2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Mauslinien

Die in Tabelle 1 aufgeführten Mauslinien wurden verwendet.

Alle Tierversuche wurden gemäß den NIH (*National Institute of Health*) Richtlinien für den Gebrauch und die Sorgfaltspflicht lebender Tiere durchgeführt. Die jeweiligen Vorgehensweisen der Tierversuche wurden vom Institut für Tierpflege und Gebrauch (*Institutional Animal Care and Use Committee* (*IACUC*)) der *Vanderbilt University* in Nashville/Tennessee geprüft und genehmigt.

Tabelle 1: Verwendete Mauslinien

Mauslinie	**Referenz**
Pax8-rtTA	(Traykova-Brauch et al. 2008)
LC-1	(Schonig et al. 2002)
Vhl$^{flox/flox}$	(Haase et al. 2001)
Arnt$^{flox/flox}$	(Walisser et al. 2004)
Epo$^{flox/flox}$	(Zeigler et al. 2010)
ROSA26R	(Soriano 1999)
Thp-Cre	(Stricklett et al. 2003)
Hoxb7-Cre	(Yu et al. 2002)
Pepck-Cre	(Rankin et al. 2006)

2.2 Genetisches System zum Erhalt eines induzierbaren, zellspezifischen Knockouts

Zur Induktion eines zeitlich kontrollierten, zellspezifischen Knockouts wurden die Pax8-rtTA und die LC-1 Mauslinie gekreuzt und wiederum mit den entsprechenden gefloxten Mauslinien für den *lacZ*-Rosareporter, *Vhl*, *Epo*, *Arnt* oder in Kombination gekreuzt. Die Pax8-rtTA knock-in Mauslinie ex-

© Springer Fachmedien Wiesbaden GmbH 2017
N. Farsijani, *Auswirkungen renal-tubulärer Aktivierung von Hypoxie-induzierbaren Faktoren auf die Erythropoietin-Produktion im transgenen Mausmodell*, BestMedDiss, DOI 10.1007/978-3-658-17363-0_2

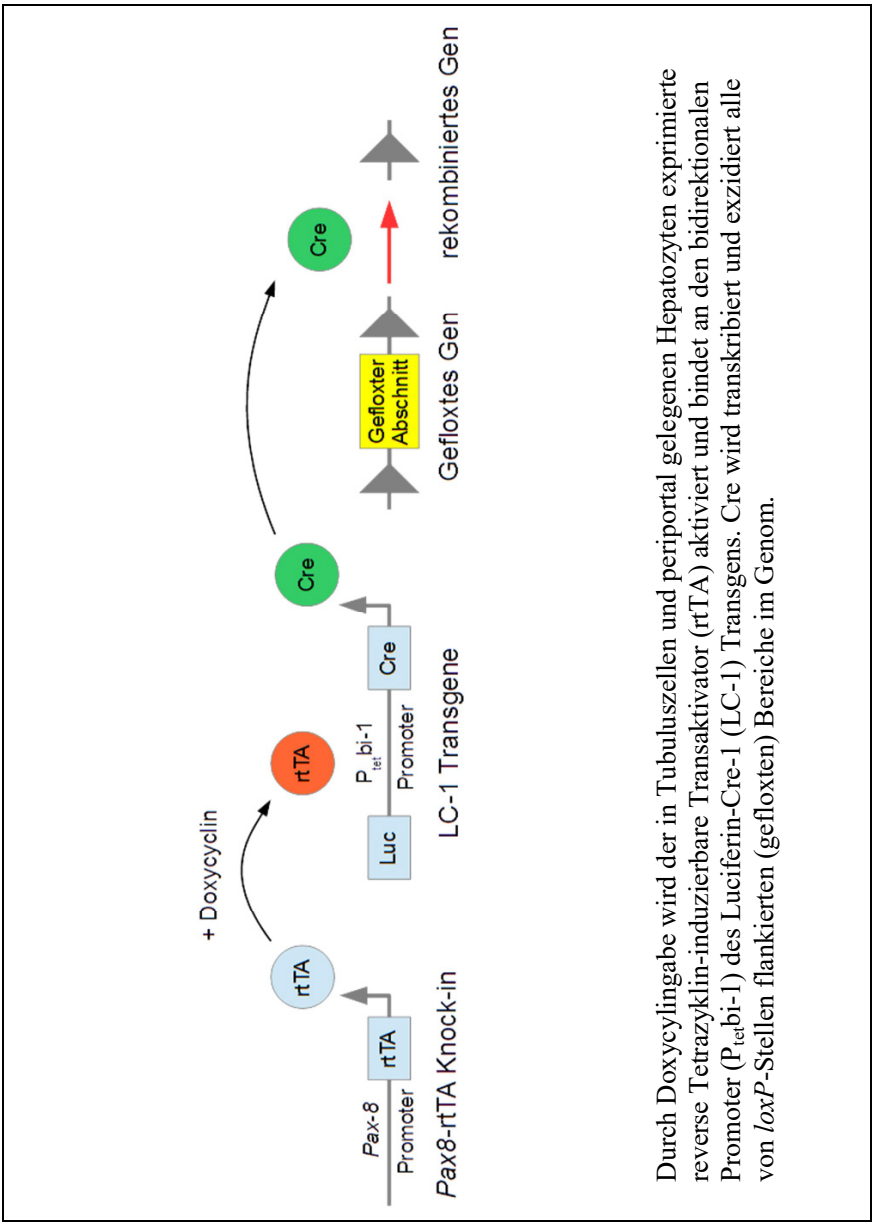


Abbildung 4: Systematik des induzierbaren, zellspezifischen Knockouts.

primiert zellspezifisch den reversen Tetracyclin-induzierbaren Transaktivator (rtTA) in allen Tubuluszellen der Niere und in periportal gelegenen Hepatozyten. In seiner nativen Konformation ist der rtTA inaktiv. Unter Gabe von Doxycyclin, einem Antibiotikum aus der Klasse der Tetracycline, ändert der rtTA seine Konformation in eine aktive Form, bindet an den bidirektionalen rtTA-responsiven Promoter des Luciferase-Cre-1-Gens (LC-1) und initiiert die Transkription der Cre-Rekombinase. Diese exzidiert die durch *loxP* Seiten markierten Abschnitte im Genom. In Abbildung 4 ist das genetische System des induzierbaren, zellspezifischen Knockouts skizziert.

