

BestMedDiss

RESEARCH

Navid Farsijani

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

 Springer

BestMedDiss

Mit „BestMedDiss“ zeichnet Springer die besten Dissertationen im Fachbereich Medizin aus, die an renommierten Universitäten Deutschlands, Österreichs und der Schweiz entstanden sind. Die mit Bestnote ausgezeichneten Arbeiten wurden durch Gutachter zur Veröffentlichung empfohlen und behandeln aktuelle Themen aus der Medizin. Die Reihe wendet sich an Praktiker und Wissenschaftler gleichermaßen und soll insbesondere auch Nachwuchswissenschaftlern Orientierung geben.

Springer awards „BestMedDiss“ to the best graduate theses in medicine which have been completed at renowned universities in Germany, Austria, and Switzerland. The studies received highest marks and were recommended for publication by supervisors. They address current issues from fields of research in medicine. The series addresses practitioners as well as scientists and, in particular, offers guidance for early stage researchers.

Navid Farsijani

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

 Springer

Navid Farsijani
Essen, Deutschland

Zugl.: Dissertation, Universität Duisburg-Essen, 2016

BestMedDiss

ISBN 978-3-658-17362-3

ISBN 978-3-658-17363-0 (eBook)

DOI 10.1007/978-3-658-17363-0

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

© Springer Fachmedien Wiesbaden GmbH 2017

Das Werk einschließlich aller seiner Teile ist urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung, die nicht ausdrücklich vom Urheberrechtsgesetz zugelassen ist, bedarf der vorherigen Zustimmung des Verlags. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Bearbeitungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronischen Systemen.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Der Verlag, die Autoren und die Herausgeber gehen davon aus, dass die Angaben und Informationen in diesem Werk zum Zeitpunkt der Veröffentlichung vollständig und korrekt sind. Weder der Verlag noch die Autoren oder die Herausgeber übernehmen, ausdrücklich oder implizit, Gewähr für den Inhalt des Werkes, etwaige Fehler oder Äußerungen. Der Verlag bleibt im Hinblick auf geografische Zuordnungen und Gebietsbezeichnungen in veröffentlichten Karten und Institutionsadressen neutral.

Gedruckt auf säurefreiem und chlorfrei gebleichtem Papier

Springer ist Teil von Springer Nature

Die eingetragene Gesellschaft ist Springer Fachmedien Wiesbaden GmbH

Die Anschrift der Gesellschaft ist: Abraham-Lincoln-Str. 46, 65189 Wiesbaden, Germany

Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Volker Haase und Herrn Prof. Dr. med. Joachim Fandrey, die diese Dissertationsarbeit¹ ermöglicht haben.

Herr Prof. Dr. med Joachim Fandrey vermittelte mir die Gelegenheit, in den USA meine Dissertation durchzuführen, und unterstütze mich bei diesem Vorhaben fortwährend mit Rat und Tat, sodass ich auch bei schwierigen Entscheidungen, wie einer erneuten Studienunterbrechung zur Fortführung des Projektes, immer auf offene Ohren stieß.

Die Laborarbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. Volker Haase an der Vanderbilt University in Nashville/Tennessee durchgeführt. Hier habe ich gelernt, was es bedeutet, ein Projekt zu „pushen“, und dass dafür auch ein ‚Über-sich-Hinauswachsen‘ nötig ist. Dies war nur möglich, da mein Einsatz auf ein mindestens ebenso großes Engagement traf. Die gemeinsamen Nachtschichten im „Mouse House“, das immer wiederkehrende „What’s new?“, aber auch die interessanten Gespräche über Kultur und Politik gehören zu den besten Erinnerungen.

Ebenfalls danken möchte ich Olena Davidoff für die technische Unterstützung, vor allem bei der Mäusezucht. Hanako Kobayashi, Pinelopi Kapsinou, Hideto Sano und Qingdu Liu danke ich für die Hilfe im Labor und die gute Zusammenarbeit.

Ich danke ebenso meiner Familie und meinen Freunden in Deutschland und den USA, auf deren Unterstützung ich während meines gesamten Studiums und meiner Promotionszeit bauen konnte.

Navid Moritz Farsijani

¹ Teile der vorliegenden Arbeit sind in folgende Publikation eingegangen:
Farsijani N.M., Liu Q., Kobayashi H., Davidoff O., Sha F., Fandrey J., Ikizler T.A., O’Connor P.M., Haase V.H. (2016) *Renal epithelium regulates erythropoiesis via HIF-dependent suppression of erythropoietin*. J Clin Invest. **126**, 1425-37.

Institutprofil

Institut für Physiologie, Universität Duisburg-Essen

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Fandrey

Stellvertreter: Univ.-Prof. Dr. med. Eric Metzen

Jun.-Prof. derzeit N.N.

