

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

betreut am
Zentrum der Inneren Medizin
Medizinische Klinik III (Kardiologie, Angiologie, Hämostaseologie)
Funktionsbereich Nephrologie
Direktor: Prof. Dr. Helmut Geiger

**Regulationsmechanismen der verminderten Erythropoetin Synthese unter
dem Immunsuppressivum Mycophenolat Mofetil in HepG2 Zellen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Anna-Nadine Preis

aus Düsseldorf

Frankfurt am Main, 2016

Dekan:	Prof. Dr. Josef M. Pfeilschifter
Referent:	Prof. Dr. Ingeborg Hauser
Korreferent:	Prof. Dr. Heiko Mühl
Tag der mündlichen Prüfung:	20.12.2017

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VII
Verzeichnis der Abkürzungen.....	VIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Einführung.....	1
1.2 Transplantation, Transplantatüberleben und Posttransplantationsanämie	2
1.3 Immunsuppression.....	4
1.3.1 Mycophenolat Mofetil.....	5
1.3.2 Weitere Immunsuppressiva.....	8
1.4 Erythropoese und Erythropoetin.....	9
1.4.1 Sauerstoffabhängige Erythropoetinbildung mit Hilfe des Hypoxie-	
induzierten Faktors (HIF-1).....	11
1.5 Zielsetzung.....	15
2 Material und Methoden.....	17
2.1 Material.....	17
2.1.1 Zellkultur Medien, Medienzusätze und Reagenzien.....	17
2.1.2 Chemikalien.....	17
2.1.3 Antikörper.....	18
2.1.4 Primer.....	18
2.1.5 TaqMan Sonden.....	19
2.1.6 Enzyme.....	19
2.1.7 Kits und sonstige Materialien.....	19
2.1.8 Geräte.....	20
2.2 Methoden.....	21
2.2.1 Zellkultur.....	21
2.2.1.1 Kultivierung der HepG2 Zellen.....	21
2.2.2 Erythropoetin ELISA.....	21
2.2.3 Western Blot.....	22
2.2.3.1 Proteingewinnung.....	22

2.2.3.2	Proteinbestimmung nach Lowry.....	23
2.2.3.3	Western Blot.....	23
2.2.4	RNA Isolation.....	25
2.2.4.1	Northern Blot	26
2.2.5	In-vitro-Degradationsversuche.....	28
2.2.5.1	Herstellung von Zelllysaten.....	28
2.2.6	Real-time PCR.....	29
2.2.6.1	Reverse Transkriptase Reaktion.....	29
2.2.6.2	Real-time PCR mit Taqman – Sonden.....	30
2.2.6.3	Real-time PCR mit SYBR-Green.....	31
2.3	Aufbau der Versuche.....	32
2.3.1	Stimulation mit MMF	32
2.3.2	Stabilitätsversuche.....	32
2.3.3	In-vitro-Degradationsversuch.....	33
2.4	Statistik.....	34
3	Ergebnisse.....	35
3.1	Erythropoetinsekretion.....	35
3.1.1	Einfluss von MMF auf die EPO Produktion.....	35
3.2	Expression der Erythropoetin mRNA.....	36
3.2.1	Einfluss von Mycophenolat Mofetil auf die Erythropoetin mRNA Expression.....	37
3.2.2	Zeitabhängiger Einfluss von Mycophenolat Mofetil auf die Erythropoetin Expression.....	37
3.3	Guanosinabhängigkeit des MMF-Effektes.....	39
3.4	Spezifität des MMF-Effektes auf die EPO-mRNA.....	40
3.4.1	Einfluss von MMF auf die Alpha1 Fetoprotein mRNA Expression. .	40
3.5	Proteinstabilität als Regulationsmechanismus.....	40
3.5.1	Proteinstabilität von EPO unter MMF.....	41
3.6	Stabilität der EPO-mRNA als Regulationsmechanismus	42
3.6.1	Untersuchung der EPO-mRNA Stabilität mittels Actinomycin-D.....	42
3.6.2	Bestimmung der Stabilität der EPO-mRNA mittels In-vitro-Degradation.....	44

3.6.3 Stabilität der α 1-Fetoprotein mRNA im In-vitro-Degradationsassay	45
3.7 Effekt von MMF auf die Proteinexpression des Hypoxie-induzierbaren Faktor 1.....	46
3.7.1 Effekt von MMF auf die HIF-1- α mRNA.....	48
4 Diskussion.....	49
4.1 Versuchsbedingungen.....	49
4.1.1 Mycophenolat Mofetil.....	49
4.1.2 HepG2 Zellen.....	50
4.1.3 Methoden.....	54
4.2 Ergebnisse.....	55
5 Zusammenfassung/Summary.....	66
Literaturverzeichnis.....	70
Schriftliche Erklärung.....	88

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Angriffspunkte einzelner Immunsuppressiva auf den Zellzyklus der Lymphozyten [87].....	4
Abbildung 2: Chemische Struktur von Mycophenolsäure und Mycophenolat Mofetil [116].....	6
Abbildung 3: IMPDH als zentraler Schritt der de novo Purinsynthese und Angriffspunkt der Mycophenolsäure (nach [6]).....	7
Abbildung 4: Die Schritte der Erythropoese (nach [29]).....	10
Abbildung 5: Vergleich von einem freien und einem Ligand-gebundenen EPO-Rezeptordimer [62].....	11
Abbildung 6: Regulation des Transkriptionsfaktors HIF-1 und die Erythropoetin Gen Expression.....	13
Abbildung 7: Synergismus zwischen Promotor und Enhancer (nach [12]).....	14
Abbildung 8: Schritte der Real-time PCR mit Taqman-Sonden.....	30
Abbildung 9: Versuchsaufbau der In-vitro-Degradation.....	34
Abbildung 10: Effekt von MMF auf die EPO Produktion	36
Abbildung 11: Effekt von MMF auf die Expression von EPO – mRNA	37
Abbildung 12: Zeitabhängigkeit des EPO-Abfalls unter der Behandlung mit MMF	38
Abbildung 13: Aufhebung des inhibitorischen Effekts von MMF auf die EPO mRNA Synthese durch Guanosin (GUA).....	39
Abbildung 14: Stabilität des EPO Proteins im Zellkulturüberstand unter MMF..	41
Abbildung 15: Stabilität von EPO mRNA unter MMF	43
Abbildung 16: Stabilität der EPO mRNA unter MMF: RNA/Lysat 1:2.....	44
Abbildung 17: Stabilität der EPO mRNA unter MMF: RNA/Lysat 50:1.....	45
Abbildung 18: Stabilität der α 1-Feto-Protein mRNA unter MMF: RNA/Lysat 50:1	46
Abbildung 19: Effekt von MMF auf die Produktion des HIF-1 α	47
Abbildung 20: Effekt von MMF auf die mRNA des HIF-1 α	48

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zyklus der Real-time PCR mit Taqman-Sonden.....	31
Tabelle 2: Zyklus der Real-time PCR mit SYBR-Green.....	31
Tabelle 3: Übersicht zum Versuchsaufbau.....	33
Tabelle 4: Übersicht zum Versuchsaufbau.....	35

Verzeichnis der Abkürzungen

AFP	α_1 -Fetoprotein
ARNT	aryl-hydrocarbon nuclear translocator (HIF1 β)
AZA	Azathioprin
BFU-E	bursting-forming unit erythroid
BSA	Bovines Serumalbumin
CFU-E	colony-forming unit erythroid
CNI	Calcineurin-Inhibitoren
CsA	Cyclosporin A
C-TAD	C-terminale-Transaktivierungs-Domäne
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat
EGTA	Ethylen-Glycol-bis[β -Aminoethylether]N,N, N',N'-Tetraessigsäure
ELISA	Enzym-linked-immunosorbent-Assay
EPO	Erythropoetin
ERBP	Erythropoietin mRNA-binding protein
FIH-1	Asparaginhydroxylase = inhibitorischer HIF-1 Faktor
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
HAF	hypoxia-associated factor
HEPES	2[4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin]-Ethansulfonsäure
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HRE	Hypoxie-responsible Element
IMPDH	Inosinmonophosphatdehydrogenase
JAK2	Januskinase 2
MAPK	mitogen-activated kinase
MMF	Mycophenolat Mofetil

Verzeichnis der Abkürzungen

MOPS	3-Morpholinopropansulfat
MPA	Mycophenolsäure
mTOR	mammalian target of Rapamycin
N.S.	nicht signifikant
ODDD	oxygen-dependent proteolytic degradation domain
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PDH	Prolindehydrogenase
PMSF	Phenylmethyloxysulfonylfluorid
pVHL	Von-Hippel-Lindau-Protein
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Zitrat-gepufferte Salzlösung (Saline Sodium Citrate)
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TH	Thyrosinhydroxylase
TNF α	Tumornekrosefaktor Alpha
UTR	Untranslated region
VEGF	vasculare endothelial growth factor

1 Einleitung

1.1 Einführung

Auch heute noch enden viele chronische Nierenerkrankungen in einer terminalen Niereninsuffizienz, welche die Patienten früher ein Leben lang an eine Hämodialyse gebunden hätte. Heutzutage ist die Therapie der Wahl bei terminaler Niereninsuffizienz eine Nierentransplantation. Diese Behandlungsstrategie ermöglicht den Patienten eine wesentliche Verbesserung der Lebensqualität [86, 105] und hat zudem noch eine sehr gute Langzeitprognose mit einer verlängerten Überlebenszeit aller Patientengruppen, trotz des kurzzeitig erhöhten Risikos nach der Transplantation [130]. Somit wird die Nierentransplantation heutzutage erfolgreich als ein Routineeingriff in Deutschland und vielen anderen Ländern eingesetzt.

Was die Prognose nach Nierentransplantation erheblich verschlechtert, sind akute und chronische Abstoßungsreaktionen des eigenen Körpers gegen das Transplantat (Host versus Graft-Reaktion). Jeder Patient muss deshalb postoperativ ein Leben lang mit Immunsuppressiva behandelt werden. Hierbei kommen Calcineurin-Inhibitoren wie Cyclosporin A (CSA) und Tacrolimus und Purinsynthesehemmer wie Mycophenolat Mofetil (MMF) und Azathioprin (AZA) zum Einsatz. Man muss mit verschiedenen teilweise medikamentenspezifischen Nebenwirkungen rechnen, weswegen häufig die Immunsuppression limitiert ist und somit auch die Transplantatüberlebenszeit verkürzt wird. In klinischen Studien sind bei Patienten, deren Therapieregime MMF beinhaltet hat, vermehrt Anämien beobachtet worden [1, 119]. Es ergaben sich auch Hinweise, dass bei dem Vergleich von verschiedenen immunsuppressiven Kombinationstherapien vor allem bei Patienten, die unter anderem mit MMF behandelt wurden, eine vermehrte Inzidenz von Anämien beobachtet werden konnte [125]. Ähnliche Häufungen von Anämien sind im Vergleich zu einer Placebogruppe gezeigt worden [3]. Warum es unter MMF zur

Entwicklung einer Anämie kommt ist bis heute unbekannt. Es ist von großer Bedeutung die Ursache dieser MMF-induzierten Anämie zu finden, da gezeigt wurde, dass mit MMF behandelte Patienten mit Anämien, aufgrund einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität ein deutlich schlechteres Langzeitüberleben und Transplantatüberleben haben [46]. In unserem Labor konnte in vitro gezeigt werden, dass HepG2 Zellen unter der Wirkung von MMF weniger Erythropoetin (EPO) bilden. EPO stellt den wichtigsten Aktivator der Erythropoese dar und ein EPO-Mangel kann dadurch in vivo Anämien hervorrufen. Ziel dieser Arbeit war es, den MMF Effekt auf RNA Ebene darzustellen und den Wirkmechanismus, der unter MMF für die verminderte Synthese von EPO verantwortlich ist, zu untersuchen.

1.2 Transplantation, Transplantatüberleben und Posttransplantationsanämie

Die erste erfolgreiche Nierentransplantation fand im Jahr 1954 in Boston von J.P. Merrill, J.E. Murray und J.H. Harrison an eineiigen Zwillingen statt [40]. Mit Einführung der Immunsuppression wurden bald Nierentransplantationen immer häufiger durchgeführt und sind heute ein Routineeingriff.

Da die Warteliste bei Eurotransplant für eine Nierentransplantation heute immer länger wird und die Zahl der jährlichen Neuanmeldungen die Zahl der Transplantationen übersteigt [72], ist es umso wichtiger die Organe sinnvoll zu verteilen, um ein möglichst langes Transplantatüberleben zu erzielen. Die größte Gefahr für einen frühzeitigen Verlust der transplantierten Niere ist die körpereigene Abstoßung. Eine herausragende Rolle spielt hier vor allem die HLA-Kompatibilität bezüglich HLA-A, HLA-B und HLA-DR [89, 90, 121] und die ABO Kompatibilität [117]. Eine Aktivierung des Immunsystems führt in der Regel zu Abstoßungen. T-Zellen und u.U. Antikörper des Empfängers erkennen inkompatible HLA-Oberflächenantigene des Transplantates und zerstören es schlimmstenfalls. Durch die Kombination aus HLA-kompatible Transplantaten zum Empfänger und einer lebenslangen Immunsuppression kann die akute und

1 Einleitung

chronische Abstoßungsreaktion häufig in ihrer Intensität vermindert oder sogar verhindert werden. Hier scheint vor allem MMF eine bedeutende Rolle zu spielen. In 3 randomisierten Multizenterstudien wurde gezeigt, dass eine immunsuppressive Behandlung mit MMF im Vergleich zu Azathioprin und Placebo, die Inzidenz der akuten Abstoßungsreaktion reduziert [1, 3, 39, 119]. Im Gegensatz zu Azathioprin und Placebo zeigt MMF eine Verbesserung des langfristigen Transplantatüberlebens [2, 58].

Aber der Transplantatverlust ist nicht nur durch Abstoßungsreaktionen hervorgerufen. Nicht zu unterschätzen ist der große Anteil der Patienten, die trotz funktionierendem Transplantat versterben. Das Alter des Empfängers, Niereninsuffizienz durch Diabetes mellitus und das kardiovaskuläre Risiko spielt hier eine bedeutende Rolle [88], wobei letzteres bei nierentransplantierten Patienten stark erhöht ist [57]. Ein weiterer bekannter Risikofaktor für kardiovaskuläre Komplikationen ist das Bestehen einer chronischen Anämie. In der Normalbevölkerung ist eine chronische Anämie ein bekannter Risikofaktor für kardiale Dysregulation, welches wiederum eine bekannte Gefahr für die kardiovaskuläre Mortalität ist [21]. Es ist anzunehmen, dass eine ähnliche Assoziation in der Population der Nierentransplantierten vorliegt [7]. Anämien treten nach Transplantation in 20 bis 57% der Fälle auf, abhängig von den Kriterien, die für die Definition einer Anämie gewählt wurden [81, 125, 132]. Nierentransplantierte Patienten haben an sich schon ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko im Gegensatz zur Normalbevölkerung. Durch die häufig auftretenden Posttransplantationsanämien wird dieses Risiko zusätzlich erhöht. Außerdem sind die Patienten durch eine lebenslange Immunsuppression und deren Nebenwirkungen, wie zum Beispiel die MMF induzierten Anämien, stark beeinträchtigt. In einer aktuellen Studie wird gezeigt, dass unter der Behandlung mit MMF die späte Posttransplantationsanämie (12 Monate nach Transplantation) das kardiovaskuläre Risiko noch zusätzlich erhöht [46].

Hier wird deutlich, dass es wichtig ist, den Mechanismus zu erforschen, welcher für die MMF induzierte Anämie verantwortlich ist, um in Zukunft

Behandlungsansätze zu ermöglichen und damit die Anämie und die damit verbundene erhöhte kardiovaskuläre Mortalität zu reduzieren.

1.3 Immunsuppression

Durch neue Erkenntnisse über die immunologischen Prozesse bei Transplantatabstoßung erkannte man wie wichtig eine effektive immunsuppressive Therapie nach einer Transplantation ist, um das neue Organ vor dem körpereigenen Immunsystem zu schützen. Zu den anfangs wichtigen Immunsuppressiva gehörten die Glukokortikoide, der Calcineurin-Inhibitor Cyclosporin A und die Antimetabolite (Azathioprin und Mycophenolat Mofetil). In den letzten Jahren wurden dann zusätzliche Medikamente wie der Calcineurin-Inhibitor Tacrolimus, der mTOR-Inhibitor Sirolimus und monoklonale Antikörper gegen verschiedene Epitope von Lymphozyten (ATG, Daclizumab und Basiliximab) auf den Markt gebracht [115]. Die Immunsuppressiva unterscheiden sich in ihren Angriffspunkten und ihrem Wirkmechanismus und können so in verschiedene Gruppen eingeteilt werden (siehe Abbildung 1). Dank dieser Medikamente konnte die Rate akuter Abstoßungsreaktionen in der Initialphase nach Nierentransplantation von ungefähr 50% auf etwa 10-20% reduziert werden [77].

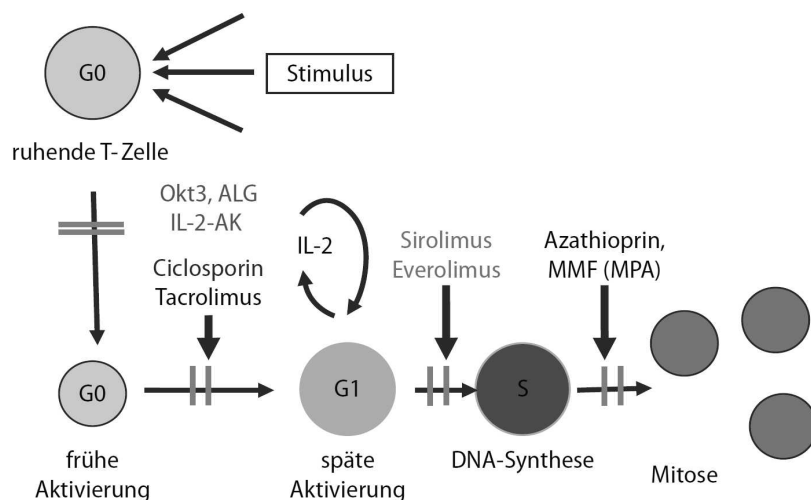


Abbildung 1: Angriffspunkte einzelner Immunsuppressiva auf den Zellzyklus der Lymphozyten [87]

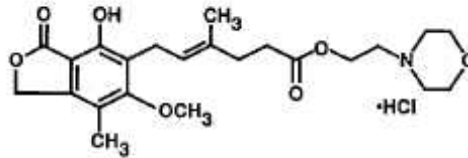
Das Therapieschema nach Nierentransplantation besteht meist aus einer Induktions- und einer Erhaltungstherapie. Die Induktionstherapie soll vor allem die akute Abstoßungsreaktion unterdrücken und betrifft die ersten 3 Monate nach Transplantation. Dabei werden vor allem hochdosierte Glukokortikoide, ein Calcineurin-Inhibitor (CsA oder Tacrolimus) und ein Antimetabolit (Azathioprin oder MMF) in einer Dreierkombination verwendet. Zusätzlich werden heutzutage je nach immunologischem Risiko monoklonale Antikörper hinzugefügt, so dass die nephrotoxischen Calcineurin-Inhibitoren eingespart werden können [77].

Zur Erhaltungstherapie wurden 2004 93% der Patienten mit Calcineurin-Inhibitoren behandelt. Bei Entlassung bekamen 72% Tacrolimus und nur 21% Cyclosporin A zur Basistherapie in den USA. Das häufigste Entlassungsregime ist die Kombination Tacrolimus/MMF, gefolgt von Cyclosporin A/MMF [77]. In einer aktuellen Metaanalyse von randomisierten Versuchen wurde das Einsparen von Calcineurin-Inhibitoren mit Hilfe von Einsatz von MMF bewertet [82]. Es zeigte sich eine Verbesserung der glomerulären Filtrationsrate und des Transplantatüberlebens. Vermehrte akute Abstoßungsreaktionen wurden nur bei totalem Calcineurin-Inhibitor (CNI) - Entzug, nicht aber bei Minimierung der CNI Dosierung beobachtet. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass in Zukunft die Reduktion von nephrotoxischem CNI durch vermehrten Einsatz von MMF nach Nierentransplantation möglich ist [37, 82].

1.3.1 Mycophenolat Mofetil

Mycophenolat Mofetil ist das synthetische Prodrug (siehe Abbildung 2), welches in vivo in die Mycophenolsäure (MPA) umgewandelt wird. *Alsberg & Black* gaben 1913 der Mycophenolsäure ihren Namen und isolierten es das erste Mal aus *Penicillium stoloniferum* [9]. *Birkinshaw et. al.* gelang es 1951 die Struktur von Mycophenolsäure erstmals darzustellen [9] (siehe Abbildung 2). In den vierziger Jahren war Mycophenolsäure für seine hemmende Wirkung auf Bakterien und Pilze bekannt. Im weiteren Verlauf wurde in den sechziger Jahren eine tumorhemmende Funktion der Mycophenolsäure bekannt.

Mycophenolate mofetil



Mycophenolic acid

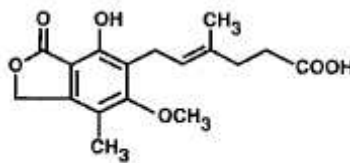


Abbildung 2: Chemische Struktur von Mycophenolsäure und Mycophenolat Mofetil [116]

1969 beschrieb *T. Franklin* den molekularen Angriffspunkt der Mycophenolsäure, welcher über eine Hemmung der IMP-Dehydrogenase (IMPDH) wirkt, welche eine Depletion des GTP Pools bewirkt [31, 97, 116], da sie die Umwandlung von Inosin-Monophosphat in Guanosin-Monophosphat katalysiert. Sobald der GTP Vorrat aufgebraucht ist, kommt die DNA Synthese zum Erliegen und es zeigt sich ein antiproliferativer Effekt [42]. Diese nichtkompetitive, reversible Hemmung der IMPDH spielt nur in den Lymphozyten eine große Bedeutung, da diese auf die de novo Purinsynthese angewiesen sind. Der antiproliferative Effekt von MMF bezieht sich also größtenteils auf die Lymphozyten und hat keinen hemmenden Einfluss auf andere schnell proliferierende Zellen, da diese den Wiederverwertungsstoffwechsel der Purine nutzen können [6] (siehe Abbildung 3).

Es gibt noch einen weiteren Wirkungsmechanismus des MMFs, weswegen es selektiv auf Lymphozyten und speziell auf proliferierende Lymphozyten antiproliferativ wirkt. Dieser beruht darauf, dass es zwei verschiedenen Isoformen der IMPDH gibt. Die IMPDH II tritt vor allem in proliferierenden

Stoffwechselwege der Purinbiosynthese

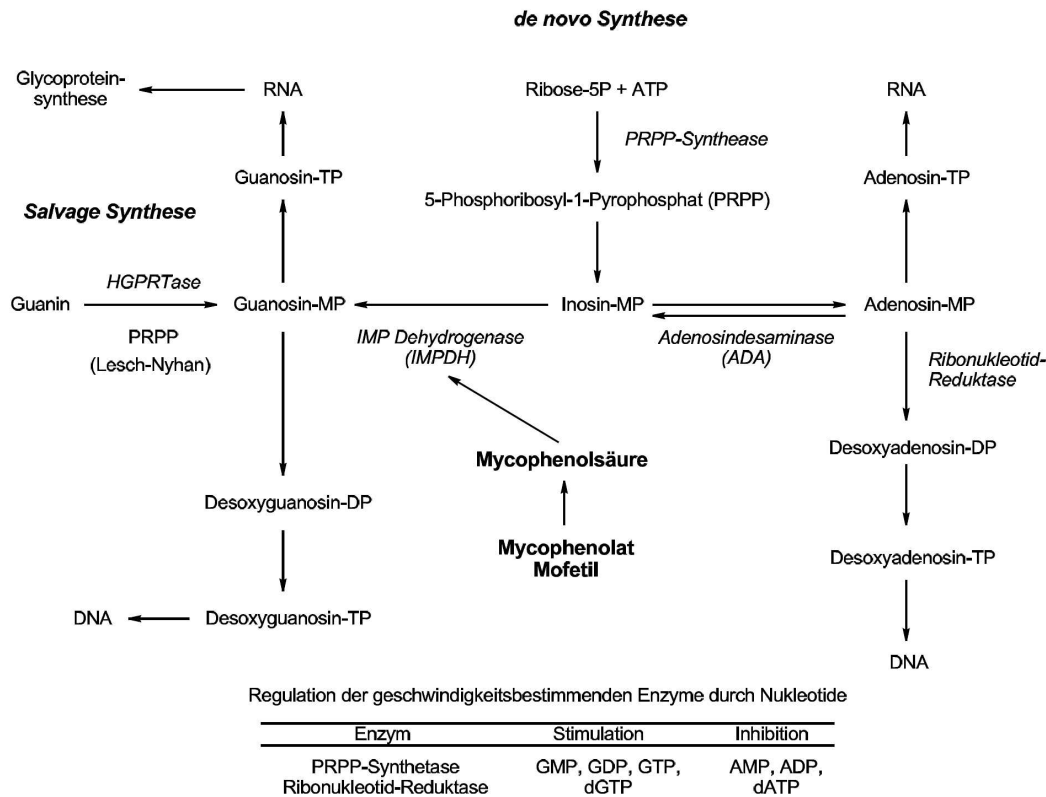


Abbildung 3: IMPDH als zentraler Schritt der de novo Purinsynthese und Angriffspunkt der Mycophenolsäure (nach [6])

Lymphozyten auf. Gleichzeitig bindet Mycophenolsäure sensitiver an den Typ II der proliferierenden Lymphozyten als an den IMPDH Typ I, welcher vorwiegend in sich nicht teilenden Zellen auftritt [16, 84]. Durch die Depletion von GTP in der Zelle wird auch die Glykosylierung von bestimmten Proteine vermindert. Dies kommt durch die fehlenden Gunaosin-Diphosphat-Zwischenprodukte, welche eine wichtige Funktion bei der Glykosylierung von Proteinen haben [116]. *Sokoloski und Sartorelli* zeigten in Sarcoma 180 Zellen, dass der Transfer von Mannose und Fruktose auf glykosylierte Membranproteine durch MPA gehemmt wird [118]. Einige dieser Glykoproteine fungieren als Adhäsionsproteine, welche bei der Adhäsion der Leukozyten an Gefäßendothel nötig sind und damit eine wichtige Rolle bei der Leukozytenmigration in Entzündungs- und Abstoßungsgebieten spielen [6, 116]. Weitere Studien unterstützen diese Aussagen, da eine Reduktion der Leukozytenmigration in

das Transplantat nachgewiesen werden konnte [10, 11]. Dies konnte ebenfalls in nierentransplantierten Ratten gezeigt werden [41].