2.3 Induktion anämischer Hypoxie durch retrobulbäre Phlebotomie

Eine systemische Hypoxie der Versuchstiere wurde durch ein Blutungsprotokoll herbeigeführt. Den Mäusen wurde einmal täglich 400 bis 500 µl Blut durch retrobulbäre Phlebotomie entnommen, bis der Hämatokrit auf etwa 15 % gefallen war.

2.4 Tötung und Sektion der Versuchstiere

Die Mäuse wurden durch Inhalation von CO_2 in einer Gaskammer und anschließender zervikaler Dislokation getötet. Die Gewebsproben wurden entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C gelagert, oder in 10 % normal gepuffertem Formalin fixiert. Serumproben wurden durch Punktion des rechten Ventrikels gewonnen und bei –20 °C gelagert.

2.5 Anfertigung von Gefrierschnitten und X-Gal Färbung

Das Gewebe wurde 1½ Stunden in 10 % normal gepuffertem Formalin fixiert. Kryoprotektion erfolgte durch Dehydrierung in hochmolarer 30%iger Saccharose in PBS über Nacht. Die Gewebe wurden in OCT Medium gelegt und auf Trockeneis ausgehärtet. Anschließend wurden die Gefrierblöcke bei –20 °C in einem Kryotom in 10 µm Gefrierschnitte geschnitten und 10 min luftgetrocknet. Die Lagerung der Gefrierschnitte und der Blöcke erfolgte bei –80 °C.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Pufferlösungen für die X-Gal Färbung

Puffer A	Puffer B	X-gal-Färbelösung
2 mM $MgCl_2$	2 mM MgCl2	5mM $K_3Fe(CN)_6$
5 mM EDTA in 1 L PBS	0.01 % Natriumdesoxy-cholat	5mM $K_4Fe(CN)_6$
	0.002 % NP-40 in 1 L PBS	1 mg/ml X-gal

Um die Expression der Cre-Rekombinase sichtbar zu machen und damit die Zellspezifität des Knockouts histologisch nachzuweisen, wurde die X-Gal Färbung angewandt. Sie beruht auf dem Prinzip, dass Zellen, welche das Enzym β-Galactosidase (β-Gal) exprimieren, in der Lage sind das Chromogen X-Gal, einem Indol-Galactosid, hydrolytisch zu spalten. Dies führt zur Bildung eines blauen, wasserunlöslichen Präzipitates innerhalb der Zelle. Als genetisches Werkzeug zur *in vivo* Analyse dienten ROSA26R (R26R) *lacZ*-Reporter-Mäuse. Sie tragen im ROSA26-Lokus das für β-Gal kodierende *lacZ*-Gen, welches von einem ubiquitären und konstitutiv aktiven Promoter kontrolliert wird, dessen Expression jedoch von einer gefloxten Stop-Kassette unterbunden wird. Wenn das inhibierende Fragment durch Cre vermittelte Rekombination deletiert wird, resultiert daraus eine spezifische Expression von β-Gal in rekombinierten Zellen.

Die Arbeitsschritte der LacZ Färbung beliefen sich auf eine 15-minütige Nachfixierung der Gefrierschnitte in Formalin, einer Waschung in Puffer A und B und einer Inkubation in X-Gal-Färbelösung für etwa 4 Stunden. Die Gefrierschnitte wurden in PBS gewaschen und mit Einbettmedium eingedeckelt.

2.6 Sirius Red/FCF Green Färbung und morphometrische Analyse der Fibrose

Der Fibrosierungsgrad histologischer Schnitte wurde mit einer Sirius Red/ FCF Green Färbung bestimmt. Sirius Red ist ein aus zahlreichen Sulfonsäuregruppen bestehendes, stark anionisches Färbemittel, welches mit basischen Aminogruppen wie Lysin, Hydroxylysin und der Guanidinogruppe des Arginins im Kollagen reagiert und Kollagenfasern rot anfärbt (Junqueira et al. 1979). Nichtkollagene Proteine wurden mit FCF Green grün gegengefärbt. Die Paraffinschnitte wurden deparaffinisiert, in einer Ethanolreihe rehydriert

und für 2 h in Sirius Red/FCF Green Färbelösung inkubiert. Darauf folgten eine kurze Waschung in destilliertem Wasser und eine rasche Dehydration in 70 %, 95 % und 100 % Ethanol. Nach Auswaschen des Ethanols mit Xylen wurden die Schnitte mit auf Xylen basierendem Einbettmedium eingedeckt. Pro Nierenschnitt wurden in zweihundertfacher Vergrößerung fünf kortikale und medulläre mikroskopische Fotos aufgenommen und die Fibrosierung mit Image J quantifiziert. Hierzu wurden die Bilder über einen rot-grün Filter in Schwarzweißbilder konvertiert, was die Kollagenfasern schwarz auf weißem Hintergrund erscheinen ließ. Durch Auswahl eines angemessen Schwellenwerts wurden die Kollagenfasern markiert und der Fibrosierungsgrad in Prozent pro Bildfläche gemessen. Sämtliche Arbeitsschritte in Image J wurden in einem „Macro“ zusammengefasst und somit jedes Bild unter denselben Bedingungen automatisiert analysiert.

2.7 Immunhistochemie für F4/80 und CD45

Um das Ausmaß infiltrierender Makrophagen und inflammatorischen Zellen zu bestimmen, wurden Makrophagen (F4/80) oder Leukozyten (CD45) auf Formalin-fixierten Paraffinschnitten mit der Avidin–Biotin–Complex (ABC) Methode immunhistochemisch dargestellt.

