Abnahme der glomerulären Filtrationsrate. Pathomorphologisch kommt es zu den gleichen chronischen Veränderungen mit Tubulusschädigungen. Insgesamt ist die Schädigung etwas geringer ausgeprägt als unter Cy-

closporin A [84]. Tacrolimus erhöht ebenfalls den systemischen Blutdruck, zur Einstellung sind jedoch weniger Antihypertensiva notwendig als unter Cyclosporin A [61, 19]. In seltenen Fällen kann es zu einer Ventrikelhypertrophie oder zu Herzrhythmusstörungen kommen. Neurotoxizität in Form von Tremor, Kopfschmerzen, Gereiztheit und Schlafstörungen treten bei Cyclosporin A genauso spiegelabhängig auf wie bei Tacrolimus. Die Ursachen der Nephro- und Neurotoxizität als Hauptnebenwirkungen beider Immunsuppressiva sind noch ungeklärt. Es wird jedoch ein Zusammenhang mit der Calcineurininhibition vermutet [28].

Der zelluläre Wirkmechanismus beider Substanzen ist nahezu identisch, trotzdem zeigt Tacrolimus in der klinischen Anwendung ein anderes Wirkungsprofil als Cyclosporin A und wird in Europa bevorzugt bei der Abstoßungstherapie eingesetzt. Tacrolimus inhibiert die Lymphozytenaktivierung *in vitro* 10- bis 100-mal stärker als Cyclosporin A bezogen auf das Molekulargewicht [64] und wird deshalb in entsprechend geringeren Dosen eingesetzt.

Für Tacrolimus liegen die optimalen Vollbluttalspiegel in Bezug auf Wirksamkeit und Nebenwirkungen nach pharmakologischen Studien von Laskow [72] bei 5–15 µg/l. Initial sollten Spiegel von 10–15 µg/l angestrebt werden, später reichen Konzentrationen von 8–10 µg/l aus. Die Dosierung von Cyclosporin A orientierte sich bisher an den Blutspiegeln, die initial um 150–300 ng/ml liegen sollten und ein Jahr nach Transplantation um 100 ng/ml. Neuere Studien zeigen eine niedrigere Abstoßungsrate unter CSA-Therapie bei Dosierung nach Spitzenspiegel [83].

Azathioprin (siehe Abb. 2) ist ein Prodrug, welches durch intrahepatische Aktivierung zu 6-Mercaptopurin umgewandelt wird. 6-Mercaptopurin hemmt als Antimetabolit die Biosynthese der Purinnucleotide Adenosin und Guanosinmonophosphat. Außerdem wird die Phosphoribosylphosphatase (PRPP) gehemmt. Beides führt zu Funktionsverlust oder Tod der Zellen. In Lymphozyten beruht der Hauptwirkmechanismus des Medikaments auf der Adenosindepletion. Diese Wirkung ist allerdings nicht spezifisch, sondern unspezifisch antiproliferativ. Azathioprin wirkt stärker auf die T- als auf die B-Lymphozyten und deren Proliferation und beeinflusst somit bevorzugt die zelluläre Immunreaktion. Auf die Antikörperbildung hat Azathioprin keinen nachweisbaren Effekt. Da alle sich teilenden

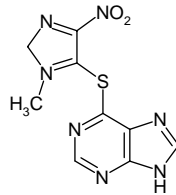


Abbildung 2: Chemische Struktur von Azathioprin. (Nach [20]).

Zellen des Körpers betroffen sind, betreffen die wichtigsten Nebenwirkungen das Knochenmark [3, 80, 96] mit eingeschränkter Blutbildung und daraus resultierender Leukopenie, Thrombopenie und makrozytärer Anämie, außerdem kann es zu einer cholestatischen Hepatose mit Hepatomegalie, Aszitesbildung und portaler Hypertension kommen sowie in seltenen Fällen zu einer fibrosierenden Alveolitis oder zu einer Alopezie. Azathioprin wird auch bei anderen nephrologischen Krankheitsbildern wie z.B. Lupus-Nephritiden, Glomerulonephritiden oder steroidresistenten nephrotischen Syndromen erfolgreich eingesetzt. Die Dosierung erfolgt initial mit 3–4 mg/kg Körpergewicht und einer Erhaltungsdosis von 1–2 mg/kg Körpergewicht. In Zellkulturuntersuchungen mit HepG2-Zellen wurden erhebliche zytotoxische Effekte beschrieben, welche mit einer Einschränkung der Erythropoetinproduktion einhergehen [122].

Mycophenolat Mofetil (MMF) ist das synthetische Morpholinoethylester-Prodrug der Mycophenolsäure, einem natürlichen Fermentationsprodukt verschiedener Pilzarten der Gattung *Penicillium* [6]. Im Körper wird das Prodrug nach der enteralen Resorption durch Leberesterasen hydrolysiert, so daß der aktive Metabolit Mycophenolsäure (MPA) frei wird (siehe Abb. 3). Noch bevor die selektiv antiproliferative Wirkung von MMF auf Lymphozyten erkannt wurde, war es in den vierziger Jahren wegen seiner hemmenden Wirkung auf Bakterien und Pilze bekannt. In den sechziger Jahren standen tumorhemmende Effekte im Mittelpunkt des Interesses. Der molekulare Angriffspunkt wurde 1969 von *T. Franklin* [36] beschrieben. Der Einsatz in der Psoriasis-Therapie wurde versucht, konnte sich allerdings nicht durchsetzen [79, 30]. Erst in den achtziger Jahren wurde die Wirksamkeit als Immunsuppressivum weiter verfolgt [85].

Mycophenolsäure ist ein nichtkompetitiver, reversibler Inosinmonophosphat-

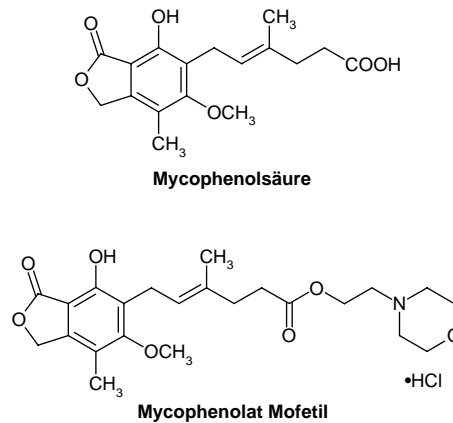


Abbildung 3: Chemische Struktur von Mycophenolsäure und Mycophenolat Mofetil. (Nach [109]).

dehydrogenase (IMPDH)-Hemmer. Die Aktivität dieses Enzyms bestimmt die Geschwindigkeit der Neusynthese von Guanodinukleotiden (siehe Abb. 4), die auch während der klonalen Expansion der Lymphozyten stattfindet [85]. Da insbesondere T- und B-Zellen auf die *de novo* Purinsynthese über die IMPDH angewiesen sind, hat MMF einen selektiven und potenten antiproliferativen Effekt auf T- und B-Zellen bei geringer Wirkung auf die Zellen des Knochenmarks [5]. Trotzdem werden häufig unerwünschte hämatologische Ereignisse, insbesondere Leukozytopenie und Anämie, unter Mycophenolat Mofetil beobachtet [31].

Mycophenolsäure weist eine höhere Bindungsaffinität zu dem in proliferierenden Lymphozyten überwiegenden IMPDH Typ II auf als zur Isoform IMPDH Typ I, welche hauptsächlich in Zellen vorkommt, die sich nicht teilen [87, 14]. Die Hemmung von IMPDH Typ II durch Mycophenolsäure führt zu einer Entleerung der Vorräte an Guanodinukleotiden, so daß die DNA-Synthese zum Erliegen kommt und als Folge davon die Vermehrung der Lymphozyten in der S-Phase gestoppt wird.

Guanosintriphosphat (GTP) beeinflusst außerdem die Synthese der Nucleotidzucker aus Fruktose und Mannose, die ohne gewisse Basalspiegel an GTP nicht stattfinden kann. Diese Zucker sind für die Synthese von Glykoproteinen notwendig, zu denen auch Adhäsionsmoleküle zählen. Die Hemmung der Glykosylierung von Adhäsionsmolekülen durch Mycophenolsäure [108, 73, 74] beeinträchtigt die Fähigkeit der Lymphozyten, sich an das Endothel des Allotransplantats anzuhängen.

Stoffwechselwege der Purinbiosynthese

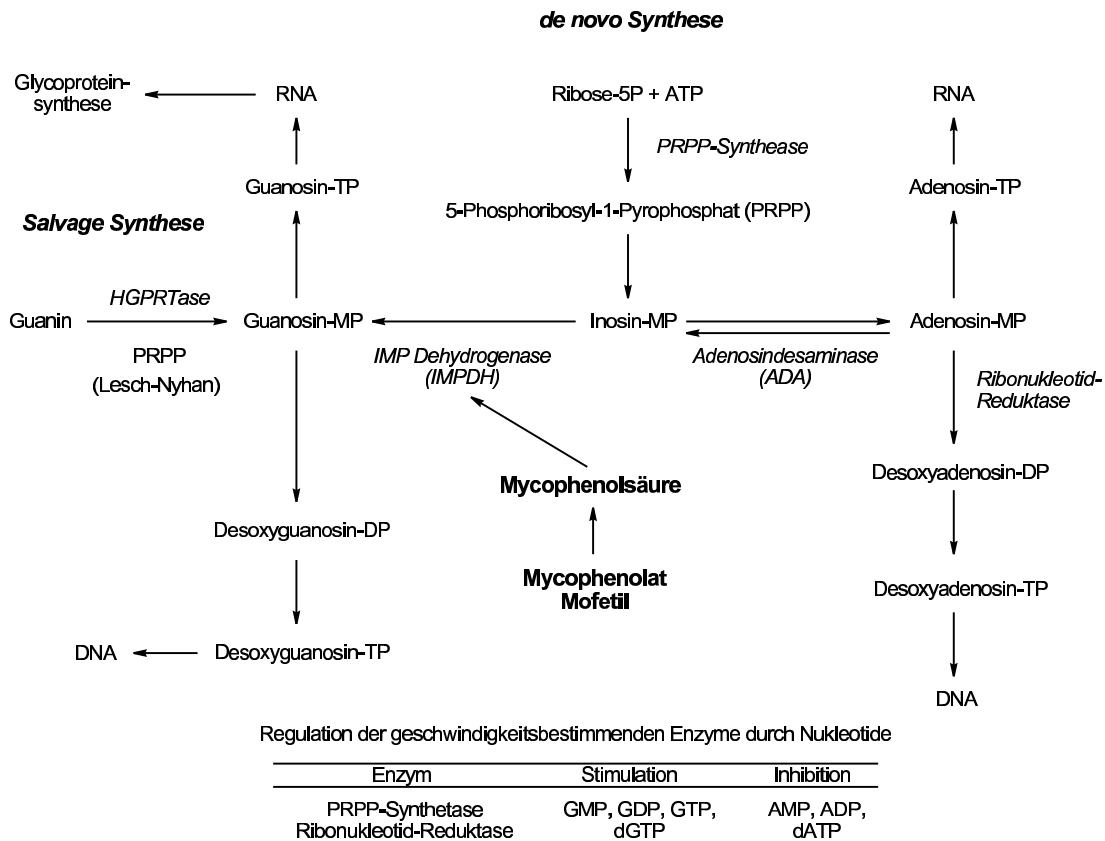


Abbildung 4: Mycophenolat Mofetil: IMPDH als zentraler Schritt der *de novo* Purinsynthese und Angriffspunkt der Mycophenolsäure. (Nach [5]).

ten. So wird die Invasion von Leukozyten in das Transplantat vermindert [8, 9, 7].

Eine veränderte Expression von Adhäsionsmolekülen hemmt zusätzlich die Rekrutierung von Lymphozyten in entzündetes Gewebe. Das Fortschreiten der Abstoßungsreaktion nach stattgefundenener Aktivierung der Lymphozyten wird infolgedessen blockiert [4].

Im Vergleich zu Azathioprin greift Mycophenolat Mofetil an einem ähnlichen Punkt in der Aktivierung der Lymphozyten an, wirkt aber stärker und spezifischer auf die Lymphozyten. Mycophenolat Mofetil ist für die Prophylaxe von Organabstoßungsreaktionen nach Nieren- oder Herztransplantationen zugelassen [32]. Es wird normalerweise mit Cyclosporin A und Kortikosteroiden kombiniert. Seine Anwendung in Kombination mit Azathioprin wird aufgrund der ähnlichen

Wirkmechanismen der beiden Substanzen nicht empfohlen.

Am häufigsten wurden gastrointestinale Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen, Diarrhöen, Bauchschmerzen oder Appetitlosigkeit beobachtet. In selteneren Fällen traten schwere gastrointestinale Ereignisse in Form von Magenulzeration, Gastritis, Magen-Darm-Blutungen und akuter Pankreatitis auf. Blutbildveränderungen in Form von Leuko- oder Thrombopenien treten deutlich seltener als unter Azathioprin auf, da MMF selektiver wirkt. Bei eingeschränkter Nierenfunktion ist eine verstärkte Neigung zu Anämien beschrieben. Anhand der klinischen Daten in Monotherapie konnte eindeutig gezeigt werden, daß MMF keine Nephro-, Neuro-, oder Hepatotoxizität besitzt und zudem nicht diabetogen wirkt. Die empfohlene orale Dosierung für Nierentransplantierte beträgt zweimal täglich 1 g, für Herztransplantierte zweimal täglich 1,5 g [6]. Niedrigere Dosen (2 g/Tag) werden allgemein besser vertragen als höhere (3 g/Tag). Unerwünschte Nebenwirkungen in Zusammenhang mit der Gabe von MMF waren nach Dosisreduktion bzw. Absetzen der Substanz reversibel.

1.1.3 Erythropoese und Erythropoetin

Die Erythropoese ist der fortwährend ablaufende Prozeß der Neubildung von Erythrozyten. Sie gleicht den steten Verlust gealterter roter Blutkörperchen aus. Der wesentliche Wachstumsfaktor, der im Knochenmark die Differenzierung von pluripotenten Stammzellen zu den Erythrozyten stimuliert, ist das Erythropoetin [48]. In physiologischen Konzentrationen steigert es die mitotische Aktivität der Vorläuferzellen der Erythrozyten, den „colony forming units - erythroid“ (CFU-E) sowie den Proerythroblasten. Die Ausbildung von Megakaryozyten, den Vorläuferzellen der Thrombozyten, aus den „colony forming units - Megacaryozyt“ (CFU-Meg) unterliegt ebenfalls dem regulatorischen Einfluß des Erythropoetins [18].

Erythropoetin entfaltet seine Wirkung auf die Zielzellen des Knochenmarks durch Bindung an spezifische Erythropoetinrezeptoren [57, 93], die sich auf der Oberfläche der erythroiden Stammzelle und megakaryozytären Vorläuferzellen befinden. Der aktivierte Rezeptor leitet die Umwandlung der erythroiden Stammzelle zum Proerythroblasten ein und aktiviert die nötigen Gene für erythrozytäre

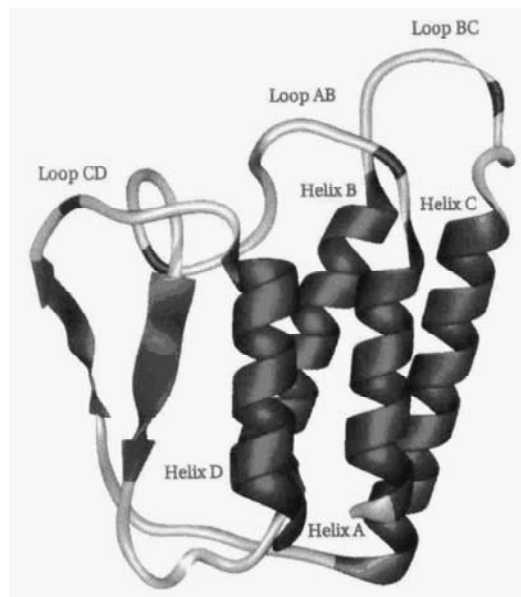


Abbildung 5: Ribbon-Diagramm der errechneten Tertiärstruktur von Erythropoetin. (Nach [10]).

Proliferation und Reifung. Dabei reguliert der Erythropoetinrezeptor Signalwege, welche direkt den Zellzyklus vorantreiben und einer Apoptose entgegenwirken. Der Erythropoetinrezeptor aktiviert hierbei die Tyrosinkinase Januskinase 2 (Jak2) [120, 82]. Erythropoetin stimuliert gemeinsam mit Thrombopoetin die Produktion von Megakaryozyten *in vitro* [54]. Anämische Stoffwechsellagen stimulieren die endogene Produktion von Erythropoetin.

Erythropoetin (EPO) (siehe Abb. 5) ist ein hitzestabiles Glykoprotein (MG 30,4 kDa; 165 Aminosäuren; 40 % Zucker), welches abhängig vom Sauerstoffpartialdruck synthetisiert wird [57]. Erythropoetin wird bei Erwachsenen primär in den Nieren (zu 90 %) und des Weiteren hauptsächlich noch in der Leber gebildet [48, 57]. Erythropoetin wird nicht gespeichert [69], sondern direkt als aktiver Metabolit von der produzierenden Zelle sezerniert. Bedingt durch seine kurze biologische Halbwertszeit ($t_{1/2} = 1,5$ bis $2,9$ h) muß es ständig im Organismus neu gebildet werden. Abgebaut wird Erythropoetin hauptsächlich in der Leber, ein sehr geringer Teil wird über die Niere ausgeschieden, wobei die Erythropoetin-Clearance bei weniger als 10 ml/min liegt [57]. Der durchschnittliche Serumspiegel liegt zwischen 6 bis 32 U/l und ist bei Frauen und Männern gleich [57], kann

jedoch in Fällen schwerer Hypoxie auf das Tausendfache ansteigen [29].

Die Regulation der Erythropoetinsynthese durch Hypoxie geschieht auf mRNA-Ebene. Unter Hypoxie wird die mRNA-Bildung und nachfolgend die Proteinsekretion von Erythropoetin um das Hundertfache gesteigert [29, 57]. Das Ausmaß und der zeitliche Verlauf der Expression der EPO-mRNA läßt sich mit der EPO-Proteinproduktion korrelieren.

Als Sauerstoffsensor soll freies intrazelluläres Eisen fungieren (siehe Abb. 6) [50], welches durch die Fentonreaktion [117] – Wasserstoffperoxid reagiert mit Eisen(II) zu Eisen(III) und Hydroxylradikalen – in der Lage ist, Sauerstoffradikale zu erzeugen [111, 29]. Diese Reaktion kann durch Verdrängung des Eisens durch andere Metalle (z.B. Co, Ni, Mn) [38] unterbrochen werden. Metalle, wie Cadmium, können hingegen selbst Sauerstoffradikale generieren und so interferieren [33, 112, 51, 106].

An der Regulation der EPO-Synthese ist zudem der Transkriptionsfaktor HIF-1 (Hypoxie-induzierbarer Faktor 1) wesentlich beteiligt (siehe Abb. 6) [11]. HIF-1 ist ein aus den zwei Untereinheiten HIF-1 α und HIF-1 β [Synonym: Aryl-Hydrocarbon-Receptor-Nuclear-Translocator (ARNT)] bestehender Proteinkomplex. Die biologische Aktivität von HIF-1 wird durch die Expression und Menge des verfügbaren, aktiven HIF-1 α bestimmt [103]. Unter nicht hypoxischen Bedingungen wird HIF-1 α stetig ubiquitinyliert und so über den Proteasomenkomplex kontinuierlich degradiert [97, 63]. Bei Sauerstoffmangel wird HIF-1 α zum einen vermehrt exprimiert [105] und zum anderen unterbleibt seine Ubiquitinylierung, sodaß HIF-1 in aktiver Form an ein Enhancer-Element, welches sich vom EPO-Gen aus in Richtung 3' befindet, binden kann [29]. Das Hypoxie Responsible Element (HRE), an welches HIF-Heterodimere binden, wurde mit der Consensus Sequenz 5'-RCGTG-3' beschrieben [104]. Diese konservierte HIF-1 Bindungsstelle (HBS) des 3' gelegenen EPO-Enhancers enthält ein CpG Dinukleotid, welches am Cytosin methyliert werden kann. Eine Methylierung des CpG Dinukleotids der HBS verhindert eine Bindung von HIF-1 an die HBS [118].

Findet an der HBS eine Bindung zwischen HIF-1 zusammen mit weiteren modulierenden Kofaktoren, wie p300 und CBP, an die HBS statt (s. Abb. 7), so induziert dies die Transskription des EPO-Gens über einen 5' gelegenen Promotor [11, 103, 29]. Über den Promotor schließlich erfolgt die Aktivierung des

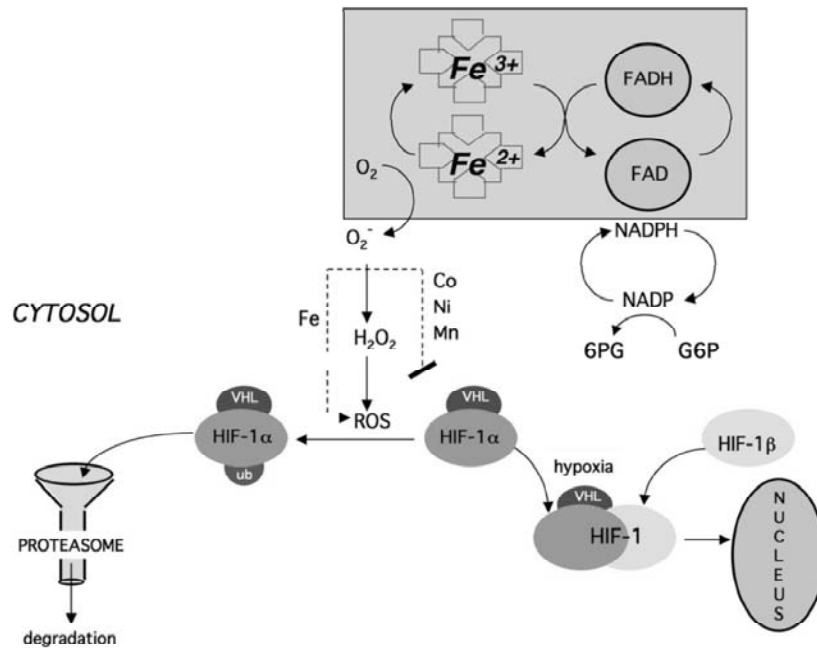


Abbildung 6: Modell der Sauerstoffsignaltransduktion: Flavo-Hämproteine wirken als NADPH-oxidase, wodurch Superoxide (O_2^-) entstehen, welche mit Eisen zu einem Hydroxylradikal ($\dot{O}H$) und anderen Sauerstoffradikalen (ROS) reagieren. Dadurch wird HIF-1 α oxidativ verändert, so daß es rasch durch die Proteasomen abgebaut wird. Kobalt und andere Übergangsmetalle (Co^{2+} , Ni^{2+} und Mn^{2+}) können den eisenabhängigen Abbau von HIF-1 α hemmen. Unter Hypoxie ist HIF-1 α stabil und bildet zusammen mit HIF-1 β aktives HIF-1, welches im Nucleus an Steuerabschnitte von hypoxieinduzierten Genen bindet. (Nach [29]).