Die häufigsten unerwünschten Wirkungen, die im Zusammenhang mit MMF beobachtet wurden, sind gastrointestinale Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen, Diarrhöen und abdominelle Schmerzen. Häufig sind auch hämatologische Nebenwirkungen wie Leukopenien, Thrombozytopenien und Anämien. Wobei Leuko- und Thrombozytopenien deutlich seltener bei MMF als bei AZA auftreten, da MMF selektiv auf Lymphozyten wirkt. MMF hat im Gegensatz zu AZA häufiger gastrointestinale Nebenwirkungen. Allerdings kann man bei einer Reduktion der MMF Dosis von 3g auf 2g die Nebenwirkungen deutlich einschränken bei weiterhin guter Wirkung gegen eine akute Abstoßung [1, 119]. Die Nebenwirkungen treten meist innerhalb des ersten Jahres nach Transplantation auf. Längerfristig (3 Jahre nach Transplantation) ist keine Zunahme der Nebenwirkungen zu beobachten [2]. Wichtig ist vor allem auch, dass im Gegensatz zu AZA bei MMF kein Anhalt für Hepato- und Myelotoxizität besteht [119].

1.3.2 Weitere Immunsuppressiva

Azathioprin ist ein Nitroimidazolderivat, welches als Prodrug fungiert, und durch intrahepatische Aktivierung zu 6-Mercaptopurin umgewandelt wird. Es unterbricht den Zellzyklus an derselben Stelle wie MMF (siehe Abbildung 1), allerdings mit einem anderen sehr unspezifischen Wirkmechanismus. Es hat zwei Wirkungsweisen, einmal die Hemmung der Zellproliferation durch eine Feedback-Hemmung der de novo Purinsynthese und eine zytotoxische Wirkung durch Inkorporation in die DNA [23].

Diese Wirkungen sind in allen Körperzellen von großer Bedeutung, allerdings am schwerwiegendsten in schnell proliferierenden Zellreihen. Dies sind vor allem aktivierte Lymphozyten bei Inflammation und Abstoßungsreaktionen, wodurch AZA immunsuppressiv wirkt. Gleichzeitig sind aber auch andere Körperzellen betroffen, wodurch die starke Toxizität mit einer hohen

Nebenwirkungsrate erklärt werden kann. Wichtig sind hier vor allem Myelotoxizität mit Auftreten von Leukopenie, makrozytäre Anämie und Thrombozytopenien und selten Panzytopenien [19] oder eine reine Aplasie der roten Zelllinie [4].

Cyclosporin A und Tacrolimus (FK 506) greifen auf eine ähnliche Weise in das Immunsystem ein, allerdings sind sie chemisch nicht miteinander verwandt. Beide gehören zur Klasse der Calcineurininhibitoren und verhindern die Produktion von Interleukin 2 in T-Helferzellen, wodurch die Aktivierung der T-Zellen verhindert und so die zelluläre Immunantwort gehemmt wird [100]. Eine wichtige Nebenwirkung der Calcineurininhibitoren ist die Nephrotoxizität.

Rapamycin (Sirolimus) ist ein mTOR (mammalian target of Rapamycin) Inhibitor. Durch eine Komplexbildung mit FKBP₁₂-Proteinen und mTOR, wird dieser gehemmt und dadurch eine Blockade von intrazellulären Signalwegen hervorgerufen. Dadurch wird wiederum unter anderem die Signaltransduktion des IL-2-Rezeptors gehemmt und somit die Wirkung von Interleukin-2 auf die Proliferation der Lymphozyten vermindert [100] (siehe Abbildung 1). Nebenwirkungen von Rapamycin sind eine Proteinurie, Pneumonitis und der antiproliferative Effekt auf alle Körperzellen.

1.4 Erythropoese und Erythropoetin

Der Prozess der ständigen Neubildung von Erythrozyten wird als Erythropoese bezeichnet. Das Hormon, das die Erythropoese aktiviert, ist das Erythropoetin (EPO). Die ersten Schritte der Erythropoese werden durch verschiedene Wachstumsfaktoren stimuliert, wodurch die pluripotenten Stammzellen zu myeloischen Stammzellen und schließlich zu BFU-E (bursting-forming unit erythroid) werden. EPO, welches in der Niere gebildet wird, hemmt in den späteren Schritten der Erythropoese die Apoptose dieser erythrogenen Vorläuferzellen (BFU-E). Unter EPO-Einfluss entwickeln sich die BFU-E zu CFU-E (colony-forming unit erythroid) und letztlich zu Normoblasten [29] (siehe Abbildung 4). Damit EPO seine Wirkung auf die erythroiden Vorläuferzellen

1 Einleitung

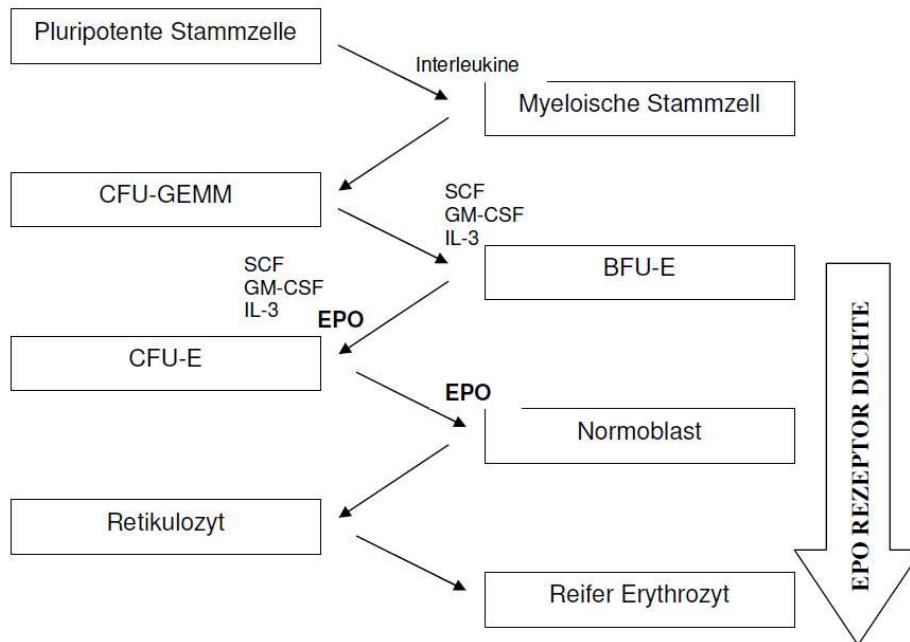


Abbildung 4: Die Schritte der Erythropoese (nach [29])

entfalten kann, muss es an einen EPO-Rezeptor binden, welcher seine höchste Konzentration auf der Zelloberfläche der CFU-E und den Pronormoblasten hat. In der weiteren Entwicklung vermindert sich die Dichte der EPO-Rezeptoren auf der Zelloberfläche, so dass sie auf Retikulozyten und reifen Erythrozyten nicht mehr nachweisbar sind [61, 107] und so EPO auch keinen Effekt mehr auf diese Zellen hat (siehe Abbildung 4). Der EPO-Rezeptor existiert auf der Zelloberfläche der erythroiden Vorläuferzellen als Rezeptordimer in zwei verschiedenen inaktiven Konformationen [70, 99]. In der einen Konformation sind die transmembranären Anteile des Rezeptordimers nahe beieinander liegend. In dieser Form kann EPO an den Rezeptor andocken. Wenn dies geschieht, kommt es zu einer Konformationsänderung und so zur Aktivierung des Rezeptors [99]. Die Tyrosinkinase Januskinase2 (JAK2), welche auf der zytoplasmatischen Seite des Rezeptor liegt, wird ebenfalls durch Dimerbildung aktiviert. Die aktivierte JAK2 phosphoryliert dann sich selbst und weitere zytoplasmatische Domänen des Rezeptors, an welche in der Folge plasmatische Proteine binden können, die dann ebenfalls durch die JAK2 phosphoryliert werden [80, 96] (siehe Abbildung 5). Die phosphorylierten

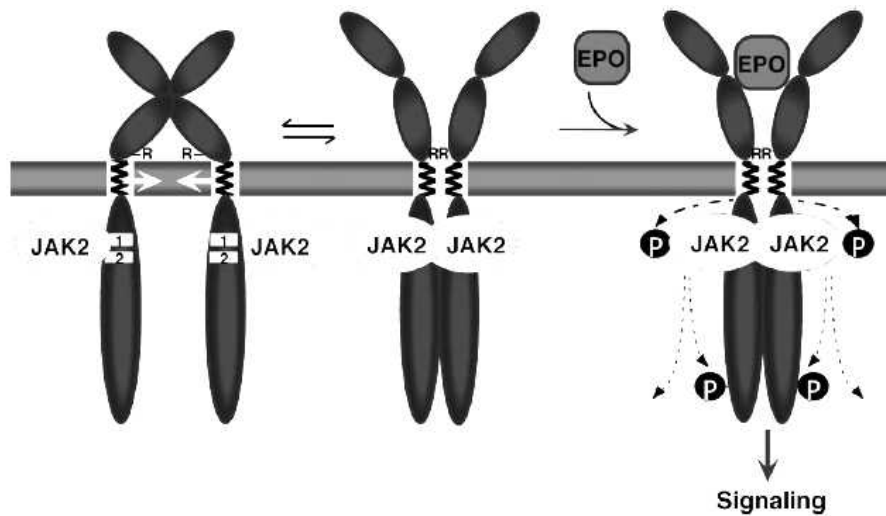


Abbildung 5: Vergleich von einem freien und einem Ligand-gebundenen EPO-Rezeptordimer [62]

Ohne Ligand (EPO) pendelt der Rezeptordimer zwischen zwei verschiedenen Konformationen. Die Annäherung der transmembranären Anteile des Rezeptordimers begünstigt die Bindung von EPO und die Aktivierung der Signaltransduktion.

zytoplasmatischen Proteine (z.B. STAT5) führen zu einer Aktivierung von verschiedenen Signalwegen [62], welche wiederum die Transkription verschiedener Gene startet. Diese Gene stoppen einerseits den programmierten Zelltod der erythroiden Vorläuferzellen und fördern andererseits die Proliferation und Reifung der erythroiden Vorläuferzellen.

1.4.1 Sauerstoffabhängige Erythropoetinbildung mit Hilfe des Hypoxie-induzierten Faktors (HIF-1)

Erythropoetin ist ein 34,4 kD großes Glykoprotein, welches als hormoneller Regulator der Erythropoese fungiert [22]. Beim Erwachsenen wird es zum größten Teil in der Niere und nur zu einem sehr geringen Teil in der Leber synthetisiert [29]. Da EPO im menschlichen Körper nicht gespeichert werden kann und eine sehr kurze Halbwertszeit aufweist [110], wird es bei normalen Sauerstoffbedingungen in geringen Mengen gebildet um die Basiserythropoese zu sichern [60]. Unter anämischen oder hypoxischen Bedingungen kann die EPO-Synthese bis zu tausendfach erhöht werden [22]. Dieser EPO-Anstieg wird durch eine Rekrutierung und Aktivierung von EPO-produzierenden Zellen

gewährleistet, nicht aber durch erhöhte EPO-Synthese der einzelnen Zelle [60]. Diese Mechanismen unterliegen einem negativen Feedback-Mechanismus. Sobald der Sauerstoffgehalt im Blut den Normwert erreicht, wird die renale EPO-Produktion wieder gedrosselt [22, 61].

Mit Hilfe der Zelllinien Hep3B und HepG2, welche geringe Basismengen an EPO konstitutiv bilden und eine deutliche Induktion der EPO Produktion unter hypoxischen Bedingungen zeigen [35], konnten die Regulationsmechanismen genauer erforscht werden.

Hypoxie bewirkte einen Anstieg des EPOs und parallel dazu der EPO-mRNA, so dass die Regulation der EPO-Synthese unter Hypoxie auf Ebene der mRNA geschieht [22]. Dies wird durch eine gesteigerte Transkription erreicht [34, 109]. *Semanza GL und Wang GL* demonstrierten, dass in hypoxischen Hep3B Zellen ein Hypoxie-induzierter Faktor (HIF-1) an einen DNA-Abschnitt bindet, welcher eine entscheidende Rolle in der hypoxiebedingten EPO-Gen Transkription spielt [114].

Der Hypoxie-induzierter Faktor (HIF-1) besteht aus einer α - und einer β -Untereinheit, wobei letztere dem aryl-hydrocarbon nuclear translocator (ARNT) entspricht [52]. Die sauerstoffabhängige Regulation wird über die Stabilität der HIF-1 α -Untereinheit ermöglicht, welche bei Hypoxie erhöht wird. Unter hypoxischen Bedingungen wird also die HIF-1 α -Untereinheit weniger degradiert. Diese Degradation bei Normoxie ist Folge der Hydroxylierung von Prolinresten durch eine Prolylhydroxylase (PHD) in der sauerstoffabhängige Degradierungs-Domäne (oxygen-dependent proteolytic degradation domain, ODDD) der HIF-1 α -Untereinheit. Die Hydroxylierung der ODDD führt zu einer Bindung des von-Hippel Lindau Proteins (pVHL) [47, 49, 133], wodurch es zu einer Ubiquitinierung von HIF-1- α -Untereinheit kommt. Proteasomen erkennen diese Markierung und degradieren die polyubiquitinierten HIF-1 α -Untereinheiten [18, 106] (siehe Abbildung 6). Die Hydroxylierung der ODDD scheint nicht der einzige Regulator für die hypoxie-abhängige EPO-Synthese zu sein, denn in weiteren Untersuchungen findet sich eine Asparaginhydroxylase (factor

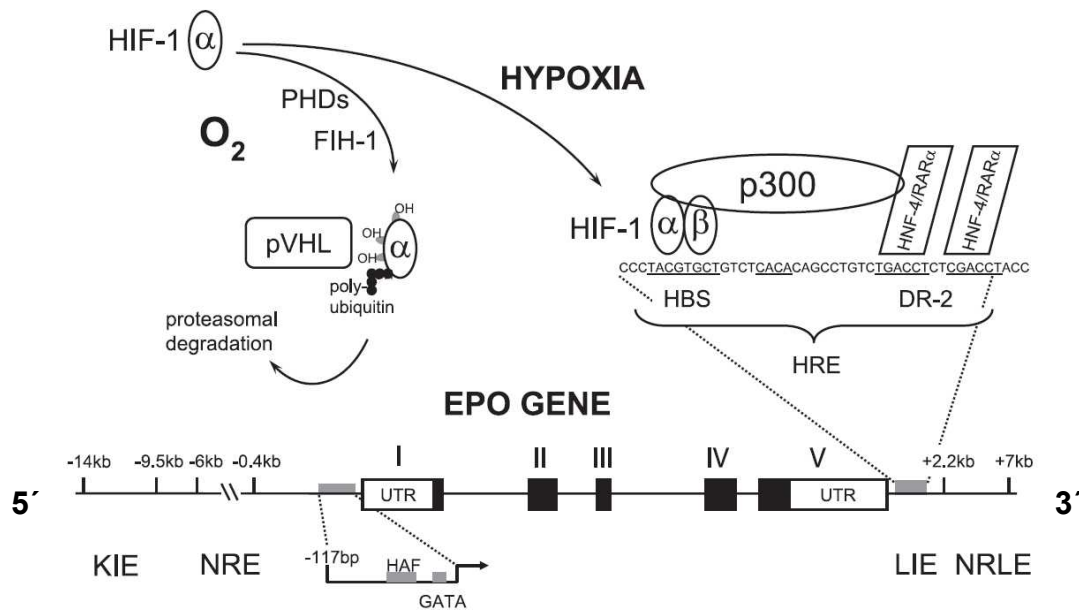


Abbildung 6: Regulation des Transkriptionsfaktors HIF-1 und die Erythropoetin Gen Expression

Unten: EPO Gen mit seinen regulatorischen DNA Elementen. KIE (kidney-inducible element), NRE (negative regulatory element), 5' und 3' UTR (untranslated region), LIE (Liver-inducible element) und NRLE (negative regulatory liver element). Außerdem ist der Promotor mit HAF (hypoxia-associated factor) und GATA Element dargestellt. Oben: Korrelation zwischen Sauerstoff und HIF-1. Genaue Beschreibung im Text.

inhibiting HIF-1, FIH-1) [64], welche bei Normoxie Asparagin in der C-terminal transactivation domain (C-TAD Region) des HIF-1α- Untereinheit hydroxyliert, wodurch eine Bindung an den Kofaktor p300/CBP verhindert wird und so auch die Transkription des EPO-Gens [65] (siehe Abbildung 6). Bei Sauerstoffmangel wird die Stabilität von der HIF-1α-Untereinheit also erhöht und es kann in den Zellkern wandern und dort ein Heterodimer mit der HIF-1β- Untereinheit bilden. Dieses Heterodimer fungiert zusammen mit dem Kofaktor p300/CBP als Transkriptionsfaktor. Durch Bindung an einen Enhancer, das sogenannte Hypoxie-Responsable-Element (HRE), welches sich vom EPO-Gen aus 120 Basenpaare in Richtung 3' befindet, wird die Transkription der EPO-Gene durch die RNA-Polymerase II über einen 5' gelegenen Promoter erhöht [24] (siehe Abbildung 7). Der EPO Promotor ist grundlegend ein schwacher Promotor und kann alleine unter Hypoxie nur eine sechsfache Steigerung der Transkriptionsrate erreichen. Durch synergistische Wirkung mit dem Enhancer kann die Transkription in vitro 50fach gesteigert werden [12]. Proteine wie HAF

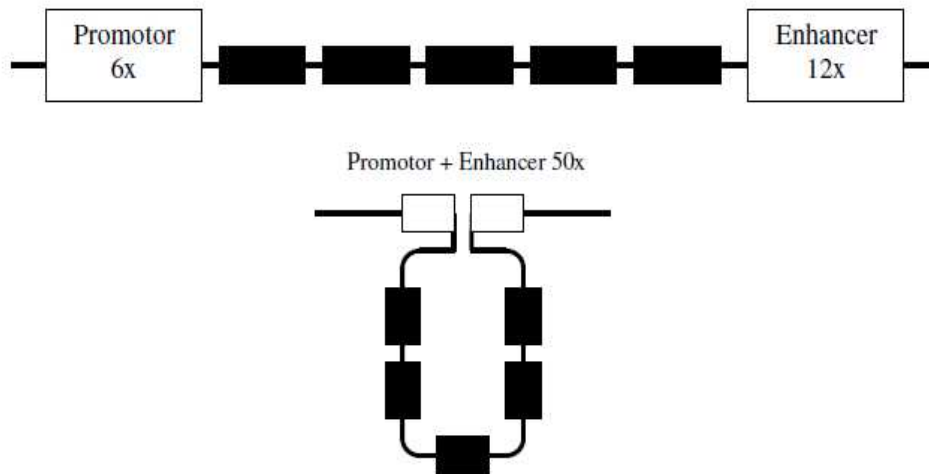


Abbildung 7: Synergismus zwischen Promotor und Enhancer (nach [12])

(hypoxia-associated factor) am Promotor (siehe Abbildung 6) interagieren mit Transkriptionsfaktoren, die an den Enhancer binden [24] (siehe Abbildung 7).

Die bisher beschriebenen Mechanismen bewirken eine gesteigerte Transkription der EPO Gene unter hypoxischen Bedingungen. *Goldberg et al* zeigten jedoch, dass der EPO mRNA Anstieg unter Hypoxie nicht alleine einer gesteigerten Transkription der EPO Gene zugeschrieben werden kann, sondern dass eine posttranskriptionellen Stabilisierung der EPO mRNA ebenfalls eine wichtige Rolle spielt [34]. Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass andere hypoxie-regulierte Gene, wie zum Beispiel vascular endothelial growth factor (VEGF) [68] und Tyrosinhydroxylase (TH) [20], teilweise durch mRNA Stabilisierung reguliert werden.

Es ist bekannt, dass Proteine, die an pyrimidinreiche Sequenzen in der mRNA binden, eine wichtige Funktion bei der RNA Metabolisierung haben [83]. Diese pyrimidinreichen oder auch AU-reichen Sequenzen (ARE) befinden sich häufig in der 3'UTR (untranslated region) der eukaryontischen mRNA und sind für den schnellen intrazellulären Umsatz von mRNA verantwortlich [83, 104]. Der destabilisierende Effekt der ARE in der 3'UTR der mRNA kann durch die Bindung bestimmter Proteine an die ARE aufgehoben werden, wodurch die mRNA Stabilität zunimmt [104].

Die Stabilität der EPO mRNA scheint durch Transkription und Translation eines schnell metabolisierten Genproduktes beeinflusst zu werden, da unter Aktinomycin D und Cycloheximid die EPO mRNA stabilisiert wird [34]. Hier ist zum Beispiel das Erythropoetin mRNA-binding protein (ERBP) bekannt, welches an eine pyrimidinreiche Region der 3'UTR der EPO mRNA bindet und unter hypoxischen Bedingungen vermehrt diese Bindung eingeht [103]. Es wurde gezeigt, dass die EPO mRNA Stabilität durch die Bindung von ERBP an die 3'UTR erhöht wird. Der destabilisierende Effekt der pyrimidinreichen Region in der 3'UTR wird also durch die Bindung von ERBP aufgehoben [75].

Zweiwertiges Eisen (Fe(II)) und das Hämprotein [12, 33] scheinen eine wichtige Rolle im Sauerstoff-Erkennungssystem zu spielen. Die oben beschriebenen Hydroxylasen, die die ODD-Domäne und die CAT-Domäne bei Normoxie hydroxylieren, scheinen von Fe(II) abhängig zu sein, und zu der Gruppe der α -Oxoglutarate- und Fe²⁺- abhängigen Dioxygenasen zu gehören. Metalle (Co²⁺, Ni²⁺, Mn²⁺) können Eisen verdrängen und dadurch den eisenabhängigen Abbau von HIF-1 α verhindern [22]. Außerdem kommt es, laut *Goldberg et al*, zur Verdrängung des Eisens aus dem Hämoglobin durch die oben genannten Metalle. Durch diese Verdrängung kommt es zu Veränderung der Konformation, wodurch wiederum die Expression von EPO-Genen gesteigert wird [33]. Dies würde auch erklären, warum Cobaltchlorid, Nickelchlorid, Manganchlorid [33] und Eisenchelatbildner [126], wie zum Beispiel Deferrioxamin, in HepG2 Zellen Hypoxie simulieren können und anscheinend über denselben Signalweg wie Hypoxie agieren [33].

1.5 Zielsetzung

In vitro sollen die Mechanismen untersucht werden, über welche MMF in nierentransplantierten Patienten Anämie induziert. Dieses Projekt gründet auf Vorarbeiten, in denen gezeigt wurde, dass MMF einen spezifischen Effekt auf die EPO Produktion in HepG2 Zellen hat. Unter dem Einfluss von MMF wurde eine verminderte EPO Synthese beobachtet [101]. Ziel der Arbeit ist es nun,

1 Einleitung

diesen MMF-Effekt auf RNA-Ebene darzustellen. Insbesondere sollte der Einfluss von MMF auf die Stabilität der EPO mRNA und auf die HIF-1 α -Untereinheit untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellkultur Medien, Medienzusätze und Reagenzien

	Firma	Ort
Actinomycin D	Calbiochem	Billerica, USA
CoCl ₂	Sigma	St. Louis/USA
Cycloheximid	Sigma	St. Louis/USA
DMSO	Sigma	St. Louis/USA
Dubecco's PBS	PAA Laboratories	Pasching/Austria
FCS	PAA Laboratories	Pasching/Austria
Guanosin	Sigma	St. Louis/USA
L-Glutamin 200mM (100x)	Invitrogen	Paisley/UK
Medium DMEM/F12	Invitrogen	Paisley/UK
MMF	Sigma	St. Louis/USA
PenStrep	Invitrogen	Paisley/UK
Schalen Cell+ 100x20mm	Sarstedt	Newton/USA
Trypsin EDTA 5% (10x)	Invitrogen	Paisley/UK
Zellkulturflaschen Cell+	Sarstedt	Newton/UK

2.1.2 Chemikalien

	Firma	Ort
100% Ethanol	AppliChem	Darmstadt/Germany
70% Ethanol	AppliChem	Darmstadt/Germany
Acrylamid/Bis 29:1 30%	AppliChem	Darmstadt/Germany
Agarose	Roth	Karlsruhe/Germany
Ammoniumacetat	Merck	Darmstadt/Germany
APS	Roth	Karlsruhe/Germany
Benzamidin	Calbiochem	Billerica, USA
Bromphenolblau	AppliChem	Darmstadt/Germany
BSA	PAA Laboratories	Pasching/Austria
Chloroform	AppliChem	Darmstadt/Germany
DEPC	AppliChem	Darmstadt/Germany
DTT	Sigma	St. Louis/USA
EDTA	Sigma	St. Louis/USA
EGTA	Sigma	St. Louis/USA
Ethidiumbromid	Sigma	St. Louis/USA
Glycerin	Sigma	St. Louis/USA
Glycin	Merck	Darmstadt/Germany
Guanidinthiocyanat 4M	Roth	Karlsruhe/Germany
HEPES	Roth	Karlsruhe/Germany

2 Material und Methoden

Isoamylalkohol	AppliChem	Darmstadt/Germany
Isopropanol	Sigma	St. Louis/USA
KCl	Merck	Darmstadt/Germany
Magermilch	Milupa	Friedrichsdorf/Germany
Mercaptoethanol	AppliChem	Darmstadt/Germany
Methanol	Sigma	St. Louis/USA
Natriumacetat	AppliChem	Darmstadt/Germany
Natriumcitrat	Merck	Darmstadt/Germany
NEM	Sigma	St. Louis/USA
Natrium-N-Laurylsarcosin 10%	AppliChem	Darmstadt/Germany
NP-40	Sigma	St. Louis/USA
Phenol	Roth	Karlsruhe/Germany
PMSF	Sigma	St. Louis/USA
Ponceau S	Sigma	St. Louis/USA
Saccharose	Merck	Darmstadt/Germany
SDS	MP Biomedicals	Solon/USA
TEMED	Roth	Karlsruhe/Germany
Tris	AppliChem	Darmstadt/Germany
Trizol Reagenz	Sigma	St. Louis/USA
TWEEN 20	Roth	Karlsruhe/Germany

2.1.3 Antikörper

	Aus	Gegen	Firma	Ort
Primärantikörper: Aktin	Kaninchen	Aktin	Sigma	Deisenhofen
Primärantikörper: Hif 1 α	Maus	Humanes Hif 1 α	BDTransduction Laboratories	New Jersey/USA
Sekundärantikörper	Ziege	Maus-IgG	DakoCytomation	Glostrup/Denmark
Sekundärantikörper	Ziege	Kaninchen- IgG	Amersham	Piscataway/USA

2.1.4 Primer

	Firma	Ort
18S-RNA Sense CCTATCAACTTTTCGATGGTA Antisense TCCTGTATTGTTATTTTCG	Sigma	St. Louis/USA
Erythropoetin Sense GAGGCCGAGAATATCAC Antisense AAATTAACCTTTGGTGTCTGG	Sigma	St. Louis/USA

2 Material und Methoden

Hif 1 α Sense TTGGAACATTATTACAGCAG Antisense GCAGTCTACATGCTAAATCA	Sigma	St. Louis/USA
α -Fetoprotein Sense AGCTTGGTGGATGAAAC Antisense TCCAACAGGCCTGAGAATC	Sigma	St. Louis/USA
Random Hexamer Primer	Invitrogen	Paisley/UK

2.1.5 TaqMan Sonden

TaqMan Gene Expression Assay: 18S Hs99999901_s1	Applied Biosystems	Foster City/USA
TaqMan Gene Expression Assay: EPO Hs00171267_m1	Applied Biosystems	Foster City/USA

2.1.6 Enzyme

	Firma	Ort
Reverse Transkriptase	Thermo Scientific	Epsom, Surrey/UK
RNase Inhibitor	Fermentas	Waltham/USA

2.1.7 Kits und sonstige Materialien

	Firma	Ort
ABsolute™ QPCR ROX Mix	ABgene	Epsom, Surrey/UK
ECL-Chemilumineszenz-Kit	GE Healthcare	Buckinghamshire/UK
Lowry Protein Assay	Biorad	Hercules/USA
Membran für Northern Blot	Pall Corporation	Pensacola/USA
Nukleotid-Mix (dNTP-Mix)	Abgene	Epsom, Surrey/UK
PCR plates 96-Well	ABgene	Epsom, Surrey/UK
PCR-MasterMix	Roche	Rotkreuz/Schweiz
PCR-Platten MicroAmp 48 Wells FastOptica	Applied Biosystems	Foster City/USA
PVDF Membran für Western	Merck	Darmstadt/Germany
Röntgenfilm	Kodak	Rochester/USA
Stripes of 8 Flat caps	ABgene	Epsom, Surrey/UK

2.1.8 Geräte

	Firma	Ort
LightCycler 480	Roche	Rotkreuz/Schweiz
Step One	Applied Biosystems	Foster City/USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kultivierung der HepG2 Zellen

Die humanen Hepatoma Zellen der Zelllinie HepG2 (American Type Culture Collection No. HB-8065) wurden in Zellkulturflaschen aus Polystyrol ausgesät und im Brutschrank bei 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit und 5 Vol% CO₂ und 95 Vol% Luft kultiviert bis die Zellen eine konfluente, einlagige Zellschicht bildeten. Als Medium wurde DMEM/F12 verwendet, welchem 10% hitze-inaktiviertes fötales Kälberserum (FCS), 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin beigefügt wurden. Das Medium wurde täglich erneuert und sobald sich ein konfluenter Zellrasen gebildet hatte, wurden die Zellen (in der Regel ein bis zweimal pro Woche) mittels 0,25% Trypsin-EDTA in Ca-freiem PBS abgelöst und je nach Wachstumsgeschwindigkeit mindestens im Verhältnis 1:3 geteilt und in neue Zellkulturflaschen oder Zellkulturschalen ausgesät.