Bei diesem mehrschrittigen Detektionssystem wird zunächst ein primärer Antikörper an das jeweilige Antigen gebunden. An das Fc-Fragment des primären Antikörpers bindet wiederum ein biotinylierter Sekundärantikörper, gefolgt von einem Tertiärreagenz, bestehend aus Streptavidin und biotinylierter Meerrettichperoxidase. Bindeglied zwischen biotinyliertem Sekundärantikörper und biotinylierter Meerrettichperoxidase bildet das für Biotin hochaffine, tetravalente Streptavidin. Wird der Meerrettichperoxidase Wasserstoffperoxid (H_2O_2) als Oxidationsmittel und das Chromogen 3,3-*Diaminobenzidin* (DAB) als Substrat angeboten, wird DAB zu einem braunen, nicht wasserlöslichem Präzipitat oxidiert und färbt die entsprechende Zielzellen braun (Ramos-Vara 2005).

Die Paraffinschnitte wurden in Xylen deparaffinisiert und in einer Ethanolreihe rehydriert. Zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte für 15 min bei 37 °C mit Trypsinlösung (Sigma) inkubiert. Nach drei Waschschritten in PBS wurden unspezifische Antikörperbindungen mit 5 % normalen Kaninchenserum (Vector) in PBS blockiert. Danach erfolgten Avidin- und Biotinblocks für jeweils 15 min. Der primäre anti-F4/80-(Abcam) oder anti-CD45-

Antikörper (BD Pharmingen) wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert. Eine endogene Peroxidaseaktivität konnte durch zehnminütige Behandlung mit 0,3 % Wasserstoffperoxid in PBS unterdrückt werden. Anschließend wurde der Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur aufgetragen und der Streptavidin-Meerrettichperoxidase Komplex durch Inkubation für 30 min angebunden.

Als nächster Schritt erfolgte eine Färbung der Schnitte für etwa 30 sec in DAB-Lösung und im Anschluss die Gegenfärbung für 3 min in dem regressiven Hämalaun Harri's Hämatoxylin. Entfärbt wurde mit saurem Ethanol und gebläut in alkalischer “Scott's tap water” Lösung. Danach wurden die Schnitte dehydriert, das Ethanol mit Xylen ausgewaschen und mit Einbettmedium eingedeckt.

Fünf kortikale Fotos der Niere wurden mit einer mikroskopischen Kamera in 200facher Vergrößerung aufgenommen und die Zielzellen pro Sichtfeld mit dem Image J Programm „cell counter jar” gezählt.

2.8 HIF-1α und HIF-2α Immunhistochemie

Die immunhistochemische Darstellung von HIF-1α und HIF-2α erfolgte durch die Tyramid-Signalamplifikationstechnik mit dem CSA-II-Kit (Dako). Nach Deparaffinisierung und Rehydrierung wurden die Schnitte zur Antigendemaskierung für 30 min in 10 mM Citratpuffer in einem Gemüsedämpfer erhitzt. Nach Abkühlung erfolgte ein Peroxidaseblock für 5 min und drei Waschschritte in TBST. Daraufhin wurde einer unspezifischen Proteinbindung durch eine fünfminütige Inkubation mit einem Proteinblock vorgebeugt und die Schnitte über Nacht mit einem polyklonalen Kaninchenantikörper gegen HIF-1α (Cayman Chemicals) (1:10.000 Verdünnung) oder gegen HIF-2α (PM8; Geschenk von Patrick Maxwell) (1:20.000 Verdünnung) bei 4 °C inkubiert. Nach drei Waschschritten erfolgte eine 15-minütige Inkubation mit einem Meerrettichperoxidase konjugiertem anti-Kaninchenglobulin und wiederum drei Waschschritten. Daraufhin folgte die 15-minütige Inkubation mit dem Amplifikationsreagenz, welches Fluorescein-Tyramid und Wasserstoffperoxid enthält. Hierbei generiert die gebundene Meerrettichperoxidase unter Verbrauch von Wasserstoffperoxid ein Fluoreszein-Tyramidradikal, welches in unmittelbarer Umgebung der Bindungsstelle des primären Antikörpers mit dem Gewebe reagiert und kovalent bindet. Nach drei Waschritten wurde mit einem Meerrettichperoxidase-konjugiertem anti-Fluorescein-Antikörper für

15 min inkubiert und gewaschen. Nachfolgend wurde durch etwa fünfminütige Inkubation mit einer DAB-Lösung gefärbt und die Schnitte wie oben beschrieben gegengefärbt und eingedeckt.

2.9 RNA-Isolierung und -Aufreinigung

Gesamt-RNA wurde unter Verwendung des TRIzol (Sigma) Reagenzes isoliert. TRIzol ist ein aus Phenol und Guanidinthiocyanat bestehendes Reagenz, welches die Isolierung von RNA, DNA und Proteinen basierend auf der *Single-Step Method* von Chomczynski und Sacchi erlaubt (Chomczynski und Sacchi 1987). Bei –80 °C gelagerte Gewebsproben wurden mit 1 ml TRIzol versetzt und mit einem Homogenisierstab homogenisiert. 0,2 ml Chloroform wurden zum Gewebelysat hinzugegeben, das Gemisch geschüttelt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die aquatische, RNA-haltige Phase durch Zentrifugation abgetrennt, abpipettiert und der Überstand zur DNA-Isolierung aufbewahrt. Durch Zugabe von 0,5 ml Isopropylalkohol zur aquatischen Phase wurde die RNA herauspräzipitiert. Nach Zentrifugation und Dekantieren des Isopropylalkohols wurde das RNA-Pellet in 75 % Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 300 µl RNase-freiem Wasser gelöst.

