

## Regulation der Erythropoietin-Bildung<sup>1</sup>

Christian Bauer, Armin Kurtz, Kai-Uwe Eckardt, Leslie Tannahill

Physiologisches Institut der Universität Zürich, Schweiz

### Einleitung

Erythropoietin (EPO) ist der hauptsächliche humorale Regulator der Erythropoiese. Seine Wirkung beruht auf der Stimulierung von Proliferation und Differenzierung der erythroiden Vorläuferzellen im Knochenmark. Seit der Entdeckung eines die Erythropoiese stimulierenden humoralen Faktors durch Carnot und Deflandre im Jahr 1906 [1] war EPO etwa 70 Jahre lang ein schwer zu erfassendes Hormon. Nicht nur die Molekularstruktur, sondern auch die Regulierung und Art seiner Biogenese waren Gegenstand von Mutmassungen. Um die Entstehung von EPO zu erklären, wurden bisher drei Theorien aufgestellt: Erstens, ein Plasmaenzym setzt EPO aus einem Vorläufermolekül frei, das in der Niere gebildet wird [2]; zweitens, ein renales Enzym spaltet EPO von einem im Plasma vorhandenen Vorläufer ab; drittens, EPO wird direkt synthetisiert. Derzeit kennen wir die Molekularstruktur des EPO [4-6], die Sequenz seiner mRNA [6-8] sowie die Organe, welche mRNA für EPO enthalten [9, 10]. Aufgrund dieser Informationen kann geschlossen werden, dass die hauptsächliche Produktionsstelle während der fetalen Periode die Leber ist [11] und dass die Nieren beim Erwachsenen fast 90% des EPO produzieren [12, 13]. Die physiologischen Mechanismen der EPO-Bildung während der Fetalzeit sind noch weitgehend unbekannt. Deshalb wollen wir uns auf die *renale* EPO-Produktion konzentrieren und vor dem Hintergrund des derzeit vorhandenen Wissens unsere eigenen Ergebnisse darstellen und diskutieren.

### Material und Methoden

#### Versuchstiere

Männliche SIV-Ratten (250–280 g) oder männliche ICR-Mäuse (28–32 g) wurden für alle Versuche verwendet, außer für die Untersuchungen des Einflusses der Polyzythämie auf die EPO-Reaktion; für diese Experimente wurden weibliche ICR-Mäuse verwendet.

#### Normobare Hypoxie und funktionelle Anämie

Die Tiere wurden einer sauerstoffarmen (13,5; 10,5 oder 8% O<sub>2</sub>) oder kohlenmonoxidhaltigen (0,1% CO) Atmosphäre ausgesetzt; hierzu wurden Inkubatoren verwendet, die mit einer Mischung aus normaler Luft und Stickstoff oder Kohlenmonoxid gefüllt waren.

#### Versuche mit polyzythämischen Tieren

Die Mäuse wurden während einer 15tägigen Periode intermittierender (20–22 h/Tag) normobarer Hypoxie (7–8% O<sub>2</sub>) ausgesetzt und auf diese Weise polyzythämisch gemacht. Vier und zwölf Tage später wurden Gruppen von je 5 polyzythämischen Tieren zusammen mit normozythämischen Kontrolltieren folgendermassen behandelt: (1) hypoxische Hypoxie (8% O<sub>2</sub>) während 3 h oder (2) Kohlenmonoxid (0,1%) während 3 h oder (3) Kobaltchlorid (60 mg/kg, s.c.) während 12 h. Danach wurden Blutproben zur Bestimmung des Hämatokrits und der EPO-Serumkonzentration entnommen.

#### Versuche mit Diuretika

Eines der folgenden vier Diuretika wurde den Mäusen vorhypoxischer Belastung injiziert: Azetazolamid (25 mg/kg), Furosemid (20 mg/kg), Hydrochlorthiazid (6 mg/kg) oder Amilorid (2 mg/kg). Die natriuretische Wirkung dieser Substanzen wurde abgeschätzt, indem der von je 5 Tieren innerhalb von 3 h ausgeschiedene Harn gesammelt und die Na-Konzentration des Urins durch Flammenphotometrie bestimmt wurde.

#### Hypobare Hypoxie bei Menschen

Sechs gesunde männliche Freiwillige wurden 5 h lang einer simulierten Höhe von 4000 m (0,61 atm) in einer Unterdruckkammer ausgesetzt.

#### Bestimmung der EPO-Konzentration

Der Radioimmunotest (RIA) für EPO wurde wie beschrieben durchgeführt [14], wobei Kaninchenantiserum gegen rekombinantes humanes EPO (r-HuEPO) und jodiniertes rekombinantes EPO als Tracer (Amersham Lab., England) eingesetzt wurden. Insgesamt 100 µl Probenvolumen plus 20 µl Rinderserumalbumin (30%) wur-

<sup>1</sup> Deutsche Übersetzung des Artikels von A. Kurtz, K.U. Eckardt, L. Tannahill und C. Bauer. Regulation of Erythropoietin Production. Contrib Nephrol 1988;66:1–16.

den mit 100 µl Antiserum (1:90 000) 24 h lang inkubiert. Danach wurden 100 µl Tracer ( $8 \times 10^{-11}$  mol/l  $^{125}\text{I}$ -EPO) beigegeben; nach zusätzlicher 24-stündiger Inkubationszeit wurden die freien und gebundenen Liganden mit Hilfe eines zweiten, präzipitierenden Antikörpers getrennt.

Wegen der unterschiedlichen Immunoreaktivität von humanem EPO einerseits und Mäuse- bzw. Ratten-EPO andererseits mit dem Antiserum wurden interne Standards von EPO für Mäuse und Ratten hergestellt: (1) das 2. Internationale Referenzpräparat (IRP) von menschlichem EPO (WHO-Standard), und (2) EPO-reicher Serumpool von Mäusen bzw. Ratten (Abb. 1). Der Serumpool wurde von Tieren gewonnen, indem die Tiere 18 h lang normobarer Hypoxie ausgesetzt wurden. Die EPO-Konzentration dieser Serumproben wurde anschliessend mit Hilfe des In-vivo-Bioassays mit polyzythämischem Mäusen [14, 15] unter Verwendung des 2. IRP geeicht.

