

Erythropoietin-Expression in Stromazellen der Niere



DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN
(DR. RER. NAT.) DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von

Katharina Anna-Elisabeth Gerl

aus

Dachau

im Jahr

2017

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von August 2013 bis März 2017 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. Armin Kurtz am Institut für Physiologie der Universität Regensburg.

Promotionsgesuch eingereicht am: 07.04.2017

Die Arbeit wurde angeleitet von: Herr Prof. Dr. med. Armin Kurtz

Unterschrift _____
(Katharina Gerl)

Inhalt

1 Einleitung.....	6
1.1 Erythropoietin.....	6
1.1.1 Struktur, Expression und Funktionen	6
1.1.2 Regulation der EPO-Genexpression	8
1.1.3 Mechanismus der EPO-Wirkung	10
1.2 Die Niere	13
1.2.1 Struktur der Niere	13
1.2.2 Renale EPO-produzierende Zellen.....	15
1.2.3 Renale FoxD1 ⁺ - Stromaprogenitorzellen und ihre Deszendenten	18
1.3 Zielsetzung.....	20
2 Material und Methoden	22
2.1 Material	22
2.1.1 Geräte.....	22
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	23
2.1.3 Chemikalien, Enzyme und Kits.....	24
2.1.4 Puffer und Lösungen	27
2.1.5 Primer	30
2.1.6 Antikörper und Hybridisierungssonden	32
2.1.7 Software und Internetdienste.....	33
2.2 Methoden	34
2.2.1 Versuchstiere.....	34
2.2.1.1 Verwendete Mauslinien	34
2.2.1.2 Genotypisierung.....	37
2.2.1.3 Tamoxifen- und Doxycyclin-Behandlung	38
2.2.1.4 ICA (Prolylhydroxylase-Inhibitor)-Behandlung	38
2.2.2 Retrograde arterielle Perfusion.....	39
2.2.3 Histologische Methoden	40
2.2.3.1 Einbettung in Paraffin	40
2.2.3.2 Anfertigung von Paraffinschnitten.....	40
2.2.3.3 Immunfluoreszenzfärbung	40
2.2.4 In situ-Hybridisierung mittels RNAscope®-Technik	42
2.2.5 Mikroskopie.....	44
2.2.5.1 Fluoreszenzmikroskopie	44
2.2.5.2 Lichtmikroskopie	44
2.2.6 Glomerulus-Präparation	45
2.2.6.1 Blockieren der Dynabeads	45

2.2.6.2	Isolierung der Glomeruli	46
2.2.7	Molekularbiologische Methoden	47
2.2.7.1	Bestimmung der mRNA-Expressionslevel.....	47
2.2.7.1.1	Isolierung von Gesamt-RNA.....	47
2.2.7.1.2	Quantifizierung der RNA.....	48
2.2.7.1.3	cDNA-Synthese	48
2.2.7.1.4	Quantitative Echtzeit-PCR.....	49
2.2.7.2	Bestimmung der Plasma-EPO-Konzentration	50
2.2.7.2.1	Blutentnahme	50
2.2.7.2.2	EPO-ELISA.....	50
2.2.8	Statistik	51
3	Ergebnisse.....	52
3.1	Erythropoietin-Produktion in PDGFR- β^+ - Zellen.....	52
3.1.1	HIF-2- abhängige induzierbare EPO-Expression in PDGFR- β^+ - Zellen der Niere.....	52
3.1.2	Zonale Verteilung der PDGFR- β^+ - / EPO-exprimierenden- Zellen in der Niere	55
3.1.3	PDGFR- β^+ - Zellen als einzige EPO-produzierende Zellen der Niere.....	60
3.1.4	Induzierbarkeit der EPO-Expression in PDGFR- β^+ - Zellen extrarenaler Organe	61
3.1.5	Lokalisation PDGFR- β^- / EPO-exprimierender- Zellen in der Nebenniere.....	63
3.1.6	Abstammung der PDGFR- β^+ - Zellen der Nieren aus der Neuralleiste?.....	64
3.1.7	Zusammenfassung	65
3.2	Induzierbarkeit der Erythropoietin-Produktion in Stroma-Vorläuferzellen	66
3.2.1	Spezifität der Cre-Rekombinase- Aktivität.....	66
3.2.2	HIF-2- abhängige induzierbare EPO-Expression in FoxD1 $^+$ - Stromavorläuferzellen.....	68
3.2.3	Lokalisation der EPO-exprimierenden Zellen in den Nieren von <i>FoxD1</i> $^{+/Cre}$ <i>Vhl</i> $^{fl/fl}$ - Mäusen	70
3.2.4	EPO-Expression in den Nebennieren von <i>FoxD1</i> $^{+/Cre}$ <i>Vhl</i> $^{fl/fl}$ - Mäusen.....	72
3.2.5	Zusammenfassung	73
3.3	Induzierbarkeit der Erythropoietin-Produktion in Renin-, Mesangial- und.....	74
vaskulären Glattmuskelzellen der adulten Niere	74	
3.3.1	Induzierbare Renin-zellspezifische Vhl-Deletion	74
3.3.1.1	Spezifität der Cre-Rekombinase- Expression	75
3.3.1.2	Induzierbarkeit der EPO-Expression in Renin-produzierenden Zellen.....	75
3.3.2	Induzierbare Mesangial-zellspezifische Vhl-Deletion	77
3.3.2.1	Spezifität der Cre-Rekombinase- Expression	77
3.3.2.2	Induzierbarkeit der EPO-Expression in Mesangialzellen	78
3.3.3	Induzierbare Glattmuskel-zellspezifische Vhl-Deletion	79
3.3.3.1	Spezifität der Cre-Rekombinase- Expression	79
3.3.3.2	Induzierbarkeit der EPO-Expression in vaskulären Glattmuskelzellen	81

3.3.3.3	Lokalisation EPO-exprimierender Zellen in SM-MHC ^{+/iCre} Vhl ^{f/f} - Nieren.....	83
3.3.4	Zusammenfassung	86
3.4	Hypoxie-induziertes Expressionsmuster.....	86
4	Diskussion.....	89
4.1	Erythropoietin-produzierende PDGFR- β^+ - Zellen.....	90
4.2	Erythropoietin-Produktion in renalen Stromavorläuferzellen	92
4.3	Erythropoietin-Produktion in Renin-, Mesangial- und vaskulären..... Glattmuskelzellen	94
4.4	Hypoxie-induziertes Expressionsmuster von HIF-2- Zielgenen.....	96
4.5	Ausblick.....	98
5	Zusammenfassung	100
6	Literaturverzeichnis	103
7	Anhang.....	114
7.1	Abkürzungsverzeichnis	114
7.2	Kongressbeiträge	117
7.3	Publikationen.....	118
7.4	Eidesstattliche Erklärung.....	119
8	Danksagung	120

1 Einleitung

1.1 Erythropoietin

1.1.1 Struktur, Expression und Funktionen

Erythropoietin (EPO) ist ein Glykoprotein-Hormon, das die Bildung und Reifung roter Blutkörperchen reguliert. Es gehört daher zur Zytokinfamilie der Hämatopoietine. EPO besteht aus 165 Aminosäuren und hat eine globuläre Struktur, die sich aus vier α -Helices zusammensetzt. Es weist ein Molekulargewicht von 30,4 kDa auf, wobei circa 40% davon auf seine starke Glykosylierung zurückzuführen sind. Dieser Kohlenhydratanteil sorgt für die *in vivo*-Stabilität des Hormons¹⁻⁵.

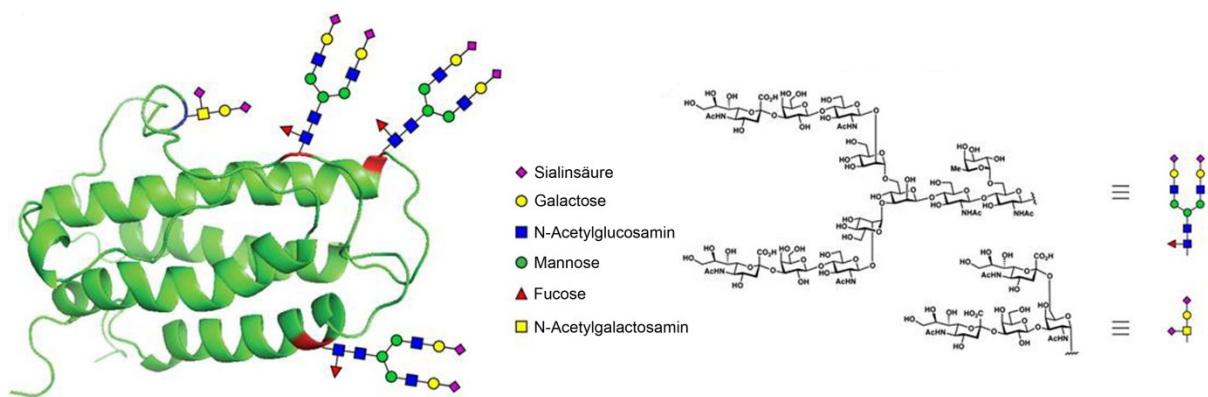


Abbildung 1.1: 3D-Schema der Proteinstruktur von Erythropoietin mit ausgewählten Oligosacchariden. Rechts ist die genaue Struktur der ausgewählten Glykane dargestellt. Abbildung modifiziert nach Brailsford und Danishefsky⁶.

Beim erwachsenen Menschen oder auch der adulten Maus wird EPO zu 85-90% in den Nieren produziert^{7, 8}. Während der Embryonalentwicklung findet die EPO-Synthese jedoch vorrangig in der Leber statt. EPO wird dort von Hepatozyten, die um die Zentralvene herum angeordnet sind, sowie von hepatischen Sternzellen, auch bekannt als ITO-Zellen, exprimiert. Der Zeitpunkt, an dem die Umstellung von Leber auf Niere stattfindet, ist je nach Spezies etwas unterschiedlich, erfolgt aber im Allgemeinen in der Spätphase der Schwangerschaft oder bei der Geburt^{1, 9, 10}. Die Regulation dieser zeit- und gewebespezifischen EPO-Expression ist nicht vollständig geklärt, scheint aber unter Beteiligung bestimmter Transkriptionsfaktoren der GATA-Familie zu erfolgen^{9, 11}. Unter bestimmten Umständen kann die Leber auch beim Erwachsenen noch EPO produzieren^{12, 13}. Dies reicht jedoch nicht aus, um einen Verlust des in der Niere produzierten EPOs zu kompensieren¹⁴. Da EPO nicht in den Zellen gespeichert wird, wird bei Bedarf die EPO-Gentranskription

erhöht und das gebildete Protein konstitutiv sezerniert^{15, 16}. Die basale EPO-Synthese kann dabei je nach Bedarf um einen Faktor von bis zu 1000 gesteigert werden^{10, 17}.

Die roten Blutkörperchen versorgen alle Gewebe und Organe des Körpers mit Sauerstoff. Da aber täglich circa 1% dieser Erythrozyten zugrunde gehen, ist eine kontinuierliche Erythropoiese nötig, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. EPO spielt dabei eine essentielle Rolle, indem es die Apoptose von erythroiden Vorläuferzellen im Knochenmark inhibiert und stattdessen deren Proliferation und Differenzierung zu Erythrozyten fördert^{10, 17, 18}. Kommt es auf Grund eines geringeren Sauerstoffpartialdrucks, zum Beispiel bei einem Aufenthalt in höheren Lagen, einer Anämie oder erhöhter Affinität von Hämoglobin für Sauerstoff, zu einer Beeinträchtigung der Sauerstoffversorgung des Gewebes, wird die Erythropoiese durch die Erhöhung der EPO-Produktion angeregt. Die Zunahme der Erythrozytenzahl und die damit einhergehende Steigerung des Sauerstofftransports führen anschließend im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus zu einer Reduktion der EPO-Produktion^{17, 19}. Die Tatsache, dass die Hypoxie-induzierte renale EPO-Synthese aber bereits abnimmt, bevor es zu einer Zunahme des Hämatokrits kommt, lässt darauf schließen, dass es zusätzlich einen oder mehrere intrinsische negative Feedback-Mechanismen gibt²⁰.

EPO-mRNA wird aber nicht nur von bestimmten Zellen der Nieren und der Leber exprimiert, sondern konnte auch im Herz, in der Lunge, in der Milz, im Knochenmark, in Osteoblasten, in Haarfollikeln, in Zellen der Reproduktionsorgane und in Neuronen, Astrozyten und Mikroglia im Gehirn nachgewiesen werden^{9, 19}. Ob die EPO-Expression dieser Zellen/Organe an der basalen Erythropoiese beteiligt ist, ist unklar. Eine Beteiligung an der Stress-induzierten Bildung roter Blutkörperchen ist allerdings möglich^{9, 21, 22}. Wahrscheinlicher ist jedoch eine lokale parakrine Wirkung zum Beispiel bei der Angiogenese, der Inhibition von Apoptose, der Mobilisierung von intrazellulärem Calcium oder bei der Zellteilung¹⁹. Außerdem gibt es Befunde zu kardio- und neuroprotektiven Wirkungen von EPO¹⁸.

Die Abbauprozesse, durch die zirkulierendes EPO aus dem Blut beseitigt wird, sind nicht vollständig geklärt. Vieles spricht jedoch dafür, dass EPO von Zellen, die EPO-Rezeptoren (EpoRs) besitzen, internalisiert und lysosomal abgebaut wird¹.

1.1.2 Regulation der EPO-Genexpression

Gewebehypoxie, also Unterversorgung des Gewebes mit Sauerstoff, führt zu einer massiven Stimulation der EPO-Genexpression¹⁷. Ausschlaggebend ist dabei der lokale Sauerstoffpartialdruck am Ort der EPO-Synthese^{10, 20}. Reguliert wird die Steigerung der Gentranskription durch den Hypoxie-induzierbaren Faktor 2 (HIF-2)^{9, 10, 12, 23-26}.

Die Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktoren bestehen aus zwei Untereinheiten, einer konstitutiv exprimierten β-Untereinheit (HIF-1β) und einer O₂-labilen α-Untereinheit, wobei drei verschiedene HIF-α- Isoformen (HIF-1α, HIF-2α und HIF-3α) existieren^{9, 23, 27}. Beide HIF-Untereinheiten sind Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktoren, die der Familie der PAS (PER-ARNT-SIM)-Transkriptionsfaktoren zugerechnet werden^{9, 10}.

Funktionell spielt sowohl HIF-1 als auch HIF-2 eine Rolle bei der Induktion der Hypoxie-Antwort einer Zelle, wobei sie zum Teil gleiche, jedoch häufig auch unterschiedliche Zielgene aktivieren^{28, 29}. HIF-1 ist zum Beispiel an der Regulation der anaeroben Glykolyse beteiligt, indem es die Expression von Glukosetransportern und glykolytischer Enzyme wie der Pyruvatdehydrogenase-Kinase 1 (PDK1), der Enolase 1 (ENO1) und der Lactat-Dehydrogenase 1 (LDHA) stimuliert³⁰⁻³², während HIF-2 die EPO-Synthese reguliert und den Eisenstoffwechsel über die Expression von DcytB (duodenales Cytochrom B) und DMT1 (divalenter Metallionen-Transporter 1) koordiniert^{9, 33, 34}. Für HIF-3 wird im Gegensatz dazu eher eine supprimierende Wirkung auf die Expression Hypoxie-induzierter Gene vermutet²⁷. Unterschiede zwischen HIF-1α und HIF-2α zeigen sich auch in deren Expressionsmuster. Während HIF-1α eher ubiquitär exprimiert wird, beschränkt sich die Expression von HIF-2α auf bestimmte Zelltypen, wie Endothelzellen, Kardiomyozyten, Hepatozyten, Gliazellen und renale interstitielle Zellen²⁹.

Unter normoxischen Bedingungen, also in Gegenwart von ausreichend O₂, werden die HIF-α- Untereinheiten kontinuierlich abgebaut. Voraussetzung dafür ist die Hydroxylierung von HIF-α an zwei spezifischen Prolinresten, die sich am C-Terminus in den O₂-abhängigen Degradationsdomänen befinden. Katalysiert wird diese Reaktion von drei Mitgliedern der 2-Oxoglutarat-abhängigen Oxygenasen, nämlich PHD1, PHD2 und PHD3 (Prolyl-4-Hydroxylase-Domäne (PHD)-enthaltende Proteine). Da diese Enzyme molekularen O₂ für die Hydroxylierung von HIF-α benötigen, erfüllen sie so die Funktion des O₂-Sensors⁹. Die hydroxylierte HIF-α- Untereinheit kann dann durch das von Hippel-Lindau (Vhl) Protein, der Substrat-Erkennungskomponente einer E3-Ubiquitin-Ligase, gebunden, ubiquityniert und somit dem proteasomalen Abbau zugeführt werden (s. Abb. 1.2 a)^{10, 23}. Sinkt der Sauerstoffpartialdruck im Gewebe und somit die Verfügbarkeit von O₂ in der Zelle, kann die HIF-α- Untereinheit nicht mehr hydroxyliert werden und entgeht somit ihrer Degradierung.

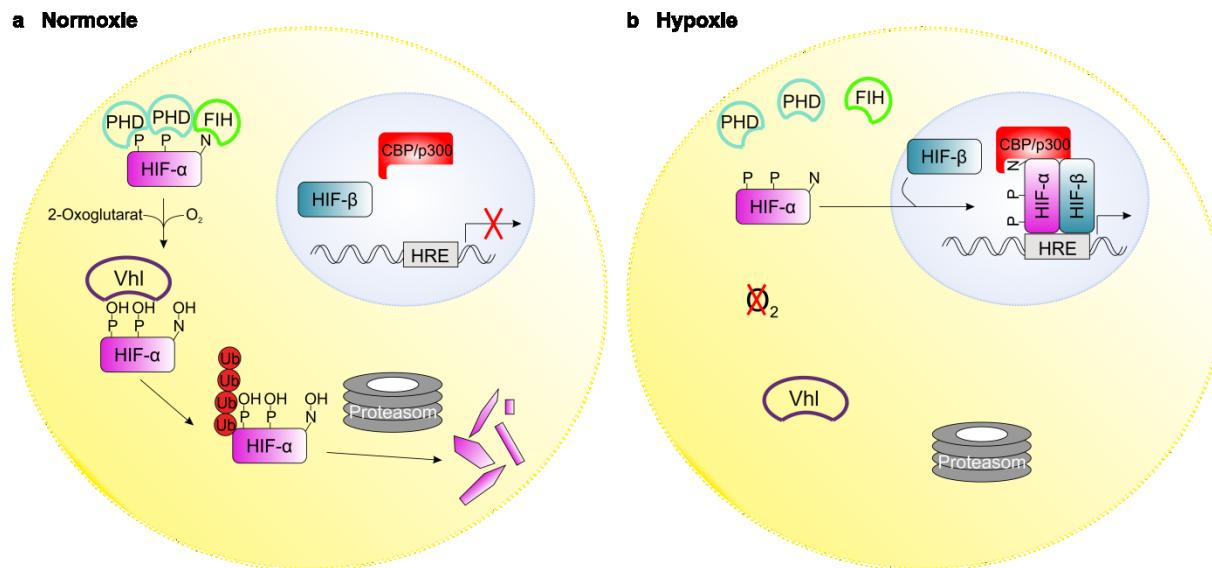


Abbildung 1.2: O₂-abhängige Regulation der Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIFs). (a) Unter normoxischen Bedingungen hydroxylieren Prolyl-4-Hydroxylase-Domäne (PHD)-enthaltende Proteine die HIF-α-Untereinheiten an spezifischen Prolinresten und der HIF-inhibierende Faktor (FIH) hydroxyliert HIF-α an einem spezifischen Asparaginrest. Die Prolylhdroxylierung ermöglicht es dem von Hippel-Lindau (Vhl) Protein, einer Komponente eines E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes, die HIF-α-Untereinheit zu erkennen und sie für den proteasomalen Abbau zu markieren. Die Hydroxylierung des Asparaginrestes verhindert die Interaktion zwischen der HIF-α-Untereinheit und den für die Transkription wichtigen Co-Aktivatoren CREB-bindendes Protein (CBP)/p300. (b) Unter hypoxischen Bedingungen kann HIF-α nicht hydroxyliert werden und entgeht dem proteasomalen Abbau. Es transloziert stattdessen in den Zellkern, dimerisiert dort mit der HIF-β-Untereinheit und kann an das Hypoxie-responsive Element (HRE) binden. Durch das Fehlen der Asparaginhydroxylierung können die transkriptionellen Co-Aktivatoren CBP/p300 binden. Abbildung modifiziert nach Lee und Percy²⁷.

Stattdessen transloziert HIF-α in den Zellkern und dimerisiert dort mit der HIF-1β-Untereinheit. Anschließend kann das HIF-Heterodimer an spezifische DNA-Konsensussequenzen binden und weitere für die Transkription wichtige Cofaktoren wie p300 und CBP (cAMP response element-binding protein)-bindendes Protein rekrutieren (s. Abb. 1.2 b)²⁸. Die sogenannten *hypoxia-response elements* (HREs) finden sich bei zahlreichen O₂-sensitiven Genen⁹. Das EPO-Gen besitzt zwei verschiedene HREs. Das HRE, welches für die Hypoxie-Induzierbarkeit in der Niere verantwortlich ist, befindet sich in der 5'-Region vor dem EPO-Gen im sogenannten Nieren-induzierbaren Element, während das HRE, welches die Hypoxie-Induzierbarkeit in der Leber reguliert, in der 3'-Region hinter dem EPO-Gen im sogenannten Leber-induzierbaren Element liegt¹⁷.

Die transkriptionelle Aktivität von HIF kann des Weiteren auch durch die Hydroxylierung eines spezifischen Asparaginrests der HIF-α-Untereinheit inhibiert werden, wodurch die Bindung der Co-Aktivatoren p300 und CBP verhindert wird. Verantwortlich dafür ist eine weitere 2-Oxoglutarat-abhängige Oxygenase, der sogenannte HIF-inhibierende Faktor (FIH, *factor inhibiting HIF*) (s. Abb. 1.2 a)^{9, 20, 23}.

Regulierende Wirkung hat außerdem der Transkriptionsfaktor GATA-2, der die Aktivität des EPO-Promotors unter Normoxie einschränkt²³. GATA-2 sorgt zudem für eine Gewebe-

spezifische EPO-Expression, indem es konstitutiv ektopische EPO-Gen-Aktivität unterdrückt¹³. Abgesehen von GATA-2 konnte auch für den Transkriptionsfaktor NF-κB eine inhibierende Wirkung auf den EPO-Promotor nachgewiesen werden. Diese kommt vor allem während inflammatorischer Erkrankungen zum Tragen^{35, 36}.

Noch deutlicher wird die Komplexität der EPO-Genregulation unter Berücksichtigung der Befunde, dass HIF die Expression von PHD3 stimuliert^{20, 37, 38}. Diese Hypoxie-abhängige Regulation von PHD3 spielt möglicherweise eine Rolle für die intrinsische Feedback-Kontrolle der EPO-Synthese²⁰. Die Halbwertszeit von PHD1 und PHD3 wird zudem Hypoxie-abhängig von Siah-Proteinen, E3-Ubiquitin-Ligasen, kontrolliert, deren Expression wiederum unter Hypoxie zunimmt^{9, 27, 39, 40}.

Fehlregulationen der HIF-EPO-Achse können zu einer unphysiologisch erhöhten Anzahl roter Blutkörperchen auf Grund stark erhöhter EPO-Gen-Expression führen (sekundäre Erythrozytose). Ursache solcher Fehlregulationen sind oftmals Punktmutationen in den Genen spezieller Mitglieder des HIF-Signalweges, wie zum Beispiel der Gene Vhl, PHD2 oder HIF-2α²⁹. Die erste Mutation, die in diesem Zusammenhang beschrieben wurde, war eine homozygote Punktmutation im Vhl-Gen, die zu einer verringerten Affinität von Vhl für die hydroxylierte HIF-α- Untereinheit führt. Entdeckt wurde sie bei mehreren Mitgliedern von insgesamt 81 Familien, die in der Chuvash-Region in Russland leben^{27, 29}.

1.1.3 Mechanismus der EPO-Wirkung

Eine der wichtigsten Funktionen von EPO ist die Erhaltung und Proliferation erythroider Vorläuferzellen im Knochenmark, um letztendlich die O₂-Versorgung des Körpers zu gewährleisten. Dabei sorgt das in geringer Konzentration im Blut zirkulierende EPO dafür, dass ein kleiner Teil der Erythrozyten-Vorläuferzellen überlebt und weiter proliferiert, während der Großteil dieser Zellen den programmierten Zelltod stirbt, um einen Überschuss an roten Blutkörperchen zu vermeiden. EPO wirkt dabei sowohl auf BFU (burst forming unit)-Erythroide als auch auf die reiferen Vorläuferzellen des Typs CFU (colony forming unit)-Erythroide, die sich aus den BFU-Erythroiden entwickeln, anti-apoptotisch und proliferativ, so dass über weitere Zellteilungs- und Reifungsschritte schließlich neue Erythrozyten gebildet werden (s. Abb. 1.3). Da CFU-Erythroide eine große Anzahl an EPO-Rezeptoren (EpoRs) auf ihrer Zelloberfläche tragen, sind diese besonders EPO-sensitiv¹.

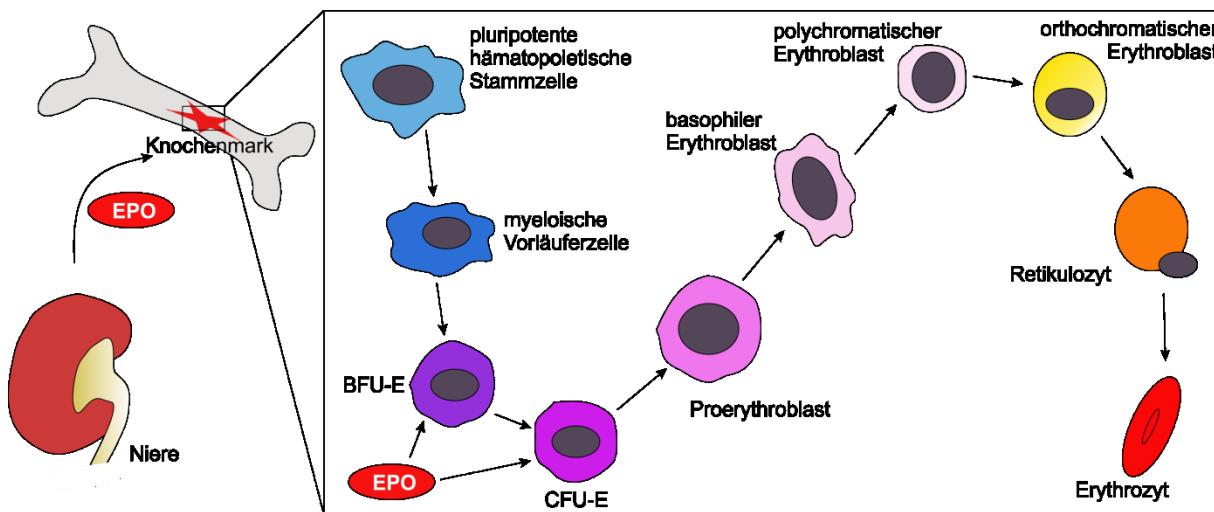


Abbildung 1.3: Vereinfachtes Schema der Erythropoiese. Im roten Knochenmark entstehen aus den pluripotenten Stammzellen myeloische Vorläuferzellen. Diese entwickeln sich wiederum zu BFU-Es (*burst forming unit*-Erythroide) und CFU-Es (*colony forming unit*-Erythroide). Das hauptsächlich in der Niere produzierte EPO wirkt dabei sowohl auf die BFU-Es, als auch auf die CFU-Es anti-apoptotisch und proliferativ. Die CFU-Es differenzieren schließlich über mehrere Schritte zu reifen Erythrozyten. Abbildung modifiziert nach Sinclair⁴¹ und Nichols et al.⁴².

Der EpoR ist ein Glykoprotein aus der Superfamilie der Zytokin-Klasse I- Rezeptoren. Er besteht aus 484 Aminosäuren, die sich auf eine einzelne hydrophobe Transmembrandomäne, eine zytoplasmatische und eine extrazelluläre Domäne aufteilen¹. In letzterer finden sich konservierte Cysteinreste und ein „WSXWS“-Motiv, welches für die Ligand-Bindung, die Signaltransduktion und die Internalisierung des Rezeptor-Ligand-Komplexes von Bedeutung ist⁴³.

Die EPO-Bindung an ein EpoR-Molekül hat die Dimerisierung zweier EpoRs und eine damit einhergehende Konformationsänderung zur Folge (s. Abb. 1.4)⁴⁴. Die Affinität von EPO für die Rezeptorbindung ist vom Kohlenhydratanteil von EPO abhängig, je höher der Glykosylierungsgrad, desto geringer ist seine Affinität¹. An die zytoplasmatischen Domänen des EpoR-Dimers ist konstitutiv jeweils eine Janus-Kinase 2 (JAK2) gebunden. Die Konformationsänderung, welche durch die Ligand-Bindung an den EpoR induziert wird, bewirkt mittels Autophosphorylierung die Aktivierung dieser Tyrosinkinasen, die dann ihrerseits verschiedene Tyrosinreste des EPO-Rezeptors phosphorylieren. Dadurch entstehen Bindestellen für Signalkaskaden mit Phosphotyrosin-Bindemotiv. Außerdem können die JAK2-Kinasen auch weitere Signalmoleküle phosphorylieren und so aktivieren⁴³. Eine der wichtigsten Signalkaskaden, die über den EpoR aktiviert wird, ist der JAK2/STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5)-Signalweg. STAT5 vermittelt anti-apoptotische Effekte und ist so essentiell für die Regulation der Erythrozytenbildung. Mäuse mit STAT5-Deletion leiden im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen an einer schweren Anämie⁴⁴. Weitere Proteine, die auf Grund der EpoR-Aktivierung phosphoryliert werden und für die

Erythropoiese wichtig sind, sind unter anderem die Proteinkinase C (PKC), die Phosphoinositid-3-Kinase (PI-3K), die Proteinkinase B (AKT), sowie die MAP-Kinase-Kinasen (MEK1/2) und die MAP-Kinasen (ERK1/2)^{1, 45}. Welche Rolle die verschiedenen Signalproteine im Hinblick auf Überleben, Proliferation und Differenzierung der erythroiden Progenitorzellen im Einzelnen spielen, ist nicht vollständig geklärt¹.

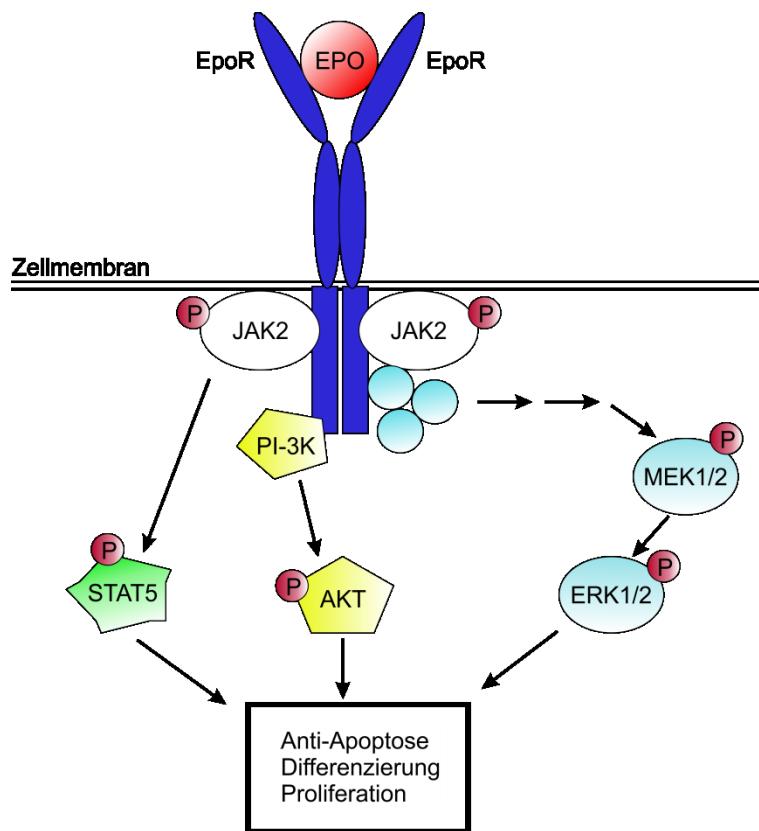


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Signalwege, die durch den EPO-Rezeptor in erythroiden Progenitorzellen nach Bindung von EPO aktiviert werden. Bei Bindung von EPO an ein lose vorgeformtes EpoR-Dimer kommt es zu einer Konformationsänderung, welche die Autophosphorylierung der Janus Kinasen 2 (JAK2) stimuliert. JAK2 ist an die intrazelluläre Domäne des EpoR gebunden und phosphoryliert ihrerseits Tyrosinreste an der Intrazellulardomäne des EpoR. Diese dienen als Bindestellen für verschiedene intrazelluläre Signalmoleküle wie zum Beispiel den Transkriptionsfaktor STAT5 (*signal transducer and activator of transcription 5*). Die Aktivierung zytoplasmatischer Signalproteine wie STAT5, AKT (Proteinkinase B) und ERK1/2 (MAP-Kinasen) vermittelt dann eine anti-apoptotische Wirkung oder führt zu Zellproliferation und -differenzierung. PI-3K Phosphoinositid-3-Kinase. MEK1/2 MAP-Kinase-Kinasen. Abbildung modifiziert nach Aapro et al.⁴⁵.

Beendet wird die Wirkung von EPO durch die Internalisierung des EPO/EpoR-Komplexes nach Dephosphylierung von JAK2. Vermittelt wird dieser Schritt über die hämatopoietische Zellphosphatase (HCP)¹.

Obwohl ursprünglich eine rein hämatopoietische Wirkung von EPO angenommen wurde, mehren sich mittlerweile die Befunde für ein breiteres Wirkspektrum. So wird der EpoR auch in anderen Geweben/Zellen wie zum Beispiel Gehirn, Niere, Plazenta, Nebennierenrinde, Endothelzellen, Makrophagen und einigen Krebsarten exprimiert⁴³.

1.2 Die Niere

Die Nieren sind paarig angelegte Organe, die retroperitoneal im Abdomen liegen und eine zentrale Rolle bei vielen lebensnotwendigen Prozessen im Körper spielen. Zu ihren wichtigsten Aufgaben zählen die Aufrechterhaltung des Wasser- und Elektrolythaushalts sowie der Säure-/Basen-Homöostase, die Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen wie Harnstoff oder Kreatinin, die Blutdruckregulation über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) und die Bildung von Hormonen wie Calcitriol, Klotho, Renin und Erythropoietin. Außerdem erfüllen die Nieren auch einige metabolische Funktionen, wie zum Beispiel Gluconeogenese oder den Abbau von Peptidhormonen.

1.2.1 Struktur der Niere

Makroskopisch betrachtet besteht die Niere aus Cortex, Medulla und Papille (innere Medulla) und ist von einer Bindegewebshülle umgeben. Die funktionelle Einheit der Niere ist das Nephron. Bei der Maus finden sich pro Niere etwa 12 000 bis 16 000 Nephrene, beim Menschen sind es im Durchschnitt circa 1 000 000⁴⁶. Das Nephron beginnt mit dem Glomerulus, der renalen Filtrationseinheit, woran sich das Tubulussystem bestehend aus proximalem Tubulus, Henleschleife und distalem Tubulus anschließt. Der Verbindungs-tubulus verbindet den distalen Abschnitt des Nephrons mit dem Sammelrohrsystem, welches in das Nierenbecken mündet. Von dort kann der gebildete Harn über den Ureter abfließen.

Der Glomerulus besteht aus dem Kapillarknäuel mit afferenter und efferenter Arteriole und ist umgeben von der sogenannten Bowman-Kapsel (vgl. Abb. 1.5). Der glomeruläre Filter setzt sich aus drei Schichten zusammen, den fenestrierten Endothelzellen der Kapillarschlingen, der Basalmembran und der Schlitzmembran, die zwischen den Fußfortsätzen der Podozyten ausgebildet wird⁴⁶. Intraglomeruläre Mesangialzellen unterstützen die Kapillarschlingen strukturell und können durch ihre Kontraktilität den intraglomerulären Kapillarfluss und die Oberfläche des Filters regulieren und so die glomeruläre Filtrationsrate eines einzelnen Nephrons verändern⁴⁷. In unmittelbarer Nähe zum vaskulären Pol des Glomerulus befindet sich zudem der juxtaglomeruläre Apparat (JGA) bestehend aus den juxtaglomerulären Renin-produzierenden Zellen, den spezialisierten Macula-densa- Zellen des distalen Tubulus und extraglomerulären Mesangialzellen. Der JGA dient der Anpassung der glomerulären Filtrationsrate an den Salzgehalt des frühdistalen Tubulusharns. Außerdem können die Macula-densa- Zellen die Aktivität des RAAS modifizieren⁴⁸. Renin, das Schlüsselenzym des RAAS, welches den Blutdruck und den Wasser-Elektrolyt- Haushalt reguliert, wird von den

juxtaglomerulären Zellen gebildet, in intrazellulären Vesikeln gespeichert und bei Bedarf sezerniert³⁶.