Eventuellen Verunreinigungen der RNA wurden durch Aufreinigung mit dem RNeasy-Kit (Qiagen) vorgebeugt. Das Prinzip des RNeasy-Kit basiert auf dem spezifischen Bindungsverhalten von RNA an Kieselgelmembranen in Zentrifugationsröhrchen, wenn diese mit Salz- und Ethanol-reichem Puffer inkubiert werden. Hierzu wurden 100 µl der mit TRIzol isolierten RNA mit 350 µl RLT-Puffer aus dem RNeasy-Kit und 250 µl 100 % Ethanol versetzt und auf die Kieselgelmembran des Zentrifugationsröhrchens aufgetragen. Das Gemisch wurde für 30 sec bei 12.000 rpm zentrifugiert und das Eluat verworfen. Es folgten zwei Waschschritte mit dem RPE-Puffer des RNeasy-Kits mit anschließender Zentrifugation für 2 min bei 12.000 rpm. Auf die nun RNA-haltige Kieselgelmembran wurde nun 50 µl RNase-freies H_2O aufgetragen und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. RNA-haltiges H_2O wurde für 1 min bei 12.000 rpm abzentrifugiert und bei –80 °C gelagert.

2.10 Bestimmung der RNA-Konzentration und cDNA-Synthese aus mRNA

Die RNA-Konzentration wurde mittels UV-Spektrometrie bestimmt. Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm und eine Extinktion von 1 entspricht einem RNA-Gehalt von 40 µg/ml (Gallagher 2001).

Das Absorptionsmaximum für Proteine hingegen liegt bei 280 nm. Somit lassen sich durch Bildung des Quotienten der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm (260 nm/280 nm) Rückschlüsse auf den Verunreinigungsgrad durch Proteine ziehen. Liegt der 260 nm/280 nm Quotient zwischen 1,8 und 2,0 kann von einer sauberen RNA-Präparation ausgegangen werden.

Vor der Umschreibung der mRNA in cDNA wurde einer möglichen Kontamination mit DNA durch Behandlung mit DNase vorgebeugt. Hierbei wurden zu 2 µg RNA 2 µl 10x DNase-Puffer und 1 µl DNase I (Invitrogen) hinzugegeben, mit RNase-freiem Wasser auf ein gesamt Volumen von 20 µl aufgefüllt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die DNase durch Zugabe von 2 µl 25 mM EDTA inhibiert und 2 µl Random-Primers (Invitrogen) mit einer Konzentration von 50 ng/µl dem Gemisch beigegeben. Sekundärstrukturen der RNA wurden durch achtminütige Inkubation bei 65 °C aufgelöst und deren Neubildung durch Schockkühlung für 2 min auf Eis verhindert. Ein Mastermix bestehend aus 8 µl 5x First-strand-Puffer, 4 µl 0,1 M DTT, 2 µl 10 mM dNTP, 1 µl RNase-freiem Wasser und 1 µl Superscript-II-reverse-Transkriptase (Invitrogen) wurde hinzugegeben und die cDNA für 50 min bei 42 °C synthetisiert. Die Reaktion wurde durch eine zehnminütige Inkubation bei 70 °C abgebrochen.

2.11 Bestimmung der Genexpression mittels quantitativer Real-Time-PCR (qPCR)

Eine quantitative Beurteilung der Genexpression in Gewebeproben erfolgte durch Anwendung der quantitativen Real-Time-PCR (qPCR). Wie die konventionelle PCR, beruht die qPCR auf dem amplifizieren einer gesuchten DNA-Sequenz mittels hierfür spezifischer Primer und Taq-Polymerase. Bei der qPCR wird das Amplikon jedoch nicht durch eine Endpunktanalyse detektiert, indem das Amplikon nach der PCR-Reaktion ein ethidiumbromidhaltiges Agarosegel durchwandert, sondern die Amplifizierung wird in Echt-

zeit (engl. *real-time*) dargestellt. Die Detektionssysteme hierfür waren entweder der SYBR-Green-I-Farbstoff oder TaqMan Hydrolyse-Sonden.

SYBR-Green-I ist ein in dsDNA interkalierender Fluoreszensfarbstoff, dessen DNA-Farbstoff-Komplex im Gegensatz zu freiem SYBR-Green-I eine vielfach höhere Fluoreszenz aufweist. Da die Menge an dsDNA bei jedem PCR-Zyklus exponentiell zunimmt, nehmen auch die Menge an DNA-Farbstoff-Komplexen und damit das Fluoreszenzsignal exponentiell zu und es können Rückschlüsse auf die Ausgangsmenge gezogen werden.

Im TaqMan-Assay binden innerhalb der Amplifizierungssequenz Sonden, die an ihrem 5'-Ende einen Reporterfarbstoff und an ihrem 3'-Ende einen *Quencher* (Fluoreszenslöscher) beinhalten. Die zur Fluoreszenz nötige Energie wird in der intakten Sonde über Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) auf den *Quencher* übertragen und in Wärme umgewandelt und das Fluoreszenzsignal somit unterdrückt. Während der Amplifikation wird die Sonde durch die 5'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase gespalten und der *Quencher* vom Reporter getrennt. Das daraus resultierende Fluoreszenzsignal ist proportional zur Menge an neugebildetem Amplifikationsprodukt und lässt Rückschlüsse auf die Ausgangsmenge zu.

Die Genexpression wurden relativ quantifiziert und mit Hilfe einer Standardkurve bestimmt. Bei der relativen Quantifizierung wird das Signal des gesuchten Gens in Bezug auf die Ausgangsmenge der Gesamt-cDNA normalisiert, indem die Expression des gesuchten Gens durch die Expression eines konstitutiv exprimierten, nicht regulierten Gens, in diesem Fall *18S*-rRNA, geteilt wird. Aus den cDNA-Proben für jedes qPCR-Experiment wurde eine Standardreihe mit den Konzentrationen 2×, 1×, 0,5× und 0,25× pipettiert und mit auf die Versuchsplatte gegeben. Anhand einer hieraus gebildeten Standardgeraden konnte das relative Expressionslevel des jeweiligen untersuchten Gens bestimmt werden.

Die qPCR-Primer wurden für eine Annealingtemperatur von 60 °C designed. Das qPCR-Programm bestand aus einer Initiationsphase von 10 min bei 95 °C und 40 Zyklen von 15 sek bei 95 °C zur Denaturierung, gefolgt von 1 min bei 60 °C zum Primerannealing und Elongation.

