

Die Balance der Transkriptionsfaktoren: Entschlüsselung der molekularen Ursache der Anämie chronischer Entzündungen

T. Hellwig-Bürgel, K. La Ferla-Brühl, C. Reimann, J. Krajewski und W. Jelkmann

Zusammenfassung

Die Anämie chronisch entzündlicher Erkrankungen beruht partiell auf einem Erythropoietin (Epo) Mangel. Die proentzündlichen Zytokine Interleukin (IL-1) und Tumornekrosefaktor α (TNF- α) hemmen die Epo-Expression. Um den Mechanismus dieser Hemmung zu ergründen, haben wir eine Zellkulturstudie zum Einfluss von IL-1 und TNF- α auf Transkriptionsfaktoren durchgeführt, welche das Epo-Gen kontrollieren. Molekularbiologische Analysen (Westernblot, DNA-Bindung, Reportergene, Oligo-Decoy) an Epo produzierenden menschlichen Hepatomzellen (HepG2) zeigten, dass die Zytokine zwei Transkriptionsfaktoren aktivieren, welche die Epo-Expression unterdrücken, nämlich NF- κ B und GATA-2. Die Befunde geben eine mechanistische Erklärung für den Epo Mangel bei entzündlichen Prozessen. Darüber hinaus wird deutlich, dass die Epo-Expression nicht nur durch aktivierende, sondern auch durch inhibierende Transkriptionsfaktoren kontrolliert wird.

Summary

The anemia of chronic diseases (ACD) is associated with inappropriately low levels of circulating erythropoietin (Epo). The proinflammatory cytokines interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor α (TNF- α) inhibit Epo gene expression. In a study of the molecular mechanisms of this inhibition the effects of IL-1 and TNF- α on transcription factors in control of the Epo gene in human hepatoma cell cultures (HepG2) were investigated. Results by Western blotting, electrophoretic mobility shift assays, reporter gene assays and oligo decoy approaches indicated that the cytokines activate two transcription factors that suppress the Epo gene, namely NF- κ B and GATA-2. The present findings do not only provide an explanation for the impaired Epo synthesis in inflammation but add further evidence in favour of the concept that Epo gene expression is balanced by positive and negative *trans*-acting factors.

Einleitung

Die Aufrechterhaltung einer konstanten Anzahl roter Blutkörperchen im Körper ist eine fulminante Leistung. Pro Sekunde werden ungefähr 2,3 Millionen Re-

tikulozyten gebildet und in die Zirkulation entlassen, die gealterte und vom mononukleären Phagozytensystem aussortierte Erythrozyten ersetzen. Die Erythropoese wird durch das Hormon Erythropoietin (Epo) geregelt. Die Hauptursache der Anämie bei entzündlichen und malignen Erkrankungen („Anemia of chronic diseases“, ACD) ist ein relativer Epo-Mangel (7). Durch Gabe von rekombinantem humanen Epo ist eine ACD korrigierbar (9; 11). Die proinflammatorischen Zytokine Interleukin 1 (IL-1) und Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α) unterdrücken die Epo-Genexpression sowohl *in vitro* (2; 3) als auch *in vivo* (4). Unserer Arbeitsgruppe gelang es kürzlich, die molekularen Mechanismen dieses Effektes teilweise aufzuklären.

Biochemische Grundlagen

Die Transkription von Strukturgenen erfolgt im Wesentlichen durch die DNA-abhängige RNA-Polymerase 2 (RNA-Pol 2). Die Menge einer bestimmten mRNA in einer Zelle hängt überwiegend davon ab, wie oft dieses Enzym mit den Promotorsequenzen eines Gens in Wechselwirkung tritt und nachfolgend eine Transkription initiiert. Die Interaktion zwischen der RNA-Pol 2 und den Promotorsequenzen ist ein stochastischer Vorgang. Um die Bindungswahrscheinlichkeit zu erhöhen, gibt es sogenannte Transkriptionsfaktoren (TFs). Diese helfen der RNA-Pol 2 bei der Erkennung und Bindung der regulatorischen DNA-Abschnitte. Neben positiv regulierenden TFs gibt es auch negativ regulierende, deren Dissoziation von der DNA eine effiziente Transkription erst ermöglicht. TFs haben spezifische Erkennungssequenzen in den Promotor- und Enhancer-Bereichen der jeweiligen Gene. Das Vorhandensein oder Fehlen verschiedener Bindungsstellen ist dabei u.a. für die gewebsspezifische Expression eines Gens verantwortlich.