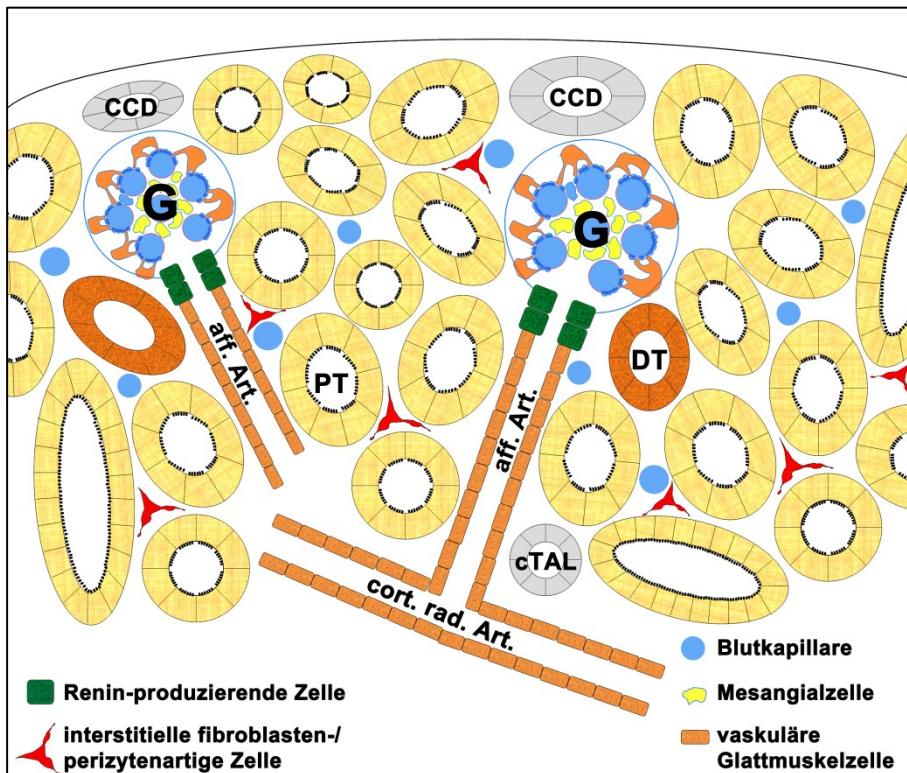


Abbildung 1. 5: Schematischer kortikaler Nierenquerschnitt. Dargestellt sind vereinfacht Glomeruli inklusive afferenter Arteriolen mit Kapillarschlingen, Podozyten und intraglomerulärem Mesangium. Sie sind umgeben von den verschiedenen Tubulusstrukturen. Die Renin-produzierenden Zellen bilden zusammen mit spezialisierten Zellen des distalen Tubulus und extraglomerulären Mesangialzellen den juxtaglomerulären Apparat. Im Interstitialraum zwischen den Tubuli finden sich zahlreiche Kapillaren und interstitielle fibroblastenartige Zellen, die zum Teil EPO exprimieren. G Glomerulus, aff. Art. afferente Arteriole, cort. rad. Art. kortikale radiäre Arteriole, PT proximaler Tubulus, DT distaler Tubulus, CCD kortikales Sammelrohr (*cortical collecting duct*), cTAL kortikaler dicker aufsteigender Ast der Henleschleife (*cortical thick ascending limb*). Abbildung modifiziert nach Kurt und Kurtz³⁶.

Der interstitielle Raum zwischen den Tubuli ist einerseits durchzogen von einem dichten Kapillarnetz, andererseits finden sich dort die interstitiellen Fibroblasten und Perizyten⁴⁶. Perizyten sind definitionsgemäß Zellen, die den Endothelzellen von Blutkapillaren direkt aufliegen und diese mit langen vom Zellkörper expandierenden Fortsätzen umschließen^{49, 50}. Dabei teilen sie sich eine gemeinsame Basalmembran mit den Endothelzellen und bilden Verbindungen mit diesen aus⁵¹. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Angiogenese und der Regulation der Stabilität und Permeabilität von Blutgefäßen⁵². Interstitielle Fibroblasten sind als nicht-epithiale, nicht-vaskuläre und nicht-inflammatorische Zellen des Interstitiums definiert^{53, 54}, die im peritubulären perivaskulären Raum lokalisiert sind⁵⁵. Sie sind wie die Perizyten verzweigt und zum Teil ebenfalls mit Blutkapillaren assoziiert^{55, 56}. Sie synthetisieren unter anderem Kollagen, Fibronectin und Proteoglykane für den Aufbau der

extrazellulären Matrix⁵⁷. Auf Grund der perivaskulären Lage von Perizyten und Fibroblasten und der Expression vieler identischer Zellmarker, wie CD73 und PDGFR-β sind Perizyten und interstitielle Fibroblasten oftmals nur schwer zu unterscheiden^{49-51, 58}.

Eine Gruppe dieser interstitiellen fibroblasten-/perizytenartigen Zellen ist die Quelle von renalem EPO^{54, 59, 60}.

1.2.2 Renale EPO-produzierende Zellen

Bereits 1957 konnten Jacobson und seine Kollegen an nephrektomierten Ratten zeigen, dass beim Erwachsenen die Nieren der Hauptsyntheseort von EPO sind^{9, 61}. Der renale Zelltyp, der für die EPO-Produktion verantwortlich ist, war jedoch lange Zeit unbekannt. Heutzutage gelten peritubuläre nicht-endotheliale interstitielle Zellen als physiologische Quelle von EPO^{13, 24, 59, 60, 62}, obwohl auch einige Befunde diskutiert werden, denen zu Folge EPO von tubulären Epithelzellen oder peritubulären Endothelzellen gebildet wird⁶³⁻⁶⁸.

Die EPO-produzierenden Zellen finden sich unter normoxischen Bedingungen im Interstitium des juxtamedullären Bereichs des Cortex sowie der äußeren Medulla (s. Abb. 1.6 A)^{16, 68}. Bei Hypoxie reagiert die Niere auf den erhöhten EPO-Bedarf nicht durch Steigerung der Expressionsrate der basal vorhandenen Zellen, sondern mit einer Erhöhung der Anzahl EPO-produzierender Zellen^{13, 68, 69}. Ein solches Phänomen ist auch im Zusammenhang mit der Rekrutierung Renin-exprimierender Zellen bekannt^{36, 70}. Die Rekrutierung zusätzlicher EPO-Zellen erfolgt mit zunehmendem Stimulus ausgehend von der kortiko-medullären Grenze bis hin zum äußeren Rand des Cortex (s. Abb. 1.6 B). Bei besonders starker Stimulation, zum Beispiel bei schwerer Anämie, finden sich einzelne EPO-produzierende Zellen auch im inneren Streifen der äußeren Medulla. Obwohl die innere Medulla/Papille die sauerstoffärmste Region der Niere ist, konnte dort bisher keine EPO-Produktion nachgewiesen werden^{60, 69, 71}. Ob die Rekrutierung EPO-exprimierender Zellen auf eine Zellneubildung, eine Umwandlung existierender Zellen oder auf ein Anschalten der EPO-Genexpression in bereits existierenden, aber ruhenden Zellen zurückzuführen ist, ist unklar³⁶. Auf Grund der Tatsache, dass eine Rekrutierung EPO-bildender Zellen bereits innerhalb weniger Stunden nach akuter Hypoxie oder pharmazeutischer PHD-Inhibition auftritt, scheint eine Neubildung EPO-produzierender Zellen jedoch wenig wahrscheinlich^{24, 36, 69}.

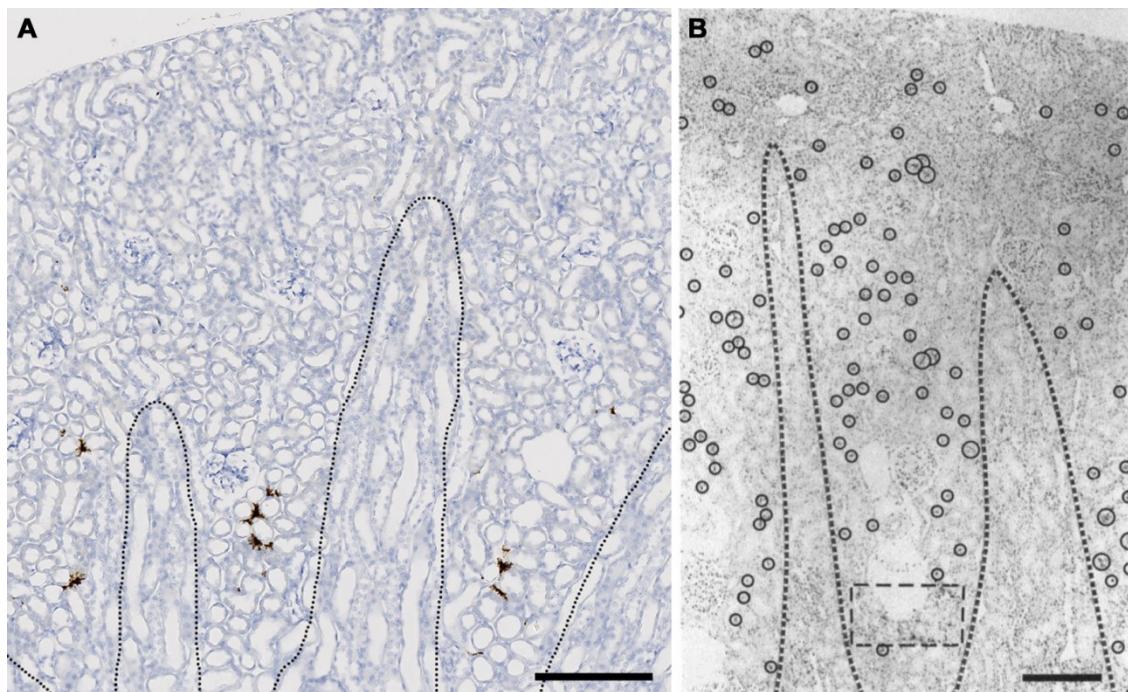


Abbildung 1.6: Verteilung EPO-produzierender Zellen in Normoxie (A) und Hypoxie (B). (A) zeigt die Verteilung EPO-exprimierender Zellen (braunes Signal) unter Normoxie anhand einer EPO-mRNA *in situ*-Hybridisierung mittels RNAscope® Assay in einer Wildtyp-Mausniere. (B) zeigt die Verteilung EPO-exprimierender Zellen (hervorgehoben durch Kreise) unter Hypoxie (7,5% O₂ für 32 Stunden) anhand einer EPO-mRNA *in situ*-Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden in einer Rattenniere. Die gestrichelten Linien markieren Markstrahlen. Maßstab: 200µm. (B) modifiziert nach Eckardt et al.⁵⁹.

Erste Hinweise auf die genaue Identität der interstitiellen EPO-exprimierenden Zellen lieferten Bachmann et al., sowie Maxwell et al. anhand von Co-Lokalisationsstudien. Beide Gruppen konnten direkt oder indirekt eine überlappende Expression von EPO und Ecto-5'-Nucleotidase (CD73) nachweisen und so interstitielle fibroblastenartige Zellen als den EPO-produzierenden Zelltyp der Niere identifizieren^{59, 60, 72}. Später konnte zudem eine Co-Lokalisation von EPO und HIF-2α in juxtamedullären kortikalen Fibroblasten nachgewiesen werden²⁴. EPO-exprimierende Zellen haben einen länglichen Zellkörper mit einigen Fortsätzen, die eine Art Netzwerk um benachbarte Tubuli und Kapillaren bilden^{59, 62}. Als weiteren Marker exprimieren die renalen EPO-produzierenden Zellen auch den Fibroblasten-/Perzytenmarker PDGFR-β (*platelet-derived growth factor receptor β*). Jedoch scheinen sie im Hinblick auf die Expression ihrer Marker eine inhomogene Zellpopulation darzustellen, da Cofärbungen darauf hindeuten, dass circa 63% der EPO-Zellen CD73 coexprimieren, während nur 50% dieser Zellen PDGFR-β als Marker besitzen⁶². Obara und Kollegen nutzten für die Charakterisierung EPO-exprimierender Zellen ein Mausmodell, welches unter Kontrolle der EPO-regulatorischen Sequenzen grün-fluoreszierendes Protein (GFP) exprimiert. Die GFP-positiven interstitiellen Zellen zeigten ein sternförmiges Aussehen mit langen vom Zellkörper expandierenden Fortsätzen. Außerdem waren sie zusätzlich zu CD73

auch positiv für Neuronen-spezifische Marker wie NFL (Neurofilament Protein leichtes Polypeptid) und MAP2 (Mikrotubulus-assoziiertes Protein 2)¹³.

Die Ursache für die Heterogenität der renalen EPO-produzierenden Zellen liegt möglicherweise in ihrer Entwicklung begründet. Eine Studie mit *Myelin-Protein 0 (P0)-Cre* transgenen Mäusen postuliert die Neuralleiste als den Ursprung EPO-exprimierender Zellen der Niere⁷³. Andere Befunde zeigen hingegen, dass die EPO-produzierenden Zellen von FoxD1⁺-Zellen abstammen, also von der Zellpopulation, aus der sich die Stromazellen der Niere entwickeln^{74, 75}.

Unzureichende renale EPO-Produktion und daraus resultierende Anämie sind ein großes Problem, unter dem Patienten mit chronischer Nierenkrankheit (CKD, *chronic kidney disease*) häufig leiden^{36, 73, 76-78}. Bei CKDs kommt es auf Grund anhaltender Entzündungsreaktionen zur Proliferation von Fibroblasten und zur fortschreitenden Entwicklung von Myofibroblasten, was zu Nierenfibrose und letztlich zum Nierenversagen führt^{73, 79, 80}. Gleichzeitig nimmt die Zahl EPO-exprimierender Zellen und somit die EPO-Produktion in der Niere ab³⁶. Die Herkunft der Myofibroblasten und Ursachen, welche für die mangelnde EPO-Synthese verantwortlich sind, sind seit langem Gegenstand intensiver Forschung. Essentiell für ein besseres Verständnis des Zusammenhangs zwischen CKD und defizitärer EPO-Produktion ist dabei eine noch detailliertere Klärung des kontrovers diskutierten Ursprungs und der Identität EPO-exprimierender Zellen⁷³. Vor kurzem konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass sich CD73- und PDGFR-β-exprimierende EPO-produzierende Zellen während Fibrose in Myofibroblasten umwandeln können. Nach der Transformation in Myofibroblasten verlieren sie jedoch die Fähigkeit, EPO zu bilden⁸¹. Interessanterweise führt jedoch die Verabreichung pharmakologischer PHD-Inhibitoren nicht nur unter Kontrollbedingungen, sondern auch bei Patienten, die an renaler Anämie leiden, zur Stabilisierung von HIF-2 und somit zur Stimulierung der EPO-Expression^{24, 82}, was auf ungenutzte Reserven für die EPO-Expression hindeuten könnte^{36, 83, 84}. Ob es sich bei den Reservezellen um noch nicht transformierte native EPO-Zellen handelt, oder um andere Zelltypen, die bisher nicht mit der EPO-Produktion in Verbindung gebracht worden sind, ist unklar. Letzteres scheint jedoch im Hinblick auf frühere Befunde möglich zu sein. Kurt et al. konnten zeigen, dass die HIF-2-Aktivierung in der Reninzelllinie während der Embryonalentwicklung zu einer EPO-Expression an juxtaglomerulärer Position führt⁸⁵.

1.2.3 Renale FoxD1⁺- Stromaprogenitorzellen und ihre Deszendenten

Die Entwicklung der metanephrischen Niere ist das Resultat multipler wechselseitiger Interaktionen dreier größerer Zellverbände: der Ureterknospen, des metanephrischen Mesenchyms und der Stromavorläuferzellen^{54, 86-88}. Jede dieser Progenitorzellpopulationen ist dabei von einem spezifischen Transkriptionsfaktor abhängig. Die Ureterknospe entwickelt sich aus Homeobox-Protein- B7⁺ (HoxB7⁺)-Progenitorzellen. Das metanephrische Mesenchym ist charakterisiert durch die Expression des Homeobox Proteins Six2 und die Stromavorläuferzellen durch den Transkriptionsfaktor FoxD1 (*forkhead box D1*) (vgl. Abb. 1.7)^{51, 54, 58, 87-89}.

Bei der Maus beginnt die renale Entwicklung etwa an Embryonaltag 10.5 mit dem Auswachsen der Ureterknospe aus dem Wolff'schen Gang in das umgebende metanephrische Mesenchym. Der Kontakt zwischen Ureterknospe und metanephrischem Mesenchym induziert reziprok mehrere Zyklen dichotomer Teilungen der Ureterknospe und der Anlage von Nephronen. Die durch sukzessive Teilung neu entstehenden Ureterknospen entwickeln sich durch Elongation und Differenzierung letztendlich zum Sammelrohrsystem. Das Six2⁺-metanephrische Mesenchym kondensiert als Kappenmesenchym um die neuen Ureterknospen. Mittels Mesenchym-zu-Epithel-Transition (MET) kommt es dann zur Ausbildung der sogenannten Nierenvesikel, aus denen die Epithelzellen des gesamten Nephrons vom proximalen Glomerulus bis zum distalen Verbindungstubulus entstehen^{54, 88, 90, 91}. Um die Ureterknospen und das Six2⁺-Mesenchym herum befindet sich eine Schicht mesenchymaler FoxD1⁺-Stromavorläuferzellen⁵⁴. Aus diesen entwickeln sich interstitielle Fibroblasten und Perizyten, vaskuläre Glattmuskelzellen, Renin- und Mesangialzellen sowie die Nierenkapsel^{46, 51, 54}. Insgesamt gesehen verläuft die Nierenentwicklung in sukzessiven Wellen, wobei reife Nephrone juxtamedullär zu finden sind, während die Neuinduktion von Nephronen im äußeren Cortex stattfindet⁵⁴.

Während die molekularen Mechanismen, die für die Entwicklung des Sammelrohrsysteins und der Nephrone von Bedeutung sind, sehr gut untersucht sind, wurde den Stromavorläuferzellen lange nur eine unterstützende Rolle zugeschrieben. Neuere Studien konnten jedoch zeigen, dass die sich entwickelnden Stromazellen essentiell zur Entwicklung der metanephrischen Niere beitragen^{54, 86, 87}. Gezielte Deletion des FoxD1-Gens führt zu kleineren und häufig deformierten Nieren (Hufeisennieren) mit reduzierter Ureterknospung und Nephronzahl. Außerdem kommt es zur Fehlbildung der Nierenkapsel und einer Fehlstrukturierung der nephrogenen Zone^{86, 87, 92}. Vergleichbare Ergebnisse erzielten Hum et al. in Nieren, in denen sie statt des FoxD1-Gens gezielt FoxD1⁺-Zellen zerstörten⁹². Wichtig für eine intakte Nephrogenese scheinen jedoch nicht die FoxD1⁺-Zellen an sich, sondern

FoxD1-regulierte Gene zu sein^{86, 92}. Die Herunterregulation der Decorin-Expression scheint in diesem Zusammenhang von besonderer Bedeutung zu sein⁹³.

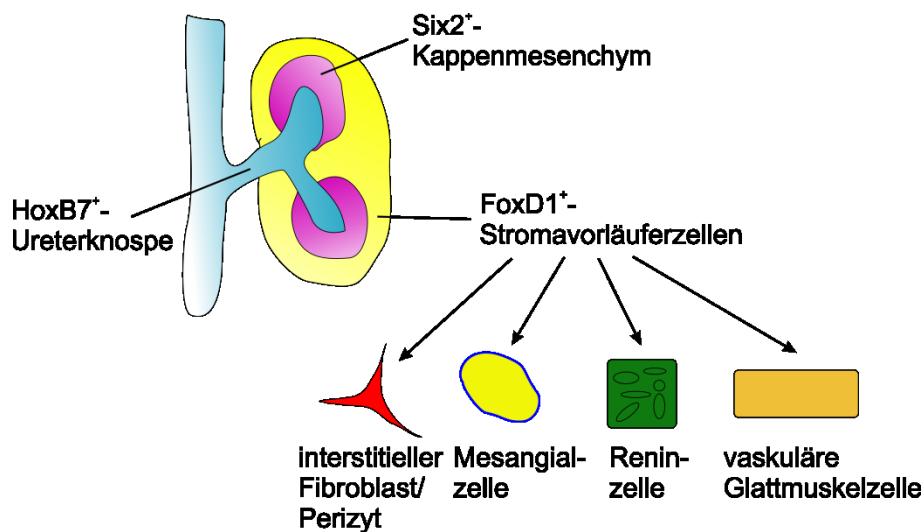


Abbildung 1. 7: FoxD1⁺-Stromavorläuferzellpopulation und ihre Nachkommen. Die metanephrische Niere entwickelt sich aus drei größeren Zellpopulationen, der HoxB7⁺-Ureterknospe, dem Six2⁺-metanephrischen Mesenchym und den FoxD1⁺-Stromavormesenchym-Zellen. Aus den Stromavorläuferzellen entwickeln sich die interstitiellen fibroblasten-/perizytenartigen Zellen, intra- und extraglomeruläre Mesangialzellen, Reninproduzierende Zellen und vaskuläre Glattmuskelzellen.

Die genaue Entwicklung der FoxD1⁺-Stromavorläuferzellen zu ausdifferenzierten reifen Zellen in der adulten Niere ist nicht vollständig geklärt. Die Expression des Transkriptionsfaktors FoxD1 ist ab Embryonaltag 11.5 in den Stromavormesenchym-Zellen nachweisbar, nimmt jedoch mit fortschreitender Entwicklung ab und ist drei Tage *post partum* kaum mehr detektierbar⁵⁴. Während der Nierenentwicklung integrieren sich die Stromavorläuferzellen Hox10-abhängig in die Räume zwischen den verzweigten Ureterknospen und die induzierten Nephrone⁹⁴. Außerdem legen sie sich als Kapsel um die Niere^{54, 86}. Welche Zellen sich von FoxD1⁺-Progenitorzellen ableiten, konnte anhand verschiedener Abstammungsstudien gezeigt werden. Dabei wurden verschiedene Reporter-Mauslinien verwendet, um FoxD1⁺-Zellen und deren Nachkommen dauerhaft zu markieren. Humphreys et al. zeigten anhand von LacZ-Färbungen, dass sich die Mesangialzellen, vaskulären Glattmuskelzellen und interstitiellen Fibroblasten/Perizyten der adulten Niere von FoxD1⁺-Zellen ableiten⁵⁸. Ähnliche Ergebnisse erzielten Kobayashi et al., die kortikale und medulläre interstitielle Fibroblasten, Perizyten und Mesangialzellen den FoxD1⁺-Stromavorläuferzellen zuordnen konnten⁸⁸. Sequeira-Lopez et al. konnten zudem die Abstammung Renin-exprimierender Zellen aus der Stromavormesenchym-Zelllinie nachweisen (s. Abb. 1.7)⁹⁵.

1.3 Zielsetzung

Die Identität renaler EPO-produzierender Zellen war lange Zeit unklar. Mittlerweile herrscht jedoch Einigkeit darüber, dass es sich bei den nativen EPO-produzierenden Zellen der Niere um interstitielle fibroblastenartige Zellen handelt, die unter normoxischen Bedingungen clusterartig an der Grenze zwischen innerem Cortex und äußerer Medulla angesiedelt sind und klassische Fibroblasten-/Perizyten-Marker wie PDGFR- β und CD73 exprimieren. Immunhistochemische Colokalisationsstudien deuten jedoch darauf hin, dass es sich bei den renalen EPO-bildenden Zellen um eine heterogene Zellpopulation handelt, da sie teils nur PDGFR- β , teils nur CD73 als Marker exprimieren.

Da PDGFR- β^+ -Zellen sehr zahlreich in allen Nierenzonen vorkommen, jedoch nur ein Teil dieser Zellen zur EPO-Produktion beizutragen scheint, soll im ersten Teil dieser Arbeit geklärt werden, welchen quantitativen Beitrag die PDGFR- β^+ -Zellen zur renalen EPO-Produktion leisten. Zur Beantwortung dieser Frage dienen Mäuse, bei denen gezielt in PDGFR- β -exprimierenden Zellen die HIF- α -Untereinheiten durch Deletion des von Hippel-Lindau Proteins, einem Schlüsselprotein des Hypoxie-Signalwegs, induzierbar stabilisiert werden können ($PDGFR-\beta^{+/iCre} Vhl^{fl/fl}$ -Mäuse). Anhand dieses Modells soll mittels *in situ*-Hybridisierung und immunhistochemischer Methoden auch die renale Verteilung der EPO-/PDGFR- β -exprimierenden Zellen untersucht werden. Weiterhin soll die Bedeutung von HIF-2, dem Hauptregulator der EPO-Produktion, für die Expression von EPO in diesen Zellen mittels Codeletion von Vhl mit HIF-2 α analysiert werden. Da PDGFR- β^+ -Zellen nicht nur in der Niere, sondern auch in vielen anderen Organen sehr häufig vorkommen, soll außerdem durch ein Organscreening geklärt werden, ob die PDGFR- β^+ -Zellen in anderen Organen prinzipiell auch in der Lage sind, EPO zu exprimieren, ihnen jedoch unter physiologischen Bedingungen der Stimulus fehlt, dies zu tun. Strittig ist auch die Herkunft dieser Zellen, weshalb geklärt werden soll, ob sich die PDGFR- β^+ -Zellen aus der Neuralleiste ableiten, worauf einige Befunde hindeuten.

Da andere Befunde hingegen für eine Abstammung der PDGFR- β^+ -Zellen aus der FoxD1 $^+$ -Stromavorläuferzellpopulation sprechen, soll im zweiten Teil dieser Arbeit geklärt werden, welche Auswirkungen eine Vhl-Deletion in FoxD1 $^+$ -Zellen auf die Expression von EPO hat. Als Modell dienen Mäuse mit einem konditionalen Knockout des Vhl-Gens in FoxD1-exprimierenden Zellen ($FoxD1^{+/Cre} Vhl^{fl/fl}$ -Mäuse). Anhand dieses Mausmodells sollen Veränderungen der Hämatokritwerte, der Plasma-EPO-Konzentrationen sowie der EPO-mRNA-Expressionslevel nach Deletion von Vhl untersucht werden. Außerdem soll die Verteilung EPO-exprimierender Zellen mittels *in situ*-Hybridisierung analysiert werden. Immunfluoreszenzfärbungen an Nierenschnitten einer $FoxD1^{+/Cre}$ -Reportermaus dienen der Untersuchung der Spezifität der Cre-Expression.

Renin-, Mesangial- und vaskuläre Glattmuskelzellen leiten sich neben interstitiellen Fibroblasten/Perizyten ebenfalls aus der FoxD1⁺- Stromavorläuferzellpopulation ab. Daher soll im dritten Teil dieser Arbeit geklärt werden, ob eine Stabilisierung der HIF- α -Untereinheiten mittels Vhl-Deletion auch in diesen Zelltypen zu einer Induktion der EPO-Produktion führt. Diese Hypothese wird gestützt durch frühere Befunde, dass bei Mäusen eine chronische Aktivierung von HIF-2 in der Reninzelllinie während der Embryonalentwicklung zu einer Induktion der EPO-Produktion an JG-Position führt.

Zur Beantwortung dieser Frage dienen verschiedene Mausmodelle mit induzierbarer zelltypspezifischer Stabilisierung von HIF-2 durch Vhl-Deletion. Anhand dieser Mausmodelle soll durch Bestimmung verschiedener Parameter, wie der Hämatokritwerte, der Plasma-EPO-Konzentrationen sowie der Quantifizierung der glomerulären bzw. renalen EPO-mRNA-Expression untersucht werden, ob in adulten ausdifferenzierten Renin-, Mesangial- und/oder vaskulären Glattmuskelzellen die EPO-Expression induziert werden kann. Immunhistochemische Färbungen an entsprechenden Cre-Reporter- Mäusen sollen Aufschluss über die Spezifität der Cre-Aktivität geben.

Da die Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktoren nicht nur an der Regulation der EPO-Expression beteiligt sind, sondern unter anderem auch an der Regulation der Angiogenese oder bestimmter Stoffwechselprozesse, soll im vierten Teil dieser Arbeit analysiert werden, ob die Deletion von Vhl in oben genannten Mausmodellen zur Induktion der Expression von weiteren HIF-2-regulierten Genen führt und ob sich dabei ein Muster erkennen lässt. Dazu soll mittels quantitativer Echtzeit-PCR eine Genexpressionsanalyse durchgeführt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav	DX-23, Systec, Linden
Computer	Precision 690, Dell, Frankfurt am Main
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen, Isernhagen
Filtersets:	
TRITC-Filter	Filter set 43 DsRed, Zeiss, Jena
Cy2-Filter	Filter set 38 HE, Zeiss, Jena
Cy5-Filter	Filter set 50, Zeiss, Jena
Dapi-Filter	Filter set 49, Zeiss, Jena
Fluoreszenzlampe	Colibri.2, Zeiss, Jena
Gel-Elektrophorese-System	Compact M, Biometra, Göttingen
Grafikkarte	Quadro FX 4500, NVIDIA, Würselen
Homogenisator	Ultra-Turrax T25, Janke & Kunkel, Staufen
Kamera	Axiocam MRm, Zeiss, Jena Axiocam 105 color, Zeiss, Jena
Magnetrührer	MR 80, Heidolph, Schwabach MR 3001 K, Heidolph, Schwabach
Mikroskope	Axiostar 1122-100, Zeiss, Jena Axio Observer.Z1, Zeiss, Jena
Mikrotome	Rotationsmikrotom RM2165, Leica, Wetzlar Rotationsmikrotom RM2265, Leica, Wetzlar
Mikrowelle	Sharp, Osaka
PCR-Geräte	Labcyler, SensoQuest, Göttingen Lightcycler LC480, Roche, Mannheim
Perfusionspumpe	323, Watson Marlow, Wilmington, USA
pH-Meter	Hanna Instruments, Vöhringen
Photometer	NanoDrop 1000, Peqlab, Erlangen
Pipetten	Pipetman P10, P20, P100, P200, P1000, Gilson, Middleton, USA

Reinwasseranlage	MilliQ Plus PF, Millipore, Schwalbach
RNAscope® Wärmeofen	HybEZ Oven, Advanced Cell Diagnostics, Hayward, USA
Scantisch, motorisiert	Märzhäuser Sensotech GmbH, Wetzlar
Schüttler	GFL, Burgwedel Rotamax, Heidolph, Schwabach
UV-Dunkelkammer	Fusion FX7, Vilber, Eberhardzell
UV-Leuchttisch	Fluorescent Tables, Renner, Dannstadt
Vortexgerät	USA REAX1, Heidolph, Schwabach
Waagen	Feinwaage ABT 120-5DM, Kern, Balingen-Frommern EMS, Kern, Balingen-Frommern
Wärmeblöcke	Thermomixer, Eppendorf, Hamburg Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg
Wärmeplatte	HI 1220, Leica, Wetzlar
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach
Wasserbäder	Aqualine AL12, Lauda, Lauda-Königshofen 1083, GFL, Burgwedel
Zentrifugen	Haematokrit 210, Hettich, Tuttlingen Tischzentrifuge, neoLab, Heidelberg Z300, Hermle, Wehingen Zentrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Auslaufpipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläschen	Roth, Karlsruhe
Dynabeads M-450 Epoxy	Life Technologies AS, Oslo
Fettstift, Super PAP-Pen	Science Services, München
Fettstift, ImmEdge Pen	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Gewebe-Einbettkassetten	Roth, Karlsruhe

Glaswaren	Roth, Karlsruhe Schott, Mainz
Hämatokrit-Kapillaren	Sanguis Counting, Nümbrecht
Hämatokrit-Versiegelungskitt	Brand, Wertheim
Handschuhe	Roth, Karlsruhe
Kanüle	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Magnet IMag™	BD Biosciences, Heidelberg
Multiwellplatten 96er, FRAMEstar® 480	4titude, Surrey, UK
Objektträger, SuperFrost® Plus	Menzel, Braunschweig
Parafilm	Bemis, Neenah, USA
Pasteurpipetten	VWR, Darmstadt
Pasteurpipetten-Hütchen	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen mit und ohne Filter	Nerbe, Winsen Sarstedt, Nümbrecht Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Pipettierhelfer accu-jet pro	Brand, Wertheim
Präparatekästen	Roth, Karlsruhe
Präparierbesteck	Hammacher, Solingen
Reagiergefäße 0,5ml, 1,5ml, 2,0ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäße 15ml, 50ml	Sarstedt, Nümbrecht
Silikonkautschuk Gießformen	Roth, Karlsruhe
Spritzen	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Zellsiebe	Falcon®, Corning Incorporated, Corning, USA

2.1.3 Chemikalien, Enzyme und Kits

Produkt	Hersteller
Agarose	Sigma-Aldrich, München
Ammoniumhydroxid-Lösung	Sigma-Aldrich, München
CaCl ₂	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt

Collagenase A	Roche, Mannheim
DMSO	Merck, Darmstadt
DNA Längenstandard: Gene Ruler™ 100bp plus DNA ladder	Thermo Scientific, Waltham, USA
Doxycyclin-Hyclat	AppliChem, Darmstadt
Dulbecco's PBS	Sigma-Aldrich, München
Eindeckmedium Glycergel (IF)	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
Eindeckmedium VectaMount™ (ISH)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Elisa-Kit Erythropoietin	R&D Systems, Minneapolis, USA
Essigsäure 100%	Sigma-Aldrich, München
Ethanol p.a.	Honeywell, Morris Plains, USA
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
First Strand Buffer, 5x	Invitrogen, Karlsruhe
Formaldehyd-Lösung (mind. 37%)	Merck, Darmstadt
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycerin 87%	AppliChem, Darmstadt
Glykogen	Invitrogen, Karlsruhe
GoTaq DNA Polymerase, 5 U/µl	Promega, Mannheim
GoTaq Reaction Buffer Green	Promega, Mannheim
Hämatoxylin-Lösung, Gill Nr. 1	Sigma-Aldrich, München
HCl 1N	Merck, Darmstadt
HCl (rauchend)	Merck, Darmstadt
ICA (2-(1-chloro-4-hydroxyisoquinoline-3-carboxamido) acetate)	Prof. Dr. med. Carsten Willam, Erlangen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isopropanol, p.A.	AnalaR Normapur, VWR, Radnor, USA
KCl	Merck, Darmstadt
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Ketamin, 10%	bela-pharm, Vechta
Lightcycler 480® SYBR Green Master PCR Kit	Roche, Mannheim

Methanol	Merck, Darmstadt
MgSO ₄	Merck, Darmstadt
M-MLV Reverse Transcriptase, 200 U/µl	Invitrogen, Karlsruhe
NaHCO ₃	Merck, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich, München
Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich, München
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt
NaOH 1N	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
Oligo(dT) ₁₅ Primer, 0,5µg/µl	Thermo Scientific, Waltham, USA
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe
PCR Nucleotide Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 10 mM)	Promega, Mannheim
Paraplast-Plus Paraffin	Roth, Karlsruhe
Pferdeserum (Horse Serum)	Gibco, Life technologies, Grand Island, USA
Saccharose	Merck, Darmstadt
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, München
RNAscope® 2.5 HD Detektionsreagenzien – braun	Advanced Cell Diagnostics, Hayward, USA
RNAscope® H ₂ O ₂ & Protease Plus Reagenzien	Advanced Cell Diagnostics, Hayward, USA
RNAscope® Target Retrieval Reagenzien	Advanced Cell Diagnostics, Hayward, USA
RNAscope® Waschpuffer	Advanced Cell Diagnostics, Hayward, USA
Roti®-Safe GelStain	Roth, Karlsruhe
Tamoxifen-Futter (400mg Tamoxifencitrat/kg)	Harlan Laboratories, NM Horst, Niederlande
TRIsure®-Reagenz	Bioline, Luckenwalde
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Affymetrix, Cleveland, USA
Xylazin, 2%	Serumwerk, Bernburg
Xylol	Merck, Darmstadt
Xylol (für RNAscope®)	AppliChem, Darmstadt

2.1.4 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders beschrieben, wurden die Chemikalien für alle Puffer und Lösungen in Reinstwasser (MilliQ-Wasser) gelöst.

Immunhistochemie und *in situ*-Hybridisierung

PBS (Phosphate Buffered Saline)-Otto-Puffer, pH 7,4

NaCl	140 mM
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	10 mM
KH ₂ PO ₄	2,5 mM

Fixierlösung für Perfusion, pH 7,4

(für Immunfluoreszenz (IF))

Dulbecco's PBS

Paraformaldehyd 3%

Tris-EDTA Puffer, pH 8,5

(zur Epitopdemaskierung, IF)

Tris 9,9 mM
EDTA 1,3 mM

Stammlösung (für IF)

PBS-Otto
BSA (bovines Serum- 1%
Albumin)

Blockierlösung (für IF)

PBS-Otto
BSA (bovines Serum- 1%
Albumin)
HS (Pferde-Serum) 10%

Fixierlösung für Perfusion, pH 7,0
(für *in situ*-Hybridisierung (ISH) mittels
RNAscope®)

Formalin (37-40% stock 10%
solution)NaH₂PO₄ 33,3 mMNa₂HPO₄ 45,8 mM

Molekularbiologie

TAE (Tris-Acetat-EDTA) Puffer, pH 8,5

Tris 40 mM

Essigsäure 20 mM

EDTA 1 mM

Agarosegel

TAE

Agarose 2%

Roti®-GelStain 0,02‰

NaOH

(für gDNA-Extraktion)

NaOH 25 mM

Tris-HCl, pH 8,0

(für gDNA-Extraktion)

Tris 1 M

PBS, pH 7,4

(für Glomerulus-Präparation)

NaCl 136,9 mM

KCl 2,7 mM

Na₂HPO₄ 10,1 mMKH₂PO₄ 1,5 mM

Puffer A1, pH 8

(für Glomerulus-Präparation)

NaH₂PO₄ 19 mMNa₂HPO₄ 81 mM

Blockierlösung

(für Glomerulus-Präparation)

Puffer A1

BSA 0,5%

HBSS (Hank´s buffered salt solution)

(für Glomerulus-Präparation)

NaCl 137 mM

KCl 5,4 mM

Na₂HPO₄ 0,25 mMKH₂PO₄ 0,44 mM

Glucose 0,6 mM

CaCl₂ 1,3 mMMgSO₄ 1,0 mMNaHCO₃ 4,2 mM

Collagenase A-Lösung

(für Glomerulus-Präparation)

HBSS

Collagenase A 0,1%

2.1.5 Primer

Die Primer für die Genotypisierungs-PCR und die quantitative Realtime-PCR wurden von der Firma Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg) entsprechend der von uns vorgegebenen Nukleotidsequenz synthetisiert und als lyophyliertes Pulver geliefert. Durch Lösen in Reinstwasser wurden die Primer auf eine Konzentration von 100 pmol/µl eingestellt.