Transkriptionskomplexes RNA-Polymerase II [95]. Verstärkte Transkription ist mitverantwortlich für einen Großteil der Steigerung der EPO-Genexpression unter Hypoxie. Es wird zusätzlich eine erhöhte Stabilität der EPO-mRNA diskutiert [21, 29].

1.1.4 Limitationen der Zellkulturmodelle

Lange Zeit galt die Erforschung der Erythropoetinregulation als besonders schwierig, da es kein geeignetes Zellkulturmodell gab. Einige Zellen, wie Mesangiumzellen der Ratte [68], die Nierenzellen der Linie RC-1 [107], und Leberkarzinomzellen

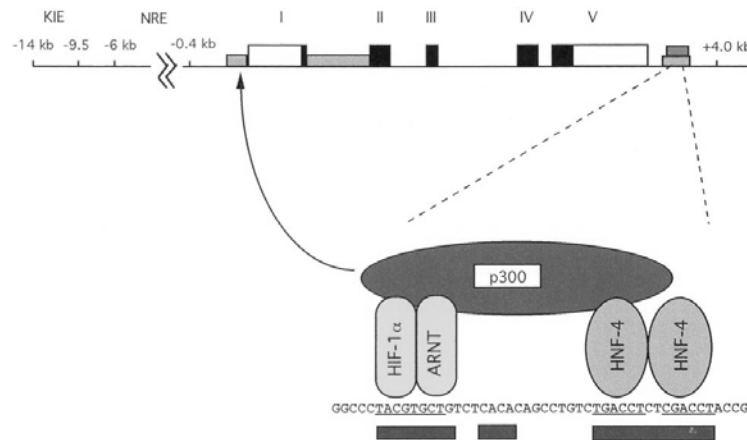


Abbildung 7: Regulation des EPO-Gens durch HIF. Exons sind durch schwarze Rechtecke, Introns durch weiße markiert. Mit schmalen hellgrauen Rechtecken sind konservierte Abschnitte, welche zwischen Maus und Mensch identisch sind, markiert. Dunkelgraue schmale Rechtecke sind relevante hypoxie-induzierbare Abschnitte. Der 3' Enhancer ist vergrößert dargestellt. Wie mit dem Pfeil dargestellt, ist der Komplex um p300 in der Lage, mit der basalen Transkriptions-Maschinerie am Promotor zu interagieren. (Nach [29]).

[88], produzieren Erythropoetin in sehr niedrigen Spiegeln mit minimaler Induktion durch Hypoxie. Zelllinien, die *in vitro* eine signifikante Menge an Erythropoetin produzieren, wurden erst nach Überprüfen einer großer Anzahl sowohl renaler als auch hepatischer Zelllinien gefunden [40]. Die beiden humanen Hepatoma Zelllinien Hep3B und HepG2 haben sich als geeignete Modelle herausgestellt, weil sie auf Hypoxie mit markanten Anstiegen der EPO-Produktion reagieren. Mit Hilfe dieser Zelllinien konnte gezeigt werden, daß einzelne Zellen in der Lage sind, den Sauerstoffgehalt der Umgebung zu messen und die Regulierung der Genexpression durchzuführen. Hep3B- und HepG2-Zellen sind daher ein etabliertes und gut charakterisiertes Modell für die Untersuchung der EPO-Genregulation auf molekularer Ebene [29, 40].

In dieser Arbeit wurden ausschließlich Zellen der Zelllinie HepG2 verwendet, da diese kein Hepatitis B Virus Genom enthalten und somit keine potentielle Infektionsgefahr darstellen. Zellen der Zelllinie Hep3B enthalten das Hepatitis B Genom und exprimieren das Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) [66, 2].

1.2 Zielsetzung

Ausgangspunkt dieser *in vitro* Untersuchung ist die Beobachtung, daß MMF bei nierentransplantierten Patienten Anämie auslösen kann. Ziel der Studie ist es zu überprüfen, ob Mycophenolat Mofetil einen Einfluß auf die Produktion von Erythropoetin hat. Falls ein Einfluß nachweisbar ist, soll die Spezifität des Effekts und die möglichen molekularen Mechanismen, die dem MMF-Effekt auf die EPO-Produktion zugrunde liegen, untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Kultivierung der HepG2-Zellen

Humane Hepatoma Zellen der Zelllinie HepG2 (American Type Culture Collection No. HB-8065) wurden freundlicherweise von Frau Dr. Löwers, Paul-Ehrlich Institut Langen, zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit modifizierter Polystyrene-Oberfläche (Primaria, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) ausgesät und wuchsen zu einer konfluenten, einlagigen Zellschicht aus. Die Kultivierung erfolgte mit dem Medium DMEM Nut Mix F-12 (Gibco, Eggenstein), dem 10 % hitze-inaktiviertes fötales Kälberserum (FCS), 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin zugesetzt waren. Vorversuche ergaben, daß die Zellen weniger als 10 % FCS nicht tolerierten. Mediumwechsel erfolgte, in Abhängigkeit von der Wachstumsgeschwindigkeit und Mediumverbrauch der Zellen, entweder jeden zweiten Tag oder auch täglich. Konfluente Kulturen wurden einmal pro Woche mittels 0,25 % Trypsin-PBS abgelöst und im Verhältnis 1:3 geteilt in neuen Kulturgefäßen ausgesät.

Die Zellen wurden bei 37 °C, 100 % Luftfeuchtigkeit und 5 Vol% CO₂ und 95 Vol% Luft gezogen.

2.1.2 Behandlung mit Immunsuppressiva

Für die Stimulationsexperimente wurden die Zellen auf 6-Well-Zellkulturplatten mit modifizierter Polystyrene-Oberfläche (siehe 2.9) ausgesät und mit 2 ml DMEM und den bereits genannten Zusätzen versetzt. Nach vorherigem Mediumwechsel wurden noch subkonfluente Zellen mittels der in DMSO gelösten Pharmaka entsprechend des Versuchsansatzes behandelt. Nach 24 h wurde erneut das Medium gewechselt und ein zweites Mal frisches Medium mit frischen Pharmaka versetzt. Die Zellen wurden so ausgesät, daß bei Versuchsende, nach weiteren 24 h, die Zellen konfluent waren. Der Zellüberstand wurde abgenommen und bis zur weiteren Untersuchung bei -20 °C eingefroren. Die Zellen wurden auf ihre Anzahl

und Vitalität untersucht (siehe 2.3).

Auf jeder 6-Well-Zellkulturplatte wurde mindestens ein Ansatz als Kontrollansatz mitgeführt, der anstelle des jeweiligen Medikaments nur das Lösungsmittel DMSO (max. 1 %) enthielt.

In den ersten Versuchen wurde die Konzentration bestimmt, mit denen ein maximal hemmender Effekt auf die EPO-Sekretion bei HepG2-Zellen erzielt wird. Diese Konzentration wurde dann in den Versuchen zur Zeitabhängigkeit eingesetzt, in welchen die EPO-Sekretion als Funktion der Zeit bei unveränderter Konzentration betrachtet wurde. Bei Zeitabhängigkeitsstudien waren die Zeitpunkte der einzelnen Stimulationen so abgestimmt, daß alle Ansätze zur gleichen Zeit geerntet werden konnten. Dabei wurde bei allen Ansätzen je 48 h und 24 h vor Versuchsende das Medium gewechselt und nur für die Dauer der eigentlichen Stimulation vor Versuchsende das Medikament zugegeben. Nach Ablauf des jeweiligen Beobachtungszeitraums wurde dann die EPO-Konzentration im Zellüberstand bestimmt.

Alle Bestimmungen wurden mindestens als Dreifachansatz ausgeführt.

Immunsuppressiva wurden in therapeutisch relevanten Konzentrationen eingesetzt. In vergleichenden Versuchen wurden Mycophenolat Mofetil (Ester der Mycophenolsäure) und Mycophenolsäure parallel verwendet. Der Effekt beider Substanzen war identisch, da die HepG2-Zellen in der Lage sind, den Ester zu Mycophenolsäure zu hydrolysieren.

2.1.3 Zellmorphologie

Die HepG2-Zellen wuchsen in DMEM mit 10 % FCS gleichmäßig und ohne morphologische Veränderungen. Durch den Zusatz von serumfreien DMEM verminderte sich das Zellwachstum erheblich. Bei der Auswahl der Kulturschalen für die Stimationsversuche wurde auf ein gleichmäßiges Aussehen und subkonfluentes Wachstum der Zellen geachtet. Durch die Stimulation mit den verwendeten Immunsuppressiva waren mikroskopisch keine Veränderungen der Zellmorphologie erkennbar.

2.2 Erythropoetin ELISA

Die Erythropoetinkonzentration im Zellüberstand wurde mittels eines kommerziellen Kits (Quantikinine IVD Erythropoetin ELISA, R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA) gemäß der Anleitung des Herstellers bestimmt:

Nach Entnahme des Zellüberstands wurde dieser, ebenso wie eine EPO-Standardreihe, in 96-Well-Platten pipettiert. Der Boden dieser Platten war mit einem monoklonalen murinen Antikörper gegen EPO beschichtet, der das im Zellüberstand vorhandene Erythropoetin quantitativ band.

Nach Entfernen des überschüssigen Zellüberstands und EPO-Standards aus den Wells wurde jedes Well mit einem polyklonalen anti-EPO-Antikörper (rabbit) inkubiert. Dieser Antikörper war mit einer Meerrettichperoxidase konjugiert. Während dieser zweiten Inkubation band nun dieser Antikörper-Enzym-Komplex an das durch den ersten Antikörper gebundene Erythropoetin. Überschüssige Antikörper-Enzym-Komplexe wurden durch Waschen entfernt. Nach Zugabe eines Chromogens (Tetramethylbenzidin) und Wasserstoffperoxyd in die Wells, oxidierte die Meerrettichperoxidase das Chromogen und ein blauer Farbkomplex entstand. Diese Reaktion wurde durch Zugabe von Schwefelsäure gestoppt, was den blauen Farbkomplex in einen gelben umwandelte.

Die Intensität der Färbung war direkt proportional zu der Menge an EPO gebundenem Antikörper-Meerrettichperoxidase-Komplexen, welche wiederum direkt proportional zur Menge an Erythropoetin im Zellüberstand oder Standard war.

Der Farbstoff wurde im Photometer bei 450 nm gemessen und aus der Extinktion der EPO-Standards eine Standardkurve erstellt, indem die Extinktion gegen die Konzentration der EPO-Standards aufgetragen wurde. Die EPO-Konzentration im Zellüberstand wurde durch Vergleich der Extinktionen zwischen Standardkurve und Proben ermittelt. Als Negativkontrolle wurde stets eine Probe frischen Mediums, welches noch nicht in der Zellkultur eingesetzt wurde, in den Meßreihen mitgeführt.

Sowohl die verwendeten Standards als auch die beschichteten Mikrotiterplatten und Antikörper waren Bestandteil des verwendeten Kits.

2.3 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

2.3.1 Direkte Zellzählung nach Trypanblaufärbung

Die Methode beruht auf dem Auszählen von trypanblaugefärbten Zellen mittels einer Zählkammer und Mikroskop. Vitale Zellen können Trypanblau ausschließen und sind damit von den blau gefärbten nekrotischen Zellen deutlich zu unterscheiden.

Zunächst wurde analog zum Teilen eines Zellrasens aus diesem eine Zellsuspension bereitet. Von dieser Zellsuspension wurde ein Aliquot zu gleichen Teilen mit 0,4%igem Trypanblau (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) versetzt. Die Zahl der lebenden und der toten Zellen wurde unter dem Mikroskop bei 80facher Vergrößerung in einer Neubauerzählkammer (0,1 mm Tiefe; 0,0025 mm²; W. Schreck, Hofheim Ts.) erfaßt. Hierbei erscheinen nichtvitale Zellen blau. Um den störenden Einfluß möglicher Zählfehler klein zu halten, erfolgte das Auszählen in vierfachem Ansatz. Aus den vier ermittelten Werten wurde jeweils der Mittelwert gebildet.

Bei bekannten Volumina konnte die Gesamtanzahl der Zellen in der Ausgangszellsuspension und die Fraktionen der lebenden und toten Zellen bestimmt werden.

Die Gleichung hierzu lautet

$$Z = nFV$$

worin Z die Zellzahl in Zellen pro ml Zellsuspension ausdrückt, n den errechneten Mittelwert der ausgezählten Zellen, F den Verdünnungsfaktor, $F = 2$ und V den Umrechnungsfaktor 10⁴/ml.

2.3.2 Zellzählung mittels Aktivitätsbestimmung der Hexosaminidase

Die Hexosaminidase (*N*-acetyl- β -D-Hexosaminidase) ist ein in fast allen Zellen vorkommendes lysosomales Enzym. Die große Verbreitung und die konstitutive Expression des Enzyms machen es zu einem idealen Indikator für die Erfassung von Zellzahlen. In diesem Sinne wurde es erstmals von *Koponen et al.* 1982 benutzt [67].

Die Zellen wurden auf Mikrotiterplatten (96 Well, Pro-Bind Assay Plate, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) kultiviert. Nach Erreichen von Konfluenz wurden die Monolayer 3 mal mit PBS gewaschen und 50 μ l PBS pro Well zugesetzt. Als Standard und zur Kontrolle der Sensitivität wurden Zellen in Suspension 3 mal mit PBS gewaschen und von Hand ausgezählt. Die ausgezählten Zellen wurden in 50 μ l PBS suspendiert in den jeweils vorgesehenen Wells der Mikrotiterplatte mitbehandelt.

Zur Bestimmung wurde jedes Well mit 50 μ l Substrat/Lyse-Puffer (7,5 mM *p*-nitrophenol-*N*-acetyl- β -D-Glukosaminid (Sigma), 0,1 M Zitratpuffer pH 5, 0,5 % Triton X-100, aqua destillata) versetzt. Nach Zugabe der Substratlösung wurden die Zellen auf der Mikrotiterplatte für 30 min bei 37 °C und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Farbreaktion wurde mittels Zugabe von 100 μ l pro Well Stopplösung (100 mM NaOH, mit 5 mM EDTA) durch Hemmung des Enzyms unterbrochen. Im alkalischen Milieu bildet sich ein gelber Farbstoff. Die Extinktion wurde bei 405 nm und bei einer Referenzwellenlänge von 650 nm gemessen [71].

Aus den Extinktionswerten der Zell-Standards wurde eine Standardkurve erstellt, indem die Extinktion gegen die Zellzahl der Zell-Standards aufgetragen wurde. Die Zellzahl der Zellrasen wurde durch Vergleich der Extinktionen zwischen Standardkurve und Proben ermittelt.

2.3.3 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Gesamtzellproteinmenge aus Zellysate wurde nach der Methode von *Lowry* [78] bestimmt. Der Assay basiert auf der Reaktion von Protein mit alkalischen Kupfer-Tartrat-Komplex und Folinreagenz. Dabei wurde ein kommerzielles Kit (DC Protein Assay, Bio-Rad, München) entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

Zum Gewinnen der Zellysate wurden die gewaschenen Zellrasen durch Zugabe von SDS-NaOH (5 g/l Natriumdodecylsulfat in 0,1 mol/l NaOH) lysiert. Das Lysat wurde anschließend für 20 s sonifiziert und die Proteinmenge mittels des Kits bestimmt.

Im Assay nach *Lowry* gibt es zwei Schritte, die zu einem Farbumschlag führen:

Zunächst die Reaktion zwischen Kupfer und Protein im alkalischen Milieu sowie die anschließende Reduktion des Folinreagenz durch das kupferbehandelte Protein [78]. Die Farbentwicklung wird hauptsächlich durch die Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan sowie zu geringerem Anteil von Cystin, Cystein und Histidin verursacht [78, 91]. Die Proteine bedingen eine Reduktion des Folinreagenz durch Verlust von ein, zwei oder drei Sauerstoffatomen, wobei eine oder mehrere der möglichen reduzierten Formen entstehen. Diese reduzierten Formen haben eine charakteristische blaue Farbe mit einem Maximum des Absorptionsspektrums bei 750 nm und ein Minimum bei 405 nm [91].

Der Assay wurde auf 96-Wellplatten (Pro-Bind Assay Plate, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) aufgetragen und die Extinktion mittels eines ELISA Readers (Dynatech MR5000) bei 650 nm gemessen. Die Extinktion der Blaufärbung der Proteinstandards wurde gemessen und eine Standardkurve erstellt, indem die Extinktion gegen die Konzentration der Proteinstandards aufgetragen wurde. Die Proteinkonzentration der Zellysatproben wurde durch Vergleich der Extinktionen mit denen einer BSA-Standardkurve ermittelt.

2.3.4 Bestimmung des α_1 -Fetoproteins

Die Bestimmung von α_1 -Fetoprotein (AFP) im Zellüberstand wurde freundlicherweise durch das Labor von PD. Dr. Oremek, Universitätsklinik Frankfurt am Main, durchgeführt.

Die α_1 -Fetoproteinkonzentration im Zellüberstand wurde dabei mit Hilfe eines kommerziellen Kits (Elecsys AFP Immunoassay, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Elektrochemiluminescence Immunoassay (ECLIA)) gemäß der Anleitung des Herstellers im Zentrallabor der Universitätsklinik Frankfurt bestimmt.

Das Prinzip des Elektrochemiluminescence Immunoassay (ECLIA) ist die Messung der Chemolumineszenz eines über AFP als Brücke an eine feste Phase gekoppelten Rutheniumkomplexes. Im Detail: Ein biotinylierter, monoklonaler, gegen AFP gerichteter Antikörper und ein mit Ruthenium-Komplex markierter, monoklonaler, gegen AFP gerichteter Antikörper bilden zusammen mit dem AFP in der Probe einen Sandwich-Komplex. Der AFP-Antikörper-Komplex bindet über eine Biotin-Streptavidin Wechselwirkung an Streptavidin beschich-

tete, magnetische Mikropartikel und ist somit an die Festphase gebunden. Das Reaktionsgemisch wird in die Meßzelle überführt, wo die Mikropartikel durch magnetische Wirkung auf die Oberfläche der Elektrode fixiert werden. Danach werden die ungebundenen Substanzen entfernt. Durch Anlegen einer Spannung wird die Chemilumineszenz-Emission induziert und mit dem Photomultiplier gemessen. Die Ergebnisse werden anhand einer Kalibrationskurve ermittelt. Diese wird durch eine Zwei-Punkt Kalibration und spezifischen Informationen zur Reagenzcharge gerätespezifisch generiert.

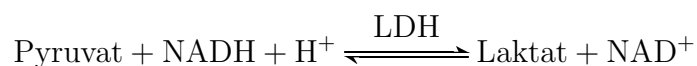
2.3.5 Bestimmung der Laktat-Dehydrogenase

Die Bestimmung der Laktat-Dehydrogenase (LDH) im Zellüberstand wurde unter Mithilfe des Nierenfunktionslabors, Universitätsklinik Frankfurt am Main, durchgeführt.

Die LDH im Zellüberstand wurde dabei mittels eines kommerziell erhältlichen Kits (LDH, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) gemäß der Anleitung des Herstellers bestimmt.

Der durchgeführte Test ist nach den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie 1972 [24] die „Optimierte Standard-Methode.“

Die Methode beruht auf der Laktat-Dehydrogenase katalysierten Reduktion von Pyruvat zu Laktat nach der Gleichung:



Dabei wird $\text{NADH} + \text{H}^+$ zu NAD^+ oxidiert. Die Geschwindigkeit der NADH-Abnahme ist direkt proportional der LDH-Konzentration und wurde photometrisch bei 546/340 nm, dem Maximum der $\text{NADH} + \text{H}^+$ spezifischen Absorption, gemessen.

2.4 Western Blot

Die qualitative Bestimmung von EPO im Zelllysate wurde mittels Western Blot durchgeführt. Die Methode basiert auf der Trennung von Proteinmolekülen durch

Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese, anschließendem Antigentransfer auf Membranen und spezifischen Nachweis mittels Antikörpern.

Die Gesamtproteinmenge im Zelllysate wurde durch eine modifizierte Methode nach Lowry (siehe 2.3.3) bestimmt.

Die Proben wurden mit SDS Probenpuffer versetzt und 30 Minuten auf 37 °C erhitzt. 50 µg Protein wurde je Spur auf das Gel geladen. Die Proteine wurden in einem diskontinuierlichem SDS-Polyacrylamidgel nach Laemmli [70] (2,5 % Sammelgel und 7,5 % Trenngel) aufgetrennt und auf eine PVDF Membran (Millipore) überführt. Der Übergang des vorgefärbten Molekulargewichtstandards (Kaleidoscope Prestained Standards, BioRad) diente gleichzeitig als Maß für die Effektivität des Transfers. Die Blots wurden in 3 % Trockenmilch in Tris gepufferter Salzlösung mit 0,1 % Tween 20 [TTBS: 10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20] 6 Stunden blockiert, dreimal in TTBS gewaschen und die Membran mit dem EPO-Antikörper (R&D; Maus-anti-Human; 1:250 in TTBS mit 0,1 % Trockenmilch) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit TTBS wurde der Primärantikörper mit einem Meerrettichperoxidase-konjugiertem Schaf-anti-Maus Antikörper (Amersham; 1:6000 in TTBS mit 1 % Trockenmilch) nach 60 minütiger Inkubation, gefolgt von viermaligen Waschen in TTBS, mittels eines kommerziellen Chemilumineszenz-Kits (ECL, Amersham) detektiert. Die P-gp spezifischen Banden des Blots wurden durch Zugabe von Chemilumineszenz-Reagentien (ECL, Amersham) für eine Minute entwickelt. Die durch die Meerrettichperoxidase katalysierte Oxidation von Lumigen PS-3-Acridan im alkalischen Milieu freigesetzte Chemilumineszenz wurde auf Röntgenfilm (Kodak, X-Omat AR) detektiert.