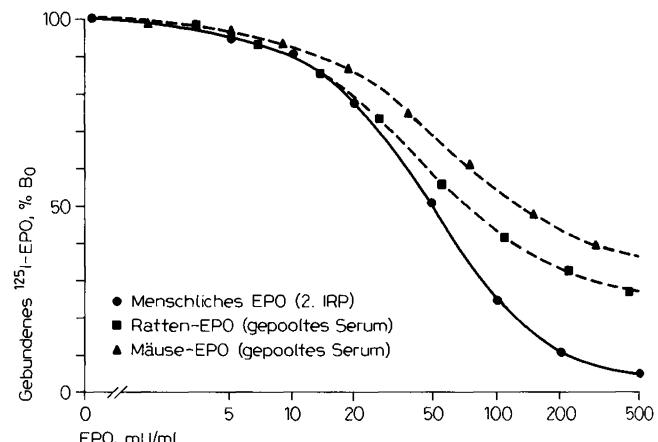
#### *Northern-Blot-Analyse*

Die Gesamt-RNA wurde aus Nierenhomogenaten unter Verwendung der Guanidin-Cäsiumchlorid-Methode extrahiert [16] und mRNA wurde durch Oligo-(dT)-Zellulose-Chromatographie angereichert [17]. Die mRNA-Proben (20 µg) wurden in Formamid/Formaldehyd denaturiert und in 1,0% Agarose/Formaldehyd-Gel elektrophoretisch getrennt.

Die mRNA wurde danach auf Nitrozellulose transferiert [18], 2 h lang im Heizkasten behandelt und mit humanem EPO-cDNA (1,2 Kilobasen) hybridisiert, welche mit  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP markiert worden war. Die Nitrozellulose wurde dann gewaschen und autoradiographiert. Um allfällige Variationen in den Mengen des mRNA zu erfassen, wurde die Nitrozellulose erneut mit einer markierten  $\alpha$ -Tubulin-cDNA-Kontrolle rehybridisiert. Die Autoradiogramme wurden mittels Densitometrie analysiert und die Ergebnisse als das Verhältnis von EPO-mRNA/Tubulin-mRNA ausgedrückt.

#### Faktoren, welche die zirkulierenden EPO-Konzentrationen beeinflussen

Es ist schon lange bekannt, dass die zirkulierenden EPO-Konzentrationen im Serum unter verschiedenen Bedingungen fallen oder steigen können. Viele dieser Bedingungen sind durch veränderte Sauerstoffzufuhr in die Gewebe charakterisiert. Anämie infolge von Blutverlust oder eine Unterfunktion des Knochenmarks ist der stärkste Stimulus für einen Anstieg des Serum-EPO [19], mit einer exponentiellen Beziehung zwischen dem EPO-Titer und dem Absinken des Hämatokrits [13]. Die Inhalation von Kohlenmonoxid, die eine funktionelle Verminderung der Sauerstofftransportkapazität bewirkt, geht ebenfalls mit einem starken Anstieg der Serum-EPO-Konzentration einher [20, 21]. Ferner beeinflusst die Sauerstoffaffinität des Hämoglobins die Serum-EPO-konzentrationen, indem der Anstieg der Sauerstoffaffinität zu einer Erhöhung des EPO-Titer führt [22]. Ein weiterer wichtiger Stimulus für erhöhte EPO-Produktion ist das Absinken der arteriellen Sauerstoffspannung, die



**Abb. 1.** Die Kurven beim EPO-RIA zeigen Kreuzreakтивität von EPO mit Serum von Mäusen und Ratten gegen ein Antiserum von r-HuEPO. Die Gesamtmenge des durch Antikörper ausfällbaren  $^{125}\text{I}$ -EPO, in Abwesenheit von nichtmarkiertem EPO ( $B_0$ ), betrug durchschnittlich 45% der zugesetzten Radioaktivität. Das 2. IRP entspricht der zweiten Internationalen Referenzpräparation für menschliches EPO (WHO-Standard). Die gepoolten Serumproben wurden ihrerseits im exhypoxischen Maus-assay gemessen.

entweder durch kardiopulmonale Störungen oder durch eine Verminderung der Sauerstoffspannung im inspiratorischen Gas verursacht wird. Umgekehrt geht ein Anstieg in der Masse der roten Blutkörperchen – wie bei der Polycythaemia vera – mit niedrigen EPO-Konzentrationen einher [23, 24].

Neben den Veränderungen der Sauerstoffzufuhr wird die Produktion von EPO auch durch metabolische Faktoren beeinflusst. Hypophysektomie [25, 26] und Hunger [13] führen zu einer Verminderung der EPO-Bildung, während die Schilddrüsenhormone [27] die EPO-Konzentration im Serum erhöhen. Schliesslich können zirkulierende EPO-Titer auch durch die Verabreichung von Kobalt [28] erhöht werden. Während diese Stimulierung durch Kobalt kein generelles regulatorisches Prinzip (siehe unten) widerzuspiegeln scheint, können alle übrigen Beobachtungen in dem Sinne zusammengefasst werden, dass Zustände mit verringelter Sauerstoffzufuhr und Zustände mit gesteigertem Sauerstoffbedarf mit erhöhten Konzentrationen von zirkulierendem EPO einhergehen, während niedrigere EPO-Konzentrationen typisch sind für Zustände mit höherer Sauerstoffzufuhr oder geringerem Sauerstoffbedarf.

Es scheint also, dass die physiologische Rolle von EPO darin besteht, die Bildung der roten Blutkörperchen dem Sauerstoffbedarf der Gewebe anzupassen.