Primer für die Genotypisierung

Konstrukt		Sequenz (5'- 3')	Produktgröße
FoxD1 ^{+/Cre}	s 1	CTCCTCCGTGTCCTCGTC	
	s 2	TCTGGTCCAAGAATCCGAAG	450bp = Cre
	as	GGGAGGATTGGGAAGACAAT	237bp = wt
HIF-2α flox	s	GAGAGCAGCTTCTCCTGGAA	220bp = flox
	as	TGTAGGCAGGAAACCAAGG	182bp = wt
LC1-Cre	s	GAAATGTCCGTTCGGTTGGCAGAAC	570bp =
	as	CCAAAACCGTGATGGAATGGAACAACA	Luciferase
mRen-rtTA ₂	s	CCCACTTCTGAGACAAGC	
	as	GGTCAAAGTCGTCAAGGG	180bp = positiv
mT/mG	s 1	CTCTGCTGCCTCCTGGCTTCT	
	s 2	CGAGGGGGATCACAGCAATA	250bp = mT/mG
	as	TCAATGGCGGGGGTCGTT	330bp = wt
PDGFR-β ^{+/iCre}	s	CAGAACCTGAAGATGTT	
	as	CCAGATTACGTATATCC	286bp = Cre
SM-MHC ^{+/iCre}	s 1	TGACCCCCATCTCTTCACTCC	
	s 2	AACTCCACGACCACCTCATC	280bp = Cre
	as	AGTCCCTCACATCCTCAGGTT	220bp = wt
Vhl flox	s	CTAGGCACCGAGCTTAGAGGTTGCG	450bp = flox
	as	CTGACTTCCACTGATGCTCACAG	270bp = wt

Primer für die quantitative Realtime-PCR

Gen	Sequenz (5' - 3')		Produktgröße (bp)
GAPDH	s	CAC CAG GGC TGC CAT TTG CA	294
	as	GCT CCA CCC TTC AAG TGG	
RPL32	s	TTA AGC GAA ACT GGC GGA AAC	100
	as	TTG TTG CTC CCA TAA CCG ATG	
ADM	s	GAC TCG CTG ATG AGA CGA CA	145
	as	GAA CCC TGG TTC ATG CTC TG	
COX-2	s	AGC CAT TTC CTT CTC TCC TG	894
	as	ACA ACA ACT CCA TCC TCC TG	
EPO	s	AAT GGA GGT GGA AGA ACA GG	174
	as	ACC CGA AGC AGT GAA GTG A	
PDGFR-β	s	GAG GCT TAT CCG ATG CCT TCT	79
	as	AAA CTA ACT CGC CAG CGC C	
PHD3	s	CGT GGA GCC CAT TTT TGA CA	107
	as	AGT ACC AGA CAG TCA TAG CGT A	
RGS2	s	AAG CGG GAG AAA ATG AAG CG	209
	as	CTG AAT GCA GCC AGC CCA TA	
RGS4	s	AAT AGA AAC CAC CGC GGC TC	292
	as	GAA AGC TGC CAG TCC ACA TT	
RGS5	s	CCC CAT CAA AAT GGC GGA GA	152
	as	TCT GGG CCA AGT CAA AGC TG	

2.1.6 Antikörper und Hybridisierungssonden

Primär-Antikörper

Name	Hersteller	Verdünnung
Chicken-anti-GFP	Abcam, Cambridge, UK	1:600
Chicken-anti-Renin	Davids Biotech., Regensburg	1:400
Goat-anti-CD31	R&D Systems, Minneapolis, USA	1:100
Goat-anti-Renin	R&D Systems, Minneapolis, USA	1:400
Mouse-anti-Glattmuskelaktin (α -SMA)	Abcam, Cambridge, UK	1:600
Rabbit-anti-PDGFR- β	Abcam, Cambridge, UK	1:200
Rabbit-anti-SM-MHC	Abcam, Cambridge, UK	1:200

Sekundär-Antikörper

Name	Konjugation	Hersteller	Verdünnung
Donkey-anti-chicken	Cy2	Dianova, Hamburg	1:400
Donkey-anti-goat	Cy2	Dianova, Hamburg	1:400
Donkey-anti-goat	TRITC	Dianova, Hamburg	1:400
Donkey-anti-mouse	Alexa Fluor® 350	Invitrogen, Karlsruhe	1:400
Donkey-anti-mouse	Cy5	Dianova, Hamburg	1:400
Donkey-anti-rabbit	Cy2	Dianova, Hamburg	1:400
Donkey-anti-rabbit	TRITC	Dianova, Hamburg	1:400

Sonden

Name	Hersteller
RNAscope® Negative Control Probe – <i>DapB</i>	Advanced Cell Diagnostics, Hayward, USA
RNAscope® Positive Control Probe – <i>mM-PPIB</i>	Advanced Cell Diagnostics, Hayward, USA
RNAscope® Probe – <i>mM-EPO-C1</i>	Advanced Cell Diagnostics, Hayward, USA

2.1.7 Software und Internetdienste

Diese Arbeit wurde mit *Microsoft Office 2007* angefertigt. Die Graphen wurden mittels *GraphPad Prism 5* erstellt und bearbeitet. Als Software zum Mikroskopieren diente *ZEN lite* von Zeiss. Zur Bearbeitung der Bilder wurden *ZEN lite* von Zeiss und *Adobe Photoshop CS4* verwendet. Abbildungen wurden mit *CorelDraw X7* erstellt. Zur Literaturrecherche wurde PubMed von NCBI (The National Center for Biotechnology; Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere

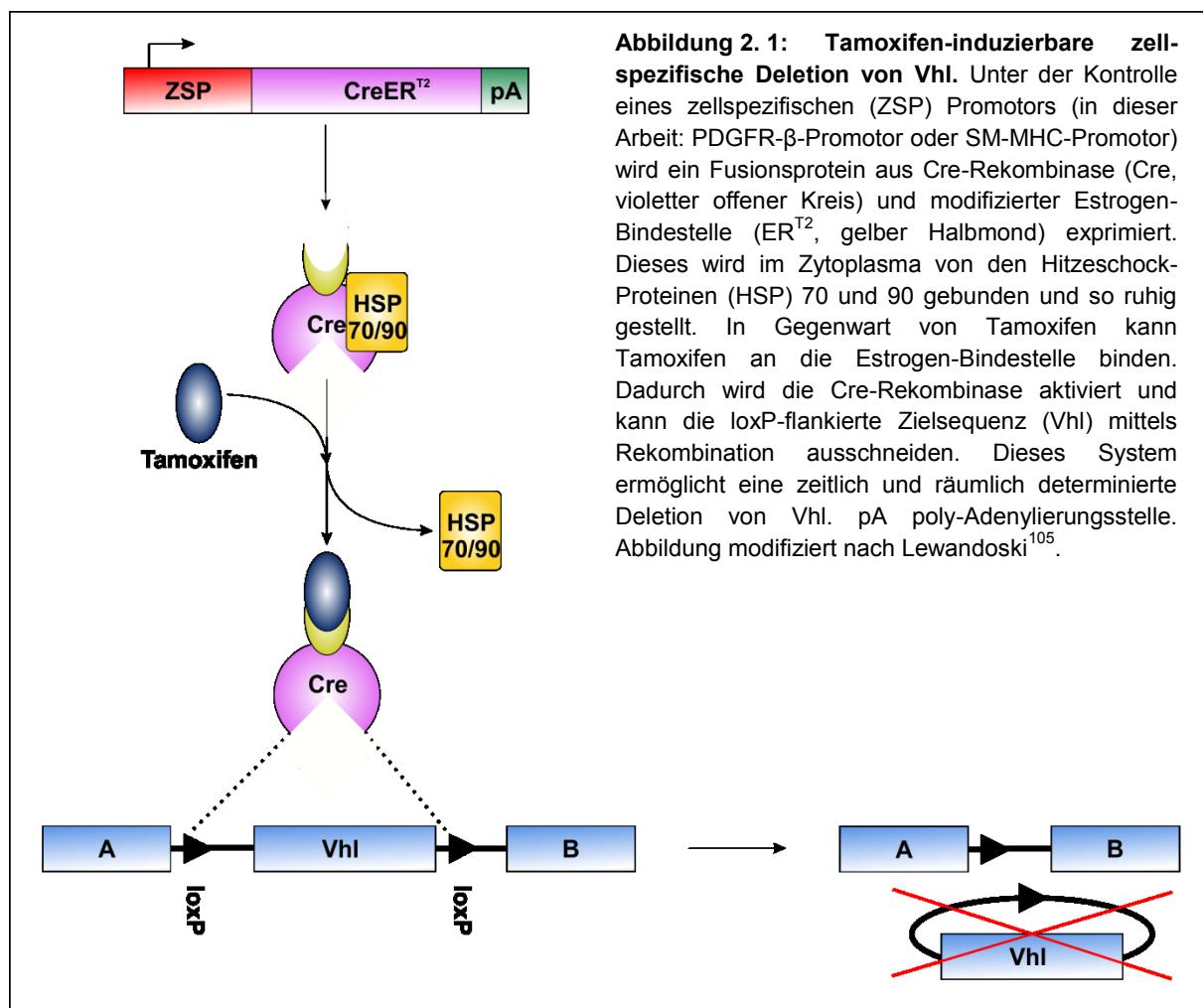
2.2.1.1 Verwendete Mauslinien

Alle Tierexperimente wurden gemäß der „National Institutes of Health guidelines for the care and use of animals in research“ durchgeführt und von der lokalen Ethikkommission genehmigt. Auf optimale Haltungsbedingungen für Nager wurde geachtet (Temperatur $23 \pm 2^\circ\text{C}$, relative Luftfeuchtigkeit $55 \pm 5\%$, Hell-/Dunkelintervall 12 h, Futter und Wasser ad libitum).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Mauslinien verwendet:

- *PDGFR- $\beta^{+/Cre}$* : Transgene Mauslinie, die unter der Kontrolle des PDGFR- β -Promotors eine Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase (CreER^{T2}, Fusionsprotein aus Cre-Rekombinase und modifizierter Estrogen-Bindestelle) exprimiert (offizielle Bezeichnung: *PDGFR- β -CreER^{T2}*; zur Verfügung gestellt von Ralf H. Adams, Max-Planck-Institut für Molekulare Biomedizin und Universität Münster)⁹⁶ (s. Abb. 2.1).
- *Vhl^{f/f}*: Mauslinie mit geflochtenen Vhl-Allelen (zur Verfügung gestellt von Volker H. Haase, Vanderbilt University, Nashville, USA)⁹⁷.
- *HIF-2 $\alpha^{f/f}$* : Mauslinie mit geflochtenen HIF-2 α -Allelen (zur Verfügung gestellt von Ian J. Frew, ETH Zürich und Universität Zürich, Schweiz)²⁵.
- *Sox10-Cre*: Mauslinie, die während der frühen Embryonalentwicklung eine Cre-Rekombinase mit einer nukleären Zielsequenz in der post-migratorischen post-otischen Neuralleisten-Zellpopulation exprimiert (zur Verfügung gestellt von Claus C. Stolt, Friedrich-Alexander-Universität, Erlangen-Nürnberg)⁹⁸.
- *R26R-EYFP*: Reporter-Mauslinie, die nach Cre-vermittelter Exzision einer geflochtenen STOP-Sequenz EYFP exprimiert (zur Verfügung gestellt von Claus C. Stolt, Friedrich-Alexander-Universität, Erlangen-Nürnberg)⁹⁹.
- *FoxD1^{+/Cre}*: Knock-in Mauslinie, die unter der Kontrolle des endogenen FoxD1-Promotors ein Fusionsprotein aus eGFP und Cre-Rekombinase exprimiert (*FoxD1^{tm1(GFP/cre)Amc}*: 012463, gekauft von Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA)^{58, 88}.
- *mT/mG*: Doppelt-fluoreszierende Cre-Reporter- Mauslinie, die membranständiges „tandem dimer tomato“ (mT) in Zellen ohne bzw. vor Cre-Aktivität und membranständiges „green fluorescent protein“ (mG) in Zellen mit Cre-Aktivität exprimiert (B6.129(Cg)-Gt(ROSA)26Sor^{tm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo}/J: 007676, gekauft von Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA)¹⁰⁰.

- LC1-Cre: Mauslinie, die eine Cre-Rekombinase und die Glühwürmchen-Luciferase unter der Kontrolle eines Tetracyclin-Response-Elements von einer bidirektionalen Transkriptionseinheit exprimiert (zur Verfügung gestellt von Vladimir T. Todorov, Universitätskrankenhaus Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden)¹⁰¹.
 - mRen-rtTA₂: Transgene Mauslinie, die einen reversen Tetracyclin-abhängigen Transaktivator vom Renin-Genlocus exprimiert (zur Verfügung gestellt von Vladimir T. Todorov, Universitätskrankenhaus Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden)¹⁰² (s. Abb. 2.2).
- LC1-Cre mRen-rtTA₂*-Mäuse werden in dieser Arbeit als *Ren^{+/iCre}*-Mäuse bezeichnet.
- SM-MHC^{+/iCre}: Transgene Mauslinie, die unter der Kontrolle des SM-MHC-Promotors ein Fusionsprotein aus Cre-Rekombinase und modifizierter Estrogen-Bindestelle (CreER^{T2})¹⁰³ exprimiert. Die Cre-Rekombinase-Aktivität ist dadurch Tamoxifen-induzierbar (offizielle Bezeichnung: SMMHC-CreER^{T2}; zur Verfügung gestellt von Stefan Offermanns, Universität Heidelberg)¹⁰⁴ (s. Abb. 2.1).



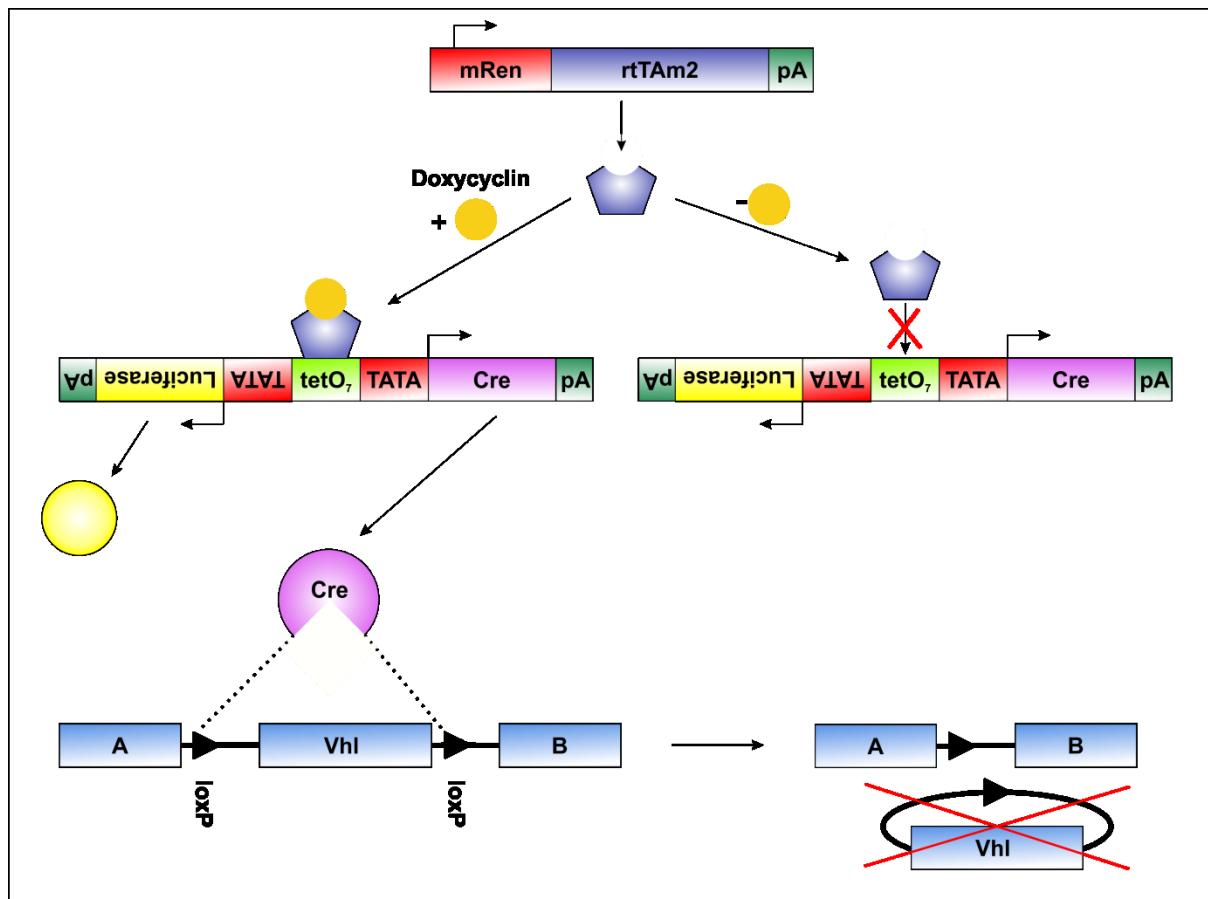


Abbildung 2.2: Doxycyclin-induzierbare Renin-zellspezifische Vhl-Deletion. Vom Maus-Renin-Genlocus (mRen) wird ein Tetracyclin-abhängiger reverser Transaktivator (rtTA2, angeschnittenes blaues Fünfeck) exprimiert. Dieser bindet nur in Gegenwart von Doxycyclin an die tetO₇-Sequenz und aktiviert die Transkription der Zielgene Cre-Rekombinase und Luciferase-Reporter, die jeweils unter der Kontrolle eines minimalen Promotors (TATA) exprimiert werden. Rekombination an den loxP-Stellen führt dann wiederum zur Deletion von Vhl. Die Luciferase-Expression wurde in dieser Arbeit nicht für Untersuchungen herangezogen. pA poly-Adenylierungsstelle; tetO₇ sieben Tandemwiederholungen der 19-Basenpaar Operatorsequenz des tet-Operons. Abbildung modifiziert nach Lewandoski¹⁰⁵.

2.2.1.2 Genotypisierung

Die Genotypisierung der Tiere erfolgte mittels PCR. Dafür wurde die genomische DNA nach folgendem Protokoll extrahiert:

- abschneiden von etwa 1,5 mm Mausschwanz
- Zugabe von 100 µl NaOH (25 mM)
- Inkubation bei 96°C für 1 h im Thermocycler
- kurz vortexen und 10 µl Tris-HCl (1 M, pH 8,0) zugeben
- 6 min bei 10000 rpm zentrifugieren
- 0,5 µl des erhaltenen Überstands (gDNA) werden in die Genotypisierungs-PCR eingesetzt
- 25 µl PCR-Reaktionsansatz:

5 µl	GoTaq Puffer
je 0,75 µl	Primer (10 pmol/µl)
2 µl	dNTPs (2,5 mM)
0,2 µl	GoTaq
0,5 µl	gDNA
ad 25 µl	MilliQ-H ₂ O

- PCR-Programm:

Zyklen	Dauer	Temperatur	Phase
1	5 min	94°C	Aktivierung
1	30-60 s	94°C	Denaturierung
36	30-60 s	x°C	Annealing
1	30-50 s	72°C	Elongation
1	10 min	72°C	Elongation
1	∞	4°C	Lagerung

PCR	Annealing-Temperatur
FoxD1 ^{+/Cre}	58°C
HIF-2α flox	59°C
LC1-Cre	56°C
mRen-rtTAm2	57°C
mT/mG	64°C
PDGFR-β ^{+/iCre}	54°C
SM-MHC ^{+/iCre}	62°C
Vhl flox	62°C

- Auftragen der PCR-Ansätze auf ein 1,5%iges Agarosegel
- Auftrennen der DNA-Fragmente durch horizontale Gelelektrophorese bei 130V

2.2.1.3 Tamoxifen- und Doxycyclin-Behandlung

Zur Aktivierung der Tamoxifen-induzierbaren Cre-Rekombinase erhielten die entsprechenden Tiere im Alter von 8 Wochen 4 Wochen lang Tamoxifen-Spezialfutter (400mg Tamoxifencitrat/kg, TD.07262, Harlan Laboratories, Niederlande) gefolgt von 3 Wochen Normaldiät (0,6% NaCl, Ssniff, Deutschland).

Ren^{+/iCre} Vh^{f/f} und *Ren^{+/iCre} mT/mG*-Mäuse erhielten zur Induktion der Cre-Rekombinase-Aktivität Doxycyclin-Hydrochlorid (Dosis: 2 mg Doxycyclin/ml, 5% Saccharose) mit dem Trinkwasser. Das Doxycyclin-Hydrochlorid wurde den Tieren in lichtgeschützten Flaschen zur Verfügung gestellt und alle 3-4 Tage neu angesetzt. Die Behandlungsdauer umfasste drei Wochen Doxycyclin, gefolgt von 4 Wochen ohne Doxycyclin.

2.2.1.4 ICA (Prolylhydroxylase-Inhibitor)-Behandlung

Zur pharmakologischen Stabilisierung der HIF- α -Untereinheiten wurde den Mäusen eine Einzeldosis des Prolylhydroxylase-Inhibitors 2-(1-Chloro-4-hydroxyisoquinolin-3-carboxamido)acetat (ICA) intraperitoneal verabreicht. Dosis: 40mg/kg Körpergewicht, gelöst in 5% DMSO in Tris-Puffer (0,5 M; pH 9,0). Der Kontrollgruppe wurde nur das Lösungsmittel intraperitoneal injiziert.

2.2.2 Retrograde arterielle Perfusion

Zur Fixierung der Nieren, die für Immunfluoreszenzfärbungen (IF) bestimmt waren, wurden die Mäuse mit 3%iger Paraformaldehydlösung (pH 7,4) retrograd arteriell perfundiert. Nieren, die für die *in situ*-Hybridisierung (ISH) mittels RNAscope®-Technologie entnommen wurden, wurden mit 10%iger Formaldehydlösung (pH 7,0) fixiert. Zuerst erfolgte dafür eine Anästhesierung der Mäuse mit einer Mischung aus Ketamin (80 mg/kg KG i.p.) und Xylazin (16 mg/kg KG i.p.). Nach Eröffnung des Abdomens und der Freilegung der Bauchaorta wurde jeweils die linke Niere abgebunden, um diese nach der Entnahme für molekularbiologische Untersuchungen verwenden zu können. Daraufhin wurde die Aorta unterhalb der Abzweigung der Nierenarterien (Arteriae renales) abgeklemmt, um die Durchblutung der Nieren weiterhin sicherzustellen. Danach wurde die Aorta abdominalis mit einer Augenschere distal zur Klemme geöffnet und der Perfusionskatheter mit Hilfe eines Dilatators eingeführt und festgeklammert. Nach Entfernen der oberen Klemme, wurde zum Druckausgleich die untere Hohlvene (Vena cava inferior) geöffnet. Gleichzeitig wurden die Nieren mit 40 ml der jeweiligen Fixierlösung mit einem konstanten Fluss von 13 ml/min perfundiert. Eine rasche Entfärbung der Abdominalorgane signalisierte den Erfolg der Perfusion. Die perfundierte Niere wurde anschließend entnommen, halbiert und bis zur Einbettung in Paraffin entweder in 70%igem Methanol bei 4°C (IF) aufbewahrt oder bei RT für 16 - 24 h in der 10%igen Formaldehydlösung (ISH) nachfixiert. Die abgebundene und somit nicht perfundierte linke Niere wurde ebenfalls entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefrosted und dann bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

Sieben Tage alte Mäuse wurden dekapitiert, vollständig aufpräpariert und dann mit 15 ml der jeweiligen Perfusionslösung bei verringriger Fließgeschwindigkeit (3 ml/min) über den linken Herzventrikel perfundiert. Anschließend wurden beide Nieren entnommen, diese nicht halbiert und anschließend mit ihnen, wie oben für die adulten Nieren beschrieben, weiterverfahren.

2.2.3 Histologische Methoden

2.2.3.1 Einbettung in Paraffin

Für die Paraffin-Einbettung wurde das Nierengewebe in Gewebe-Einbettkassetten überführt und durch eine Alkoholreihe aufsteigender Konzentration schrittweise dehydriert.

Dauer, Temperatur	Immunfluoreszenz	<i>In situ</i> -Hybridisierung
1 x 30 min, RT	70% Methanol	70% Ethanol p.A.
2 x 30 min, RT	80% Methanol	80% Ethanol p.A.
2 x 30 min, RT	90% Methanol	90% Ethanol p.A.
2 x 30 min, RT	100% Methanol	100% Ethanol p.A.
2 x 30 min, RT	100% Isopropanol	100% Isopropanol p.A.
1 x 30 min, 45°C	100% Isopropanol	100% Isopropanol p.A.
1 x 30 min, 60°C	1:1 Isopropanol/Paraffin	1:1 Isopropanol p.A./Paraffin
2 x 24 h, 60°C	Paraffin	Paraffin
Einbettung in mit Paraffin (60°C) gefüllten Silikon-Kautschuk-Einbettformen und Aushärten bei RT über Nacht		

2.2.3.2 Anfertigung von Paraffinschnitten

Nach dem vollständigen Aushärten wurden die eingebetteten Präparate aus den Einbettformen entfernt. Die Blöcke wurden dann jeweils mit einer Rasierklinge angetrimmt und in ein Rotationsmikrotom eingespannt. Anschließend wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt, zum Strecken in ein 41°C warmes Wasserbad überführt und auf beschichtete *SuperFrost® Plus* Objektträger aufgezogen. Die Schnitte für IF wurden über Nacht bei 39°C im Wärmeschrank getrocknet. Die Schnitte für ISH wurden über Nacht bei RT getrocknet.

2.2.3.3 Immunfluoreszenzfärbung

Immunfluoreszenzfärbungen dienen dazu, das Verteilungsmuster der zu untersuchenden Proteine im Gewebe sichtbar zu machen. Dafür nutzt man eine Kombination zweier Antikörper. Zunächst erfolgt die Inkubation des Gewebeschnitts mit einem primären

Antikörper, der spezifisch an ein Epitop des Proteins von Interesse bindet. Danach wird ein sekundärer Antikörper zugegeben, der wiederum den primären Antikörper erkennt und daran bindet. Da der sekundäre Antikörper an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, kann die Färbung durch Anregung mit Licht geeigneter Wellenlänge unter dem Mikroskop sichtbar gemacht werden.

Vor dem Färben mussten die Schnitte zunächst durch eine absteigende Alkoholreihe entparaffiniert und rehydriert werden:

- 2 x 10 min in 100% Xylol
- 2 x 5 min in 100% Isopropanol
- 1 x 5 min in 96% Isopropanol
- 1 x 5 min in 80% Isopropanol
- 1 x 5 min in 70% Isopropanol
- 1 x 5 min in destilliertem Wasser

Anschließend erfolgte die Färbung nach folgendem Protokoll:

Standardprotokoll:

- 3 x 10 min waschen in PBS-Otto-Puffer
- Umranden der Schnitte mit einem Fettstift
- 30 min blockieren mit der Blockierlösung (10% HS/ 1% BSA in PBS-Otto) bei RT zur Abschwächung unspezifischer Bindungen
- Inkubation des Primärantikörpers über Nacht bei 4°C in einer Feuchtkammer (Verdünnung des Primärantikörpers in der Blockierlösung)
- am folgenden Tag: 3 x 5 min waschen mit der Stammlösung (1% BSA in PBS-Otto)
- Inkubation des Sekundärantikörpers 1,5 h bei RT (unter Lichtausschluss) (Verdünnung des Sekundärantikörpers in der Stammlösung)
- 3 x 5 min waschen der Präparate in PBS-Otto-Puffer (unter Lichtausschluss)
- Eideckeln mit Eideckmedium

Je nach verwendetem Primärantikörper waren leichte Modifikationen des Standardprotokolls nötig.

Variante für SM-MHC:

nach dem Entparaffinieren und Rehydrieren der Schnitte:

- 40 min Inkubation in Tris-EDTA-Puffer (pH 8,5) im 95°C heißen Wasserbad
- 30 min abkühlen lassen auf RT
- dann mit Standardprotokoll fortfahren

2.2.4 *In situ*-Hybridisierung mittels RNAscope®-Technik

Mittels *in situ*-Hybridisierung können Nukleinsäuren im Gewebe detektiert werden. In dieser Arbeit diente die ISH dazu, die EPO mRNA-Expression im Gewebeschnitt zu lokalisieren.

Die ISH wurde nach folgendem Protokoll (RNAscope® Assay¹⁰⁶) durchgeführt:

- Objektträger 1 h bei 60°C im Wärmeschrank backen
- Entparaffinieren:
 - 2 x 10 min Xylol (RT)
 - 2 x 2 min 100% Ethanol (RT)
- Schnitte 5 min lufttrocknen lassen
- 10 min inkubieren mit RNAscope® Hydrogenperoxid (RT)
- 2 x kurz in Reinstwasser waschen
- 15 min kochen in RNAscope® 1x Target Retrieval-Lösung (98-102°C) im Wasserbad
- kurz waschen in Reinstwasser
- kurz waschen in 100% Ethanol p.A. und vollständig lufttrocknen lassen
- einzelne Schnitte mit Fettstift umranden und über Nacht trocken lagern
- am nächsten Tag: 30 min inkubieren mit RNAscope® Protease Plus (40°C)
- 2x kurz waschen in Reinstwasser
- 2 h hybridisieren mit der entsprechenden Sonde (40°C)
- 2x 2 min waschen in 1x Waschpuffer
- Durchführung folgender Amplifizierungsschritte (unter Lichtausschluss):
 - AMP 1: 30 min (40°C)
 - AMP 2: 15 min (40°C)
 - AMP 3: 30 min (40°C)
 - AMP 4: 15 min (40°C)
 - AMP 5: 45 min (RT)
 - AMP 6: 15 min (RT)

zwischen den einzelnen Schritten jeweils 2x 2 min waschen in 1x Waschpuffer

- zur Signaldetektion 10 min inkubieren mit DAB-Substratlösung (30 µl pro Schnitt) bei RT
- 2 min gegenfärbeln mit 50%iger Hämatoxylin-Lösung (RT)
- kurz waschen in Reinstwasser
- bläuen durch 5-maliges Eintauchen in 0,02%ige Ammoniumhydroxid-Lösung
- kurz waschen in Reinstwasser
- 20 min trocknen bei 60°C im Wärmeschrank (stehend)
- Eindeckeln mit VectaMount™ Eindeckmedium

Für die gleichzeitige Detektion von EPO-mRNA und Proteinen wurde die ISH wie folgt abgewandelt:

- Reduktion der Inkubationszeit mit RNAscope® Protease Plus auf 15 min
- restlichen Assay ohne Abwandlungen durchführen einschließlich der Gegenfärbung mit Hämatoxylin

Nach dem Bläuen durch Eintauchen in Ammoniumhydroxidlösung und kurzem Waschen in Reinstwasser erfolgte dann die Immunfluoreszenzfärbung nach folgendem Protokoll:

- 3 x 10 min waschen in PBS-Otto-Puffer
- 60 min blockieren mit der Blockierlösung (10% HS/ 1% BSA in PBS-Otto) bei RT
- Inkubation des Primärantikörpers über Nacht bei 4°C in einer Feuchtkammer (Verdünnung des Primärantikörpers in der Blockierlösung)
- am folgenden Tag: 3 x 5 min waschen mit der Stammlösung (1% BSA in PBS-Otto)
- Inkubation des Sekundärantikörpers 1,5 h bei RT (unter Lichtausschluss) (Verdünnung des Sekundärantikörpers in der Stammlösung)
- 3 x 5 min waschen der Präparate in PBS-Otto-Puffer (unter Lichtausschluss)
- Eindeckeln mit Eindeckmedium

2.2.5 Mikroskopie

2.2.5.1 Fluoreszenzmikroskopie

Immunfluoreszenzgefärbte Gewebeschnitte wurden unter Verwendung eines Axio Observer.Z1-Mikroskops mit motorisierter Objektauflage, einer Schwarz-Weiß-CCD-Kamera (AxioCam MRm), sowie der Software ZEN lite (2012) von Zeiss untersucht und digitalisiert. Unter Verwendung passender Fluoreszenzfilter wurden die Farbstoffe der jeweiligen sekundären Antikörper angeregt und das Emissionslicht im entsprechenden Spektralbereich aufgenommen. Bei Mehrfachfärbungen wurden die einzelnen Kanäle separat aufgenommen, anschließend überlagert und im Rot-Grün-Blau (RGB)-Farbraum gespeichert.

Konjugation	Anregung (nm)	Emission (nm)
Cy2	450 - 490	500 - 550
TRITC	533 - 558	570 - 640
Cy5	625 - 655	665 - 715
DAPI	335 - 383	420 - 470

2.2.5.2 Lichtmikroskopie

Gewebeschnitte, auf denen eine *in situ*-Hybridisierung durchgeführt worden war, wurden unter Verwendung eines Axio Observer.Z1-Mikroskops mit motorisierter Objektauflage, einer Farbkamera (Axiocam 105 color), sowie der Software ZEN lite (2012) von Zeiss untersucht und digitalisiert. Um einen besseren Überblick über das Expressionsmuster zu erhalten, wurde jeweils ein Übersichtsbild des gesamten Gewebequerschnitts in 200facher Vergrößerung mit Hilfe der Kachelfunktion aufgenommen.

2.2.6 Glomerulus-Präparation

Da in einigen Fällen insbesondere die glomerulären Zellen von Interesse waren, war es nötig Glomeruli aus den entsprechenden Mäusenieren zu isolieren, um daraus RNA isolieren und quantifizieren zu können. Eine effiziente Methode zur Erreichung dieses Ziels ist die Isolierung von Glomeruli mittels magnetischer Partikel (Dynabeads), welche erstmals 2002 von Takemoto und Kollegen beschrieben wurde¹⁰⁷. Dazu werden die Nieren mittels retrograder arterieller Perfusion mit Dynabeads perfundiert. Diese bleiben auf Grund ihrer Größe (\varnothing 4,5 µm) im Gefäßknäuel des Glomerulus hängen. Nach der Entnahme werden die Nieren zerstückelt und in Collagenase A verdaut. Anschließend wird das verdaute Gewebe durch ein Zellsieb in ein Reaktionsgefäß gestrichen, welches sich in unmittelbarer Nähe zu einem starken Magneten befindet. Die Glomeruli, die die magnetischen Partikel enthalten, sammeln sich an der dem Magneten zugewandten Gefäßseite. Nach mehreren Waschgängen verbleiben nur noch die Glomeruli im Gefäß und können für weitere Untersuchungen verwendet werden.

2.2.6.1 Blockieren der Dynabeads

Vor der Verwendung der Dynabeads werden diese mit Rinderserum-Albumin (BSA) geblockt, um ungewollte Wechselwirkungen zu verhindern.

Protokoll:

- Beads 1-2 min vortexen und 200 µl der Beads-Suspension in ein 1,5 ml Cup überführen
- für 1 min an den Magneten stellen und Puffer absaugen
- Cup vom Magneten entfernen und 1 ml Puffer A1 zugeben
- 2 min vortexen und anschließend wieder 1 min an den Magnet stellen
- Puffer absaugen, Cup vom Magnet entfernen und 200 µl Puffer A1 zugeben
- 1 min vortexen und 200 µl Blockierlösung zugeben
- 16-20 h bei RT inkubieren (unter leichtem Rotieren)
- Cup 1 min an den Magneten stellen, Puffer absaugen und Cup vom Magneten entfernen
- blockierte Beads 4x mit PBS waschen:
 - 200 µl PBS zugeben und 1 min vortexen
 - 1 min an den Magneten stellen und Puffer absaugen
 - Cup vom Magnet entfernen
- blockierte Beads in 200 µl PBS bei 4°C aufbewahren

2.2.6.2 Isolierung der Glomeruli

Für die Isolierung der Glomeruli mittels Dynabeads werden die Nieren wie unter 2.2.2 beschrieben zunächst mit 20 ml sterilem Dulbecco's PBS retrograd arteriell perfundiert. Anschließend werden die Nieren mit 50 µl blockierten Dynabeads in 10 ml sterilem PBS (gut gevortext) perfundiert. Nach der Perfusion werden beide Nieren entnommen und die Hälfte der linken Niere für die Isolierung von Gesamt-RNA in flüssigem Stickstoff schockgefrosten und bei -80°C aufbewahrt. Aus den restlichen 1½ Nieren werden die Glomeruli, wie im Folgenden beschrieben, isoliert.

Protokoll:

- 1½ Nieren in ca. 1 mm³ große Stücke zerschneiden (nicht quetschen)
- 30 min bei 37°C in 1 ml Collagenase A-Lösung (in 2 ml Cup) inkubieren, alle 5 min schwenken
- Verdau über ein 100 µm Sieb in ein 50 ml Tube geben, Gewebe mit dem Stempel einer Spritze vorsichtig durch das Sieb streichen, regelmäßig mit sterilem PBS spülen (höchstens 8 ml)
- Gewebesuspension in 13 ml Tubes überführen und am Magneten (auf Eis) fixieren
→ Glomeruli sammeln sich an der dem Magneten zugewandten Tube-Innenseite, andere Gewebereste sinken ab
- nach ca. 10 min die Lösung mit einer Pasteurpipette vorsichtig abnehmen, Tube vom Magneten entfernen und Glomeruli mit 7 ml PBS waschen
- kurz vortexen, für 5 min am Magneten fixieren und wieder absaugen
- Tube vom Magneten entfernen, Glomeruli mit 7 ml PBS waschen, über ein neues 100 µm Sieb geben, kurz vortexen, erneut für 5 min am Magneten fixieren und absaugen
- Volumen über 3 weitere Waschschrifte hinweg einengen (5 ml → 3 ml → 1 ml)
- Glomeruli nach dem letzten Waschschritt in 1 ml TRIsure® aufnehmen, vortexen und 5 min bei RT stehen lassen
- Tube für 1 min ins Ultraschallbad stellen
- in 2 ml Cup überführen und in flüssigem Stickstoff schockfrosten

2.2.7 Molekularbiologische Methoden

2.2.7.1 Bestimmung der mRNA-Expressionslevel

2.2.7.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Das Protokoll der Isolierung von Gesamt-RNA aus Nieren und anderen Geweben beruht auf der Guanidinthiocyanat-Phenol-Chloroform-Methode, die erstmals 1987 von Chomczynski und Sacchi beschrieben wurde¹⁰⁸. Dazu wurde das Gewebe zunächst in TRIsure®-Reagenz, einer einphasigen Lösung mit Phenol und Guanidinithiocyanat, homogenisiert. Durch Zugabe von Chloroform wurde das Homogenisat anschließend in drei Phasen aufgetrennt. Die grüne Phase enthält DNA und hydrophobe Proteine, die weiße Interphase relativ hydrophile Proteine und im wässrigen Überstand ist die RNA gelöst. Daher wurde die wässrige Phase abgenommen und daraus mit Isopropanol die RNA gefällt. Zur Vermeidung von RNase-Kontaminationen wurden bei allen Arbeitsschritten Latexhandschuhe getragen und RNase-freie Einmalartikel verwendet. Außerdem wurden alle Lösungen mit Reinstwasser (ddH_2O) angesetzt. Falls nicht anders beschrieben, wurden alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt.