2.5 Isolierung von RNA

Die Isolierung der RNA aus der Zellkultur erfolgte nach der Methode von *Chomczynski und Sacchi* [17]. Hierzu wurde ein kommerzielles Kit (RNA Clean, Hybaid-AGS, Heidelberg) gemäß der Anleitung des Herstellers benutzt.

Die Isolierungsmethode beruht darauf, daß sich im sauren Milieu Komplexe zwischen RNA, Guanidinium und Wassermolekülen in der wäßrigen Phase ausbilden, während DNA/Protein bei diesem pH diese Wechselwirkung nicht ein-

gehen. Die wäßrige und die organische Phase werden durch Zugabe von Chloroform/Isoamylalkohol (49/1) und Zentrifugation voneinander getrennt. Die RNA wird aus der wäßrigen Phase durch Zugabe von Isopropanol (1:1 Vol) gefällt und abzentrifugiert. Das Pellet wird anschließend mit eiskaltem 75 %igen Ethanol gewaschen, nach erneuter Zentrifugation bei Raumtemperatur getrocknet, und in Diethylpyrocarbonat behandeltem Wasser resuspendiert. Hierbei werden durch das Diethylpyrocarbonat eventuell vorhandene RNAsen inaktiviert.

Ausbeute und Reinheitsgrad der Gesamt-RNA wurden in einem Photometer durch Messung der Extinktion bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Die Bestimmung der Reinheit der mRNA erfolgte aus dem Quotient der optische Dichte (OD) OD_{260}/OD_{280} , wobei Werte zwischen 1,7 und 2,1 repräsentativ für eine von Proteinresten befreite mRNA waren. Bei Werten außerhalb dieses Bereiches, wurde die entsprechende RNA für weitere Versuche nicht mehr verwendet. Der Gehalt der mRNA wurde mit Hilfe der OD_{260} bestimmt. Ausgehend von der bekannten Annahme, eine mRNA Konzentration von 40 µg/ml (bei einer Schichtdicke von 1 cm, verdünnt in Wasser) entspreche einer OD_{260} von 1, konnte der Gehalt mit dem jeweiligen Wert der OD_{260} berechnet werden.

2.6 Northern Blot

Die Bestimmung und Quantifizierung der RNA erfolgte mittels Northern Blot. Hierbei wird die RNA zunächst elektrophoretisch über ein denaturierendes formaldehydhaltiges Agarosegel aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran transferiert und für 120 Minuten bei 80 °C fixiert. Die untersuchten mRNAs werden jeweils durch Hybridisierung mit einer markierten cDNA-Sonde auf dieser Membran detektiert und quantifiziert. Die verwendete EPO Sonde besteht aus einem 745 Basenpaaren großem Fragment aus der kompletten humanen EPO cDNA (Accession-Nummer: NM_000799), welche in die EcoR V Schnittstelle eines pTR Vektors kloniert und mit Kpn I und Bgl II isoliert wurde. Herr Peter Keller aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. C. Bauer, Physiologisches Institut der Universität Zürich-Irchel, hat uns den Vektor freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Durchführung: 10 µg Gesamt-RNA in 50 % deionisiertem Formamid, 5,9 %

Formaldehyd und 1x MOPS Laufpuffer [10x MOPS-Puffer: 200 mM MOPS, 50 mM Na-Acetat, 5 mM EDTA (pH 8,0), mit NaOH auf pH 7,0] wurden in Probenpuffer (ad 40 μ l) aufgenommen [Probenpuffer: 4,5 ml DEPC-H₂O, 10 ml Formamid (deion.), 3,5 ml Formaldehyd, 2 ml 10x MOPS-Puffer, 2 ml H₂O mit 50 % Glycerol, 1 mM EDTA, 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol] und 10 min bei 75 °C denaturiert, dann auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Proben in einem denaturierenden Agarosegel bestehend aus 1 % Agarose, 5,9 % Formaldehyd in 1x MOPS bei konstant 60 V in einer BioRad Kammer aufgetrennt. Der Transfer auf die Biodyne B Nylonmembran (Gelman) erfolgte durch Kapillarblotting mit 20x SSC [3,0 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0] für 15 Stunden. Nach dem Transfer wurde die RNA für 2 Stunden bei 80 °C auf der Membran fixiert. Die Membran wurde in 2x SSC gespült und 1 Stunde in Prähybridisierungslösung [1 % SDS, 5x SSC, 50 % Formamid (deion.), 0,2 % Ficoll 400, 5 mM EDTA, 50 mM TRIS/HCl (pH 7,5), 0,2 % BSA, 0,1 molar NaCl, 0,2 % Polyvinylpyrrolidon] mit 2 μ g/ml denaturierter Heringssperma DNA prähybridisiert. Die EPO-cDNA Sonde wurde mittels Random Hexamerprimer und klonaler Polymere mit [α -³²P]dCTP markiert. Zur Markierung wurde die EPO-Sonde in destilliertem Wasser für 5 min bei 100 °C gekocht, anschließend für 5 min auf Eis gestellt. Nach dem anschließenden Abzentrifugieren der DNA wurde das Reaktionsgemisch eines Kits (Amersham Mega Prime), 5 μ l des radiomarkiertem [α -³²P] und 2 ml Klenow Polymerase zugegeben und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Die so gewonnene ³²P-markierte cDNA-Sonde wurde in Prähybridisierungslösung hinzugegeben und mit Heringssperma bei 100 °C für 10 min gekocht, anschließend in Eiswasser abgeschreckt, um einzelsträngige cDNA-Stränge zu erhalten. Mit dieser Lösung wurde der Blot über Nacht bei 42 °C hybridisiert. Die hybridisierte Membran wurde zweimal für 15 min bei 42 °C mit 2x SSC, 0,5 % SDS und einmal mit 0,2x SSC, 0,5 % SDS gewaschen. Im Anschluß wurde die Membran in einem Plastikbeutel eingeschweißt und ein bis vier Tage lang bei -80 °C auf einem Röntgenfilm (Kodak, X-Omat AR) exponiert. Die Filme wurden densitometrisch ausgewertet (Image/J, National Institutes of Health (NIH) Bethesda, Maryland, USA) und die erhaltenen Werte auf die Werte eines „housekeeping“ Gens (GAPDH) normalisiert. Als „housekeeping“ Gene, werden solche Gene bezeichnet, die konstitutiv exprimiert werden und somit als Vergleichsparameter für

eine weitgehend unregulierte Genexpression genutzt werden können.

2.7 Elektro Mobility Shift DNA-Binding Assay

Die qualitative und quantitative Bestimmung der Aktivität von HIF im Zellkern wurde mittels des Elektro Mobility Shift DNA-Binding Assay (EMSA) nach *Schreiber et al.* [101] durchgeführt. Die Methode basiert auf der Extraktion aktiver Transkriptionsfaktoren aus den Kernen stimulierter Zellen. Die Transkriptionsfaktoren werden anschließend mit ^{32}P markierten DNA Oligonukleotiden inkubiert und die DNA-Proteinkomplexe auf einem nichtdenaturierenden Polyacrylamidgel (Trisborat-EDTA) elektrophoretisch getrennt. Die Detektion der DNA-Proteinkomplexe sowie noch freie Oligonukleotide, wurden mittels Autoradiographie durchgeführt. Als HIF-bindenden Oligonukleotide wurden solche mit der Sequenz 5'-TCA CCA ACA GGC AAC GTG CAG CCG GAC GCG-3' und mit 5'-CGC GTC CGG CTG CAC GTT GCC TGT TGG TGA-3' als komplementärer Strang genutzt. Die mutierten Oligonukleotide hatten die Sequenz 5'-TCA CCA ACA GGC AAC GGA TCG CCG GAC GCG-3' und 5'-CGC GTC CGG CGA TCC GTT GCC TGT TGG TGA-3' als Gegenstrang.

Zur Extraktion der nukleären Proteine wurden die Zellen (pro Probe eine 75 cm² Flasche konfluenter Kulturen) zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit 1,5–2 ml PBS/EDTA (0,1 mM) für 5 min inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS/EDTA abgelöst und in ein Einmalreaktionsgefäß (1,5 ml) überführt. Nach 30 s Zentrifugation (13000 rpm) wurde der Überstand verworfen. Das Pellet wurde 10 s mit 300 µl Puffer A [10 mM HEPES (pH 7,9), 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF] bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde 10 µl 10%ige Nonidet P-40 zugegeben und die Zellen für 15 s auf höchster Stufe „gevortext“. Nach Zentrifugation (14000 rpm, 1 min) wurde der Überstand, der die Zellmembranen und das Zytoplasma enthielt, entnommen und verworfen. Die Kernproteine wurden in eiskaltem Extraktionspuffer [20 mM HEPES (pH 7,9), 25 % Glycerol, 0,4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF] bei 4 °C für 20 min unter permanentem „vortexen“ extrahiert. Nach Zentrifugation (14000 rpm, 5 min, 4 °C) wurde der Überstand, der die nukleären Proteine enthielt, entnommen, aliquotiert und bei –80 °C gelagert.

Vor Durchführung des EMSA wurde der Protein-Gehalt mittels Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung bestimmt. Dabei wird das Polyacrylamidgel 1 h oder länger in der Färbelösung [0,04 % Coomassie Brilliant Blue R (Sigma), 40 % (v/v) Methanol, 10 % Essigsäure] inkubiert. Danach erfolgen Waschungen mit 40 % Methanol bis der Hintergrund durchsichtig ist. Die Auswertung erfolgt densitometrisch (Image/J, National Institutes of Health (NIH) Bethesda, Maryland, USA).

HIF-bindende Oligonukleotide wurden mit [γ - ^{32}P]ATP (Amersham) terminal mit T4-Polynukleotidkinase (New England Biolabs) radioaktiv markiert und mit Hilfe einer Säule (G-50 Sephadex, Nick Säulen, Pharmacia) vom freien [γ - ^{32}P]ATP gereinigt. 5 μg des Extraktes nukleärer Proteine wurden 30 min mit 4 μl [γ - ^{32}P]-markierten, HIF-bindenden Doppelstrang-Oligonukleotiden, die das HIF-responsibele Element mit der Consensus Sequenz 5'-RCGTG-3' [104] enthielten, (65000 counts/ μl) und 3 μg poly(dI/dC) (Pharmacia), um eine unspezifische Bindung der Sonde an die irrelevanten Proteine zu verhindern, inkubiert. Die DNA-Protein-Komplexe wurden elektrophoretisch (BioRad Protean II Kammer, 260 V, ca. 15 mA) in einem 4%igen Polyacrylamid-Gel mit 12,5 mM Trisborat, 0,25 mM EDTA (pH 8,0) aufgetrennt. Anschließend erfolgte Autoradiographie und densitometrische Auswertung der Autoradiogramme. Zur Kontrolle der Spezifität wurden die spezifische Bindung der [γ - ^{32}P]-markierten Oligonukleotide mit 100fachem Überschuß des Wildtyp oder mutierten Oligonukleotiden, die nicht radioaktiv markiert waren, kompetitiert. Für Supershift Gel Assays wurden 5 μg eines monoklonalen, spezifischen HIF-1 α -Antikörper (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) zu einer Probe der γ - ^{32}P markierten HIF-Oligonukleotid-Komplexe gegeben und für 30 min bei 4 °C vor der Elektrophorese inkubiert [86].

2.8 Auswertungsverfahren und Statistik

Zur besseren Vergleichbarkeit der Meßwerte wurden diese als Prozent der Kontrolle angegeben. Außerdem wurden alle Werte auf gleiche Zellzahlen, der jeweiligen Kontrolle, bezogen.

Arbeitshypothese: Immunsuppressiva wirken sich auf die Syntheseleistung von Erythropoetin bei HepG2-Zellen aus.

Nullhypothese: Es besteht für die Zielvariable Erythropoetinsyntheseleistung von HepG2-Zellen kein Unterschied zwischen Vorhandensein und Nichtvorhandensein von Immunsuppressiva im Nährmedium.

Die Ergebnisse wurden als Durchschnittswert angegeben \pm Standardabweichung. Der Wilcoxon-Mann-Whitney Test [1] wurde benutzt, um statistische Auffälligkeiten bei den Kontrollwerten und jeweiligen Meßwerten zu ermitteln. Als signifikant wurden Werte ab $p < 0,05$ angenommen.

In der Berechnung der Signifikanzen wurden in allen Fällen die Absolutwerte herangezogen. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte, falls nicht anders Vermerkt, als Prozent der jeweiligen Kontrolle.

2.9 Reagenzien

- Azathioprin (Glaxo Wellcome GmbH & Co, Bad Oldesloe)
- Cyclosporin A (Novartis, Basel, Schweiz)
- Dimethylsulphoxide (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim), als Lösungsmittel für die Immunsuppressiva
- FK506 (Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd, Osaka, Japan)
- *p*-nitrophenol-*N*-acetyl- β -D-Glukoseaminide (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- Guanosin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- Mycophenolat Mofetil (Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen, Schweiz)
- Zellkulturmaterialien:
 - Zellkulturflaschen und Multiwell Tissue Culture Plates: Falcon Primaria (modifizierte Polysterene Oberfläche) (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA)
 - Medium: Dulbecco's MEM/Nut Mix F-12(HAM) (Gibco, Eggenstein)
 - Mediumzusätze:

- * Fetal Bovine Serum (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- * Penicillin/Streptomycin
- Waschpuffer: PBS (Dulbecco seromed, Biochrom KG, Berlin)

Alle anderen verwendeten Reagenzien waren ebenfalls von höchster analytischer Reinheit und wurden in den im Text angegebenen Konzentrationen eingesetzt und über Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim bezogen.

3 Ergebnisse

In den hier vorgestellten Experimenten wurde der Einfluß von Mycophenolat Mofetil auf die Erythropoetinsekretion untersucht. Die Untersuchungen erfolgten anhand des Zellkulturmodells der HepG2-Zellen. Hierbei wurden therapeutisch relevante MMF-Konzentrationen eingesetzt, wobei auch eine Plasma-Eiweißbindung im Zellnährmedium durch Zugabe von FCS berücksichtigt wurde.

3.1 Erythropoetinsekretion

Zu Beginn wurde untersucht, ob und wenn ja bei welchen Konzentrationen Mycophenolat Mofetil die Erythropoetinsekretion beeinflusst.

3.1.1 Konzentrationsabhängiger Effekt von MMF auf die EPO-Sekretion

Der Einfluß von Mycophenolat Mofetil auf die Erythropoetinsekretion in den Zellüberstand von HepG2-Zellen wurde in aufsteigenden Konzentrationen von 0,01 μM bis 5,0 μM MMF bestimmt. Hierzu wurde nach der in 2.1.2 bereits beschriebenen Versuchsdurchführung die EPO-Konzentration im Zellüberstand mittels des in 2.2 beschriebenen Erythropoetin ELISA gemessen.

Zur Normierung der gemessenen EPO-Werte wurde zunächst der gesamte Proteingehalt der jeweiligen Kultur nach dem in 2.3.3 beschriebenen Verfahren bestimmt und auf ein Milligramm Gesamtprotein bezogen (mU/mg). Anschließend wurde von jeder Probe das Verhältnis der Erythropoetin-Sekretion pro Milligramm Gesamtprotein zur jeweiligen Kontrolle im gleichen Versuchsansatz bestimmt. Dieses Verhältnis, dargestellt in Prozent der Kontrolle, ist in Abbildung 8 wiedergegeben. Wie in Abbildung 8 gezeigt, ist ein signifikanter Abfall der EPO-Sekretion auf $96\% \pm 4$ bereits ab MMF Konzentrationen von 0,1 μM nachzuweisen. Der zu beobachtende maximale Effekt wurde mit einem Abfall der Sekretion auf $54\% \pm 15$ der Kontrolle bei MMF Konzentrationen von 5 μM gemessen.

Neben der relativen Sekretionsminderung, ausgedrückt in Prozent der Kontrolle, wurde exemplarisch der absolute Wert für die Konzentration von 5 μM

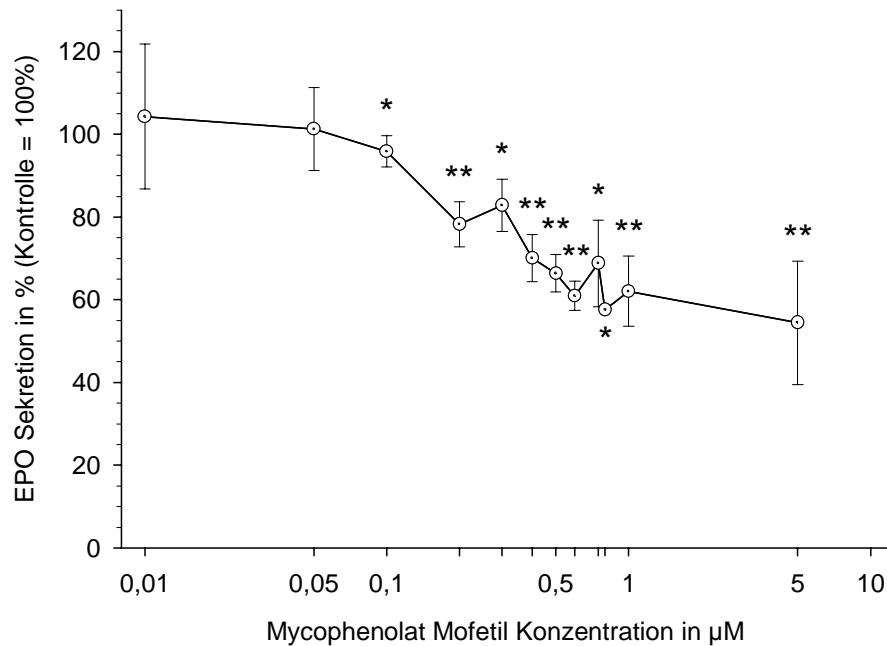


Abbildung 8: Reduktion der Erythropoetin-Sekretion in Abhängigkeit von der MMF Konzentration *in vitro*: DMSO-Kontrolle entspricht 100 %. Alle Werte Protein bezogen bereinigt. Stimulationsdauer 48 h. Mittel \pm SD. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. n=6, für 5 μM n=36.

MMF im Vergleich zum Absolutwert der Kontrolle in Abbildung 10 graphisch veranschaulicht. Zudem wurde die EPO-Sekretion in dieser Abbildung auf die absolute Zellzahl der jeweiligen Kultur bezogen, dargestellt als EPO-Sekretion pro Zelle. Die Berechnung erfolgte nach Bestimmung der Zellzahl nach Trypanblaufärbung, wie in 2.3.1 beschrieben.

Wie in Abbildung 10 dargestellt, bewirken 5 μM MMF nach 48 h einen signifikanten Abfall der EPO-Sekretion von durchschnittlich $8,6 \cdot 10^{-5}$ mU EPO in der DMSO-Kontrolle auf $5,2 \cdot 10^{-5}$ mU EPO pro Zelle unter MMF ($p < 0,05$).

Nachdem eine konzentrationsabhängige Wirkung von MMF gezeigt wurde, interessierte in Folge, ob diese auch von der Stimulationsdauer abhängen würde.

3.1.2 Zeitabhängigkeit der EPO-Sekretion unter MMF

Die Bestimmung der zeitlichen Abhängigkeit des Effekts von MMF auf die EPO-Sekretion erfolgte durch Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten. Als Zeitpunkte

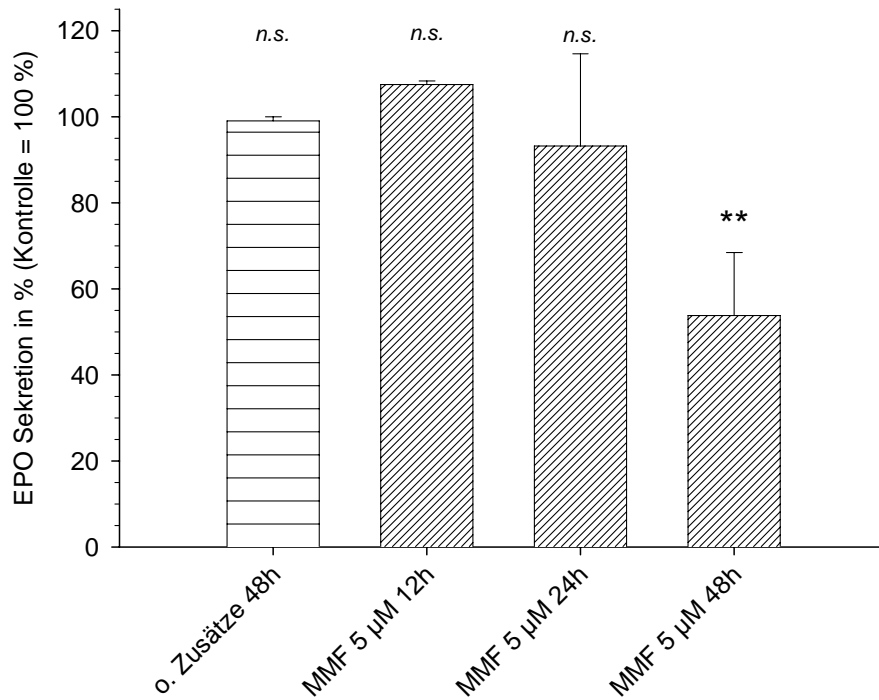


Abbildung 9: Zeitabhängigkeit des MMF-Effektes in HepG2-Zellen: Alle Werte bezogen auf jeweilige DMSO-Kontrolle. Mittel \pm SD. ** $p < 0,001$. Alle $n=9$. Absolute Werte der proteinbezogenen EPO-Konzentration der DMSO-Kontrolle nach Zeitabhängigkeit (in mU EPO pro mg Zellprotein): DMSO 12 h: $247,2 \pm 20$; DMSO 24 h: $271,8 \pm 50$; DMSO 48 h: 253 ± 42 .

der Messung wurden 12, 24 und 48 Stunden nach Beginn der Stimulation gewählt und analog den Beschreibungen in Kapitel 2.1.2 durchgeführt.