Das Epo-Gen besitzt sowohl im 5'-Promotorbereich als auch im 3'-gelegenen Enhancer mehrere Bindungsstellen für TFs (Abb. 1). Der wichtigste positiv regulierende TF für die hypoxisch gesteigerte Epo-Transkription ist der Hypoxie Induzierbare Faktor 1 (HIF-1), der eine Bindungsstelle im 3'-Enhancer hat (1; 12; 14). Unter normoxischen Bedingungen ist dieser TF in Zellen und im Gewebe nicht nachweisbar. Erst unter Sauerstoffmangelbedingungen wird die α -Untereinheit

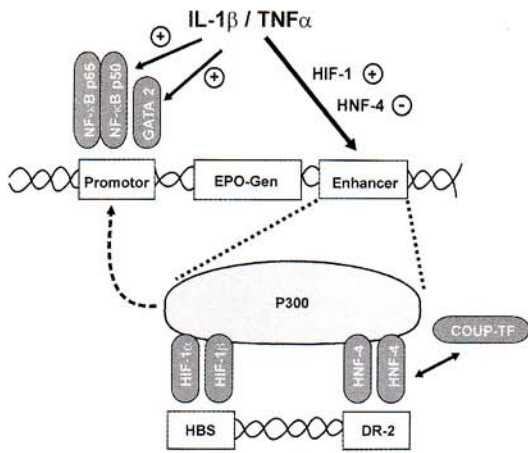


Abb. 1: Schema des Erythropoietin-Gens (EPO-Gen) mit den 5' und 3' gelegenen regulatorischen Abschnitten und den potenziellen Bindungsstellen für relevante Transkriptionsfaktoren. Die Wirkungen der Zytokine IL-1 α und TNF- α sind durch die Pfeile mit den entsprechenden Effekten auf den jeweiligen Transkriptionsfaktor symbolisiert. NF- κ B: Nukleärer Faktor kappa B, GATA-2: GATA-bindender Transkriptionsfaktor 2, HIF-1: Hypoxie-Induzierbarer Faktor 1, HNF-4: Hepatocyten Nukleärer Faktor 4, COUP-TF: „chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor“.

des dimeren HIF-1 stabilisiert und damit einer Analyse zugänglich (10).

Fragestellung

Unsere Untersuchungen zielten darauf ab, die molekularen Mechanismen aufzuklären, durch die die proinflammatorischen Zytokine IL-1 und TNF- α die Epo-Produktion unterdrücken. Da HIF-1 als wichtigster TF für die Epo-Genexpression beschrieben war, wurde die Arbeitshypothese aufgestellt, dass IL-1 und TNF- α die Menge oder die Funktion von HIF-1 reduzieren könnten. Zur Prüfung dieser Hypothese wurden Untersuchungen an der menschlichen Epo produzierenden Hepatom-Zelllinie HepG2 durchgeführt.

Ergebnisse

Als wir den Einfluss von IL-1 und TNF- α auf HIF-1 im Zellkulturmodell mit HepG2-Zellen untersuchten, machten wir eine aufregende Beobachtung. Entgegen unserer Hypothese führte die Stimulation der Zellen mit IL-1 zu einer Stabilisierung und Aktivierung von HIF-1 unter normoxischen Bedingungen (TNF- α steigerte nur die Aktivität) (Abb. 2, A und B). Demnach konnte HIF-1 nicht der Vermittler der verminderten Epo-Transkription sein (5).

lieren. Dafür transfizierten wir HepG2-Zellen mit zwei unterschiedlichen Expressionsplasmiden (8). Das erste codierte für I κ -B α , ein Protein, das eine Untereinheit (p65) von NF- κ B solange im Zytoplasma zurückhält,

