

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-1 α und HIF-2 α 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 ^{fllox/fllox} (P8;Vhl ^{flf}) 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 ^{flf} Mäusen im zeitlichen Verlauf	32
3.1.5	Hepatisches Epo in anämischen P8;Vhl ^{flf} Mäusen	33
3.1.6	Serum-EPO-Werte in anämischen P8;Vhl ^{flf} 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 ^{flf} Mäuse 38	
3.2	Charakterisierung der P8;Vhl ^{flf} Epo ^{flf} Mäuse	40
3.2.1	Rekombination in P8;Vhl ^{flf} Epo ^{flf} Mäusen	40
3.2.2	Blutbildanalyse in P8;Vhl ^{flf} Epo ^{flf} Mäusen.....	41
3.2.3	Charakterisierung der Anämie in P8;Vhl ^{flf} Epo ^{flf} Mäusen.....	42

3.2.4	Auswirkung einer Phlebotomie von P8;Epo ^{ff} Mäusen auf sEPO-Werte.....	42
3.2.5	Renale Epo-Produktion in P8;Vhl ^{ff} Epo ^{ff} und P8;Epo ^{ff} Mäusen	43
3.2.6	Histologie und leukozytäre Infiltration in P8;Vhl ^{ff} Epo ^{ff} Nieren.....	44
3.2.7	Expression inflammatorischer Gene und Schädigungsmarker in Nieren von P8;Vhl ^{ff} Epo ^{ff} Mäusen.....	45
3.2.8	Renale Funktion in P8;Vhl ^{ff} Epo ^{ff} Mäusen	46
3.2.9	Elektrolytbalance in P8;Vhl ^{ff} Epo ^{ff} Mäusen.....	47
3.2.10	Zusammenfassung der Charakterisierung der P8;Vhl ^{ff} Epo ^{ff} 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 ^{ff} Epo ^{ff} Mäusen	53
3.3.4	Reduktion der mitochondrialen Masse in Nieren von P8;Vhl ^{ff} Epo ^{ff} Mäusen.....	54
3.3.5	Renaler Sauerstoffpartialdruck (PtO ₂) in P8;Vhl ^{ff} Epo ^{ff} Mäusen	54
3.3.6	Renale Epo-Induktion in P8;Vhl ^{ff} Epo ^{ff} 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