2.12 DNA-Isolation

Aus der verbleibenden Interphase und organischen Phase der RNA-Isolation mit TRIzol, wurde DNA extrahiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 0,3 ml 100 % Ethanol zum verbleibenden Gewebshomogenat ausgefällt und das entstandene DNA-Aggregat in einer 0,1 M Natriumcitratlösung in 10 % Ethanol überführt und für 30 min inkubiert. Nach Zentrifugation bei 2.000 g für 5 min wurde der Überstand verworfen und eine erneute Waschung in 0,1 M Natriumcitratlösung in 10 % Ethanol durchgeführt. Anschließend erfolgte eine zehnminütige Lufttrocknung des DNA-Pellets und eine Lösung der DNA in 300 µl 8 mM NaOH. Zellfragmente wurden bei 12.000 g für 10 min abzentrifugiert und die gelöste DNA in ein neues Röhrchen überführt. Hierbei wurde der pH durch Zugabe von 30 µl 0,1 M HEPES auf einen pH-Wert von ~8,4 eingestellt und die DNA bei 4 °C gelagert.

2.13 Multiplex-PCR zur Verifizierung der Rekombination

Die Multiplex-PCR erlaubt eine qualitative Beurteilung der Rekombination. Dafür sind drei Primer so konstruiert, dass eine Unterscheidung zwischen wildtyp, gefloxtem und rekombiniertem Allel möglich ist. Der Forward-Primer F1 bindet in 5'-Richtung der 5'-loxP-Stelle, der Forward-Primer F2 in 5'-Richtung der 3'-loxP-Stelle und der Reverse-Primer R in 3'-Richtung der 3'-loxP-Stelle. In dem nicht rekombinierten Allel ist aufgrund des Abstandes zwischen F1 und R nur eine Amplifizierung zwischen F2 und R möglich. Diese liefern entweder eine 2-lox-Bande bei gefloxtem Allel, oder bei ungefloxtem Allel die um die loxP-Stelle kürzere wildtyp Bande. Ist Cre aktiv, wird der von den loxP-Stellen umschlossene Abschnitt exzidiert. Die Anlagerungsstelle für F2 wird dabei entfernt und F1 und R rücken näher zusammen, sodass nun eine 1-lox Bande amplifiziert wird (s. Abb. 5, nächste Seite).

2.14 Messung des relativen Gehalts an mitochondrialer DNA (mtDNA)

Genomische DNA wurde wie zuvor erläutert isoliert und auf eine Konzentration von 2 ng/µl verdünnt. Anschließend konnte mittels qPCR die Menge des mitochondrial kodierten Gens *Mtnd1* und des nukleär kodierten Gens *18S*-rRNA bestimmt werden. Der Quotient mtDNA/nDNA, der beiden relativen

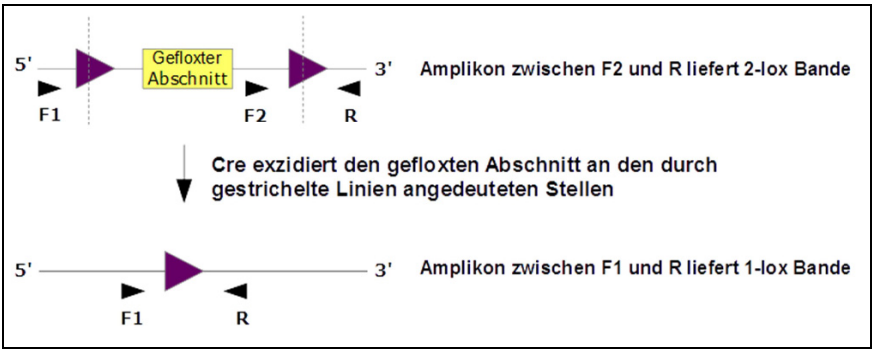


Abbildung 5: Schematische Darstellung der qualitativen Rekombinationsanalyse.

Quantitäten, stellt ein direktes Maß des Verhältnisses von mtDNA zu nDNA und somit der mitochondrialen Masse pro Zelle dar.

2.15 Genomweite Microarray-Genexpressionsanalyse

Zur Microarrayanalyse wurden mRNA-Proben dem *Vanderbilt Technologies for Advanced Genomics* (*VANTAGE*) Zentrum übergeben und die genomweite Genexpression mit einem Exon/Gen (WT) Microarray chip (Affimetrix) bestimmt. Die Intensitätswerte jeder einzelnen Hybridisation wurden auf das Durchschnittssignal des gesamten Arrays bezogen und mittels *Robust Multichip Average* (*RMA*) Analyse normalisiert. Die Feststellung statistisch signifikanter Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen erfolgte mithilfe eines moderierten t-Test. Bei einem 1,5-fachen Unterschied der Genexpression und einem korrigiertem p-Wert <0,05 zwischen den Versuchsgruppen wurde eine differentielle Genexpression angenommen. Heatmaps wurden mit *Heatmap builder* Software (http://ashleylab.stanford.edu/tools_scripts.html) erstellt.