Zentrale Telefonnummer +49 201 723 4600

Zentrale Faxnummer +49 201 723 4648

Zentrale E-Mail-Adresse joachim.fandrey@uni-due.de

Internetadresse www.uni-due.de/physiologie/

Struktur im Hinblick auf Forschung und Lehre

Das Institut für Physiologie hat drei Arbeitsgruppen. Jede Arbeitsgruppe hat ein eigenes wissenschaftliches Forschungsprofil, trotzdem kann die Ausrichtung unter dem Oberbegriff „Anpassung an veränderte Sauerstoffversorgung“ zusammengefasst werden. In Bezug auf die Lehre wird die gesamte Animalische und Vegetative Physiologie abgedeckt. Als Grundlagenfach der vorklinischen Ausbildung in der Medizin ist die Ausbildung Medizinstudierender von vorrangigem Interesse. Darüber hinaus ist die Physiologie jedoch Gründungsmitglied im Studienschwerpunkt Medizinisch-Biologische Chemie (mit der Fakultät für Chemie der Universität Duisburg-Essen) sowie als Gründungsmitglied des Zentrums für Medizinische Biologie wesentliche Säule des Studiengangs Medizinische Biologie (zusammen mit der Fakultät für Biologie). Seit dem Wintersemester 2015/2016 trägt die Physiologie darüber hinaus wesentlich zum Bachelor-Studiengang Medizintechnik (gemeinsam mit der Fakultät für Ingenieurwissenschaften) bei.

Eine besondere Beteiligung von Forschungsprojekten ergibt sich durch die Mitgliedschaft im im Graduiertenkollegs 1739 „Molecular determinants of the cellular radiation response and their potential for response modulation“ sowie im Graduiertenkolleg 2098 „Biomedizin des saure Sphingomyelinase/saure Ceramidase Systems“. In den vergangenen Jahren ist das Institut in verschiedenen europäischen Konsortien erfolgreich gewesen. Herauszuheben sind die geförderten Projekte „Pulmotension“ im 6. Rahmenprogramm sowie im „EpoCan“ 7. Rahmenprogramm.

Forschungsschwerpunkte

- Aktivierung der sauerstoffabhängigen Genexpression durch Aktivierung des Transkriptionsfaktorkomplexes Hypoxie-induzierbarer Faktor 1 durch Inflammatorische Hypoxie
- Hypoxie-induzierbarer Genexpression in der neuronalen Entwicklung und Differenzierung neuraler Vorläuferzellen
- Hochauflösende Mikroskopie von Protein/Proteinwechselwirkung
- Expression und Regulation sauerstoffabhängiger Hydroxylasen
- Sauerstoffmangel und HIF-1 bei Proliferation, Induktion von Zelltod und Strahlenempfindlichkeit kultivierter Tumorzellen
- Interaktion von Stoffwechselwegen
- Differentielle Regulation der Erythropoietin-Genexpression

Ausgewählte Publikationen aus den letzten fünf Jahren

1. Bernardini A, Brockmeier U, Metzen E, Berchner-Pfannschmidt U, Harde E, Acker-Palmer A, Papkovsky D, Acker H, Fandrey J. Type I cell ROS kinetics under hypoxia in the intact mouse carotid body ex vivo: a FRET-based study. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2015 Jan 1;308(1):C61-7.
2. Hussmann M, Janke K, Kranz P, Neumann F, Mersch E, Baumann M, Goepelt K, Brockmeier U, Metzen E. Depletion of the thiol oxidoreductase ERp57 in tumor cells inhibits proliferation and increases sensitivity to ionizing radiation and chemotherapeutics. *Oncotarget.* 2015 Nov 17;6(36):39247-61.
3. Klose R, Krzywinska E, Castells M, Gotthardt D, Putz EM, Kantari-Mimoun C, Chikdene N, Meinecke AK, Schrödter K, Helfrich I, Fandrey J, Sexl V, Stockmann C. Targeting VEGF-A in myeloid cells enhances natural killer cell responses to chemotherapy and ameliorates cachexia. *Nat Commun.* 2016 Aug 19;7:12528.
4. Flück K, Breves G, Fandrey J, Winning S. Hypoxia-inducible factor 1 in dendritic cells is crucial for the activation of protective regulatory T cells in murine colitis. *Mucosal Immunol.* 2016 Mar;9(2):379-90.
5. Farsijani NM, Liu Q, Kobayashi H, Davidoff O, Sha F, Fandrey J, Ikizler TA, O'Connor PM, Haase VH. Renal epithelium regulates erythropoiesis via HIF-dependent suppression of erythropoietin. *J Clin Invest.* 2016 Apr 1;126(4):1425-37.

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