**Tabelle I.** Wirkung von Diuretika auf die durch Hypoxie induzierte Produktion von EPO

	Acetazolamid		Furosemid		Thiazid		Amilorid	
Angriffspunkt	proximaler Tubulus		Henle-Schleife		distaler Tubulus		Sammelrohr	
Na <sup>+</sup> -Absorption im entsprechenden Segment, % der gefilterten Menge	60		30		8		1	
Na <sup>+</sup> -Ausscheidung bei Behandlung mit Diuretika, % der gefilterten Menge	3		23		5		5	
	K	B	K	B	K	B	K	B
Serum-EPO als Reaktion auf 3 h 8% O <sub>2</sub> , mU/ml	309 ± 17	348 ± 26	265 ± 18	317 ± 23	314 ± 60	300 ± 27	237 ± 33	233 ± 23
n	20	15	28	30	5	5	15	15
Serum-EPO als Reaktion auf 3 h 0,1% CO, mU/ml	727 ± 92	586 ± 84	727 ± 92	702 ± 92	625 ± 36	532 ± 50	625 ± 36	643 ± 40
n	5	5	5	5	5	5	5	5

Die Anwendung diuretischer Substanzen ergab keine signifikante Verminderung der EPO-Reaktion. Die Wirkung von Azetazolamid auf die Natriumabsorption im proximalen Tubulus ist jedoch wahrscheinlich zu schwach, um den Sauerstoffverbrauch in diesem Tubulusabschnitt signifikant reduzieren zu können. Die Natriumausscheidung unter Diuretika ist ausgedrückt in Relation zu der Natriumausscheidung bei Kontrolltieren (46 µmol/5 Tiere innerhalb von 3h). Dieser Wert entspricht zirka 1% des filtrierten Natriumangebots («Na load»). K = Kontrolle; B = Behandlung.

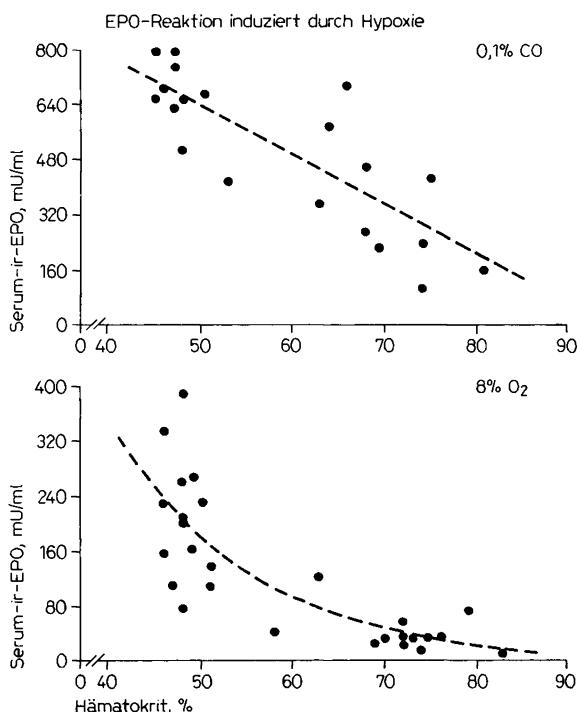
## Der renale Sauerstoffsensor

Bis jetzt gibt es keinen Hinweis dafür, dass die Halbwertszeit von EPO einer physiologischen Regulation unterliegt. Es kann daher angenommen werden, dass die EPO-Konzentrationen im Plasma direkt die renale Sekretionsrate reflektieren, welche offenbar durch einen Sauerstoffsensor kontrolliert wird, der seinerseits auf das Verhältnis zwischen Sauerstoffzufuhr und Sauerstoffbedarf anspricht. Es war zunächst nicht klar, ob sich dieser Sauerstoffsensor in der Niere selbst befindet; daher lag es auf der Hand, die Rolle der klassischen Chemorezeptoren in der Regulation der EPO-Produktion zu untersuchen. Es scheint jedoch, dass weder die Funktion der Karotiskörperchen noch irgendein anderer neuraler Input in die Niere erforderlich ist, um die EPO-Synthese als Reaktion auf Hypoxie zu steigern [29, 30]. Andererseits kann die selektive Reduktion des renalen Blutstroms die EPO-Bildung erhöhen [31–33]. Auch die isolierte perfundierte Niere setzt nach Reduktion der Sauerstoffspannung im Perfusat mehr EPO frei [34, 35]; renale Gewebekulturen produzieren ebenfalls mehr EPO, nachdem sie niedrigen Sauerstoffspannungen ausgesetzt wurden [36, 37]. Es ist deshalb wahrscheinlich, dass der Sauerstoffsensor, welcher die EPO-Synthese kontrolliert, seinen Sitz tatsächlich in der Niere selbst hat.

Die Lokalisation dieses Sauerstoffsensors innerhalb der Niere ist jedoch noch nicht bekannt. Aufgrund seiner

Funktion, d.h. der Ansprechbarkeit auf das Verhältnis zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf, sollte der Sensor an Strukturen mit hohem Energiebedarf und infolgedessen mit hohem Sauerstoffverbrauch gekoppelt sein. Der Sauerstoffverbrauch der Niere wird vor allem durch die Menge des pro Zeiteinheit resorbierten Natriums bestimmt [38]. Um die mögliche Lokalisierung des Sauerstoffsensors einzudringen, untersuchten wir die Wirkung einer spezifischen Hemmung der Na-Reabsorption auf die EPO-Produktion in verschiedenen Abschnitten des Tubulussystems.

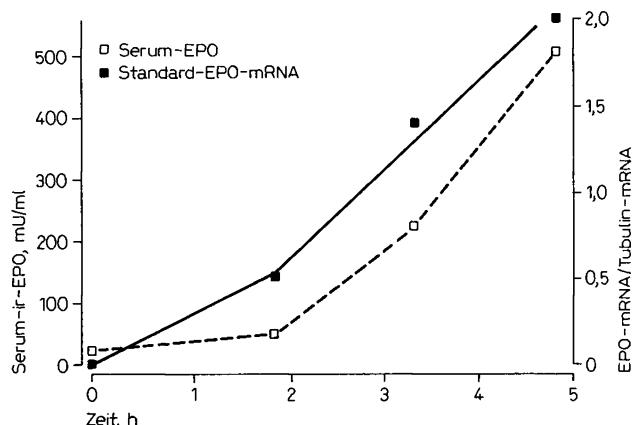
Zu diesem Zweck wurden Mäuse vor Hypoxie mit Diuretika mit unterschiedlichen tubulären Angriffsorten behandelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle I wiedergegeben und zeigen, dass die wirksame Hemmung der Na-Reabsorption im Sammelrohr, im distalen Tubulus, im Bereich der Macula densa und in der Henle-Schleife den Einfluss der Hypoxie auf die EPO-Bildung nicht beeinflusst. Bei diesen Versuchen war es jedoch nicht möglich, die Na-Reabsorption im proximalen Tubulus in ausreichendem Mass zu hemmen. Per exclusionem kann aus diesem Ergebnis der Schluss gezogen werden, dass sich der renale Sauerstoffsensor im Bereich des proximalen Tubulus befinden muss. Neben der zellulären Lokalisierung des sauerstoffempfindlichen Mechanismus wurde auch der Zelltyp, welcher EPO produziert, noch nicht einwandfrei identifiziert. Da EPO in den Zellen nicht gespeichert wird, können diese nicht mit Hilfe von im-