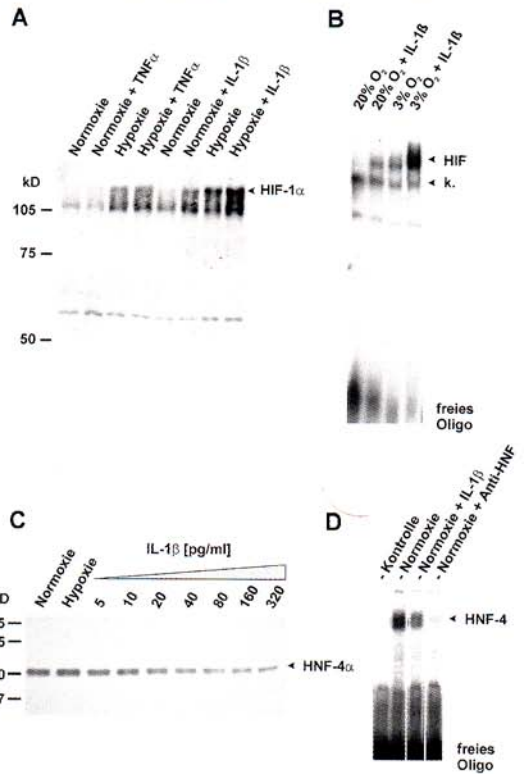


Abb. 2: A: HIF-1 α Westernblot mit Kernextrakten (KE) von HepG2 Zellen, die unter normoxischen (5% CO $_2$, Rest Raumluft) oder hypoxischen Bedingungen (3% O $_2$, 5% CO $_2$, Rest N $_2$) 4 Stunden mit oder ohne Zytokine inkubiert wurden (10 ng/ml TNF- α ; 300 pg/ml IL-1 β). Der Grad der Schwärzung ist proportional der Menge des HIF-1 α Proteins. B: HIF-1 EMSA (Electrophoretic mobility shift assay) der Zellextrakte. In diesem Ansatz wird ein kurzes, radioaktiv markiertes, synthetisches Oligonukleotid mit der Bindungssequenz für den zu untersuchenden Transkriptionsfaktor (TF) zusammen mit einem KE inkubiert. Ist der entsprechende TF aktiviert worden, bindet er an das Oligonukleotid und kann durch Elektrophorese von dem ungebundenen Oligonukleotid (freies Oligo) getrennt werden. Der Grad der Schwärzung ist proportional der DNA-Bindung von HIF-1. C: HNF-4 α Westernblot. Die IL-1 β Dosis-Wirkungsbeziehung wurde mit normoxischen HepG2 Zellen gewonnen (4 Stunden Inkubation). D: HNF-4 EMSA der Zellen. Kontrolle: kein KE in der Reaktion, Anti-HNF: Reaktion inkubiert mit einem Antikörper gegen HNF-4 α , der die Bindung von HNF-4 an die DNA verhindert.

Es war bekannt, dass für eine maximale hypoxische Induktion des Epo-Gens die Bindungsstelle für den Hepatozyten Nukleären Faktor 4 (HNF-4) essentiell ist (1). Nach Literaturangaben bildet HNF-4 über das p300/CBP (ein Adaptorprotein) einen großen Komplex mit HIF-1, welcher seinerseits die RNA-Pol 2 bindet, dirigiert und fördert (Abb. 1). Also untersuchten wir den Einfluss der Zytokine auf HNF-4. Unser Vorhaben gestaltete sich schwieriger, als zunächst angenommen, da an die Bindungssequenz von HNF-4 auch andere TFs wie z.B. COUP-Tf und RXR binden, welche die HNF-Wirkungen antagonisieren können. Tatsächlich bekamen wir einen ersten Hinweis darauf, dass die Modulation eines TFs möglicherweise die Ursache für eine verminderte Epo-Transkription sein könnte, denn IL-1 reduzierte sowohl die HNF-4 Menge im Zellkern als auch die DNA-Bindungs-fähigkeit (Abb. 2, C und D). Daraus konnten wir den Schluss ziehen, dass, obwohl die HIF-1 Menge für sich allein erhöht ist, der Komplex aus HIF-1, p300/CBP und HNF-4 nur in verringertem Maße zur Verfügung steht.