Abbildung 9 (Werte als Prozent der Kontrolle) und Abbildung 10 (dargestellt als absolute Werte) zeigen die kumulierte Erythropoetinsekretion der HepG2-Zellen in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer bei einer konstanten Konzentration von 5 μ M Mycophenolat Mofetil. Die Konzentration von 5 μ M MMF wurde gewählt, da nach vorangegangener Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit (3.1.1) hier der größte Effekt auszumachen war und noch keine toxischen Effekte sichtbar waren (s. 3.2).

Es zeigten sich erst nach 48 h signifikante Effekte von MMF auf die Erythropoetin-Sekretion. Kürzere Inkubationszeiten brachten keine signifikanten Ergebnisse. Der Zusatz von DMSO zum Kontrollansatz zeigte auch nach 48 h keinen

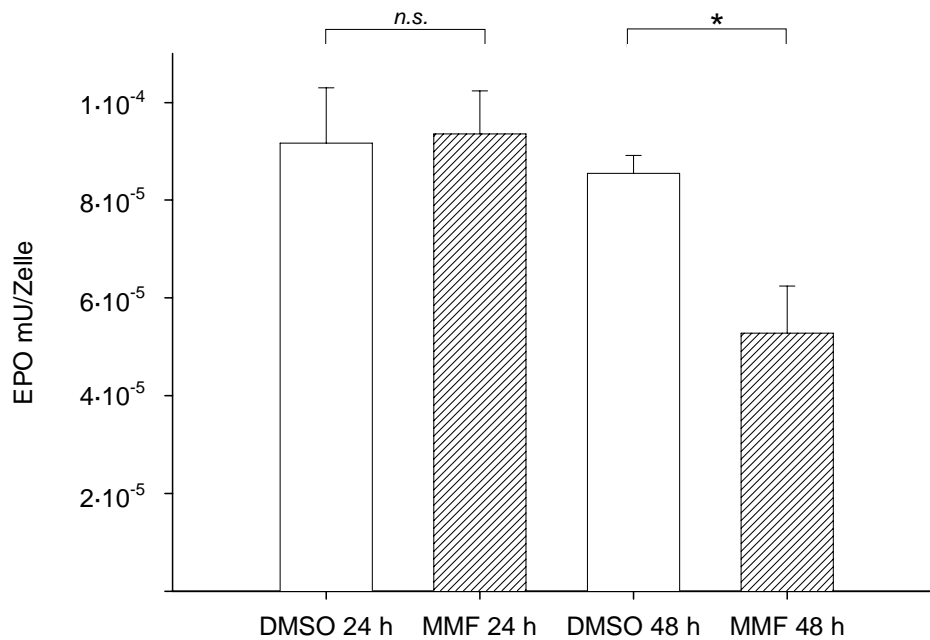


Abbildung 10: EPO-Sekretion pro HepG2-Zelle: Stimulationsdauer wie angegeben. MMF Konzentration jeweils 5 μ M. Mittel \pm SD. * $p = 0,024$. Alle $n=9$.

signifikanten Unterschied verglichen mit den Ansätzen ohne Zusätze zum Kulturmedium.

Die auf die Zellzahl normierte EPO-Sekretion ergibt, dargestellt als EPO-Sekretion pro Zelle (s. Abb. 10), nach 24 h keinen, nach 48 h einen signifikanten Abfall mit Rückgang von durchschnittlich $8,6 \cdot 10^{-5}$ mU auf $5,3 \cdot 10^{-5}$ mU pro Zelle ($p < 0,05$). Im DMSO-Kontrollansatz zeigten sich keine signifikanten Veränderungen.

3.2 Bestimmung der Zytotoxizität

Zur Erfassung möglicher zytotoxischer Effekte wurden mehrere unabhängige Methoden angewendet. So konnte überprüft werden, ob es sich bei der beobachteten Wirkung auf die EPO-Sekretion um einen Substanzeffekt des eingesetzten Immunsuppressivums, oder um Auswirkungen verminderten Zellwachstums, Zellhypertrophie oder Zellnekrosen handelt.

3.2.1 Laktat-Dehydrogenase

Um das Ausmaß zytotoxischer Effekte, die zur Zellnekrose führen können, zu ermitteln, wurde die Laktat-Dehydrogenase-Konzentration im Zellkulturüberstand gemessen. Laktat-Dehydrogenase (LDH) wird als zytoplasmatisches Enzym nach toxischer Zellschädigung ins Medium freigesetzt. Die Bestimmung der LDH-Konzentration erfolgte wie in Kapitel 2.3.5 beschrieben.

Wie in Tabelle 1 dargestellt, zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Konzentrationen von MMF (0,01 bis 5 μM) und der LDH-Konzentration im Zellkulturüberstand im Vergleich zur Kontrolle. In Tabelle 1 sind absolute LDH-Konzentrationen in IU/l dargestellt.

Tabelle 1: Absolute Laktat-Dehydrogenase-Konzentration im Zellkulturüberstand in Abhängigkeit von MMF. LDH-Werte sind absolute Werte, welche auf 1 mg/ml Zellysatsprotein standardisiert sind. Stimulationsdauer 48 h. Mittel \pm SD. n=6; für 5 μM n=19.

	LDH [IU/l]	\pm SD	<i>p</i>
DMSO 48h	25,3	10,4	
MMF 0,05 μM	27,31	3,09	<i>n.s.</i>
MMF 0,2 μM	29,37	10,61	<i>n.s.</i>
MMF 0,4 μM	27,68	11,27	<i>n.s.</i>
MMF 0,8 μM	30,83	22,41	<i>n.s.</i>
MMF 1 μM	31,01	18,09	<i>n.s.</i>
MMF 5 μM	24,4	12,87	<i>n.s.</i>

Bei Bestimmungen von LDH und EPO aus gleichen Ansätzen konnte demonstriert werden, daß trotz signifikantem Abfall der EPO-Sekretion die LDH-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle keine signifikante Änderung aufwies. Dieses ist in Abbildung 11 veranschaulicht, wobei die jeweilige Veränderung relativ in Prozent zur Kontrolle dargestellt ist.

Obwohl MMF konzentrationsabhängig die EPO-Sekretion inhibierte, waren die LDH-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle, die nur DMSO zum Medium enthielt, unverändert.

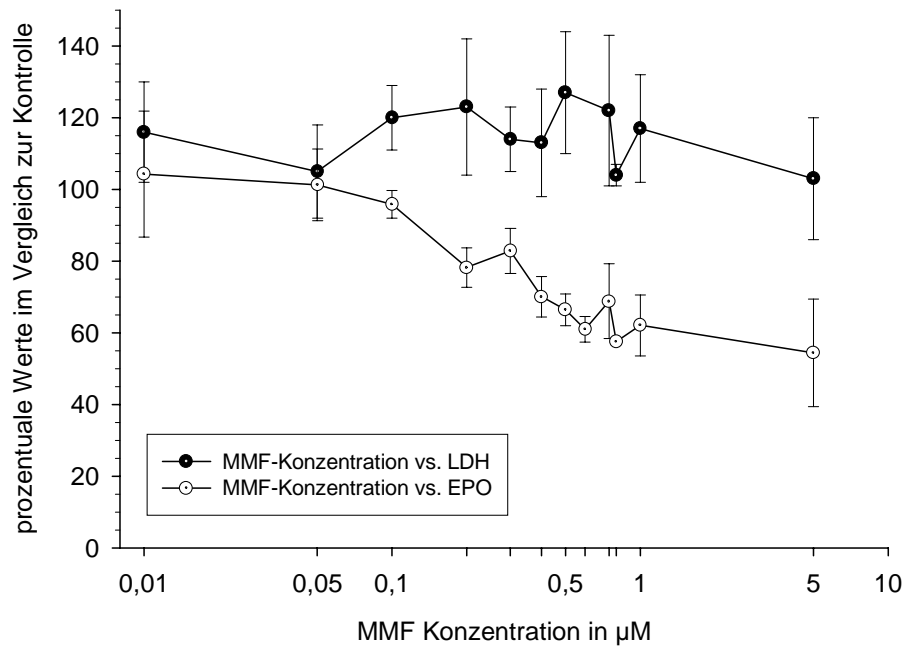


Abbildung 11: Relative EPO-Sekretion und LDH-Freisetzung im Zellkulturüberstand in Abhängigkeit von MMF im direkten Vergleich: LDH-Werte sind auf 1 mg/ml Zellysatprotein standardisiert. Werte als Prozent der Kontrolle. Stimulationsdauer 48 h. Mittel \pm SD. $n=6$; für 5 μM $n=19$. Obere Kurve keine Signifikanz. Signifikanzen der unteren Kurve s. Abb. 8.

3.2.2 Bestimmung der Vitalität über Trypanblaufärbung

Als weitere unabhängige Methode wurde die Bestimmung der Vitalität nach Trypanblaufärbung durchgeführt, wobei es hierbei möglich ist, zwischen lebenden und nekrotischen Zellen direkt zu unterscheiden. Das Auszählen der Zellen erfolgte nach in Kapitel 2.3.1 beschriebenem Vorgehen. Die Anzahl der lebenden und nekrotischen Zellen wurde durch Auszählen von Zellen, nach 24 h und 48 h nach Stimulation, nach Färbung mit Trypanblau bestimmt. Dabei wurden die Zellen von jeweils einer 6-Well-Platte zu jedem Ansatz ausgezählt.

Es konnte nach 24-stündiger Beobachtung gezeigt werden, daß sich die Anzahl der nekrotischen Zellen unter 5 μM MMF im Vergleich zur DMSO-Kontrolle nicht signifikant unterschied. Eine solche Differenz war auch nach 48 Stunden nicht nachweisbar. Wie in Tabelle 2 dargestellt, wurden unter keiner der beobachteten Bedingungen mehr als 2% tote Zellen gezählt.

Zudem zeigte sich keine statistische Auffälligkeit bezüglich der Zellzahl pro Well. Weder nach 24 h noch nach 48 h zeigte sich ein antiproliferativer Effekt in der MMF-Gruppe im Vergleich zur DMSO-Kontrolle.

Tabelle 2: Vitalitätsnachweis mittels Trypanblautest in An- oder Abwesenheit von MMF. Anteil der toten Zellen < 2%. Stimulationsdauer 24 h und 48 h. Weder die Anzahl der lebenden Zellen noch die der nicht vitalen Zellen war statistisch auffällig gegen die jeweilige Kontrolle. Alle n=9.

	Zellen / Well	±SD	nicht vitale Zellen / Well	±SD	<i>p</i>
DMSO 24h	3 632 222	355 942	7 778	8 333	<i>n.s.</i>
MMF 5 µM 24h	3 620 000	482 960	8 889	9 280	<i>n.s.</i>
DMSO 48h	4 715 556	587 986	26 667	17 321	<i>n.s.</i>
MMF 5 µM 48h	4 265 000	617 252	21 250	15 526	<i>n.s.</i>

Somit besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Zellen der mit 5 µM MMF stimulierten Gruppe und der Kontroll (DMSO) Gruppe bezüglich der Vitalität.

3.2.3 Bestimmung der Zellzahl durch Hexosaminidase Assay

Neben einer direkten Bestimmung der Zellzahl durch Auszählung wurde die Gesamtzellzahl auch durch Bestimmung des lysozymalen Enzyms Hexosaminidase ermittelt. Diese Methode wurde wegen der einfachen Durchführbarkeit, hoher Reproduzierbarkeit sowie Standardisierbarkeit des Verfahrens gewählt. Die Bestimmung der Hexosaminidase und die daraus abgeleitete Zellzahl wurde wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben durchgeführt.

Es wurden drei verschiedene Versuchsbedingungen in je achtfachem Ansatz gewählt, solche ohne Lösungsmittel DMSO, mit DMSO und mit 5 µM MMF. Die gewählte Inkubationsdauer lag bei allen Ansätzen bei 48 Stunden.

Aus den in Abbildung 12 dargestellten Meßergebnissen lassen sich zwischen diesen drei Gruppen statistisch keine Unterschiede ableiten. Daraus folgt unmittelbar, daß in diesem Versuchsaufbau HepG2-Zellen unter 5 µM MMF bezogen auf das Wachstum im Vergleich zu den Kontrollen keinen Unterschied zeigten.

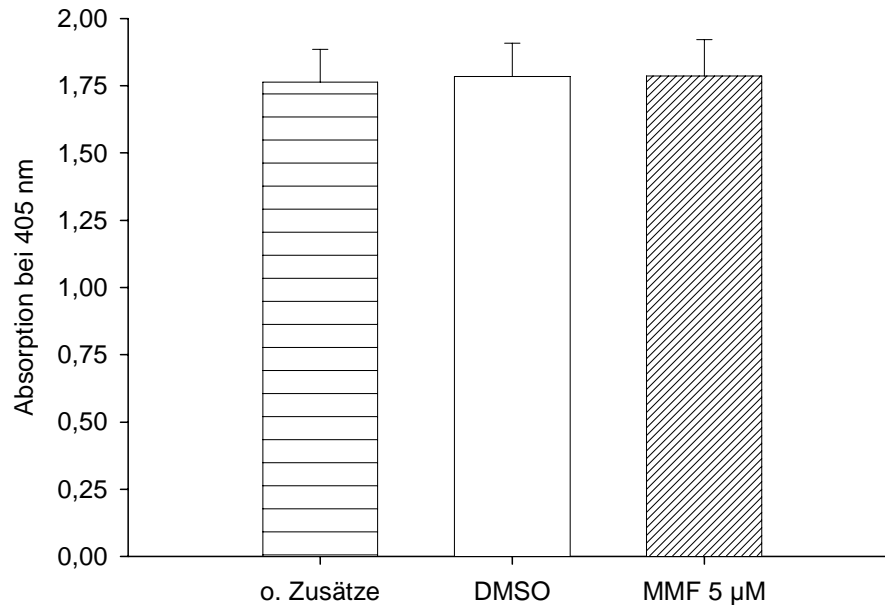


Abbildung 12: Bestimmung der Zellzahl durch Messung der Hexosaminidaseaktivität: Darstellung der Extinktion des durch Hexosaminidase umgesetzten Substrats. Stimulationsdauer 48 h. Mittel \pm SD. Alle $n=8$. Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Auch zeigte sich, daß das Lösungsmittel DMSO keinen hemmenden Einfluß auf die HepG2-Proliferation hat.

3.3 Guanosinabhängigkeit des Effekts von Mycophenolat Mofetil auf die Erythropoetin-Synthese

Mycophenolat Mofetil führt über die reversible Hemmung der IMPDH zu einer Guanosindepletion in den Zellen. Es wurde untersucht, ob sich durch Zugabe von Guanosin die Depletion ausgleichen läßt und dieses einen Einfluß auf die EPO-Sekretion hat.

Es zeigte sich, daß die Zugabe von 100 μ M Guanosin den hemmenden Effekt von 5 μ M MMF auf die EPO-Sekretion soweit wieder aufhebt, daß statistisch kein Unterschied zur Kontrolle besteht. In Abbildung 13 ist zudem dargestellt, daß für Guanosin selbst kein Effekt auf die EPO-Sekretion nachweisbar ist.

In wenigen Versuchen mit mehr als 100 μ M Guanosin konnte kein weiterer Anstieg der EPO-Sekretion unter 5 μ M MMF gefunden werden. Die maximal

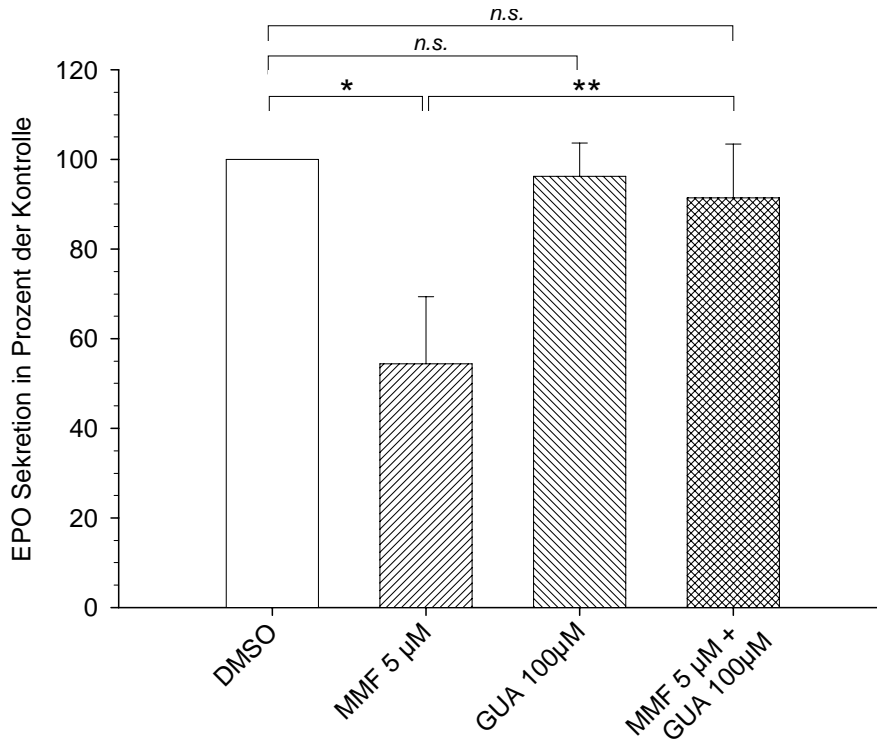


Abbildung 13: Aufhebung des inhibitorischen Effekts von MMF auf die EPO-Sekretion durch Guanosin (GUA): DMSO-Kontrolle entspricht 100 %. Stimulationsdauer 48 h. Mittel \pm SD. ** $p < 0,001$, * $p = 0,006$, *n.s.* = nicht signifikant. $n=18$; für 5 μ M MMF $n=36$.

eingesetzte Konzentrationen von Guanosin betrug hierbei 300 μ M.

3.4 Spezifische Modulation der Sekretion von Erythropoetin durch Mycophenolat Mofetil

Zur Beurteilung, ob die beobachtete verminderte EPO-Sekretion unter MMF Stimulation auf einen unspezifischen Effekt auf die Proteinsekretion zurückzuführen ist, wurde α_1 -Fetoprotein im Zellüberstand gemessen. Dabei wurde α_1 -Fetoprotein exemplarisch als ein in HepG2-Zellen nicht reguliertes, kontinuierlich synthetisiertes Protein betrachtet.

A_1 -Fetoprotein im Zellüberstand wurde nach 48-stündiger Stimulation mit 5 μ M MMF, wie in Abschnitt 2.3.4 beschrieben, bestimmt. Die Stimulation der Zellen erfolgte analog zu den Untersuchungen zur EPO-Sekretion. Wie in

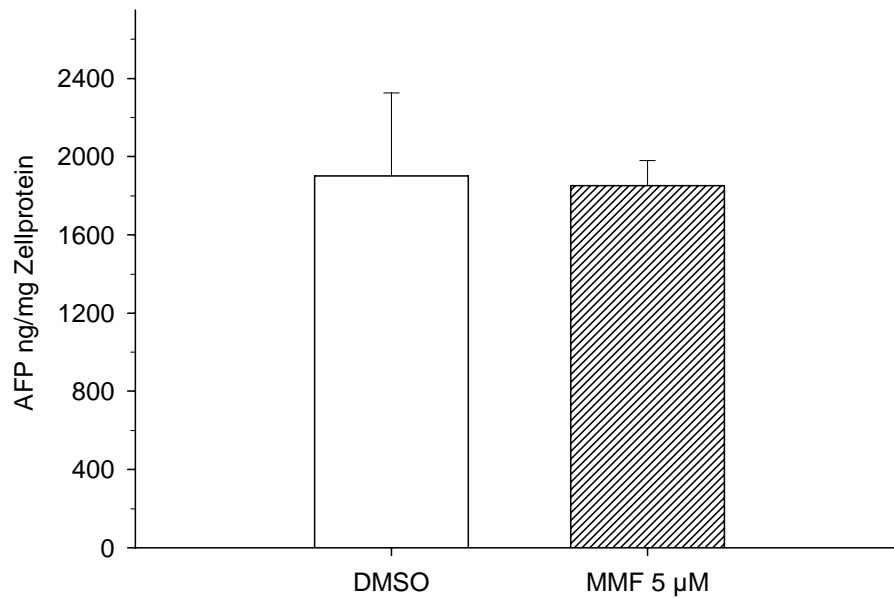


Abbildung 14: Effekt von MMF auf die α_1 -Fetoprotein Sekretion bei HepG2-Zellen: α_1 -Fetoprotein Werte sind absolute Werte, welche auf 1 mg/ml Zelllysatsprotein standardisiert sind. Stimulationsdauer 48 h. Mittel \pm SD. n=9. $p = n.s.$

Abbildung 14 zeigt, ließ sich kein charakteristischer Unterschied der absoluten Menge des sezernierten α_1 -Fetoprotein pro Milligramm Zelllysatsprotein unter MMF Stimulation zeigen. In der Kontrolle mit DMSO wurden im Durchschnitt 1902 ± 424 ng AFP pro mg Zelllysatsprotein (Mittel \pm SD) und unter MMF 1851 ± 127 ng AFP pro mg Zelllysatsprotein (Mittel \pm SD) sezerniert.

Ein Einfluß von MMF auf die Sekretion von α_1 -Fetoprotein bei HepG2-Zellen ist somit nicht nachweisbar.

3.5 Einfluß von Mycophenolat Mofetil auf die EPO-mRNA Expression

Zur Bestimmung des Einflusses von Mycophenolat Mofetil auf die Erythropoetin mRNA Expression in HepG2-Zellen wurde die mRNA, wie in Abschnitt 2.5 beschrieben aufbereitet und diese mittels EPO-RNA Northern Blot (s. 2.6) quantifiziert. Neben der Messung nach 48-stündiger Inkubation mit MMF wurde zudem ein mögliches Signal durch zusätzliche Inkubation mit 50 μM CoCl_2 verstärkt. Kobalt simuliert in HepG2-Zellen Hypoxie. Die Zugabe von CoCl_2 erfolgte zu verschiedenen Stimulationszeitpunkten, wie 6 und 18 Stunden vor Versuchsende.

Abbildung 15 zeigt ein typisches Ergebnis einer zeitabhängigen Bestimmung der EPO-mRNA und der GAPDH als Kontrolle. Die Stimulierung erfolgte mit 5 μM Mycophenolat Mofetil für jeweils 48 Stunden. Vor Versuchsende wurde zu den angegebenen Zeitpunkten 50 μM CoCl_2 zugegeben.