**Abb. 2.** Umgekehrte Korrelation zwischen Hämatokrit und Serum-EPO-Konzentrationen als Reaktion auf 1) Inhalation von Kohlenmonoxid während 3 h, und 2) hypoxische Hypoxie während 3 h. Die Abbildung bezieht sich auf normale Tiere (Hämatokrit: 53%) sowie Tiere, die nach 4 oder 12 Tagen nach vorhergehender normobare 15-tägiger Hypoxie untersucht wurden (Hämatokrit:  $74,8 \pm 1,5$  und  $67,7 \pm 1,4\%$ ; X  $\pm$  SEM, n = 12 bzw. 11).

munhistochemischen Methoden identifiziert werden, sondern nur durch den Nachweis von mRNA für EPO mit der In-situ-Hybridisierung sichtbar gemacht werden. Neue Erkenntnisse deuten darauf hin, dass mRNA für EPO in den Zellen der Nierenrinde in nächster Nähe des proximalen Tubulus vorhanden ist (siehe nächstes Kapitel). Diese Lokalisierung der EPO-produzierenden Zellen würde gut in das Konzept passen, dass dem proximalen Tubulus bei der «Erkennung» des Signals Sauerstoffmangel eine wichtige Rolle zukommt.

Bevor die Möglichkeiten diskutiert werden, auf welche Weise der proximale Tubulus bei dieser Rezeptorfunktion beteiligt sein könnte, müssen wir die Parameter betrachten, die durch den Sauerstoffsensor erfasst werden. Aus den obigen Darlegungen geht hervor, dass der Sauerstoffsensor empfindlich ist auf 1) Zustände, welche sowohl den arteriellen als auch den venösen pO<sub>2</sub> beeinflussen (z.B. hypoxische Hypoxie) und 2) Zustände mit normalem arteriellem pO<sub>2</sub> und erniedrigtem venösem pO<sub>2</sub>, z.B. bei der Anämie. Es stellt sich daher die Frage, ob der Sauerstoffsensor auch imstande ist, den arteriel-



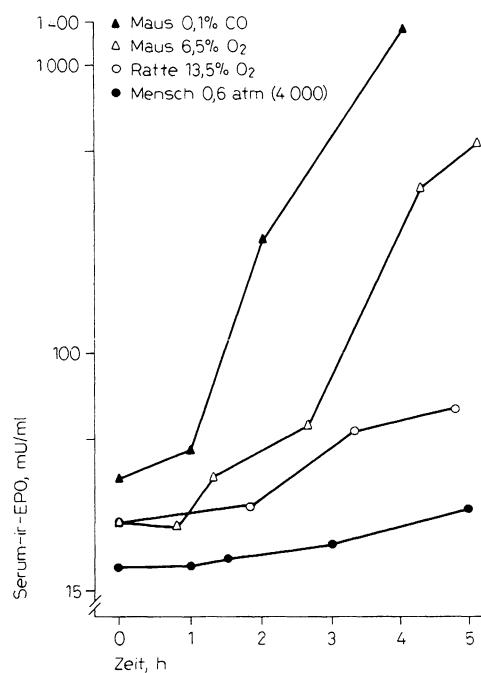
**Abb. 3.** Die Serum-EPO-Konzentrationen steigen bei Ratten während der Hypoxie parallel zum Anstieg des renalen EPO-mRNA. Der Gehalt an EPO-mRNA wurde quantifiziert durch Analyse mittels Northern-Blot-Autoradiogrammen, die mit Densitometrie ausgewertet wurden. Wiedergegeben ist das Verhältnis der densitometrischen Analyse von EPO-mRNA und  $\alpha$ -Tubulin-mRNA. Die Hypoxie entspricht einer O<sub>2</sub>-Konzentration von 10,5%.

len pO<sub>2</sub> zu registrieren. Abbildung 2 zeigt jedoch, dass die Stimulierung der EPO-Produktion sowohl durch arterielle Hypoxie als auch durch funktionelle Anämie (Inhalation von Kohlenmonoxid) umgekehrt proportional zur Sauerstofftransportkapazität des Blutes ist. Dies deutet darauf hin, dass in beiden Zuständen eher der venöse als der arterielle pO<sub>2</sub> die Bildung von EPO beeinflusst.

Derzeit wissen wir nicht, ob die EPO-produzierenden Zellen selbst die Funktion eines Sauerstoffsensors haben. Wenn dies der Fall ist, könnte die Funktion der proximalen Tubuluszellen darin bestehen, den pO<sub>2</sub> in der Umgebung der EPO-produzierenden Zellen auf venöse Werte zu bringen. Dies würde eine passive Funktion der proximalen Tubuluszellen bei der Sauerstoffregistrierung darstellen. Wenn andererseits die EPO-produzierenden Zellen selbst keine Funktion als Sauerstoffsensor haben, wäre es wahrscheinlich, dass die proximalen tubulären Zellen ein biochemisches Signal für Hypoxie bilden, welches die Produktion von EPO in den nahegelegenen Zellen auslöst.