Während allen Versuchen wurde immer auf eine für die Zellen typische Morphologie und den Konfluenzgrad geachtet. Es wurden nur Zellkulturen verwendet, die keine Zeichen einer Kontamination durch Pilze und Bakterien aufwiesen. Auch während der kompletten Stimulationszeit mit dem Immunsuppressivum MMF waren die Morphologie und die Zellproliferation erhalten.

2.2.2 Erythropoetin ELISA

Ein kommerzielles Kit für einen Sandwich ELISA wurde zur Bestimmung der Erythropoetinkonzentration im Zellüberstand gemäß der Anleitung des Herstellers verwendet.

Der Zellüberstand wurde zusammen mit einer EPO-Standardreihe in die verschiedenen Vertiefungen einer 96-Well-Platte pipettiert, welche mit einem monoklonalen EPO – Capture-Antikörper beschichtet war. In den einzelnen

Vertiefungen der 96-Well-Platte wurde das EPO des Zellüberstandes und des EPO Standards durch den Antikörper quantitativ gebunden.

Als nächstes wurde der überschüssige Zellüberstand und die EPO-Standards aus den Wells entfernt. Um das quantitativ gebundene EPO zu detektieren, wurden die einzelnen Wells mit polyklonalen anti-EPO-Detektion Antikörper inkubiert, an den Meerrettichperoxidase gekoppelt war. Nach der Inkubation sind die ungebundenen Antikörper-Enzym-Komplexe durch mehrmaliges Waschen aus den Wells entfernt worden. Die Meerrettichperoxidase verstoffwechselt Wasserstoffperoxid, wobei Protonen entstehen, welche dann zugegebenes Chromogen Tetramethylbenzidin zu einem blauen Farbkomplex oxidieren. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Schwefelsäure gestoppt und der ursprünglich blaue Farbkomplex in einen gelben umwandelt.

Die Intensität der Färbung ist direkt proportional zu den gebundenen Antikörper-Meerrettichperoxidase-Komplexen, welche wiederum direkt proportional zur Erythropoetinkonzentration im Zellüberstand oder im Standard ist.

In einem Photometer kann bei einer Wellenlänge von 450 nm aus der Extinktion des EPO Standards eine Standardkurve erstellt werden. Durch den Vergleich der Extinktion zwischen Standardkurve und den einzelnen Proben, kann die EPO-Konzentration im Zellüberstand ermittelt werden. Es wurde immer eine Negativkontrolle aus frischem Medium parallel mitgeführt.

2.2.3 Western Blot

2.2.3.1 Proteingewinnung

Um nach einer Stimulationsreihe, die Proteine einer Schale zu ernten, wurde der Zellrasen zunächst mit PBS gewaschen. Durch Zugabe von 400 µl SDS-Puffer, welchem kurz vorher Proteininhibitoren (100mM Pmsf, 500mM NEM und 500 mM Benzamidin) beigefügt wurden, konnten die Proteine von der Platte geschabt und lysiert werden. Diese Prozedur wurde auf Eis durchgeführt und die lysierten Proteine bei der Weiterverarbeitung immer auf Eis gekühlt

gehalten. Zur Zwischenlagerung wurden die lysierten Proteine in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80 °C bis zur weiteren Aufarbeitung eingefroren.

2.2.3.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Bestimmung der Gesamtproteinmenge in den Lysaten wurde mit Hilfe eines kommerziellen Kits entsprechend der Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Die Proteinbestimmung nach Lowry [71] beruht auf zwei verschiedenen Reaktionen, an deren Ende es zu einem Farbumschlag in der Probe kommt. Die erste Reaktion ist die Bildung eines Komplexes zwischen Kupfer und den Peptidbindungen der Proteine in einem alkalischen Milieu [71]. Der Kupfer-Protein-Komplex führt zu einer Reduktion des Folinreagenz (Molybdän(VI)- und Wolfram(VI)-Heteropolysäuren) zu Molybdänblau, welches eine intensive Blaufärbung hervorruft [71]. Je mehr Proteine in der Probe, desto intensiver ist die Blaufärbung, welche dann mittels einer Photometrie bei 650nm gemessen werden kann.

Zunächst wurde eine Standardkurve erstellt. BSA (bovine serum albumine) diente in einer Verdünnungsreihe als Proteinstandard. Die Extinktion der Blaufärbung bei 650nm bildet die Standardkurve. Nun wird die Extinktion der einzelnen Proteinproben im Vergleich zur Konzentration des Proteinsstandards aufgetragen. So konnte die Proteinkonzentration der Zelllysate ermittelt werden.

2.2.3.3 Western Blot

Der Western Blot wurde zur qualitativen und quantitativen Bestimmung des EPOs im Zelllysate verwendet. In einem Western Blot werden die verschiedenen Proben auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und dann in einem elektrischen Feld nach ihrer elektrischen Mobilität getrennt. In einem weiteren Schritt werden dann die Proteine auf eine PVDF-Membran geblottet und anschließend mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

2 Material und Methoden

Nachdem die Proteinbestimmung nach Lowry (siehe 2.2.3.2) durchgeführt wurde, wird jede Probe mit destilliertem Wasser und SDS Probenpuffer (3,12ml Trenngelpuffer, 2,5ml Glycerin, 0,5g SDS, 250µl 2-Mercaptoethanol, 0,12mg Bromphenolblau auf 25ml mit H₂O auffüllen) gemischt, so dass jede Probe die selbe Konzentration an Protein enthält. Die Proben werden dann bei 95 °C für 10 Minuten aufgekocht und anschließend für 10 Minuten auf Eis gestellt. Durch das Aufkochen der Proben mit SDS und Mercaptoethanol, werden metastabile Proteine aufgefaltet und die Proteine mit SDS beladen [74]. Durch die Beladung mit anionischem SDS wird die Eigenladung der Proteine überdeckt, so dass diese eine konstante negative Ladung haben. Als nächstes wurde jede Probe auf je eine Spur im Polyacrylamidgel aufgetragen und die Proteine aufgetrennt. Das Polyacrylamidgel wurde nach Laemmli hergestellt und besteht aus einem 3,9% Sammelgel und einem 10% Trenngel [63]. Zusätzlich zu den einzelnen Proben wird auch ein Marker (Page Ruler, Fermentas, Waltham/USA) auf das Gel aufgetragen, um am Ende dem markierten Protein eine Größe zuzuordnen.

Um sicher zu gehen, dass der Transfer von dem Polyacrylamidgel auf die PVDF Membran regelmäßig und ohne Fehler funktioniert hat, kann man nach dem Blotvorgang die Membran mit Ponceau S (0,5 mg/ml in 1%ig Essigsäure) anfärben. Als nächstes wurde die Membran mit 3% Magermilch in TBS (tris-buffered saline) und 0,1% Tween 20 über Nacht bei 4 °C blockiert. Nach der Blockierung wurde die Membran einmal kurz mit TBS abgespült und dann dreimal für 10 Minuten mit Waschlösung (0,1%ig Magermilch in TBS und 0,1% Tween 20) gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem Primärantikörper gegen HIF-1α oder Aktin eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren drei Waschvorgängen, um überschüssige Primärantikörper zu entfernen, wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Der Sekundärantikörper bindet an den Primärantikörper und nach erneuten 5 Waschvorgängen mit Waschlösung für je 5 Minuten um den überschüssigen Sekundärantikörper zu entfernen, konnte dieser mit Hilfe eines kommerziellen

Chemilumineszenz-Kits detektiert werden. Die nun leuchtenden Banden konnten schließlich auf einem Röntgenfilm detektiert werden.

2.2.4 RNA Isolation

Die Ernte und Isolation der RNA wurde nach der Methode von Chomoczynski und Sachi [17] durchgeführt. Die Schalen werden auf Eis gelegt, das Medium abgesaugt und der Zellrasen mit kaltem Natriumchlorid gewaschen. Dann werden 500 µl Lösung D mit 0,72 % Mercaptoethanol auf die Schale gegeben und die RNA-haltigen Zellen geerntet. Zur Herstellung von Lösung D wird Guanidinthiocyanat 4M in DEPC-H₂O bei 37 °C für 1-2 Stunden gelöst und anschließend wird noch Natriumcitrat 25 mM und 10,6 ml N-Laurylsarcosin (10%) hinzugefügt. Zur weiteren Aufarbeitung der RNA-haltigen Zellen wird der Reihe nach 50 µl 2M Natriumacetat (pH4) und 500 µl Phenol dazugegeben und dies dann sehr gründlich gemischt. Nachdem die Probe dann 15 Minuten auf Eis gestellt wurde, werden noch 120 µl Chloroform-Isoamylalkohol (49:1) beigefügt. Nach einer erneuten Mischung werden die Proben dann für 20 Minuten bei 4 °C und 13000 UpM zentrifugiert. Nach der Zentrifugation haben sich dann drei Phasen gebildet, eine obere wässrige Phase, eine Interphase mit DNA und eine untere organische Phase. Die RNA befindet sich in der wässrigen Phase, welche dann vorsichtig abpipettiert wird und mit Isopropanol im Verhältnis 1:1 verdünnt wird. Als nächstes wird die RNA über Nacht bei -20 °C gefällt. Am nächsten Tag kann man nach einer 20-minütigen Zentrifugation bei 4 °C und 13000 UpM ein RNA-Pellet am Boden des Eppendorf Gefäßes erkennen. Das Pellet wird nun zunächst mit 70%igem und dann in einem zweiten Waschvorgang mit 100%igem Ethanol gereinigt und dann bei 37 °C an der Luft getrocknet. Als nächstes wird das RNA-Pellet in DEPC behandeltem Wasser bei Raumtemperatur resuspendiert.

Bei den In-vitro-Degradationsversuchen wurde die RNA mittels eines Trizol Reagenz isoliert, um die Schritte der Isolation etwas zu verkürzen. Das Trizol Reagenz enthält bereits Guanidiniumthiocyanate und Phenol. Es muss anschließend nur noch Chloroform hinzugefügt werden.

2 Material und Methoden

Allgemein bewirken Guanidiniumthiocyanate und Phenol eine Lyse der Zellen und inaktivieren zusätzlich RNasen und andere Enzyme, welche die RNA schädigen könnten. Durch das Phenol werden die DNA und Proteine gelöst. Die Zugabe von Chloroform ruft die bereits oben beschriebene typische Phasentrennung nach Zentrifugation hervor.

Mittels Spektralphotometrie kann man die Reinheit und die Menge der gewonnenen RNA bestimmen. Es wird die Extinktion bei 260nm für die RNA/DNA und bei 280nm für die Proteine gemessen. Der Quotient aus der OD_{260}/OD_{280} , sollte bei einer geringen Verunreinigung der RNA ungefähr bei 2,0 liegen, ansonsten sollte die RNA erneut gereinigt werden. Da eine $OD = 1$ bei 260nm einer RNA-Konzentration von 40 ng/ μ l entspricht (bei einer Schichtdicke von 1 cm, verdünnt in Wasser), lässt sich die RNA-Konzentration der Probe errechnen.

2.2.4.1 Northern Blot

Durch einen Northern Blot wurde die zuvor isolierte RNA (siehe 2.2.4) quantifiziert. Beim Northern Blot wird die RNA mittels Elektrophorese nach Ladung voneinander getrennt. Diese RNA kann dann mittels Kapillar-Blotting auf eine Membran transferiert werden, auf welcher spezifische RNA Sequenzen durch Hybridisierung mit P-32 markierten cDNA-Sonden nachgewiesen und quantifiziert werden können. Die EPO Sonde wurde uns freundlicherweise durch Herrn Peter Keller aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. C. Bauer, Physiologisches Institut der Universität Zürich-Irchel, zur Verfügung gestellt. Sie besteht aus 745 Basenpaaren der humanen EPO cDNA. Diese wurde in einen pTR Vektor kloniert und mit KpnI und Bgl II isoliert.

Zu Beginn wurden alle Proben mit DEPC behandeltem Wasser in gleicher Konzentration verdünnt und es wurde 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 Ethidiumbromid dazugegeben. Dann wurde die RNA für 10 Minuten bei 75 °C

2 Material und Methoden

denaturiert und schließlich auf Eis gestellt. Jede Probe wurde in eine eigene Spur im denaturierenden Agarosegel (1% Agarose, 5,9% Formaldehyd in 1x MOPS) aufgetragen und bei konstant 60 V im Gel aufgetrennt. Die Trennung erfolgte dadurch, dass kleine Moleküle schneller durch das Gel wandern als größere Moleküle. Als nächstes erfolgte mittels eines Kapillarblottings ein Transfer der aufgetrennten RNA von dem Agarosegel auf eine Membran. Der Blottvorgang erfolgte durch kapilläre Wanderung mit 20x SSC (3,0M NaCl, 0,3M Natriumcitrat, pH 7,0) für mindestens 15 Stunden. Anschließend wurde die Membran dann zur Fixierung für zwei bis drei Stunden bei 80 °C gebacken. Nach zweimaligem Spülen der Membran mit 20x SSC wurde sie mit 2 µg/ml denaturierter Heringssperma DNA in einer Prähybridisierungslösung (1% SDS, 5x SSC, 50% Formamid (deion.), 0,2% Ficoll 400, 5mM EDTA, 50mM TRIS/HCl (pH 7,5), 0,2% BSA, 0,1M NaCl, 0,2% Polyvinylpyrrolidon) vorhybridisiert.

Die EPO-cDNA-Sonde wurde zur Markierung mit Random Hexamer Primer in destilliertem Wasser für 5 Minuten bei 100 °C aufgeköcht und anschließend für 5 Minuten auf Eis gekühlt. Nach Abzentrifugation des Kondenswassers wurde das Reaktionsgemisch, Klenow Polymerase und radioaktives [α -³²P]dCTP zusammen für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Durch diese Vorgehensweise wird die EPO-cDNA-Sonde mit ³²P markiert. Diese ³²P-markierte EPO-cDNA-Sonde wurde zusammen mit Heringssperma DNA in Hybridisierungslösung bei 100 °C für 10 Minuten aufgeköcht und anschließend, um einzelsträngige cDNA Stränge zu erhalten, in Eiswasser abgeschreckt. Mit dieser Hybridisierungslösung wurde die Membran dann über Nacht bei 42 °C im Ofen hybridisiert. Am nächsten Tag wurde die überschüssige radioaktive Sonde von dem Blot entfernt und die Membran wurde zweimal für 15 Minuten bei 42°C mit 2x SSC und 1% SDS und einmal für 30 Minuten mit 0,2x SSC und 1% SDS gespült. Anschließend wurde die Membran in Plastikfolie eingeschweißt und für ein bis vier Tage bei -80 °C auf einen Röntgenfilm aufgelegt. Die Röntgenfilme wurden schließlich densitometrisch ausgewertet und die EPO RNA wurde zur GAPDH normalisiert.

2.2.5 In-vitro-Degradationsversuche

In den In-vitro-Degradationsversuchen wurde RNA und Zelllysate in einem bestimmten Verhältnis gemischt. Nach unterschiedlichen Reaktionszeiten des RNA/Zelllysate Gemisches wurden Proben entnommen und die übriggebliebene EPO-RNA bestimmt. Es wurde in einem Verhältnis von 1:2 und 50:1 RNA mit Zelllysate (siehe 2.2.5.1) in einem Eppendorf Cap gemischt und dann nach verschiedenen Zeitpunkten jeweils 160 µl des RNA-Lysate-Gemisches entnommen. Es wurden jeweils immer zwei Ansätze parallel durchgeführt. Im ersten Ansatz wurden Lysate von Zellen verwendet, welche vorher mit MMF stimuliert wurden. Der zweite Ansatz diente als Kontrolle, indem hier Lysate von Zellen genutzt wurden, welche vorher nur mit DMSO behandelt wurden.

Sobald nach den verschiedenen Zeitpunkten 160 µl des RNA-Lysate-Gemisches entnommen wurden, wurde die Reaktion durch Zugabe von 780 µl DEPC-H₂O und 104 µl Ammoniumacetat mit 100mM EDTA gestoppt. Im nächsten Schritt wurde die verbliebene RNA mit der Methode nach Chomczynski und Sachi isoliert.

2.2.5.1 Herstellung von Zelllysaten

Zur Gewinnung der Zelllysate der HepG2 Zellen wurde zunächst das Medium abgesaugt und der Zellrasen mit PBS gewaschen. Zur Lösung der Zellen von dem Boden der Schale wurden diese für 5 Minuten mit 2 ml PBS/EDTA (0,1mM) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Inkubation ließen sich die Zellen einfach von der Schale abschaben und in ein Eppendorf Cap überführen. Nach einer zweiminütigen Zentrifugation sammelten sich die Zellen am Boden des Caps. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden anschließend sehr vorsichtig in 300 µl Puffer A (10mM HEPES pH7,9; 10mM KCl; 0,1mM EDTA; 0,1 mM EGTA) resuspendiert. Dem Puffer wurde vorher noch der Proteaseinhibitoren (0,5 mM PMSF) und zur Proteinkonservierung 1mM DTT und hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde dann 15 Minuten auf Eis gestellt. Durch Zugabe von 20 µl 10%igem NP-40

(Endkonzentration 0,6%) und guter Mischung wurden die Zellen lysiert. Durch kurze Zentrifugation sammelten sich die Zellkerne am Boden des Gefäßes und konnten verworfen werden. Dem Lysat wurde schließlich noch 0,5 mM PMSF zugefügt.

2.2.6 Real-time PCR

Die Quantifizierung der RNA mittels Northern Blot stellte uns zeitweise vor zeitliche und technische Probleme, so dass wir später mit geringerem Aufwand auf eine RNA-Quantifizierung mit Hilfe der Real-time PCR umstiegen. Initial stand uns freundlicherweise der Light Cycler aus der Pharmakologie der JWG-Universität zur Verfügung, wo Real-time PCR mittels Taqman-Sonden durchgeführt wurde. Im weiteren Verlauf wurde uns die Benutzung der Real-time PCR Machine Step One von Applied Biosystems der Hämatologie der JWG-Universität ermöglicht. Diese Real-time PCR arbeitete mit SYBR Green I Farbstoff. Die beiden PCR Methoden werden im Folgenden erklärt.

2.2.6.1 Reverse Transkriptase Reaktion

Um RNA mittels Real-time PCR zu quantifizieren muss man zunächst die RNA-Proben in einer Reversen Transkriptase Reaktion in DNA umschreiben. Dafür werden die RNA-Proben so verdünnt, dass alle dieselbe Konzentration (0,1 µg/µl) an RNA enthalten. Dann werden 10 µl RNA (1 µg) mit 1 µl Random Primer gemischt, für fünf Minuten auf 95 °C erhitzt und anschließend für 5 Minuten auf Eis gestellt. Es wird ein Mastermix für die Anzahl der Reaktionen hergestellt. Für eine Reaktion besteht er aus 2 µl MgCl₂, 0,75 µl H₂O, 2 µl 10xPCR-Puffer (ohne MgCl₂), 1 µl Mercaptoethanol, 2 µl dNTP-Mix (Nukleotide), 1 µl RNase Inhibitor und 0,25 µl Reverse Transkriptase. Jeweils 9 µl des Mastermixes werden den einzelnen Proben zugefügt. In einer PCR-Maschine wird die Reverse Transkription der RNA zu DNA bei 37 °C für eine halbe Stunde durchgeführt mit anschließendem Aufkochen der Proben bei 95 °C für 5 Minuten. Am Ende der Reversen Transkriptase Reaktion haben wir die

komplette mRNA in cDNA umgeschrieben, welche wir dann mittels der Real-time PCR quantifizieren können.

2.2.6.2 Real-time PCR mit Taqman – Sonden

Die bei uns verwendeten EPO - Taqman – Sonden sind Primer, bestehend aus Oligonukleotiden, welche jeweils an den Enden zwei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe tragen. An einem Ende sitzt der Quencherfarbstoff, welcher die Emission des am anderen Ende sitzenden Reporterfarbstoffs unterdrückt [14, 69]. Die DNA-Polymerase, welche für die Amplifikation benötigt wird, besitzt eine Exonukleasefunktion, wodurch während der Amplifikation der Reporter freigesetzt wird und sich vom Quencherfarbstoff entfernt (siehe Abbildung 8). Die Unterdrückung der Emission durch den Quencher ist somit aufgehoben und die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs steigt proportional zur Menge der EPO - PCR-Produkte an [14].

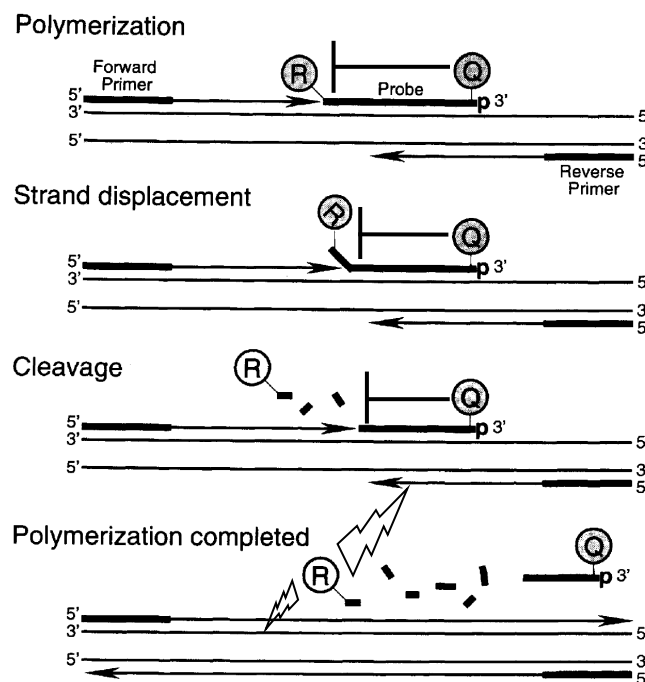


Abbildung 8: Schritte der Real-time PCR mit Taqman-Sonden

Nach schrittweiser Elongation der DNA-Polymerase wird die Sonde abgebaut und der Reporterfarbstoff vom Quencherfarbstoff getrennt. Der Reporter kann dann ungehindert fluoreszieren. Nach [69]

2 Material und Methoden

Die Proben wurden auf die PCR vorbereitet, indem ein Mastermix bestehend aus 25 µl PCR-Mix , 2,5 µl Sonde und 12,5 µl H₂O je Probe hergestellt wurde, wobei dann jeweils 10 µl cDNA und 40 µl des Mastermixes zusammengefügt wurden und die Proben auf eine 96-Well-Platte aufgetragen wurden. In der folgenden Tabelle 1 ist der Zyklus der PCR dargestellt.

Tabelle 1: Zyklus der Real-time PCR mit Taqman-Sonden

Aktivierung	50 °C	5 Sekunden
Aktivierung	95 °C	15 Minuten
40 Zyklen von Folgendem.		
Denaturation	95 °C	15 Sekunden
Annealing	60 °C	1 Minute

2.2.6.3 Real-time PCR mit SYBR-Green

Bei der Methode der Real-time PCR mit SYBR-Green ist der EPO-Primer nicht mit einem Farbstoff markiert wie die Taqman – Sonden, sondern der zusätzlich dazugegebene fluoreszierende Farbstoff SYBR-Green reagiert mit Zielsequenz und Primer. Diese Methode ist sensitiver, aber dafür weniger spezifisch als die Real-time PCR mit Taqman-Sonden. Die geringere Spezifität dieser Technik ist dadurch bedingt, dass der SYBR-Green Farbstoff nicht nur mit der EPO-Zielsequenz, sondern auch mit Dimeren der Primer und mit Nebenprodukten der PCR reagieren kann. Um die Spezifität der SYBR-Green Real-time PCR zu überprüfen, wird am Ende der 40 Zyklen eine Schmelzkurve angefertigt [14].