Protokoll:

- 1 ml TRIsure® pro Organ in 13 ml Röhrchen auf Eis vorlegen
- Organe direkt aus flüssigem Stickstoff in das Röhrchen überführen, ca. 30s homogenisieren
- Homogenisat in 2 ml Cups überführen, 5 min bei RT stehen lassen (Proteine denaturieren und lösen sich in Phenol)
- 200 µl Chloroform zugeben, schütteln (nicht vortexen, da sonst die DNA denaturiert und sich in wässriger Phase löst)
- 30 min bei 4°C und 13000 rpm zentrifugieren
- wässrigen Überstand abnehmen und in 1,5 ml Cup überführen
- 1 Vol. 100% Isopropanol (RT) zugeben, bei Glomeruli oder sehr kleinen Geweben zusätzlich 2 µg Glykogen zugeben, kurz vortexen
- 10 min bei RT stehen lassen → Fällen der RNA
- 20 min bei 4°C und 12000 rpm zentrifugieren
- Überstand absaugen → glasiges Pellet
- Pellet in 1 ml 75% Ethanol (RT) waschen
- 20 min bei 4°C und 12000 rpm zentrifugieren
- Überstand absaugen → weißes Pellet
- Pellet bei RT trocknen (wird durchsichtig)

- in ddH₂O lösen (Konzentration sollte 1 µg/µl erreichen)
- kurz vortexen, max. 2 min bei 65°C resuspendieren
- kurz vortexen und bei -80°C lagern

2.2.7.1.2 Quantifizierung der RNA

Zur Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA wurde mittels eines Photometers die optische Dichte bei 260 nm und 280 nm gemessen. Der Quotient der beiden Messwerte zeigt die Qualität der isolierten RNA. In den Versuchen wurde nur RNA mit einem Quotienten zwischen 1,5 und 2,0 eingesetzt.

2.2.7.1.3 cDNA-Synthese

Im Anschluss an die Isolierung wurde die RNA mittels reverser Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Um nur mRNA-Moleküle zu transkribieren, wurden Oligo(dT)₁₅-Primer verwendet, die selektiv an den 3'-poly(A)-Schwanz der isolierten mRNA binden.

Protokoll:

- 10 µl Ansatz:
 - 1 µg RNA
 - 1 µl Oligo-(dT)₁₅-Primer
 - ad 10 µl ddH₂O
- 5 min bei 65°C inkubieren
- sofort auf Eis stellen, kurz abzentrifugieren, wieder auf Eis stellen
- Zugabe von:
 - 4 µl FSB (5x first strand buffer)
 - 1 µl dNTP-Mix (10 mmol)
 - 1 µl Reverse Transkriptase (M-MLV, Moloney Murine Leukemia Virus)
 - 4 µl ddH₂O
- kurz abzentrifugieren
- 1 h bei 37°C inkubieren → Synthese der cDNA
- 2 min erhitzen auf 94°C → Inaktivierung der Reversen Transkriptase
- Zugabe von 35 µl Reinstwasser
- Lagerung bei -20°C

2.2.7.1.4 Quantitative Echtzeit-PCR

Die quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) ermöglicht es, cDNA zu vervielfältigen und dabei gleichzeitig Auskunft über die Menge der amplifizierten DNA zu erhalten. Um den exponentiellen Verlauf der Reaktion in Echtzeit beobachten zu können, wird bei der qPCR nach jedem Zyklus die entstandene DNA-Menge photometrisch anhand der Messung der Fluoreszenz des Farbstoffes SYBR Green indirekt bestimmt. SYBR Green bindet mit hoher Affinität in der kleinen Furche doppelsträngiger DNA, wobei die Fluoreszenz des gebundenen Farbstoffes 1000-fach stärker ist als die des freien SYBR Green und die Signalintensität proportional zur gebildeten DNA-Menge ist.

Zur Durchführung der qPCR wurden der LightCycler® 480 SYBR Green I Master Kit und ein Roche Lightcycler LC480® verwendet.

Reaktionsansatz (10 µl):

- 5 µl LightCycler® 480 SYBR Green I Master
- 0,5 µl sense-Primer (10 pmol)
- 0,5 µl antisense-Primer (10 pmol)
- 3 µl ddH₂O
- 1 µl cDNA

Amplifikationsprotokoll

Zyklen	Temperatur	Dauer	Phase
1	95°C	5 min	Aktivierung
50	{ 95°C 62°C 72°C	15 s 20 s 20 s	Denaturierung Annealing Elongation

Nach Abschluss des Amplifikationsprotokolls wurde das Schmelzverhalten der amplifizierten DNA analysiert. Dafür wurde die DNA langsam (0,1°C/s) von 60°C auf 95°C erhitzt und dabei kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen. Als Haushaltsgene dienten GAPDH bei Gesamt-Organ-Bestimmungen und RPL32 bei Glomerulus-Präparationen.

2.2.7.2 Bestimmung der Plasma-EPO-Konzentration

2.2.7.2.1 Blutentnahme

Um den Hämatokritwert und die Plasma-EPO- Konzentration bestimmen zu können, wurde den adulten Mäusen an festgelegten Zeitpunkten Blut aus der Vena facialis mittels Punktion entnommen und in eine EDTA-Kapillare überführt. Sieben Tage alte Mäuse, denen die Nieren entnommen werden sollten, wurden zunächst dekapitiert und dabei das Blut in EDTA-Kapillaren aufgenommen. Um ein Auslaufen zu verhindern, wurden die Kapillaren an einer Seite gut mit Versiegelungskitt verschlossen und 4 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Hämatokritwert (Anteil aller festen Blutbestandteile am Gesamtblut) bestimmt und das Plasma in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C aufbewahrt.

2.2.7.2.2 EPO-ELISA

Dieser Immunassay (R&D Systems) ermöglicht die quantitative Bestimmung der EPO-Konzentration im Plasma durch Verwendung der sogenannten Sandwich-ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)-Technik. Dabei wird das zu bestimmende Protein zunächst von einem spezifischen Antikörper gebunden, der auf einer Wellplatte fixiert ist. Anschließend bindet zusätzlich ein zweiter Enzym-gekoppelter Antikörper an das Protein. Durch Zugabe einer Substratlösung kommt es zu einer enzymatischen Reaktion, bei der ein farbiges Produkt entsteht. Das Abstoppen der Reaktion führt zu einem Farbumschlag. Die Farbintensität ist proportional zur gebundenen Proteinmenge.

Protokoll (laut Herstellerangaben):

- Standardreihe (8 Verdünnungen von 0 pg/ml - 3000 pg/ml) und Plasmaproben (Verdünnung 1:5 - 1:220) vorbereiten
- Vorlegen von 50 µl Assay-Verdünnungslösung RD1W (Kit) in jedes Well
- Zugabe von 50 µl Standard/Probe
- Wellplatte mit Folie verschließen
- 2 h bei RT auf dem Schüttler (200 rpm) inkubieren
- 5-mal waschen mit 1x Waschpuffer (Kit)
- Zugabe von 100 µl Maus-EPO-Konjugat (Kit) pro Well
- Wellplatte mit Folie verschließen
- 2 h bei RT auf dem Schüttler (200 rpm) inkubieren
- 5-mal waschen mit 1x Waschpuffer
- Zugabe von 100 µl Substratlösung (1:1-Mischung von Farbreagenz A und B, Kit) pro Well

- 30 min bei RT unter Lichtausschluss inkubieren (Bildung eines blauen Farbstoffs)
- Zugabe von 100 µl Stopp-Lösung (Kit) pro Well (Farbumschlag nach gelb)
- Messen der Farbintensität bei 450 nm und 540 nm innerhalb von 30 min
- Auswertung:
 - Wert = (Messwert 540 nm) - (Messwert 450 nm) - (Blank-Wert)
 - Blank-Wert = (Messwert 540 nm) - (Messwert 450 nm) des 0-Standards
 - Standardkurve mit Trendlinie (lineare Funktion) generieren
 - Berechnung der Plasma-EPO-Konzentration anhand der Linearfunktion

2.2.8 Statistik

Um die Signifikanz zu bestimmen wurde der Student's t-Test durchgeführt. Pro Messserie und Bedingung wurden mindestens drei Tiere untersucht. Aus den Einzelwerten wurden der Mittelwert und die Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) gebildet. Die Irrtumswahrscheinlichkeit P wurde bei $P < 0,05$ als statistisch signifikant gewertet. Entsprechende Ergebnisse wurden mit einem Stern (*) markiert.

3 Ergebnisse

3.1 Erythropoietin-Produktion in PDGFR- β^+ - Zellen

Erythropoietin-bildende Zellen sind nicht-endotheliale fibroblastenartige Zellen, die sich unter physiologischen Bedingungen im Interstitium an der Grenze zwischen innerem Cortex und äußerer Medulla befinden^{24, 59, 60, 62, 81}. Sie exprimieren klassische Perizytenmarker wie CD73 und PDGFR- β ^{13, 24, 59, 60, 62}. Dabei scheinen sie im Hinblick auf die Expression ihrer Marker jedoch eine heterogene Zellpopulation zu bilden⁶². Eine Erklärung für diese Heterogenität ist möglicherweise in der Entwicklung der EPO-exprimierenden Zellen zu finden, da einige Befunde für eine Abstammung aus der FoxD1 $^+$ -Stromavöräuferzellpopulation sprechen⁷⁴, während andere auf einen Ursprung in der Neuralleiste hindeuten⁷³. Da PDGFR- β^+ - Zellen sehr zahlreich im Interstitium aller Nierenzonen vorkommen, soll im ersten Teil dieser Arbeit geklärt werden, inwieweit PDGFR- β^+ - Zellen fähig sind, EPO zu exprimieren und welchen quantitativen Beitrag sie zur renalen EPO-Produktion leisten. Zudem soll geklärt werden, ob sich die EPO-bildenden Zellen aus der Neuralleiste ableiten.

3.1.1 HIF-2- abhängige induzierbare EPO-Expression in PDGFR- β^+ - Zellen der Niere

Unter physiologischen Umständen führt eine Sauerstoffunterversorgung zu einer Verringerung des lokalen Sauerstoffpartialdrucks in der Niere und somit zu einer Stabilisierung der HIF- α - Untereinheiten. Dies wiederum resultiert in einer erhöhten EPO-Expression^{33, 109}. Aufgrund der guten Durchblutung der Nieren ist es jedoch selbst unter experimentellen Bedingungen nicht möglich, den Sauerstoffpartialdruck beim lebenden Tier in allen Nierenzonen so weit abzusenken, dass es in allen Bereichen zu einer Stabilisierung der HIFs kommen würde. Daher sollte zur Untersuchung der PDGFR- β^+ - Zellen auf ihre Fähigkeit hin, EPO zu exprimieren, ein Mausmodell mit chronischer HIF- α - Stabilisierung in den PDGFR- β^+ - Zellen genutzt werden. Die HIF- α - Untereinheiten werden unter Normoxie vom Vhl-Protein erkannt, ubiquitiniiert und dem proteasomalen Abbau zugeführt^{110, 111}. Durch die gentechnische Deletion von Vhl können die HIF- α - Untereinheiten nicht mehr degradiert werden, sie reichern sich stattdessen in der Zelle an, translozieren in den Nukleus und aktivieren die Expression ihrer Zielgene, wozu auch das EPO-Gen gehört (s. Abb. 3.1).

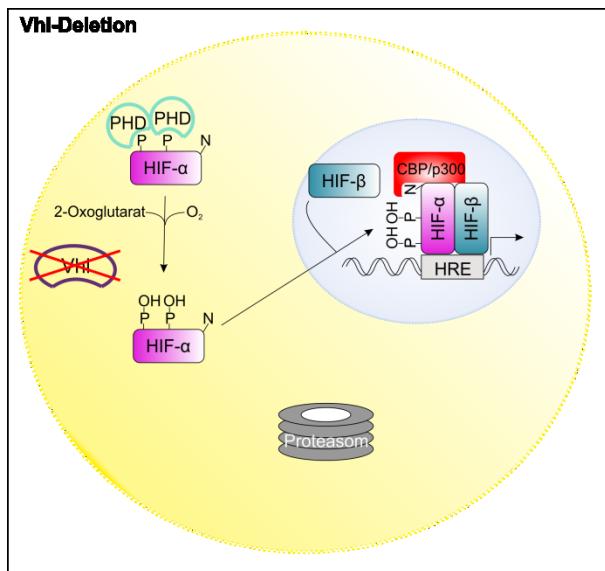


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Auswirkung einer Vhl-Deletion auf den HIF-Signalweg. Unter Normoxie werden die HIF- α -Untereinheiten von den PHDs hydroxyliert und dadurch vom Vhl-Protein erkannt und dem proteasomalen Abbau zugeführt. Nach Deletion von Vhl entgehen die hydroxylierten HIF- α -Untereinheiten jedoch ihrer Degradierung, translozieren stattdessen in den Nukleus und können dann nach Dimerisierung mit HIF-1 β die Transkription ihrer Zielgene aktivieren. Durch die Stabilisierung von HIF-2 α kann so die EPO-Gentranskription stimuliert bzw. induziert werden. Abbildung modifiziert nach Lee und Percy²⁷.

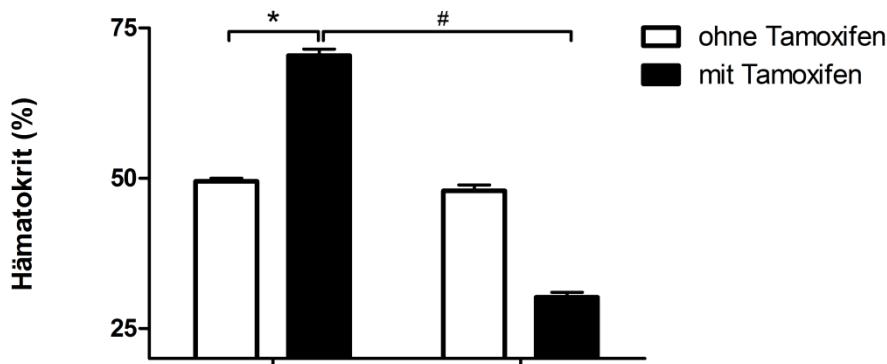
Um den Zeitpunkt der HIF- α -Stabilisierung in den PDGFR- β^+ -Zellen bestimmen zu können, wurden Mäuse mit geflochtenen Vhl-Allelen mit Mäusen verpaart, die eine Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des PDGFR- β -Promotors exprimieren ($PDGFR-\beta^{+/iCre}$ $Vhl^{fl/fl}$ -Mäuse). Um die Fähigkeit zur EPO-Produktion in den bereits ausdifferenzierten PDGFR- β^+ -Zellen der adulten Niere untersuchen zu können, erhielten die $PDGFR-\beta^{+/iCre}$ $Vhl^{fl/fl}$ -Tiere im Alter von acht Wochen ein Tamoxifen-Spezialfutter für vier Wochen, gefolgt von drei Wochen Normaldiät. Als Kontrollen dienten $PDGFR-\beta^{+/iCre}$ $Vhl^{fl/fl}$ -Tiere aus demselben Wurf, die kein Tamoxifenfutter erhalten hatten.

Die Tiere mit Vhl-Defizienz in den PDGFR- β^+ -Zellen wurden polyzythämisch mit Hämatokritwerten von ca. 70%, während die unbehandelten Kontrolltiere mit ca. 50% normale Werte aufwiesen (s. Abb. 3.2 A). Einhergehend mit der Polyzythämie waren die Plasma-EPO-Konzentrationen im Vergleich zu den Kontrollen um einen Faktor von 650 erhöht ($140437,8 \pm 13042,1$ pg/ml vs. $216,4 \pm 17,5$ pg/ml; s. Abb. 3.2 B). Parallel dazu stiegen die renalen EPO-mRNA-Expressionslevel in diesen Tieren in etwa um das 175-fache an (s. Abb. 3.2 C).

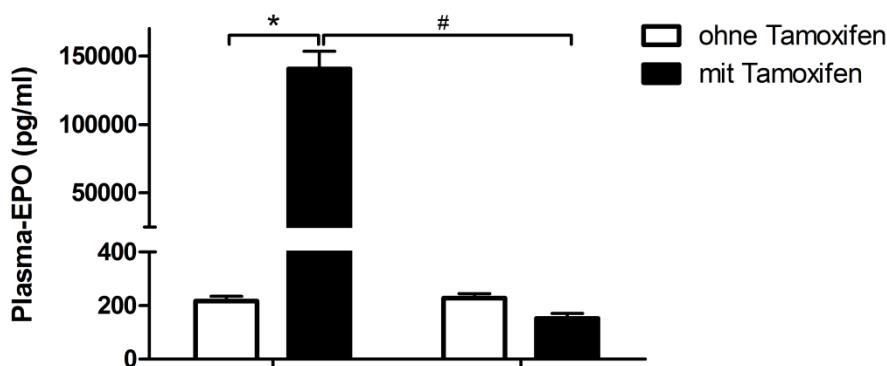
Da unter physiologischen Bedingungen HIF-2 α als Hauptregulator der EPO-Genexpression gilt¹¹², sollte untersucht werden, ob der in den Tamoxifen-behandelten $PDGFR-\beta^{+/iCre}$ $Vhl^{fl/fl}$ -Mäusen beobachtete Anstieg der EPO-mRNA-Abundanz auf die Stabilisierung von HIF-2 α in diesen Zellen zurückzuführen ist. Dazu wurden $PDGFR-\beta^{+/iCre}$ -Mäuse mit geflochtenen Vhl und HIF-2 α -Allelen gezüchtet und nach obigem Schema mit Tamoxifen behandelt. Als Kontrollen dienten wiederum unbehandelte Geschwistertiere. Tatsächlich waren die EPO-stimulierenden Effekte der Vhl-Deletion durch die zusätzliche HIF-2 α -Defizienz komplett aufgehoben, vielmehr kam es sogar zu einer Reduktion der renalen EPO-Expression um 20% im Vergleich zu den Kontrolltieren. Außerdem wurden die Vhl-HIF-2 α -defizienten

Mäuse anämisch mit Hämatokritwerten von nur noch ca. 30%. Parallel dazu waren auch die Plasma-EPO-Konzentrationen verglichen mit den Kontrolltieren um ein Drittel verringert (s. Abb. 3.2 A-C).

A



B



C

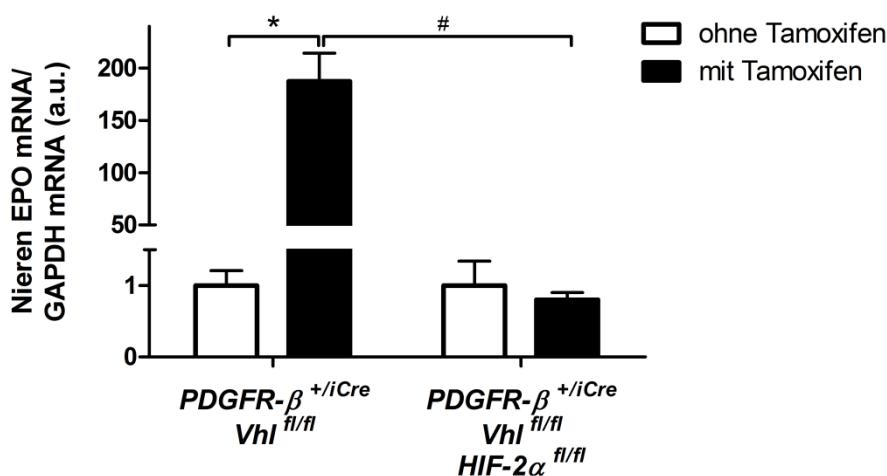


Abbildung 3.2: Hämatokritwerte (A), Plasma-EPO-Konzentrationen (B) und renale EPO-mRNA-Expressionslevel (C) von $PDGFR-\beta^{+/iCre} Vhl^{fl/fl}$ -Mäusen und $PDGFR-\beta^{+/iCre} Vhl^{fl/fl} HIF-2\alpha^{fl/fl}$ -Mäusen mit und ohne Tamoxifen-Spezialdiät. Die EPO-mRNA-Expressionslevel der unbehandelten Tiere sind auf 1 gesetzt und dienen als Referenzwert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 6 Mäusen in jeder Gruppe. * indiziert $P < 0,05$ verglichen mit den nichtbehandelten Tieren. # indiziert $P < 0,05$ verglichen mit den tamoxifen-behandelten $PDGFR-\beta^{+/iCre} Vhl^{fl/fl}$ -Tieren.

3.1.2 Zonale Verteilung der PDGFR- β^+ - / EPO-exprimierenden- Zellen in der Niere

PDGFR- β^+ - Zellen finden sich in allen Zonen – Cortex, äußere Medulla und innere Medulla – der Niere. EPO-exprimierende Zellen hingegen sind unter physiologischen Bedingungen nur an der Grenze von innerem Cortex zur äußeren Medulla lokalisiert. Selbst bei schwerer Anämie, wenn die Anzahl EPO-produzierender Zellen in der Niere zunimmt, sind diese auf den Cortex und den an den Cortex angrenzenden Bereich der äußeren Medulla begrenzt^{67, 68}. Daher sollte die zonale Verteilung der PDGFR- β^+ - Zellen, sowie die Verteilung der EPO-exprimierenden Zellen nach Vhl-Deletion in PDGFR- β^+ - Zellen genauer analysiert werden.

Dazu wurden Nieren von Tamoxifen-behandelten und unbehandelten *PDGFR- $\beta^{+/-Cre}$ Vhl^{f/f}*-Mäusen zoniert, aus den einzelnen Zonen mRNA isoliert und anschließend die Expressionslevel von EPO in den entsprechenden Nierensegmenten mittels quantitativer *Realtime-PCR* bestimmt. Außerdem wurden Nierenschnitte von Wildtyp-Mäusen immunfluoreszent gegen PDGFR- β gefärbt. Da EPO nicht in den Zellen gespeichert wird und somit nicht immunhistochemisch nachgewiesen werden kann, wurde die Verteilung der EPO-exprimierenden Zellen mittels *in situ*-Hybridisierung nach dem RNAscope-Protokoll untersucht. Zur Kontrolle der Integrität des verwendeten Gewebes und der richtigen Durchführung wurden bei jeder ISH zusätzlich eine Positiv- und eine Negativkontrolle durchgeführt. Als Positivkontrolle diente die ubiquitär exprimierte Peptidyl-prolyl-(cis-trans)-Isomerase B (PPIB), als Negativkontrolle die bakterielle Dihydrodipicolinat-Reduktase (DapB).

Die PDGFR- β^+ - Zellen zeigten eine heterogene Verteilung über die verschiedenen Nierenzonen. Sie waren in sehr hoher Dichte in der äußeren Medulla zu finden, während ihre Dichte im Cortex und auch in der inneren Medulla geringer war. Innerhalb der inneren Medulla nahm die Zahl der PDGFR- β^+ - Zellen außerdem zur Papillenspitze hin ab (s. Abb. 3.3).

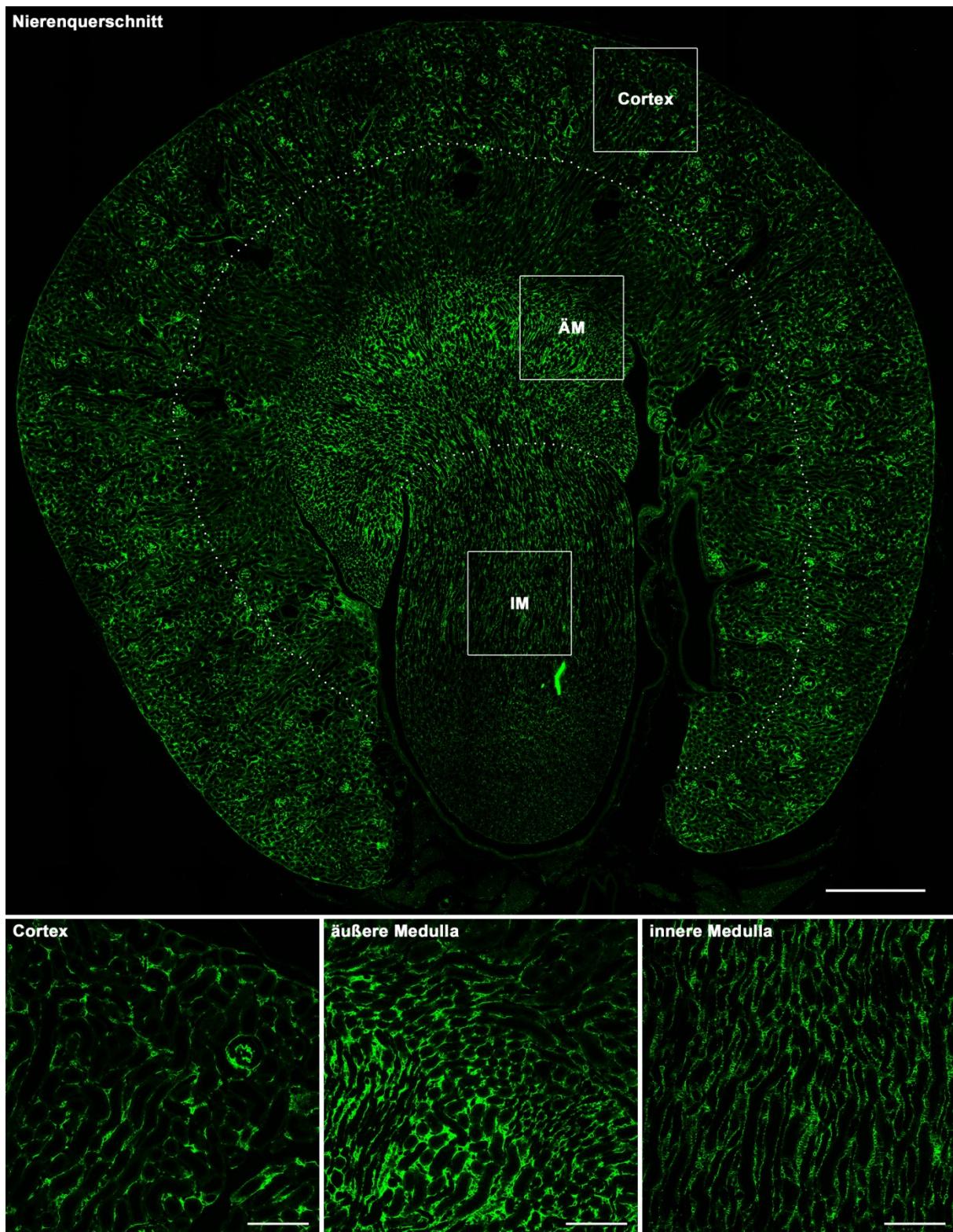


Abbildung 3.3: Immunfluoreszenzfärbung für PDGFR- β (grün) am Nierenquerschnitt einer Wildtyp-Maus.
 Zu sehen ist die Verteilung der PDGFR- β^+ -Zellen in der Übersicht (oben) und in aus der Übersicht herausvergrößerten Bereichen der einzelnen Nierenzonen (unten). Die Unterteilung der Nierenzonen ist durch die gestrichelten weißen Linien angedeutet. PDGFR- β^+ -Zellen finden sich in allen Zonen, sind aber heterogen verteilt. In besonders hoher Dichte sind sie in der äußeren Medulla angesiedelt, während im Cortex und der inneren Medulla die Dichte etwas geringer ist. Innerhalb der inneren Medulla nimmt die Dichte der PDGFR- β^+ -Zellen zudem zur Papillenspitze hin ab. ÄM äußere Medulla. IM innere Medulla. Maßstabsbalken in der Übersicht: 500 µm. Maßstabsbalken in den vergrößerten Bereichen: 100 µm. Abbildung modifiziert nach Gerl et al.¹¹³.

In unbehandelten $PDGFR-\beta^{+/iCre}$ $Vhl^{fl/fl}$ - Kontrolltieren waren wenige EPO-exprimierende Zellen clusterartig im Interstitium entlang der Grenze zwischen innerem Cortex und äußerer Medulla lokalisiert, wie anhand der EPO-mRNA *in situ*-Hybridisierung zu sehen ist (s. Abb. 3.4 A). Außerhalb dieses Bereichs fanden sich jedoch keine EPO-positiven Zellen. Dies deckt sich mit früheren Befunden zur Lokalisation nativer EPO-produzierender Zellen in der Niere^{59, 60}. Die EPO-positiven Zellen sind charakterisiert durch ein sternförmiges Aussehen, bedingt durch zahlreiche dünne Fortsätze, die sich vom Zellkörper ausgehend zwischen die Tubuli ausstrecken (s. Abb. 3.4 A2). Bei den Tieren mit Vhl-Defizienz in den PDGFR- β^+ -Zellen hingegen hatte die Zahl EPO-positiver Zellen sehr stark zugenommen. EPO-exprimierende Zellen fanden sich interstitiell in allen Nierenzonen, wobei ihre Verteilung das Muster der PDGFR- β^+ -Zellen widerspiegelte. Die Dichte der EPO-positiven Zellen war entsprechend der PDGFR- β^+ -Zellen in der äußeren Medulla am höchsten. Interessanterweise waren sogar in der inneren Medulla EPO-positive Zellen zu finden. Dabei fiel auf, dass sich diese hauptsächlich im Bereich zur äußeren Medulla hin konzentrierten, während zur Papillenspitze hin keine zu finden waren (s. Abb. 3.4 B). Dies stimmt wiederum mit der heterogenen Verteilung der PDGFR- β^+ -Zellen in der inneren Medulla überein.

Die Analyse der zonalen Verteilung der EPO-mRNA-Abundanz nach Vhl-Deletion in den PDGFR- β^+ -Zellen ergab eine massive Steigerung der EPO-mRNA-Expression in allen Nierensegmenten, wobei der Faktor im Bereich des inneren Cortex und der äußeren Medulla, also der Zone der nativen EPO-Expression und der höchsten Dichte an PDGFR- β^+ -Zellen, am größten war (etwa Faktor 220 verglichen mit den Kontrolltieren). Auch im äußeren Cortex und der inneren Medulla, den beiden Zonen, in denen unter basalen Bedingungen kaum EPO-Produktion stattfindet, war ein 70- bzw. 40-facher Anstieg der EPO-mRNA-Abundanz verglichen mit den unbehandelten Kontrolltieren zu verzeichnen (s. Abb. 3.5). Diese Verteilung deckt sich gut mit den Ergebnissen der *in situ*-Hybridisierung.

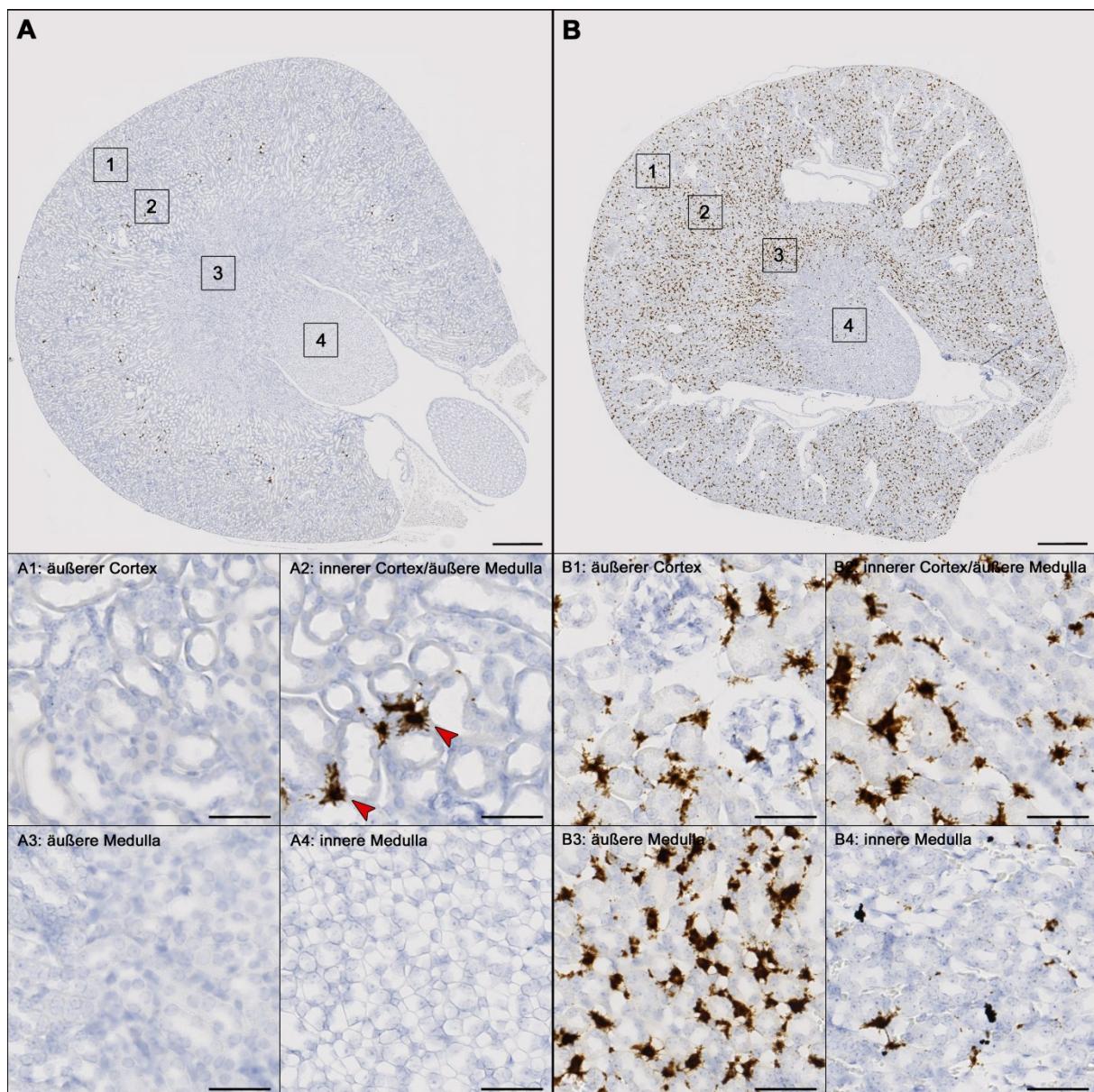


Abbildung 3.4: EPO-mRNA *in situ*-Hybridisierung auf Nierenschnitten von unbehandelten (A) und Tamoxifen-behandelten *PDGFR-β*^{+/Cre} *Vhl*^{fl/fl}-Mäusen (B). A1-A4 und B1-B4 zeigen jeweils vergrößerte Ausschnitte (schwarz markierte Bereiche aus A und B) der einzelnen Zonen – äußerer Cortex, innerer Cortex/äußere Medulla, äußere Medulla und innere Medulla – der Nierenquerschnitte. In den unbehandelten Nieren befinden sich die EPO-exprimierenden Zellen ausschließlich im kortiko-medullären Grenzbereich. Die roten Pfeilspitzen markieren einige EPO-positive Zellen, die durch den Besitz dünner, vom Zellkörper ausgehender Fortsätze charakterisiert sind (A2). In den Vhl-defizienten Nieren sind die EPO-produzierenden Zellen hingegen über alle Nierenzonen verteilt. Sogar in der inneren Medulla finden sich EPO-positive Zellen (B4). Maßstabsbalken in der Übersicht: 500 µm. Maßstabsbalken in den vergrößerten Bereichen: 50 µm. Abbildung modifiziert nach Gerl et al.¹¹³.

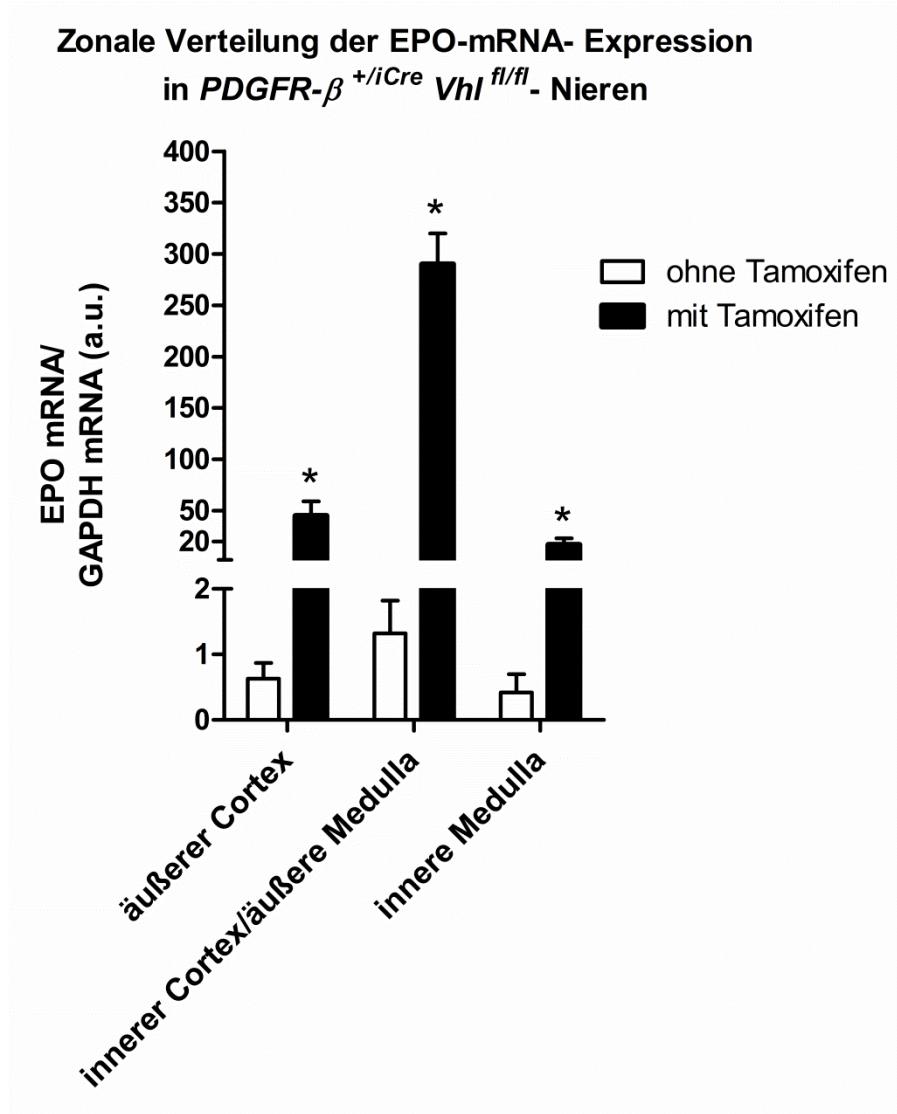


Abbildung 3.5: Zonale Verteilung der renalen EPO-mRNA- Expressionslevel von Tamoxifen-behandelten und unbehandelten $PDGFR-\beta^{+/iCre} Vhl^{fl/fl}$ - Mäusen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von fünf Mäusen in jeder Gruppe. * indiziert $P < 0,05$ verglichen mit den nichtbehandelten Tieren. Abbildung modifiziert nach Gerl et al.¹¹³.