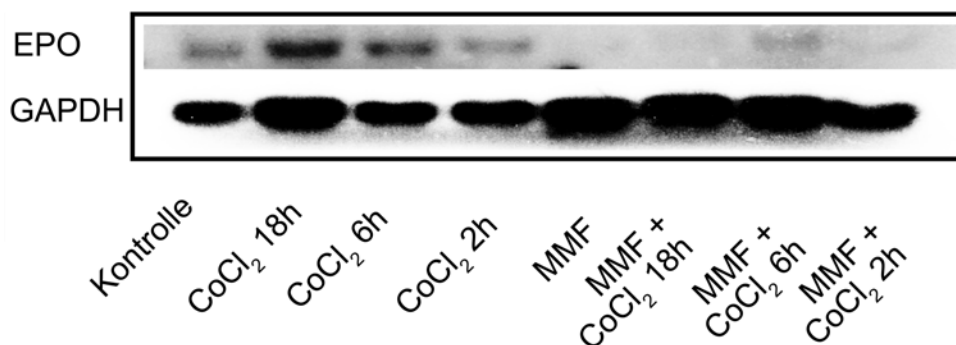


Abbildung 15: Repräsentativer EPO-mRNA Northern Blot und GAPDH als Kontrolle. Stimulationsdauer mit MMF stets 48 h; mit CoCl_2 wie angegeben.

Eine densitometrische Auswertung der Northern Blots aus fünf unabhängigen Experimenten ist in Abbildung 16 zusammengefasst. Mycophenolat Mofetil in einer Konzentration von 5 μM bewirkte eine Reduktion der EPO-mRNA Induktion um 74 % nach 48-stündiger Behandlung im Vergleich zur Kontrolle (DMSO).

Eine Stimulation mit 50 μM CoCl_2 führte nach 6 und 18 Stunden zu einer Erhöhung der EPO-mRNA-Expression im Vergleich zur Basalexpression der Kontrolle. Die EPO-mRNA Spiegel lagen nach 6 Stunden 2,6fach und nach 18 Stunden 3,4fach über der Kontrolle (DMSO). Bereits nach 6 h Inkubationsdauer reduzierten 5 μM Mycophenolat Mofetil die CoCl_2 induzierte EPO-mRNA-Expression

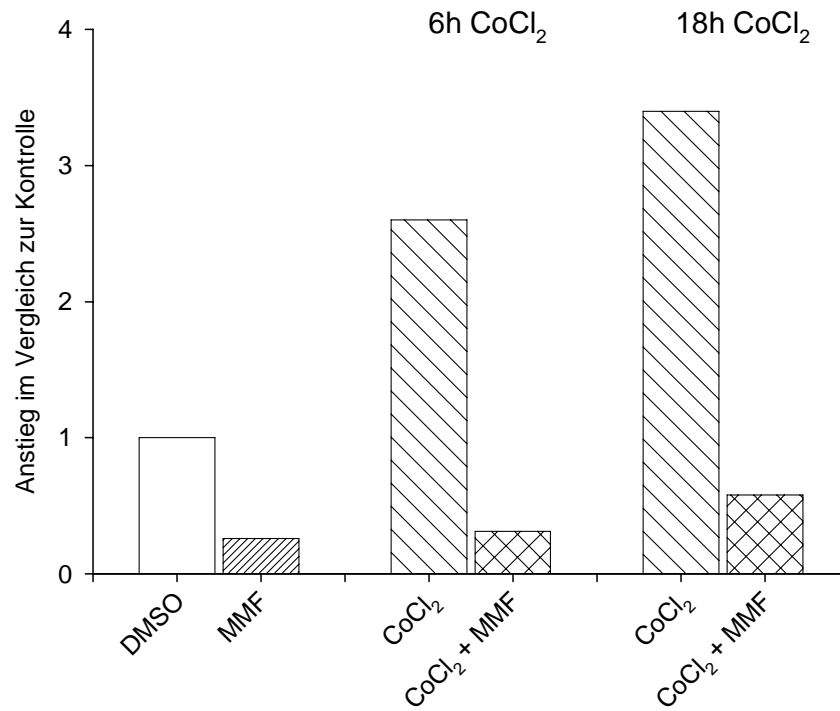


Abbildung 16: Effekt von MMF auf die EPO-mRNA: Densitometrische Auswertung. Werte dargestellt als Mittel von 5 unabhängigen Experimenten und normalisiert zur GAPDH. Inkubationsdauer mit MMF stets 48 h; mit CoCl₂ wie angegeben in den jeweils letzten 6 bzw. 18 h der Stimulation. Kontrolle (DMSO) entspricht 100 %.

der HepG2-Zellen um 88 % im Vergleich zu den 6 h CoCl₂ Werten. Nach 18 h zeigte sich eine 83%ige Reduktion unter MMF im Vergleich zu den 18 h CoCl₂ Werten.

3.6 Einfluß von Mycophenolat Mofetil auf die Glykolisierung von Erythropoetin

Den Einfluß von Mycophenolat Mofetil auf die Glykolisierung von Erythropoetin bei HepG2-Zellen wurde mittels Western Blot untersucht. Neben Erythropoetin-Proben aus der Zellkultur wurde auch zum Vergleich rekombinantes humanes Erythropoetin (NeoRecormon, Roche, Grenzach-Wyhlen), welches aus einer CHO-Zelllinie (Chinesische-Hamster-Ovarialzellen) hergestellt wird.

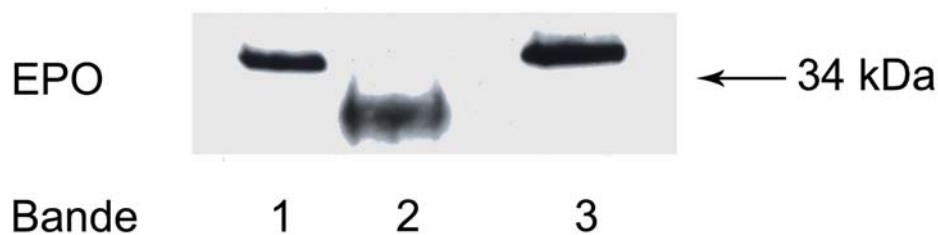


Abbildung 17: EPO-Western Blot. Bande 1: DMSO-Kontrolle; Bande 2: humanes rekombinantes EPO Roche; Bande 3: MMF 5 μ M

Wie in Abbildung 17 zu erkennen, befinden sich die beiden Erythropoetinproben von HepG2-Zellen (Banden 1 und 3) auf gleicher Höhe, was auf ein unverändertes Molekulargewicht unter 48 stündiger MMF Gabe und somit auf eine unveränderte Glykolisierung schließen läßt. Das auf Bahn 2 eingesetzte rHu-EPO weist eine leicht unterschiedliche Laufgeschwindigkeit auf, welche sich in der erwarteten Größenordnung von 30 kDa befindet.

3.7 HIF-1 Bindung in HepG2-Zellen nach MMF Behandlung

Zur genaueren Untersuchung des Angriffspunktes von Mycophenolat Mofetil auf die Erythropoetin mRNA Expression in HepG2-Zellen wurden HIF-1-Elektro Mobility Shift Assays (EMSA) wie in Abschnitt 2.7 beschrieben durchgeführt. Hierbei wurde die Aktivität des Transkriptionsfaktors HIF-1 untersucht. Neben der Messung nach 48-stündiger Inkubation mit MMF wurde zudem ein mögliches Signal durch zusätzliche Inkubation mit 50 μM CoCl_2 verstärkt. Kobalt simuliert in HepG2-Zellen Hypoxie. Die Zugabe von CoCl_2 erfolgte 2, 4 und 18 Stunden vor Versuchsende, um eventuelle Zeitabhängigkeiten zu erfassen.

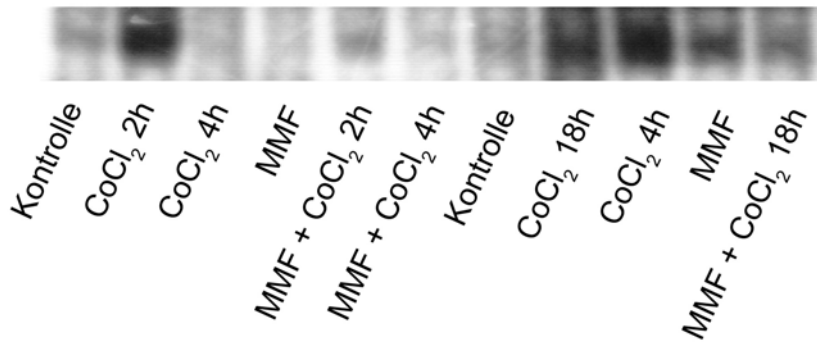


Abbildung 18: HIF-1-EMSA. Eingesetzte Konzentrationen: MMF 5 μM , CoCl_2 50 μM . Stimulationsdauer mit MMF stets 48 h, mit CoCl_2 wie angegeben.

Abbildung 18 zeigt einen repräsentativen HIF-1-EMSA. Es wurde eine vermehrte Bindung von HIF an markierte Oligonukleotide des humanem EPO-Gens von 2 bis 18 Stunden nach CoCl_2 Stimulation beobachtet. Wie erwartet führte die Inkubation mit CoCl_2 nach 2, 4 und 18 Stunden in HepG2 Zellen zu einer Verstärkung der HIF-1 Bindung an die spezifischen Oligonukleotide. Die Bindung eines HIF-1 spezifischen Komplexes wurde durch MMF in den Kontrollen (basal), wie auch in den CoCl_2 behandelten Zellen signifikant inhibiert.

Abbildung 19 zeigt eine Supershift-Kontrolle mit einem HIF-1 α -Antikörper (Bande 3). Durch die Bindung des spezifischen HIF-Antikörpers entsteht ein weiterer Komplex, welcher durch sein größeres Molekulargewicht eine geringere elektrophoretische Mobilität hat. Das Erscheinen dieses schwereren Komplexes

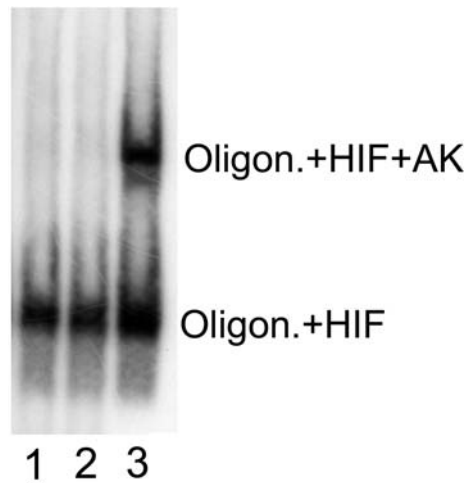


Abbildung 19: HIF-1 α -EMSA Supershift. Bande 1: CoCl₂ 18 h. Bande 2: CoCl₂ 18 h + MMF. Bande 3: CoCl₂ 18 h Supershift. Eingesetzte Konzentrationen: MMF 5 μ M, CoCl₂ 50 μ M. Stimulationsdauer mit MMF 48 h, mit CoCl₂ 18 h. Oligon. = Oligonukleotide, AK = Antikörper.

beweißt, daß es sich wirklich um Komplexe aus HIF-1 und den Oligonukleotiden handelt.

3.8 Effekte der Immunsuppressiva Azathioprin, Cyclosporin A und Tacrolimus auf die EPO-Sekretion *in vitro*

Wir haben in die Untersuchung die Immunsuppressiva eingeschlossen, die im Zusammenhang mit dem roten Blutbild auffällig gewesen sind. So wurde neben Mycophenolat Mofetil das im Wirkmechanismus ähnliche Azathioprin, welches auch supprimierend auf die Purinsynthese wirkt, betrachtet. Zur Kontrolle wurden außerdem die Immunsuppressiva Cyclosporin A (CSA) und Tacrolimus (FK506) eingeschlossen.

Unter den weiteren untersuchten Immunsuppressiva zeigte lediglich **Azathioprin** einen Effekt auf die EPO-Sekretion. Bei Konzentrationen von 2500 ng pro ml Medium lag die Sekretion von EPO bei 32,3 % \pm 6,4 der Kontrolle und war damit signifikant erniedrigt ($p < 0,001$). Die weiteren Ergebnisse der Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit für den Effekt auf EPO durch AZA sind in Tabelle 3 dargestellt. Bei 2500 ng pro ml Medium war auch das AFP signifikant

erniedrigt ($70,9\% \pm 6,1$) im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,001$). Statistisch nicht auffällig waren hingegen die LDH und der Gesamtproteingehalt im Vergleich zur Kontrolle. Ebenfalls unauffällig waren die Ergebnisse des Hexosaminidase-Assays bei Konzentrationen von 2500 ng AZA.

Tabelle 3: Einfluß von AZA auf die EPO-Konzentration im Zellüberstand. Stimulationsdauer 48 h. Dargestellt als Prozent der jeweiligen Kontrolle \pm SD. n=7; für AZA 2500 ng ist n=11.

	EPO-Sekretion	p
AZA 500 ng/ml	85,2% \pm 13,3	<i>n.s.</i>
AZA 1000 ng/ml	67,4% \pm 14,3	0,028
AZA 2500 ng/ml	32,3% \pm 6,4	<0,001
AZA 5000 ng/ml	22,6% \pm 8,0	<0,001

Die Immunsuppressiva **Cyclosporin A** und **Tacrolimus** zeigten keine signifikante Veränderung der EPO-Sekretion im Vergleich zur Kontrolle (s. Tab. 4). Dabei wurden für CSA außerdem Konzentrationen von 100, 500, 1000, 1500 und 3000 ng pro ml Medium untersucht, die allesamt keine wesentlichen Veränderungen zeigten. Untersuchte Konzentrationen von FK506 waren 5, 50, 125, 250 und 500 ng pro ml Medium, welche ebenfalls keinen Einfluß auf die EPO-Sekretion der HepG2-Zellen zeigten.

Tabelle 4: Einfluß der Immunsuppressiva Cyclosporin A, FK506 und AZA auf die EPO-Konzentration im Zellüberstand. Stimulationsdauer 48 h. Dargestellt als Prozent der jeweiligen Kontrolle \pm SD. * $p < 0,05$. für AFP alle n=6; für EPO: FK506 n=14; CSA n=20; AZA n=11. (n.d.: nicht durchgeführt)

	EPO-Sekretion	AFP
FK506 250 ng/ml	91,4% \pm 15,6	<i>n.d.</i>
CSA 1500 ng/ml	90,4% \pm 13,1	90,3% \pm 6,9
AZA 2500 ng/ml	32,3% \pm 6,4 *	70,9% \pm 6,1 *

Im Bezug auf das AFP erwies sich Cyclosporin A bei 1500 ng/ml als unauffällig mit $90,3\% \pm 6,9$ der Kontrolle. Die LDH Werte deuteten weder bei CSA noch bei FK506 im Vergleich zur Kontrolle auf eine erhöhte zytotoxische Wirkung hin.

4 Diskussion

Ziel der vorgelegten Arbeit war es, das Auftreten von Anämien unter immunsuppressiver Therapie mit MMF genauer zu untersuchen. Vermutet wurde eine Beeinflussung des Erythropoetin Spiegels, welcher als wesentlicher Wachstumsfaktor die Neubildung roter Blutkörperchen steuert. Hierzu wurde der Einfluß von MMF und zum Vergleich noch anderer Immunsuppressiva auf die EPO-Sekretion bei HepG2-Zellen *in vitro* bestimmt. Aus Mangel an einem etablierten Modell mit renalen Zellen sind die Untersuchungen an einem Zellkultur Modell mit HepG2-Zellen, welche sich in der Untersuchung der Erythropoetinsynthese bewährt haben, durchgeführt worden. Überprüft wurde auch, ob und wie die EPO-Genexpression durch Mycophenolat Mofetil beeinflusst wird, und über welchen intrazellulären Signaltransduktionsweg MMF das EPO-Gen inhibiert wird.

4.1 Auswahl der Versuchsbedingungen

4.1.1 Immunsuppressiva

Neben anderen Nebenwirkungen ist unter immunsuppressiver Therapie mit MMF das Auftreten einer Anämie problematisch, welche im Rahmen dieser Arbeit genauer untersucht worden ist. Mycophenolat Mofetil (MMF) ist ein Immunsuppressivum, welches klinisch im Zusammenhang mit dem roten Blutbild auffällig gewesen ist [31]. Als Erklärung für das Auftreten einer Anämie ist eine Minderung der Bildung von Erythrozyten möglich. Der wichtigste humorale Faktor zur Stimulation der Erythropoese ist das Hormon Erythropoetin (EPO). Ein Mangel an EPO könnte eine Erklärung für die beobachteten Anämien sein, weshalb der Einfluß von MMF auf die Erythropoetinsynthese das zentrale Thema dieser Arbeit ist. Zusätzlich sind andere Immunsuppressiva, wie Azathioprin (AZA) [3, 20], das ebenfalls als Purinsynthesehemmer anämieauslösend wirken kann und zur Kontrolle die beiden Calcineurininhibitoren Cyclosporin A (CSA) [90] und Tacrolimus [90] untersucht worden. Im Gegensatz zu MMF und AZA verursacht Cyclosporin A bei einigen Patienten eine Polyglobulie [52]. Unter FK506 wird in Kombination mit ACE-Hemmern eine leichte Anämie beobachtet [53].

Um pharmakologische Artefakte durch toxische Konzentrationen zu vermeiden, wurden die Immunsuppressiva in therapeutisch relevanten Konzentrationen

eingesetzt.

Die eingesetzten fettlöslichen Immunsuppressiva sind zur Verwendung in den Versuchen in DMSO gelöst worden. Zur Standardisierung ist stets ein Kontrollansatz mit reinem Lösungsmittel mitgeführt worden, auf welchen die jeweiligen Ergebnisse bezogen wurden. Zudem konnte gezeigt werden, daß das Lösungsmittel DMSO in der eingesetzten Konzentration von maximal 1 % keinen Einfluß auf die EPO-Sekretion bei HepG2-Zellen hat.

4.1.2 HepG2-Zellen

Die Studien wurden an humanen Hepatoma Kulturen der Linie HepG2, welche ein Standardmodell zur Untersuchung der Erythropoetinsynthese sind [107], durchgeführt. Ein renales Zellkulturmodell mit kontrollierter Erythropoetinsynthese ist nicht verfügbar [122]. Es ist daher zu beachten, daß quantitative Unterschiede in der Sensitivität zwischen Leberzellen und Nierenzellen in Bezug auf Immunsuppressiva, der Empfindlichkeit auf zytotoxische Effekte und der EPO-Produktion möglich sind. Der genaue Anteil der Leber an der gesamten EPO-Produktion ist nicht exakt bekannt, es sind aber Größenordnungen von 10 % der Syntheseleistung eines Erwachsenen für die Leber und 90 % für die Niere beschrieben [57].

HepG2-Zellen stammen von einem menschlichen primären Hepatoblastom ab [66]. Sie weisen ein kontinuierliches, homogenes Wachstum auf und bleiben langfristig morphologisch stabil. Diese von einem menschlichen Tumor stammenden Zellen besitzen viele biosynthetische Fähigkeiten normaler Leberparenchymzellen [66]. HepG2-Zellen sezernieren eine Reihe von Serumproteinen, wie beispielsweise Albumin, α_1 -Antitrypsin, α_1 -Fetoprotein, Transferrin, Haptoglobin, Komplementfaktor C3, Plasminogen und auch das Hormon Erythropoetin [65, 66, 40].

Aus den Untersuchungen von *Gong et al.* [41] zur Auswirkung von Mycophenolat Mofetil auf die Hepatitis B Replikation geht hervor, daß HepG2-Zellen in der Lage sind, Mycophenolat Mofetil über eine Esterase in die aktive Form der Mycophenolsäure [5] umzuwandeln.

HepG2-Zellen produzieren verstärkt Erythropoetin in Reaktion auf Hypoxie oder auch nach Behandlung mit Kobaltionen [115]. *Goldberg et al.* [40] beschreiben, daß HepG2-Zellen sowohl unter hypoxischen Bedingungen, als auch nach Zugabe von 50 μM CoCl_2 neben einem deutlichen Anstieg der EPO-Sekretion

auch einen Anstieg der EPO-mRNA zeigen. Es besteht somit die Möglichkeit hypoxische Bedingungen zu imitieren, indem 50 μM CoCl_2 hinzugegeben werden. Kobaltionen verhindern intrazellulär die Formierung von Hydroxyradikalen ($\dot{\text{O}}\text{H}$) und anderen Sauerstoffradikalen (ROS) aus dem intrazellulärem Botenstoff H_2O_2 , wie von *Porwol et al.* an HepG2-Zellen untersucht wurden [92]. Eine Verknappung von Sauerstoffradikalen bewirkt, wie in Abbildung 6 dargestellt, eine intrazelluläre Zunahme an HIF-1 α und somit eine Aktivierung von HIF-1 [49]. Transkriptionsfaktoren aus der HIF-Familie bewirken eine vermehrte Expression der EPO-mRNA [69, 59, 110]. Deshalb gaben wir bei der Messung von HIF-1 α und EPO-mRNA CoCl_2 hinzu, um ein stärkeres Signal zu erhalten.

Für Konzentrations- und Zeitabhängigkeitsstudien kultivierten wir die HepG2-Zellen unter Standardbedingungen, bei 37 °C, 100 % Luftfeuchtigkeit und 5 Vol% CO_2 und 95 Vol% Luft. Aufgrund der gegebenen Diffusionsstrecken können leichte perizelluläre Hypoxien nicht ausgeschlossen werden. Genauere Untersuchungen durch mikroelektrodische Messungen [81, 121] zeigen, daß bedingt durch verlängerte Diffusionsstrecken oder große Zellzahlen deutliche perizelluläre Hypoxien auftreten können. Unter den von uns gewählten Bedingungen fanden sich mit dem EPO-ELISA sehr gut bestimmbare EPO-Basalspiegel im Zellüberstand.

4.1.3 Bestimmung und Eingrenzung der Effekte auf die Sekretion von Erythropoetin

Eine Beeinflussung der Erythropoetinsynthese ist in allen Abschnitten des Erythropoetinregelkeises innerhalb einer Zelle denkbar. Angefangen beim Messen des Sauerstoffpartialdruckes, über die Signaltransduktionskette vom Sauerstoffsensoren zum Zellkern, zur Regulation der Transkription und Translation, über die posttranslationale Modifikation des Proteins, bis hin zu der Sekretion des Proteins sind Angriffspunkte möglich. Aus diesem Grund wurde die Gesamtmenge an sezerniertem Erythropoetin im Zellüberstand untersucht, da somit alle denkbaren Effekte innerhalb einer Zelle in der Beobachtung erfaßt werden.