Der 5'-Promotorbereich des Epo-Gens ist durch das Fehlen einer typischen TATA-Box gekennzeichnet. Die entsprechende Sequenz ist durch einen Basenaustausch in GATA verändert (Abb. 1). An diese Sequenz binden die sogenannten GATA-TFs (hämapoietische TFs). Aus der Literatur war bekannt, dass GATA-2 ein negativ regulierender Faktor für das Epo-Gen ist (6; 13). Das bedeutet, unter normoxischen Bedingungen ist GATA-2 an die DNA gebunden und verhindert eine Anlagerung der RNA-Pol 2. Unter hypoxischen Bedingungen dissoziiert GATA-2 von der DNA und ermöglicht auf diese Weise die Transkription. Wir fanden heraus, dass IL-1 β und TNF- α die GATA-2 DNA-

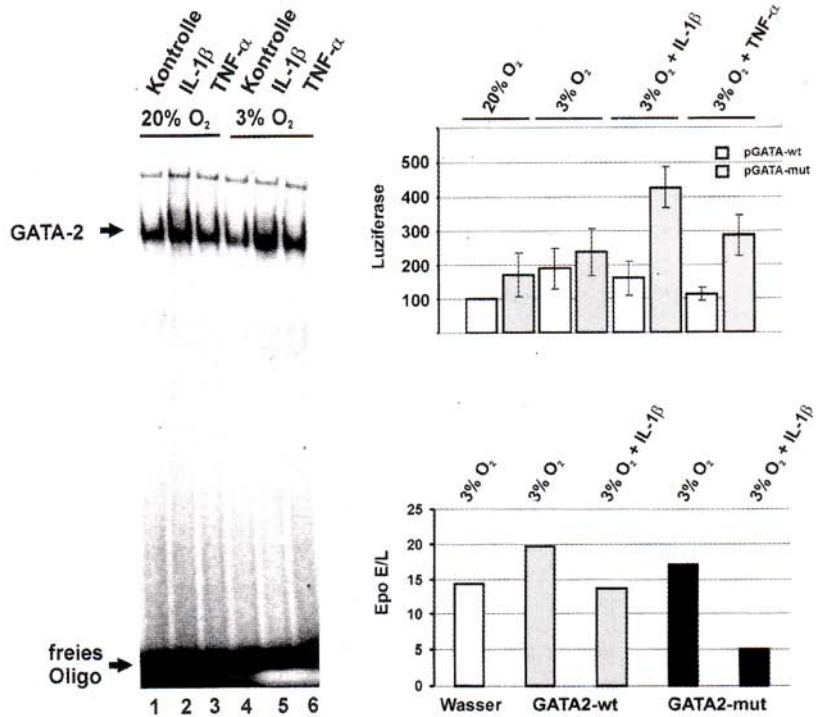


Abb. 3: A: GATA-2 EMSA mit KE aus HepG2 Zellen, die 4 Stunden den experimentellen Bedingungen ausgesetzt waren. B: Relative Aktivität eines Luciferase-Reportergenkonstruktes unter der Kontrolle eines GATA-Elementes (pGATA-wt) oder eines in TATA veränderten Elementes (pGATA-mut). C: Oligo-Decoy Versuch. Hier wird die zelluläre Funktion eines TFs in vivo gehemmt. Anschließend bestimmt man die Expressionsrate geeigneter Zielgene. Wird GATA-2 unter hypoxischen Bedingungen gehemmt, ist die Epo Produktion im Vergleich zur Wasserkontrolle leicht gesteigert. IL-1 β wirkt bei gehemmter GATA-2 Funktion kaum. Im Kontrollversuch mit einem Oligonukleotid mit veränderter GATA-2 Bindungsstelle (und damit keiner GATA-2 Hemmung) führt IL-1 β Stimulation zu einer deutlichen Reduktion der Epo Produktion.

