Inhaltsverzeichnis

Danksagung V
Institutsprofil VII
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis XIII
Abkürzungsverzeichnis XV

1 Einleitung 1

1.1 Erythropoietin 1
1.2 Hypoxie-induzierbare Faktoren 2
1.3 Renale Erythropoietin-Produktion 5
1.4 Renale Anämie 7
1.5 Fragestellung und Aufbau der Dissertation 9

2 Material und Methoden 11

2.1 Verwendete Mauslinien 11
2.2 Genetisches System zum Erhalt eines induzierbaren, zellspezifischen Knockouts 11
2.3 Induktion anämischer Hypoxie durch retrobulbäre Phlebotomie 13
2.4 Tötung und Sektion der Versuchstiere 13
2.5 Anfertigung von Gefrierschnitten und X-Gal Färbung 13
2.6 Sirius Red/FCF Green Färbung und morphometrische Analyse der Fibrose 14
2.7 Immunhistochemie für F4/80 und CD45 15
2.8 HIF-1α und HIF-2α Immunhistochemie 16
2.9 RNA-Isolierung und -Aufreinigung 17
2.10 Bestimmung der RNA-Konzentration und cDNA-Synthese aus mRNA 18
2.11 Bestimmung der Genexpression mittels quantitativer Real-Time-PCR (qPCR) 18
2.12 DNA-Isolation 20
2.13 Multiplex-PCR zur Verifizierung der Rekombination 20
2.14 Messung des relativen Gehalts an mitochondrialer DNA (mtDNA) 20

2.15 Genomweite Microarray-Genexpressionsanalyse 21
2.16 Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate (GFR)..... 21
2.17 Bestimmung des renalen Blutflusses (RBF)..... 22
2.18 Bestimmung der Blut-Harnstoff-Stickstoffkonzentration (BUN)..... 22
2.19 Bestimmung der EPO-Konzentration im Serum 23
2.20 Bestimmung der Retikulozytenzahl..... 23
2.21 Blutbildanalyse 24
2.22 Bestimmung der Blutgase und Natrium- und Kaliumkonzentration im Plasma 24
2.23 Respiratorische Messungen 24
2.24 Messung der Citrat-Synthase-Aktivität 27
2.25 Bestimmung des kortikalen Gewebesauerstoffpartialdruckes (PtO_2) 27
2.26 Behandlung der Mäuse mit einem Prolylhydroxylaseinhibitor ... 28
2.27 Statistik..... 28

3 Ergebnisse..... 29

3.1 Charakterisierung der Pax8-rtTA;LC-1;*Vhl*$^{flox/flox}$ (P8;*Vhl*$^{f/f}$) Mäuse 29
3.1.1 Visualisierung der Cre-Aktivität im Pax8-rtTA vermittelten Knockout 29
3.1.2 Stabilisierung von HIF-α in Vhl-defizienten renalen Tubuli und Hepatozyten 30
3.1.3 Einfluss der Pax8-rtTA vermittelten Vhl-Ablation auf den Hämatokrit und die EPO-Produktion 31
3.1.4 Entwicklung des Hämatokrits von P8;Vhl$^{f/f}$ Mäusen im zeitlichen Verlauf 32
3.1.5 Hepatisches Epo in anämischen P8;Vhl$^{f/f}$ Mäusen 33
3.1.6 Serum-EPO-Werte in anämischen P8;Vhl$^{f/f}$ Mäusen..... 34
3.1.7 Die tubuläre Ablation von Vhl führt langfristig zu einer renalen Schädigung 35
3.1.8 Zusammenfassung der Charakterisierung der P8;Vhl$^{f/f}$ Mäuse 38
3.2 Charakterisierung der P8;*Vhl*$^{f/f}$*Epo*$^{f/f}$ Mäuse 40
3.2.1 Rekombination in P8;Vhl$^{f/f}$Epo$^{f/f}$ Mäusen 40
3.2.2 Blutbildanalyse in P8;Vhl$^{f/f}$Epo$^{f/f}$ Mäusen..... 41
3.2.3 Charakterisierung der Anämie in P8;Vhl$^{f/f}$Epo$^{f/f}$ Mäusen..... 42

3.2.4 Auswirkung einer Phlebotomie von P8;Epo$^{f/f}$ Mäusen auf sEPO-Werte 42
3.2.5 Renale Epo-Produktion in P8;Vhl$^{f/f}$Epo$^{f/f}$ und P8;Epo$^{f/f}$ Mäusen 43
3.2.6 Histologie und leukozytäre Inflitration in P8;Vhl$^{f/f}$Epo$^{f/f}$ Nieren 44
3.2.7 Expression inflammatorischer Gene und Schädigungsmarker in Nieren von P8;Vhl$^{f/f}$Epo$^{f/f}$ Mäusen.... 45
3.2.8 Renale Funktion in P8;Vhl$^{f/f}$Epo$^{f/f}$ Mäusen 46
3.2.9 Elektrolytbalance in P8;Vhl$^{f/f}$Epo$^{f/f}$ Mäusen..... 47
3.2.10 Zusammenfassung der Charakterisierung der P8;Vhl$^{f/f}$Epo$^{f/f}$ Mäuse..... 48
3.3 Studien bezüglich des Mechanismus der durch tubuläre *Vhl*-Ablation verursachten Anämie 49
3.3.1 Zellspezifität und HIF-Abhängigkeit der durch tubuläre Vhl-Ablation verursachten Anämie 49
3.3.2 Metabolische Reprogrammierung durch tubuläre Vhl-Ablation 51
3.3.3 Zelluläre Respiration in Nieren von P8;Vhl$^{f/f}$Epo$^{f/f}$ Mäusen 53
3.3.4 Reduktion der mitochondrialen Masse in Nieren von P8;Vhl$^{f/f}$Epo$^{f/f}$ Mäusen..... 54
3.3.5 Renaler Sauerstoffpartialdruck (PtO_2) in P8;Vhl$^{f/f}$Epo$^{f/f}$ Mäusen 54
3.3.6 Renale Epo-Induktion in P8;Vhl$^{f/f}$Epo$^{f/f}$ Mäusen nach Stimulation mit einem Prolylhydroxylaseinhibitor (PHI)..... 57
3.3.7 Zusammenfassung der Studien bezüglich der Entstehung der Anämie 58

4 Diskussion 59

4.1 Zeitlicher Verlauf der durch tubuläre *Vhl*-Ablation bedingten renalen EPO-Suppression.....59
4.2 Mechanismen der VHL-abhängigen tubulären EPO-Regulation 60
4.3 Plastizität von renalen EPO-produzierenden Zellen (REPC) 62
4.4 Auswirkung einer *Vhl*-Ablation in anderen Zelltypen auf die Regulation von EPO und die Erythropoiese.....62
4.5 Metabolische Regulation von EPO 63

4.6 Feedback-Regulation von EPO 65
4.7 Renale Hypoxie in CKD 66
4.8 Limitationen der Studie und ausstehende Fragen 67

5 Zusammenfassung 69

6 Literaturverzeichnis 71

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