2.16 Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate (GFR)

Die GFR wurde anhand der Inulin-Plasma-Clearance bestimmt. 5 % FITC-Inulin (Sigma) in 0,9 % Natriumchloridlösung wurde über Nacht in Dialyseröhrchen (Spectrum Labs) mit einer Molekulargewicht-Abtrennungsgrenze (MWCO) von 1 kd in 2 Liter 0,9 % Natriumchloridlösung dialysiert. Den

Mäusen wurde eine Bolusinjektion mit 3,74 µl 5 % FITC-Inulin per Gramm Körpergewicht in die Schwanzvene injiziert. Nach 3, 7, 10, 15, 35, 55 und 75 Minuten wurden 20 µl Blut durch Punktion der Vena saphena in heparinisierten Plasmaröhrchen gewonnen. Diese Blutproben wurden anschließend für 10 min bei 400 rpm zentrifugiert und jeweils 10 µl des Plasmas mit 40 µl 500 mM HEPES versetzt. Die Messung des Fluoreszenzsignals erfolgte nach einer Übertragung der Proben in eine 96-Lochplatte mithilfe eines Fluoreszenzlesegerät (Thermo Labsystems) bei einer Exzitation von 485 nm und einer Emission von 538 nm. Die erhaltenen Messwerte wurden in das Statistikprogramm Graph Pad Prism übertragen und anhand eines Zwei-Kompartiment-Modells analysiert, wobei die x-Werte der Zeit nach Bolusgabe und die y-Werte der Fluoreszenzintensität entsprachen. Mit der Formel $GFR = I/(A/\alpha + B/\beta)$ konnte die GFR bestimmt werden. Hierbei steht I für die Fluoreszenzintensität der verabreichten FITC-Inulin-Dosis, α für die erste Verfallskonstante, β für die zweite Verfallskonstante, A dem Schnittpunkt mit der y-Achse der ersten Verfallskonstante und B dem Schnittpunkt mit der y-Achse der zweiten Verfallskonstante (Qi Z et al., 2004).

2.17 Bestimmung des renalen Blutflusses (RBF)

Mittels ^{99m}Tc-MAG3 Szintigrafie konnte der RBF in Knockout- und Kontrollmäusen verglichen werden. Die Versuchstiere wurden dafür dem *Mouse Kidney Imaging Core* der *Vanderbilt University* übergeben, um dort den RBF bestimmen zu lassen. Die ermittelte Steigung der initialen Radionuklidaufnahme ist ein Maß der renalen Perfusion und wird in 1/s angegeben (Tantawy et al. 2012).

2.18 Bestimmung der Blut-Harnstoff-Stickstoffkonzentration (BUN)

Der BUN (engl. *blood urea nitrogen*) wurde mit einem kommerziell erhältlichen biochemischen Testkit (Quantichrome; BioAssay Systems) bestimmt. Hierbei reagiert o-Phthalaldehyd mit Harnstoff und das entstehende Produkt bildet mit N-(1-naphthyl)-Ethylenediamin ein Farbprodukt in einem direkt proportionalen Verhältnis (Jung et al. 1975). Serumproben wurden für 20 min in der Arbeitslösung inkubiert und die Farbintensität bei 520 nm mittels

UV-Spektrometrie bestimmt. Unter Verwendung folgender Formel konnte im Anschluss auf die Serum-BUN-Konzentration geschlossen werden:

$$\text{BUN} = \frac{\text{OD}^{Probe} - \text{OD}^{Blank}}{\text{OD}^{Standard} - \text{OD}^{Blank}} \times 50 \frac{\text{mg}}{\text{dl}} \div 2{,}14$$

2.19 Bestimmung der EPO-Konzentration im Serum

Der EPO-Serumspiegel wurde mit einem kommerziell erworbenen Sandwich-ELISA (R&D Systems) bestimmt. Die Serumproben wurden dafür auf die mit anti-EPO-Antikörpern beschichteten Vertiefungen der Mikrotiterplatten gegeben und für zwei Stunden inkubiert. Nach einer Waschung erfolgte eine weitere zweistündige Inkubation mit einem Meerrettichperoxidase-konjugiertem anti-EPO-Antikörper, welcher an einem anderen Epitop als der erste Antikörper bindet. Nach erneuter Waschung erfolgte eine dreißigminütige Inkubation mit Substratlösung, welche aus Wasserstoffperoxid und dem Chromogen Tetramethylbenzidin besteht und durch die gebundene Meerrettichperoxidase in ein blaues Farbprodukt umgewandelt wird. Durch Zugabe einer schwefelsäurehaltigen Stopplösung wurde die enzymatische Reaktion beendet und das blaue Farbprodukt in ein gelbes Endprodukt umgewandelt, welches in einem UV-Spektrometer (Thermo Labsystems) bei 450 nm gemessen wurde und dessen Farbintensität proportional zur vorhandenen EPO-Konzentration ist. Durch Verwendung einer Standardkurve, welche mittels einer Verdünnungsreihe eines EPO-Standards mit bekannter Konzentration von rekombinanten EPO erstellt wurde, konnte auf die absolute EPO-Konzentration im Serum geschlossen werden.

2.20 Bestimmung der Retikulozytenzahl

Der Anteil an zirkulierenden Retikulozyten im Vollblut wurde nach der Methode von Lee et al. bestimmt (Lee et al. 1986). Venöse Blutproben wurden dazu durch Punktion der Vena saphena magna gewonnen. Anschließend wurden jeweils 3 µl Blut mit 2 ml einer Thiazol-Orange-Lösung (100 µg/l in PBS) versetzt und für 30 min unter Lichtschutz inkubiert. Die Proben wurden dem *Flow Cytometry Core* der *Vanderbilt University* zur Durchführung der Durchflusszytometrie übergeben. Thiazol-Orange bindet an die RNA, welche in Retikulozyten vorhanden ist und emittiert Licht bei 530 nm unter

Exzitation bei 488 nm. Durch sogenanntes *Gating* der Erythrozytenpopulation und Bestimmung der fluoreszierenden Zellenpopulation kann auf den prozentualen Anteil der fluoreszierenden Erythrozytenpopulation geschlossen werden, welche die Retikulozyten darstellen.

2.21 Blutbildanalyse

Die Erythrozytenzahl (RBC), die Hämoglobinkonzentration (Hb) und der Hämatokrit (Hct) wurden mit einem Hemavet 950 FS Blutanalysator (Drew Scientific) bestimmt. Hierzu wurden 20 µl Blut in EDTA-Röhrchen durch Punktion der Vena saphena magna gewonnen. Vor jeder Analyse erfolgte die Messung des Leerwertes sowie eines von der Firma bereit gestellten Kontrollblutes.