Tabelle 2: Zyklus der Real-time PCR mit SYBR-Green

Aktivierung	95 °C	10 Minuten
40 Zyklen von Folgendem.		
Denaturation	95 °C	15 Sekunden
Annealing	60 °C	1 Minute
Schmelzkurve		
+3 °C / Sekunde bis 95 °C		
	95 °C	15 Sekunden

Der PCR Ansatz bestand jeweils aus 25 µl PCR Master Mix, 1 µl Forward Primer, 1 µl Reverse Primer, 18 µl RNase freies H₂O und 2 µl cDNA. Die Primer hatten jeweils eine Endkonzentration von 200 nM. Diese Ansätze wurden auf eine 48 Well PCR-Platte FastOptica aufgetragen und es wurden, wie in Tabelle 2 dargestellt, folgende Zykluseinstellung benutzt.

2.3 Aufbau der Versuche

2.3.1 Stimulation mit MMF

Die HepG2 Zellen wurden vor der Stimulation mit MMF in Schalen aus Polystyrol ausgesät. Zur Stimulation wurde MMF verwendet, welches in DMSO gelöst wurde. Am ersten Stimulationstag wurde das Medium gewechselt und MMF dem Medium beigefügt, so dass sich eine Endkonzentration von 10 µM ergab. Zur Kontrolle wurden parallel immer Zellen mit dem entsprechenden Lösungsmittel (DMSO) behandelt. 24 Stunden später wurde erneut das Medium gewechselt und mit frischem MMF bzw. DMSO versetzt. Zusätzlich wurde dem Medium CoCl₂ mit einer Endkonzentration von 150 µM zugefügt. Nach weiteren 24 Stunden, also nach einer Stimulationszeit von 48 Stunden mit MMF und 24 Stunden CoCl₂ wurden die Zellen, die nun zu einem konfluenten Zellrasen herangewachsen waren, je nach Versuchsreihe unterschiedlich weiter behandelt.

2.3.2 Stabilitätsversuche

Für die Stabilitätsversuche wurde der Zeitpunkt nach einer Stimulationszeit von 48 Stunden mit MMF und 24 Stunden CoCl₂ als Zeitpunkt 0 bezeichnet. Zu diesem Zeitpunkt (T₀) wurde Cycloheximid (Endkonzentration 20 µg/ml) oder Actinomycin D (Endkonzentration 10 µg/ml) in das Zellmedium gegeben. Cycloheximid hemmt die Translation von mRNA zu Proteinen, so dass man nach dessen Zusatz die Proteinstabilität untersuchen kann. Zur Prüfung der mRNA Stabilität wird mittels Actinomycin die Transkription der DNA gehemmt. Es wurden zusätzlich zum Zeitpunkt 0 jeweils aus einer DMSO und einer MMF

2 Material und Methoden

Schale RNA oder Proteine geerntet und vorher 1 ml des Zellüberstandes abgenommen und bei -20°C zur weiteren Untersuchung eingefroren. Zu verschiedenen festgelegten Zeitpunkten wurden dann mit den weiteren Schalen ebenso verfahren. In Tabelle 3 ist der Versuchsaufbau noch einmal zur besseren Übersicht tabellarisch aufgeführt.

Tabelle 3: Übersicht zum Versuchsaufbau

1. Tag	2. Tag (24 Std.)	3.Tag (48 Std.)
MMF/DMSO dem Medium beifügen	Mediumwechsel und erneut MMF/DMSO hinzufügen Zusätzlich CoCl_2 auf alle Schalen	Zum Zeitpunkt 0: Ernte jeweils einer Schale mit MMF und mit DMSO Zusatz Den restlichen Schalen Actinomycin oder Cycloheximid zufügen

2.3.3 In-vitro-Degradationsversuch

Für den In-vitro-Degradationsversuch benötigt man Zelllysate und RNA der HepG2 Zellen. Die Zellen aus denen die Zelllysate gewonnen wurden, mussten zuvor wie in 2.3.1 erklärt für 48 Stunden mit MMF und für 24 Stunden mit CoCl_2 behandelt werden. Die Zellen aus denen die RNA geerntet wurde, wurden vorher für 24 Stunden mit CoCl_2 (Endkonzentration $150 \mu\text{M}$) stimuliert. In vitro reagieren Zelllysate und RNA miteinander für verschiedene festgelegte Reaktionszeiten und am Ende wird die verbleibende RNA erneut isoliert (siehe 2.2.4) und mit Hilfe der Real-time PCR (siehe 2.2.6) qualitativ und quantitativ bestimmt. Als Kontrolle wurde immer ein Versuchansatz mit Lysaten von Zellen, die nicht mit MMF sondern mit DMSO behandelt wurden, parallel durchgeführt (siehe Abbildung 9). In der in vitro Reaktion erwartet man, dass wenn unter der Behandlung mit MMF Enzyme in-vivo gebildet werden, welche einen schnelleren Abbau der EPO-mRNA in vivo hervorrufen, dann müssten diese Enzyme ebenfalls die mRNA bei in vitro Verhältnissen vermehrt abbauen. Man würde erwarten, dass im Vergleich zur Kontrolle die RNA unter Einfluss von MMF nach einer gewissen Reaktionszeit vermindert ist.

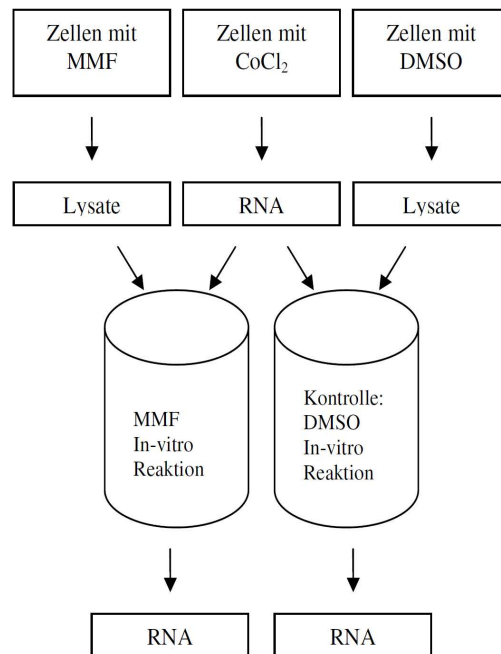


Abbildung 9: Versuchsaufbau der In-vitro-Degradation

2.4 Statistik

Arbeitshypothese: Mycophenolat Mofetil beeinflusst die Expression der Erythropoetin mRNA auf transkriptioneller und posttranskriptioneller Ebene in HepG2 Zellen.

Nullhypothese: Die Stabilität der Erythropoetin mRNA und die Expression des Hypoxie-induzierbaren Faktors in HepG2 Zellen wird nicht durch Mycophenolat Mofetil beeinflusst.

Die Ergebnisse wurden als Durchschnittswerte von mehreren Experimenten +/- Standardabweichungen in den jeweiligen Abbildungen dargestellt. Um auf statistische signifikante Unterschiede zu testen, wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney Test angewandt. Eine statistische Signifikanz wurde bei p-Werten < 0,05 angenommen.

3 Ergebnisse

Es wurde der Einfluss von Mycophenolat Mofetil auf die Erythropoetinsekretion, die Erythropoetin – mRNA Expression und die Expression des Hypoxie-induzierbaren Faktors untersucht. Zusätzlich wurde der Einfluss von MMF auf die Stabilität von Erythropoetin und die Stabilität der Erythropoetin-mRNA untersucht.

3.1 Erythropoetinsekretion

Zu Beginn haben wir die grundlegenden Beobachtungen aus den Vorarbeiten reproduziert. Die Sekretion von Erythropoetin durch HepG2 Zellen war unter Einfluss von Mycophenolat Mofetil gehemmt.

3.1.1 Einfluss von MMF auf die EPO Produktion

In den Experimenten wurden die HepG2 Zellen wie in 2.3. beschrieben mit 5 μM MMF, 150 μM CoCl_2 behandelt und die Erythropoetinsekretion wurde im Zellüberstand der Zellen bestimmt. Dies wurde mit Hilfe von dem in 2.2.2 beschriebenen EPO ELISAs durchgeführt. Die Tabelle 4 veranschaulicht den Versuchsaufbau.

Tabelle 4: Übersicht zum Versuchsaufbau

1. Tag	2. Tag (24 Std.)	3.Tag (48 Std.)
MMF/DMSO dem Medium beifügen	Mediumwechsel und erneut MMF/DMSO hinzufügen Zusätzlich CoCl_2 auf alle Schalen	Zum Zeitpunkt 0: Ernte jeweils einer Schale mit MMF und mit DMSO Zusatz

CoCl_2 dient der Stimulation der HepG2-Zellen und imitiert den hypoxischen Zustand. Zu Beginn haben wir zum Vergleich, in Kooperation mit der Pharmakologie der JWG- Universität Frankfurt am Main, auch eine Stimulation in der Hypoxiekammer durchgeführt. Hier konnten wir keinen verbesserten

3 Ergebnisse

Effekt im Gegensatz zur Stimulation mit CoCl_2 beobachten (data not shown), so dass wir für die folgenden Versuch nur CoCl_2 Stimulation verwendeten.

Nach einer 48stündigen Inkubation mit $5 \mu\text{M}$ MMF reduzierte sich die EPO-Sekretion der HepG2 Zellen in den Zellkulturüberständen auf 44% im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 10). Als Kontrolle diente der Erythropoetingehalt im Zellüberstand von HepG2 Zellen nach Zugabe von DMSO.

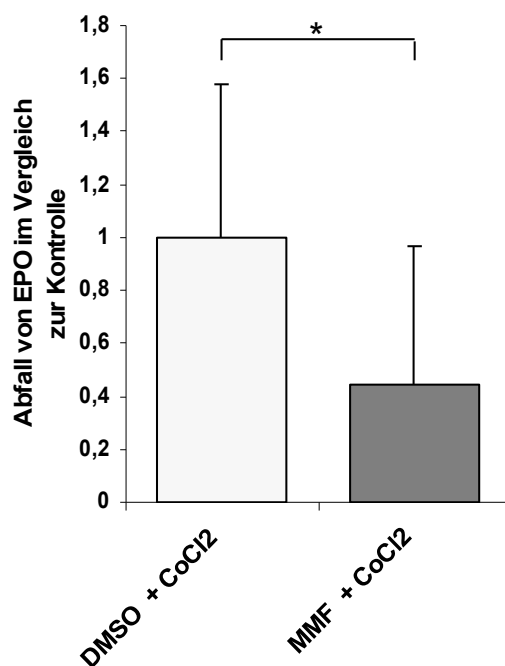


Abbildung 10: Effekt von MMF auf die EPO Produktion

Die Werte sind als Mittel von 9 unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Inkubationsdauer betrug stets 48 h MMF und 24 h CoCl_2 . Das EPO wurde mit Hilfe eines ELISAs gemessen. Die Kontrolle (DMSO + CoCl_2) entspricht 100%.

Mittel +SD. n=9. * $p = 0,015$

3.2 Expression der Erythropoetin mRNA

Wie in 3.1 beschrieben, fällt die Erythropoetinsekretion unter MMF signifikant ab. Es stellt sich die Frage, ob die beobachtete Reduktion der EPO-Sekretion auf Proteinebene oder transkriptionell reguliert wird.

3.2.1 Einfluss von Mycophenolat Mofetil auf die Erythropoetin mRNA Expression

In den hier durchgeführten Experimenten, wurden die HepG2 Zellen gemäß der Versuchsbeschreibung in 2.3.1 behandelt. Aus den HepG2 Zellen wurde dann die RNA isoliert und mittels quantitativer PCR, die EPO-mRNA-Expression bestimmt. Wie in Abbildung 11 dargestellt fiel die CoCl_2 induzierte Expression der EPO mRNA in den HepG2 Zellen unter MMF signifikant auf 36% im Vergleich zu den Kontrollzellen ab.

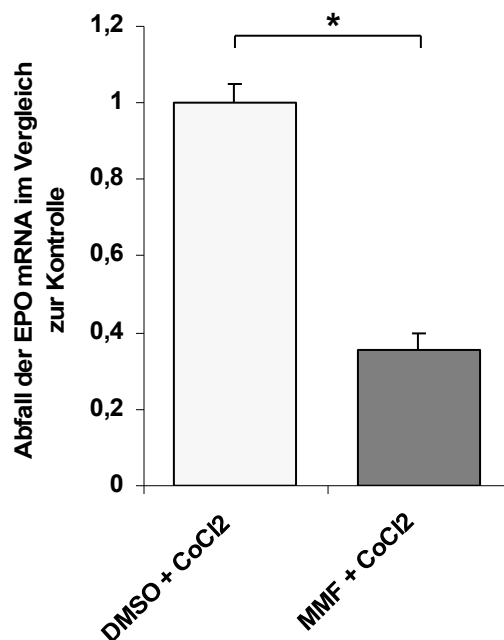


Abbildung 11: Effekt von MMF auf die Expression von EPO – mRNA

Die Werte sind als Mittel von 8 unabhängigen Experimenten und normalisiert zur 18S – RNA dargestellt. Die Zellen wurden mit MMF für 48 Stunden und mit CoCl_2 für 24h inkubiert. Die Auswertung erfolgt mittels Real-time-PCR. Die Kontrolle (DMSO) entspricht 100%. Mittel +SD. n=8. * p = 0

3.2.2 Zeitabhängiger Einfluss von Mycophenolat Mofetil auf die Erythropoetin Expression

Um die zeitliche Abhängigkeit des MMF Effektes auf die EPO-mRNA Expression in HepG2 Zellen zu untersuchen, wurden diese jeweils für 6, 12, 24

3 Ergebnisse

und 48 Stunden mit 5 μ M MMF inkubiert. Nach Isolation der RNA gemäß der Beschreibung in 2.2.4 wurde die RNA mittels Northern Blot quantifiziert.

Alle HepG2 Zellen wurden mit 5 μ M MMF für unterschiedliche Zeitdauern (6, 12, 24 und 48 Stunden) behandelt. Als Kontrolle diente RNA von HepG2 Zellen, welche für 48 Stunden mit DMSO inkubiert wurden. Wie in Abbildung 12 dargestellt, zeigt sich bereits nach einer Inkubationszeit von 12 Stunden ein geringer Abfall in der EPO mRNA Expression um 10%. Innerhalb des Beobachtungszeitraums war die größte Reduktion der EPO mRNA nach eine Inkubation mit 5 μ M MMF für 48 Stunden. Es zeigt sich hier ein Abfall auf 45% im Vergleich zur Kontrolle.

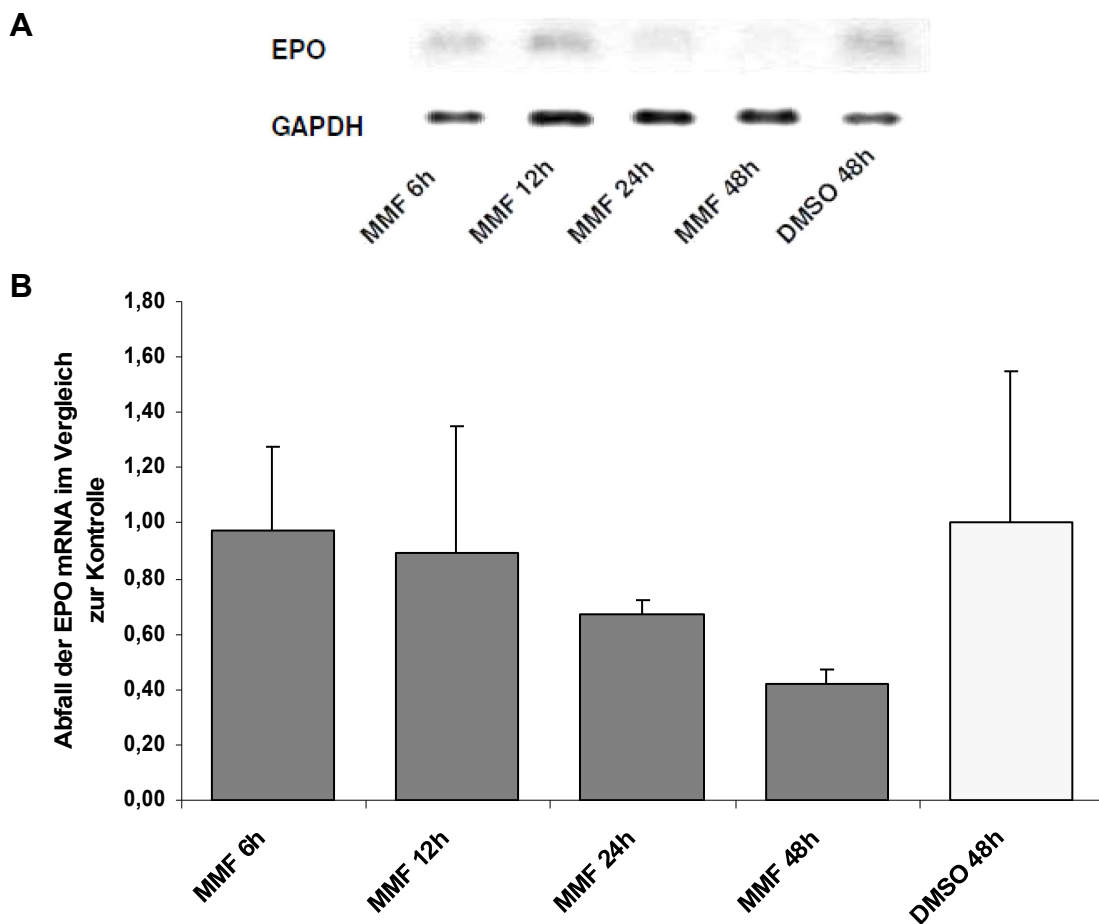


Abbildung 12: Zeitabhängigkeit des EPO-Abfalls unter der Behandlung mit MMF
12A: Repräsentativer EPO Northern Blot mit der GAPDH als Kontrolle.
12B: Densitometrische Auswertung. Hier dargestellt als Mittel von 2 unabhängigen Experimenten, normalisiert zur GAPDH. Die Zellen wurden mit MMF bzw DMSO für die oben angegebenen Zeiten behandelt. Der Wert DMSO 48h stellt die Kontrolle dar, welcher auf 100% gesetzt wurde. Mittel +SD. n=2. p= n.s.

3.3 Guanosinabhängigkeit des MMF-Effektes

Da Mycophenolat Mofetil wie unter 1.3.1 beschrieben, über eine Depletion der zellulären Guanosinvorräte durch eine reversible Hemmung der Inosinmonophosphatdehydrogenase (IMPDH) wirkt, haben wir die Spezifität der beobachteten Hemmung mittels Zugabe von Guanosin getestet.

Die Guanosinabhängigkeit des MMF Effektes ist ein Beweis dafür, dass die von uns beobachtete Reduktion der EPO mRNA eine spezifische MMF Wirkung ist. Um dies zu untermauern, wurden Versuche durchgeführt, in denen MMF behandelte HepG2 Zellen mit Guanosin supplementiert wurden.

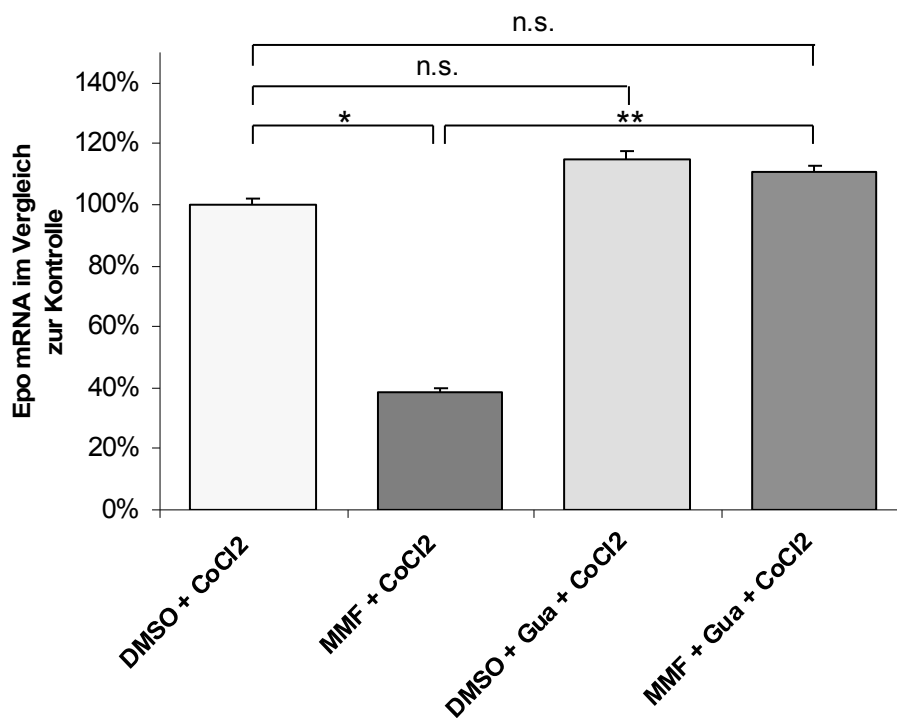


Abbildung 13: Aufhebung des inhibitorischen Effektes von MMF auf die EPO mRNA Synthese durch Guanosin (GUA)

Die Quantifizierung erfolgte mittels SYBR-Green-PCR. Die Werte sind als Mittel von 3 unabhängigen Experimenten und normalisiert zur 18S RNA dargestellt. Die Stimulationsdauer mit DMSO bzw. MMF und Gua betrug 48h, zusätzlich wurden alle Zellen mit CoCl₂ für 24 h stimuliert. Die DMSO Kontrolle entspricht 100 %. Mittel +SD. n=3. * p = 0.037, ** p = 0,05, n.s. = nicht signifikant

Hierbei war zu beobachten, dass der inhibitorische Effekt von 5 μM MMF auf die EPO mRNA Expression durch Zugabe von 100 μM Guanosin vollständig reversibel ist. Es zeigt sich statistisch kein signifikanter Unterschied zur DMSO behandelten Kontrolle. Zudem zeigt sich, dargestellt in Abbildung 13, dass Guanosin keinen induzierenden Effekt auf die EPO mRNA Expression hat, da alleinige Zugabe von Guanosin und CoCl_2 zur Kontrolle zu keinem signifikanten Anstieg der EPO mRNA führt. Somit ist der inhibitorische Effekt von MMF, IMPDH und guanosinabhängig.

3.4 Spezifität des MMF-Effektes auf die EPO-mRNA

Um die Frage zu klären, ob MMF nur die Expression der EPO mRNA spezifisch inhibiert oder ob MMF vielleicht die gesamte Transkription unspezifisch drosselt, wurde deshalb die mRNA Expression eines in Leberzellen konstitutiv exprimierten Proteins, des α_1 -Fetoproteins, mittel Real-time PCR bestimmt. Sollte MMF die Transkription allgemein inhibieren, sollten sich also auch beim α_1 -Fetoprotein Effekte zeigen.

3.4.1 Einfluss von MMF auf die α_1 Fetoprotein mRNA Expression

Die Stimulation erfolgt analog zu den unter 3.1.1 beschriebenen Versuchen zur EPO mRNA Expression.

In diesen Untersuchungen zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Expression der α_1 -Fetoprotein mRNA zur Kontrolle. Im Vergleich zur EPO mRNA wird die α_1 -Fetoprotein mRNA Expression durch MMF nicht reduziert. Somit scheint der MMF Effekt spezifisch zu sein.

3.5 Proteininstabilität als Regulationsmechanismus

Der Effekt von MMF auf die Erythropoetinsynthese und die Erythropoetin mRNA Expression und deren Spezifität wurde nun untersucht und dargestellt. Um den dafür verantwortlichen Regulationsmechanismus zu erforschen, wurden

3 Ergebnisse

Experimente durchgeführt, welche die Abbaugeschwindigkeit von Erythropoetin unter MMF im Vergleich zur DMSO Kontrolle untersuchen.

3.5.1 Proteinstabilität von EPO unter MMF

Um die Stabilität von Erythropoetin zu beurteilen, wurden die HepG2 Zellen, wie in 2.3 beschrieben, mit MMF für 48 Stunden und für die letzten 24 Stunden zusätzlich mit CoCl_2 inkubiert. Zum Zeitpunkt 0 wurde Cycloheximid hinzugegeben, welches die weitere Translation von der gesamten mRNA unterbricht. Ab diesem Zeitpunkt findet nur noch ein Abbau von Proteinen statt.

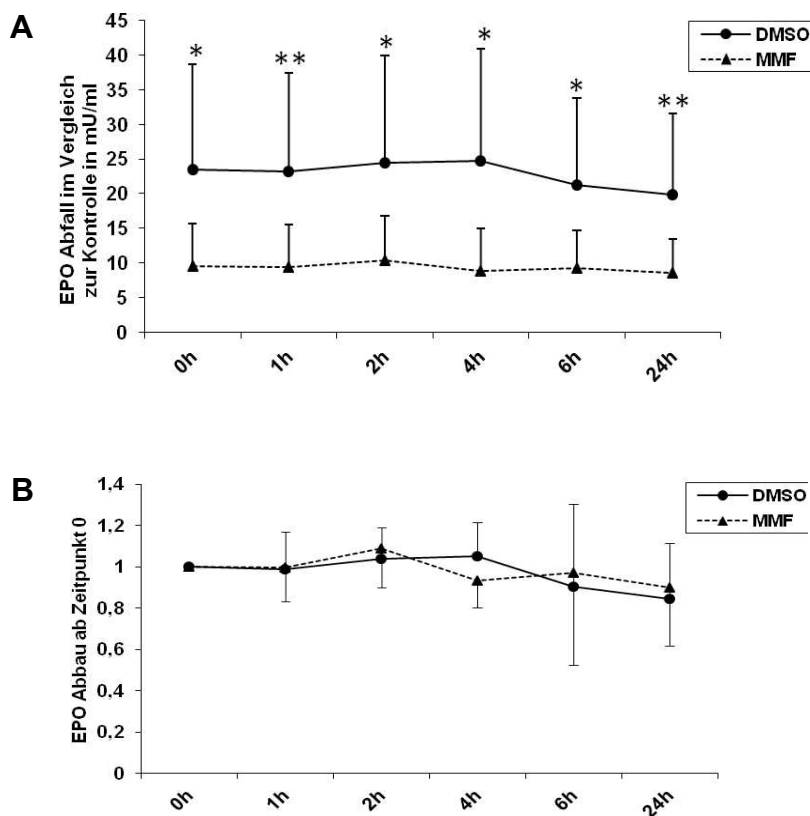


Abbildung 14: Stabilität des EPO Proteins im Zellkulturüberstand unter MMF

Die Werte sind dargestellt als Mittel von 9 unabhängigen Experimenten. Inkubation als erstes mit MMF für 48 h und zusätzlich mit CoCl_2 für die letzten 24 h, danach wurden zum Zeitpunkt 0 die Zellen mit Cycloheximid behandelt. Das EPO wurde mit Hilfe eines ELISAs gemessen. Die Abbildung 14A und B zeigen denselben Versuch.