### Zelluläre Regulation der EPO-Produktion

Es ist bekannt, dass die Nieren keine Speicher für EPO enthalten [39, 40]. Überdies zeigt ein Vergleich der Nukleotidsequenz des EPO-Gens mit der Aminosäuren-



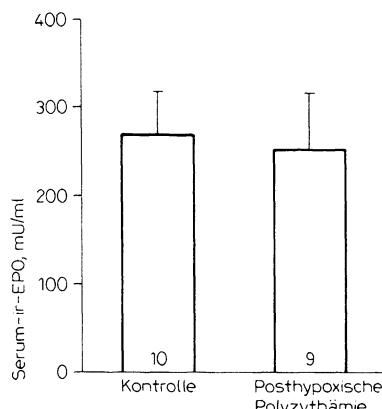
**Abb. 4.** Zeitabhängiger Anstieg der Serum-EPO-Konzentrationen bei Menschen, Ratten und Mäusen, als Reaktion auf verschiedene hypoxische Stimuli.

sequenz des Moleküls, dass EPO nicht als aktivierbarer Vorläufer synthetisiert wird [5, 6]. Es gibt weitere Hinweise dafür, dass EPO auf seinem Weg von der Synthese zur Sekretion nicht in spezifische sekretorische Granula sequestriert wird [R. Taugner, persönl. Mitteilung]. Man kann daher annehmen, dass die Sekretion von EPO durch die Syntheserate reguliert wird. Diese wird wiederum bestimmt durch den Gehalt an EPO-mRNA in der Niere und kann zusätzlich durch Veränderungen der Translationsrate von EPO-mRNA moduliert werden. Um festzustellen, ob Änderungen des Gehaltes an EPO-mRNA eine signifikante Rolle für die Serumkonzentrationen des Hormons spielen, wurde der Gehalt an EPO-mRNA in der Rattenniere während Hypoxie mit den Serum-EPO-Konzentrationen verglichen (Abb. 3). Die verwendete «Northern-Blot»-Technik ist nicht empfindlich genug, um die niedrigen mRNA-Spiegel zu erfassen, welche bei normoxischen oder leicht hypoxischen Tieren vorhanden sind. Bei schwerer Hypoxie wurde jedoch ein linearer Anstieg des EPO-mRNA, parallel mit dem Anstieg des Serum-EPO, beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass unter den von uns gewählten Versuchsbedingungen die Produktion von EPO direkt durch Veränderungen des EPO-mRNA-Gehalts reguliert wird.

Bevor wir die Mechanismen diskutieren, die zu einer Aktivierung des EPO-Gens führen könnten, muss man die Kinetik der EPO-Bildung nach Einsetzen des hypoxischen Stimulus in Betracht ziehen. In Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen [41, 42] fanden wir, dass die Zeit zwischen dem Einsetzen des hypoxischen Stimulus und dem Anstieg des Serum-EPO zwischen 1 und 1,5 h betrug, und zwar unabhängig von der betrachteten Spezies und der Art des hypoxischen Reizes (Abb. 4). Diese Zeitspanne beinhaltet folgende Teilphasen: 1) Verminderung der Sauerstoffspeicher im Körper; 2) Erkennung des Signals und Transduktion am Sauerstoffsensor; 3) Transkription des EPO-Gens und Translation von EPO-mRNA, und 5) Translokation von EPO und Equilibrierung des EPO-Verteilungsraums. Um den Zeitbedarf für die Aktivierung des Sauerstoffsensors abzuschätzen, wurden Mäuse für 5,15 oder 30 min einem hypoxischen Stimulus ausgesetzt. Nach Absetzen des hypoxischen Stimulus wurden die Tiere für weitere 3 h in normoxischer Atmosphäre belassen, bevor die Serum-EPO-Konzentrationen bestimmt wurden. Die EPO-Konzentrationen änderten sich nach 5 und 15 min Hypoxie nicht, stiegen jedoch signifikant nach 30 min ( $34,1 \pm 4,9$  vs.  $20,9 \pm 2,7$  mU/ml;  $p < 0,001$ ). Dies zeigte, dass die für die Aktivierung des Sauerstoffsensors erforderliche Zeitspanne maximal 30 min beträgt. Es ist derzeit noch nicht bekannt, ob der Beginn der Gentranskription bereits in dieser Zeitspanne enthalten ist; jedoch wurde 60 min nach dem Einsetzen der Hypoxie ein deutlicher Anstieg des EPO-mRNA nachgewiesen [43]. Somit scheinen für die Synthese, die Freisetzung und die Verteilung von EPO mindestens 30 min erforderlich zu sein.

Im folgenden werden die Mechanismen diskutiert, durch welche ein pO<sub>2</sub>-Abfall zu einer verstärkten Transkription des EPO-Gens führen können. Die Kenntnisse über diesen Prozess sind immer noch sehr lückenhaft, da die verfügbaren Zellkulturmodelle [36, 37, 44, 45] viel geringere EPO-Mengen produzieren als eine intakte Niere und es darüber hinaus nicht sicher ist, ob diese Zellkulturen auch von Zellen abstammen, welche unter In-vivo-Bedingungen EPO produzieren.

Es kann jedoch angenommen werden, dass der pO<sub>2</sub> die Transkription des EPO-Gens nicht direkt reguliert, was wiederum eine Signaltransduktion mit nachfolgender Bildung von metabolischen «Botenmolekülen» erforderlich macht. So könnte z.B. eine Veränderung des pO<sub>2</sub> durch den Reduktionsgrad der sauerstoffabhängigen Enzyme, wie z.B. den Oxidasen, gemessen werden. Es könnte aber auch sein, dass der pO<sub>2</sub> durch den Umsatz energiereicher Nukleotide wie ATP erfasst wird. Wir



**Abb. 5.** Serum-EPO-Konzentration 12 h nach subkutaner Behandlung normaler (Hämatokrit:  $49 \pm 1\%$ ) und polyzythämischer (Hämatokrit:  $68 \pm 2\%$ ) Mäuse mit Kobalchlorid. Die Tiere waren zuvor 15 Tage lang normobarischer Hypoxie ausgesetzt worden ( $\bar{X} \pm \text{SEM}$ ).

haben kürzlich den Nachweis erbracht, dass ein Anstieg des Energieverbrauchs in tubulären Nierenzellen zum Anstieg des Quotienten ADP/ATP an denjenigen Plasmamembranen führt, an denen die Na/K-ATPase lokalisiert ist [46]. Als Ergebnis dieses lokalen Abfalls der ATP-Konzentration wird die Reazylierung der Arachidonsäure vermindert, was zu einer verstärkten Freisetzung von Prostaglandinen führt. Ferner wurden unter diesen Versuchsbedingungen die Schlüsselenzyme der Glykolyse stimuliert und somit die Laktatbildung gesteigert. So werden im Falle eines Missverhältnisses zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf zwei verschiedene Substanzen – Prostaglandin und Laktat – freigesetzt, die Botenmoleküle für Sauerstoffmangel darstellen könnten. Unter denjenigen biochemischen Parametern, die eine Hypoxiereaktion vermitteln könnten, werden die Prostaglandine als ernsthafte Kandidaten betrachtet. Dies beruht auf folgenden Erkenntnissen: 1) verschiedene Gewebe, einschließlich der Nieren, setzen auf Hypoxie hin mehr Prostaglandine frei [47, 48]; 2) die Prostaglandine können die Bildung von EPO in der Niere [49, 50] und in Zellkulturen [51] stimulieren, und 3) die Hemmung der Prostaglandinbildung hemmt die durch O<sub>2</sub>-Mangel induzierte Bildung von EPO in vivo [21, 52, 53].