2.22 Bestimmung der Blutgase und Natrium- und Kaliumkonzentration im Plasma

Die Analyse der Blutgase sowie der Na^+- und K^+-Konzentrationen erfolgte in einem i-STAT Analysegerät (Abbott). Zur Bestimmung der Plasma Na^+- und K^+-Konzentration wurden durch Punktion der Vena saphena magna etwa 60 µl Blut in Lithium-Heparin Röhrchen gewonnen und in eine EC8+ Kartusche (Abbott) pipettiert, in ein i-STAT Analysegerät eingeführt und die Werte abgelesen.

Die arterielle Blutgasanalyse erfolgte nach Katheterisierung der Arteria carotis interna durch das *Mouse Metabolic Phenotyping Center* der *Vanderbilt University* und unter Verwendung von GC8+ i-STAT Kartuschen.

2.23 Respiratorische Messungen

Respiratorische Messungen von kortikalen und medullären Gewebsproben wurden in einem O2k Oxygraphen (Oroboros) durchgeführt. Im Oxygraphen befinden sich zwei luftdicht verschließbare Kammern, die jeweils mit einer polarografischen Elektrode vom Clark-Typ ausgestattet sind. Diese misst

molekularen Sauerstoff (O_2), indem an der Elektrode O_2 zu Hydroxid-Ionen (OH^-) reduziert wird, wobei der dabei entstehende elektrische Strom dem gegeben O_2-Partialdruck (pO_2) direkt proportional ist.

Nierenkortices und -medullae von Knockout- und Kontrollmäusen wurden im Respirationsmedium Mir05 in einer auf Eis liegenden Petrischale mit einer Rasierklinge zerstückelt und mit Mir05 auf eine Konzentration von 1 mg/ml gebracht. 2 ml dieser Gewebssuspension wurden anschließend in die Kammern pipettiert, sodass der O_2-Verbrauch unter Verwendung eines Substrat-Inhibitor-Protokolls bei 37 °C gemessen werden konnte.

Zunächst wurden 15 µl einer 2 mM Malat und 10 mM Glutamatlösung mit einer Hamilton-Spritze in die Messkammern injiziert. An diesem Schritt ist die Respiration des Gewebes noch minimal, da der Elektronenfluss der Atmungskette durch den Mangel an ADP zur Bildung von ATP durch die ATP-Synthase inhibiert ist, was als Ruherespiration (*state 2* Respiration) bezeichnet wird (Nicholls und Ferguson 2002). Nach Stabilisierung des Signals wurde eine *state 3* Respiration über Komplex I (CI) durch Zugabe von 10 µl einer 0,5 M ADP Lösung induziert. Die Spezifität für den Komplex I ist durch die Substrate Glutamat und Malat bedingt, welche über NADH nur Elektronen durch Komplex I in die Atmungskette einspeisen. Daraufhin wurde CI durch Titration von 1 µl 0,5 µM Rotenonlösung inhibiert und im nächsten Schritt die Respiration über Komplex II (CII) durch Zugabe von 20 µl 10 mM Succinatlösung erzielt. Anschließend erfolgte die Inhibierung der gesamten Elektronentransportkette durch Zugabe von 1 µl 2,5 µM Antimycin-A-Lösung, einem spezifischen Inhibitor von Komplex III (CIII). Zur Bestimmung der Aktivität von Komplex IV (CIV) wurden 10 µl einer 0,5 mM Tetramethylphenylenediamin (TMPD) und 2 mM Ascorbatlösung in die Versuchskammern titriert. TMPD ist eine stark reduzierende Substanz, die in der Zelle vorhandenes Cytochrom c reduziert und ein artifizielles Substrat für die Cytochrom-c-Oxidase (CIV) darstellt. Ascorbat hält TMPD selbst in einem reduzierten Zustand.

Während des Experiments wurden die O_2-Konzentration in der Kammer und die Rate des O_2-Verbrauchs (O_2-Flux) mit dem Computerprogramm DatLab aufgezeichnet (s. Abb. 6).