3.1.3 PDGFR- β^+ - Zellen als einzige EPO-produzierende Zellen der Niere

Da immunhistochemische Co-Lokalisationsstudien zeigen, dass nur ein Teil der EPO-produzierenden Zellen der Niere PDGFR- β als Marker exprimiert, wohingegen ein anderer Teil CD73 als Marker besitzt⁶², sollte untersucht werden, ob es neben den PDGFR- β^+ - Zellen noch weitere Zellen in der Niere gibt, die fähig sind EPO zu exprimieren.

Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden Mäuse mit geflochtenen HIF-2 α - Allelen und der Tamoxifen-induzierbaren Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des PDGFR- β - Promotors (*PDGFR- $\beta^{+/iCre}$ HIF-2 $\alpha^{fl/fl}$* - Mäuse) gezüchtet, da HIF-2 der Hauptregulator der EPO-Expression ist. Durch die Deletion von HIF-2 α in allen PDGFR- β^+ - Zellen sollte sichergestellt werden, dass diese Zellen nicht mehr zur EPO-Expression beitragen können. Dazu wurde *PDGFR- $\beta^{+/iCre}$* - und *PDGFR- $\beta^{+/iCre}$ HIF-2 $\alpha^{fl/fl}$* - Mäusen im Alter von acht Wochen zunächst Tamoxifen-Spezialfutter für vier Wochen verabreicht, gefolgt von drei Wochen Normaldiät. Als Kontrollen dienten die Tamoxifen-behandelten *PDGFR- $\beta^{+/iCre}$* - Tiere.

Um überprüfen zu können, ob es in den Nieren der Mäuse mit HIF-2 α - Defizienz in den PDGFR- β^+ - Zellen möglich ist, die EPO-Expression zu stimulieren, wurde den Tieren der Prolylhydroxylase (PHD)-Inhibitor 2-(1-Chloro-4-hydroxyisoquinolin-3-carboxamido)acetat (ICA) intraperitoneal verabreicht. Den jeweiligen Kontrollgruppen wurde nur das Lösungsmittel intraperitoneal injiziert. Da akute Stimuli wie Hypoxie oder pharmakologische PHD-Inhibierung bereits nach wenigen Stunden zu erhöhter EPO-Expression führen^{24, 69}, wurden den Tieren vier Stunden nach ICA-Gabe die Nieren entnommen und die EPO-mRNA-Abundanz bestimmt. Die Inhibierung der Prolylhydroxylasen verhindert den Abbau der HIF- α - Untereinheiten, da diese nicht hydroxyliert und somit nicht von Vhl erkannt und dem proteasomalen Abbau zugeführt werden. So werden die HIF- α - Untereinheiten stabilisiert und können die Expression ihrer Zielgene anschalten.

Nach der Tamoxifen-Behandlung wurden die *PDGFR- $\beta^{+/iCre}$ HIF-2 $\alpha^{fl/fl}$* - Mäuse anämisch mit Hämatokritwerten von nur noch $27,9 \pm 0,6\%$. Die Kontrolltiere zeigten mit $49,5 \pm 0,5\%$ normale Werte (s. Abb. 3.6 A). Parallel dazu lag das renale EPO-mRNA- Expressionslevel der HIF-2 α - defizienten Tiere basal unterhalb der Detektionsgrenze (s. Abb. 3.6 B).

Vier Stunden nach der ICA-Gabe war die EPO-mRNA- Abundanz in den Kontrolltieren um das 12-fache angestiegen, während die EPO-Expression in den Nieren der Tamoxifen-behandelten *PDGFR- $\beta^{+/iCre}$ HIF-2 $\alpha^{fl/fl}$* - Mäuse nicht durch die PHD-Inhibierung stimuliert wurde (s. Abb. 3.6 B).

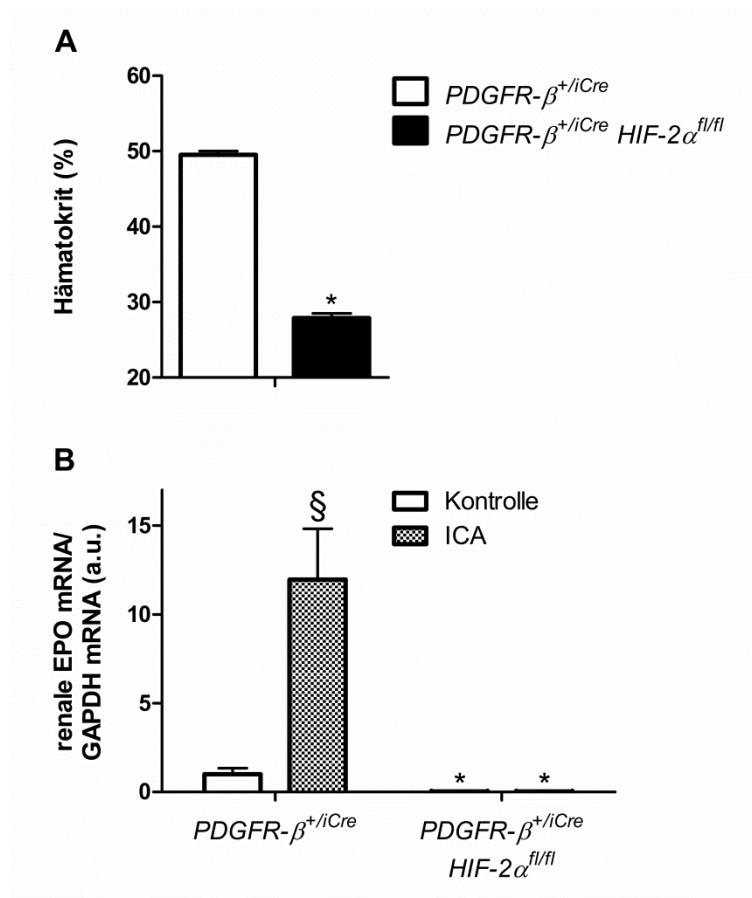


Abbildung 3.6: Hämatokritwerte Tamoxifen-behandelter $PDGFR-\beta^{+/iCre}$ - und $PDGFR-\beta^{+/iCre} HIF-2\alpha^{fl/fl}$ -Mäuse (A) und Effekt des PHD-Inhibitors ICA auf die EPO-mRNA-Abundanz dieser Tiere nach 4 wöchiger Fütterung mit Tamoxifen-Futter (B). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von sechs Mäusen in jeder Gruppe. * indiziert $P < 0,05$ verglichen mit den $PDGFR-\beta^{+/iCre}$ -Tieren. § indiziert $P < 0,05$ verglichen mit den Tieren gleichen Genotyps, denen statt ICA nur das Lösungsmittel verabreicht wurde. Abbildung modifiziert nach Gerl et al.¹¹³.

3.1.4 Induzierbarkeit der EPO-Expression in PDGFR- β^+ -Zellen extrarenaler Organe

Da PDGFR- β^+ -Zellen nicht nur in der Niere sehr zahlreich vorkommen, sondern auch in anderen Organen zu finden sind^{114, 115}, sollte überprüft werden, ob die Deletion von Vhl in diesen Zellen auch extrarenal zu einer Induktion der EPO-Expression führt. Dafür wurden zunächst die PDGFR- β -mRNA-Expressionslevel verschiedener Organe von Wildtyp-Mäusen (unbehandelte $PDGFR-\beta^{+/iCre} Vhl^{fl/fl}$ -Tiere) analysiert. Anschließend wurden die EPO-mRNA-Expressionslevel behandelter und unbehandelter $PDGFR-\beta^{+/iCre} Vhl^{fl/fl}$ -Mäuse in den entsprechenden Organen bestimmt.

Tatsächlich konnte in vielen Organen, wie Nebenniere, Herz, Lunge, Gehirn und Ovar die Expression von PDGFR- β nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.7 A). Ein Anstieg der EPO-mRNA-Abundanz auf Grund der Vhl-Deletion war jedoch abgesehen von den Nieren nur in den Nebennieren zu beobachten. Insgesamt gesehen fiel die Induktion der EPO-Expression in den Nebennieren aber deutlich schwächer aus als in den Nieren (vgl. Abb. 3.7 B).

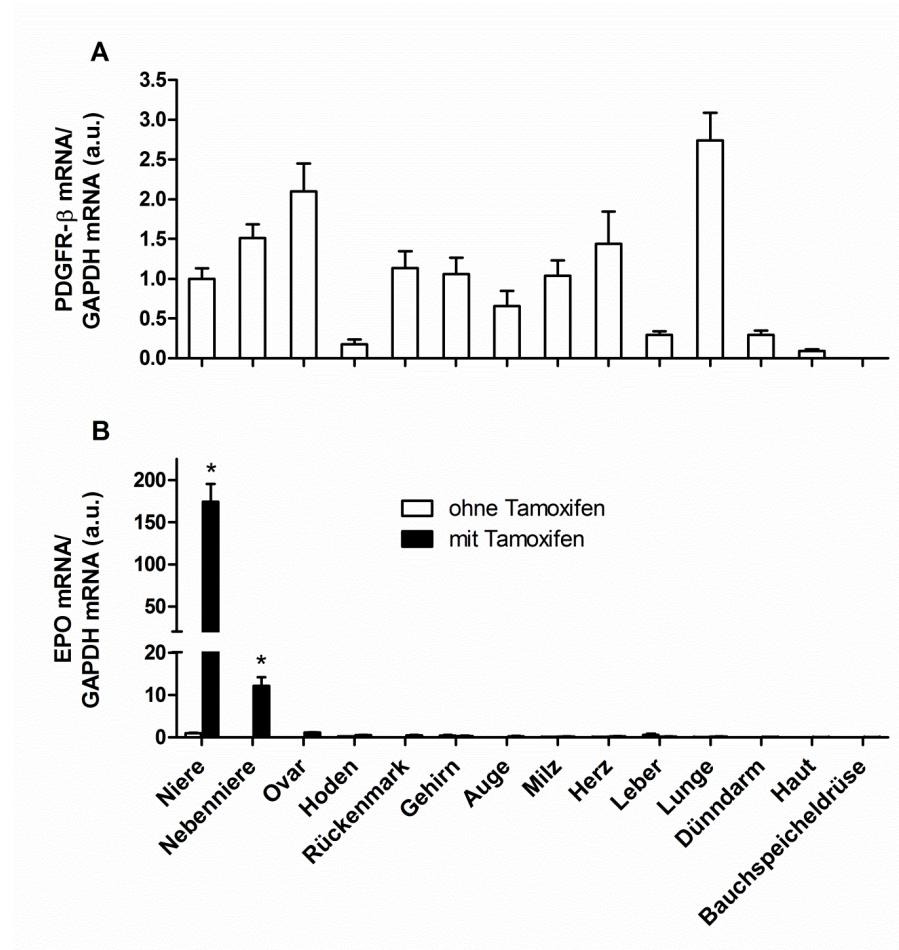


Abbildung 3.7: PDGFR- β - mRNA-Abundanz in verschiedenen Organen von Wildtyp-Mäusen (A) und EPO-mRNA- Expressionslevel in den entsprechenden Organen von $PDGFR-\beta^{+/+} Vhl^{-/-}$ - Mäusen mit und ohne 4-wöchiger Tamoxifen-Spezialdiät (B). Die mRNA-Expression von PDGFR- β ist in vielen Organen detektierbar. Ein Anstieg des EPO-Expressionslevels nach Vhl-Deletion in den $PDGFR-\beta^+$ - Zellen ist hingegen, abgesehen von den Nieren, nur in den Nebennieren zu finden. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von vier Mäusen in jeder Gruppe. * indiziert $P < 0,05$ verglichen mit den unbehandelten Kontrolltieren in (B). Abbildung modifiziert nach Gerl et al.¹¹³.

3.1.5 Lokalisation PDGFR- β - / EPO-exprimierender Zellen in der Nebenniere

Um den Ort der PDGFR- β - und EPO-Expression in der Nebenniere bestimmen zu können, wurden einerseits wieder Nebennierenschnitte von Wildtyp-Mäusen gegen PDGFR- β immunfluoreszent gefärbt und andererseits eine EPO-mRNA *in situ*-Hybridisierung auf Schnitten von Tamoxifen-behandelten und unbehandelten $PDGFR-\beta^{+/iCre} Vhl^{fl/fl}$ -Mäusen durchgeführt.

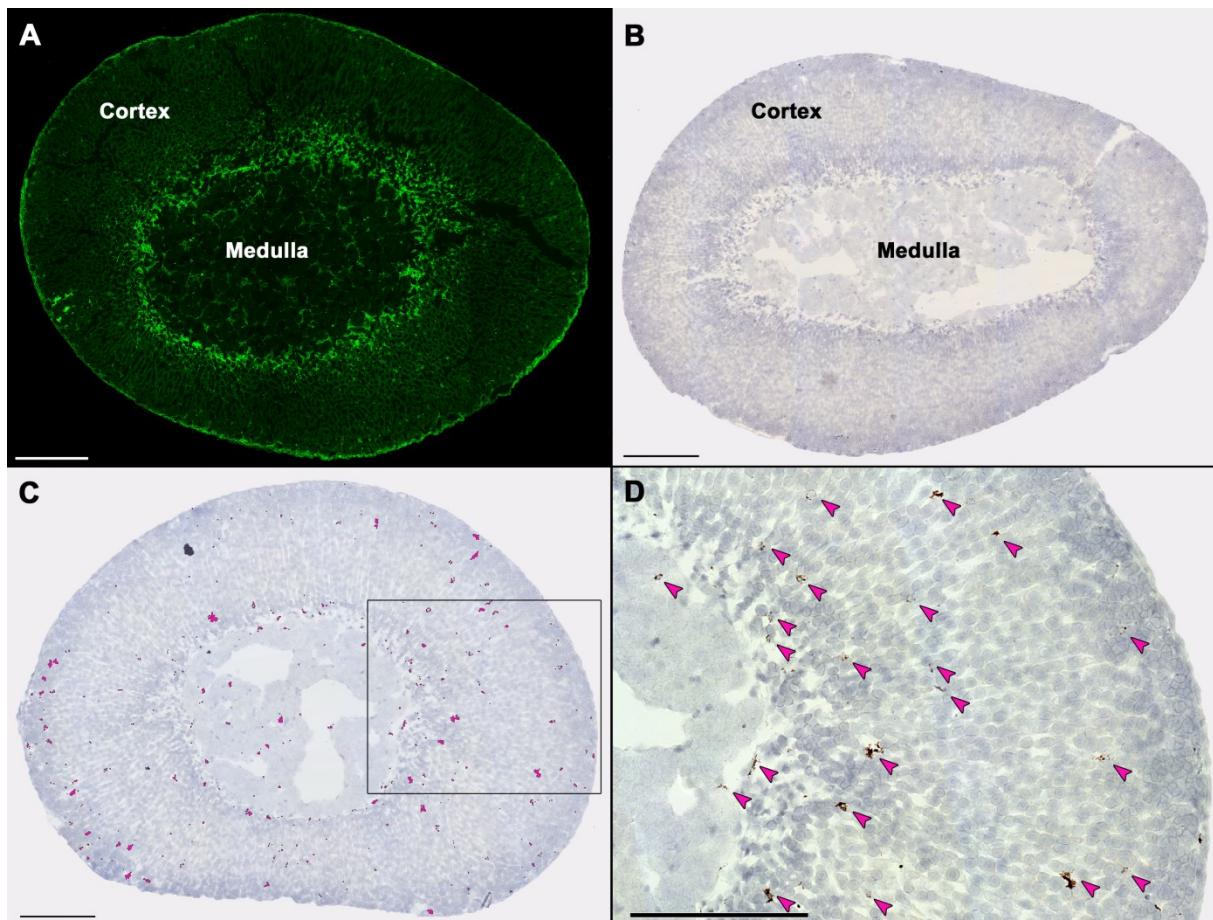


Abbildung 3.8: Immunfluoreszenzfärbung für PDGFR- β (grün) auf einem Nebennierenschnitt einer Wildtyp-Maus (A) und EPO-mRNA *in situ*-Hybridisierung an Nebennieren von Tamoxifen-behandelten (C, D) und unbehandelten (B) $PDGFR-\beta^{+/iCre} Vhl^{fl/fl}$ -Mäusen. (A) Die PDGFR- β -Färbung ist am intensivsten im kortiko-medullären Bereich der Nebenniere. Aber auch in der Medulla und im Cortex sind verstreut PDGFR- β^+ -Zellen zu finden. (B) Die *in situ*-Hybridisierung zeigt keine EPO-Signale in der unbehandelten Kontrollnebenniere. (C) In der Nebenniere mit Vhl-defizienten PDGFR- β^+ -Zellen finden sich einige EPO-exprimierende Zellen im Übergangsbereich von Cortex zu Medulla. Auch im Cortex und der Medulla sind verstreut EPO-Signale zu sehen. Diese Verteilung EPO-exprimierender Zellen deckt sich mit dem Expressionsmuster der PDGFR- β^+ -Zellen. Um die EPO-Signale besser sichtbar zu machen, wurden sie nachträglich pink markiert. In (D) ist der in (C) schwarz markierte Bereich vergrößert dargestellt. Die pinken Pfeile heben die nativen EPO-Signale (braun) hervor. Maßstabsbalken: 200 µm. Abbildung modifiziert nach Gerl et al.¹¹³.

Die PDGFR- β - Immunfluoreszenzfärbung war am stärksten im kortiko-medullären Grenzbereich der Nebennieren zu sehen. Zudem waren einige PDGFR- β^+ - Zellen verstreut im Cortex und der Medulla zu finden (s. Abb. 3.8 A). Die Verteilung der EPO-exprimierenden Zellen in den Nebennieren Tamoxifen-behandelter $PDGFR-\beta^{+/-Cre} Vhl^{fl/fl}$ - Tiere deckte sich mit dem Expressionsmuster der PDGFR- β^+ - Zellen. Die meisten EPO-mRNA- Hybridisierungssignale waren auf den Schnitten der Vhl-defizienten Nebennieren ebenfalls im Grenzbereich von Cortex zu Medulla zu detektieren. Auch in den kortikalen und medullären Bereichen der Nebennieren waren verstreut EPO-mRNA Signale zu erkennen. Auf den Schnitten der unbehandelten Kontrolltiere war keine EPO-mRNA- Expression nachweisbar (s. Abb. 3.8 B-D).

3.1.6 Abstammung der PDGFR- β^+ - Zellen der Nieren aus der Neuralleiste?

Da die bisherigen Ergebnisse darauf hindeuten, dass die PDGFR- β^+ - Zellen sehr wahrscheinlich als einzige Zellen in der Niere fähig sind, EPO zu produzieren, sollte die Frage geklärt werden, ob sich diese spezielle Fähigkeit möglicherweise durch die entwicklungsgeschichtliche Abstammung dieser Zellen erklären lässt. Auf Grund früherer Befunde, dass EPO-produzierende Zellen neuronale Marker, wie MAP2 (Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2) und NFL (Neurofilament leichtes Polypeptid), exprimieren¹³, sollte geklärt werden, ob sich die renalen PDGFR- β^+ - Zellen von Zellen der Neuralleiste ableiten.

Dazu sollte das Verteilungsmuster der EPO-exprimierenden Zellen in den Nieren mit Vhl-Defizienz in den PDGFR- β^+ - Zellen mit dem Verteilungsmuster renaler Zellen, die aus der Neuralleiste abstammen, verglichen werden. Zur Markierung der renalen Zellen mit Ursprung in der Neuralleiste wurden *Sox10-Cre R26R-EYFP*- Reportermäuse verwendet. Diese exprimieren in allen Zellen, die von der post-migratorischen post-otischen Neuralleisten-Zellpopulation abstammen, Cre-vermittelt gelb-fluoreszierendes Protein (EYFP)^{98, 99}. Dieses wurde auf Paraffin-Nierenschnitten mit Hilfe eines GFP-Antikörpers sichtbar gemacht. Wie Abbildung 3.9 zeigt, war jedoch keine Ähnlichkeit zwischen dem Expressionsmuster von EYFP (grün, A) und dem von EPO (braun, B) zu erkennen.

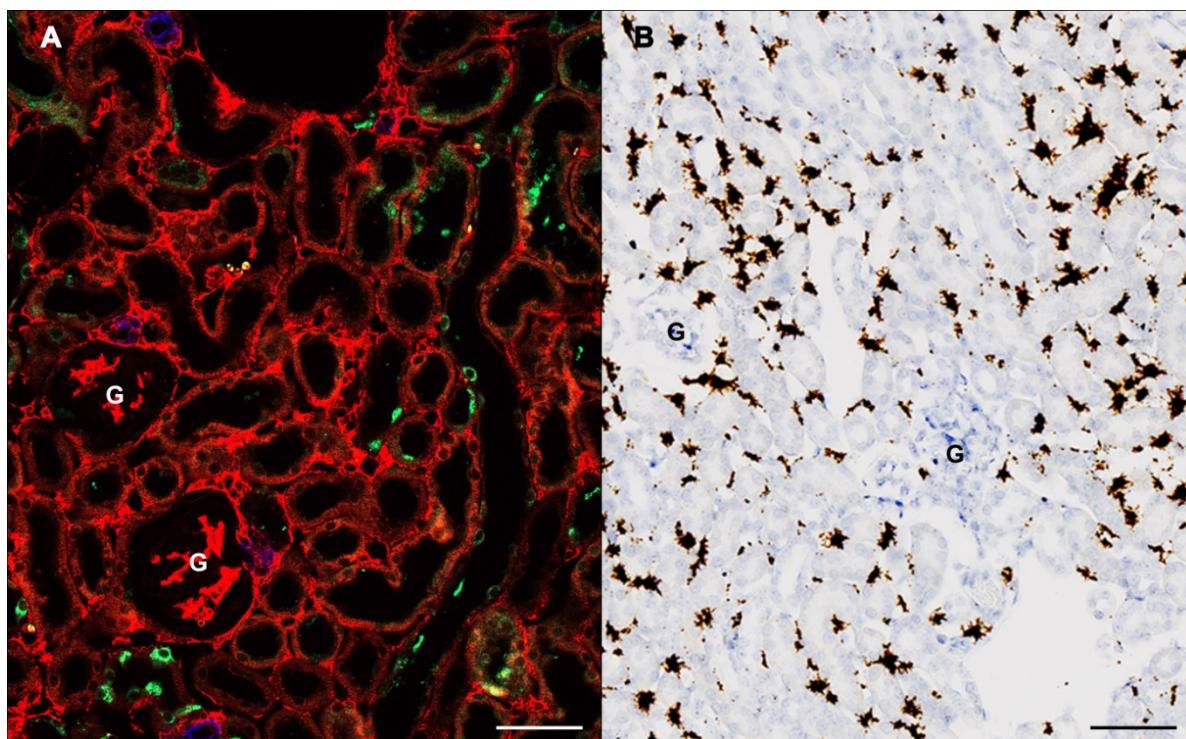


Abbildung 3.9: Immunfluoreszenzfärbung für EYFP (grün), PDGFR- β (rot) und α -Glattmuskelaktin (blau) am Nierenschnitt einer *Sox10-Cre R26R-EYFP*-Reportermäuse (A) und EPO-mRNA *in situ*-Hybridisierung (braun) am Nierenschnitt einer Tamoxifen-behandelten *PDGFR- $\beta^{+/-Cre} Vhl^{fl/fl}$* -Maus (B). Für die Detektion von EYFP wurde ein GFP-Antikörper benutzt. Das Verteilungsmuster der renalen EYFP-positiven Zellen, die ihren Ursprung in der Neuralleiste haben, deckt sich nicht mit dem Expressionsmuster der EPO-exprimierenden Zellen. Maßstabsbalken: 50 μ m. Abbildung modifiziert nach Gerl et al.¹¹³.

3.1.7 Zusammenfassung

Die Deletion von Vhl in $PDGFR-\beta^+$ -Zellen der Niere führt HIF-2-abhängig zu einem massiven Anstieg der EPO-Expression in der Niere, wobei mittels *in situ*-Hybridisierung gezeigt werden konnte, dass prinzipiell jede interstitielle $PDGFR-\beta$ -exprimierende Zelle zur EPO-Produktion fähig zu sein scheint. Die unterschiedliche zonale Verteilung der EPO-exprimierenden Zellen spiegelt dabei das Verteilungsmuster der $PDGFR-\beta^+$ -Zellen wider. Außerdem sind diese Zellen höchstwahrscheinlich die einzigen in der Niere, die EPO-exprimieren können, zumindest als Reaktion auf einen akuten Stimulus. Die Vermutung, die exklusive Fähigkeit von $PDGFR-\beta^+$ -Zellen zur EPO-Bildung könne durch die entwicklungsgeschichtliche Abstammung dieser Zellen aus der Neuralleiste erklärt werden, konnte jedoch nicht bestätigt werden. Extrarenal kommt es durch die Vhl-Deletion nur in den $PDGFR-\beta^+$ -Zellen der Nebennieren zu einer erhöhten EPO-Expression, nicht jedoch in $PDGFR-\beta^+$ -Zellen anderer Organe.

3.2 Induzierbarkeit der Erythropoietin-Produktion in Stroma-Vorläuferzellen

Andere kürzlich erhobene Befunde deuten darauf hin, dass die renalen EPO-produzierenden Zellen nicht von Neuralleistenzellen, sondern von FoxD1⁺-mesenchymalen Vorläuferzellen abstammen könnten⁷⁴. Die FoxD1-Zelllinie ist eine von drei größeren Zellpopulationen, aus denen sich die metanephrische Niere entwickelt⁵⁴. Es handelt sich dabei um Stromavorläuferzellen, aus denen sich neben den interstitiellen fibroblasten-/perizytenartigen Zellen auch vaskuläre Glattmuskelzellen, Renin-produzierende Zellen und Mesangialzellen entwickeln^{51, 54, 58}. Da die EPO-produzierenden Zellen der Niere ebenfalls typische Merkmale interstitieller perizytenartiger Zellen aufweisen, sollte im zweiten Teil dieser Arbeit geklärt werden, ob eine chronische HIF-Stabilisierung in FoxD1⁺-Zellen zu einer Induktion der EPO-Expression in diesen Zellen führt.

Um die Induktion der EPO-Expression in der FoxD1-Zelllinie untersuchen zu können, sollten wiederum die HIF-α- Untereinheiten mittels Vhl-Deletion in FoxD1⁺-Zellen stabilisiert werden. Dazu wurden Mäuse mit geflochtenen Vhl-Allelen und einer konstitutiv unter der Kontrolle des FoxD1-Promotors exprimierten Cre-Rekombinase gezüchtet (*FoxD1*^{+Cre} *Vhl*^{f/f}- Mäuse).

3.2.1 Spezifität der Cre-Rekombinase- Aktivität

Zunächst sollte jedoch genauer analysiert werden, in welchen renalen Zellen beziehungsweise in den Vorläufern welcher Zellen die Cre-Rekombinase aktiv war, um die Spezifität der Cre-Rekombinase- Expression zu überprüfen. Dafür wurden die *FoxD1*^{+Cre}-Mäuse mit doppelt-fluoreszierenden *mT/mG*- Reportermäusen verpaart. *mT/mG*- Reportermäuse exprimieren in Zellen, in denen eine Cre-Rekombinase aktiv war, sowie in deren Nachkommen, membranständiges grün-fluoreszierendes Protein (eGFP, mG) und in Zellen ohne Cre-Aktivität membranständiges tandem-dimer-Tomato (tdTomato, mT). Die *FoxD1*^{+Cre} *mT/mG*- Mäuse wurden im Alter von drei Monaten entsprechend dem Protokoll für Immunfluoreszenzfärbungen perfundiert. Da es durch die Paraffineinbettung der Nieren zu Konformationsänderungen von tdTomato und eGFP kommt und so deren Fluoreszenz verloren geht, wurden die Nierenschnitte mit einem GFP-Antikörper immunhistochemisch gefärbt, um die Cre-vermittelte Expression von eGFP sichtbar zu machen. Da sich interstitielle Fibroblasten, Renin- und Mesangialzellen sowie vaskuläre Glattmuskelzellen aus der FoxD1-Zelllinie entwickeln, wurden die Schnitte außerdem gegen Renin, α-Glattmuskelaktin und PDGFR-β cogefärbt. PDGFR-β markiert sowohl interstitielle Zellen als auch Mesangialzellen.

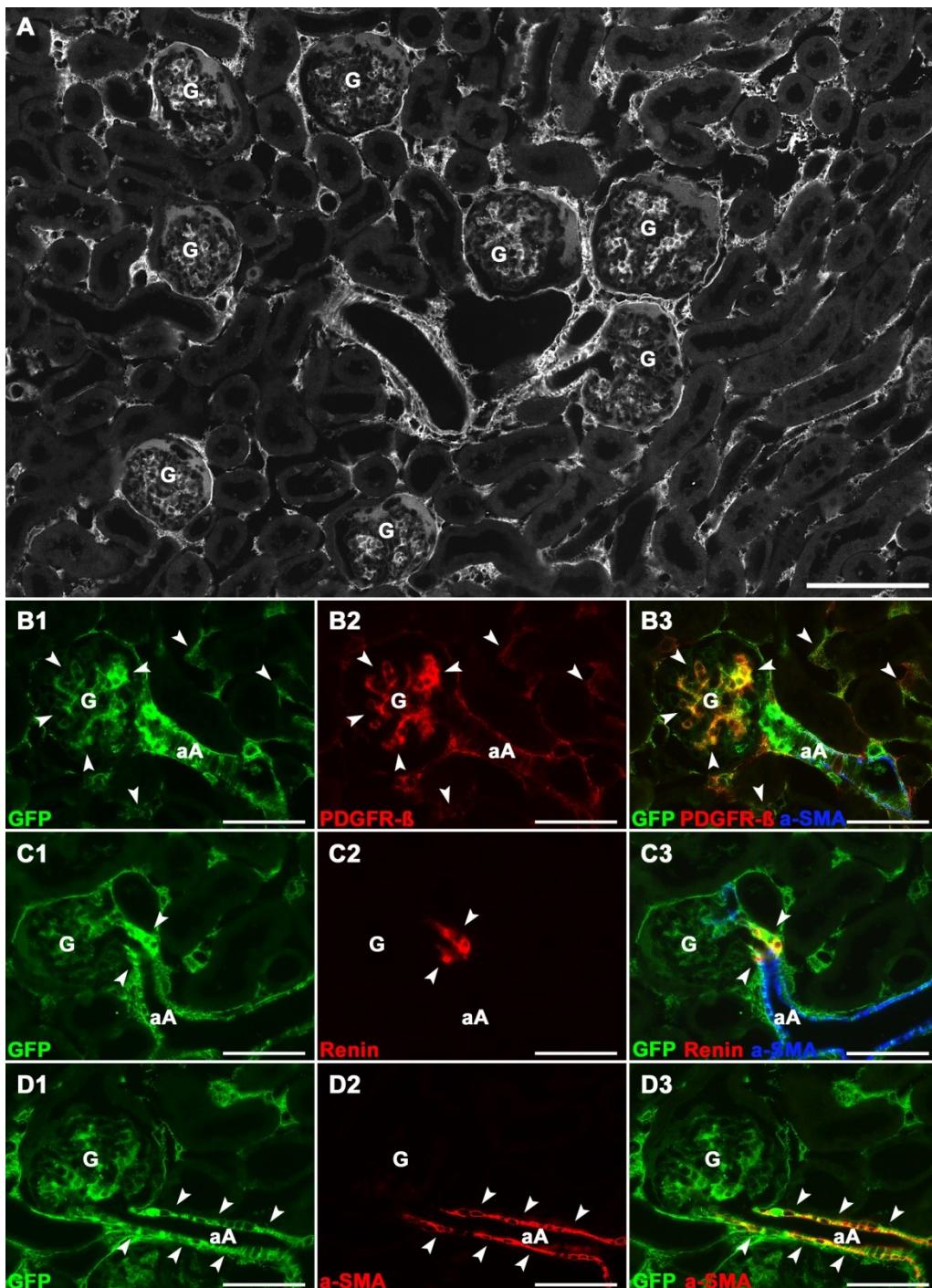


Abbildung 3.10: FoxD1-Zelllinie – verschiedene Co-Immunfluoreszenzfärbungen gegen GFP, PDGFR- β , Renin und α -Glattmuskelaktin an Nierenschnitten einer $FoxD1^{+/-} mT/mG$ - Reportermaus. (A) zeigt Zellen, die sich aus der FoxD1-Zelllinie ableiten anhand der GFP-Färbung (weiß) auf einem größeren kortikalen Ausschnitt. Nur interstitielle Fibroblasten/Perizyten, Mesangial- und Reninzellen, sowie vaskuläre Glattmuskelzellen sind positiv für GFP. Tubuläre Strukturen stammen nicht aus der FoxD1-Zelllinie ab. Die vergrößerten Einzelaufnahmen (B-D) heben die Abstammung der einzelnen Zelltypen von FoxD1 $^+$ -Zellen mittels Cofärbung von GFP und zelltyp-spezifischen Markern hervor. (B1-B3) zeigt die Überlappung (gelb) der GFP- und PDGFR- β -Färbung in interstitiellen Fibroblasten und Mesangialzellen. (C1-C3) zeigt die Überlappung (gelb) der GFP (grün)- und Renin (rot)-Färbung in Renin-produzierenden JG-Zellen. (D1-D3) zeigt die Abstammung der vaskulären Glattmuskelzellen aus der FoxD1-Zelllinie anhand der Überlappung (gelb) der Cofärbung von GFP (grün) und α -SMA (rot). Pfeilspitzen heben jeweils die Cofärbung und die entsprechenden Stellen in den Einzelkanalbildern hervor. aA afferente Arteriole. G Glomerulus. Maßstabsbalken in der Übersicht: 100 μ m. Maßstabsbalken in (B-D): 50 μ m.

Wie Abbildung 3.10 zeigt, waren vaskuläre Glattmuskelzellen (D), interstitielle Fibroblasten, Mesangialzellen (B) und auch Renin-produzierende juxtaglomeruläre Zellen (C) positiv für GFP.

3.2.2 HIF-2- abhängige induzierbare EPO-Expression in $FoxD1^+$ -Stromavorläuferzellen der Niere

Die konditionale Deletion von Vhl in den $FoxD1^+$ -Zellen führte 10-12 Tage nach der Geburt dieser Tiere zu deren Tod. Daher wurden die folgenden Untersuchungen an Tag 7 nach der Geburt (pp7) durchgeführt. Um zu untersuchen, ob die Vhl-Deletion in den Stromavorläuferzellen zu einer erhöhten EPO-Produktion in der Niere führt, wurden zunächst die Hämatokritwerte und die Plasma-EPO- Konzentrationen von $FoxD1^{+/Cre}$ $Vhl^{fl/fl}$ - Mäusen bestimmt. Als Kontrollen dienten $FoxD1^{+/Cre}$ - Geschwistertiere. Außerdem wurden den Tieren die Nieren entnommen, daraus RNA isoliert und die EPO-Expressionslevel bestimmt.

Die Mäuse mit Vhl-Defizienz in der $FoxD1$ -Zelllinie zeigten verglichen mit den Kontrolltieren (Hct: $34,8 \pm 0,3\%$; Plasma-EPO: $769,3 \pm 79,7$ pg/ml) erhöhte Hämatokritwerte ($43,5 \pm 0,6\%$) und auch deutlich erhöhte Plasma-EPO- Konzentrationen ($22696,2 \pm 2816,5$ pg/ml). Die renale EPO-mRNA- Abundanz war parallel dazu etwa um das 90-fache angestiegen (vgl. Abb. 3.11 A-C).

Um zu überprüfen, ob der Anstieg der EPO-mRNA- Expression auch in den $FoxD1^{+/Cre}$ $Vhl^{fl/fl}$ - Mäusen auf einer Stabilisierung der HIF-2 α - Untereinheit beruht, wie es bei den Mäusen mit Vhl-Defizienz in den PDGFR- β^+ - Zellen der Fall war, wurden Mäuse mit einer Codeletion von Vhl und HIF-2 α in $FoxD1^+$ -Zellen gezüchtet ($FoxD1^{+/Cre}$ $Vhl^{fl/fl}$ $HIF-2\alpha^{fl/fl}$ - Mäuse). Diese hatten mit $31,6 \pm 0,5\%$ geringere Hämatokritwerte als die $FoxD1^{+/Cre}$ - Kontrolltiere und auch die Plasma-EPO- Konzentrationen lagen mit $368,9 \pm 40,7$ pg/ml unterhalb des Kontrollniveaus. Bei der Bestimmung der renalen EPO-mRNA- Expressionslevel fiel auf, dass die Vhl- HIF-2 α - doppeldefizienten Mäuse kaum noch renales EPO exprimieren (s. Abb. 3.11 A-C). Erwähnenswert ist außerdem, dass diese Tiere im Gegensatz zu den $FoxD1^{+/Cre}$ $Vhl^{fl/fl}$ - Tieren nicht nach 10-12 Tagen verstarben.