Wie könnten die Prostaglandine die verstärkte Transkription des EPO-Gens zustande bringen? Ein zweiter «Botenstoff», der bei der Signalübermittlung beteiligt sein könnte, ist cAMP, da gezeigt wurde, dass Aktivatoren der Adenylylatzyklase, einschließlich der Prostaglan-

dine, die Produktion von EPO in vivo und in vitro stimulieren [44, 51, 54].

Ein weiterer, gut bekannter – wenn auch geheimnisvoller – Stimulator der EPO-Produktion ist Kobalt. Es wurde nachgewiesen, dass Kobaltbehandlung zu einem signifikanten Anstieg der renalen EPO-mRNA führt [10, 43]. Wie Abbildung 5 zeigt, wird die stimulierende Wirkung von Kobalt durch die erhöhte Transportkapazität des Blutes für Sauerstoff nicht vermindert, was darauf hindeutet, dass Kobalt an einer Stelle wirkt, welche «distal» zum Sauerstoffsensor liegt. Im Gegensatz zur hypoxieinduzierten EPO-Produktion wird die durch Kobalt stimulierte EPO-Produktion durch Hemmung der Prostaglandinsynthese nicht abgeschwächt [21]; dies unterstützt die Annahme, dass Kobalt keine Wirkung auf die frühen Phasen der sauerstoffabhängigen Reaktionen hat. In allen bisher untersuchten Geweben erwies sich Kobalt als Hemmer des Kalziumeinstroms in die Zelle [55]. Man kann deshalb annehmen, dass Kobalt seine Wirkung ausübt, indem es das Einfließen von Kalzium in die EPO-produzierenden Zellen blockiert. Tatsächlich erhöhen die Kalziumblocker Verapamil und Diltiazem sowie ein Medium mit niedrigem Kalziumgehalt die Sekretion von EPO in einer Kultur von renalen Krebszellen [45]. Diese Aussage wird gestützt durch In-vivo-Studien, in denen nachgewiesen wurde, dass Verapamil die Wirkung von Hypoxie auf die EPO-Produktion beschleunigt [56, sowie eigene unveröffentl. Daten]. In diesem Zusammenhang ist von Interesse, dass ein Anstieg der cAMP-Konzentration zu einem Abfall der intrazellulären Kalziumkonzentration in verschiedenen Geweben führt: der Einstrom von Kalzium durch die Zellmembran wird gehemmt. Dies legt die Annahme nahe, dass das EPO-Gen normalerweise unter dem hemmenden Einfluss eines Prozesses steht, der von Kalziumcalmodulin abhängt. Eine Senkung der intrazellulären Kalziumkonzentration durch physiologische oder pharmakologische Mittel (Verapamil, Kobalt) wäre dann das stimulierende Signal für die Produktion von EPO.

## Zusammenfassung

Die renale Ausscheidung von EPO wird durch einen Sauerstoffsensor kontrolliert, der imstande ist, Veränderungen im Verhältnis zwischen Sauerstoffzufuhr und Sauerstoffbedarf in der Niere festzustellen. Der Sensormechanismus hängt wahrscheinlich mit der proximalen tubulären Funktion zusammen und ist von Veränderungen im venösen pO<sub>2</sub> abhängig. Die Aktivierung des Sauerstoffsensors durch akute Hypoxie erfordert ungefähr 30 min Zeit und führt zum Anstieg der Serum-EPO-Konzentrationen innerhalb von

60–90 min nach dem Einsetzen der Hypoxie. Dieser Anstieg der EPO-Gehalte scheint direkt proportional zu sein zu der Anreicherung von EPO-mRNA in den Nieren. Einzelheiten über den Mechanismus, der das Absinken des  $pO_2$  mit gesteigerter EPO-Genaktivität verbindet, sind noch unklar. Indirekte Hinweise deuten darauf hin, dass eine Verminderung des intrazellulären Kalziums, die durch Pharmaka (Kobalt, Ca-Antagonisten) oder durch erhöhte cAMP-Spiegel hervorgerufen wird, eine wichtige Rolle spielen könnte.

## Regulation of Erythropoietin

The main regulatory hormone for the control of erythropoiesis is erythropoietin (EPO). This glycoprotein has a molecular weight of 34,000 daltons, about 40% of which is represented by carbohydrates. EPO leads to an enhanced mitosis and differentiation of erythroid precursors (colony-forming unit erythroid) in the bone marrow by binding to specific receptors. The major stimulus for EPO formation in the kidney is hypoxia. The tubular parts that are intimately involved in this  $O_2$ -sensing mechanism are the proximal tubular cells as can be inferred from the use of site-specific transport inhibitors. The minimal time necessary for a hypoxic signal to induce EPO formation was found to be 30 min, including wash out of oxygen stores, activation of the EPO gene and equilibration of the EPO distribution space. About 1.5 h after the onset of hypoxia, EPO mRNA was found to accumulate in the kidney, thus pointing toward the possibility of an oxygen-regulated transcription or oxygen-dependent regulation of the stability of EPO mRNA. Possibly, a decrease in the intracellular calcium concentration is involved in this signalling process.

## Danksagung

Die Autoren danken Herrn Dr. P. Hirth, Boehringer-Mannheim, für die grosszügige Bereitstellung von Anti-EPO-Serum sowie Herrn Dr. C. Shoemaker, für die Bereitstellung der cDNA für das menschliche EPO-Gen. Die Arbeit der Autoren wurde unterstützt durch den Schweizerischen Nationalfonds (Gesuch Nr. 3.023-0.84), die «Roche Research Foundation» und die «Hartmann Müller-Stiftung für medizinische Forschung». K.U. Eckardt dankt der Deutschen Forschungsgemeinschaft für ein Stipendium.