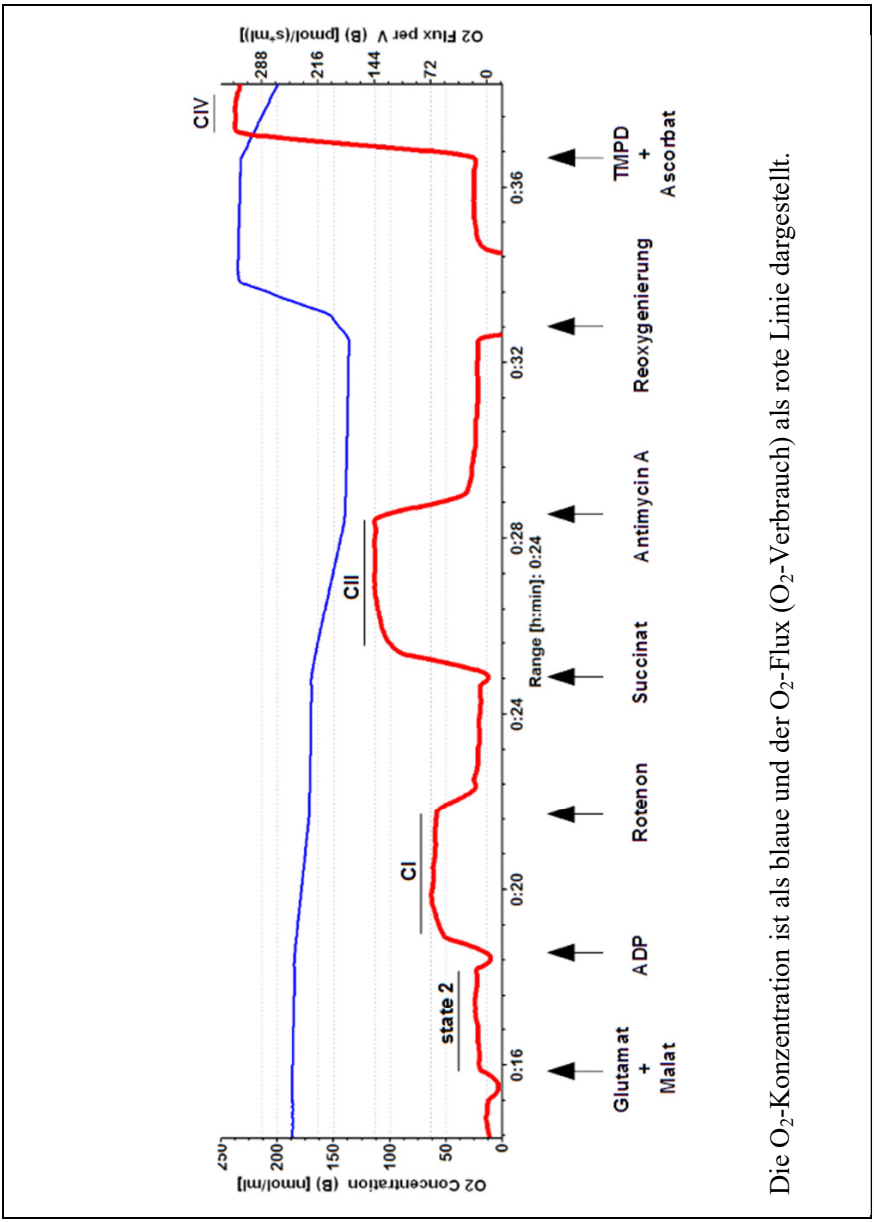


Abbildung 6: Aufzeichnung einer respiratorischen Messung.

2.24 Messung der Citrat-Synthase-Aktivität

Die Citrat-Synthase (CS) ist ein Leitenzym der mitochondrialen Matrix, welches die Bildung von Citrat, dem ersten Schritt des Citratzyklus katalysiert. Die Aktivität der CS ist ein allgemein akzeptierter Marker der mitochondriale Masse, da die CS-Aktivität eng mit der Mitochondrienzahl pro Zelle korreliert (Rooyackers et al. 1996). Die CS katalysiert die Reaktion von Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) und Oxalacetat zu Citrat und Coenzym-A (CoA-SH). CoA-SH reagiert mit 5,5'-Dithio-2-Nitrobenzolsäure (DTNB), was zur Bildung von Thionitrobenzoat führt, welches im UV-Spektrometer ein Absorptionsmaximum bei 412 nm aufweist. Ein 1 ml Aliquot, der für die respirometrischen Messungen verwendeten Gewebssuspension, wurde homogenisiert und bei –20 °C zur weiteren Bearbeitung aufbewahrt. 20 µl Gewebshomogenat wurden mit 140 µl H_20, 20 µl DTNB (1 mM in Tris-HCl Puffer), 5 µl 10 % Triton X-100 und 5 µl 12,2 mM Acetyl-CoA versetzt und in eine 96-Lochplatte pipettiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl 10 mM Oxalacetat gestartet und die Absorption bei 412 nm kontinuierlich alle 10 Sekunden für 3 min bei Raumtemperatur gemessen. Aus den Messwerten wurden mittels linearer Regressionsanalyse eine Gerade und deren Steigung ermittelt. Die CS-Aktivität wurde mit folgender Formel berechnet:

$$v = \frac{r_A}{\iota \times \varepsilon_B} \times \frac{V_{Küvette}}{V_{Probe} \times \rho}$$

v : spezifische Aktivität der CS; r_A: Rate der Absorptionsveränderung (min^{-1}); ι : optische Weglänge; ε_B : Extinktionskoeffizient von TNB bei 412 nm und pH 8,1 (13,6 $mM^{-1} \times cm^{-1}$); $V_{Küvette}$: Küvettenvolumen; V_{Probe} : Probenvolumen; ρ: Probenkonzentration (mg/ml)

2.25 Bestimmung des kortikalen Gewebesauerstoffpartialdruckes (PtO_2)

Der kortikale PtO_2 wurde mit einer modifizierten Clark-Typ Elektrode mit 8-10 µm Durchmesser (Unisense) bestimmt. Eine Zweipunktkalibrierung erfolgte in einer mit N_2-Gas saturierter Salzlösung (PO_2 = 0 mmHg) und in einer mit Umgebungsluft saturierter Salzlösung (PO_2 = 159 mmHg).

Die Versuchstiere wurden mit einer Isofluraninhalation anästhesiert und die Kernkörpertemperatur mit einer Rektalprobe zwischen 36,5 und 37,5 °C

gehalten. Eine Wärmelampe sicherte dabei eine stabile Umgebungstemperatur. Die linke Niere wurde mit einem Flankenschnitt dargestellt und ohne Zerrung der renalen Gefäße auf einer Halterung stabilisiert. Die Nierenkapsel wurde entfernt und die Niere mit Mineralöl zur Wärmedämmung benetzt. Für jede Maus wurden mindestens drei unabhängige Messungen 1 mm unterhalb der Nierenoberfläche am kortiko-medullären Übergang bestimmt. Zur statistischen Analyse wurden die Durchschnittswerte individueller Mäuse verwendet.

2.26 Behandlung der Mäuse mit einem Prolylhydroxylaseinhibitor

Der Prolylhydroxylaseinhibitor (PHI) GSK1002083A (GlaxoSmithKline) wurde den Mäusen einmal 24 h und einmal 4 h vor Tötung in 1 % Methylzellulose in einer Konzentration von 60 mg/kg mit einer Magensonde zugeführt.

2.27 Statistik

Beim Vergleich von zwei Gruppen wurde der Student's-t-Test und beim Vergleich von mehreren Gruppen der one-way-ANOVA-Test und eine Bonferroni-post-hoc-Analyse angewendet. Das Signifikanzniveau lag bei 5 %.

http://www.springer.com/978-3-658-17362-3

Auswirkungen renal-tubulärer Aktivierung von Hypoxie-induzierbaren Faktoren auf die Erythropoietin-Produktion im transgenen Mausmodell

Farsijani, N.

2017, XVIII, 78 S. 31 Abb., Softcover
ISBN: 978-3-658-17362-3