Im ersten Untersuchungsschritt bestimmten wir die Menge des sezernierten Erythropoetins, wie in Abschnitt 2.2 beschrieben, mittels eines „Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay“ (ELISA). Ein Erythropoetin-ELISA ist ein gut reproduzierbares Verfahren, welches sich für Proteine und Proteingemische eignet,

da die eingesetzten monoklonalen Antikörper spezifisch für EPO sind. In Vorversuchen konnten wir zeigen, daß frisches Nährmedium keine Kreuzreaktionen im Sinne falsch positiver Ergebnisse liefert. Durchschnittliche EPO-Spiegel lagen um 136 mU/mg Zellprotein pro 24 h, was in einem gut meßbarem Bereich liegt. *Schobersberger et al.* beschreiben durchschnittlich gemessene EPO-Spiegel im Zellkulturüberstand von 240–360 mU/mg Zellprotein pro 24 h [100], was etwas höher liegt als die von uns bestimmten Werte. Es bieten sich zwei Erklärungen für diesen Unterschied an: Zum einen könnte die stärkere EPO-Sekretion im Vergleich zu unseren Versuchen durch hypoxische Bedingungen aufgrund einer im Vergleich längeren Diffusionsstrecke begründet sein. *Schobersberger et al.* setzten bei sonst gleichen Bedingungen in ihren Versuchen 0,5 ml Kulturmedium pro cm² Kulturschale ein. Wir setzten umgerechnet 0,23 ml Kulturmedium pro cm² Kulturschale ein. Untersuchungen an HepG2-Zellen von *Metzen et al.* zeigen, daß mit zunehmender Schichtdicke des Nährmediums der Sauerstoffpartialdruck an den Zellen in Kultur sinkt [81]. Zum anderen könnte dieser Unterschied noch im Streubereich einer relativ alten Zelllinie liegen, da hier eine unterschiedlich starke EPO-Expression im Verlauf der Passagierung durch Überwachsen der Zellen mit hoher EPO-Sekretion durch solche mit geringerer denkbar ist.

Einen anderen Zusammenhang zum Maß der EPO-Sekretion stellen *Goldberg et al.* [40] her. *Goldberg et al.* beschreiben, daß die EPO-Sekretion bei HepG2-Zellen von der Anzahl der Zellen pro Fläche abhängt. Sie setzten dabei in ihren Versuchen 0,2 ml Kulturmedium pro cm² Kulturschale ein und beobachteten bei 10⁶ Zellen/cm² eine Sekretion von ungefähr 40 mU EPO pro 10⁶ Zellen. Diese Ergebnisse liegen im Bereich unserer Messungen. Die durchschnittliche Zelldichte lag in unseren Versuchsansätzen bei 5 · 10⁵ Zellen pro cm² Kulturschale, worunter wir EPO-Konzentrationen von 86 mIU/10⁶ Zellen beobachten. Verglichen wurde hierbei jeweils ein Zeitraum von 24 Stunden.

Zu Beginn wurde die EPO-Sekretion in Abhängigkeit der jeweiligen Immunsuppressivkonzentration untersucht. Als Ausgangspunkt der Inkubationsdauer wurden jeweils 48 Stunden gewählt, das bedeutet, daß den Zellen zu Beginn frisches Medium mit der entsprechenden Menge an Immunsuppressivum gegeben wurde, welches nach 24 Stunden erneuert und für weitere 24 Stunden belassen wurde. Die Kontrollen wurden jeweils analog behandelt, nur das zum Medium

keine Immunsuppressiva sondern alleinig das Lösungsmittel DMSO gegeben wurde. Diese Inkubationszeit von 48 Stunden hat sich bei Untersuchungen von Medikamentenwirkungen an HepG2 [75] und Versuchen bezüglich Hypoxie, EPO-mRNA oder EPO-Genexpression [118, 55, 104] als günstig erwiesen. Der Vorteil einer solchen langen Stimulationsdauer liegt darin, daß sich ein eventuell nur geringer Effekt über die Zeit summiert und somit im Vergleich zur Kontrolle deutlicher zum Ausdruck kommt. Die Untersuchungen wurden analog den in der Literatur beschriebenen Versuchsbedingungen, wie exemplarisch bei Versuchen der konzentrationsabhängigen Minderung der EPO-Sekretion durch Natriumnitroprussid [100], oder dem Einfluß von Zytostatika auf die EPO-Sekretion [122], durchgeführt.

Die biologische Halbwertszeit von EPO im Organismus liegt bei 1,5 bis 2,9 h [57]. Der Abbau von EPO in Zellkulturen ist bislang nicht genauer untersucht. Im klinischen Umgang wird Serum zur EPO-Bestimmung bis zu einer Woche bei 4–7 °C aufbewahrt. Hersteller von EPO-ELISA Kits beschreiben in der Anleitung zusätzlich die Möglichkeit der Aufbewahrung bei –20 °C für bis zu 6 Wochen. Eine Bestimmung der EPO-Konzentration im Zellüberstand nach 24stündiger Inkubationszeit sowie anschließende Lagerung bei –20 °C bis zur Bestimmung ist eine gebräuchliche Verfahrensweise [13]. Daß aufgrund eines spontanen Zerfalls oder Denaturierung des sezernierten EPO falsch niedrige Spiegel gemessen wurden, ist daher unwahrscheinlich. Zudem würde in unseren Untersuchungen bedingt durch den steten Bezug auf die jeweilige Kontrolle ein solcher Effekt das Ergebnis nicht verfälschen. Eine Wechselwirkung zwischen MMF und dem sezerniertem EPO ist schon deswegen ausgeschlossen, weil erst nach 48stündiger Stimulation mit MMF ein signifikanter Effekt zu beobachten war. Das Nährmedium wurde aber immer nach 24 h gewechselt und es wurde in den ersten 24 h kein Unterschied zwischen MMF-Gruppe und Kontrolle gefunden.

Um die verschiedenen Versuche vergleichen zu können, wurde auf standardisierte Bedingungen von Nährmedium, Zelldichte, Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Luftzusammensetzung geachtet. Die im Überstand gemessene EPO-Konzentration ist von drei Parametern abhängig:

1. Dem Volumen des Zellüberstandes.

2. Der Anzahl der Zellen.
3. Der Syntheseleistung der Zellen.

Das Volumen des Nährmediums, welches für Versuche in das jeweilige Well der 6-Well-Platten gegeben wurde, betrug stets 2 ml. Somit war eine optimale Versorgung der Zellen mit Nährstoffen, wie zum Beispiel Aminosäuren oder Glukose, gewährleistet. Ebenso wurden mögliche interferierende Effekte durch Stoffwechselprodukte vermieden. HepG2-Zellen sezernieren im sauren Milieu nur noch ein Bruchteil der Menge von Serumproteinen, wie Albumin und Transferrin, im Vergleich zu den gewählten Standardbedingungen [116]. Zum anderen war mit der exakten Gabe von 2 ml Nährmedium sichergestellt, daß die EPO-Konzentration im Zellüberstand stets aus dem gleichem Gesamtvolumen bestimmt wurde.

Die Anzahl der Zellen pro Well wurde nach Trypanblaufärbung von Hand ausgezählt, wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben. Da der Proteingehalt des Zellrasens direkt proportional zur Zellzahl ist, wurde dieser als weiterer Parameter bestimmt. Die Menge an Gesamtprotein von HepG2-Zellen zur Standardisierung des sezernierten Erythropoetins wurde analog zu den Versuchen von *Schobersberger et al.* [100] gewählt. Die Bestimmung des Gesamtproteingehalts erfolgte mittels eines nach *Lowry* entwickelten Assays, wie in Abschnitt 2.3.3 beschrieben. Als weitere unabhängige Methode zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Hexosaminidase Assay nach *Koponen*, wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben, gewählt. Hierbei wird als Maß für die Zellzahl das konstitutiv in Zellen vorkommende lysosomale Enzym Hexosaminidase bestimmt. Die Aktivität der Hexosaminidase ist in der Regel direkt proportional zur Zellzahl [67]. Da die drei genannten Methoden die gleichen Ergebnisse erzielten, beschränkten wir uns im Weiteren auf die am einfachsten durchzuführende Bestimmung des Gesamtproteingehaltes.

Als Ursache für unterschiedliche EPO-Konzentration im Zellüberstand können somit Variationen im Volumen des Zellüberstandes und unterschiedliche Zellzahlen ausgeschlossen werden. Die bestimmende Größe ist demnach allein die Sekretionsleistung der HepG2-Zellen. Eine genauere Unterscheidung der Beeinflussung von Sekretion oder Synthese ist durch alleinige Messung des bereits sezernierten Erythropoetins nicht möglich.

Zum Nachweis der Spezifität mußte ausgeschlossen werden, daß zytotoxische

Effekte für die Minderung der EPO-Sekretion verantwortlich sind. Eine mögliche zytotoxische Wirkung der Immunsuppressiva, die unspezifisch eine verminderte EPO-Sekretion bewirken könnte, wurde durch die Bestimmung der Laktat-Dehydrogenase (LDH) parallel zu EPO untersucht. Der LDH-Spiegel ist ein in der medizinischen Labordiagnostik häufig genutzter Parameter zum Nachweis von Zellnekrosen. In Untersuchungen von Zellkulturen ist die Bestimmung der LDH ein ebenfalls seit langem genutzter Parameter. Die LDH ist ein obligat im Zytoplasma vorkommendes Enzym, das bei Zerstörung der Zelle freigesetzt, und im Zellüberstand gemessen werden kann. In diesem Zusammenhang wurde schon 1976 dieser Parameter von *Goto et al.* in der Untersuchung der Toxizität von allgemeinen Anästhetika auf Leberzellkulturen genutzt [42]. Die erhobenen Daten der LDH-Bestimmung konnten mittels weiterer unabhängiger Methoden verifiziert werden. Direkte Zellzählung, die sowohl die Zellzahl als auch die Zellnekrosen nach Trypanblaufärbung bestimmt, ergab eine sehr geringe Rate an toten Zellen, welche sich statistisch nicht von der Kontrolle unterscheidet. Weiterhin ließ sich nachweisen, daß die direkte Zellzahl mit der Gesamtproteinmenge, gemessen mit der Proteinbestimmung nach *Lowry*, in allen Ansätzen korrelierte. Eine durch Immunsuppressiva induzierte zelluläre Hyper- oder Hypotrophie konnte so ausgeschlossen werden.

Zudem wurde die Möglichkeit bedacht, daß die Zellen unspezifisch in ihrer Syntheseleistung eingeschränkt sein könnten. Hierzu bestimmten wir ein in HepG2-Zellen konstitutiv gebildetes und kontinuierlich sezerniertes Protein [65, 66], stellvertretend für die gesamte Proteinsyntheseleistung. Um Kreuzreaktionen mit im Serumzusatz des Nährmediums vorhandenen Faktoren zu vermeiden, wählten wir nicht Albumin oder Komplementfaktoren, sondern das α_1 -Fetoprotein (AFP). AFP ist gut bestimmbar und im Nährmedium nicht vorhanden. Die Bestimmung von AFP erfolgte wie in Abschnitt 2.3.4 beschrieben. Wäre nun eine unspezifische Protein-Syntheseminderung eingetreten, so müsste dabei auch die AFP-Synthese und Sekretion gemindert sein. Im Umkehrschluß folgern wir eine spezifische Syntheseminderung, da die AFP-Sekretion unbeeinflusst blieb, aber Erythropoetin vermindert sezerniert wurde.

Nach Abschluß der Beobachtungen der EPO-Sekretion wurde der Versuch unternommen, den möglichen Angriffspunkt weiter einzugrenzen. Um zu differen-

zieren, ob der Angriffspunkt prä- oder posttranslational liegt, wurde die EPO-mRNA mittels Northern Blot bestimmt. Die beobachtete Größe der EPO-mRNA lag im erwarteten Bereich von 1340 Basen [56], wie aus der Laufsteckendifferenz zwischen den Banden der rRNA (18 S und 28 S) bestimmt werden konnte. Da außerdem die verwendete Sonde spezifisch für EPO-mRNA ist, gehen wir davon aus, daß das detektierte Signal von der EPO-mRNA stammt.

Findet sich eine Minderung der EPO-mRNA-Menge, unter der Zugabe des Immunsuppressivums, so wäre dies ein Hinweis auf einen möglichen prätranslationalen Angriffspunkt. Es sind jedoch auch zahlreiche Beispiele einer posttranslationalen Regulation der EPO-mRNA bekannt, wie auf der Ebene der mRNA-Stabilität [39, 21]. Da unter den gegebenen Versuchsbedingungen „steady state“ mRNA gemessen wurde, können keine Aussagen über die mRNA-Stabilität oder -Neusynthese getroffen werden.

Das EPO-Gen wird sauerstoffabhängig reguliert. Um einen vermuteten transkriptionalen Angriffspunkt weiter einzugrenzen, wurde das Binden des Hypoxie-Induzierbaren-Faktors-1 (HIF-1) an den EPO-Promotor untersucht. Der Transkriptionsfaktor (HIF-1) und dessen Untereinheit HIF-1 α sind inzwischen gut charakterisiert und ihre Aktivität ist ein wesentlicher Faktor der Hypoxie-induzierten EPO-Synthese (s. Abb. 6) [11, 103]. Wir bestimmten die Aktivität von HIF-1 mittels Elektro Mobility Shift DNA-Binding Assay (EMSA). Zum Beweis der Spezifität der Bindung von HIF mit den markierten Oligonukleotiden wurden die Komplexe mit 100fachem Überschuß des Wildtyp oder mutierten Oligonukleotiden, die nicht radioaktiv markiert waren, kompetitiert. Zum weiteren Nachweis, daß wirklich HIF und nicht ein anderer zufälliger Faktor an die Oligonukleotide gebunden hat, wurde ein sogenannter „Supershift“ durchgeführt. Hierbei wird zu den Komplexen aus HIF und markierten Oligonukleotiden ein HIF-spezifischer Antikörper gegeben, wodurch ein erneut schwererer Komplex entsteht, der sich durch seine geringere elektrophoretische Mobilität von den vorangegangenen unterscheidet.

4.2 Ergebnisse

Es wurde das Immunsuppressivum Mycophenolat Mofetil (MMF) und im Vergleich Cyclosporin A (CSA), Tacrolimus (FK506) und Azathioprin (AZA), welche klinisch im Zusammenhang mit Anämie auffällig gewesen sind, untersucht. Es sollte überprüft werden, ob als möglicher Pathomechanismus für das Auftreten einer Anämie eine verminderte EPO-Sekretion, welche am Zellkulturmodell der HepG2-Zellen *in vitro* untersucht wurde, verantwortlich ist.

Zunächst wurde die dosisabhängige Wirkung auf die EPO-Sekretion gemessen. Da Summationseffekte über große Zeiträume gemessen wurden, konnten wir bereits geringe Effekte registrieren.

Wie das später eingeführte FK506 gehört das Standardimmunsuppressivum CSA zur Gruppe der Calcineurin-Inhibitoren. Aus diesem Grund ist beiden Immunsuppressiva eine sehr ähnlichen Wirkungsweise gemeinsam, worin begründet sein könnte, daß in unseren *in vitro* Versuchen CSA und FK506 vergleichbare Ergebnisse lieferten. Beide Immunsuppressiva minderten die EPO-Sekretion von HepG2-Zellen nicht. Dieses steht auf den ersten Blick im Gegensatz zu früheren Untersuchungen von *Wolff et Jelkmann*, welche für Cyclosporin A eine Minderung der EPO-Sekretion bei HepG2-Zellen beobachtet haben [122]. Dieser scheinbare Unterschied klärt sich, wenn die eingesetzten Konzentrationen der jeweiligen Versuche verglichen werden. Die Konzentrationen, bei denen CSA die EPO-Sekretion mindert, lagen um den Faktor 10–1000 höher als bei unseren Versuchen. Bei zu uns vergleichbar eingesetzten Konzentrationen fanden die Autoren ebenfalls keine Inhibition der EPO-Sekretion. In unseren Versuchen wurden die Immunsuppressiva in therapeutischen Konzentrationen eingesetzt, welche für Cyclosporin A bei 100–400 ng/ml liegt [123]. Wir konnten bis 1500 ng/ml keine Minderung der EPO-Sekretion zeigen.

Die von *Wolff et Jelkmann* beschriebene Minderung der EPO-Sekretion bezieht sich auf Werte von 10–100 µg/ml, welches ebenfalls als der beginnende Bereich mit signifikanten zytotoxischen Effekten beschrieben ist. Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen fanden sich keine zytotoxischen Effekte oder Auffälligkeiten in der Gesamtproteinmenge in den von uns gewählten Konzentrationen. Zu den vorbeschriebenen Ergebnissen können wir hinzufügen, daß auch nach einer verlängerten Stimulationsdauer (von vorbeschrieben 24 h auf 48 h) kein signifi-

kanter Einfluß von CSA auf die EPO-Sekretion oder Zytotoxizität auffällt.

Da in unseren Versuchen Cyclosporin A und Tacrolimus gleiche Ergebnisse lieferten, ist es möglich, daß klinisch beobachtete Unterschiede hinsichtlich des roten Blutbildes nicht auf unterschiedlicher EPO-Sekretion als Grundmechanismus beruhen. *Dobrolet et al.* [26] beschrieb hämatologische Auffälligkeiten, insbesondere Anämien, unter Tacrolimus, welche sich in einigen Fällen unter Wechsel zu Cyclosporin A erholten. Zur Klärung sind jedoch entsprechende EPO-Messungen *in vivo* zu fordern. Eine mögliche Erklärung könnte eine milde Hämolyse unter immunsuppressiver Therapie mit Tacrolimus sein [94, 23, 16, 34].

Ein weiteres sehr lange bekanntes Immunsuppressivum ist Azathioprin, welches zu der Gruppe der Antimetabolite zählt. Durch seine purinsynthesehemmende Wirkung führt Azathioprin in der Zelle auch zu einer Guanosindepletion. Ähnlich wie AZA wirkt Mycophenolat Mofetil, welches jedoch über eine selektive Hemmung der Inosinmonophosphatdehydrogenase (IMPDH) zu einer gezielten Guanosindepletion in der Zelle führt. Wir konnten zeigen, daß im HepG2-Zellkulturmodell Mycophenolat Mofetil und Azathioprin in der Lage sind, die EPO-Sekretion zu erniedrigen. Es zeigten sich bereits sehr geringe Konzentrationen von 0,1 μM MMF und 500 ng/ml AZA als inhibierend wirksam. Dieser Effekt ist konzentrationsabhängig. Wir konnten zeigen, daß die maximal erzielbare Hemmung bei 54 % der Kontrolle unter 5 μM MMF und bei 23 % der Kontrolle bei 5000 ng/ml AZA liegt. Die durch uns erhobenen Daten bezüglich AZA stehen im Einklang mit denen von *Wolff et Jelkmann*, welche eine signifikante Minderung der EPO-Sekretion für HepG2-Zellen ab Konzentrationen von 1000 ng/ml beschreiben [122].

Azathioprin zeigte hierbei eine größere Potenz im Vergleich zu Mycophenolat Mofetil. Der Unterschied in der maximal hemmenden Wirkung von Mycophenolat Mofetil und Azathioprin mag daran liegen, daß die beiden Immunsuppressiva unterschiedlich in ihrer Potenz sind, die intrazelluläre Guanosinbildung zu hemmen. Neben dem Grad der Guanosindepletion wären auch weitere Angriffspunkte denkbar, worin sich die Substanzen unterscheiden und somit das unterschiedliche Ausmaß der Hemmung erklären.

Zytotoxische Effekte als ursächlichen Grund für die verminderte EPO-Sekretion konnten wir mit verschiedenen, unabhängigen Methoden ausschließen. So zeigten

sich weder in Bezug auf Vitabilität, Zellzahl, Gesamtproteinmenge, oder gemessener LDH im Zellüberstand in Ansätzen mit MMF oder AZA Unterschiede zur jeweiligen Kontrolle. Einen antiproliferativen Effekt, wie für MMF auf humane Mesangium-Zellen bereits ab Konzentrationen von 0,19 μM beschriebenen [44], konnten wir auf HepG2-Zellen auch unter 5 μM nicht beobachten. Für AZA sind antiproliferative Effekte, die dann auch mit einer signifikanten Minderung des Gesamtzellproteins einhergehen, erst ab Konzentrationen von 100 $\mu\text{g/ml}$ beschrieben worden [122]. Wir konnten bis zu unserer höchsten eingesetzten Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ AZA ebenfalls keine antiproliferativen Effekte beobachten.

Eine verminderte EPO-Sekretion könnte auf eine verminderte Proteinsynthese zurückzuführen sein. Als Parameter für die Proteinsynthese bestimmten wir als wenig reguliertes Protein das α_1 -Fetoprotein (AFP), welches von HepG2-Zellen unabhängig von der Stimulierung produziert wird [66, 65]. Die Sekretion von α_1 -Fetoprotein wurde unter AZA um 29,1% im Vergleich zur Kontrolle reduziert. MMF zeigte auch unter der höchsten eingesetzten Konzentration keinen Einfluß auf die Sekretion des α_1 -Fetoproteins. Azathioprin scheint somit im Gegensatz zu Mycophenolat Mofetil unspezifisch die Gesamtproteinsynthese zu beeinflussen. Da das α_1 -Fetoprotein unter AZA stark reguliert wurde, nicht aber unter MMF, vermuten wir einen spezifischen Effekt von MMF auf die EPO-Sekretion.

Zur weiteren Charakterisierung bestimmten wir die zeitabhängige Wirkung von MMF in der maximal hemmenden Konzentration. Wir konnten für MMF eine zeitabhängige Wirkung beschreiben. Ein signifikanter Effekt auf die EPO-Sekretion von HepG2-Zellen zeigte sich nach einer 48-stündigen Inkubationszeit. Nach 4, 12 oder 24 Stunden konnten wir noch keinen Einfluß von MMF auf die EPO-Sekretion bei HepG2-Zellen zeigen.