## References

- 1 Carnot, P.; Deflandre, C.: Sur l'activité hémopoïétique des différents organes au cours de la régénération du sang. *C.r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris* 143: 432–435 (1906).
- 2 Peschle, C.; Condorelli, M.: Biogenesis of erythropoietin: evidence for pro-erythropoietin in a subcellular fraction of the kidney. *Science* 190: 910–912 (1975).
- 3 Gordon, A.S.; Cooper, G.W.; Zanjani, E.D.: The kidney and erythropoiesis. *Semin. Hematol.* 4: 337–358 (1967).
- 4 Miyake, T.; Kung, C.K.H.; Goldwasser, E.: Purification of human erythropoietin. *J. biol. Chem.* 252: 5558–5564 (1977).
- 5 Lai, P.-H.; Everett, R.; Wang, F.-F.; Arakawa, T.; Goldwasser, E.: Structural characterization of human erythropoietin. *J. biol. Chem.* 261: 3116–3121 (1986).
- 6 McDonald, J.D.; Lin, F.-K.; Goldwasser, E.: Cloning, sequencing and evolutionary analysis of the mouse erythropoietin gene. *Mol. cell. Biol.* 6: 842–848 (1986).
- 7 Jacobs, K.; Shoemaker, C.; Rudersdorf, R.; Neill, S.D.; Kaufman, R.J.; Mufson, A.; Seehra, J.; Jones, S.S.; Hewick, R.; Fritsch, E.F.; Kawakita, M.; Shimizu, T.; Miyake, T.: Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature, Lond.* 313: 806–810 (1985).
- 8 Lin, F.-K.; Suggs, S.; Lin, C.-H.; Browne, J.K.; Smalling, R.; Egrie, J.C.; Chen, K.K.; Fox, G.M.; Martin, F.; Stabinski, Z.; Badrawi, M.; Lai, P.-H.; Goldwasser, E.: Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc. natn. Acad. Sci. USA* 82: 7580–7584 (1985).
- 9 Bondurant, M.C.; Koury, M.J.: Anemia induces accumulation of erythropoietin mRNA in the kidney and liver. *Mol. cell. Biol.* 6: 2731–2733 (1986).
- 10 Beru, N.; McDonald, J.; Lacombe, C.; Goldwasser, E.: Expression of the erythropoietin gene. *Mol. cell. Biol.* 6: 2571–2575 (1986).
- 11 Zanjani, E.D.; Peterson, E.N.; Gordon, A.S.; Wasserman, L.R.: Erythropoietin production in the fetus: role of the kidney and maternal anemia. *J. Lab. clin. Med.* 83: 281–287 (1974).
- 12 Jacobson, L.O.; Goldwasser, E.; Fried, W.; Plzak, L.F.: The role of the kidney in erythropoiesis. *Nature, Lond.* 179: 633–634 (1957).
- 13 Jelkmann, W.: Renal erythropoietin: properties and production. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 104: 140–215 (1986).
- 14 Eckardt, K.-U.; Kurtz, A.; Hirth, P.; Scigalla, P.; Wieczorek, L.; Bauer, C.: Evaluation of the stability of human erythropoietin in samples for radioimmunoassay. *Klin. Wschr.* 66: 241–245 (1988).
- 15 Cotes, P.M.; Bangham, D.R.: Bioassay for erythropoietin in mice made polycythemic by exposure to air at a reduced pressure. *Nature, Lond.* 191: 1065–1067 (1961).
- 16 Chirgwin, J.; Przybyla, A.E.; McDonald, R.J.; Rutter, W.J.: Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18: 5294–5299 (1977).
- 17 Aviv, H.; Leder, P.: Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc. natn. Acad. Sci. USA* 69: 1408–1412 (1972).
- 18 Thomas, P.S.: Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. natn. Acad. Sci. USA* 77: 5201–5205 (1980).
- 19 Erslev, A.J.; Caro, J.; Miller, O.; Silver, R.: Plasma erythropoietin in health and disease. *Ann. clin. Lab. Sci.* 10: 250–257 (1980).
- 20 Syvertsen, G.R.; Harris, J.A.: Erythropoietin production in dogs exposed to high altitude and carbon monoxide. *Am. J. Physiol.* 225: 293–299 (1973).
- 21 Jelkmann, W.; Kurtz, A.; Seidl, J.; Bauer, C.: Mechanisms of the renal glomerular erythropoietin production; in Grote, Witzleb, Atemgaswechsel und  $O_2$ -Versorgung der Organe, pp. 130–137 (Akademie der Wissenschaften und der Literatur, Mainz 1984).
- 22 Lechermann, B.; Jelkmann, W.: Erythropoietin production in normoxic and hypoxic rats with increased blood  $O_2$  affinity. *Respir. Physiol.* 60: 1–8 (1985).
- 23 Erslev, A.J.; Caro, J.; Kansu, E.; Miller, O.; Cobbs, E.: Plasma erythropoietin in polycythemia. *Am. J. Med.* 66: 243–247 (1979).