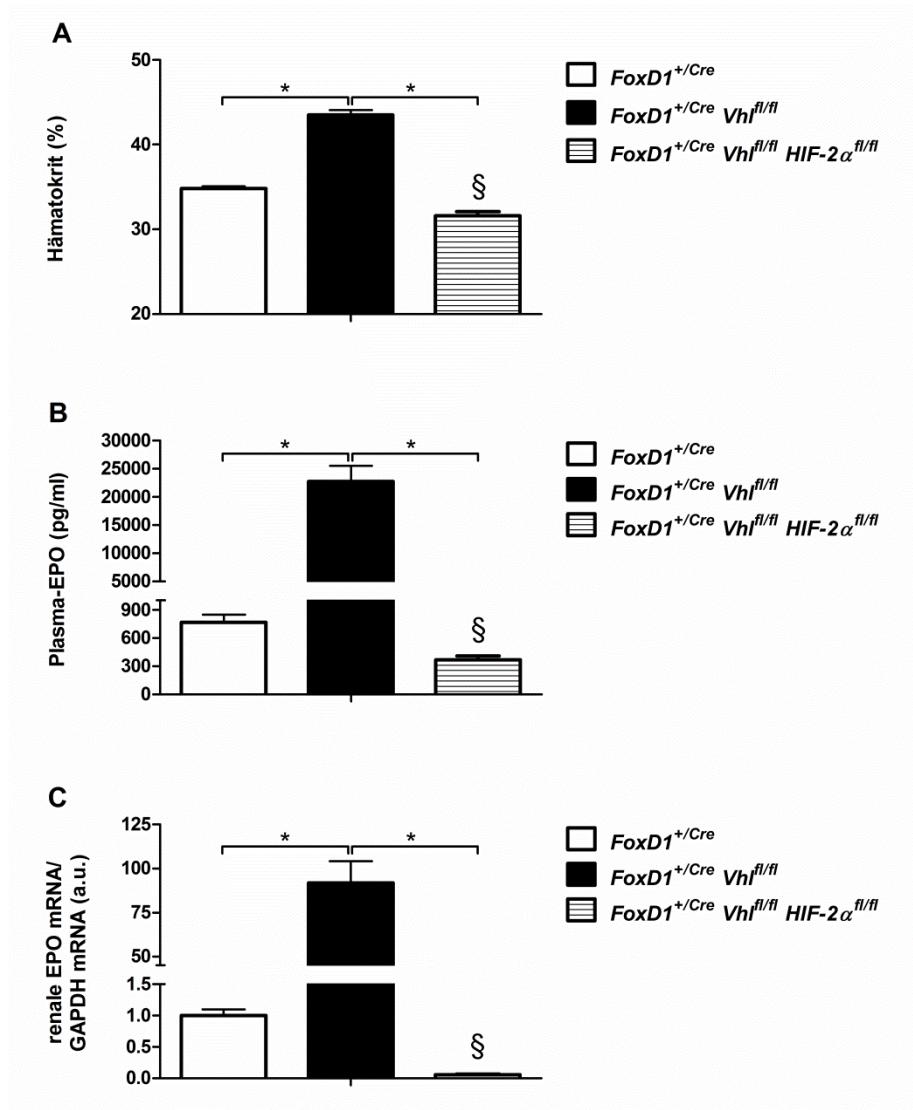


Abbildung 3.11: Hämatokritwerte (A), Plasma-EPO-Konzentrationen (B) und renale EPO-mRNA-Expressionslevel (C) von *FoxD1*^{+/Cre}-, *FoxD1*^{+/Cre} *Vhl*^{fl/fl}- und *FoxD1*^{+/Cre} *Vhl*^{fl/fl} *HIF-2α*^{fl/fl}- Mäusen. Die EPO-mRNA-Expressionslevel der *FoxD1*^{+/Cre}- Kontrolltiere sind auf 1 gesetzt und dienen als Referenzwert. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von 10 Mäusen in jeder Gruppe. * indiziert P < 0,05 zwischen den mit Klammern gekennzeichneten Gruppen. § indiziert P < 0,05 verglichen mit den *FoxD1*^{+/Cre}- Kontrollmäusen.

Da EPO während der Embryonalentwicklung hauptsächlich in der Leber produziert wird und die Niere erst im Zeitraum um die Geburt herum zum Hauptproduktionsort von EPO wird^{10, 12, 84}, sollte die renale EPO-mRNA-Expression von *FoxD1*^{+/Cre} *Vhl*^{fl/fl}-Mäusen auch zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten untersucht werden. Dazu wurden die renalen EPO-mRNA-Expressionslevel von *FoxD1*^{+/Cre} *Vhl*^{fl/fl}-Mäusen und den Kontrolltieren des gleichen Wurfes an den Embryontagen E16 und E18, sowie am Tag der Geburt (pp0) und sieben Tage nach der Geburt (pp7) bestimmt.

Bei den Kontrolltieren war die EPO-mRNA- Expression an E16, E18 und pp0 unterhalb des detektierbaren Levels. An Tag sieben *post partum* war eine geringe EPO-mRNA- Expression nachweisbar. Bei den $FoxD1^{+/Cre}$ $Vhl^{fl/fl}$ - Mäusen war die EPO-mRNA- Abundanz hingegen bereits an E16 etwa doppelt so hoch wie bei den Kontrolltieren an pp7. Von E16 bis pp7 stieg das renale EPO-mRNA- Expressionslevel dann insgesamt um einen Faktor von 15 an (s. Abb. 3.12).

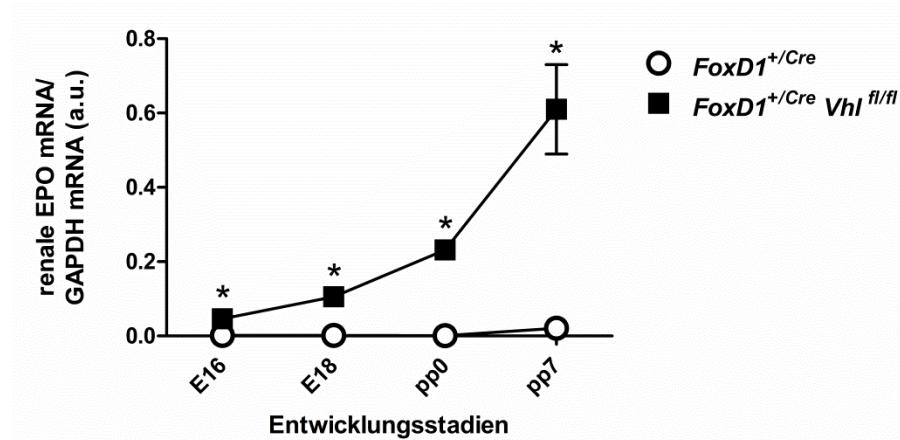


Abbildung 3.12: Renale EPO-mRNA- Expressionslevel in verschiedenen Entwicklungsstadien von $FoxD1^{+/Cre}$ - und $FoxD1^{+/Cre} Vhl^{fl/fl}$ - Mäusen. Untersucht wurden die EPO-mRNA- Expressionslevel der Nieren an Embryonaltag 16 (E16) und 18 (E18), sowie am Tag der Geburt (pp0) und 7 Tage nach der Geburt (pp7) der Mäuse. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von fünf Mäusen in jeder Gruppe im jeweiligen Entwicklungsstadium. * indiziert $P < 0,05$ verglichen mit den $FoxD1^{+/Cre}$ - Kontrollmäusen. Abbildung modifiziert nach Gerl et al.¹¹⁶.

3.2.3 Lokalisation der EPO-exprimierenden Zellen in den Nieren von $FoxD1^{+/Cre} Vhl^{fl/fl}$ - Mäusen

Zur Bestimmung des genauen EPO-Expressionsortes in den Nieren der $FoxD1^{+/Cre} Vhl^{fl/fl}$ - Mäuse wurde eine EPO-mRNA *in situ*-Hybridisierung an pp7-Nierenschnitten durchgeführt. Auf den Schnitten der Kontrollnieren waren nur sehr vereinzelt EPO-exprimierende Zellen zu sehen. Diese waren im Interstitium im Übergangsbereich von Cortex zu Medulla angesiedelt, also in dem Bereich, in dem sie auch in adulten Wildtyp-Nieren unter Normoxie zu finden sind (s. Abb. 3.13 A, rosa Pfeilspitzen). In den Nieren mit Vhl-Deletion in der FoxD1-Zelllinie waren hingegen sehr viele interstitielle Zellen EPO-positiv. Diese waren sowohl im Cortex als auch der äußeren Medulla lokalisiert, in der inneren Medulla waren keine EPO-exprimierenden Zellen zu finden (s. Abb. 3.13 B und C).

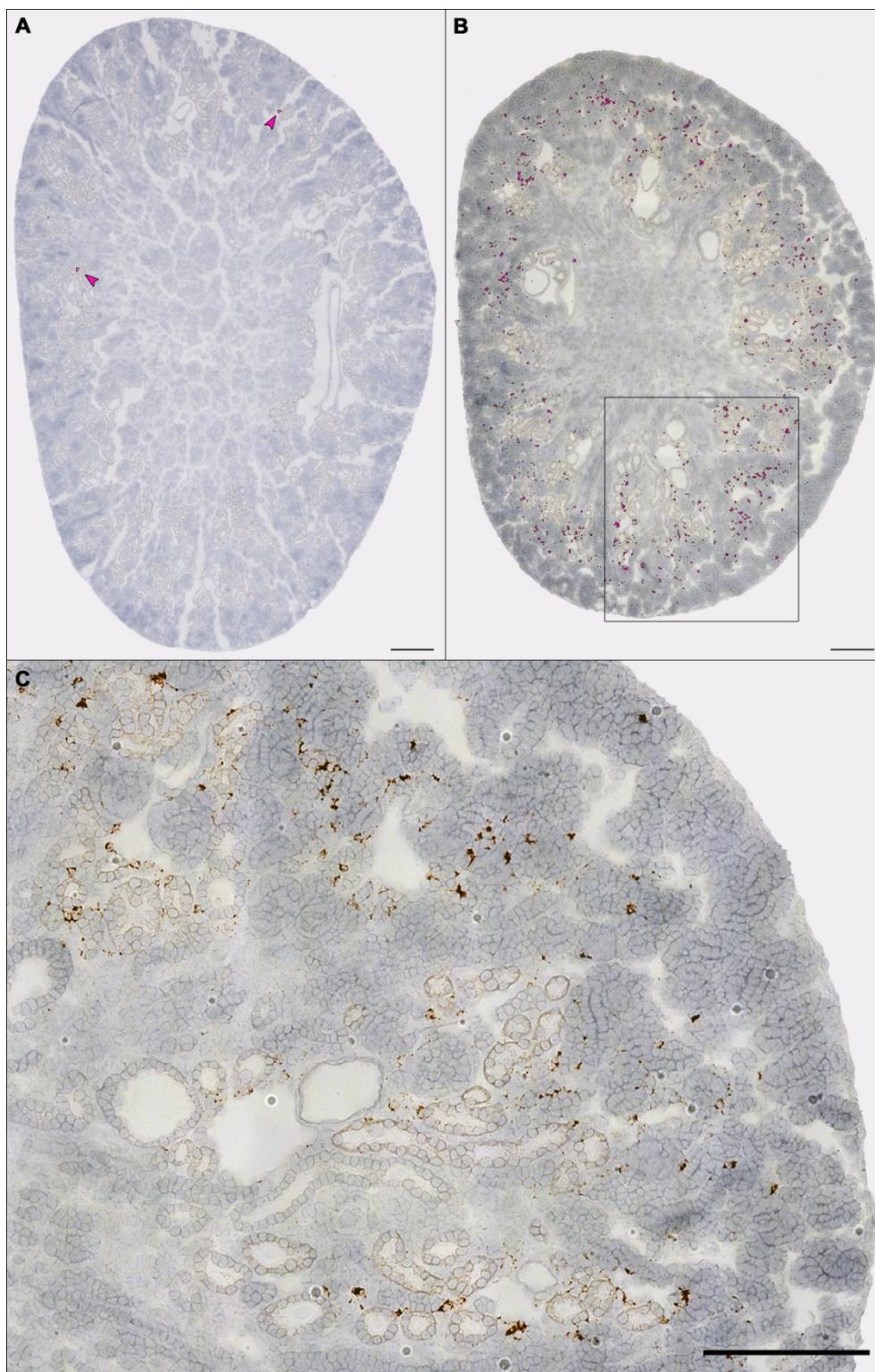


Abbildung 3.13: EPO-mRNA *in situ*-Hybridisierung an Nierenschnitten 7 Tage alter $FoxD1^{+/Cre}$ (A) und $FoxD1^{+/Cre} Vhl^{fl/fl}$ -Mäuse (B und C). (A) In den Kontroll-Nieren ($FoxD1^{+/Cre}$) sind nur vereinzelt EPO-positive Zellen im Interstitium an der Grenze von Cortex zu Medulla zu sehen. Um die EPO-Signale besser sichtbar zu machen, wurden sie nachträglich pink markiert und mit Pfeilspitzen hervorgehoben. (B) Die *in situ*-Hybridisierung zeigt viele EPO-Signale (pink hervorgehoben) im Interstitium von Cortex und Medulla der $FoxD1^{+/Cre} Vhl^{fl/fl}$ -Nieren. In (C) ist der in (B) schwarz markierte Bereich vergrößert dargestellt. Hier sind die nativen EPO-Signale in braun zu sehen. Maßstabsbalken: 200 µm.

3.2.4 EPO-Expression in den Nebennieren von $FoxD1^{+/Cre}$ $Vhl^{fl/fl}$ - Mäusen

Da in den Nebennieren der Tamoxifen-behandelten $PDGFR-\beta^{+/iCre}$ $Vhl^{fl/fl}$ - Tiere ein Anstieg der EPO-mRNA- Expression zu beobachten war, sollte überprüft werden, ob die Vhl- Defizienz in der FoxD1-Zelllinie ebenfalls zu einer erhöhten EPO-Expression in den Nebennieren führt. Dazu wurden sieben Tage alten $FoxD1^{+/Cre}$ $Vhl^{fl/fl}$ - Mäusen und den entsprechenden Kontrolltieren die Nieren und Nebennieren entnommen und daraus Gesamt- RNA isoliert. Mittels quantitativer *Realtime-PCR* wurden anschließend die EPO-mRNA- Expressionslevel bestimmt.

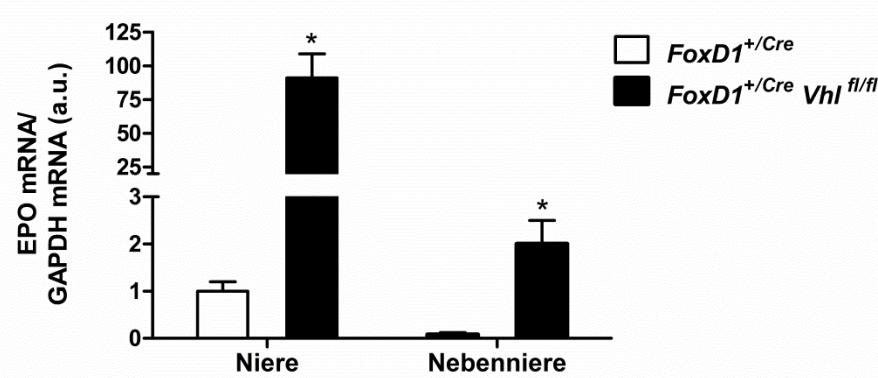


Abbildung 3.14: EPO-mRNA- Expressionslevel in den Nieren und Nebennieren von sieben Tage alten $FoxD1^{+/Cre}$ - und $FoxD1^{+/Cre} Vhl^{fl/fl}$ - Mäusen. Die renale EPO-mRNA- Abundanz der $FoxD1^{+/Cre}$ - Kontrolltiere ist auf 1 gesetzt und dient als Referenzwert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von fünf Mäusen in jeder Gruppe. * indiziert $P < 0,05$ verglichen mit den $FoxD1^{+/Cre}$ - Kontrollmäusen. Abbildung modifiziert nach Gerl et al.¹¹³.

Wie Abbildung 3.14 zeigt, war die EPO-mRNA- Expression in den Nebennieren der Mäuse mit Vhl-Defizienz in der FoxD1-Zelllinie im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich erhöht. Verglichen mit der EPO-mRNA- Abundanz in den Nieren der $FoxD1^{+/Cre}$ $Vhl^{fl/fl}$ - Tiere ist die EPO-Expression in den Nebennieren aber gering.

3.2.5 Zusammenfassung

Auf Grund von Befunden, dass die renalen PDGFR- β^+ -Zellen ihren Ursprung möglicherweise in der FoxD1-Zelllinie haben könnten, sollte untersucht werden, ob eine chronische HIF-Aktivierung in FoxD1 $^+$ -Zellen zu einer Induktion der EPO-Expression in diesen Zellen führt.

Die Untersuchung der Cre-Aktivität anhand einer Reporter-Mauslinie zeigt die Spezifität der Cre-Expression und bestätigt außerdem frühere Befunde, dass sich PDGFR- β^+ interstitielle Fibroblasten und Perizyten aus der FoxD1-Zelllinie ableiten. Gleiches gilt für Reninproduzierende Zellen, Mesangial- und vaskuläre Glattmuskelzellen. Die Tiere mit Vhl-Defizienz in den FoxD1 $^+$ -Zellen zeigen zudem erhöhte renale EPO-mRNA-Expressionslevel und damit einhergehend erhöhte Hämatokritwerte und Plasma-EPO-Konzentrationen. Bei den *FoxD1^{+/Cre} Vhl^{f/f}*-Mäusen ist zudem bereits ab E16 eine renale EPO-mRNA-Expression vorhanden, während diese bei den Kontrolltieren erst an pp7 detektierbar war. Die EPO-exprimierenden Zellen sind im Interstitium von Cortex und äußerer Medulla lokalisiert. Zusätzlich kommt es zu einer erhöhten EPO-mRNA-Expression in den Nebennieren, wie es auch bei den Tieren mit Vhl-Defizienz in PDGFR- β^+ -Zellen beobachtet werden konnte. Die Steigerung der EPO-Produktion erfolgt dabei wiederum HIF-2-abhängig.

3.3 Induzierbarkeit der Erythropoietin-Produktion in Renin-, Mesangial- und vaskulären Glattmuskelzellen der adulten Niere

Renin-produzierende juxtaglomeruläre Zellen, intra- und extraglomeruläre Mesangialzellen und vaskuläre Glattmuskelzellen haben ihren Ursprung ebenfalls in der FoxD1-Zelllinie. Außerdem handelt es sich bei ihnen um renale Zelltypen, die wie interstitielle Fibroblasten bevorzugt die HIF-2 α -Isoform der Hypoxie induzierbaren Transkriptionsfaktoren exprimieren^{85, 117-119}. Daher stellte sich die Frage, ob diese Zellen prinzipiell auch in der Lage sind, EPO zu produzieren, ihnen jedoch unter physiologischen Umständen der Stimulus fehlt, dies zu tun. Hinweise dafür, zumindest bezüglich der Reninzellen, liefern bereits frühere Befunde, dass eine chronische Stabilisierung von HIF-2 in der Renzelllinie während der Embryonalentwicklung zu einer Induktion der EPO-Expression an juxtaglomerulärer Position führt⁸⁵.

Daher sollten im dritten Teil dieser Arbeit Renin-, Mesangial- und vaskuläre Glattmuskelzellen auf ihre Fähigkeit hin, EPO produzieren zu können, untersucht werden. Dazu sollte mittels verschiedener zelltypspezifischer Cre-Mausmodelle in jeweils einem dieser Zelltypen Vhl deletiert und so HIF-2 α stabilisiert werden.

3.3.1 Induzierbare Renin-zellspezifische Vhl-Deletion

Um Vhl spezifisch in Renin-produzierenden Zellen deletieren zu können, wurden zunächst Mäuse, die einen reversen Tetracyclin-abhängigen Transaktivator unter der Kontrolle des Reninpromotors (*mRen-rtTA2*) exprimieren, mit LC1-Mäusen verpaart, die eine Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines Tetracyclin-Response-Elements exprimieren (*LC1-Cre*). Diese *mRen-rtTA2 LC1-Cre*-Mäuse werden in dieser Arbeit kurz als *Ren^{+/-Cre}*-Mäuse bezeichnet. Die *Ren^{+/-Cre}*-Mäuse wurden dann zum einen wieder mit *mT/mG*-Reportermäusen verpaart (*Ren^{+/-Cre} mT/mG*-Mäuse), um die Spezifität der Cre-Expression überprüfen zu können. Zum anderen wurden sie mit Mäusen mit geflochtenen Vhl-Allelen verpaart (*Ren^{+/-Cre} Vhl^{f/f}*-Mäuse), um die Induzierbarkeit der EPO-Expression in Renin-exprimierenden Zellen zu untersuchen.

Zur Aktivierung der Cre-Rekombinase erhielten die *Ren^{+/-Cre} mT/mG*- und die *Ren^{+/-Cre} Vhl^{f/f}*-Mäuse im Alter von fünf Wochen für 21 Tage Doxycyclin-Hydrochlorid mit dem Trinkwasser, gefolgt von 4 Wochen ohne Doxycyclin. Als Kontrollen dienten jeweils unbehandelte Geschwistertiere.

3.3.1.1 Spezifität der Cre-Rekombinase- Expression

Die Reportermäuse wurden für immunhistochemische Untersuchungen perfundiert. Um die Lokalisation der Cre-Aktivität zu überprüfen, wurden Nierenschnitte immunhistochemisch mit Antikörpern gegen GFP als Anzeiger der Cre-Aktivität und Renin gefärbt. Die Gefäße wurden mit α -Glattmuskelaktin sichtbar gemacht. Abbildung 3.15 zeigt anhand der Gelbfärbung die Co-Lokalisation von GFP-positiven Zellen (grün, A und C) und Renin-positiven Zellen (rot, B und C). Abgesehen von den Renin-produzierenden Zellen sind keine GFP-positiven Zellen zu finden, was für die spezifische Expression der Cre-Rekombinase in $Ren^{+/iCre}$ - Mäusen spricht.

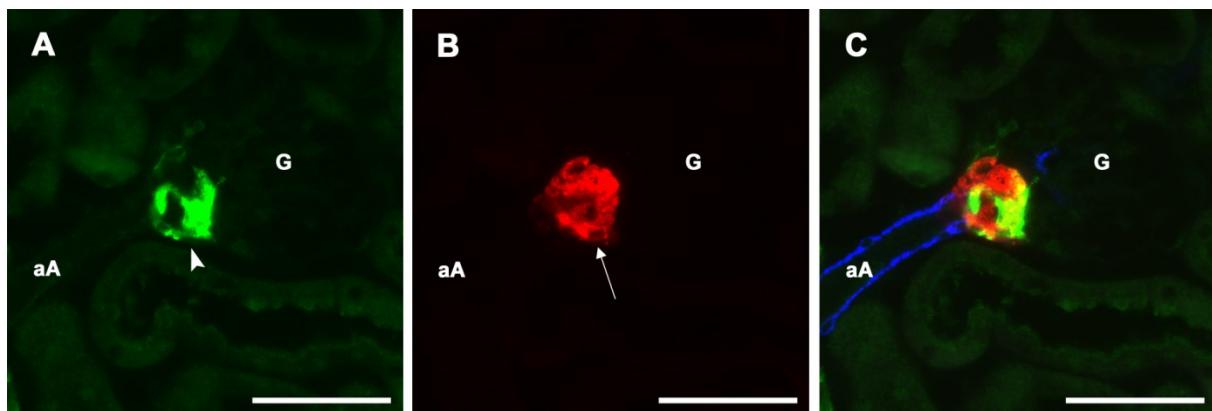


Abbildung 3.15: Immunfluoreszenzfärbung für GFP (grün), Renin (rot) und α -SMA (blau) an $Ren^{+/iCre}$ mT/mG-Reportermäusen. (A) zeigt die GFP-Färbung, (B) die Renin-Färbung und (C) die Überlagerung von GFP, Renin und α -SMA. Die GFP-Expression/Cre-Aktivität beschränkt sich auf Renin-positive Zellen. Die Pfeilspitze hebt GFP-exprimierende Zellen hervor, der Pfeil Renin-exprimierende Zellen. G Glomerulus, aA afferente Arteriole. Maßstabsbalken: 50 μ m.

3.3.1.2 Induzierbarkeit der EPO-Expression in Renin-produzierenden Zellen

Die $Ren^{+/iCre}$ $Vhl^{fl/fl}$ -Mäuse waren nach der Induktion der Vhl-Deletion mittels Doxycyclin-Behandlung stark polyzythämisch mit Hämatokritwerten von $71,9 \pm 1,0\%$, während die Kontrolltiere unauffällige Hämatokritwerte von $50,0 \pm 0,9\%$ hatten (s. Abb. 3.16 A). Die Mäuse mit Vhl-Defizienz in Renin-exprimierenden Zellen zeigten außerdem deutlich erhöhte Plasma-EPO-Konzentrationen von $1175,9 \pm 210,8$ pg/ml im Vergleich zu den Kontrollen mit $250,3 \pm 9,0$ pg/ml (s. Abb. 3.16 B). Da die erhöhten Hämatokritwerte und Plasma-EPO-Konzentrationen auf eine Induktion der EPO-Expression in den Reninzellen hindeuteten, wurden Glomeruli mit Hilfe magnetischer Dynabeads aus den Nieren Doxycyclin-behandelter und unbehandelter $Ren^{+/iCre}$ $Vhl^{fl/fl}$ -Mäuse isoliert und anschließend die EPO-mRNA-Expressionslevel bestimmt. Durch die Glomerulus-Präparation sollte sichergestellt werden, dass native interstitielle EPO-produzierende Zellen bei der quantitativen Bestimmung der mRNA-Expression nicht mitgemessen werden.

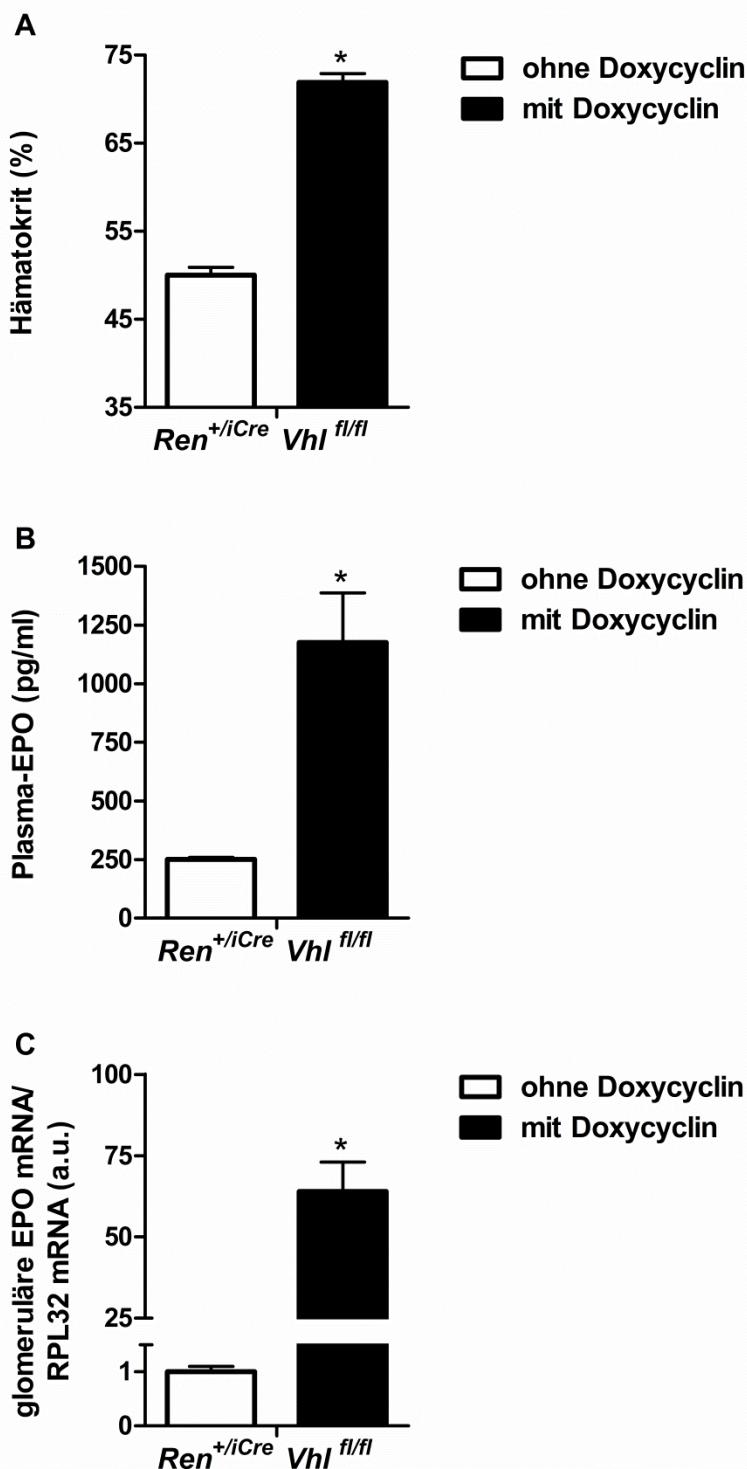


Abbildung 3.16: Hämatokritwerte (A), Plasma-EPO-Konzentrationen (B) und EPO-mRNA-Expressionslevel in den Glomerulus-Präparationen (C) von Doxycyclin-behandelten und unbehandelten $\text{Ren}^{+/i\text{Cre}}$ $\text{Vhl}^{\text{fl}/\text{fl}}$ -Mäusen. Das mRNA-Expressionslevel der unbehandelten Tiere ist auf 1 gesetzt und dient als Referenzwert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von fünf Glomerulus-Präparationen in jeder Gruppe. * indiziert $P < 0.05$ verglichen mit den nicht behandelten Kontrollmäusen.

Um außerdem Verunreinigungen der Glomerulus-Präparationen mit tubulären Strukturen auszuschließen, wurden immer auch die Expressionslevel verschiedener Tubulus-Marker mitbestimmt. Als Marker dienten Megalin für den proximalen Tubulus, der Na-K-2Cl-Cotransporter (NKCC2) für den dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife und Aquaporin 2 (AQP-2) für das Sammelrohr. Für die Bestimmung der EPO-mRNA- Expressionslevel wurden nur Glomerulus-Präparationen ohne Verunreinigungen verwendet. In den Glomeruli der Mäuse mit Renin-zellspezifischer Vhl-Deletion kam es zu einer starken Anreicherung der EPO-mRNA. Im Vergleich zu den Kontrollen war ein 64-facher Anstieg der EPO-Expression zu verzeichnen (s. Abb. 3.16 C).

3.3.2 Induzierbare Mesangial-zellspezifische Vhl-Deletion

Zur Überprüfung der Mesangialzellen auf eine mögliche Induktion der EPO-Expression nach chronischer Stabilisierung von HIF-2, wurden die unter 3.1.1 beschriebenen Tamoxifen-induzierbaren *PDGFR-β^{+/iCre}*- Mäuse verwendet, da PDGFR-β nicht nur ein Marker für interstitielle Fibroblasten, sondern auch ein typischer Mesangialzell-Marker ist¹²⁰. Diese wurden einerseits wieder mit *mT/mG*- und andererseits mit *Vhl^{f/f}*- Mäusen verpaart. Die Induktion der Cre-Aktivität erfolgte nach dem gleichen Schema wie im ersten Teil dieser Arbeit beschrieben, vier Wochen Tamoxifen-Futter, gefolgt von drei Wochen Normaldiät beginnend im Alter von acht Wochen. Als Kontrollen dienten unbehandelte Geschwistertiere.

3.3.2.1 Spezifität der Cre-Rekombinase- Expression

Die Analyse immunhistochemischer Färbungen von GFP, PDGFR-β, Renin und Glattmuskelaktin auf Nierenschnitten Tamoxifen-behandelter Reportermäuse ergab eine spezifische Expression und Aktivität der Cre-Rekombinase in PDGFR-β- exprimierenden Zellen. Abbildung 3.17 A-C zeigt, dass im Bereich der Glomeruli nur intra- und extraglomeruläre Mesangialzellen positiv für PDGFR-β (grün) sind. Renin- und vaskuläre Glattmuskelzellen hingegen sind negativ für PDGFR-β. Im Tubulo-Interstitium finden sich außerdem die PDGFR-β- exprimierenden fibroblastenartigen Zellen. Das Verteilungsmuster der GFP-positiven Zellen (s. Abb. 3.17 D-F) spiegelt die Verteilung der PDGFR-β- exprimierenden Zellen wider und beschränkt sich im Bereich der Glomeruli auf die Mesangialzellen.

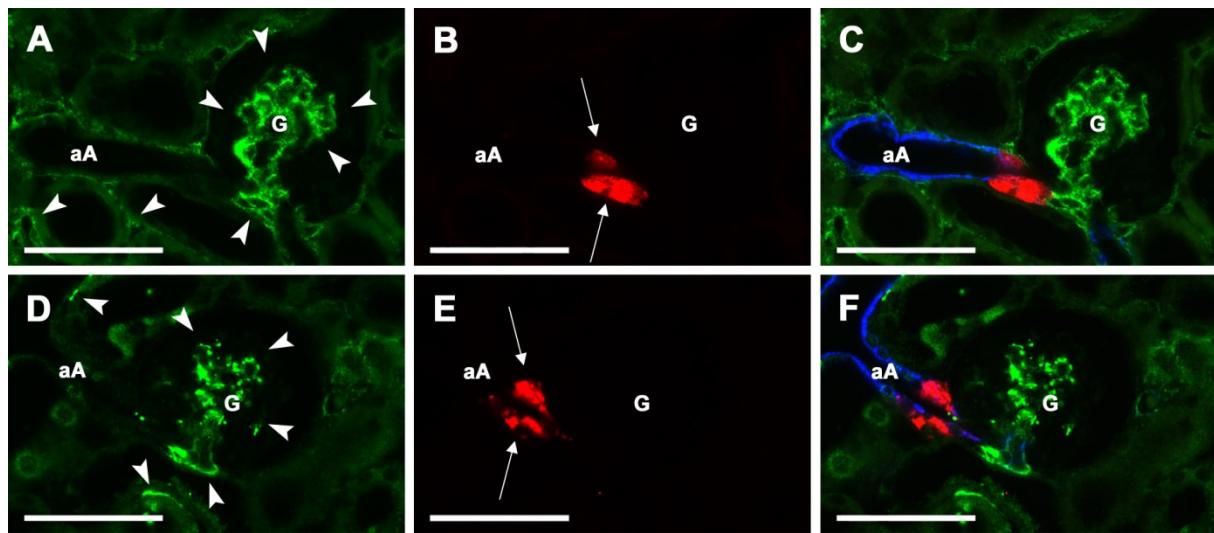


Abbildung 3.17: Immunfluoreszenzfärbung für PDGFR- β /GFP (grün), Renin (rot) und α -SMA (blau) an $PDGFR-\beta^{+/iCre} mT/mG$ -Reportermäusen. (C) zeigt die Überlagerung von PDGFR- β (A), Renin (B) und α -SMA. Intra- und extraglomeruläre Mesangialzellen, sowie tubulo-interstitielle Fibroblasten sind positiv für PDGFR- β . Renin- und vaskuläre Glattmuskelzellen sind negativ für PDGFR- β . (F) zeigt die Überlagerung von GFP (D), Renin (E) und α -SMA. Das Verteilungsmuster von GFP deckt sich mit dem von PDGFR- β . Pfeilspitzen heben in (A) PDGFR- β -, in (D) GFP-exprimierende Zellen hervor; die Pfeile zeigen Renin-exprimierende Zellen. G Glomerulus, aA afferente Arteriole. Maßstabsbalken: 50 μ m. Ausschnitte D-F modifiziert nach Gerl et al.¹²¹.

3.3.2.2 Induzierbarkeit der EPO-Expression in Mesangialzellen

Um ausschließlich die Effekte der chronischen HIF-2- Stabilisierung in den Mesangialzellen untersuchen zu können, wurden nach Beendigung des Tamoxifen-Behandlungszyklus die Glomeruli der $PDGFR-\beta^{+/iCre} Vhl^{fl/fl}$ - Mäuse und der Kontrollen isoliert und die EPO-mRNA-Expressionslevel in den Glomerulus-Präparationen bestimmt. Die Abundanz der EPO-mRNA in den isolierten Glomeruli war verglichen mit den Kontrollen in den Tamoxifen-behandelten $PDGFR-\beta^{+/iCre} Vhl^{fl/fl}$ - Mäusen um das 300-fache erhöht (s. Abb. 3.18).

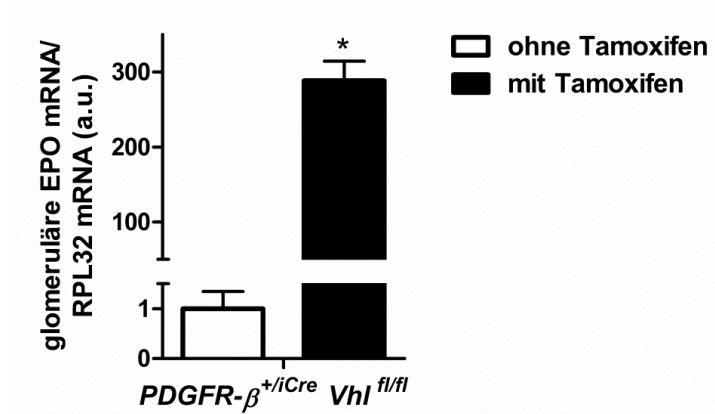


Abbildung 3.18: EPO-mRNA- Expressionslevel in den isolierten Glomeruli von Tamoxifen-behandelten und unbehandelten $PDGFR-\beta^{+/iCre} Vhl^{fl/fl}$ - Mäusen. Das mRNA-Expressionslevel der unbehandelten Tiere ist auf 1 gesetzt und dient als Referenzwert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von fünf Glomerulus-Präparationen in jeder Gruppe. * indiziert $P < 0,05$ verglichen mit den nicht behandelten Kontrollmäusen.