Die immunsuppressive Wirkung von MMF wird der Hemmung der IMPDH und der damit verbundenen Guanosindepletion zugesprochen. Wir versuchten daher, den inhibitorischen Effekt von MMF auf die EPO-Sekretion durch Zugabe von Guanosin zu antagonisieren. Als Vorbild dienten Versuche, in denen exogen zugeführtes Guanosin den durch MMF geminderte Thymidineinbau in Mesangiumzellen aufhob [44]. In unseren Versuchen zeigte sich, daß 100 μM Guanosin ausreichten, um den Effekt von 5 μM MMF vollständig aufzuheben. Guanosin selbst hat keinen Einfluß auf die EPO-Sekretion bei HepG2-Zellen. Eine Erhö-

hung der Guanosinkonzentration auf 300 μM führte zu keiner weiteren Steigerung der EPO-Sekretion unter gleichzeitiger Gabe von MMF. Es ist daher wahrscheinlich, daß der Wirkmechanismus, über den MMF zu einer Minderung der EPO-Sekretion bei HepG2-Zellen führt, guanosinabhängig ist.

Ein weiterer denkbarer Angriffspunkt von MMF könnte die posttranslationale Regulation der EPO-Glykolisierung sein. Die Zucker Fruktose und Mannose sind für Glykolisierung von Proteinen notwendig. Guanosintriphosphat (GTP) beeinflusst die Aktivierung der Nukleotidzucker, weshalb diese ohne gewisse Basalspiegel an GTP nicht stattfinden kann. Daß die Erschöpfung des lymphozytären GTP-Pools durch Mycophenolsäure eine Hemmung der Proteinglykosylierung zur Folge hat, ist bekannt [108, 73, 74]. Während eine geänderte oder gar fehlende Glykolisierung keine Veränderung in der Interaktion zwischen EPO und dessen Rezeptor bewirkt [114], könnte dies aber zu einer gestörten Ausschleusung des Proteins aus der Zelle führen, da der intrazelluläre Transport durch Glykosylierungen gesteuert wird [99, 45]. Ein Verlust der Glykosylierung des Erythropoetins würde sich zudem negativ auf die Stabilität des Moleküls auswirken [27]. Der Versuch, eine Veränderung der Glykolisierung des Erythropoetins zu zeigen, erfolgte mittels Western Blot. Die Stärke der Banden ist hierbei methodisch bedingt nur semiquantitativ. Wir haben hierbei neben dem gewonnenen EPO aus den mit und ohne MMF behandelten HepG2-Zellkulturen auch eine unterschiedlich glykosylierte Erythropoetinvariante aus CHO-Zellen aufgetragen. CHO-Zellen sind Ovarialzellen des chinesischen Hamsters, in welche das humane EPO-Gen eingebracht wurde und daher rekombinantes humanes Erythropoetin (rHu-EPO) bilden. Zwischen den Proben aus den mit und ohne MMF behandelten HepG2-Zellkulturen fand sich kein Unterschied im Molekulargewicht, wohl aber zu dem aus den CHO-Zellen gewonnenem rHu-EPO. Daraus schließen wir, daß MMF wahrscheinlich keinen Einfluß auf die Glykolisierung von EPO in HepG2-Zellen hat. Eine unterschiedliche Glykolisierung mit zufällig gleichem Molekulargewicht kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Zum anderen konnten wir mit der gewählten Methode sicher zeigen, daß die Glykolisierung von rHu-EPO aus CHO-Zellen anders ist als die des EPOs aus HepG2-Zellen.

Die Sekretion kann durch eine Steigerung der Syntheseleistung oder durch erhöhte Sekretion von präformierten EPO gesteuert sein. Wie durch *Lacombe*

et Mayeux bekannt wurde, wird EPO nicht in den Zellen gespeichert, sondern wird direkt nach vollendeter Herstellung sezerniert [69]. Da die Sekretion des EPO-Proteins im Vergleich zu AFP durch MMF selektiv gemindert wird, ist eine unspezifische Störung der Proteinsekretion durch MMF somit unwahrscheinlich.

Da eine Beeinflussung der Translation und Glykoproteinsekretion unwahrscheinlich sind, lag es nahe, die Wirkung von MMF auf die EPO-mRNA Spiegel zu betrachten. Hierbei haben wir „steady-state“ RNA untersucht. Dynamische Größen wie Einflüsse auf RNA-Degeneration, RNA-Abbau oder RNA-Stabilität [39] können daher nicht beurteilt werden und sind zusätzlich möglich. Wir konnten zeigen, daß schon die basale Gleichgewichtskonzentration der EPO-mRNA unter den gewählten normoxischen Bedingungen durch MMF gemindert wird. Noch deutlicher war der Effekt von MMF auf zusätzlich durch Kobaltionen induzierte EPO-mRNA im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten. Daß es zu leichten perizellulären hypoxischen Bedingungen kam und der beschriebene Effekt nicht ausschließlich die basale EPO-Expression betrifft, sondern bereits eine Hypoxie-induzierte, ist nicht auszuschließen.

Wir konnten beobachten, daß analog zur Abnahme der EPO-mRNA in der Zelle die Menge des sezernierten Erythropoetin im Überstand abnahm. Ähnliche Versuche, welche eine solche Korrelation von EPO-mRNA und sezerniertem EPO untersuchen, wurden von *Dittmer et al.* [25] sowie *Herkens et al.* [47] beschrieben.

Transkriptionsfaktoren, die bekannt dafür sind, die EPO-Synthese zu regulieren, sind NF- κ B [35], HIF-2 [119] und der Hypoxie-Induzierbare Faktor (HIF-1) [29, 11, 103]. Es sind weiterhin verschiedene Signaltransduktionswege bekannt, in denen PI3K/AKT oder MAP-Kinasen eine Rolle in der Steuerung der Aktivität der genannten Transkriptionsfaktoren spielen [35]. Ein gut charakterisierter Transkriptionsfaktor ist HIF-1. HIF-1 ist ein Heterodimer, bestehend aus HIF-1 α und HIF-1 β (ARNT), welche nicht nur unter Hypoxie, sondern auch basal exprimiert werden. HIF-1 α wird unter normoxischen Bedingungen kontinuierlich über das Ubiquitin-Proteasomen-System abgebaut. Wir haben im Rahmen dieser Arbeit die Wirkung von MMF auf HIF-1 genauer betrachtet mit der Frage, ob eine Regulation des Hypoxie-Induzierbaren Faktors HIF-1 durch Mycophenolat Mofetil ein Stellglied der EPO-Sekretion sein könnte. Wir konnten mittels EMSA zeigen, daß MMF die Aktivität von HIF-1 im Zellkern von HepG2-Zellen mindert. Da

HIF-1 regulierend auf die EPO-Transkription Einfluß nimmt, ist der beobachtete Effekt von MMF auf die EPO-Sekretion auf Transkriptionsebene über HIF-1 anzunehmen. Es sind verschiedene Angriffspunkte von MMF auf die HIF-Regulation denkbar, die Bildung und Abbau von HIF betreffen.

Figuroa et al. konnten zeigen, daß an der durch HIF-1 regulierten Erythropoetinexpression NF- κ B beteiligt ist [35]. NF- κ B ist für seine vielfältige Rolle in der Regulation der Immunantwort bekannt [12]. Der Effekt von MMF auf NF- κ B in HepG2-Zellen ist bislang nicht genauer untersucht. Eines der bekannten, durch NF- κ B regulierten Zytokine ist Tumor-Nekrosefaktor α (TNF- α). Untersuchungen mit den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 α , IL-1 β und TNF- α zeigten, daß diese eine dosisabhängige Inhibition der EPO-Sekretion und EPO-mRNA in HepG2-Zellen verursachen [60, 58]. Es stellt sich die Frage, ob MMF eventuell über eine Induktion einer TNF- α -Synthese zu einer Inhibition von EPO in HepG2-Zellen wirkt. *Frede et al.* konnte zeigen, daß nachweislich nicht konstitutionell exprimiertes TNF- α in HepG2-Zellen durch IL-1 β , Phorbol-12-myristat-13-acetat induziert werden kann [37]. Da IL-1 und TNF- α bei chronischer Entzündung und akuten Abstoßung eines Allotransplantats mit hypoplastischen Anämien, verminderten EPO-Spiegeln und vermehrter Produktion assoziiert sind [60], wäre hier eine mögliche Verbindung zu den klinischen Beobachtungen denkbar.

Erstaunlich hingegen ist, daß die Bindung von HIF-1 an das spezifische responsible DNA-Element unter IL-1 β und TNF- α Stimulation erhöht ist [46]. Da die inhibierende Wirkung von IL-1 β und TNF- α jedoch nur unter hypoxischen Bedingungen stattfindet, wird eine Wirkung über weitere Kofaktoren, wie HNF-4 (Hepatic Nuclear Factor-4), vermutet, die bei der Bindung von HIF-1 an die DNA unter Hypoxie benötigt werden [46]. Wir haben in unseren Untersuchungen unter normoxischen Bedingungen gearbeitet, weshalb der beobachtete Effekt von MMF wahrscheinlich über einen anderen Mechanismus funktioniert.

Vergleichbare Effekte zu denen von MMF konnten *Horiguchi et al.* zeigen. Hierbei wurde unter der Wirkung von Cadmium und Cisplatin bei Hep3B Zellen sowohl die EPO-Produktion, die EPO-mRNA-Expression als auch die DNA-Bindungsaktivität von HIF-1 supprimiert [50]. Es ist bekannt, daß HIF-1 neben Erythropoetin auch andere Proteine steuert, wie den Vasular Endothelial Growth Faktor (VEGF), welcher die Angiogenese aktiviert, den Glukose Transporter 1

(GLUT1), welcher den Glukosetransport steuert sowie die Lactatdehydrogenase (LDH-A), welche in der Glykolyse involviert ist. Zudem aktiviert HIF-1 die Transkription der induzierbaren Stickoxydsynthase (i-NOS), welche Angiogenese und Vasodilatation induziert [43, 103, 89]. Es wäre daher interessant zu wissen, wie sich diese anderen genannten Proteine unter der Gabe von MMF verhalten. Falls MMF diese wie EPO beeinflusst, würde das die These stützen, daß MMF in der Lage ist, über HIF die EPO-Transkription und letztlich die EPO-Sekretion in HepG2-Zellen zu modulieren.

Die Daten dieser Arbeit sprechen dafür, daß eine Anämie unter der Therapie mit Mycophenolat Mofetil im Zusammenhang mit erniedrigten EPO-Spiegeln steht. Dieses konnten wir am Zellkulturmodell der HepG2-Zelllinie, welches stellvertretend für die erythropoetinbildenden Zellen der Niere und Leber im menschlichen Organismus steht, zeigen. Im Gegensatz zu Azathioprin, bei dem wir nur einen unspezifischen Zusammenhang zwischen der sezernierten EPO-Menge und der Zugabe von AZA gezeigt haben, waren die Effekte von MMF spezifisch für die EPO-Synthese. Ferner ist für AZA bekannt, daß neben einer Anämie sowohl Leukopenien als auch Thrombopenien ausgelöst werden [20]. Erythropoetin ist jedoch ein spezifischer regulativer Faktor für die rote Zellreihe, so daß für AZA andere Angriffspunkte als für MMF wahrscheinlich sind. Für die anderen untersuchten Immunsuppressiva wie Cyclosporin A und Tacrolimus scheint eine Minderung der EPO-Spiegel unwahrscheinlich, da sich im verwendeten Zellkulturmodell keine Änderung der sezernierten EPO-Menge feststellen ließ. Aufgrund der Limitationen bei der Übertragbarkeit von Zellkulturmodellen auf den menschlichen Organismus müßten jedoch zur weiteren Untersuchung des Effekts des Immunsuppressivums MMF auf die renale und extrarenale Erythropoetin-Produktion *in vivo* Studien folgen. Wenn die unter Therapie mit Mycophenolat Mofetil auftretende Anämie bei genügend großen Patientenkollektiven mit einem Mangel an Erythropoetin korrelieren würde, wäre die Grundlage für eine kausale Substitutionstherapie mit Erythropoetin gegeben.

5 Zusammenfassung / Summary

5.1 Zusammenfassung

Das Hormon Erythropoetin (EPO) ist ein hitzestabiles Glykoprotein, welches als wesentlicher Wachstumsfaktor an der Erythropoese beteiligt ist. EPO wird sauerstoffabhängig in Leber und Niere synthetisiert. Da EPO in Zellen nicht gespeichert wird, ist seine Sekretionsrate durch die Syntheserate bestimmt. Unter Hypoxie wird über einen hypoxieinduzierbaren Faktor (HIF-1) die Transkription des EPO-Gens angeregt.

Mycophenolat Mofetil (MMF) wird erfolgreich bei transplantierten Patienten als Immunsuppressivum eingesetzt. MMF ist ein nichtkompetitiver, reversibler Hemmer der Inosinmonophosphatdehydrogenase (IMPDH), die essentiell für die *de novo* Purinsynthese in Lymphozyten ist. MMF soll selektiv antiproliferativ auf Lymphozyten wirken, ohne einen unspezifischen knochenmarkdepressiven Effekt zu haben. Trotzdem wurden bei bis zu 15 % der nierentransplantierten und nahezu der Hälfte aller herztransplantierten Patienten unter immunsuppressiver Therapie mit MMF Anämien beschrieben. Die Genese dieser Anämien ist noch unklar und könnte durch eine reduzierte EPO-Produktion unter MMF bedingt sein.

In dieser Untersuchung wird deshalb der Effekt von MMF auf die EPO-Freisetzung aus HepG2-Zellen *in vitro* analysiert. HepG2 und Hep3B Zellen sind ein etabliertes Zellkulturmodell zur Untersuchung der Regulierung hypoxieabhängiger EPO-Sekretion.

MMF vermindert zeit- und konzentrationsabhängig die mittels ELISA gemessenen EPO-Konzentration im Zellüberstand von HepG2-Zellen – im Mittel etwa auf die Hälfte des Ausgangswertes ($p < 0,001$). Dieser Effekt ist signifikant ab einer Konzentration von 0,1 μM MMF und maximal bei 5 μM MMF. Eine signifikante Inhibition der EPO-Sekretion war erst nach 48stündiger Inkubation mit MMF nachweisbar. Unspezifische Effekte auf Proliferation und Proteinsynthese sowie zytotoxische Effekte wurden mittels verschiedener unabhängiger Methoden weitgehend ausgeschlossen. Der Effekt von MMF auf die EPO-Sekretion konnte durch Zugabe von Guanodin aufgehoben werden, was für eine kausale Rolle der IMPDH in diesem Zusammenhang spricht. Analog zu der sezernierten EPO-Menge verminderte sich auch die Menge der gebildeten EPO-mRNA unter MMF.

Zudem ist die Aktivität von HIF-1 unter MMF gemindert.

Im Gegensatz zu MMF zeigen andere Immunsuppressiva wie der Purinsynthesehemmer Azathioprin und die Calcineurininhibitoren Cyclosporin A und Tacrolimus keinen spezifischen Effekt auf die EPO-Freisetzung von HepG2-Zellen.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Minderung der EPO-Sekretion im Zellkulturmodell ein Erklärungsansatz für die beobachteten Anämien unter MMF sein könnte. Eine Therapie der Anämie mittels EPO-Substitution erscheint daher sinnvoll.

5.2 Summary

The hormone erythropoietin (EPO) is a heat-stable glycoprotein which is the main growth factor for erythropoiesis. EPO is synthesized in the adult kidney and in the liver in an oxygen-dependent manner. After hormone synthesis EPO is not being stored, but rather directly secreted as an active metabolite. During hypoxia, the transcription of the EPO-gene is stimulated via the so-called „hypoxia-inducible factor“ (HIF-1). Mycophenolate mofetil (MMF) has been successfully used as an immunosuppressant after renal transplantation. MMF is a non-competitive, reversible inhibitor of inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH), the essential enzyme of the *de novo* purine synthesis in lymphocytes. MMF is an antiproliferative agent predominantly for lymphocytes without causing severe bone marrow suppression. Nevertheless, anemia has been observed in up to 15% of the renal transplant patients and approximately in half of the heart transplant recipients under therapy with MMF. The pathogenesis of this MMF-associated anemia is still under investigation and might be caused by a reduced production of EPO due to MMF.

In this study, the effect of MMF on the release of EPO from HepG2 cells is analyzed *in vitro*. The cell lines HepG2 and Hep3B are established models in regard to the regulation of hypoxia-dependent EPO-secretion. MMF reduces the concentration of EPO in the cell culture supernatant of HepG2 cells *in vitro* in a time- and dose-dependent manner. EPO measured by ELISA is reduced to almost half of the initial dose ($p < 0,001$). This effect is significant starting at a concentration of 0,1 μM MMF and reaches its maximum at 5 μM MMF. A significant inhibition of the EPO secretion was found only after an incubation

period of 48 hours with MMF. Non-specific or cytotoxic effects were excluded by various independent methods. The effect of MMF on the secretion of EPO in HepG2 cells was antagonized by guanosine. This indicates the central role of IMPDH within this context. Parallel to the secreted amount of EPO, the amount of EPO-mRNA in HepG2 cells under MMF is diminished. In addition, the activity of HIF-1 is reduced under incubation with MMF. On the other hand, other immunosuppressants like the purine synthesis-inhibitor azathioprine and the calcineurin inhibitors cyclosporine A and tacrolimus did not exhibit a specific effect on the secretion of EPO from HepG2 cells. The results indicate that the reduction of the secretion of EPO in cell culture might cause the anemia observed under MMF therapy. A substitution with EPO seems to be indicated in those forms of anemia.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Ackermann H. *Biometrie*. Epsilon Verlag, Hochheim-Darmstadt 1995.
- [2] Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 1979; **282**(5739): 615–6.
- [3] Agarwal SK, Mittal D, Tiwari SC, Dash SC, Saxena S, Saxena R, Mehta SN. Azathioprine-induced pure red blood cell aplasia in a renal transplant recipient. *Nephron* 1993; **63**(4): 471.
- [4] Allison AC, Eugui EM. The design and development of an immunosuppressive drug, mycophenolate mofetil. *Springer Semin Immunopathol* 1993; **14**(4): 353–80.
- [5] Allison AC, Eugui EM. Immunosuppressive and other effects of mycophenolic acid and an ester prodrug, mycophenolate mofetil. *Immunol Rev* 1993; **136**: 5–28.
- [6] Bardsley-Elliot A, Noble S, Foster RH. Mycophenolatmofetil: Anwendung bei der Transplantation solider Organe – Ein Überblick. *BioDrugs* 1999; **12**(5): 363–410.
- [7] Bertalanffy P, Dubsky P, Wolner E, Weigel G. Alterations of endothelial nucleotide levels by mycophenolic acid result in changes of membrane glycosylation and E-selectin expression. *Clin Chem Lab Med* 1999; **37**(3): 259–64.
- [8] Blaheta RA, Leckel K, Wittig B, et al. Mycophenolate mofetil (Cellcept Rm) potently inhibits lymphocyte emigration through allogenic endothelium: characterization of its mode of action [abstract]. 3rd International Conference on New Trends in Clinical and Experimental Immunosuppression; 1998 Feb 12–15; Geneva, Switzerland.
- [9] Blaheta RA, Leckel K, Wittig B, Zenker D, Oppermann E, Harder S, Scholz M, Weber S, Encke A, Markus BH. Mycophenolate mofetil impairs tran-

- sendothelial migration of allogeneic CD4 and CD8 T-cells. *Transplant Proc* 1999; **31**(1–2): 1250–2.
- [10] Boissel JP, Lee WR, Presnell SR, Cohen FE, Bunn HF. Erythropoietin structure-function relationships. Mutant proteins that test a model of tertiary structure. *J Biol Chem* 1993; **268**(12): 15983–93.
- [11] Bunn HF, Poyton RO. Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol Rev* 1996; **76**(3): 839–85.
- [12] Caamano J, Hunter CA. NF-kappaB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. *Clin Microbiol Rev* 2002; **15**(3): 414–29.
- [13] Canbolat O, Fandrey J, Jelkmann W. Effects of modulators of the production and degradation of hydrogen peroxide on erythropoietin synthesis. *Respir Physiol* 1998; **114**(2): 175–83.
- [14] Carr SF, Papp E, Wu JC, Natsumeda Y. Characterization of human type I and type II IMP dehydrogenases. *J Biol Chem* 1993; **268**(36): 27286–90.
- [15] Cecka JM. Outcome statistics of renal transplants with an emphasis on long-term survival. *Clin Transplant* 1994; **8**(3 Pt 2): 324–7.
- [16] Chand DH, Southerland SM, Cunningham RJr. Tacrolimus: the good, the bad, and the ugly. *Pediatr Transplant* 2001; **5**(1): 32–6.
- [17] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; **162**(1): 156–9.
- [18] Clark SC, Kamen R. The human hematopoietic colony-stimulating factors. *Science* 1987; **236**(4806): 1229–37.
- [19] Copley JB, Staffeld C, Lindberg J, Hansen A, Bailey C, Anand R, Van Veldhuisen P. Cyclosporine to tacrolimus: effect on hypertension and lipid profiles in renal allografts. *Transplant Proc* 1998; **30**(4): 1254–6.

- [20] Crawford DJ, Maddocks JL, Jones DN, Szawlowski P. Rational design of novel immunosuppressive drugs: analogues of azathioprine lacking the 6-mercaptopurine substituent retain or have enhanced immunosuppressive effects. *J Med Chem* 1996; **39**(14): 2690–5.
- [21] Czyzyk-Krzeska MF, Bendixen AC. Identification of the poly(C) binding protein in the complex associated with the 3' untranslated region of erythropoietin messenger RNA. *Blood* 1999; **93**(6): 2111–20.
- [22] Damjanov I, Linder J (Herausgeber). *Anderson's Pathology*, Band 1. Mosby-Year Book, Inc., St. Louis, Missouri, 10. Auflage 1996.
- [23] Debska-Slizien A, Chamienia A, Krol E, Zdrojewski Z, Pirski I, Zadrozny D, Sledzinski Z, Rutkowski B. Hemolytic anemia after renal transplantation: analysis of case reports. *Transplant Proc* 2003; **35**(6): 2233–7.
- [24] Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie. Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie (DGKC). *J Clin Chem Clin Biochem* 1972; **10**: 182–193.
- [25] Dittmer J, Bauer C. Inhibitory effect of zinc on stimulated erythropoietin synthesis in HepG2 cells. *Biochem J* 1992; **285**(Pt 1): 113–6.
- [26] Dobrolet NC, Webber SA, Blatt J, Michaels M, Kiaffas M, Kurland G, Boyle GJ. Hematologic abnormalities in children and young adults receiving tacrolimus-based immunosuppression following cardiothoracic transplantation. *Pediatr Transplant* 2001; **5**(2): 125–31.
- [27] Dordal MS, Wang FF, Goldwasser E. The role of carbohydrate in erythropoietin action. *Endocrinology* 1985; **116**(6): 2293–9.
- [28] Dumont FJ. FK506, an immunosuppressant targeting calcineurin function. *Curr Med Chem* 2000; **7**(7): 731–48.
- [29] Ebert BL, Bunn HF. Regulation of the erythropoietin gene. *Blood* 1999; **94**(6): 1864–77.