Abbildung A: Dargestellt sind die absoluten Werte, Mittel +SD. n=9. * $p < 0,02$, ** $p < 0,006$

Abbildung B: Darstellung bezogen auf zwei unabhängige Kontrollen, einmal für DMSO und einmal für MMF zum Zeitpunkt 0, welche jeweils 100% entsprechen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Abbaugeschwindigkeit von EPO dargestellt werden. Mittel +/- SD. n=9. $p = \text{n.s.}$

Man kann also den Abbau des Erythropoietins beurteilen, indem man Zellüberstände zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Cycloheximidzugabe entnimmt und mittel ELISA den EPO-Gehalt im Zellüberstand misst. Die Abbildungen 14A und B zeigt denselben Versuch in zwei unterschiedlichen Darstellungsweisen: In Abbildung 14A sind die absoluten Werte dargestellt und in Abbildung 14B ist der Wert zum Zeitpunkt 0 als 100% festgelegt, um dann den möglichen Abbau des EPOs zu beurteilen. Es zeigt sich kein gesteigerter Abbau von EPO in den HepG2 Zellen nach Zugabe von MMF. In Abbildung 14A sind die absoluten Werte des Erythropoietins dargestellt. Es zeigt sich zu jedem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied in der EPO Sekretion zwischen den mit MMF behandelten Zellen und den DMSO Kontrollen.

3.6 Stabilität der EPO-mRNA als Regulationsmechanismus

In 3.5.1 wurde gezeigt, dass die Stabilität des EPO-Proteins durch MMF nicht beeinflusst wird. Als nächstes wurden nun Untersuchungen durchgeführt, welche die Stabilität der EPO-mRNA unter dem Einfluss von MMF beurteilen sollen. Diese Fragestellung wurde mittels zweier unabhängiger Ansätze zu beantworten versucht. Zum einen wurden Versuche mit Actinomycin D durchgeführt und zum anderen wurde, um einen unspezifische Effekt von Actinomycin D auszuschließen, die RNA Stabilität durch In-vitro-Degradationsversuche (2.3.3) bestimmt.

3.6.1 Untersuchung der EPO-mRNA Stabilität mittels Actinomycin-D

Für die Beurteilung der Stabilität der Erythropoetin-mRNA wurden Experimente analog zur Beschreibung in 2.3 durchgeführt. Nach CoCl_2 Stimulation entweder allein oder unter gleichzeitigem Einfluss von MMF wurde zum Zeitpunkt 0 Actinomycin D, als Transkriptionsinhibitor hinzugefügt (Unter Actinomycin D findet keine Neuesynthese der RNA statt. Änderungen in der Gesamtmenge einer RNA beruhen also auf deren Abbaukinetik). Um den Abbau der EPO mRNA darzustellen wurden, nach Zugabe von Actinomycin D zum Zeitpunkt 0, nach 0, 1, 2, 4, 6 und 24 Stunden (gemäß 2.2.4) die RNA isoliert und mittels

3 Ergebnisse

Real-time PCR (2.2.6) die EPO-Expression bestimmt. In diesen Versuchen zeigt sich kein verstärkter Abbau der EPO mRNA unter MMF.

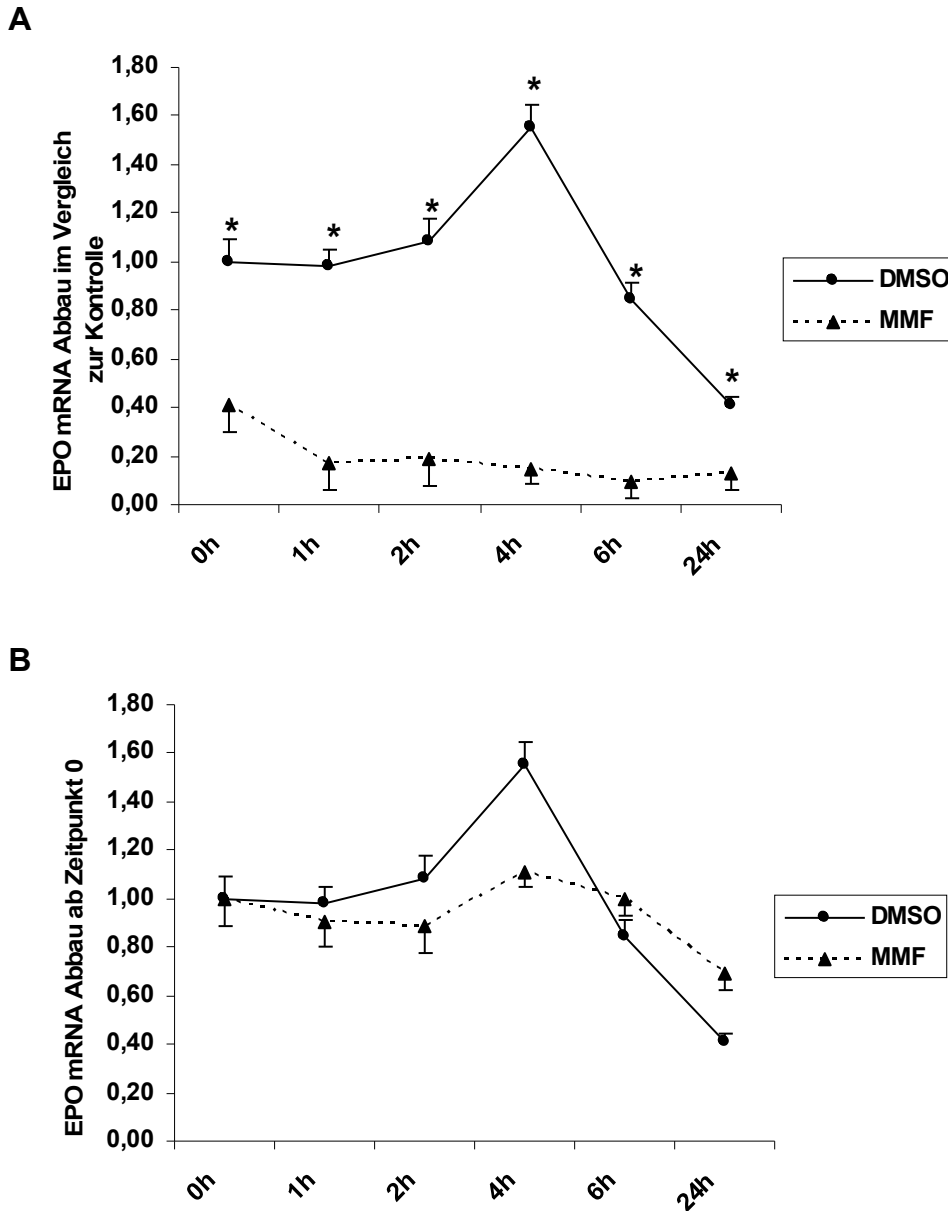


Abbildung 15: Stabilität von EPO mRNA unter MMF

Die Vorinkubation der Zellen mit MMF bis zum Zeitpunkt 0 betrug stets 48 h und mit CoCl_2 24 h. Zum Zeitpunkt 0 wurden die Zellen mit Actinomycin behandelt und dann wurde die RNA zu den oben angegebenen Zeitpunkten geerntet. Die EPO-RNA wurde mittels Real-time-PCR quantifiziert. Die Werte sind als Mittel von fünf unabhängigen Experimenten dargestellt und sind zur 18S-RNA normalisiert. Die Abbildungen A und B zeigen denselben Versuch in zwei unterschiedlichen Darstellungsweisen:

15A: Als Kontrolle dient DMSO zum Zeitpunkt 0 und entspricht 100%.

Mittel \pm SD. N=5. * $p < 0,03$

15B: Die Werte für DMSO und MMF wurden beide auf den jeweiligen Ausgangswert zum Zeitpunkt 0 normalisiert und als 100% dargestellt. Mittel \pm SD. N=5. $p = \text{n.s.}$

In den Abbildungen 15A und B wird derselbe Versuch dargestellt, einmal dient DMSO als Kontrolle und stellt zum Zeitpunkt 0 100% dar (15A) und einmal werden die Werte für DMSO und MMF beide auf den jeweiligen Ausgangswert zum Zeitpunkt 0 normalisiert (welcher jeweils 100% entspricht), um dann den möglichen Abbau der EPO-mRNA zu beurteilen (15B). Es findet sich kein statistisch relevanter Unterschied in der Abbaugeschwindigkeit der RNA zwischen den beiden Gruppen. Bei einem Bezug auf die DMSO-Kontrolle zum Zeitpunkt 0 zeigt sich in der Abbildung 15A zu jedem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen der EPO mRNA der MMF-Gruppe und der Kontrollgruppe.

3.6.2 Bestimmung der Stabilität der EPO-mRNA mittels In-vitro-Degradation

Um mögliche unspezifische Effekte von Actinomycin auszuschließen wurde die Stabilität der EPO-mRNA mit einer weiteren unabhängigen Methode bestimmt. Die praktische Durchführung ist in 2.3.3 ausführlich beschrieben. Bei einem RNA-Lysat-Verhältnis von 1:2 zeigte sich nach einer Reaktionszeit von 10 Minuten ein starker Abfall sowohl der EPO als auch der 18S-RNA unter 40% der Ausgangsmenge, dargestellt in Abbildung 16A und B.

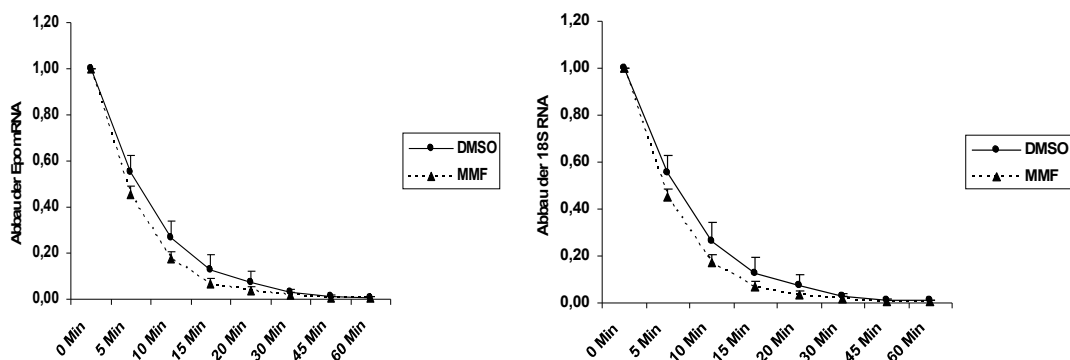


Abbildung 16: Stabilität der EPO mRNA unter MMF: RNA/Lysat 1:2

Als Experimente wurden In-vitro-Degradationsversuche durchgeführt, in denen die mRNA durch Lysate vorstimulierter Zellen in vitro abgebaut wurde. Zu den oben angegebenen Zeitpunkten wurde die Reaktion gestoppt und die übrig gebliebene RNA isoliert. Die Auswertung erfolgte mittels SYBR-Green-PCR. Dargestellt ist in Abbildung A der Abbau der EPO mRNA und in Abbildung B der Abbau der 18 S RNA. Mittel +SD. N=2. p=n.s.

3 Ergebnisse

Um das richtige RNA-Lysat-Verhältnis herauszufinden, wurden als nächstes Versuche mit einem geringeren Anteil von Lysat durchgeführt. Die Degradationsversuche wurden mit Verhältnissen Lysat zu RNA von 1:1,5, 1:5 und 1:50 durchgeführt. Bei einem Verhältnis von 1:50 konnte kein starker Abbau der 18S-RNA mehr festgestellt werden, so dass dieses Verhältnis den Ausgangspunkt für die nächsten Versuche darstellte. Diese Versuche sind in Abbildung 17 dargestellt. Auch hier zeigt sich, ähnlich den Actinomycin D Versuchen in 3.6.1, keine erhöhte Degradation der EPO mRNA unter dem Einfluss von MMF im Vergleich zur Kontrolle.

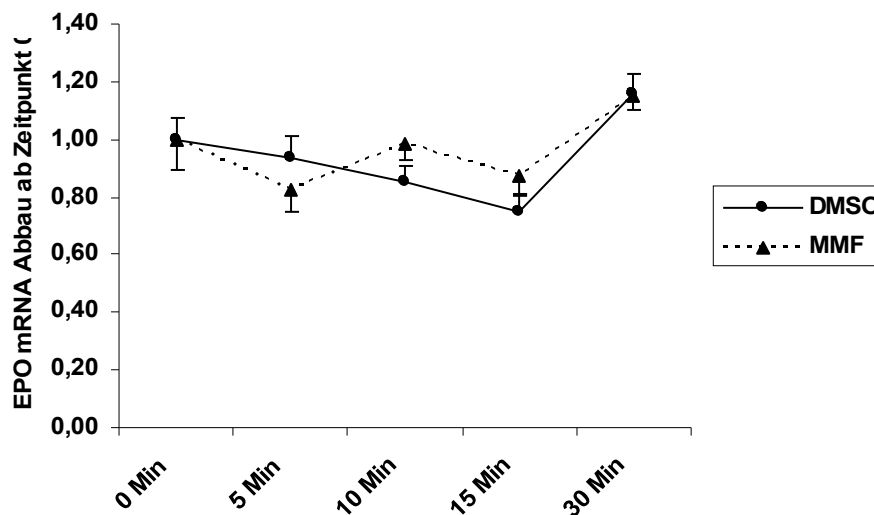


Abbildung 17: Stabilität der EPO mRNA unter MMF: RNA/Lysat 50:1

Als Experimente wurden In-vitro-Degradationsversuche durchgeführt, indem RNA und Lysat (Verhältnis 50:1) miteinander reagierten. Zu den oben angegebenen Zeitpunkten wurde die Reaktion gestoppt und die übrig gebliebene RNA isoliert. Die Auswertung erfolgte mittels SYBR-Green-PCR. Dargestellt sind hier die Werte als Mittel von 3 unabhängigen Experimenten normalisiert zur 18S RNA. Es gibt zwei unabhängige Kontrollen, einmal für DMSO und einmal für MMF zum Zeitpunkt 0, welche jeweils 100% entsprechen. Mittel +SD. n=3. p= n.s.

3.6.3 Stabilität der α_1 -Fetoprotein mRNA im In-vitro-Degradationsassay

Da Alpha₁-Fetoproteins (AFP) wird von den HepG2 Zellen konstitutiv gebildet wird, wurde die Stabilität der AFP-mRNA als Kontrolle untersucht. Hierbei zeigte sich, wie in Abbildung 18 dargestellt, dass wie zuvor bei der EPO-mRNA, kein verstärkter Abbau der AFP-mRNA unter MMF nachzuweisen war.

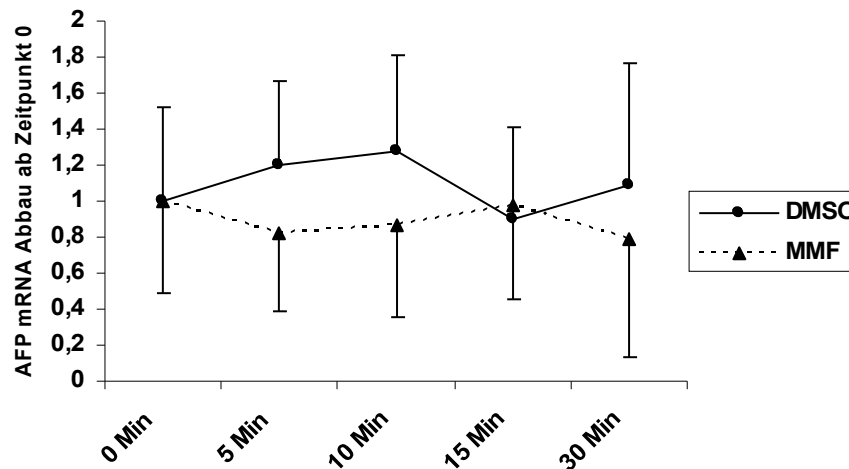


Abbildung 18: Stabilität der α_1 -Feto-Protein mRNA unter MMF: RNA/Lysat 50:1

Als Experimente wurden In-vitro-Degradationsversuche durchgeführt, indem RNA und Lysat miteinander reagierten. Zu den oben angegebenen Zeitpunkten wurde die Reaktion gestoppt und die RNA isoliert. Die nicht degradierte EPO RNA wurde mittels SYBR-Green-PCR quantifiziert. Dargestellt sind hier die Werte als Mittel von 3 unabhängigen Experimenten normalisiert zur 18S RNA. Die absoluten Werte wurden jeweils auf die entsprechenden Kontrollen normiert (für DMSO bzw für MMF zum Zeitpunkt Null), welche jeweils auf 100% gesetzt wurden.

Mittel +SD. n=3. p= n.s.

3.7 Effekt von MMF auf die Proteinexpression des Hypoxie-induzierbaren Faktor 1

Da die EPO-Synthese unter anderem durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 beeinflusst wird (wie unter 1.4.1 beschrieben), haben wir vermutet, dass der Einfluss von MMF auf die EPO Synthese über die Regulation der Verfügbarkeit des Hypoxie-induzierbaren Faktors vermittelt werden könnte.

Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden HepG2 Zellen für 2, 7, 10, 14, 16 und 24 Stunden mit MMF oder als Kontrolle mit DMSO behandelt. Alle Zellen wurden für 2 Stunden 150 μ M CoCl₂ inkubiert. Zu den oben angegebenen Zeitpunkten wurden die Proteine geerntet und HIF-1 alpha mittels Western Blot semiquantitativ dargestellt. Abbildung 19A zeigt ein typisches Ergebnis eines solchen Western Blots und in Abbildung 19B ist die densitometrische Auswertung als Mittel von 3 unabhängigen Experimenten dargestellt.

3 Ergebnisse

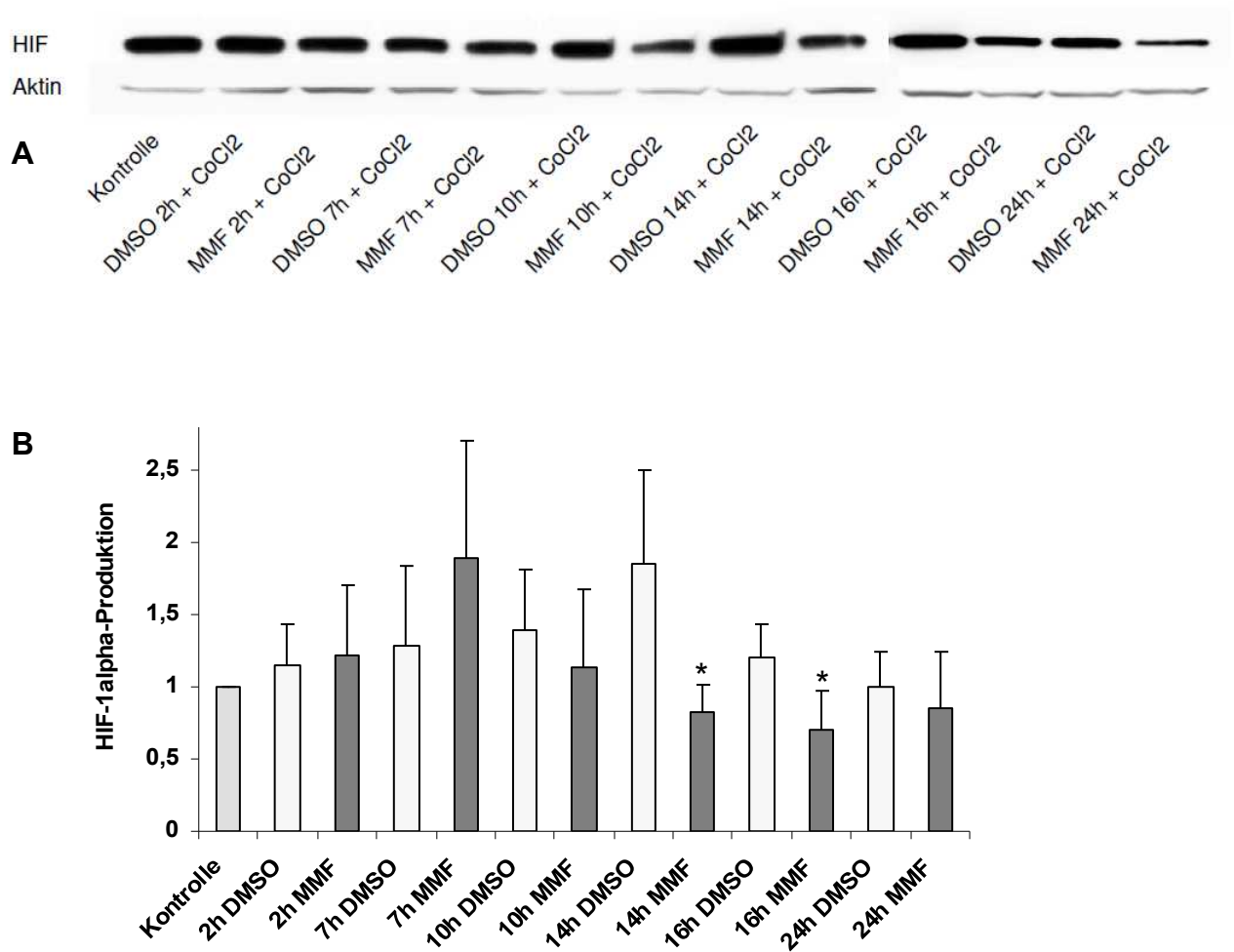


Abbildung 19: Effekt von MMF auf die Produktion des HIF-1 α

19A: Repräsentativer HIF-1-alpha Western Blot und Aktin als Kontrolle.

Alle HepG2 Zellen wurden mit CoCl₂ für 2 h und mit MMF bzw. DMSO für die oben angegebene Zeit stimuliert. Die Kontrolle wurde nur für 2 Stunden mit CoCl₂ stimuliert.

19B: Dargestellt ist die densitometrische Auswertung der Western Blots als Mittel von 3 unabhängigen Experimenten und normalisiert zu Aktin. Mittel +SD. n=3. * p = 0,037

In beiden Abbildungen zeigt sich eine Abnahme von HIF-1- α unter MMF nach einer Stimulationsdauer von 10 Stunden. Der Effekt ist weiterhin deutlich bei 14, 16 und nur noch leicht bei 24 Stunden Stimulation zu sehen. Für die 14 und 16 Stunden Werte unterscheiden sich die Werte für die MMF-behandelten Zellen signifikant von der Kontrolle.

3.7.1 Effekt von MMF auf die HIF-1- α mRNA

Da der zelluläre Proteingehalt der HIF-1 α -Untereinheit unter MMF verringert war, haben wir als nächstes überprüft, ob diese Regulation auf mRNA Ebene stattfinden könnte.

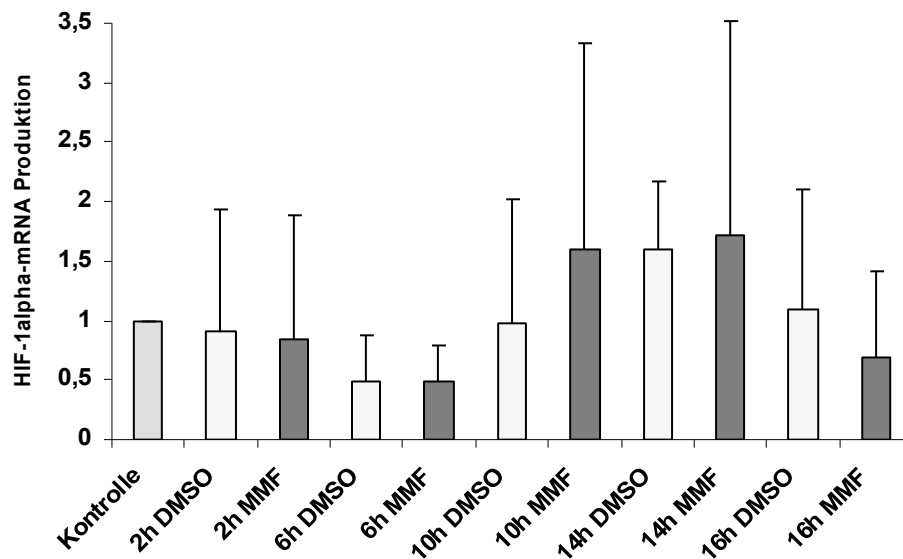


Abbildung 20: Effekt von MMF auf die mRNA des HIF-1 α

HepG2 Zellen wurden für 2 h mit CoCl₂ inkubiert und anschließend mit MMF bzw. DMSO für die angegebenen Zeiten behandelt. Der Kontrollwert, der auf 100% gesetzt ist, entspricht Zellen, die direkt nach der 2 stündigen Inkubation mit CoCl₂ geerntet wurden. Dargestellt ist das Mittel der zur 18S RNA normalisierten Werte aus 3 unabhängigen Experimenten. Mittel +SD. N=3, p=n.s.

Dazu wurden HepG2 Zellen, die mit 150 μ M CoCl₂ für 2 Stunden vorinkubiert waren, für 2, 6, 10, 14 und 16 Stunden mit MMF und als Kontrolle mit DMSO behandelt. Zu den angegebenen Zeiten wurde die RNA geerntet, und die HIF-1 α RNA mittels SYBR Green PCR qualitativ bestimmt. Wie in Abbildung 20 dargestellt, zeigte sich keine signifikante Reduktion der HIF-1 α mRNA unter MMF.