Bindung erhöhen (Abb. 3 A) und, da GATA-2 ein negativ regulierender TF ist, die Expression eines GATA-2 abhängigen Reportergens vermindern (Abb. 3 B) (8). Desweiteren konnten wir mit einem Oligo-Decoy Ansatz zeigen, dass die durch die Zytokine induzierte Reduktion der Epo-Proteinmenge aufgehoben wurde, wenn wir die Funktion von GATA-2 verminderten (Abb. 3 C).

Weiter 5'-gelegen von der GATA-2 Bindungsstelle finden sich mehrere Bindungsstellen für NF- κ B (Abb. 1). NF- κ B ist der vermutlich wichtigste TF für die Vermittlung von Entzündungsreaktionen. Ein vereinfachtes Schema zur NF- κ B Aktivierung ist in Abb. 4 gezeigt. Im allgemeinen werden durch NF- κ B Aktivierung die entsprechenden Zielgene vermehrt abgelesen. Hier galt es nun, einen negativen Effekt mit diesem TF zu korre-

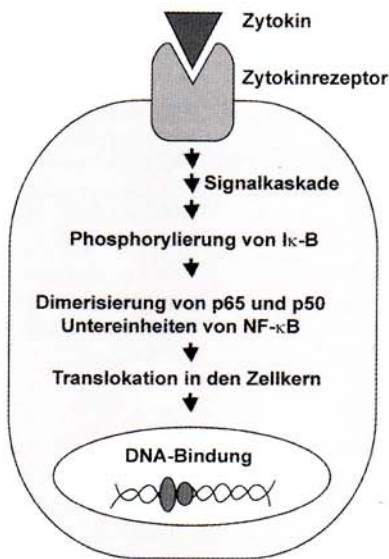


Abb. 4: Schema zur Aktivierung von NF-κB. Im Ruhezustand liegen die beiden Untereinheiten von NF-κB (p65 und p50) getrennt voneinander im Zytoplasma vor. Inhibitorische Proteine (Iκ-B Proteine) sind mit den Untereinheiten assoziiert und halten diese im Zytoplasma. Wird durch eine Zytokin-Rezeptor-Interaktion eine intrazelluläre Signalkaskade gestartet, werden die inhibitorischen Proteine phosphoryliert und damit funktionslos. Daraufhin dimerisieren die p65 und p50 Untereinheiten, translozieren in den Zellkern und binden an ihre Zielsequenzen.

bis durch Zytokinstimulation Iκ-Bα phosphoryliert wird. Das zweite codierte für eine mutierte Form von Iκ-Bα, die nicht mehr phosphoryliert werden kann, wohl aber die p65 Untereinheit von NF-κB binden kann. Stimulierten wir diese Zellen mit Zytokinen, so blieb die Reduktion sowohl von Epo-mRNA als auch sezerniertem Epo in den mit dem mutierten Iκ-Bα transfizierten Zellen aus (Abb. 5, A und B). Auch dieses Ergebnis konnten wir mit einem Oligo-Decoy Experiment, bei dem wir die NF-κB Funktion einschränkten, bestätigen (Abb. 5 C).

Schlussfolgerungen

Unter normoxischen Bedingungen halten sich die Aktivitäten der vier für die Epo-Transkription wichtigen TFs die Waage (Abb. 6). Auffällig ist dabei, dass die zwei positiv regulierenden Abschnitte 3' des Gens lokalisiert und die negativ regulierenden Abschnitte im 5' Promotor zu finden sind. Gewebshypoxie verschiebt das Gleichgewicht der TFs in Richtung vermehrter Epo-Produktion (durch vermehrte HIF-1 Aktivität und verminderte GATA-2 Aktivität, HNF-4 und NF-κB