- [30] Epinette WW, Parker CM, Jones EL, Greist MC. Mycophenolic acid for psoriasis. a review of pharmacology, long-term efficacy, and safety. *J Am Acad Dermatol* 1987; **17**(6): 962–71.
- [31] European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group. Placebo-controlled study of mycophenolate mofetil combined with cyclosporin and corticosteroids for prevention of acute rejection. *Lancet* 1995; **345**(8961): 1321–5.
- [32] F. Hoffmann-La Roche. *Mycophenolate mofetil prescribing information*. F. Hoffmann-La Roche, Nutley (NJ), USA 1998.
- [33] Fariss MW. Cadmium toxicity: unique cytoprotective properties of alpha tocopheryl succinate in hepatocytes. *Toxicology* 1991; **69**(1): 63–77.
- [34] FAU Danesi R, Del Tacca M. Hematologic toxicity of immunosuppressive treatment. *Transplant Proc* 2004; **36**(3): 703–4.
- [35] Figueroa YG, Chan AK, Ibrahim R, Tang Y, Burow ME, Alam J, Scandurro A, Beckman BS. NF-kappaB plays a key role in hypoxia-inducible factor-1-regulated erythropoietin gene expression. *Exp Hematol* 2002; **30**(12): 1419–27.
- [36] Franklin TJ, Cook JM. The inhibition of nucleic acid synthesis by mycophenolic acid. *Biochem J* 1969; **113**(3): 515–24.
- [37] Frede S, Fandrey J, Jelkmann W. Interleukin 1 beta and phorbol ester induce tumour necrosis factor alpha production in a hepatic cell line (HepG2). *Pflugers Arch* 1996; **431**(6): 923–7.
- [38] Goldberg MA, Dunning SP, Bunn HF. Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science* 1988; **242**(4884): 1412–5.
- [39] Goldberg MA, Gaut CC, Bunn HF. Erythropoietin mRNA levels are governed by both the rate of gene transcription and posttranscriptional events. *Blood* 1991; **77**(2): 271–7.

- [40] Goldberg MA, Glass GA, Cunningham JM, Bunn HF. The regulated expression of erythropoietin by two human hepatoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; **84**(22): 7972–6.
- [41] Gong ZJ, De Meyer S, Clarysse C, Verslype C, Neyts J, De Clercq E, Yap SH. Mycophenolic acid, an immunosuppressive agent, inhibits HBV replication in vitro. *J Viral Hepat* 1999; **6**(3): 229–36.
- [42] Goto Y, Dujovne CA, Shoeman DW, Arakawa K. Liver cell culture toxicity of general anesthetics. *Toxicol Appl Pharmacol* 1976; **36**(1): 121–30.
- [43] Harris AL. Hypoxia – a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**(1): 38–47.
- [44] Hauser IA, Renders L, Radeke HH, Sterzel RB, Goppelt-Struebe M. Mycophenolate mofetil inhibits rat and human mesangial cell proliferation by guanosine depletion. *Nephrol Dial Transplant* 1999; **14**(1): 58–63.
- [45] Helenius A, Aebi M. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 2001; **291**(5512): 2364–9.
- [46] Hellwig-Burgel T, Rutkowski K, Metzen E, Fandrey J, Jelkmann W. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood* 1999; **94**(5): 1561–7.
- [47] Herkens C, Wolff M, Fandrey J, Schuler F, Jelkmann W. Immunocytochemical demonstration of erythropoietin in hypoxic human hepatoma cultures. *Histochemistry* 1993; **100**(4): 303–9.
- [48] Hildebrandt H (Herausgeber). *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*. de Gruyter, Berlin; New York, 257. Auflage 1994.
- [49] Ho VT, Bunn HF. Effects of transition metals on the expression of the erythropoietin gene: further evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **223**(1): 175–80.
- [50] Horiguchi H, Kayama F, Oguma E, Willmore WG, Hradecky P, Bunn HF. Cadmium and platinum suppression of erythropoietin production in cell culture: clinical implications. *Blood* 2000; **96**(12): 3743–7.

- [51] Horiguchi H, Mukaida N, Okamoto S, Teranishi H, Kasuya M, Matsushima K. Cadmium induces interleukin-8 production in human peripheral blood mononuclear cells with the concomitant generation of superoxide radicals. *Lymphokine Cytokine Res* 1993; **12**(6): 421–8.
- [52] Innes A, Pal CR, Dennis MJ, Ryan JJ, Morgan AG, Burden RP. Post-transplant erythrocytosis and immunosuppression with cyclosporin: a case-control study. *Nephrol Dial Transplant* 1991; **6**(8): 588–91.
- [53] Ishani A, Weinhandl E, Zhao Z, Gilbertson DT, Collins AJ, Yusuf S, Herzog CA. Angiotensin-converting enzyme inhibitor as a risk factor for the development of anemia, and the impact of incident anemia on mortality in patients with left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2005; **45**(3): 391–9.
- [54] Ishibashi T, Koziol JA, Burstein SA. Human recombinant erythropoietin promotes differentiation of murine megakaryocytes in vitro. *J Clin Invest* 1987; **79**(1): 286–9.
- [55] Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY, Semenza GL. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev* 1998; **12**(2): 149–62.
- [56] Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, Neill SD, Kaufman RJ, Mufson A, Seehra J, Jones SS, Hewick R, Fritsch EF, et al. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 1985; **313**(6005): 806–10.
- [57] Jelkmann W. Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev* 1992; **72**(2): 449–89.
- [58] Jelkmann W. Proinflammatory cytokines lowering erythropoietin production. *J Interferon Cytokine Res* 1998; **18**(8): 555–9.
- [59] Jelkmann W. Molecular biology of erythropoietin. *Intern Med* 2004; **43**(8): 649–59.

- [60] Jelkmann WE, Fandrey J, Frede S, Pagel H. Inhibition of erythropoietin production by cytokines. Implications for the anemia involved in inflammatory states. *Ann N Y Acad Sci* 1994; **718**: 300–9; discussion 309–11.
- [61] Jensik SC. Tacrolimus (FK 506) in kidney transplantation: three-year survival results of the US multicenter, randomized, comparative trial. FK 506 Kidney Transplant Study Group. *Transplant Proc* 1998; **30**(4): 1216–8.
- [62] Jiang H, Kobayashi M. Differences between cyclosporin A and tacrolimus in organ transplantation. *Transplant Proc* 1999; **32**(5): 1978–80.
- [63] Kallio PJ, Wilson WJ, O'Brien S, Makino Y, Poellinger L. Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 1999; **274**(10): 6519–25.
- [64] Kino T, Inamura N, Sakai F, Nakahara K, Goto T, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H, Ochiai T. Effect of FK-506 on human mixed lymphocyte reaction in vitro. *Transplant Proc* 1987; **19**(5 Suppl 6): 36–9.
- [65] Knowles BB, Aden DP. Human hepatoma derived cell line, process for preparation thereof, and uses thereof. U. S. Pat. 4,393,133; 1983 July 12.
- [66] Knowles BB, Howe CC, Aden DP. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 1980; **209**(4455): 497–9.
- [67] Koponen M, Grieder A, Loor F. The effects of cyclosporins on the cell cycle of t-lymphoid cell lines. *Exp Cell Res* 1982; **140**(2): 237–50.
- [68] Kurtz A, Jelkmann W, Sinowatz F, Bauer C. Renal mesangial cell cultures as a model for study of erythropoietin production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; **80**(13): 4008–11.
- [69] Lacombe C, Mayeux P. Biology of erythropoietin. *Haematologica* 1998; **83**(8): 724–32.
- [70] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**(259): 680–5.

- [71] Landegren U. Measurement of cell numbers by means of the endogenous enzyme hexosaminidase. Applications to detection of lymphokines and cell surface antigens. *J Immunol Methods* 1984; **67**(2): 379–88.
- [72] Laskow DA, Vincenti F, Neylan JF, Mendez R Matas AJ. An open-label, concentration-ranging trial of FK506 in primary kidney transplantation: a report of the United States Multicenter FK506 Kidney Transplant Group. *Transplantation* 1996; **62**(7): 900–5.
- [73] Laurent AF, Dumont S, Poindron P, et al. Inhibition of mannosylation on human monocyte surface glycoprotein could explain some of the anti-inflammatory effects of mycophenolate mofetil [abstract]. *Clin Exp Rheumatol* 1994; **12**(Suppl. 10): 110.
- [74] Laurent AF, Sibilia jand Dumont S, et al. Mycophenolate mofetil: an inhibitor of the glycosylation of cellular membrane protein [abstract]. *Revue du Rhumatisme English ed Joint Bone Spine Diseases* 1995; **62**(10): 685.
- [75] Li G, Segu VB, Rabaglia ME, Luo RH, Kowluru A, Metz SA. Prolonged depletion of guanosine triphosphate induces death of insulin-secreting cells by apoptosis. *Endocrinology* 1998; **139**(9): 3752–62.
- [76] Liu J. FK506 and cyclosporin, molecular probes for studying intracellular signal transduction. *Immunol Today* 1993; **14**(6): 290–5.
- [77] Liu J, Farmer JD, Lane WS, Friedman J Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 1991; **66**(4): 807–15.
- [78] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* 1951; **193**: 265–275.
- [79] Lynch WS, Roenigk HHJ. Mycophenolic acid for psoriasis. *Arch Dermatol* 1977; **113**(9): 1203–8.
- [80] Maddocks JL, Lennard L, Amess J, Amos R, Thomas RM. Azathioprine and severe bone marrow depression. *Lancet* 1986; **1**(8473): 156.

- [81] Metzen E, Wolff M, Fandrey J, Jelkmann W. Pericellular PO₂ and O₂ consumption in monolayer cell cultures. *Respir Physiol* 1995; **100**(2): 101–6.
- [82] Miura O, Nakamura N, Quelle FW, Witthuhn BA, Ihle JN, Aoki N. Erythropoietin induces association of the JAK2 protein tyrosine kinase with the erythropoietin receptor in vivo. *Blood* 1994; **84**(5): 1501–7.
- [83] Morales J, Buckel E, Fierro A, Zehnder C, Herzog C, Manalich J. A simple method to calculate cyclosporine dosage to obtain a target c₂ drug level. *Ther Drug Monit* 2003; **25**(3): 389–92.
- [84] Morozumi K, Sugito K, Oda A, Takeuchi O, Fukuda M, Usami T, Oikawa T, Fujinami T, Koyama K, Takeda A, Yoshida A, Haba T, Tominaga Y, Uchida K, Yokoyama I, Takagi H. A comparative study of morphological characteristics of renal injuries of tacrolimus (FK506) and cyclosporin (CyA) in renal allografts: are the morphologic characteristics of FK506 and CyA nephrotoxicity similar? *Transplant Proc* 1996; **28**(2): 1076–8.
- [85] Morris RE. Mechanisms of action of new immunosuppressive drugs. *Kidney Int Suppl* 1996; **53**: S26–38.
- [86] Mukhopadhyay CK, Mazumder B, Fox PL. Role of hypoxia-inducible factor-1 in transcriptional activation of ceruloplasmin by iron deficiency. *J Biol Chem* 2000; **275**(28): 21048–54.
- [87] Natsumeda Y, Carr SF. Human type I and II IMP dehydrogenases as drug targets. *Ann N Y Acad Sci* 1993; **696**: 88–93.
- [88] Okabe T, Urabe A, Kato T, Chiba S, Takaku F. Production of erythropoietin-like activity by human renal and hepatic carcinomas in cell culture. *Cancer* 1985; **55**(9): 1918–23.
- [89] Palmer LA, Semenza GL, Stoler MH, Johns RA. Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1. *Am J Physiol* 1998; **274**(2 Pt 1): L212–9.

- [90] Peter C, Latta K, Graf D, Offner G, Brodehl J. Does tacrolimus cause more severe anemia than cyclosporine A in children after renal transplantation? *Transpl Int* 1998; **11**(Suppl 1): S328–30.
- [91] Peterson GL. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal Biochem* 1979; **100**(2): 201–20.
- [92] Porwol T, Ehleben W, Zierold K, Fandrey J, Acker H. The influence of nickel and cobalt on putative members of the oxygen-sensing pathway of erythropoietin-producing HepG2 cells. *Eur J Biochem* 1998; **256**(1): 16–23.
- [93] Ratcliffe PJ, Ebert BL, Firth JD, Gleadle JM, Maxwell PH, Nagao M, O'Rourke JF, Pugh CW, Wood SM. Oxygen regulated gene expression: erythropoietin as a model system. *Kidney Int* 1997; **51**(2): 514–26.
- [94] Reid DW, Street A, Mansfield D, Chin W, Cole-Sinclair M, Williams TJ, Snell GI. Microangiopathic haemolytic anaemia and thrombocytopenia following lung volume reduction surgery in a single lung transplant recipient on maintenance tacrolimus (FK506) therapy. *Respirology* 2003; **8**(2): 243–5.
- [95] Reines D, Conaway JW, Conaway RC. The RNA polymerase II general elongation factors. *Trends Biochem Sci* 1996; **21**(9): 351–5.
- [96] Rossi SJ, Schroeder TJ, Hariharan S, First MR. Prevention and management of the adverse effects associated with immunosuppressive therapy. *Drug Saf* 1993; **9**(2): 104–31.
- [97] Salceda S, 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* 1997; **272**(36): 22642–7.
- [98] Sanfilippo F, Vaughn WK, Spees EK, Light JA, LeFor WM. Benefits of HLA-A and HLA-B matching on graft and patient outcome after cadaveric-donor renal transplantation. *N Engl J Med* 1984; **311**(6): 358–64.
- [99] Scheiffele P, Fullekrug J. Glycosylation and protein transport. *Essays Biochem* 2000; **36**: 27–35.

- [100] Schobersberger W, Hoffmann G, Fandrey J. Nitric oxide donors suppress erythropoietin production in vitro. *Pflugers Arch* 1996; **432**(6): 980–5.
- [101] Schreiber E, Matthias P, Muller MM, Schaffner W. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 1989; **17**(15): 6419.
- [102] Schreiber SL, Crabtree GR. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol Today* 1992; **13**(4): 136–42.
- [103] Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* 2000; **88**(4): 1474–80.
- [104] Semenza GL, Jiang BH, Leung SW, Passantino R, Concordet JP, Maire P, Giallongo A. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1996; **271**(51): 32529–37.
- [105] Semenza GL, 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* 1992; **12**(12): 5447–54.
- [106] Shaikh ZA, Vu TT, Zaman K. Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium-induced hepatotoxicity and renal toxicity and protection by antioxidants. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; **154**(3): 256–63.
- [107] Sherwood JB, Shouval D. Continuous production of erythropoietin by an established human renal carcinoma cell line: development of the cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; **83**(1): 165–9.
- [108] Sokoloski JA, Sartorelli AC. Effects of the inhibitors of IMP dehydrogenase, tiazofurin and mycophenolic acid, on glycoprotein metabolism. *Mol Pharmacol* 1985; **28**(6): 567–73.
- [109] Sollinger HW. Update on preclinical and clinical experience with mycophenolate mofetil. *Transplant Proc* 1996; **28**(6 Suppl 1): 24–9.

- [110] Sowter HM, Raval RR, Moore JW, Ratcliffe PJ, Harris AL. Predominant role of hypoxia-inducible transcription factor (Hif)-1 α versus Hif-2 α in regulation of the transcriptional response to hypoxia. *Cancer Res* 2003; **63**(19): 6130–4.
- [111] Stadtman ER, Oliver CN. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J Biol Chem* 1991; **266**(4): 2005–8.
- [112] Stohs SJ, Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* 1995; **18**(2): 321–36.
- [113] Takemoto S, Terasaki PI, Cecka JM, Cho YW, Gjertson DW. Survival of nationally shared, HLA-matched kidney transplants from cadaveric donors. the UNOS Scientific Renal Transplant Registry. *N Engl J Med* 1992; **327**(12): 834–9.
- [114] Tsuda E, Kawanishi G, Ueda M, Masuda S, Sasaki R. The role of carbohydrate in recombinant human erythropoietin. *Eur J Biochem* 1990; **188**(2): 405–11.
- [115] Ueno M, Seferynska I, Beckman B, Brookins J, Nakashima J, Fisher JW. Enhanced erythropoietin secretion in hepatoblastoma cells in response to hypoxia. *Am J Physiol* 1989; **257**(4 Pt 1): C743–9.
- [116] Ulrich C, Kruger B, Kohler H, Riegel W. Effects of acidosis on acute phase protein metabolism in liver cells. *Miner Electrolyte Metab* 1999; **25**(4–6): 228–33.
- [117] Walling C. Fenton's reagent revisited. *Acc Chem Res* 1975; **8**: 125–131.
- [118] Wenger RH, Kvietikova I, Rolfs A, Camenisch G, Gassmann M. Oxygen-regulated erythropoietin gene expression is dependent on a CpG methylation-free hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding site. *Eur J Biochem* 1998; **253**(3): 771–7.
- [119] Wiesener MS, Jurgensen JS, Rosenberger C, Scholze CK, Horstrup JH, Warnecke C, Mandriota S, Bechmann I, Frei UA, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Bachmann S, Maxwell PH, Eckardt KU. Widespread hypoxia-inducible

- expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs. *FASEB J* 2003; **17**(2): 271–3.
- [120] Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, Yi T, Tang B, Miura O, Ihle JN. JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell* 1993; **74**(2): 227–36.
- [121] Wolff M, Fandrey J, Jelkmann W. Microelectrode measurements of pericellular PO₂ in erythropoietin-producing human hepatoma cell cultures. *Am J Physiol* 1993; **265**(5 Pt 1): C1266–70.
- [122] Wolff M, Jelkmann W. Effects of chemotherapeutic and immunosuppressive drugs on the production of erythropoietin in human hepatoma cultures. *Ann Hematol* 1993; **66**(1): 27–31.
- [123] Wong SH. Therapeutic drug monitoring for immunosuppressants. *Clin Chim Acta* 2001; **313**(1–2): 241–53.

Danksagung

An erster Stelle danke ich Frau Prof. Dr. Ingeborg Hauser für die Vergabe des Themas, ihre äußerst engagierte Betreuung und für die Bereitschaft, jederzeit Fragen zu erörtern und mir mit freundlichem Rat zur Seite zu stehen.

Herrn Prof. Dr. Helmut Geiger danke ich dafür, daß mir die Möglichkeit gegeben wurde, mich mit diesem interessanten Thema auseinanderzusetzen.

Ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Stefan Gauer für die fundierten Hilfestellungen im Labor sowie die wiederholte kritische Durchsicht des Manuskripts und die vielen anregenden Gespräche und Treffen.

Für die Unterstützung beim Erlernen der Zellkulturtechniken sowie die nette Zusammenarbeit im Labor danke ich Isabel Laßotta und Sandra Helbig. Für die Unterstützung aus dem nephrologischen Routinelabor danke ich zudem Antje Faust und Frau Siegers.

Herzlich danken möchte ich Herrn Dr. Micha I. Wagner für die wiederholte Durchsicht der Manuskripte und seine freundschaftliche Unterstützung.

Herzlichen Dank auch an Herrn Dr. Marcel Nold für das Korrekturlesen und den freundschaftlichen Beistand.

Nicht zuletzt und in besonderer Weise danke ich meiner Mutter Christine Reuter, Prof. Dr. Klaus F. Arndt und meinem Bruder Philipp Reuter sowie meiner Frau Alicja Reuter für ihre stete, uneingeschränkte Unterstützung.

Lebenslauf von Rafael Marc Reuter

28.05.1973	in Bonn-Bad Godesberg geboren
1979–1983	Frankeschule, Frankfurt am Main
1983–1989	Goethe-Gymnasium, Frankfurt am Main
1989–1990	South Terrebone High School in Louisiana, USA
1990–1991	Goethe-Gymnasium, Frankfurt am Main
1991–1993	Wöhlerschule, Frankfurt am Main
1993–2000	Studium der Humanmedizin, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
1995	Ärztliche Vorprüfung
1995–1997	wissenschaftliche Hilfskraft im Zentrum für Morphologie der Universitätsklinik Frankfurt
1996	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1996–1999	Famulaturen in den Fachrichtungen Allgemeinmedizin, Anästhesie, Chirurgie und Gynäkologie
1999	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1999–2000	Praktisches Jahr am St. Markus-Krankenhaus Frankfurt (Anästhesie, Innere Medizin und Chirurgie)
2000	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2001–2002	Arzt im Praktikum im Mathilden Hospital zu Büdingen Fachrichtung Innere Medizin
2002–	Assistenzarzt im Mathilden Hospital zu Büdingen Fachrichtung Innere Medizin

Frankfurt am Main, den 6. Juni 2005

Schriftliche Erklärung

Ich erkläre, daß ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Modulation der Erythropoetinsynthese in HepG2-Zellen durch das Immunsuppressivum Mycophenolat Mofetil *in vitro*“

in dem Zentrum der Inneren Medizin des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main Abteilung für Nephrologie unter Betreuung und Anleitung von Frau PD Dr. I. Hauser ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Hauser I, Reuter R, Scheuermann EH, Siegers J, Geiger H. Erythropoietin (EPO) Produktion von HepG2 Zellen *in vitro*. 106. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin (DGIM) Wiesbaden. 29. April – 3. Mai 2000. P-123.

Gauer S, Reuter RM, Wegner B, Scheuermann EH, Geiger H, Hauser IA. Effects of the immunosuppressive drug mycophenolate mofetil on erythropoietin synthesis of HepG2 cells *in vitro*. *Manuskript in Vorbereitung*.

Frankfurt am Main, den 6. Juni 2005