4 Diskussion

Das Ziel der Arbeit war es den Mechanismus für die MMF-induzierten Anämien bei nierentransplantierten Patienten genauer zu untersuchen. Voruntersuchungen zu diesem Thema in unserem Labor haben gezeigt, dass die Erythropoetinsekretion in HepG2 Zellen durch MMF spezifisch reduziert wurde [101]. Da die Hauptfunktion des EPOs die Aktivierung der Erythropoese ist, konnte ein Zusammenhang zwischen der vermindert EPO Sekretion unter MMF und Anämien unter immunsuppressiver Therapie mit MMF angenommen werden. Um Angriffspunkte für mögliche neue Therapieansätze zu finden, mit deren Hilfe MMF induzierte Anämien behandelt werden können, war das Ziel dieser Arbeit, die EPO-vermittelten Effekte von MMF auf die Hämatopoese auf Protein und auf RNA Ebene zu untersuchen. Der Fokus wurde hierbei auf Regulationsmechanismen gelegt, die über die Beeinflussung der Protein oder RNA Stabilität vermittelt werden. Aus Vorarbeiten war bekannt, dass die spezifische Wirkung von MMF auf die EPO-Sekretion nicht durch veränderte EPO-Glykosylierung beeinflusst wird [101]. In der vorliegenden Doktorarbeit war unsere Arbeitshypothese, dass die Stabilität des Erythropoetins oder der EPO mRNA unter dem Einfluss von MMF in HepG2 Zellen reduziert wird. Diese Hypothese gründet in Beobachtungen, dass bestimmte hypoxieregulierten Genen wie VEGF [68] und Tyrosinhydroxylase [20] über Stabilitätsänderungen reguliert werden, wobei es auch erste Daten zu analogen Regulationsmechanismen bei EPO selbst bereits vorliegen [34].

4.1 Versuchsbedingungen

4.1.1 Mycophenolat Mofetil

Unter der Therapie mit MMF treten neben anderen Nebenwirkungen, trotz einer selektiven Wirkung auf Lymphozyten, häufig Anämien auf. Dies wurde in mehreren klinischen Multicenter Studien gezeigt [1, 3, 119]. Da eine verminderte EPO-Synthese, welcher eine geringere Bildung von Erythrozyten

folgt, einen Grund für diese MMF induzierten Anämien darstellen könnte, wurde in dieser Arbeit der Einfluss von MMF auf die EPO Synthese in HepG2 Zellen untersucht und Ansätze für einen möglichen Regulationsmechanismus gesucht. Wenn der Regulationsmechanismus der verminderten EPO Synthese dargestellt werden kann, bietet diese Erkenntnis einen möglichen medikamentösen Angriffspunkt, um die unerwünschten, durch MMF induzierten Anämien zu verhindern.

In den Experimenten wurde MMF in therapeutisch relevanten Konzentrationen eingesetzt [120], so dass toxische Zelleffekte möglichst vermieden wurden.

Das nur schwer wasserlösliche MMF wurde für die Experimente mit Dimethylsulfoxid (DMSO) in Lösung gebracht. Als Standard wurden in allen Versuchen stets Kontrollen mit reinem DMSO mitgeführt.

Die Auswahl der Inkubationszeiten mit MMF beruhte auf den Ergebnissen von Voruntersuchungen in unserem Labor. Hier zeigte sich eine effektive Reduktion von EPO bei einer Stimulationsdauer von 48 Stunden und einer Endkonzentration von 5 μM MMF, ohne dass eine Verminderung der Zellzahl oder Zellvitalität zu beobachten war [101]. In anderen Laboren haben sich bei unabhängigen Studien ebenfalls Inkubationszeiten von 48 Stunden bei Untersuchungen von Hypoxie, EPO mRNA und EPO Genexpression bewährt [48, 113]. Innerhalb des relativ langen Stimulationszeitraums können sich potentielle kleinere Effekte von MMF gegebenenfalls addieren und so einen Unterschied zur Kontrolle deutlicher zu Tage treten lassen.

4.1.2 HepG2 Zellen

Die Versuche wurden mit humanen Hepatoma Zellen der HepG2 Linie durchgeführt. Da zurzeit noch kein auf Nierenzellen basierendes Zellkulturmodell für die hypoxieinduzierte Erythropoetinsynthese etabliert werden konnte, sind die HepG2 und Hep3B Zellen die Standardmodelle zur Untersuchung der EPO Synthese [35]. Die aus Biopsien eines menschlichen

primären Hepatoblastoms etablierten HepG2 Zellen produzieren ähnlich normaler Leberparenchymzellen eine Anzahl von Serumproteinen wie zum Beispiel Albumin, α_1 -Antitypsin, α_1 -Fetoprotein, Transferrin, Haptoglobin, Komplementfaktoren wie C₃ und C₄, Fibrinogen [59] und Erythropoetin [85]. Trotz dieser Analogien ist jedoch in Betracht zu ziehen, dass Nierenzellen und Leberzellen möglicherweise eine unterschiedliche Sensitivität für MMF aufweisen könnten und somit die in vitro Wirkungen von MMF auf HepG2 Zellen nicht unmittelbar auf die in vivo Wirkung von MMF auf Nierenzellen übertragen werden können. Während der fetalen Entwicklung produziert die Leber den Hauptanteil des EPOs, aber nach der Geburt übernehmen Zellen der Niere diese Aufgabe [52]. An transgenen Mäusen haben *Semenza et al.* gezeigt, dass es Unterschiede in der Regulation der EPO Expression in Leber und Niere gibt [112] (siehe Abbildung 6). Eine Regulation der EPO Genexpression durch verschiedene regulatorische DNA Elemente impliziert, dass unterschiedliche Transkriptionsfaktoren an der Regulation der EPO Genexpression in der Niere und der Leber eine Rolle spielen [112]. MMF könnte somit in der Leber und der Niere unterschiedliche Transkriptionsfaktoren beeinflussen und dadurch unterschiedliche Wirkungen ausüben. 2010 gelang es *Frede et al.* erstmals eine humane renale Zelllinie aus Patienten mit Nierenkarzinom zu isolieren, welche sauerstoffabhängig EPO produzieren [32]. Außerdem konnte eine renale Zelllinie, welche spezifisch EPO während der Anämie exprimiert, aus genetisch veränderten Mäusen gewonnen werden [92]. Durch die Isolation von renalen EPO produzierenden Zelllinien ermöglichen sich nun für die Zukunft ganz neue Möglichkeiten zur weiteren Erforschung der sauerstoffabhängigen Regulationsmechanismen der EPO Synthese.

HepG2 Zellen sezernieren konstitutiv EPO in das Zellkulturmedium [85]. Diese EPO Sekretion kann unter anderem durch Hypoxie und CoCl₂ stark induziert werden [35]. Dies konnte in vivo an anämischen Ratten gezeigt werden, welche nach CoCl₂ Behandlung eine erhöhte Transkription der Erythropoietin Gene in der Niere aufwiesen [109]. 50 μ M CoCl₂ für 24 Stunden können die Reaktion von HepG2 Zellen auf Hypoxie imitieren, indem sie an den Porphyrinring im

Hämteil des Hämoglobins binden und Eisen ersetzen. Dies macht eine Sauerstoffbindung unmöglich, wodurch die Hypoxie imitiert wird [35, 128]. Von einigen Autoren wurden auch bis zu 150 μM CoCl_2 zur Induktion eines Hypoxie-analogen Zustandes in HepG2 Zellen verwendet [95]. Da eine Modulation durch MMF bei induzierter Genexpression einfacher zu untersuchen ist als unter Basalbedingungen, haben wir in unseren Versuchen 150 μM CoCl_2 verwendet. Da die HIF-1 α -Untereinheit unter normoxischen Bedingungen nicht detektierbar ist [55, 128], war bei der Darstellung von HIF-1 α im Western Blot eine Stimulation mit CoCl_2 unverzichtbar.

HepG2 Zellen zeigten während der Versuche teilweise sehr unterschiedliche Wachstums- und EPO Sekretionsraten. In unseren Versuchen lag die EPO Sekretion nach 24 Stunden im Durchschnitt bei 10 mU/mg Zellprotein in den DMSO behandelten Zellen, und bei 6 mU/mg Zellprotein bei den MMF behandelten Zellen. Dies liegt weit unter der von *Schobersberger et al.* und *Herkens et al.* beschriebenen EPO Sekretion [44, 108]. Diese Unterschiede in der EPO Sekretion könnten verschiedene Gründe haben. *Schobersberger et al.* und *Herkens et al.* verwendeten kein CoCl_2 , sondern setzten die Zellen perizellulärer Hypoxie aus. Möglicherweise bewirkt CoCl_2 eine weniger starke Induktion im Vergleich zur Hypoxie, da dies *Goldberg et al.* bei Hep3B Zellen ebenfalls beobachten konnte [35]. CoCl_2 wirkt durch eine Verdrängung von Eisen. Dieses wird einerseits aus dem Hämoglobin [33] und andererseits aus den eisenabhängigen Hydroxylasen verdrängt [22]. Dadurch wird das Hämoglobin in der Deoxy-Formation gehalten, wie bei der Hypoxie [33]. Außerdem wird der eisenabhängige Abbau von HIF-1 α verhindert [22], wodurch wie bei der Hypoxie mehr HIF-1 α zur Verfügung gestellt wird und so auch vermehrt EPO gebildet wird. Möglicherweise findet hier keine vollständige Verdrängung des Eisens statt, so dass deshalb CoCl_2 eine geringere Induktion der EPO Sekretion bewirkt als die Hypoxie. Außerdem ist bekannt, dass Proteine, wie z.B. das ERBP, unter Hypoxie an die pyrimidinreiche Region der 3'UTR der EPO mRNA binden und dadurch deren Stabilität erhöhen [75]. An diesem Punkt der Regulation kann CoCl_2 , soweit bisher bekannt ist, nicht

eingreifen. Um auszuschließen, dass ein vermindertes Ansprechen unserer HepG2-Zellen durch eine insuffiziente chemische Hypoxie-Induktion bedingt ist, haben wir den hypoxischen Zustand direkt in einer Hypoxiekammer (Sauerstoff wird durch Stickstoff ersetzt) erzeugt. Trotzdem ließ sich keine höhere EPO Sekretionsrate induzieren. Weiterhin könnte der Konfluenzgrad der HepG2 Zellen eine Rolle spielen. Die EPO Produktion und auch die Induzierbarkeit durch Hypoxie hängt stark von der Zelldichte ab [35, 85]. Außerdem haben *Metzen et al.* gezeigt, dass je nach Schichtdicke des Mediums in Zellen unterschiedlich perizelluläre Hypoxien entstehen [78]. Das heißt, je mehr die Zellen von Medium bedeckt sind, desto mehr Hypoxie entsteht um die Zellen herum. Da wir nur 0,06 ml Medium pro cm² einsetzten, könnte es sein, dass die HepG2 Zellen bei uns weniger perizelluläre Hypoxie aufwiesen als bei *Schobersberger et al.*, der 0,5 ml Medium pro cm² einsetzte. Perizelluläre Hypoxie wird nach *Wolff et al* durch eine Inkubation bei 5% CO₂ und 20-60 % O₂ erreicht, wenn die Zellen in einer sauerstoffundurchlässigen Kulturflasche wachsen [131]. Unsere Zellen sind in sauerstoffdurchlässigen Kulturflaschen gewachsen, so dass dies ebenfalls dafür spricht, dass unsere Zellen weniger perizellulärer Hypoxie ausgesetzt waren. Zuletzt sollte das langjährige Bestehen der Zelllinie nicht unterschätzt werden. Im Laufe der langen Zeit könnten Zellen mit niedrigerer EPO Expressionsrate selektiert worden sein.

Es wird beschrieben, dass HepG2 Zellen im Gegensatz zu der Hep3B Zelllinie eine geringere EPO Produktion und eine geringere Induzierbarkeit bei Hypoxie aufweisen [35, 44]. Wir haben in einigen Experimenten Hep3B Zellen zur Kontrolle dieses Effektes verwendet, aber auch hier konnte keine eindeutig erhöhte EPO Produktion im Gegensatz zu den HepG2 Zellen in unseren Versuchen gefunden werden.

Da der Effekt von MMF kontinuierlich und eindeutig darstellbar war, haben wir die Experimente schließlich trotz geringer EPO Sekretion mit HepG2 Zellen fortgeführt.

4.1.3 Methoden

Die Zellüberstände, die zur EPO Bestimmung mittels ELISA abgenommen wurden, wurden nach Gewinnung bei -20 °C eingefroren. Der ELISA wurde innerhalb der nächsten ein bis drei Wochen durchgeführt. In der Anleitung zum EPO-ELISA wird beschrieben, dass die Proben für 6 Wochen bei -20 °C stabil sind. Diese Vorgehensweise entspricht der Durchführung in anderen Laboren [15, 26]. Eine Degradation des EPOs während der Lagerung kann somit als unwahrscheinlich angesehen werden.

RNA Proben, welche später mittels Northern Blot oder quantitativer PCR untersucht wurden, wurden stets nach der Ernte bei -20 °C eingefroren. Vor dem nächsten Gebrauch wurden die Proben auf Eis gekühlt aufgetaut und stets gekühlt gehalten. Weiterhin waren alle eingesetzten Reagenzien RNase frei, teilweise durch Behandlung mit DEPC. Durch diese Maßnahmen war eine verstärkte unkontrollierte Degradation der RNA nicht zu erwarten und somit eine Verfälschung der Ergebnisse unwahrscheinlich.

Für den Northern Blot wurden spezifische Sonden für die EPO mRNA verwendet. Die detektierten Banden lagen in einem Bereich von etwa 1600 Basenpaaren, welche der Größe der EPO mRNA entspricht [50]. Die Spezifität der Detektion bei der Real-time PCR wurde bei der SYBR Green PCR zunächst nur durch die Spezifität der verwendeten Primer gewährleistet. Anschließend wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, welche eine einheitliche Bande mit der entsprechenden Schmelztemperatur zeigte (siehe 2.2.6.3) [14]. Wir haben außerdem die Spezifität mittels Sonden-basierender Taqman Real-time PCR überprüft. Bei dieser Methode sind die Sonden spezifisch für die EPO mRNA, so dass hier die Spezifität des Signals durch die Sonden sichergestellt wird (siehe 2.2.6.2) [14].

Eine Degradierung der Proteine wurde durch das Zufügen von Proteaseinhibitoren und durch Einfrieren bei -80 °C und ständiger Kühlung auf Eis während der Versuche verhindert. Die Verwendung von spezifischen

Sonden für die HIF-1 α -Untereinheit bei der Durchführung des Western Blots konnte die Spezifität des Signals sicherstellen. Da sich das Signal zwischen 100 und 130 kD im Western Blot darstellte, war bei einer bekannten Größe der HIF-1 α -Untereinheit von 120 kD [22] anzunehmen, dass das Signal spezifisch für diese ist.

Ein Limitation in der abschließenden Interpretierbarkeit der In-vitro-Degradationsversuche mit HepG2 Lysaten liegt darin, dass diese Methode noch nicht durch Kontrollen mit bekannten stabilitätsregulierten mRNAs (z.B. die von Tyrosinhydroxylase, VEGF) verifiziert wurden.

4.2 Ergebnisse

Wir konnten zeigen, dass bei einer Konzentration von 5 μ M MMF die EPO Sekretion in HepG2 Zellen im Vergleich zur Kontrolle auf 44% reduziert war. Dieses Ergebnis entspricht den Daten der Voruntersuchungen in unserem Labor [101], so dass eine Reproduzierbarkeit der Daten gegeben ist. Auf der RNA Ebene konnten wir diesen Effekt noch deutlicher darstellen. Hier zeigte sich unter 5 μ M MMF eine Reduktion der EPO mRNA auf 36%. Diese direkte Korrelation zwischen der EPO Produktion und den zellulären EPO mRNA Spiegeln konnte auch in anderen Laboren gezeigt werden [35, 44]. Für diese Wirkung konnten wir außerdem eine Zeitabhängigkeit zeigen. Nach einer Stimulation mit MMF für 24 Stunden konnten wir eine geringe Abnahme der EPO mRNA feststellen. Die höchste Reduktion wurde nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden erreicht, hier war die EPO mRNA auf 45% der Kontrolle reduziert. Nach 6 und 12 Stunden war noch keinen MMF Effekt zu beobachten. Dies korreliert gut mit den Ergebnissen aus früheren Untersuchungen, bei denen erst nach 48 Stunden auf Proteinebene eine Minderung gezeigt werden konnte und nach 24 Stunden noch kein MMF-Effekt sichtbar war. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass ein wichtiger Teil der Regulation auf RNA-Ebene erfolgt. Die Regulation auf RNA Ebene

(sichtbar nach 24 Stunden) spiegelt sich kurz darauf erst auf Proteinebene wieder (sichtbar nach 48 Stunden).

Verminderte zelluläre EPO mRNA Spiegel könnten auch auf eine allgemein verminderte Genexpression aller Gene zurückzuführen sein. Um dies auszuschließen, wurde parallel das Alpha₁-Fetoprotein (AFP) in den Versuchen bestimmt. Das AFP und die mRNA von AFP werden in HepG2 konstitutiv und unabhängig von der Stimulation produziert [59]. Die mRNA des AFPs wurde also als Marker für die allgemeine Genexpression bestimmt. Da sich kein statistisch signifikanter Unterschied der AFP-mRNA Produktion zwischen den MMF behandelten Zellen zur Kontrollgruppe ergab, können wir weitgehend ausschließen, dass die Beobachtungen der Reduktion der EPO mRNA unter MMF aufgrund von unspezifischer allgemeiner Hemmung des Zellstoffwechsels oder unspezifischer Hemmung der RNA- und Proteinproduktion entsteht. Wir schließen daher auf eine spezifische Wirkung des MMFs auf die EPO mRNA Expression. Dass eine solche Regulation sich in den Proteinspiegeln des EPOs niederschlägt, konnte in früheren Arbeiten in unserem Labor schon gezeigt werden [101] und unterstützt die Annahme, dass MMF spezifisch auf die EPO Produktion wirkt.

MMF wirkt über eine Hemmung der IMPDH, welche eine Depletion des Guanospools der Zelle bewirkt [31, 97, 116]. Daher kann die Wirkung von MMF durch Zugabe von exogenem Guanotin vollständig aufgehoben werden [31, 118]. Da auch in unseren Versuchen die MMF Wirkung auf die EPO RNA Synthese nahezu vollständig durch das Zufügen von Guanotin aufgehoben werden konnte, ist es sehr wahrscheinlich, dass die beobachtete Reduktion der EPO mRNA von Guanotin abhängig ist und somit durch die Hemmung der IMPDH verursacht wird. Es konnte kein Effekt von Guanotin selbst auf die EPO mRNA Expression in HepG2 Zellen festgestellt werden. Diese Ergebnisse bestärken die Vermutung, dass es sich bei den von uns beobachteten Effekten um MMF spezifische Wirkungen handelt, welche für die Depletion des Guanospools verantwortlich sind.

Der Grund für eine verminderte EPO Synthese unter MMF Therapie kann auf Ebene des Proteins oder auf Ebene der RNA liegen. Eine Überlegung war, ob MMF die Stabilität des Erythropoetinproteins vielleicht herabsetzt. Diese Hypothese war darauf gestützt, dass viele Proteine, wie zum Beispiel auch die HIF-1 α -Untereinheit, über eine Veränderung der Proteinstabilität reguliert werden. Die HIF-1 α -Untereinheit ist ebenso wie EPO hypoxiereguliert, so dass die Vermutung nahe liegt, dass die Regulation auch auf anderen Ebenen vergleichbar ist. *Goldwasser et al* haben außerdem gezeigt, dass die EPO Stabilität durch Entfernung der Sialinsäure, eines terminalen Zuckers, abnahm [36]. Es wäre denkbar, dass MMF auf Enzyme wirkt, welche die Glykosylierung von EPO steuern und so die EPO Stabilität verändert werden kann. Unsere Daten konnten jedoch die Hypothese nicht stützen, dass MMF seine Wirkung ausschließlich auf der Proteinebene durch Veränderung der EPO Stabilität entfaltet. Es zeigte sich kein erhöhter Abbau von EPO bei den mit MMF behandelten Zellen innerhalb von 24 Stunden nach Zugabe von Cycloheximid im Vergleich zur Kontrolle. Um die EPO Stabilität noch etwas genauer zu untersuchen, versuchten wir dies im Western Blot darzustellen. Dies ist uns leider nicht gelungen, da das EPO ohne Aufkonzentrierung des Zellkulturüberstandes nicht detektierbar war. Hierbei könnte die bereits erwähnte niedrige EPO Sekretion der HepG2 Zellen eine Rolle spielen.

Da Erythropoetin unter MMF anscheinend, wie bereits erwartet, unter Berücksichtigung der bereits diskutierten Limitationen der Versuche, keinen Stabilitätsverlust erfährt, haben wir als nächstes aufgrund von Hinweisen in der Literatur die Stabilität der EPO mRNA unter MMF untersucht. Es ist bekannt, dass posttranskriptionelle Stabilisierung der EPO mRNA bei der Hypoxieregulation eine wichtige Rolle spielt [34]. Proteine wie ERBP können durch Bindung an die EPO mRNA deren Stabilität steigern [75]. MMF könnte also in diesen Mechanismus eingreifen und dadurch die Stabilität der EPO mRNA negativ beeinflussen. Hierzu haben wir zunächst Versuche mit Actinomycin D durchgeführt. Actinomycin D ist ein Inhibitor der Gentranskription, so dass ab dem Zeitpunkt der Zugabe von Actinomycin D

keine weitere Bildung von mRNA in der Zelle mehr erfolgt. Somit kann nach Zugabe von Actinomycin D die Stabilität der bereits vorhandenen EPO-mRNA durch Ernte zu verschiedenen Zeitpunkten beurteilt werden. Es zeigte sich nach Zugabe von Actinomycin D zum Zeitpunkt 0 innerhalb von 24 Stunden keine verstärkte Degradation der EPO mRNA. Allerdings konnte auch hier zu jedem Zeitpunkt gezeigt werden, dass die EPO mRNA unter MMF stark reduziert ist im Vergleich zur Kontrolle. *Goldberg et al* zeigten, dass sowohl unter Actinomycin D als auch unter Cycloheximid die Stabilität der EPO mRNA stärker erhöht ist als ohne diese Chemikalien. Sie haben deshalb postuliert, dass die Stabilität der EPO mRNA durch kurzlebige Proteine moduliert wird [34]. Unter Actinomycin D und Cycloheximid werden diese destabilisierenden Proteine, bzw. die RNA dieser destabilisierenden Proteine, schnell abgebaut, aber nicht erneut synthetisiert. Dadurch kommt es zur Stabilisierung der EPO mRNA. *Goldberg et al* berichteten von einer Halbwertszeit der EPO mRNA von ungefähr 7 bis 8 Stunden unter Actinomycin [34]. Dies entspricht in etwa den bei uns beobachteten Halbwertszeiten der EPO mRNA unter Actinomycin in der Kontrollgruppe. Hier waren nach 6 Stunden noch 80% und nach 24 Stunden nur noch 40% der EPO mRNA vorhanden. Die leicht verlängerte Halbwertszeit könnte daran liegen, dass wir 10 µg/ml Actinomycin eingesetzt haben, während *Goldberg et al* nur 5 µg/ml verwendet haben. Diese Versuche legen die Vermutung nahe, dass MMF nicht direkt an der EPO mRNA wirkt, sondern vielleicht indirekt über schnell degradierende Enzyme, welche wiederum die Stabilität der EPO mRNA beeinflussen.

Um diesen verfälschenden Effekt von Actinomycin D zu verhindern, haben wir im weiteren Verlauf In-vitro-Degradationsversuche durchgeführt, um die Stabilität der EPO mRNA zu untersuchen. In-vitro-Degradationsversuch bedeutet, dass die Degradation von RNA nach Zusammenfügen von spezifischem Lysat und RNA beobachtet wird. Als Richtwert haben wir mit einem RNA-Lysat-Verhältnis von 1:2 begonnen, welches bei Mesangiumzellen (MC) als optimal beschrieben wurde [5]. Unter diesen Bedingungen wurden sowohl die EPO als auch die 18S RNA sehr schnell degradiert. Die 18S RNA

war als interne Kontrolle bei den MCs über die gesamte Inkubationszeit als stabil beschrieben worden [5]. Da die HepG2 Zellen als Leberzellen größere Mengen an degradierenden Enzymen besitzen im Vergleich zu den MCs und zum anderen als Tumorzellen einen hohen Stoffwechsel haben, mussten wir in der Folge das RNA-Lysat-Verhältnis auf diesen Zelltyp optimieren. Bei einem Verhältnis von 50:1 konnte innerhalb der 30 minütigen Inkubationszeit keine relevante Degradation der 18S mRNA mehr festgestellt werden. Bei diesem Verhältnis konnte kein vermehrter Abbau der EPO mRNA, normalisiert zur 18S RNA, unter MMF im Vergleich zur Kontrolle gezeigt werden. Wir haben außerdem noch die Stabilität der AFP mRNA im In-vitro-Degradationsversuch untersucht, da dieses als Marker für die allgemeine Genexpression fungiert. Auch die AFP mRNA zeigte keine schnellere Degradation unter MMF. Unsere Versuche lassen vermuten, dass MMF nicht über eine Destabilisierung der EPO mRNA wirkt.

Da wir allerdings einen Einfluss von MMF auf die steady state EPO-mRNA wiederholt und reproduzierbar darstellen konnten, haben wir weitere Überlegung bezüglich möglicher Angriffspunkte von MMF diskutiert. Hier könnten verschiedene Transkriptionsfaktoren eine Rolle spielen, welche an den Enhancer und Promotor der EPO Gene binden und dadurch die Transkription des Gens regulieren. Bei der Regulation des EPO-Gens sind bereits unterschiedliche Transkriptionsfaktoren bekannt, wie zum Beispiel GATA-2 [123] (siehe Abbildung 6), NF κ B [28, 66], HIF-2 [129] und HIF-1 [114]. Diese Transkriptionsfaktoren werden über verschiedene Signaltransduktionswege gesteuert, bei denen verschiedene Kinasen, wie die Protein Kinase C [25, 87], verschiedene MAP-Kinasen [102, 122] und Protein Kinase B (PI3K/AKT) [28], eine wichtige Rolle spielen. Die meisten Untersuchungen beziehen sich allerdings auf die Funktion von HIF-1. Der Transkriptionsfaktor HIF-1 ist ein Heterodimer, welcher aus einer HIF-1 α - und einer HIF-1 β -Untereinheit (ARNT) besteht [52]. Beide Untereinheiten werden konstitutiv exprimiert, allerdings wird die HIF-1 α -Untereinheit unter normoxischen Bedingungen schnell durch Proteasomen degradiert. In dieser Arbeit haben wir uns die Frage gestellt, ob

die Expression von HIF-1 durch MMF vermindert ist. Da die HIF-1 α -Untereinheit das Vorhandensein von HIF-1 reguliert, haben wir diese im Western Blot quantitativ und qualitativ dargestellt. Wir konnten bei MMF behandelten HepG2 Zellen im Western Blot zeigen, dass nach einer Inkubationszeit von 14 und 16 Stunden eine signifikante Reduktion von HIF-1 α im Vergleich zur Kontrolle und im Vergleich zum jeweiligen DMSO Wert zu finden war. Diese nur geringfügige Reduktion von HIF-1 α unter MMF kann sicherlich nicht die von uns beobachtete Minderung von EPO mRNA auf mehr als die Hälfte im Vergleich zur Kontrolle erklären. Dies deutet daraufhin, dass MMF über mehrere verschiedene Mechanismen die EPO mRNA vermindert.