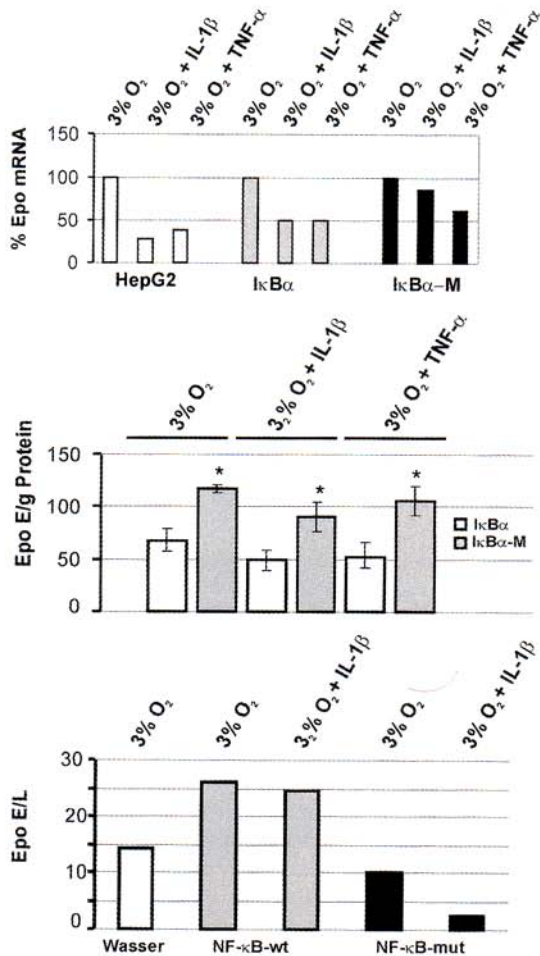


Abb. 5: A: Einfluss einer Zytokinbehandlung auf den Epo mRNA Gehalt hypoxischer genmanipulierter Hepatomzellen. HepG2: Ausgangszelllinie, in der Zytokine die Epo mRNA reduzieren. Iκ-Bα: HepG2 Zellen, die Iκ-Bα überexprimieren. Auch hier reduzieren die Zytokine die Epo mRNA. Iκ-Bα-M: HepG2 Zellen, die eine mutierte Form von Iκ-Bα überexprimieren. Diese Form von Iκ-Bα kann nicht phosphoryliert werden, NF-κB kann somit nicht aktiviert werden. Hier zeigen die Zytokine nur eine schwache Reduktion der Epo mRNA. B: Sezerniertes Epo im Zellkulturüberstand. Iκ-Bα-M überexprimierende Zellen zeigen unter allen Versuchsbedingungen eine vermehrte Epo Produktion im Vergleich zu Iκ-Bα überexprimierenden HepG2 Zellen. C: NF-κB Oligo-Decoy Versuch. Die *in vivo* Hemmung von NF-κB (NF-κB-wt) führt auch unter IL-1β Stimulation zu einer deutlich gesteigerten Epo Produktion im Vergleich zur Kontrolle (Wasser). Ein Oligonukleotid mit veränderter NF-κB Bindungsstelle (NF-κB-mut) ist nicht in der Lage, die NF-κB Funktion *in vivo* zu hemmen, und somit produzieren diese Zellen unter IL-1α Stimulation nur wenig Epo.

**“Normoxische” Homöostase
“steady state” Epo Produktion**

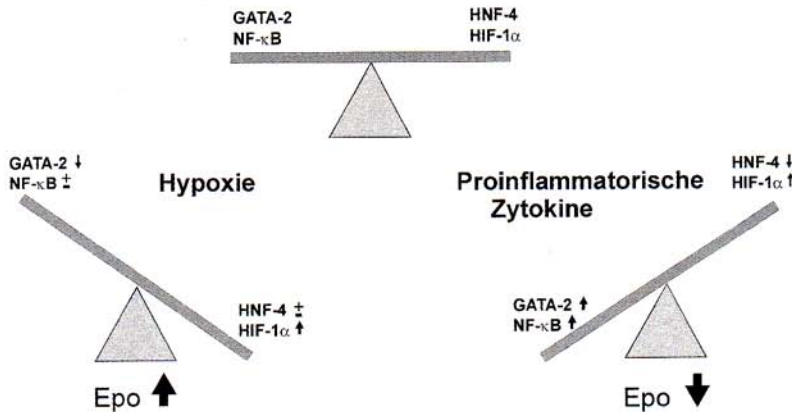


Abb. 6: Schema des Gleichgewichtes der Transkriptionsfaktoren. Im Ausgangszustand halten sich positive und negative Effekte die Waage. Hypoxie oder proinflammatorische Zytokine bringen die Waage zur einen oder anderen Seite aus dem Gleichgewicht. Die Folge ist eine gesteigerte oder verminderte Epo-Produktion.