3.3.3 Induzierbare Glattmuskel-zellspezifische Vhl-Deletion

Um zu untersuchen, ob die Deletion von Vhl zu einer Induktion der EPO-Expression in vaskulären Glattmuskelzellen der Niere führt, wurden Mäuse verwendet, die eine Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des SM-MHC (*smooth muscle myosin heavy chain*)-Promotors exprimieren (*SM-MHC^{+/-Cre}*-Mäuse). Diese wurden einerseits mit *mT/mG*-Reportermäusen und andererseits mit *Vhl^{f/f}*-Mäusen verpaart. Die Induktion der Cre-Aktivität erfolgte wiederum durch 4-wöchige Fütterung mit Tamoxifen-Spezialfutter, gefolgt von drei Wochen Normaldiät.

3.3.3.1 Spezifität der Cre-Rekombinase- Expression

Die Reportermäuse wurden für immunhistochemische Färbungen der Nieren perfundiert und das Gewebe entsprechend in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden Nierenschnitte auf GFP, SM-MHC und Renin gefärbt, um die Spezifität der Cre-Expression analysieren zu können.

Die Färbung gegen SM-MHC zeigte, dass die arteriellen vaskulären Glattmuskelzellen sehr stark SM-MHC exprimieren. Allerdings war auch in Renin- und Mesangialzellen sowie in interstitiellen Fibroblasten/Perizyten, also den Zelltypen, die sich wie vaskuläre Glattmuskelzellen von den FoxD1⁺-Stromavorläuferzellen ableiten, eine schwache SM-MHC-Färbung zu sehen (s. Abb. 3.19 B1). Die GFP-Färbung war in den Glattmuskelzellen der Gefäße sehr ausgeprägt und deckte sich mit der SM-MHC-Färbung. Vor allem in der äußeren Medulla waren zusätzlich auch vermehrt interstitielle Zellen positiv für GFP (s. Abb. 3.19 A). Kortikale Detailaufnahmen der Cofärbung von Renin und GFP zeigten, dass vereinzelt auch Renin-produzierende Zellen positiv für GFP waren (s. Abb. 3.19 B4). Es fanden sich jedoch keine GFP-positiven Zellen, die nicht gleichzeitig auch positiv für SM-MHC waren.

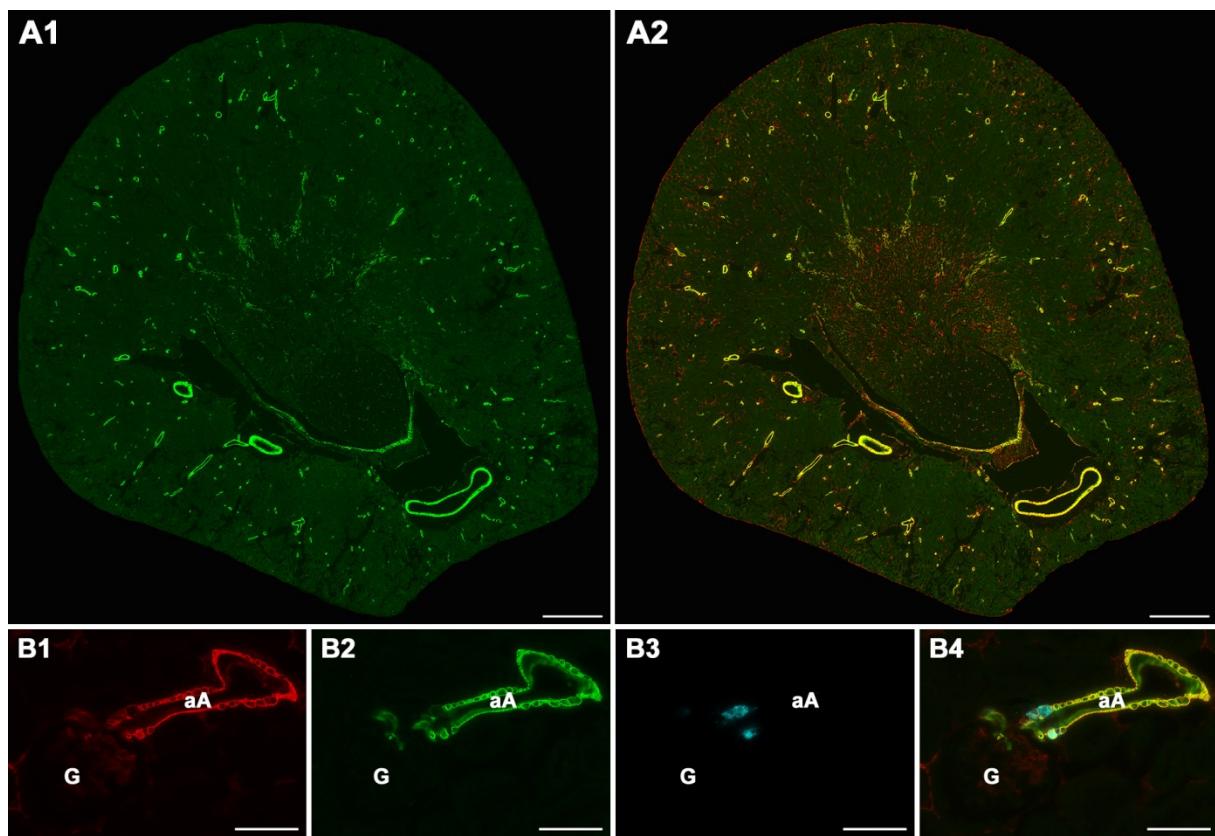


Abbildung 3.19: Immunfluoreszenzfärbung für GFP (grün), Renin (cyan) und SM-MHC (rot) an $SM\text{-MHC}^{+/\text{Cre}} mT/mG$ -Reportermäusen. (A1) zeigt die GFP-Färbung auf einem Nierenquerschnitt in der Übersicht. (A2) zeigt die Überlappung (gelb) der GFP- und SM-MHC- Färbung in der Übersicht. (B4) zeigt in einer Detailaufnahme die Überlagerung der Färbungen gegen SM-MHC (B1), GFP (B2) und Renin (B3). Sowohl die vaskulären Glattmuskelzellen größerer Gefäße, als auch interstitielle SM-MHC-positive Zellen sind positiv für GFP. Die meisten interstitiellen GFP-positiven Zellen sind in der äußeren Medulla lokalisiert. Die GFP-Expression/Cre-Aktivität beschränkt sich auf SM-MHC-positive Zellen. G Glomerulus, aA afferente Arteriole. Maßstabsbalken in A1, A2: 500 µm. Maßstabsbalken in B1-B4: 50 µm.

3.3.3.2 Induzierbarkeit der EPO-Expression in vaskulären Glattmuskelzellen

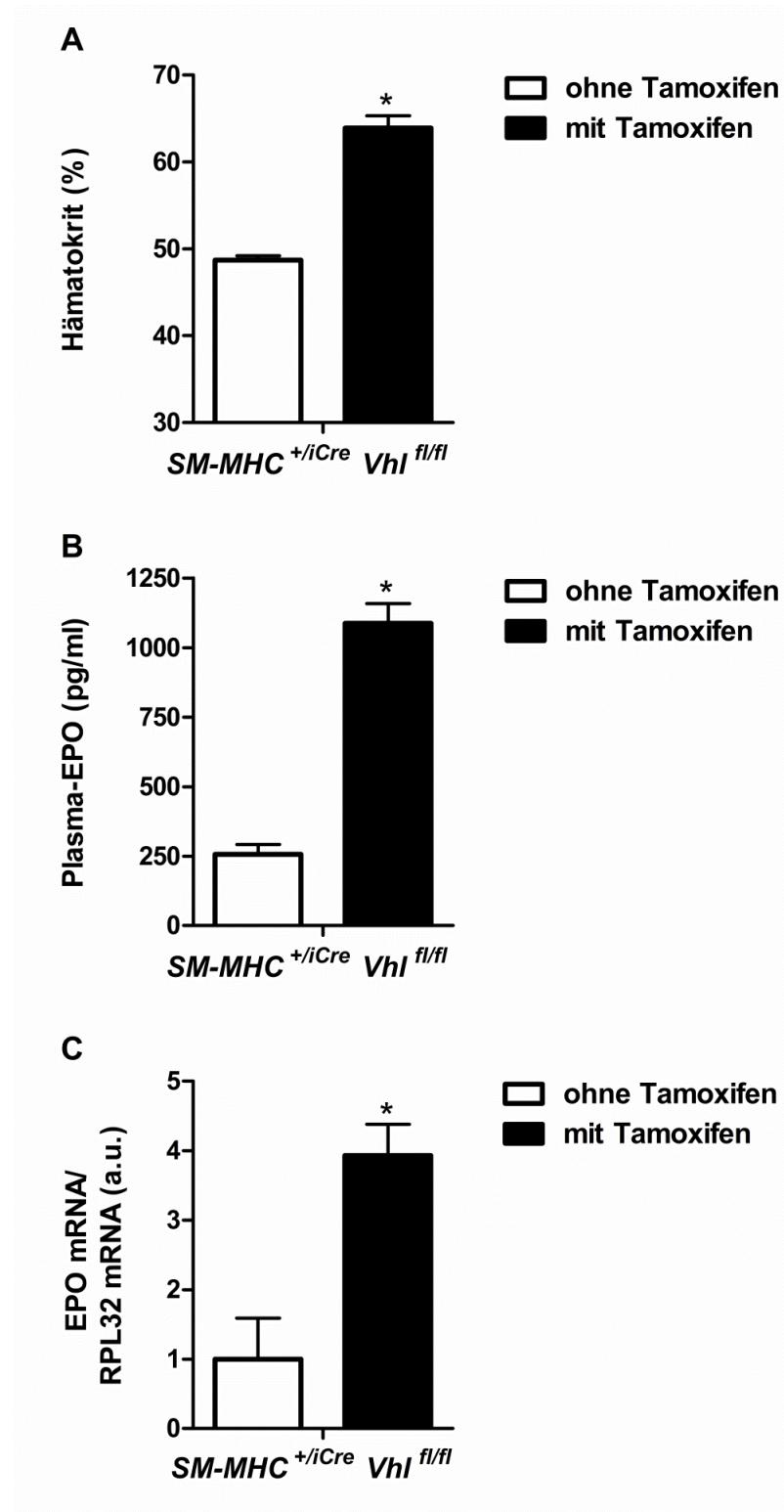


Abbildung 3. 20: Hämatokritwerte (A), Plasma-EPO- Konzentrationen (B) und EPO-mRNA- Expressionslevel in den Glomerulus-Präparationen (C) von Tamoxifen-behandelten und unbehandelten $SM\text{-}MHC^{+/iCre}$ $Vhl^{fl/fl}$ - Mäusen. Das mRNA-Expressionslevel der unbehandelten Tiere ist auf 1 gesetzt und dient als Referenzwert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von fünf Tieren in jeder Gruppe. * indiziert $P < 0,05$ verglichen mit den nicht behandelten Kontrollmäusen.

Die Tamoxifen-behandelten $SM\text{-}MHC^{+/\text{Cre}} Vhl^{fl/fl}$ - Mäuse waren polyzythämisch mit Hämatokritwerten von $63,9 \pm 1,4\%$, während die unbehandelten Kontrolltiere normale Hämatokritwerte von $48,7 \pm 0,5\%$ aufwiesen. Einhergehend mit den erhöhten Hämatokritwerten waren auch die Plasma-EPO- Konzentrationen dieser Tiere auf $1086,9 \pm 71,3$ pg/ml angestiegen (Kontrollen: $256,8 \pm 35,6$ pg/ml). Die renalen EPO-mRNA- Expressionslevel waren in etwa vervierfacht (s. Abb. 3.20 A-C).

Eine Analyse der zonalen Verteilung der EPO-mRNA- Expression ergab, dass der Anstieg der EPO-mRNA- Abundanz hauptsächlich auf eine erhöhte Expression im Bereich von innerem Cortex und äußerer Medulla zurückzuführen war (s. Abb. 3.21).

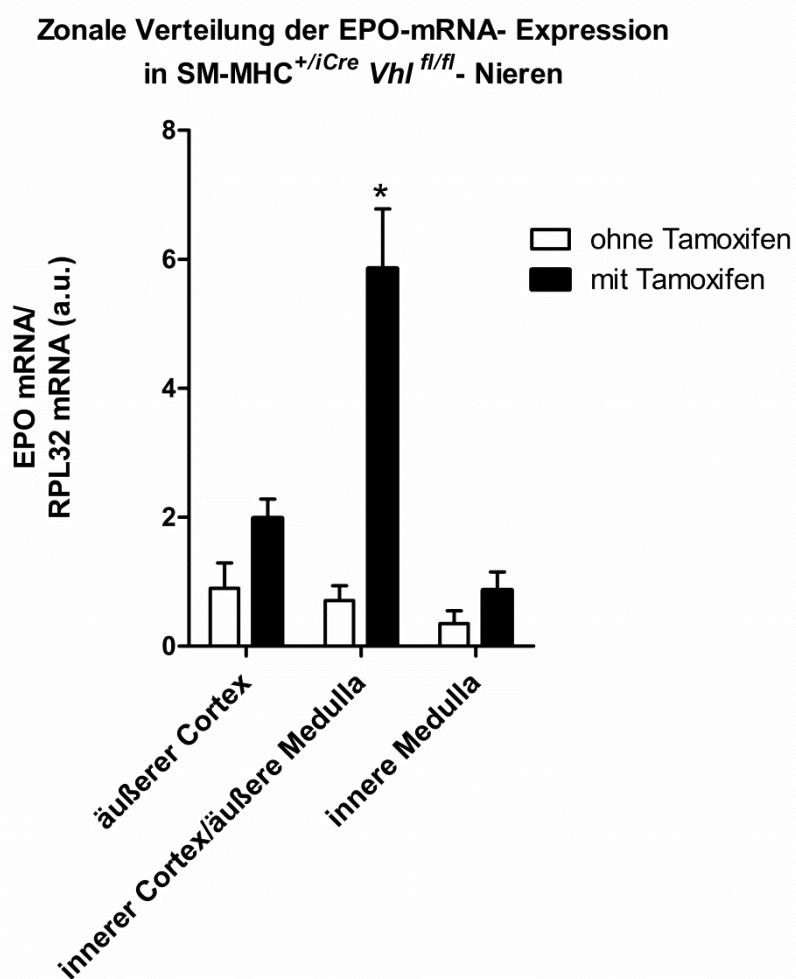


Abbildung 3. 21: Zonale Verteilung der renalen EPO-mRNA- Expressionslevel von Tamoxifen-behandelten und unbehandelten $SM\text{-}MHC^{+/\text{Cre}} Vhl^{fl/fl}$ - Mäusen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von fünf Mäusen in jeder Gruppe. * indiziert $P < 0,05$ verglichen mit den nichtbehandelten Tieren.

3.3.3.3 Lokalisation EPO-exprimierender Zellen in SM-MHC^{+/-Cre} Vhl^{f/f}- Nieren

Um den Ort der erhöhten EPO-Synthese in den Nieren mit Vhl-Defizienz in den vaskulären Glattmuskelzellen genauer lokalisieren zu können, wurde eine EPO *in situ*-Hybridisierung nach dem RNAscope-Protokoll durchgeführt.

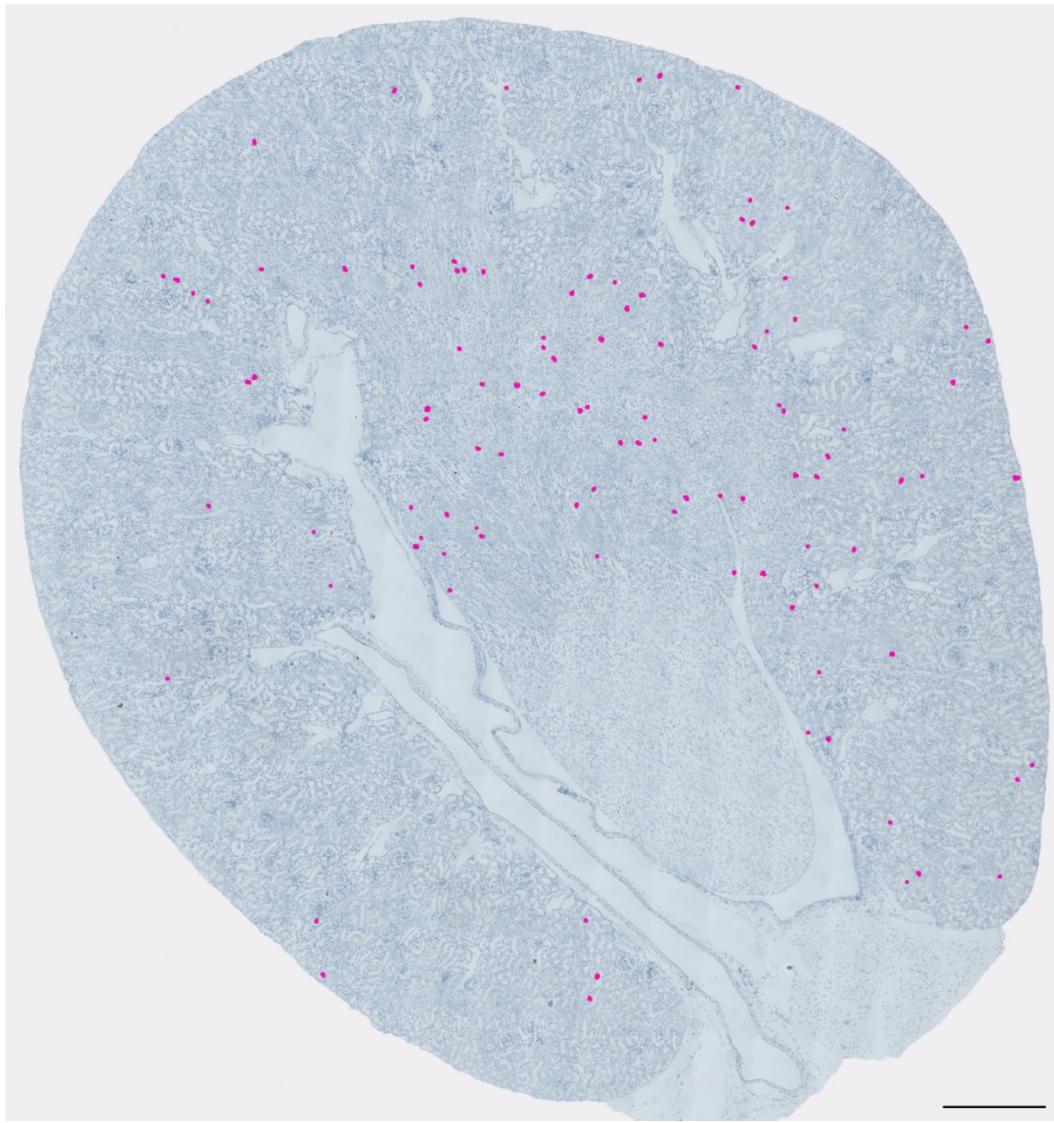


Abbildung 3.22: EPO-mRNA *in situ*-Hybridisierung am Nierenquerschnitt einer Tamoxifen-behandelten SM-MHC^{+/-Cre} Vhl^{f/f}- Maus. Um die nativen EPO-Signale besser sichtbar zu machen, wurden sie nachträglich pink markiert. Die meisten EPO-positiven Zellen finden sich im Interstitium der äußeren Medulla. Im Interstitium des Cortex sind vereinzelt ebenfalls EPO-produzierende Zellen zu sehen. Vaskuläre Glattmuskelzellen der größeren arteriellen Gefäße, sind jedoch negativ für EPO. Maßstabsbalken: 500 µm.

Dabei fiel auf, dass die EPO-mRNA- Expression hauptsächlich in interstitiellen Zellen der äußeren Medulla erfolgte. Im Übergangsbereich von innerem Cortex zu äußerer Medulla, also dem Bereich der nativen EPO-Produktion, waren ebenfalls einige EPO-positive Zellen zu finden. Vereinzelt fanden sich außerdem EPO-exprimierende Zellen im Interstitium des

äußerem Cortex. Die Glattmuskelzellen der größeren arteriellen Gefäße waren hingegen negativ für EPO (s. Abb. 3.22). Die zonale Verteilung und Häufigkeit EPO-exprimierender Zellen deckte sich verhältnismäßig mit der Verteilung und Anzahl GFP-positiver interstitieller Zellen, die in den $SM\text{-}MHC^{+/iCre}$ mT/mG - Reportermäusen zu sehen waren (vgl. Abb. 3.19 A1).

Auf Schnitten unbehandelter $SM\text{-}MHC^{+/iCre}$ $Vhl^{fl/fl}$ - Nieren waren im Vergleich deutlich weniger Zellen positiv für EPO. Diese befanden sich wie erwartet im Grenzbereich von innerem Cortex zu äußerer Medulla (Daten nicht gezeigt).

Da die vaskulären Glattmuskelzellen bezüglich ihrer Herkunft mit den Perizyten verwandt sind und sie sich auch anhand der Expression von Markerproteinen nicht unterscheiden lassen^{49, 122}, sollte untersucht werden, ob es sich bei den interstitiellen EPO-positiven Zellen um Perizyten handeln könnte. Aufgrund der periendothelialen Lage von Perizyten um die Blutkapillaren herum⁴⁹, wurden Nierenschnitte der $SM\text{-}MHC^{+/iCre}$ - Reportermäuse auf GFP und den Endothelzellmarker CD31 cogefärbt. Außerdem wurden Nierenschnitte von Mäusen mit glattmuskelzellspezifischer Vhl-Defizienz, auf denen eine EPO-mRNA *in situ*- Hybridisierung durchgeführt worden war, zusätzlich auf CD31 gefärbt. Zudem wurde eine Cofärbung gegen den Perizytenmarker PDGFR-β und GFP auf Reporter-Nierenschnitten durchgeführt.

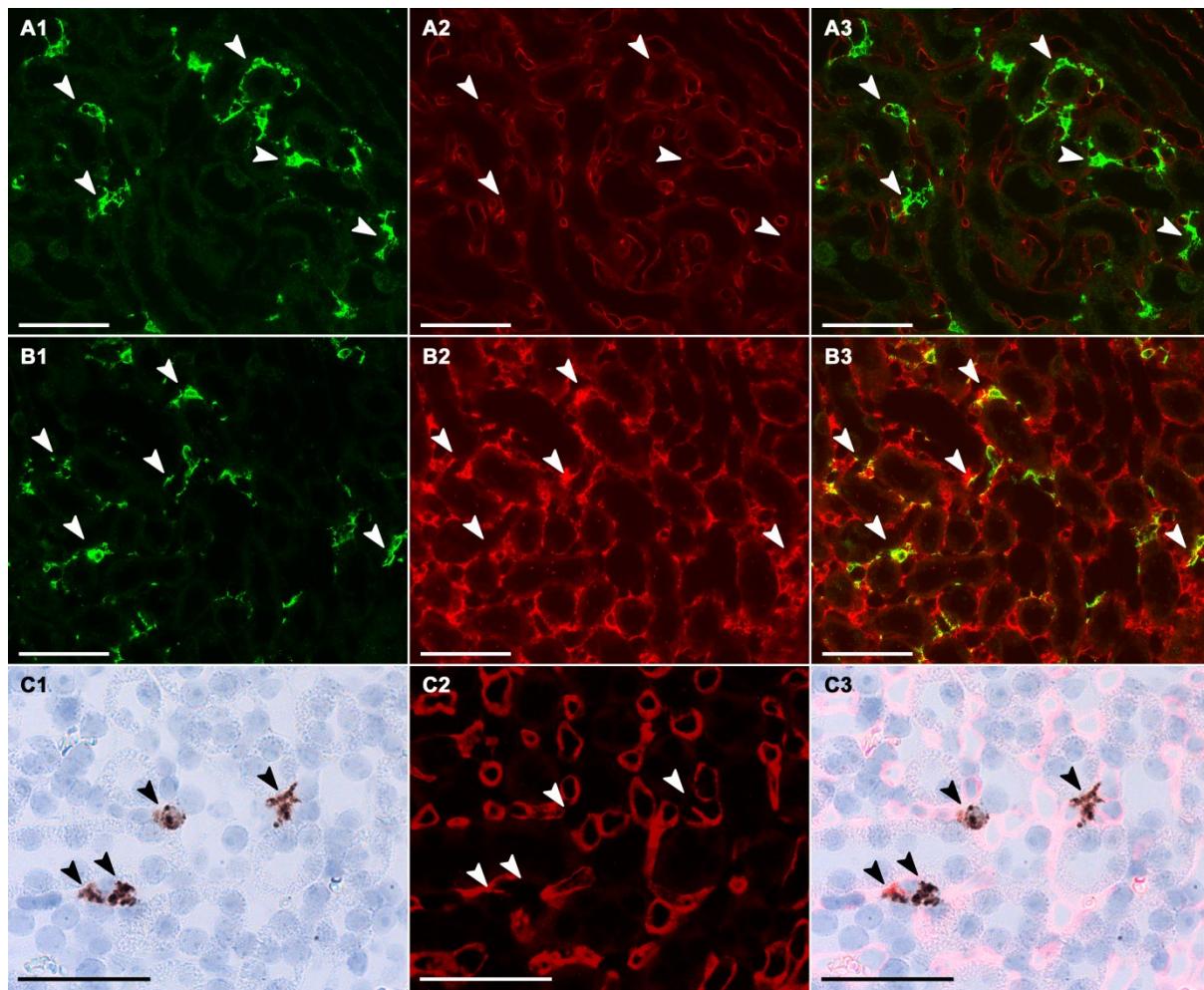


Abbildung 3.23: Identifikation interstitieller EPO-exprimierender Zellen in den Nieren von Mäusen mit Vhl-Defizienz in vaskulären Glattmuskelzellen anhand verschiedener Cofärbungen auf Schnitten von Tamoxifen-behandelten $SM\text{-}MHC^{+/\text{Cre}}$ mT/mG - und $SM\text{-}MHC^{+/\text{Cre}}$ $Vhl^{fl/fl}$ -Mäusen. (A) Cofärbung von GFP (grün, A1) und CD31 (rot, A2) an Nierenschnitten (Ausschnitt äußere Medulla) von Reportermäusen. In (A3) ist die Überlagerung von GFP und CD31 dargestellt. Die GFP-positiven Zellen befinden sich immer in enger räumlicher Nähe zu CD31-positiven Endothelzellen. Es kommt jedoch zu keiner Überlappung der GFP-Färbung mit der CD31-Färbung. (B) Cofärbung von GFP (grün, B1) und PDGFR- β (rot, B2) an Nierenschnitten (Ausschnitt äußere Medulla) von Reportermäusen. Die GFP-positiven Zellen sind gleichzeitig auch positiv für PDGFR- β , wie die gleichzeitige Darstellung beider Färbungen anhand der Gelbfärbung in (B3) zeigt. (C) Kombination aus chromogener EPO *in situ*-Hybridisierung (braunes Signal, C1) und CD31-Färbung (rot, C2) auf einem Nierenschnitt (Ausschnitt der äußeren Medulla) einer Tamoxifen-behandelten $SM\text{-}MHC^{+/\text{Cre}}$ $Vhl^{fl/fl}$ -Maus. Die EPO-positiven Zellen befinden sich in unmittelbarer Nähe zu den CD31-positiven Endothelzellen (C3). Pfeilspitzen heben GFP (A, B)- bzw. EPO (C)-positive Zellen und die entsprechenden korrespondierenden Stellen hervor. Maßstabsbalken: 50 µm.

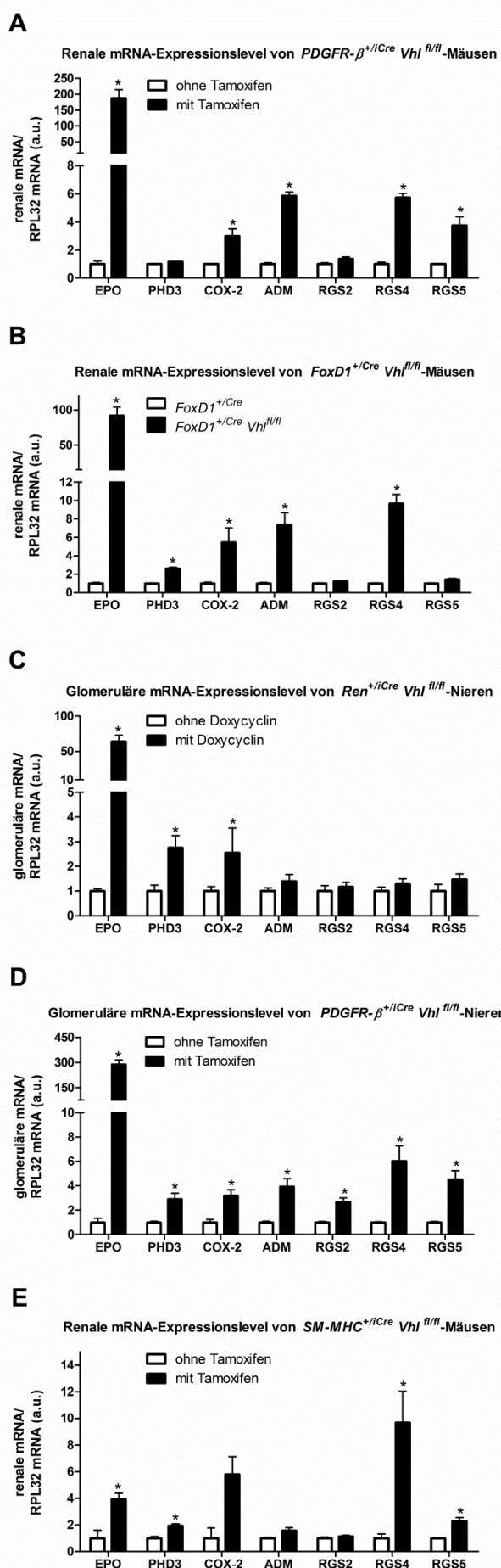
Wie Abbildung 3.23 zeigt, befanden sich die interstitiellen GFP-positiven Zellen (grün, A3) der Glattmuskelzelllinie in unmittelbarer Nachbarschaft zu den CD31-markierten Blutkapillaren (rot, A3). Außerdem waren die GFP-positiven Zellen gleichzeitig positiv für PDGFR- β (siehe Gelbfärbung B3). Die Nierenschnitte der Tamoxifen-behandelten $SM\text{-}MHC^{+/\text{Cre}}$ $Vhl^{fl/fl}$ -Mäuse zeigten zudem eine enge räumliche Nähe von EPO-exprimierenden Zellen zu Blutkapillaren (C3).

3.3.4 Zusammenfassung

Da Renin-, Mesangial- und vaskuläre Glattmuskelzellen neben den interstitiellen Fibroblasten/Perizyten ebenfalls zur FoxD1-Zelllinie gehören, sollte untersucht werden, ob diese Zellen prinzipiell auch in der Lage sind, EPO zu exprimieren. Dazu wurde mittels verschiedener Mausmodelle zelltypspezifisch HIF-2 durch die Deletion von Vhl stabilisiert, um so eine mögliche Induktion der EPO-Expression untersuchen zu können. Die Analyse der Hämatokritwerte, Plasma-EPO-Konzentrationen und der glomerulären EPO-mRNA-Expressionslevel ergab, dass die HIF-2-Stabilisierung in einer EPO-Produktion in Renin- und Mesangialzellen resultiert. Auch in den Nieren der Tiere mit Vhl-Defizienz in den Glattmuskelzellen war eine erhöhte EPO-Gentranskription feststellbar. Die Synthese von EPO war jedoch nur in interstitiellen perizytenartigen Zellen induzierbar, nicht in den Glattmuskelzellen größerer Blutgefäße.

3.4 Hypoxie-induziertes Expressionsmuster

Die Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktoren regulieren generell in allen Zelltypen die Genexpression unter Hypoxie. Dabei sind die HIF-regulierten Gene unter anderem in die Regulation der Apoptose, der Angiogenese, der mitochondrialen Atmungskette oder der Glykolyse involviert. Jedoch unterscheiden sich die verschiedenen HIF-Isoformen hinsichtlich ihrer Spezifität für verschiedene Zielgene. HIF-1 α spielt zum Beispiel eine größere Rolle für die Regulation der Glykolyse, während HIF-2 α die Erythropoiese über die Expression von EPO reguliert²⁷. Die Prolylhydroxylase 3 (PHD3), die Regulatoren des G-Protein-Signalwegs (RGS) 2, 4 und 5, die Matrixmetalloproteininasen (MMP) 2 und 13, der Stammzellfaktor Oct3/4, Adrenomedullin (ADM) und die Cyclooxygenase-2 (COX-2) sind ebenfalls bekannte HIF-2-regulierte Gene^{37, 123-130}. Daher sollte im Folgenden untersucht werden, ob die Stabilisierung von HIF-2 in den untersuchten Mausmodellen neben der Induktion der EPO-Expression auch zu einer erhöhten Transkription weiterer HIF-2-regulierter Gene führt. Dazu wurden die renalen oder glomerulären Expressionslevel von PHD3, RGS2, 4 und 5, ADM und COX-2 mittels quantitativer Echtzeit-PCR in den oben beschriebenen Mausmodellen bestimmt und auf ein übereinstimmendes Expressionsmuster hin untersucht.

**Abbildung 3. 24:**

Expressionsanalyse verschiedener HIF-2-induzierter Zielgene in den verschiedenen Mausmodellen mit zellspezifischer Vhl-Deletion.

Die mRNA-Expressionslevel der Kontrollen sind auf 1 gesetzt und dienen als Referenzwerte. Zum Vergleich sind auch die EPO-mRNA-Expressionslevel gezeigt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von fünf Tieren in jeder Gruppe. * indiziert $P < 0,05$ verglichen mit den entsprechenden Kontrollmäusen. Bitte unterschiedliche Skalierung der y-Achsen beachten! Abbildung modifiziert nach Gerl et al.¹²¹.

In den Nieren mit Vhl-Defizienz in den PDGFR- β^+ -Zellen waren die Expressionslevel von COX-2, ADM und RGS4 und 5 verglichen mit den Kontrolltieren um einen Faktor von drei bis sechs erhöht. Die Genexpression von PHD3 und RGS2 war unverändert (s. Abb. 3.24 A).

Bei den Tieren mit Vhl-Defizienz in der FoxD1-Zelllinie waren die renalen Expressionslevel von COX-2, ADM und RGS4 ebenfalls angestiegen. Auch die Expression von PHD3 war erhöht, wohingegen RGS2 und 5 keine Veränderung hinsichtlich ihres Expressionslevels aufwiesen (s. Abb. 3.24 B).

Um bei den Tieren mit reninzellspezifischer Vhl-Deletion Veränderungen der Genexpression in den Renin-produzierenden Zellen möglichst genau bestimmen zu können, wurde die glomeruläre mRNA-Expression untersucht. Auch für die Bestimmung der mRNA-Expressionsunterschiede in den Mesangialzellen wurden die glomerulären Expressionslevel verglichen.

Die Tiere mit reninzellspezifischer HIF-2-Stabilisierung zeigten erhöhte glomeruläre Expressionslevel für PHD3 und COX-2. Die Expression von ADM und RGS2, 4 und 5 blieb auf Wildtyp-Niveau (s. Abb. 3.24 C).

In den Vhl-defizienten Mesangialzellen war die Expression aller untersuchter HIF-2-Zielgene um einen Faktor von drei bis sechs hochreguliert (s. Abb. 3.24 D).

Bei den Tieren mit Vhl-Deletion in den Glattmuskelzellen war die mRNA-Abundanz von PHD3, RGS4 und RGS5 erhöht. Außerdem ließ sich für das Expressionslevel von COX-2 ein tendenzieller Anstieg erkennen (s. Abb. 3.24 E).

Beim Vergleich der verschiedenen Genotypen untereinander fiel auf, dass insbesondere die Expressionslevel von RGS4 und COX-2 hochreguliert waren. Auch die mRNA-Abundanz von PHD3 und ADM war meist verglichen mit den entsprechenden Kontrollen erhöht. RGS5 war nach Vhl-Deletion sowohl in interstitiellen perizytenartigen Zellen und Mesangialzellen als auch in den vaskulären Glattmuskelzellen hochreguliert. Auf die Regulation der Genexpression von RGS2 schien die Stabilisierung von HIF-2 hingegen weniger Einfluss zu haben.

4 Diskussion

Das Glykoproteinhormon Erythropoietin ist von essentieller Bedeutung für eine ausreichende Sauerstoffversorgung des Körpers, indem es die Proliferation und Differenzierung erythroider Progenitorzellen zu reifen Erythrozyten reguliert. Während der Embryonalentwicklung wird EPO größtenteils in der Leber gebildet, in etwa ab der Geburt werden jedoch die Nieren zum Hauptproduktionsort von EPO^{10, 23}. Bei den EPO-produzierenden Zellen der Niere handelt es sich unter Normoxie um wenige interstitielle fibroblastenartige Zellen, die peritubulär im Grenzbereich zwischen Cortex und Medulla lokalisiert sind^{59, 60}. Unter Hypoxie kommt es zur Rekrutierung weiterer EPO-exprimierender Zellen^{16, 69}. Hauptregulator der EPO-Genexpression ist der Transkriptionsfaktor HIF-2α^{12, 24-26}. Morphologisch betrachtet besitzen die EPO-produzierenden Zellen einen verhältnismäßig kleinen Zellkörper mit langen dünnen Fortsätzen, die sich in engem Kontakt zu benachbarten Tubuli und Blutkapillaren befinden^{59, 62}. Sie exprimieren einerseits typische Fibroblasten-/Perizytenmarker wie CD73 und PDGFR-β^{59, 60, 62}, andererseits konnte auch die Expression neuronaler Marker wie NFL und MAP2 gezeigt werden¹³. Hinsichtlich der Expression ihrer Marker scheinen die EPO-produzierenden Zellen insgesamt gesehen allerdings keine homogene Zellpopulation darzustellen⁶². Kontrovers diskutiert wird auch die Abstammung der EPO-bildenden Zellen. Einige Befunde sprechen für eine Abstammung aus der Neuralleiste⁷³, während andere eine Abstammung von der mesenchymalen FoxD1⁺-Stromavorläuferzellpopulation nahe legen^{74, 75}.