HIF-1 wird wie oben beschrieben hauptsächlich auf Proteinebene durch Stabilitätsänderung von HIF-1 α reguliert. Eine Regulation auf RNA-Ebene wäre ebenfalls denkbar, so dass hier weitere Versuche durchgeführt wurden. Durch Auswertung mit der Real-time-PCR konnten wir keine Unterschiede in der Expression der HIF-1 α -mRNA unter MMF innerhalb einer Inkubationszeit von 16 Stunden im Vergleich zur Kontrolle und zur zeitgleichen DMSO Kontrolle feststellen. Bei nur 3 Versuchen dieser Art ergaben sich so große interexperimentelle Abweichungen, dass die Spezifität dieser Versuche in Frage gestellt werden muss.

Um die Verminderung der HIF-1 α -Untereinheit genauer zu charakterisieren, sollte man noch weitere Versuche zur Stabilität der Untereinheit unter MMF durchführen. Die HIF-1 α -Untereinheit wird durch verminderte Degradation bei hypoxischen Bedingungen stabilisiert. Eine Möglichkeit wäre, dass diese Proteinstabilisierung unter MMF aufgehoben wird. Da die Degradation von HIF-1 α durch die Aktivität einer Prolin- und einer Asparaginhydroxylase bestimmt wird (siehe Kapitel 1.4.1), wäre es vorstellbar dass MMF teilweise über eine Modulation dieser Enzyme wirkt.

Da wir eine Wirkung von MMF auf HIF-1 gefunden haben, wäre es wissenswert, ob andere Zielgene von HIF-1 ebenfalls eine verminderte Expression unter MMF Stimulation erfahren. Zu diesen Genen gehören zum Beispiel Transferrin

und dessen Rezeptor, VEGF, induzierbare NO-Synthetase und Glukose Transporter 1 [128]. Es ist bekannt, dass MMF die NO-Synthetase inhibiert [6]. Falls MMF einen ähnlichen Einfluss auf diese HIF-1-gesteuerten Genprodukte hat wie auf EPO, würde dies die Theorie bestärken, dass MMF über HIF-1 die EPO Transkription beeinflusst.

Bisher war man davon ausgegangen, dass vor allem HIF-1 eine wichtige Rolle in der hypoxieinduzierten Expression des EPO Gens spielt [114], so dass wir uns entschieden die Wirkung von MMF auf HIF-1-alpha zu untersuchen. In den letzten Jahren zeigen sich allerdings immer mehr Hinweise dafür, dass der Einfluss von HIF-2 eine bedeutendere Rolle in der Regulation des EPO Gens spielt als HIF-1 [56, 91, 111]. Es zeigt sich in den REP Zellen (renale Erythropoetin produzierende Zellen) von *Pan et al.*, dass diese vorwiegend HIF-2 und HIF-3 und weniger HIF-1 exprimieren [92]. Diese Erkenntnis passt auch dazu, dass *Percy et al.* bei familiärer Erythrozytose eine Mutation im HIF-2- α Gen gefunden haben [93]. In Zusammenschau dieser Erkenntnisse erscheint es sinnvoll in zukünftigen Forschungsarbeiten auch die Wirkung von MMF auf HIF-2 zu untersuchen. Da wir bereits eine Reduktion der HIF-1- α -Untereinheit auf Proteinebene festgestellt haben, ist es gut vorstellbar, dass auch die HIF-2- α -Untereinheit von MMF beeinflusst wird. Dies könnte auch durch eine Veränderung im PHD/VHL Kaskade entstehen, welche sowohl bei dem Abbau der HIF-1- α -Untereinheit als auch bei HIF-2- α -Untereinheit eine entscheidende Rolle spielt. Da wir nur die HIF-1- α -Untereinheit untersucht haben, muss man sich an diesem Punkt die Frage stellen, zu welchem Anteil die von uns dargestellte Reduktion der HIF-1- α -Untereinheit für die reduzierte EPO Transkription verantwortlich ist. Man muss davon ausgehen, dass MMF über mehrere verschiedene Signalwege eine verminderte EPO Sekretion bewirkt. Außerdem ist zu erwägen, ob HIF-1 nicht nur als Transkriptionsfaktor des EPO-Genes wirkt, sondern über einen zusätzlichen anderen Signalweg agiert. *Flygare et al.* konnten zeigen, dass HIF-1- α synergetisch mit niedrig dosierten Glucocorticoiden (möglicherweise mit endogener Cortisol Dosis bereits auch ausreichend) die Selbsterneuerung der BFU-E fördert und somit zur deutlichen

Steigerung der EPO-sensiblen CFU-E im Knochenmark führt. Dadurch kommt es zu einer gesteigerten Erythropoese und Erhöhung des EPO-Sensibilität des Knochenmarks [30]. MMF könnte über das verminderter HIF-1 die Selbsterneuerung der BFU-E hemmen, so dass weniger EPO sensible CFU-E im Knochenmark bereitgestellt werden und es somit zur verminderten Erythropoese und damit zur Anämie kommt.

Die Nieren synthetisieren beim Erwachsenen hypoxieabhängig den größten Anteil des EPOs und steuern somit an erster Stelle die Erythropoese. Die Leber produziert in der Embryonalphase das EPO und kann beim Erwachsenen in akuten Hypoxiephase reaktiviert werden [56]. Im Laufe der letzten Jahre konnte EPO Produktion auch in vielen anderen Organen (Gehirn, Lunge, Herz, Milz) festgestellt werden [38]. Von diesen Organen kann nur das Gehirn EPO bilden, welches die Erythropoese beeinflussen kann [127]. Zuletzt hat 2013 Rankin et al eine HIF abhängige EPO Produktion in Osteoblasten zeigen können. Diese EPO Bereitstellung durch Osteoblasten zeigte eine regelrechte Aktivierung der Erythropoese [98]. Im Rahmen der Forschungen bezüglich MMF induzierten Anämien sollte man sich also auch die Frage stellen, ob MMF auch die EPO Expression in Osteoblasten hemmt.

Weitere Angriffspunkte für eine Modulation der EPO mRNA Expression könnten Transkriptionsfaktoren wie GATA-2 und NF κ B darstellen, da diese wie bereits oben beschrieben neben HIF-1 bekannte Transkriptionsfaktoren für die Regulation des EPO-Gens sind. Die Wirkung von MMF auf GATA-2 und NF- κ B in HepG2 Zellen ist zurzeit noch nicht untersucht worden. Eine Vielzahl von Zytokinen benötigt eine Aktivierung durch NF- κ B, welcher wiederum durch den Tumor-Nekrosefaktor α (TNF- α) aktiviert wird. In der Literatur gibt es mehrere Hinweise darauf, dass die EPO mRNA Expression durch die Zytokine, IL-1 α , IL-1 β und TNF- α , gehemmt wird [25, 27, 53, 54]. Dies wäre auch mit den klinischen Beobachtungen vereinbar, dass bei chronischen Entzündungen und bei Transplantatabstoßungen verminderte EPO Spiegel mit einer erhöhten IL-1 und TNF- α Produktion assoziiert sind [54, 76]. Man kann somit vermuten, dass

MMF über eine Induktion der TNF- α und IL-1 Synthese agiert und es dadurch zur Inhibition der EPO Sekretion in HepG2 Zellen kommt. Auf der anderen Seite haben *Faquin et al* gezeigt, dass IL-6 im Gegensatz zu IL-1 und TNF- α die EPO Produktion steigert. Daraus könnte man auch schließen, dass MMF womöglich über eine Minderung von IL-6 wirkt, oder über eine Kombination aus IL-6 Hemmung und IL-1 und TNF- α Induktion. Diese cytokininduzierte reduzierte EPO mRNA Expression spielt im Rahmen der Entwicklung von Anämien bei chronischen Nierenerkrankungen und bei inflammatorischen Prozessen sicherlich nur eine Teilrolle. Wichtig ist in diesem Rahmen zu erwähnen, dass 10 % der Patienten, welche bei renaler Anämie mit rekombinantem EPO behandelt werden, ein unzureichendes Ansprechen auf adäquate Dosen von rekombinantem EPO zeigen [73]. Hier wird vor allem eine Resistenz des EPO Rezeptors diskutiert, so dass EPO nicht adäquat an diesem wirken kann [124].

Eine aktuelle Studie von *Lee J. et al* ist kontrovers zur oben genannten Theorie, dass MMF möglicherweise über eine Induktion der TNF- α und IL-1 Synthese agiert und es dadurch zur Inhibition der EPO Sekretion in HepG2 Zellen kommt. *Lee J et al* haben gezeigt, dass MMF in HT-29 Kolonepithelzellen eine TNF- α -stimulierte NF- κ B Aktivierung durch eine I κ B- α Stabilisierung hemmt [67]. NF- κ B wird durch die Bindung von I κ B- α im Zytoplasma an einer Translokation in den Zellkern gehindert [8]. MMF bewirkt in HT-29 Kolonepithelzellen eine Stabilisierung von I κ B- α , wodurch NF- κ B nicht als Transkriptionsfaktor aktiv werden kann. Eine Hemmung von NF- κ B durch MMF konnte auch in Endothelzellen durch *Huang et al* gezeigt werden [45]. Dies passt auch zur Theorie von *Figuerola et al*, dass NF- κ B die Transkription von HIF-1 α induziert und dadurch die Transkription des EPO Gens aktiviert. Das heißt eine Minderung der Aktivität von NF- κ B z.B. durch MMF [45, 67] könnte unter Umständen zu einer verminderten HIF-1 α Transkription und somit zu einer Reduktion der EPO Gen Transkription führen. Da sowohl das EPO- als auch das HIF-1 α -Gen NF- κ B-Bindungsstellen aufweisen [66, 79], kann vermutet werden, dass MMF durch Verminderung der NF- κ B-Aktivität direkte und indirekte Wirkungen auf die EPO-Gen-Transkription hat. Bisher ist der relative

Beitrag der NF- κ B Aktivierung von HIF-1 α und EPO Gen Expression noch nicht bekannt.

Hellwig-Bürgel et al haben gezeigt, dass IL-1 β und TNF α die Bindung von HIF-1 an das HRE-Element des EPO Genes erhöhen [43]. MMF hemmt die Rekrutierung von Monozyten und Lymphozyten in das Transplantat bei Abstoßung. Diese Zellen produzieren hauptsächlich IL-1 β und TNF α . Man könnte also vermuten, dass MMF über Hemmung der Mono- und Lymphozyten eine Minderung von IL-1 β und TNF α hervorruft und deshalb die Bindung von HIF-1 an das HRE-Element reduziert ist. Dadurch wird eine Hemmung der EPO Genexpression hervorgerufen. Nach diesen Ergebnissen muss man annehmen, dass die Inhibition der EPO Genexpression durch Zytokine, wie oben diskutiert, über einen anderen Transkriptionsfaktor als HIF-1 vermittelt wird, der dann einen Angriffspunkt für MMF darstellt.

In dieser Arbeit haben wir uns auf die Fragestellung konzentriert, ob die MMF assoziierte Anämie auf eine verminderte EPO Expression zurückzuführen ist. Nichtsdestotrotz sollte man andere mögliche Ansatzpunkte von MMF nicht außer Acht lassen. Bisher war man von einer nahezu selektiven Wirkung von MMF auf Lymphozyten ausgegangen, da diese auf die IMPDH abhängige de-novo Synthese von Purinen angewiesen sind und nicht die Möglichkeit haben diese über den Wiederverwertungsmechanismus bereitzustellen. Deshalb wirkt auch der Wirkungsmechanismus der hinter der MMF assoziierten Anämie steht so viele Fragen auf. *Pile et al.* haben kürzlich gezeigt, dass MMF in vitro die Erythropoese in UT-7 Zellen und murinen Knochenmarkszellen IMPDH-abhängig hemmt. Sie postulieren, dass unter Stresssituationen, wie Nierenversagen und Immunsuppression, der Wiederverwertungsmechanismus der Zellen nicht ausreicht um den Guanodinbedarf der Zellen zu decken [94]. Möglicherweise ist die MMF assoziierte Anämie eine Folge von vielen unterschiedlichen Wirkmechanismen einerseits mit Einfluss auf die EPO Expression und andererseits mit direktem Einfluss auf die erythroiden Vorläuferzellen. Außerdem wird heutzutage eine genetische Disposition für die

Entwicklung einer Anämie unter MMF vermutet. *Jacobson et al.* konnten verschiedene genetische Polymorphismen darstellen, welche mit einer erhöhten Inzidenz von Anämien unter MMF Therapie einhergehen [51]. Einer dieser Polymorphismen (CYP2C8) konnte auch in einer Studie von *Bouamar et al.* verifiziert werden [13].

Unsere Vordaten und diese Arbeit liefern einen begründeten Hinweis dafür, dass durch MMF induzierte Anämien mit erniedrigten EPO-Spiegeln einhergehen. MMF scheint auf Transkriptionsebene die EPO mRNA-Spiegel zu senken, da wir eine Korrelation zwischen der EPO Sekretion und EPO mRNA Expression darstellen konnten. Die Stabilität des EPOs und der EPO mRNA scheint nicht für diese Verminderung der EPO Sekretion verantwortlich zu sein. MMF hat in unseren Versuchen keine direkten oder indirekten Einflüsse auf die EPO mRNA Stabilität. Allerdings konnten wir zeigen, dass der Transkriptionsfaktor HIF-1 unter dem Einfluss von MMF reduziert war. Diese Regulation scheint auf Proteinebene einzugreifen, da keine Reduktion der HIF-1 α mRNA unter MMF beobachtet werden konnten. Dies kann nicht die starke Abnahme der EPO mRNA unter MMF gänzlich erklären, so dass weitere Untersuchungen in Richtung der Wirkung von MMF auf andere Transkriptionsfaktoren des EPO Gens in Zukunft nötig sein werden. Letztendlich muss man die eingeschränkte Übertragbarkeit von Zellkulturmodellen auf den menschlichen Organismus bedenken. Diese Wirkungen von MMF müssten sowohl in einer renalen Zellkultur als auch in in-vivo-Studien reproduziert werden.

5 Zusammenfassung/Summary

Die Erythropoese wird durch das Hormon Erythropoetin (EPO), welches nach Geburt größtenteils in der Niere gebildet wird, aktiviert. Die Bildung von EPO erfolgt sauerstoffabhängig über eine vermehrte Aktivität des hypoxieinduzierbaren Faktors (HIF-1), welcher die Transkription der EPO Gene reguliert. HIF-1 besteht aus zwei Untereinheiten, der HIF-1 α - und der HIF-1 β -Untereinheit. Das Vorhandensein von HIF-1 wird über die veränderte Stabilität der HIF-1 α -Untereinheit reguliert.

Mycophenolate mofetil (MMF) ist ein Immunsuppressivum, welches eine wichtige Rolle in der Transplantationsmedizin einnimmt. Es ist ein nicht kompetitiver, reversibler Hemmer der Inosinmonophosphatdehydrogenase (IMPDH), welche für die de novo Purinsynthese notwendig ist. Lymphozyten, welche im Gegensatz zu anderen Zellen keine Möglichkeit haben Purine über einen Wiederverwertungsmechanismus bereitzustellen, sind von der IMPDH abhängig. Dieser Mechanismus ermöglicht MMF eine selektive Wirkung auf Lymphozyten ohne andere Zellen zu schädigen. Trotzdem haben einige Multicenter Studien gezeigt, dass unter MMF Therapie nach Nierentransplantation in bis zu 15% der Fälle Anämien auftreten.

Wir haben in früheren Versuchen gezeigt, dass es nach einer Behandlung der HepG2 Zellen mit 5 μ M MMF über 24 Stunden zu einer spezifische Minderung der EPO Sekretion kam. Es konnte so ein Zusammenhang zwischen der vermindert EPO Sekretion unter MMF und Anämien unter immunsuppressiver Therapie mit MMF angenommen werden.

Ziel dieser Arbeit war es, mögliche Ansätze für einen Regulationsmechanismus zu untersuchen, der für die reduzierte EPO Sekretion unter MMF verantwortlich ist. Es zeigte sich, mittels PCR und Western Blot Versuchen, eine zeitabhängige Verminderung der EPO mRNA parallel zu einer reduzierten EPO Sekretion, was auf eine Regulation auf RNA Ebene hindeutet. MMF depletiert

den intrazellulären Guanosinpool durch Hemmung der IMPDH. Nach Zugabe von exogenem Guanosin zu den HepG2 Zellen war die MMF induzierte Reduktion der EPO mRNA vollständig reversibel. Dies zeigt, dass der beobachtete Effekt IMPDH abhängig und somit spezifisch für die MMF Wirkung ist. Des Weiteren konnten wir zeigen, dass die Stabilität des EPOs und der EPO mRNA durch MMF nicht verändert war. Allerdings zeigte sich eine Verminderung der HIF-1 α -Untereinheit unter MMF nach 14 und 16 Stunden. Da keine eindeutige Abnahme der HIF-1 α mRNA beobachtet werden konnte, gehen wir hier von einer Regulation auf Proteinebene aus.

Im Hinblick auf diese Ergebnisse scheint eine Substitution von EPO eine gute Möglichkeit zur Behandlung von MMF induzierten Anämien. Die Ergebnisse weisen außerdem auf eine Beteiligung des HIF-1 in der Entstehung von MMF induzierten Anämien hin und sollten Grundlage für weitere Forschungsansätze zur Klärung der Mechanismen sein. Hier ist es von Interesse, ob andere Zielgene von HIF-1 (z.B. Transferrin und dessen Rezeptor, VEGF, induzierbare NO-Synthetase und Glukose Transporter 1) ebenfalls eine verminderte Expression unter MMF Stimulation erfahren. Dies würde unsere These unterstützen, dass MMF über HIF-1 die EPO Transkription beeinflusst. Außerdem könnten genauere Untersuchungen bezüglich der Stabilität der HIF-1-alpha Untereinheit unter MMF Einfluss und Forschungen bezüglich der möglichen Beteiligung von anderen Transkriptionsfaktoren (z.B. GATA-2 und NF κ B) in Zukunft wegweisend sein, um den Regulationsmechanismus von MMF induzierten Anämien weiter zu erforschen. Hier könnten weitere Erkenntnisse in Zukunft neue Möglichkeiten für medikamentöse Angriffspunkte der MMF induzierten Anämien eröffnen.

Summary

Erythropoiesis is activated by the hormone erythropoietin (EPO), which is mainly synthesized by kidneys after birth. Generation of EPO is an oxygen-dependent mechanism triggered by hypoxia-inducible factor (HIF-1), which regulates transcription of the EPO gene. HIF-1 consists of two subunits, HIF-1-alpha and

HIF-1-beta. Altered stability of the HIF-1-alpha-subunit determines the amount of HIF-1 in cells.

Mycophenolat Mofetil (MMF) is an immunosuppressant, which plays a major role in transplantation medicine. It is a non-competitive, reversible inhibitor of inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH), the essential enzyme of the de novo purine synthesis. In contrast to other cells, lymphocytes cannot use the salvage pathway for purine synthesis. Thus lymphocytes are dependent on the IMPDH. This mechanism allows MMF to exert a selective effect on lymphocytes without affecting other cells. However some multicenter studies were able to show, that an immunosuppressive therapy with MMF is associated with an incidence of 15 % of anaemia.

We have previously shown that treatment with 5 µM MMF over 24 hours results in a selective reduction of the EPO secretion in HepG2 cells. Thus we speculated, that MMF induced anaemia is a result of reduced EPO secretion.

The aim of this study was to examine regulation mechanisms, which are responsible for reduced EPO secretion caused by MMF. We could show, by performing PCR and western blot experiments, a time-dependent reduction of EPO mRNA in line with a reduced EPO secretion, which hints on a regulation on RNA basis. MMF depletes the guanosine pool inside the cells by inhibition of IMPDH. Therefore we demonstrated, that the MMF induced reduction of EPO mRNA was completely reversible after addition of guanosine to the HepG2 cells. This proves, that the observed reduction of EPO mRNA specifically depends on IMPDH, and therefore the effect is specific for MMF. Furthermore, we could show that the stability of EPO and EPO mRNA was not altered by MMF treatment. Moreover treatment with MMF over 14 and 16 hours resulted in a reduction of protein HIF-1-alpha-subunit. Since we could not demonstrate a reduction of the HIF-1-alpha mRNA, we assume a regulation on protein basis.

With regards to the results, the substitution of erythropoietin seems to be a good possibility to treat the MMF induced anaemia. Furthermore, the results

suggest an involvement of HIF-1 in the development of MMF induced anaemia and should be a foundation for further research projects to understand the mechanisms of regulation. In the future it will be of great interest, whether other target genes of HIF-1 (for example transferrin und its receptor, VEGF, inducible NO-Synthase und Glucose-transporter 1) are showing reduced expression during stimulation with MMF. This fact would support our hypothesis, that MMF affects the EPO transcription via HIF-1. Detailed examinations regarding the stability of HIF-1-alpha subunit under the influence of MMF and the possible involvement of other transcription factors (such as GATA-2 and NfκB) could be of further interest to investigate the mechanism and therapy of MMF induced anaemia.

Literaturverzeichnis

1. *A blinded, randomized clinical trial of mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in cadaveric renal transplantation. The Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplantation Study Group.* Transplantation: 1996. **61**(7): p. 1029-1037.
2. *Mycophenolate mofetil in renal transplantation: 3-year results from the placebo-controlled trial. European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group.* Transplantation: 1999. **68**(3): p. 391-396.
3. *Placebo-controlled study of mycophenolate mofetil combined with cyclosporin and corticosteroids for prevention of acute rejection. European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group.* Lancet: 1995. **345**(8961): p. 1321-1325.
4. Agrawal, A., Parrott, N.R., Riad, H.N., and Augustine, T. *Azathioprine-induced pure red cell aplasia: case report and review.* Transplant Proc: 2004. **36**(9): p. 2689-2691.
5. Akool el, S., Kleinert, H., Hamada, F.M., Abdelwahab, M.H., Forstermann, U., Pfeilschifter, J., and Eberhardt, W. *Nitric oxide increases the decay of matrix metalloproteinase 9 mRNA by inhibiting the expression of mRNA-stabilizing factor HuR.* Mol Cell Biol: 2003. **23**(14): p. 4901-4916.
6. Allison, A.C., and Eugui, E.M. *Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action.* Immunopharmacology: 2000. **47**(2-3): p. 85-118.
7. Augustine, J.J., and Hricik, D.E. *Anemia after kidney transplantation: time for action.* J Am Soc Nephrol: 2006. **17**(11): p. 2962-2963.

8. Baeuerle, P.A., and Baltimore, D. *I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor*. Science: 1988. **242**(4878): p. 540-546.
9. Birkinshaw, J.H., Raistrick, H., and Ross, D.J. *Studies in the biochemistry of micro-organisms. 86. The molecular constitution of mycophenolic acid, a metabolic product of Penicillium Brevi-compactum Dierckx. Part III. Further observations on the structural formula for mycophenolic acid*. Biochem J: 1952. **50**(5): p. 630-634.
10. Blaheta, R.A., Leckel, K., Wittig, B., Zenker, D., Oppermann, E., Harder, S., Scholz, M., Weber, S., Encke, A., and Markus, B.H. *Mycophenolate mofetil impairs transendothelial migration of allogeneic CD4 and CD8 T-cells*. Transplant Proc: 1999. **31**(1-2): p. 1250-1252.
11. Blaheta, R.A., Leckel, K., Wittig, B., Zenker, D., Oppermann, E., Harder, S., Scholz, M., Weber, S., Schuldes, H., Encke, A., et al. *Inhibition of endothelial receptor expression and of T-cell ligand activity by mycophenolate mofetil*. Transpl Immunol: 1998. **6**(4): p. 251-259.
12. Blanchard, K.L., Fandrey, J., Goldberg, M.A., and Bunn, H.F. *Regulation of the erythropoietin gene*. Stem Cells: 1993. **11 Suppl 1**: p. 1-7.
13. Bouamar, R., Elens, L., Shuker, N., van Schaik, R.H., Weimar, W., Hesselink, D.A., and van Gelder, T. *Mycophenolic acid-related anemia and leucopenia in renal transplant recipients are related to genetic polymorphisms in CYP2C8*. Transplantation: 2012. **93**(10): p. e39-40; author reply e41-32.
14. Bustin, S.A. *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays*. J Mol Endocrinol: 2000. **25**(2): p. 169-193.

15. Canbolat, O., Fandrey, J., and Jelkmann, W. *Effects of modulators of the production and degradation of hydrogen peroxide on erythropoietin synthesis*. *Respir Physiol*: 1998. **114**(2): p. 175-183.
16. Carr, S.F., Papp, E., Wu, J.C., and Natsumeda, Y. *Characterization of human type I and type II IMP dehydrogenases*. *J Biol Chem*: 1993. **268**(36): p. 27286-27290.
17. Chomczynski, P., and Sacchi, N. *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. *Anal Biochem*: 1987. **162**(1): p. 156-159.
18. Cockman, M.E., Masson, N., Mole, D.R., Jaakkola, P., Chang, G.W., Clifford, S.C., Maher, E.R., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., and Maxwell, P.H. *Hypoxia inducible factor-alpha binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein*. *J Biol Chem*: 2000. **275**(33): p. 25733-25741.
19. Connell, W.R., Kamm, M.A., Ritchie, J.K., and Lennard-Jones, J.E. *Bone marrow toxicity caused by azathioprine in inflammatory bowel disease: 27 years of experience*. *Gut*: 1993. **34**(8): p. 1081-1085.
20. Czyzyk-Krzeska, M.F., Furnari, B.A., Lawson, E.E., and Millhorn, D.E. *Hypoxia increases rate of transcription and stability of tyrosine hydroxylase mRNA in pheochromocytoma (PC12) cells*. *J Biol Chem*: 1994. **269**(1): p. 760-764.
21. Das, S.R., Dries, D.L., Drazner, M.H., Yancy, C.W., and Chae, C.U. *Relation of lower hematocrit to progression from asymptomatic left ventricular dysfunction to symptomatic heart failure (from the Studies of Left Ventricular Dysfunction Prevention trial)*. *Am J Cardiol*: 2005. **96**(6): p. 827-831.