- 24 Garcia, J.F.; Ebbe, S.N.; Hollander, L.; Cutting, H.O.; Miller, M.E.; Cronkite, E.P.: Radioimmunoassay of erythropoietin: circulating levels in normal and polycythemic human beings. *J. Lab. clin. Med.* 99: 624–635 (1982).
- 25 Peschle, C.; Rappaport, I.A.; Magli, M.C.; Marone, G.; Lettieri, F.; Cillo, C.; Gordon, A.S.: Role of the hypophysis in erythropoietin production during hypoxia. *Blood* 51: 1117–1124 (1978).
- 26 Halvorsen, S.; Roh, B.L.; Fisher, J.W.: Erythropoietin production in nephrectomized and hypophysectomized animals. *Am. J. Physiol.* 215: 349–352 (1968).
- 27 Peschle, C.; Zanjani, E.D.; Gidari, A.S.; McLaurin, W.D.; Gordon, A.S.: Mechanism of thyroxine action on erythropoiesis. *Endocrinology* 89: 609–612 (1971).
- 28 Goldwasser, E.; Jacobson, L.O.; Fried, W.; Plzak, L.F.: Studies on erythropoiesis. V. The effect of cobalt on the production of erythropoietin. *Blood* 13: 55–60 (1958).
- 29 Hansen, A.J.: Fogh, J.; Møllgard, K.; Sørensen, S.C.: Evidence against EPO production by the carotid body. *Respir. Physiol.* 18: 101–106 (1973).
- 30 Beynon, G.: The influence of the autonomic nervous system in the control of erythropoietin secretion in the hypoxic rat. *J. Physiol.* 266: 347–360 (1977).
- 31 Takaku, F.; Hirashima, K.; Nakao, K.: Studies on the mechanism of erythropoietin production. I. Effect of unilateral constriction of the renal artery. *J. Lab. clin. Med.* 59: 815–820 (1962).
- 32 Hansen, P.: Polycythemia produced by constriction of the renal artery in a rabbit. *Acta pathol. microbiol. immunol. scand.* 60: 465–472 (1964).
- 33 Fisher, J.W.; Samuels, A.I.: Relationship between renal blood flow and erythropoietin production in dogs. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 125: 482–485 (1967).
- 34 Kuratowska, Z.; Lewartowski, B.; Michalak, E.: Studies on the production of erythropoietin by isolated perfused organs. *Blood* 18: 527–534 (1961).
- 35 Fisher, J.W.; Langston, J.W.: Effects of testosterone, cobalt and hypoxia on erythropoietin production in the isolated perfused dog kidney. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 149: 75–87 (1968).
- 36 Kurtz, A.; Jelkmann, W.; Sinowatz, F.; Bauer, C.: Renal mesangial cell cultures as a model for study of erythropoietin production. *Proc. natn. Acad. Sci. USA* 80: 4008–4011 (1983).
- 37 Caro, J.; Hickey, J.; Erslev, A.: Erythropoietin production by an established kidney proximal tubule cell line (LLCPK1). *Exp. Hematol.* 12: 357 (1984).
- 38 Deetjen, P.; Kramer, K.: Die Abhängigkeit des O<sub>2</sub>-Verbrauchs der Niere von der Na<sup>+</sup> Rückresorption. *Pflügers Arch.* 273: 636–650 (1961).
- 39 Sherwood, J.B.; Goldwasser, E.: Extraction of erythropoietin from normal kidneys. *Endocrinology* 103: 866–870 (1978).
- 40 Jelkmann, W.; Bauer, C.: Demonstration of high levels of erythropoietin in rat kidneys following hypoxic hypoxia. *Pflügers Arch.* 393: 34–39 (1981).
- 41 Schooley, J.C.; Mahlmann, L.J.: Evidence for the de novo synthesis of erythropoietin in hypoxic rats. *Blood* 40: 662–670 (1972).
- 42 Clemons, G.C.; DeManincor, D.; Fitzsimmons, S.L.; Garcia, J.F.: Immunoreactive erythropoietin studies in hypoxic rats and the role of the salivary glands. *Exp. Hematol.* 15: 18–23 (1987).
- 43 Schuster, S.J.; Wilson, J.H.; Erslev, A.J.; Caro, J.: Physiologic regulation and tissue localization of renal erythropoietin messenger RNA. *Blood* 70: 316–318 (1987).
- 44 Sherwood, J.B.; Burns, E.R.; Shouval, D.: Stimulation by cAMP of erythropoietin secretion by an established human renal carcinoma cell line. *Blood* 69: 1053–1057 (1987).
- 45 Nagakura, K.; Fischer, J.W.: Low levels of calcium increase erythropoietin (Ep) secretion by human renal carcinoma cells in culture. *Fed. Proc.* 45: 655 (1986).
- 46 Kurtz, A.; Pfeilschifter, J.; Malmström, K.; Woodson, R.D.; Bauer, C.: Mechanism of NaCl transport-stimulated prostaglandin formation in MDCK cells. *Am. J. Physiol.* 252: C307–C314 (1987).
- 47 Gross, D.M.; Mujovic, V.M.; Jubiz, W.; Fisher, J.W.: Enhanced erythropoietin and prostaglandin E production in the dog following renal artery constriction. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 151: 498–501 (1976).
- 48 Walker, B.R.: Diuretic response to acute hypoxia in the conscious dog. *Am. J. Physiol.* 243: F440–F446 (1982).
- 49 Foley, J.W.; Gross, D.M.; Nelson, P.K.; Fisher, J.W.: The effects of arachidonic acid on erythropoietin production in exhypoxic polycythemic mice and the isolated perfused canine kidney. *J. Pharmac. exp. Ther.* 207: 402–409 (1978).
- 50 Gross, D.M.; Fisher, J.W.: Erythropoietic effects of PGE<sub>2</sub> and 2 endoperoxide analogs. *Experientia* 36: 458–459 (1980).
- 51 Kurtz, A.; Jelkmann, W.; Pfeilschifter, J.; Bauer, C.: Role of prostaglandins in hypoxia-stimulated erythropoietin production. *Am. J. Physiol.* 249: C3–C8 (1985).
- 52 Mujovic, V.M.; Fisher, J.W.: The role of prostaglandins in the production of erythropoietin (ESF) by the kidney. II. Effects of indomethacin on erythropoietin production following hypoxia in dogs. *Life Sci.* 16: 463–473 (1975).
- 53 Fischer, J.W.: Prostaglandins and kidney erythropoietin production. *Nephron* 25: 53–56 (1980).
- 54 Rodgers, G.M.; Fisher, J.W.; George, J.W.: The role of adenosine 3',5' monophosphate in the control of erythropoietin production. *Am. J. Med.* 58: 31–38 (1975).
- 55 Kohlhardt, M.; Bauer, B.; Krause, H.; Fleckenstein, A.: Selective inhibition of the transmembrane Ca conductivity of mammalian myocardial fibers by Ni, Co and Mn ions. *Pflügers Arch.* 338: 115–123 (1973).
- 56 McGonigle, R.J.S.; Brookins, J.; Pegram, B.L.; Fisher, J.W.: Enhanced erythropoietin production by calcium entry blockers in rats exposed to hypoxia. *J. Pharmac. exp. Ther.* 241: 428–432 (1987).

Prof. Dr. Christian Bauer  
Physiologisches Institut  
Universität Zürich  
Winterthurerstrasse 190  
CH 8057 Zürich (Schweiz)