bleiben dabei unverändert). Entzündungsmediatoren stören dieses Gleichgewicht in gegensinniger Richtung, da GATA-2 und NF-κB Aktivitäten gesteigert werden. Die erhöhte HIF-1 Aktivität kann die negativen Effekte von GATA-2 und NF-κB alleine nicht ausgleichen, da der Kooperationspartner HNF-4 vermindert wird. Durch das Studium der einzelnen TFs können wir nun die Entstehung einer ACD, zumindest im Modell, erstmals kausal erklären. Ferner lassen sich durch das Verständnis der molekularen Ursachen einer verminderten Epo-Produktion prospektiv auch neue Konzepte für die Behandlung von Patienten mit chronisch entzündlichen oder malignen Erkrankungen ableiten.

Danksagung

Die Untersuchungen wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt (SFB 367-C8). Der Bericht fasst Befunde zusammen, die im Rahmen der Promotionsvorhaben von Katia La Ferla-Brühl, Christian Reimann und Jochen Krajewski gewonnen worden sind.

Literatur

1. Bunn HF, Poyton RO (1996) Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol Rev* 76 : 839-885
2. Fandrey J, Huwiler A, Frede S, Pfeilschifter J, Jelkmann W (1994) Distinct signaling pathways mediate phorbol-ester-induced and cytokine-induced inhibition of erythropoietin gene expression. *Eur J Biochem* 226 : 335-340
3. Faquin WC, Schneider TJ, Goldberg MA (1992) Effect of inflammatory cytokines on hypoxia-induced erythropoietin production. *Blood* 79 : 1987-1994

4. Frede S, Fandrey J, Pagel H, Hellwig T, Jelkmann W (1997) Erythropoietin gene expression is suppressed after lipopolysaccharide or interleukin-1 beta injections in rats. *Am J Physiol* 273 : R1067-R1071
5. Hellwig-Bürgel T., Rutkowski K, Metzgen E, Fandrey J, Jelkmann W (1999) Interleukin-1β and tumor necrosis factor-α stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood* 94 : 1561-1567
6. Imagawa S, Yamamoto M, Ueda M, Miura Y (1996) Erythropoietin gene expression by hydrogen peroxide. *Int J Hematol* 64 : 189-195
7. Jelkmann W (1998) Proinflammatory cytokines lowering erythropoietin production. *J Interferon Cytokine Res* 18 : 555-559
8. La Ferla K, Reimann C, Jelkmann W, Hellwig-Bürgel T (2002) Inhibition of erythropoietin gene expression signaling involves the transcription factors GATA-2 and NF-κB. *FASEB J* 10.1096 : fj 02-0168fje
9. Pincus T, Olsen NJ, Russell JJ, Wolfe F, Harris ER, Schnitzer TJ, Boccagno JA, Krantz SB (1990) Multicenter study of recombinant human erythropoietin in correction of anemia in rheumatoid arthritis. *Am J Med* 89 : 161-168
10. Salceda S, Caro J (1997) Hypoxia-inducible factor 1α (HIF-1α) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 272 : 22642-22647
11. Schreiber S, Howaldt S, Schnoor M, Nikolaus S, Bauditz J, Gasche C, Lochs H, Raedler A (1996) Recombinant erythropoietin for the treatment of anemia in inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 334 : 619-623
12. Semenza GL (1994) Regulation of erythropoietin production. New insights into molecular mechanisms of oxygen homeostasis. *Hematol Oncol Clin North Am* 8 : 863-884
13. Tsuchiya T, Okada M, Ueda M, Yasukochi Y (1997) Activation of the erythropoietin promoter by a point mutation from GATA to TATA in the -30 region. *J Biochem (Tokyo)* 121 : 193-196
14. Wenger RH (2000) Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation. *J Exp Biol* 203 : 1253-1263