22. Ebert, B.L., and Bunn, H.F. *Regulation of the erythropoietin gene*. Blood: 1999. **94**(6): p. 1864-1877.
23. Elion, G.B. *The purine path to chemotherapy*. Science: 1989. **244**(4900): p. 41-47.
24. Fandrey, J. *Oxygen-dependent and tissue-specific regulation of erythropoietin gene expression*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol: 2004. **286**(6): p. R977-988.
25. Fandrey, J., Huwiler, A., Frede, S., Pfeilschifter, J., and Jelkmann, W. *Distinct signaling pathways mediate phorbol-ester-induced and cytokine-induced inhibition of erythropoietin gene expression*. Eur J Biochem: 1994. **226**(2): p. 335-340.
26. Fandrey, J., Seydel, F.P., Siegers, C.P., and Jelkmann, W. *Role of cytochrome P450 in the control of the production of erythropoietin*. Life Sci: 1990. **47**(2): p. 127-134.
27. Faquin, W.C., Schneider, T.J., and Goldberg, M.A. *Effect of inflammatory cytokines on hypoxia-induced erythropoietin production*. Blood: 1992. **79**(8): p. 1987-1994.
28. Figueroa, Y.G., Chan, A.K., Ibrahim, R., Tang, Y., Burow, M.E., Alam, J., Scandurro, A.B., and Beckman, B.S. *NF-kappaB plays a key role in hypoxia-inducible factor-1-regulated erythropoietin gene expression*. Exp Hematol: 2002. **30**(12): p. 1419-1427.
29. Fisher, J.W. *Erythropoietin: physiology and pharmacology update*. Exp Biol Med (Maywood): 2003. **228**(1): p. 1-14.
30. Flygare, J., Rayon Estrada, V., Shin, C., Gupta, S., and Lodish, H.F. *HIF1alpha synergizes with glucocorticoids to promote BFU-E progenitor self-renewal*. Blood: 2011. **117**(12): p. 3435-3444.

31. Franklin, T.J., and Cook, J.M. *The inhibition of nucleic acid synthesis by mycophenolic acid*. Biochem J: 1969. **113**(3): p. 515-524.
32. Frede, S., Freitag, P., Geuting, L., Konietzny, R., and Fandrey, J. *Oxygen-regulated expression of the erythropoietin gene in the human renal cell line REPC*. Blood: 2011. **117**(18): p. 4905-4914.
33. Goldberg, M.A., Dunning, S.P., and Bunn, H.F. *Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein*. Science: 1988. **242**(4884): p. 1412-1415.
34. Goldberg, M.A., Gaut, C.C., and Bunn, H.F. *Erythropoietin mRNA levels are governed by both the rate of gene transcription and posttranscriptional events*. Blood: 1991. **77**(2): p. 271-277.
35. Goldberg, M.A., Glass, G.A., Cunningham, J.M., and Bunn, H.F. *The regulated expression of erythropoietin by two human hepatoma cell lines*. Proc Natl Acad Sci U S A: 1987. **84**(22): p. 7972-7976.
36. Goldwasser, E., Kung, C.K., and Eliason, J. *On the mechanism of erythropoietin-induced differentiation. 13. The role of sialic acid in erythropoietin action*. J Biol Chem: 1974. **249**(13): p. 4202-4206.
37. Grinyo, J.M., and Cruzado, J.M. *Mycophenolate mofetil and calcineurin-inhibitor reduction: recent progress*. Am J Transplant: 2009. **9**(11): p. 2447-2452.
38. Haase, V.H. *Hypoxic regulation of erythropoiesis and iron metabolism*. Am J Physiol Renal Physiol: 2010. **299**(1): p. F1-13.
39. Halloran, P., Mathew, T., Tomlanovich, S., Groth, C., Hooftman, L., and Barker, C. *Mycophenolate mofetil in renal allograft recipients: a pooled efficacy analysis of three randomized, double-blind, clinical studies in*

- prevention of rejection. The International Mycophenolate Mofetil Renal Transplant Study Groups. Transplantation: 1997. 63(1): p. 39-47.*
40. Hamza, A., Rettkowski, O., Osten, B., and Fornara, P. [*Living donor and kidney transplantation*]. *Urologe A: 2003. 42(7): p. W961-972; quiz W973-964.*
41. Heemann, U., Azuma, H., Hamar, P., Schmid, C., Tilney, N., and Philipp, T. *Mycophenolate mofetil inhibits lymphocyte binding and the upregulation of adhesion molecules in acute rejection of rat kidney allografts. Transpl Immunol: 1996. 4(1): p. 64-67.*
42. Heinschink, A., Raab, M., Daxecker, H., Griesmacher, A., and Muller, M.M. *In vitro effects of mycophenolic acid on cell cycle and activation of human lymphocytes. Clin Chim Acta: 2000. 300(1-2): p. 23-28.*
43. Hellwig-Burgel, T., Rutkowski, K., Metzen, E., Fandrey, J., and Jelkmann, W. *Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. Blood: 1999. 94(5): p. 1561-1567.*
44. Herkens, C., Wolff, M., Fandrey, J., Schuler, F., and Jelkmann, W. *Immunocytochemical demonstration of erythropoietin in hypoxic human hepatoma cultures. Histochemistry: 1993. 100(4): p. 303-309.*
45. Huang, H.D., Liu, Z.H., Zhu, X.J., Chen, Z.H., and Li, L.S. *Inhibition of mycophenolic acid on NF-kappaB activity in human endothelial cells. Acta Pharmacol Sin: 2002. 23(7): p. 649-653.*
46. Imoagene-Oyediji, A.E., Rosas, S.E., Doyle, A.M., Goral, S., and Bloom, R.D. *Posttransplantation anemia at 12 months in kidney recipients treated with mycophenolate mofetil: risk factors and implications for mortality. J Am Soc Nephrol: 2006. 17(11): p. 3240-3247.*

47. Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J.M., Lane, W.S., and Kaelin, W.G., Jr. *HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing*. Science: 2001. **292**(5516): p. 464-468.
48. Iyer, N.V., Kotch, L.E., Agani, F., Leung, S.W., Laughner, E., Wenger, R.H., Gassmann, M., Gearhart, J.D., Lawler, A.M., Yu, A.Y., et al. *Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α* . Genes Dev: 1998. **12**(2): p. 149-162.
49. Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., von Kriegsheim, A., Hebestreit, H.F., Mukherji, M., Schofield, C.J., et al. *Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation*. Science: 2001. **292**(5516): p. 468-472.
50. Jacobs, K., Shoemaker, C., Rudersdorf, R., Neill, S.D., Kaufman, R.J., Mufson, A., Sehra, J., Jones, S.S., Hewick, R., Fritsch, E.F., et al. *Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin*. Nature: 1985. **313**(6005): p. 806-810.
51. Jacobson, P.A., Schladt, D., Oetting, W.S., Leduc, R., Guan, W., Matas, A.J., Lamba, V., Mannon, R.B., Julian, B.A., Israni, A., et al. *Genetic determinants of mycophenolate-related anemia and leukopenia after transplantation*. Transplantation: 2011. **91**(3): p. 309-316.
52. Jelkmann, W. *Molecular biology of erythropoietin*. Intern Med: 2004. **43**(8): p. 649-659.
53. Jelkmann, W. *Proinflammatory cytokines lowering erythropoietin production*. J Interferon Cytokine Res: 1998. **18**(8): p. 555-559.
54. Jelkmann, W.E., Fandrey, J., Frede, S., and Pagel, H. *Inhibition of erythropoietin production by cytokines. Implications for the anemia*

- involved in inflammatory states*. Ann N Y Acad Sci: 1994. **718**: p. 300-309; discussion 309-311.
55. Jewell, U.R., Kvietikova, I., Scheid, A., Bauer, C., Wenger, R.H., and Gassmann, M. *Induction of HIF-1alpha in response to hypoxia is instantaneous*. FASEB J: 2001. **15**(7): p. 1312-1314.
56. Kapitsinou, P.P., Liu, Q., Unger, T.L., Rha, J., Davidoff, O., Keith, B., Epstein, J.A., Moores, S.L., Erickson-Miller, C.L., and Haase, V.H. *Hepatic HIF-2 regulates erythropoietic responses to hypoxia in renal anemia*. Blood: 2010. **116**(16): p. 3039-3048.
57. Kasiske, B.L., Guijarro, C., Massy, Z.A., Wiederkehr, M.R., and Ma, J.Z. *Cardiovascular disease after renal transplantation*. J Am Soc Nephrol: 1996. **7**(1): p. 158-165.
58. Knight, S.R., Russell, N.K., Barcena, L., and Morris, P.J. *Mycophenolate mofetil decreases acute rejection and may improve graft survival in renal transplant recipients when compared with azathioprine: a systematic review*. Transplantation: 2009. **87**(6): p. 785-794.
59. Knowles, B.B., Howe, C.C., and Aden, D.P. *Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen*. Science: 1980. **209**(4455): p. 497-499.
60. Koury, S.T., Koury, M.J., Bondurant, M.C., Caro, J., and Graber, S.E. *Quantitation of erythropoietin-producing cells in kidneys of mice by in situ hybridization: correlation with hematocrit, renal erythropoietin mRNA, and serum erythropoietin concentration*. Blood: 1989. **74**(2): p. 645-651.
61. Krantz, S.B. *Erythropoietin*. Blood: 1991. **77**(3): p. 419-434.
62. Kubatzky, K.F., Ruan, W., Gurezka, R., Cohen, J., Ketteler, R., Watowich, S.S., Neumann, D., Langosch, D., and Klingmuller, U. *Self*

- assembly of the transmembrane domain promotes signal transduction through the erythropoietin receptor.* Curr Biol: 2001. **11**(2): p. 110-115.
63. Laemmli, U.K. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature: 1970. **227**(5259): p. 680-685.
64. Lando, D., Peet, D.J., Gorman, J.J., Whelan, D.A., Whitelaw, M.L., and Bruick, R.K. *FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor.* Genes Dev: 2002. **16**(12): p. 1466-1471.
65. Lando, D., Peet, D.J., Whelan, D.A., Gorman, J.J., and Whitelaw, M.L. *Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch.* Science: 2002. **295**(5556): p. 858-861.
66. Lee-Huang, S., Lin, J.J., Kung, H.F., Huang, P.L., Lee, L., and Huang, P.L. *The human erythropoietin-encoding gene contains a CAAT box, TATA boxes and other transcriptional regulatory elements in its 5' flanking region.* Gene: 1993. **128**(2): p. 227-236.
67. Lee, J., Kim, M.S., Kim, E.Y., Park, H.J., Chang, C.Y., Park, K.S., Jung, D.Y., Kwon, C.H., Joh, J.W., and Kim, S.J. *Mycophenolate mofetil promotes down-regulation of expanded B cells and production of TNF-alpha in an experimental murine model of colitis.* Cytokine: 2008. **44**(1): p. 49-56.
68. Levy, A.P., Levy, N.S., and Goldberg, M.A. *Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia.* J Biol Chem: 1996. **271**(5): p. 2746-2753.
69. Livak, K.J., Flood, S.J., Marmaro, J., Giusti, W., and Deetz, K. *Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization.* PCR Methods Appl: 1995. **4**(6): p. 357-362.

70. Livnah, O., Stura, E.A., Middleton, S.A., Johnson, D.L., Jolliffe, L.K., and Wilson, I.A. *Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation*. Science: 1999. **283**(5404): p. 987-990.
71. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem: 1951. **193**(1): p. 265-275.
72. Lutz, J., Stangl, M., and Heemann, U. *[Kidney transplantation in Germany - 2002]*. Zentralbl Chir: 2003. **128**(10): p. 816-820.
73. Macdougall, I.C., and Cooper, A.C. *Erythropoietin resistance: the role of inflammation and pro-inflammatory cytokines*. Nephrol Dial Transplant: 2002. **17 Suppl 11**: p. 39-43.
74. Maizel, J.V. *SDS polyacrylamide gel electrophoresis*. Trends Biochem Sci: 2000. **25**(12): p. 590-592.
75. McGary, E.C., Rondon, I.J., and Beckman, B.S. *Post-transcriptional regulation of erythropoietin mRNA stability by erythropoietin mRNA-binding protein*. J Biol Chem: 1997. **272**(13): p. 8628-8634.
76. Means, R.T., Jr., and Krantz, S.B. *Progress in understanding the pathogenesis of the anemia of chronic disease*. Blood: 1992. **80**(7): p. 1639-1647.
77. Meier-Kriesche, H.U., Li, S., Gruessner, R.W., Fung, J.J., Bustami, R.T., Barr, M.L., and Leichtman, A.B. *Immunosuppression: evolution in practice and trends, 1994-2004*. Am J Transplant: 2006. **6**(5 Pt 2): p. 1111-1131.

78. Metzen, E., Wolff, M., Fandrey, J., and Jelkmann, W. *Pericellular PO₂ and O₂ consumption in monolayer cell cultures*. *Respir Physiol*: 1995. **100**(2): p. 101-106.
79. Minet, E., Ernest, I., Michel, G., Roland, I., Remacle, J., Raes, M., and Michiels, C. *HIF1A gene transcription is dependent on a core promoter sequence encompassing activating and inhibiting sequences located upstream from the transcription initiation site and cis elements located within the 5'UTR*. *Biochem Biophys Res Commun*: 1999. **261**(2): p. 534-540.
80. Miura, O., Nakamura, N., Quelle, F.W., Witthuhn, B.A., Ihle, J.N., and Aoki, N. *Erythropoietin induces association of the JAK2 protein tyrosine kinase with the erythropoietin receptor in vivo*. *Blood*: 1994. **84**(5): p. 1501-1507.
81. Mix, T.C., Kazmi, W., Khan, S., Ruthazer, R., Rohrer, R., Pereira, B.J., and Kausz, A.T. *Anemia: a continuing problem following kidney transplantation*. *Am J Transplant*: 2003. **3**(11): p. 1426-1433.
82. Moore, J., Middleton, L., Cockwell, P., Adu, D., Ball, S., Little, M.A., Ready, A., Wheatley, K., and Borrows, R. *Calcineurin inhibitor sparing with mycophenolate in kidney transplantation: a systematic review and meta-analysis*. *Transplantation*: 2009. **87**(4): p. 591-605.
83. Morris, D.R., Kakegawa, T., Kaspar, R.L., and White, M.W. *Polypyrimidine tracts and their binding proteins: regulatory sites for posttranscriptional modulation of gene expression*. *Biochemistry*: 1993. **32**(12): p. 2931-2937.
84. Natsumeda, Y., and Carr, S.F. *Human type I and II IMP dehydrogenases as drug targets*. *Ann N Y Acad Sci*: 1993. **696**: p. 88-93.

85. Nielsen, O.J., Schuster, S.J., Kaufman, R., Erslev, A.J., and Caro, J. *Regulation of erythropoietin production in a human hepatoblastoma cell line*. Blood: 1987. **70**(6): p. 1904-1909.
86. Niu, S.F., and Li, I.C. *Quality of life of patients having renal replacement therapy*. J Adv Nurs: 2005. **51**(1): p. 15-21.
87. Ohigashi, T., Mallia, C.S., McGary, E., Scandurro, A.B., Rondon, I., Fisher, J.W., and Beckman, B.S. *Protein kinase C alpha protein expression is necessary for sustained erythropoietin production in human hepatocellular carcinoma (Hep3B) cells exposed to hypoxia*. Biochim Biophys Acta: 1999. **1450**(2): p. 109-118.
88. Ojo, A.O., Hanson, J.A., Wolfe, R.A., Leichtman, A.B., Agodoa, L.Y., and Port, F.K. *Long-term survival in renal transplant recipients with graft function*. Kidney Int: 2000. **57**(1): p. 307-313.
89. Opelz, G. *Impact of HLA compatibility on survival of kidney transplants from unrelated live donors*. Transplantation: 1997. **64**(10): p. 1473-1475.
90. Opelz, G., Mytilineos, J., Scherer, S., Dunckley, H., Trejaut, J., Chapman, J., Middleton, D., Savage, D., Fischer, O., Bignon, J.D., et al. *Survival of DNA HLA-DR typed and matched cadaver kidney transplants. The Collaborative Transplant Study*. Lancet: 1991. **338**(8765): p. 461-463.
91. Paliege, A., Rosenberger, C., Bondke, A., Sciesielski, L., Shina, A., Heyman, S.N., Flippin, L.A., Arend, M., Klaus, S.J., and Bachmann, S. *Hypoxia-inducible factor-2alpha-expressing interstitial fibroblasts are the only renal cells that express erythropoietin under hypoxia-inducible factor stabilization*. Kidney Int: 2010. **77**(4): p. 312-318.
92. Pan, X., Suzuki, N., Hirano, I., Yamazaki, S., Minegishi, N., and Yamamoto, M. *Isolation and characterization of renal erythropoietin-*

- producing cells from genetically produced anemia mice*. PLoS One: 2011. **6**(10): p. e25839.
93. Percy, M.J., Furlow, P.W., Lucas, G.S., Li, X., Lappin, T.R., McMullin, M.F., and Lee, F.S. *A gain-of-function mutation in the HIF2A gene in familial erythrocytosis*. N Engl J Med: 2008. **358**(2): p. 162-168.
94. Pile, T., Kieswich, J., Harwood, S., and Yaqoob, M.M. *A possible explanation for anemia in patients treated with mycophenolic acid*. Transplantation: 2011. **92**(12): p. 1316-1321.
95. Piret, J.P., Cosse, J.P., Ninane, N., Raes, M., and Michiels, C. *Hypoxia protects HepG2 cells against etoposide-induced apoptosis via a HIF-1-independent pathway*. Exp Cell Res: 2006. **312**(15): p. 2908-2920.
96. Qiu, H., Belanger, A., Yoon, H.W., and Bunn, H.F. *Homodimerization restores biological activity to an inactive erythropoietin mutant*. J Biol Chem: 1998. **273**(18): p. 11173-11176.
97. Raab, M., Daxecker, H., Karimi, A., Markovic, S., Cichna, M., Markl, P., and Muller, M.M. *In vitro effects of mycophenolic acid on the nucleotide pool and on the expression of adhesion molecules of human umbilical vein endothelial cells*. Clin Chim Acta: 2001. **310**(1): p. 89-98.
98. Rankin, E.B., Wu, C., Khatri, R., Wilson, T.L., Andersen, R., Araldi, E., Rankin, A.L., Yuan, J., Kuo, C.J., Schipani, E., et al. *The HIF signaling pathway in osteoblasts directly modulates erythropoiesis through the production of EPO*. Cell: 2012. **149**(1): p. 63-74.
99. Remy, I., Wilson, I.A., and Michnick, S.W. *Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change*. Science: 1999. **283**(5404): p. 990-993.

100. Renders, L. [*Immunosuppressants in the treatment of kidney transplant recipients*]. *Nephrologie* 2007: 2007. **2**: p. 157-166.
101. Reuter, R.M. *Modulation der Erythropoetinsynthese in HepG2-Zellen durch das Immunsuppressivum Mycophenolat Mofetil in vitro*. 2005: Dissertation, Uniklinik Frankfurt am Main.
102. Richard, D.E., Berra, E., Gothie, E., Roux, D., and Pouyssegur, J. *p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1*. *J Biol Chem*: 1999. **274**(46): p. 32631-32637.
103. Rondon, I.J., MacMillan, L.A., Beckman, B.S., Goldberg, M.A., Schneider, T., Bunn, H.F., and Malter, J.S. *Hypoxia up-regulates the activity of a novel erythropoietin mRNA binding protein*. *J Biol Chem*: 1991. **266**(25): p. 16594-16598.
104. Ross, J. *mRNA stability in mammalian cells*. *Microbiol Rev*: 1995. **59**(3): p. 423-450.
105. Russell, J.D., Beecroft, M.L., Ludwin, D., and Churchill, D.N. *The quality of life in renal transplantation--a prospective study*. *Transplantation*: 1992. **54**(4): p. 656-660.
106. Salceda, S., and 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): p. 22642-22647.
107. Sawada, K., Krantz, S.B., Kans, J.S., Dessypris, E.N., Sawyer, S., Glick, A.D., and Civin, C.I. *Purification of human erythroid colony-forming units and demonstration of specific binding of erythropoietin*. *J Clin Invest*: 1987. **80**(2): p. 357-366.

108. Schobersberger, W., Hoffmann, G., and Fandrey, J. *Nitric oxide donors suppress erythropoietin production in vitro*. Pflugers Arch: 1996. **432**(6): p. 980-985.
109. Schuster, S.J., Badiavas, E.V., Costa-Giomi, P., Weinmann, R., Erslev, A.J., and Caro, J. *Stimulation of erythropoietin gene transcription during hypoxia and cobalt exposure*. Blood: 1989. **73**(1): p. 13-16.
110. Schuster, S.J., Wilson, J.H., Erslev, A.J., and Caro, J. *Physiologic regulation and tissue localization of renal erythropoietin messenger RNA*. Blood: 1987. **70**(1): p. 316-318.
111. Semenza, G.L. *Involvement of oxygen-sensing pathways in physiologic and pathologic erythropoiesis*. Blood: 2009. **114**(10): p. 2015-2019.
112. Semenza, G.L., Dureza, R.C., Traystman, M.D., Gearhart, J.D., and Antonarakis, S.E. *Human erythropoietin gene expression in transgenic mice: multiple transcription initiation sites and cis-acting regulatory elements*. Mol Cell Biol: 1990. **10**(3): p. 930-938.
113. Semenza, G.L., Jiang, B.H., Leung, S.W., Passantino, R., Concordet, J.P., Maire, P., and 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): p. 32529-32537.
114. Semenza, G.L., and Wang, G.L. *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): p. 5447-5454.
115. Shapiro, R., Young, J.B., Milford, E.L., Trotter, J.F., Bustami, R.T., and Leichtman, A.B. *Immunosuppression: evolution in practice and trends, 1993-2003*. Am J Transplant: 2005. **5**(4 Pt 2): p. 874-886.

116. Shaw, L.M., Sollinger, H.W., Halloran, P., Morris, R.E., Yatscoff, R.W., Ransom, J., Tsina, I., Keown, P., Holt, D.W., Lieberman, R., et al. *Mycophenolate mofetil: a report of the consensus panel*. Ther Drug Monit: 1995. **17**(6): p. 690-699.
117. Sienko, J., Wisniewska, M., Ostrowski, M., Ciechanowski, K., Safranow, K., Chudyk, A., Fronczyk, A., Rozanski, J., Kaminski, M., Sulikowski, T., et al. *Factors that impact on immediate graft function in patients after renal transplantation*. Transplant Proc: 2003. **35**(6): p. 2153-2154.
118. Sokoloski, J.A., and Sartorelli, A.C. *Effects of the inhibitors of IMP dehydrogenase, tiazofurin and mycophenolic acid, on glycoprotein metabolism*. Mol Pharmacol: 1985. **28**(6): p. 567-573.
119. Sollinger, H.W. *Mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in primary cadaveric renal allograft recipients*. U.S. Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group. Transplantation: 1995. **60**(3): p. 225-232.
120. Sollinger, H.W., Deierhoi, M.H., Belzer, F.O., Diethelm, A.G., and Kauffman, R.S. *RS-61443--a phase I clinical trial and pilot rescue study*. Transplantation: 1992. **53**(2): p. 428-432.
121. Takemoto, S.K., Terasaki, P.I., Gjertson, D.W., and Cecka, J.M. *Twelve years' experience with national sharing of HLA-matched cadaveric kidneys for transplantation*. N Engl J Med: 2000. **343**(15): p. 1078-1084.
122. Tamura, K., Sudo, T., Senftleben, U., Dadak, A.M., Johnson, R., and Karin, M. *Requirement for p38alpha in erythropoietin expression: a role for stress kinases in erythropoiesis*. Cell: 2000. **102**(2): p. 221-231.
123. Tarumoto, T., Imagawa, S., Ohmine, K., Nagai, T., Higuchi, M., Imai, N., Suzuki, N., Yamamoto, M., and Ozawa, K. *N(G)-monomethyl-L-arginine*

- inhibits erythropoietin gene expression by stimulating GATA-2*. Blood: 2000. **96**(5): p. 1716-1722.
124. van der Putten, K., Braam, B., Jie, K.E., and Gaillard, C.A. *Mechanisms of Disease: erythropoietin resistance in patients with both heart and kidney failure*. Nat Clin Pract Nephrol: 2008. **4**(1): p. 47-57.
125. Vanrenterghem, Y., Ponticelli, C., Morales, J.M., Abramowicz, D., Baboolal, K., Eklund, B., Kliem, V., Legendre, C., Morais Sarmiento, A.L., and Vincenti, F. *Prevalence and management of anemia in renal transplant recipients: a European survey*. Am J Transplant: 2003. **3**(7): p. 835-845.
126. Wang, G.L., and Semenza, G.L. *Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction*. Blood: 1993. **82**(12): p. 3610-3615.
127. Weidemann, A., Kerdiles, Y.M., Knaup, K.X., Rafie, C.A., Boutin, A.T., Stockmann, C., Takeda, N., Scadeng, M., Shih, A.Y., Haase, V.H., et al. *The glial cell response is an essential component of hypoxia-induced erythropoiesis in mice*. J Clin Invest: 2009. **119**(11): p. 3373-3383.
128. Wenger, R.H. *Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation*. J Exp Biol: 2000. **203**(Pt 8): p. 1253-1263.
129. Wiesener, M.S., Jurgensen, J.S., Rosenberger, C., Scholze, C.K., Horstrup, J.H., Warnecke, C., Mandriota, S., Bechmann, I., Frei, U.A., Pugh, C.W., et al. *Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs*. FASEB J: 2003. **17**(2): p. 271-273.
130. Wolfe, R.A., Ashby, V.B., Milford, E.L., Ojo, A.O., Ettenger, R.E., Agodoa, L.Y., Held, P.J., and Port, F.K. *Comparison of mortality in all*

- patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant.* N Engl J Med: 1999. **341**(23): p. 1725-1730.
131. Wolff, M., Fandrey, J., and Jelkmann, W. *Microelectrode measurements of pericellular PO₂ in erythropoietin-producing human hepatoma cell cultures.* Am J Physiol: 1993. **265**(5 Pt 1): p. C1266-1270.
132. Yorgin, P.D., Scandling, J.D., Belson, A., Sanchez, J., Alexander, S.R., and Andreoni, K.A. *Late post-transplant anemia in adult renal transplant recipients. An under-recognized problem?*, Am J Transplant: 2002. **2**(5): p. 429-435.
133. Yu, F., White, S.B., Zhao, Q., and Lee, F.S. *HIF-1alpha binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation.* Proc Natl Acad Sci U S A: 2001. **98**(17): p. 9630-9635.

Schriftliche Erklärung

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

Regulationsmechanismen der verminderten Erythropoetin Synthese unter dem Immunsuppressivum Mycophenolat Mofetil in HepG2 Zellen

in der Medizinischen Klinik III (Kardiologie, Angiologie, Hämostaseologie) Funktionsbereich Nephrologie unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Ingeborg Hauser mit Unterstützung durch Dr. Stefan Gauer ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

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.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)