Da interstitielle PDGFR-β⁺- Fibroblasten/Perizyten sehr zahlreich in der gesamten Niere und auch in vielen anderen Organen zu finden sind, stellte sich die Frage, welchen quantitativen Beitrag die PDGFR-β⁺- Zellen der Niere zur renalen EPO-Produktion leisten und ob es möglicherweise auch in anderen Organen PDGFR-β⁺- Zellen gibt, die prinzipiell in der Lage wären, EPO zu exprimieren, dies aber auf Grund physiologischer Bedingungen nicht tun. Außerdem sollte auch untersucht werden, ob sich die PDGFR-β⁺- EPO-exprimierenden Zellen aus der Neuralleiste ableiten. Zur Beantwortung dieser Fragen diente ein Mausmodell, in dem mittels Vhl-Deletion die HIF-α- Untereinheiten spezifisch in PDGFR-β-exprimierenden Zellen unabhängig vom Sauerstoffpartialdruck stabilisiert wurden.

4.1 Erythropoietin-produzierende PDGFR- β^+ - Zellen

Die gezielte Stabilisierung der HIF- α - Untereinheiten in PDGFR- β^+ - Zellen führte zu einem enormen Anstieg der renalen EPO-Produktion, was sowohl durch deutlich erhöhte EPO-mRNA-Expressionslevel als auch durch signifikant erhöhte Plasma-EPO- Konzentrationen zum Ausdruck kam (vgl. Abb. 3.2). Der, verglichen mit den Kontrollen, 650-fache Anstieg der Plasma-EPO- Konzentrationen resultierte in einer starken Polyzythämie (Hct ca. 70%, Kontrolltiere ca. 50%; vgl. Abb. 3.2 A), wie sie auch bei bestimmten Mutationen des Vhl-Gens beim Menschen auftritt^{27, 29, 131}. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass renale PDGFR- β^+ - Zellen prinzipiell fähig sind, EPO zu produzieren, was gut mit früheren Befunden übereinstimmt^{62, 73}. Um einen quantitativen Eindruck zu erhalten, welcher Anteil der PDGFR- β^+ - Zellen nach chronischer HIF- α - Stabilisierung zur EPO-Expression beiträgt, wurde die Verteilung PDGFR- β - exprimierender Zellen in Wildtypnieren mit der Verteilung der EPO-exprimierenden Zellen in Nieren von Tamoxifen-induzierten *PDGFR- $\beta^{+/Cre}$ Vhl^{fl/fl}*-Mäusen verglichen. Die EPO-produzierenden Zellen wurden dabei mittels *in situ*-Hybridisierung nach dem RNAscope® Assay, einem sehr sensitiven und spezifischen Verfahren¹⁰⁶, detektiert. Auf den Kontrollnierenschnitten waren die EPO-positiven Zellen dabei clusterartig im Interstitium im Grenzbereich zwischen innerem Cortex und äußerer Medulla lokalisiert, wie es bereits früher beschrieben wurde^{59, 60}. Sie zeigten auch das typische sternförmige Aussehen (s. Abb. 3.4 A)^{13, 59, 62}. In den Nieren der Mäuse mit Vhl-defizienten PDGFR- β^+ - Zellen waren die EPO-exprimierenden Zellen im Interstitium des gesamten Cortex und der äußeren Medulla zu finden. Dieses Verteilungsmuster deckte sich mit der Verteilung der PDGFR- β^+ - Zellen. Im Gegensatz zu früheren Befunden^{16, 62} fanden sich in den Nieren mit Vhl-Defizienz in den PDGFR- β^+ - Zellen auch EPO-exprimierende Zellen in der Papille. Diese waren in Übereinstimmung mit der Verteilung PDGFR- β - exprimierender Zellen jedoch nur im proximalen Teil der Papille lokalisiert, die Papillenspitze war sowohl frei von EPO- als auch von PDGFR- β - exprimierenden Zellen (vgl. Abb. 3.3 und 3.4 B). Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass nach Aktivierung des HIF-Signalweges beinahe alle interstitiellen PDGFR- β^+ - Zellen EPO exprimieren können. Besonders dicht waren die EPO-exprimierenden und PDGFR- β^+ - Zellen im juxtamedullären Bereich des Cortex sowie der äußeren Medulla angesiedelt, während die Dichte im äußeren Bereich des Cortex und der inneren Medulla geringer war. Dieses Verteilungsmuster EPO-exprimierender Zellen lässt sich auch bei Anämie, Hypoxie oder pharmakologischer PHD-Inhibition erkennen^{24, 59, 62, 69, 84}, was darauf hindeutet, dass die zonale Verteilung EPO-produzierender Zellen nicht nur durch lokale Unterschiede im Sauerstoffpartialdruck²⁰, sondern auch durch die Verteilung der PDGFR- β - exprimierenden Zellen determiniert wird. Die visuelle Verteilung der EPO-produzierenden Zellen spiegelte sich auch in den EPO-mRNA- Expressionsleveln der verschiedenen Nierenzonen wider (vgl. Abb. 3.4 und 3.5).

Auf Grund einiger Anhaltspunkte, dass es sich bei den EPO-exprimierenden Zellen der Niere um eine heterogene Zellpopulation handelt und nur ein Teil davon PDGFR- β exprimiert⁶², wurde untersucht, ob es in der Niere neben den PDGFR- β^+ -Zellen noch andere Zellen gibt, die fähig sind, EPO zu exprimieren. Dazu wurde Tieren mit HIF-2 α -Deletion in PDGFR- β^+ -Zellen sowie Kontrolltieren der Prolylhydroxylase-Inhibitor ICA intraperitoneal injiziert, um die EPO-Expression zu stimulieren^{24, 82}, und vier Stunden später die renale EPO-mRNA-Abundanz bestimmt. Im Gegensatz zu den *PDGFR- $\beta^{+/iCre}$* -Kontrolltieren, bei denen ein 12-facher Anstieg der renalen EPO-mRNA-Expression messbar war, führte die PHD-Inhibierung in den Nieren der Tamoxifen-induzierten *PDGFR- $\beta^{+/iCre}$ HIF2 $\alpha^{fl/fl}$* -Tiere nicht zur Induktion der EPO-Gentranskription (s. Abb. 3.6). Dieser Befund legt den Schluss nahe, dass es zumindest als Reaktion auf akute Prolylhydroxylase-Hemmung außer den interstitiellen PDGFR- β^+ -Zellen keine weiteren renalen Zellen gibt, die EPO produzieren können.

Des Weiteren konnte HIF-2 als essentieller Transkriptionsfaktor für die Stimulation der EPO-Genexpression bestätigt werden^{12, 24-26, 132-135}. Dies zeigt sich darin, dass sowohl Tiere mit gleichzeitiger Vhl- und HIF-2 α -Defizienz als auch Tiere mit alleiniger HIF-2 α -Deletion in PDGFR- β^+ -Zellen anämisch wurden (s. Abb. 3.2 und Abb. 3.6 A). Bei den Tamoxifen-induzierten *PDGFR- $\beta^{+/iCre}$ HIF-2 $\alpha^{fl/fl}$* -Mäusen war die renale EPO-mRNA-Expression sogar unterhalb des detektierbaren Levels (s. Abb. 3.6 B). Die Ausbildung einer renalen Anämie auf Grund unzureichender renaler EPO-Produktion durch den Verlust von HIF-2 α in den interstitiellen PDGFR- β^+ -Zellen spiegelt zudem experimentelle und klinische Erfahrungen wider, die zeigen, dass extrarenal gebildetes EPO nicht ausreicht, um einen Verlust der EPO-Expression in den Nieren auszugleichen^{14, 76-78, 136}.

Da PDGFR- β^+ -Zellen nicht nur in der Niere, sondern auch in vielen anderen Organen zu finden sind^{114, 115}, wurde zudem untersucht, ob die EPO-Expression auch in PDGFR- β -exprimierenden Zellen anderer Organe induzierbar ist. Tatsächlich war in vielen Organen, wie Herz, Milz, Lunge, Gehirn und Nebennieren, PDGFR- β -mRNA-Expression detektierbar, eine Induktion der EPO-Expression auf Grund der Vhl-Deletion in PDGFR- β^+ -Zellen war jedoch, abgesehen von den Nieren, nur in den Nebennieren zu finden (s. Abb. 3.7). Die EPO-mRNA-Abundanz war in den Nebennieren jedoch deutlich geringer als in den Nieren der Tamoxifen-behandelten *PDGFR- $\beta^{+/iCre}$ Vhl $^{fl/fl}$* -Mäuse. Die EPO-positiven Zellen fanden sich in der Nebenniere, ähnlich wie in der Niere, größtenteils im kortiko-medullären Bereich. Vereinzelt waren EPO-exprimierende Zellen aber auch im Cortex und der Medulla zu sehen. Diese Verteilung der EPO-positiven Zellen entsprach dabei wiederum dem Verteilungsmuster der PDGFR- β -exprimierenden Zellen in der Nebenniere. Allerdings schien im Gegensatz zur Niere nicht jede PDGFR- β^+ -Zelle auch EPO zu exprimieren (vgl. Abb. 3.8). Dies könnte jedoch auch daran liegen, dass die EPO-Gentranskriptionsrate pro

Zelle möglicherweise in der Nebenniere geringer ist als in der Niere und dadurch nicht jede Zelle als EPO-positiv detektiert werden konnte, insbesondere wenn im Nebennierenanschnitt nur ein Fortsatz der entsprechenden Zelle zu sehen ist. Eine mögliche Erklärung dafür, dass neben den PDGFR- β^+ -Zellen der Niere nur PDGFR- β^+ -Zellen der Nebenniere nach Vhl-Deletion fähig sind, EPO zu exprimieren, könnte in der evolutionären Verwandtschaft beider Organe durch ihre Entwicklung aus dem adrenogonadalen Primordium zu finden sein^{137, 138}.

Auf Grund früherer Befunde, die auf einen neuronalen Ursprung renaler EPO-produzierender Zellen hinweisen, wie zum Beispiel die Expression neuronaler Marker wie MAP2 und NFL^{13, 73}, wurde außerdem eine mögliche Abstammung EPO-exprimierender Zellen aus der Neuralleiste untersucht. Dafür wurde ein Mausmodell verwendet, in dem Zellen, die sich aus der Neuralleiste ableiten, EYFP exprimieren. Als Neuralleistenmarker diente die Expression des Transkriptionsfaktors Sox10^{98, 99, 139}. Durch den Vergleich des Verteilungsmusters von renalen EYFP-positiven Zellen, also Zellen mit Ursprung in der Neuralleiste, mit dem Verteilungsmuster EPO-exprimierender Zellen in Nieren von Tamoxifen-induzierten $PDGFR-\beta^{+/iCre} Vhl^{fl/fl}$ -Mäusen sollte eine mögliche Überlappung analysiert werden. Es war jedoch keine Übereinstimmung des Expressionsmusters von EYFP mit dem von EPO zu erkennen (s. Abb. 3.9). Ein Ursprung EPO-exprimierender Zellen in der Neuralleiste konnte somit nicht bestätigt werden.

4.2 Erythropoietin-Produktion in renalen Stromavöräuferzellen

Es gibt jedoch auch Befunde, die für eine Abstammung der renalen EPO-exprimierenden Zellen aus der FoxD1 $^+$ -Stromavöräuferzellpopulation sprechen^{74, 75}. Aus den FoxD1 $^+$ -Progenitorzellen entwickeln sich interstitielle Fibroblasten und Perizyten, Mesangialzellen, Renin-produzierende Zellen und vaskuläre Glattmuskelzellen^{58, 88, 95}. Da die bisherigen Befunde darauf hindeuten, dass die interstitiellen PDGFR- β^+ -Zellen der Niere sehr wahrscheinlich die einzigen renalen Zellen sind, die physiologisch EPO produzieren und zudem eine Abstammung der EPO-produzierenden Zellen aus der Neuralleiste nicht bestätigt werden konnte, sollte untersucht werden, ob sich die renalen EPO-exprimierenden Zellen aus der FoxD1 $^+$ -Stromavöräuferzellpopulation ableiten. Dazu sollte untersucht werden, ob die Deletion von Vhl in FoxD1 $^+$ -Zellen zu einer Induktion der EPO-Expression in diesen Zellen führt. Zunächst wurde jedoch mittels doppelt-fluoreszenter *mT/mG*-Reportermäuse untersucht, welche Zellen sich aus der FoxD1-Zelllinie ableiten. *FoxD1 $^{+/Cre} mT/mG$* -Mäuse exprimieren in allen FoxD1 $^+$ -Zellen, in denen die Cre-Rekombinase aktiv war sowie deren Nachkommen, GFP. Wie erwartet, bestätigten Co-Immunfluoreszenzfärbungen (s. Abb. 3.10) die Abstammung von Renin-produzierenden Zellen, Mesangialzellen,

vaskulären Glattmuskelzellen und interstitiellen fibroblastenartigen Zellen aus der FoxD1-Zelllinie^{58, 88, 95} und somit auch die Spezifität der verwendeten Cre-Rekombinase⁸⁸.

Da die *FoxD1^{+/Cre} Vhl^{f/f}*- Tiere im Alter von 10-12 Tagen nach der Geburt verstarben, wurden die Versuche mit diesen Tieren an Tag 7 nach der Geburt durchgeführt. Die Stabilisierung der HIF-α- Untereinheiten in der FoxD1-Zelllinie mittels Vhl-Deletion führte, verglichen mit den Kontrolltieren, zu einem deutlichen Anstieg der renalen EPO-mRNA- Expression einhergehend mit erhöhten Plasma-EPO- Konzentrationen und Hämatokritwerten (s. Abb. 3.11). Ähnliche Befunde erzielten Kobayashi et al. durch die Deletion von PHD2 in FoxD1⁺- Stromavorläuferzellen. Außerdem beschrieb er passend zu den hier getätigten Beobachtungen, dass die gleichzeitige Deletion von PHD1, PHD2 und PHD3 beziehungsweise die Co-Deletion von PHD2 und PHD3 in Stromavorläuferzellen zum juvenilen Tod der Mäuse führte⁷⁵. Die Codeletion von Vhl und HIF-2α führte hingegen zu Anämie und einem fast vollständigen Verlust der renalen EPO-mRNA- Expression (vgl. Abb. 3.11). Dieser Befund bestätigt einerseits wiederum HIF-2 als den essentiellen Regulator der EPO-Gentranskription^{24, 132}, andererseits deutet das Fehlen renaler EPO-mRNA- Expression trotz Anämie darauf hin, dass sich die renalen EPO-exprimierenden Zellen ausschließlich aus der FoxD1⁺- Stromavorläuferzellpopulation ableiten^{13, 74, 75}. Unterstützt wird dieses Konzept auch durch den Befund, dass die Deletion von Vhl in FoxD1⁺-Progenitorzellen auch in den Nebennieren zur Induktion der EPO-mRNA- Expression führt (s. Abb. 3.14), wie es bereits für die Tamoxifen-induzierten *PDGFR-β^{+/iCre} Vhl^{f/f}*- Mäuse gezeigt werden konnte. Gleichzeitig spricht dieses Ergebnis dafür, dass nicht nur die PDGFR-β⁺- EPO-exprimierenden Zellen der Niere, sondern auch der Nebenniere der FoxD1-Zelllinie angehören.

Da EPO während der Embryonalentwicklung hauptsächlich in der Leber gebildet wird und die Umstellung der EPO-Produktion von der Leber auf die Niere erst etwa zum Zeitpunkt der Geburt erfolgt, wurden zusätzlich verschiedene Entwicklungsstadien hinsichtlich ihrer renalen EPO-Produktion untersucht^{9, 10, 12, 84}. Dazu wurden die renalen EPO-mRNA- Expressionslevel von *FoxD1^{+/Cre} Vhl^{f/f}*- Mäusen und entsprechenden Kontrolltieren an den Embryontagen E16 und E18, am Tag der Geburt sowie sieben Tage nach der Geburt bestimmt. Bei den Kontrolltieren war die EPO-mRNA- Expression in der Niere erst ab pp7 detektierbar, davor lag sie unterhalb des messbaren Levels. Dieser Befund passt zu dem Konzept, dass die EPO-Synthese bis zur Geburt größtenteils in der Leber stattfindet¹². Im Gegensatz dazu war das Level der EPO-mRNA- Expression in den Nieren mit Vhl-Defizienz in der FoxD1-Zelllinie bereits an E16 höher als in den Kontrollnieren sieben Tage nach der Geburt. Im weiteren Entwicklungsverlauf stieg die EPO-mRNA- Expression kontinuierlich weiter an (s. Abb. 3.12). Die zeitliche gewebespezifische Determination der EPO-Produktion, die vermutlich durch verschiedene Transkriptionsfaktoren der GATA-Familie reguliert

wird^{11, 13}, scheint bei diesen Tieren durch die chronische Stabilisierung von HIF-2 aufgehoben zu sein.

Die *in situ*-Hybridisierung zeigt, dass die EPO-produzierenden Zellen bei den *FoxD1^{+/Cre} Vhl^{f/f}*- Mäusen im peritubulären Interstitium des Cortex und der äußeren Medulla lokalisiert sind. Diese Verteilung der EPO-positiven Zellen ähnelt der Verteilung der EPO-produzierenden Zellen in den Nieren der Tiere mit Vhl-Defizienz in den PDGFR-β⁺- Zellen. Der äußere Streifen des Cortex und die innere Medulla sind im Gegensatz zu den *PDGFR-β^{+/iCre} Vhl^{f/f}*- Nieren jedoch frei von EPO-positiven Zellen. Das Fehlen EPO-produzierender Zellen im äußeren Bereich des Cortex liegt möglicherweise darin begründet, dass dieser Bereich die nephrogene Zone darstellt und die Nephrogenese an pp7 noch nicht abgeschlossen ist¹⁴⁰. So sind in dieser Zone eventuell auch die interstitiellen Zellen noch nicht ausreichend differenziert, um EPO zu produzieren. Diese Hypothese muss jedoch noch genauer untersucht werden. In den Nieren der Kontrolltiere finden sich passend zu den niedrigen EPO-mRNA- Expressionsleveln nur sehr wenige EPO-exprimierende Zellen, die sich im kortiko-medullären Grenzbereich befinden (s. Abb. 3.13), was der Lokalisation der EPO-produzierenden Zellen in der adulten Niere unter Normoxie entspricht^{59, 60}.

Zusammengenommen unterstützen diese Ergebnisse die bisherigen Befunde und sprechen für eine Abstammung der interstitiellen PDGFR-β⁺- EPO-exprimierenden Zellen der Nieren und Nebennieren aus der *FoxD1⁺*- Stromavorläuferzellpopulation.

4.3 Erythropoietin-Produktion in Renin-, Mesangial- und vaskulären Glattmuskelzellen

Neben den interstitiellen Fibroblasten und Perizyten stammen auch Renin-produzierende Zellen, Mesangialzellen und vaskuläre Glattmuskelzellen aus der *FoxD1*-Zelllinie ab. Bei diesen Zelltypen handelt es sich zudem um Zellen, die, wie die interstitiellen fibroblastenartigen Zellen, bevorzugt die HIF-2α- Isoform der Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktoren exprimieren^{85, 117-119}. Daher wurde untersucht, ob sich auch in diesen Zelltypen die EPO-Produktion durch die Deletion von Vhl induzieren lässt. Dazu wurden verschiedene induzierbare zelltypspezifische Cre-Mauslinien verwendet, deren Spezifität mittels Co-Immunfluoreszenzfärbungen bestätigt wurde (s. Abb. 3.15, 3.17 und 3.19).

Nach der Induktion der Vhl-Deletion wurden die *Ren^{+/Cre} Vhl^{f/f}*- Mäuse polyzythämisch. Parallel dazu stiegen auch die Plasma-EPO- Konzentrationen deutlich an (s. Abb. 3.16). Da für die Analyse einer möglichen Induktion der EPO-Expression in Mesangialzellen das Mausmodell mit Vhl-Defizienz in PDGFR-β⁺- Zellen verwendet wurde, in den Nieren dieser Tiere aber beinahe alle interstitiellen PDGFR-β⁺- fibroblastenartigen Zellen EPO exprimieren, war es anhand dieses Modells nicht möglich, zu untersuchen, ob eine mesangiale EPO-

Produktion zur Polyzythämie und dem Anstieg der Plasma-EPO-Konzentrationen dieser Tiere beträgt. Die Bestimmung der EPO-mRNA-Expressionslevel in den Glomeruli dieser Tiere zeigte jedoch eine starke Induktion der EPO-Expression (s. Abb. 3.18). Auch in den Glomeruli der Tiere mit reninzellspezifischer Vhl-Deletion konnte eine deutliche Erhöhung des EPO-mRNA-Expressionslevels nachgewiesen werden (s. Abb. 3.16). Diese Befunde sprechen dafür, dass sowohl in Mesangialzellen, als auch in Renin-produzierenden Zellen HIF-2-abhängig die EPO-Expression induziert werden kann.

Im Hinblick auf die Renin-exprimierenden Zellen stimmt dieser Befund gut mit früheren Resultaten von Kurt et al. überein, die zeigten, dass die konditionale Vhl-Deletion in der Reninzelllinie während der Entwicklung anstatt zu Renin-produzierenden Zellen zu EPO-exprimierenden Zellen an juxtaglomerulärer Position in der adulten Niere führt^{85, 117}. Dieses Ergebnis konnte nun noch um den Aspekt erweitert werden, dass es sich dabei wahrscheinlich nicht um ein entwicklungsbestimmtes Phänomen handelt, sondern dies auch noch in der ausgereiften adulten Niere möglich ist.

Mesangialzellen gelten als spezialisierte Perizyten, da sie in sehr engem Kontakt mit den Endothelzellen der Kapillarschleifen stehen und so die Struktur der Endothelschlingen aufrechterhalten und unter anderem den Kapillarfluss regulieren^{47, 50, 141, 142}. Diese Eigenschaften sind auch von Perizyten bekannt^{49, 122}. Zudem haben sie Marker wie PDGFR-β, CD73 und NG2 (neurales/gliales Antigen 2) mit den interstitiellen fibroblasten-/perizytenartigen Zellen gemeinsam^{47, 50, 56, 120, 143, 144}. Auch mit Renin-produzierenden Zellen haben sie viele Gemeinsamkeiten. So exprimieren sie die Reninzellmarker Cx40 (Connexin 40), Akr1b7 (Aldose-Ketose-Reduktase Familie 1, Mitglied B7) und RBP-J (Rekombinationssignal bindendes Protein für die Immunglobulin kappa J-Region)¹⁴⁵⁻¹⁵⁰. Außerdem ist bekannt, dass sich Renin-produzierende Zellen in der adulten Niere in Mesangialzellen umwandeln können¹⁰². Die Fähigkeit der Mesangialzellen zur EPO-Produktion steht daher im Einklang mit ihrer engen Verwandtschaft zu Reninzellen und Perizyten.

Von Interesse sind diese Ergebnisse auch im Hinblick darauf, dass in vielen bisherigen Studien, in denen Vhl in verschiedenen renalen Zelltypen deletiert wurde, keine Induktion einer EPO-Expression in den entsprechenden Zellen festgestellt werden konnte. Dies gilt für die Vhl-Deletion in Podozyten, Endothelzellen und allen Abschnitten des Tubulussystems^{121, 151-155}. Nur in Zelltypen, die als native EPO-produzierende Zellen bekannt sind, wie Hepatozyten, Osteoblasten oder Gliazellen, führte eine Vhl-Deletion HIF-2-abhängig zur Stimulation der EPO-Synthese^{21, 22, 132}. Hinsichtlich der hohen Effektivität der EPO-Produktion von Renin- und Mesangialzellen, die in der Entwicklung einer schweren Polyzythämie in den betroffenen Tieren zum Ausdruck kommt, könnten diese Zellen als potentielle Orte für eine renale EPO-Produktion betrachtet werden. Inwiefern diese Zellen

jedoch physiologisch in die Sauerstoff-regulierte Genexpression, die nur bei sehr niedrigen zellulären Sauerstoffpartialdrücken zum Tragen kommt, involviert sein könnten, ist hinsichtlich ihrer anatomischen Lokalisation in unmittelbarer Nähe zum arteriellen Blutfluss jedoch nur schwer zu erklären. Denkbar wäre möglicherweise eine sauerstoffunabhängige Stimulation der HIF-Gentranskription durch endogene Faktoren oder eine endogene Modulation der PHD-Aktivität¹⁵⁶⁻¹⁵⁸.

In den Nieren der Tamoxifen-induzierten $SM\text{-}MHC^{+/iCre}$ $Vhl^{fl/fl}$ - Mäuse konnte ebenfalls ein signifikanter Anstieg der EPO-mRNA- Expression einhergehend mit Polyzythämie und erhöhten Plasma-EPO- Konzentrationen detektiert werden (s. Abb. 3.20). Die *in situ*- Hybridisierung zeigte allerdings, dass der Großteil der EPO-produzierenden Zellen in diesen Nieren im Interstitium der äußeren Medulla lokalisiert war. Einige EPO-positive Zellen waren auch im Bereich der nativen EPO-Produktion zu finden. Die vaskulären Glattmuskelzellen der größeren arteriellen Blutgefäße hingegen waren negativ für EPO (s. Abb. 3.22). Cofärbungen zur Identifikation der interstitiellen EPO-exprimierenden Zellen in den $SM\text{-}MHC^{+/iCre}$ $Vhl^{fl/fl}$ - Nieren ergaben, dass es sich um Perizyten handeln könnte, da sich die EPO-positiven Zellen in unmittelbarer Nähe zu den Endothelzellen von Blutkapillaren befanden (s. Abb. 3.23)^{49, 122, 159}. Dies scheint auch unter dem Aspekt möglich zu sein, dass vaskuläre Glattmuskelzellen mit Perizyten verwandt sind und sie sich anhand der Expression ihrer Marker nicht unterscheiden lassen^{49, 58, 88, 122}. Ein weiterer Punkt, der dafür spricht, dass es sich bei diesen interstitiellen EPO-exprimierenden Zellen um perizytenartige Zellen handelt, ist die Expression des typischen Perizyten-Markers PDGFR- β ^{49, 56}, die anhand von Co-Immunfluoreszenzfärbungen auf Nierenschnitten der $SM\text{-}MHC^{+/iCre}$ mT/mG - Reportermäuse nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 3.23). Auf Grund dieser Ergebnisse scheinen die vaskulären Glattmuskelzellen, zumindest die der größeren Gefäße, nicht zur EPO-Produktion fähig zu sein. Da jedoch jede Nachweismethode in ihrer Sensitivität limitiert ist, kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass die vaskulären Glattmuskelzellen nach Vhl-Deletion prinzipiell EPO exprimieren können, jedoch nur deutlich schwächer als die anderen Zelltypen, die sich aus der FoxD1-Zelllinie ableiten.

4.4 Hypoxie-induziertes Expressionsmuster von HIF-2- Zielgenen

Da HIF-2 nicht nur die Expression von Erythropoietin reguliert, sondern zahlreiche weitere HIF-2- Zielgene bekannt sind, wurde untersucht, ob die mittels Vhl-Deletion erreichte HIF-2-Stabilisierung neben der Induktion der EPO-Expression auch zur Induktion der Expression weiterer HIF-2- regulierter Gene führt. Dazu wurden die Expressionslevel von ADM, COX-2, PHD3 und verschiedener RGS-Proteine, die als HIF-2- Zielgene gelten^{37, 123, 124, 126-128}, in den Nieren bzw. Glomeruli aller untersuchten Mausmodelle mit zelltypspezifischer Vhl-Deletion

bestimmt. Dabei fiel auf, dass COX-2 in fast allen untersuchten Mauslinien mit zellspezifischer Vhl-Defizienz, verglichen mit den jeweiligen Kontrollen, um einen Faktor von 2,5 bis 5 hochreguliert war (s. Abb. 3.24). Nur in den $SM\text{-}MHC^{+/\text{Cre}}\ Vhl^{\text{fl}/\text{f}}$ - Tieren war diese Änderung nicht signifikant (vgl. Abb. 3.24 E).

Ein ähnliches Bild ergab sich für die Gentranskription von PHD3. Abgesehen von den renalen mRNA-Expressionsleveln der Tamoxifen-behandelten $PDGFR\text{-}\beta^{+/\text{Cre}}\ Vhl^{\text{fl}/\text{f}}$ - Tiere waren die PHD3-mRNA- Expressionslevel gegenüber den Kontrollen jeweils um einen Faktor von 2 bis 3 angestiegen. Da jedoch anhand der Bestimmung der glomerulären mRNA-Expressionslevel der Tamoxifen-behandelten, im Vergleich mit den unbehandelten, $PDGFR\text{-}\beta^{+/\text{Cre}}\ Vhl^{\text{fl}/\text{f}}$ - Tieren ein 2,5-facher Anstieg der PHD3-mRNA- Expression detektiert werden konnte und dies für einen Anstieg der PHD3-Gentranskription in den Mesangialzellen spricht, ist es auch möglich, dass ein eventueller Anstieg der PHD3-Expression in den interstitiellen $PDGFR\text{-}\beta^+$ - Zellen zu gering ist, um im Vergleich der Gesamt-Nieren- mRNA detektiert werden zu können (vgl. Abb. 3.24 A und D).

Die mRNA-Expressionslevel von ADM waren, außer in den renin- und glattmuskelzell-spezifischen Vhl-defizienten Tieren, ebenfalls um einen Faktor von 4 bis 7 gegenüber den Kontrolltieren erhöht.

Für die mRNA-Expressionslevel der verschiedenen RGS-Proteine ergab sich ein differenzierteres Bild. Die Gentranskription von RGS4 war in den meisten untersuchten Mausmodellen mit zelltypspezifischer Vhl-Deletion, verglichen mit den entsprechenden Kontrollen, um einen Faktor von 5 bis 10 hochreguliert. Eine Ausnahme stellten hier nur die Doxycyclin-behandelten $Ren^{+/\text{Cre}}\ Vhl^{\text{fl}/\text{f}}$ - Mäuse dar. Hier war im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen kein Unterschied in den glomerulären RGS4-mRNA- Expressionsleveln messbar. Die mRNA-Expression von RGS5 war hingegen nur in den Tamoxifen-induzierten $PDGFR\text{-}\beta^{+/\text{Cre}}\ Vhl^{\text{fl}/\text{f}}$ - und den $SM\text{-}MHC^{+/\text{Cre}}\ Vhl^{\text{fl}/\text{f}}$ - Tieren um einen Faktor von 2 bis 4, verglichen mit den Kontrolltieren, hochreguliert. Ein Anstieg der RGS2- mRNA-Expression konnte nur in den Glomeruli der mesangialzellspezifischen Vhl- defizienten Mäuse detektiert werden (Faktor 2,5 verglichen mit den Kontrollen).

Zusammengefasst ergab sich für die mRNA-Expressionslevel von COX-2, ADM, PHD3 und RGS2, 4 und 5 nach zelltypspezifischer Vhl-Deletion folgendes Bild: die Gentranskription von RGS4, ADM, COX2 und PHD3 war nach HIF-Stabilisierung in fast allen untersuchten Mausmodellen hochreguliert, was für eine generelle HIF-2- abhängige Regulation dieser Gene spricht. RGS2 und 5 scheinen hingegen unter Hypoxie nur in bestimmten Zellen eine Rolle zu spielen. Abgesehen von den glattmuskelzellspezifischen Vhl-defizienten Tieren fällt die Induktion der Gentranskription der betrachteten HIF-regulierten Gene in den anderen untersuchten Mausmodellen jedoch deutlich geringer aus als die Induktion der EPO- Expression. Diese Befunde zur HIF-2- abhängigen Stimulation der Gentranskription von

COX-2, ADM, PHD3 und RGS4 bestätigen frühere Befunde^{37, 123, 124, 126-128}. Funktionell betrachtet, wirkt die Hochregulation von ADM, COX-2 und RGS4 auch insofern schlüssig, da es sich um Proteine handelt, die relevant für wichtige renale und glomeruläre Funktionen sind. So handelt es sich bei ADM und COX-2 um Vasodilatatoren, die an der Regulation des vaskulären Tonus beteiligt sind¹⁶⁰⁻¹⁶³. Die RGS-Proteine spielen eine wichtige Rolle für die Gefäßrelaxation und dadurch für die Regulation des Blutdrucks¹⁶⁴⁻¹⁶⁶. Möglicherweise dient die Hochregulation der Gentranskription dieser Proteine während Hypoxie dazu, die Durchblutung zu verbessern und somit eine Verbesserung der Sauerstoffversorgung zu erreichen. Der Grund für den selektiven Anstieg der verschiedenen RGS-Proteine liegt vermutlich in der zelltypspezifischen Expression von RGS2, 4 und 5¹⁶⁴.

4.5 Ausblick

Anhand dieser Daten lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass sehr wahrscheinlich alle renalen PDGFR- β^+ -Zellen fähig sind, HIF-2- abhängig EPO zu produzieren. Die EPO-exprimierenden Zellen finden sich dabei in allen Nierenzonen, sogar im proximalen Bereich der inneren Medulla. Nur die Papillenspitze ist sowohl frei von PDGFR- β^+ - als auch von EPO-produzierenden Zellen. Die PDGFR- β -exprimierenden Zellen scheinen außerdem die einzigen Zellen zu sein, die in der Niere zur EPO-Produktion beitragen, zumindest als Reaktion auf den akuten Stimulus der PHD-Inhibition. Des Weiteren konnte außerhalb der Niere nur in den PDGFR- β^+ -Zellen der Nebenniere die EPO-Gentranskription mittels Vhl-Deletion induziert werden, nicht jedoch in anderen Organen wie Lunge, Herz oder Gehirn, in denen ebenfalls viele PDGFR- β -exprimierende Zellen zu finden sind. Die Verteilung der EPO-positiven Zellen in der Nebenniere entspricht, wie in der Niere, der Verteilung der PDGFR- β^+ -Zellen, allerdings scheint hier nicht jede PDGFR- β -exprimierende Zelle auch EPO zu exprimieren. Befunde, die auf einen Ursprung der renalen EPO-produzierenden Zellen in der Neuralleiste hindeuten, konnten nicht bestätigt werden. Stattdessen konnten frühere Ergebnisse, die für eine Abstammung der EPO-exprimierenden Zellen aus der FoxD1 $^+$ -Stromavöräuferzellpopulation sprechen, weiter erhärtet werden. Die Stabilisierung von HIF-2 α mittels Vhl-Deletion in FoxD1 $^+$ -Zellen führt nämlich zum einen zu einer starken Induktion der EPO-Gentranskription in kortiko-medullären interstitiellen Zellen der Nieren und zum anderen auch zu einer Induktion der EPO-mRNA-Expression in den Nebennieren, wie es auch in den Tieren mit Vhl-Defizienz in PDGFR- β^+ -Zellen zu beobachten war. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sich auch in Mesangial- und Renin-produzierenden Zellen, die sich ebenfalls aus der FoxD1-Zelllinie ableiten, die Expression von EPO durch die Stabilisierung der HIF- α -Untereinheiten induzieren lässt. In den vaskulären Glattmuskelzellen, die sich ebenfalls aus FoxD1 $^+$ -Stromavöräuferzellen ableiten, konnte die

EPO-Expression jedoch nicht induziert werden, zumindest nicht in den Glattmuskelzellen der größeren arteriellen Gefäße. Eine Induktion der EPO-Gentranskription war hier mittels *in situ*-Hybridisierung nur in einigen perizytenartigen Zellen detektierbar. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Deletion von Vhl zusätzlich zur Induktion der EPO-Gentranskription auch zur Stimulation der Expression weiterer HIF-2-regulierter Gene wie PHD3, ADM, COX-2 und RGS4 in den untersuchten Zelltypen führt.

Weiterführend ergibt sich aus diesen Befunden die Frage, ob und falls ja, welche Signalwege zusätzlich zum HIF-Signalweg bei der Induktion der EPO-Gentranskription in Renin- und Mesangialzellen eine Rolle spielen, da die Stabilisierung von HIF-2 mittels PHD-Inhibierung allein nicht ausreicht, um eine Induktion der EPO-Expression in Renin-produzierenden Zellen zu bewirken. Dabei gilt es auch zu untersuchen, ob dies auf die Aufnahme des PHD-Inhibitors in die Zelle oder auf die Behandlungsdauer zurückzuführen sein könnte. Des Weiteren ist bislang unklar, ob die Induktion der EPO-Produktion in Renin- und Mesangialzellen prinzipiell auch wieder reversibel ist.

Vor dem Hintergrund früherer Befunde von Souma et al., die zeigen, dass sich PDGFR- β^+ -EPO-produzierende Zellen während Fibrose in Myofibroblasten umwandeln können und dadurch aber die Fähigkeit zur EPO-Produktion verlieren^{81, 135}, stellt sich außerdem die Frage, wie sich die PDGFR- β^+ -Zellen, die auf Grund der Vhl-Deletion EPO produzieren, während Fibrose verhalten und ob die chronische Aktivierung des HIF-Signalweges in diesen Zellen einen Einfluss auf das Fortschreiten der Fibrose hat. Auf Grund der großen Anzahl EPO-produzierender Zellen in den Nieren der Tamoxifen-induzierten *PDGFR- $\beta^{+/-Cre}$ Vhl^{f/f}*-Mäuse lassen sich so möglicherweise Rückschlüsse auf die Ursache der defizitären EPO-Produktion bei chronischen Nierenkrankheiten ziehen.

5 Zusammenfassung

Erythropoietin ist das Hormon, welches die Proliferation und Differenzierung erythroider Progenitorzellen im Knochenmark zu roten Blutkörperchen reguliert und so die Sauerstoffversorgung des Gewebes sicherstellt. Beim adulten Menschen wird EPO vorrangig in den Nieren produziert. Reguliert wird die EPO-Gentranskription hauptsächlich über den Hypoxie-induzierbaren Faktor 2 (HIF-2) im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus in Abhängigkeit von der Sauerstoffverfügbarkeit. Unter Normoxie wird die HIF- α - Untereinheit von Prolylhydroxylasen hydroxyliert, wodurch sie vom von Hippel-Lindau (Vhl) Protein erkannt und ubiquitiniiert wird. Anschließend wird die hydroxylierte HIF- α - Untereinheit proteasomal degradiert. Unter Hypoxie hingegen kann HIF- α nicht hydroxyliert werden und entgeht somit dem proteasomalen Abbau. Stattdessen transloziert HIF- α in den Zellkern, dimerisiert dort mit der HIF-1 β - Untereinheit und kann dann die Expression von EPO stimulieren. Bei den EPO-produzierenden Zellen der Niere handelt es sich um interstitielle fibroblastenartige Zellen, die clusterartig im Übergangsbereich von Cortex zu Medulla lokalisiert sind. Sie zeichnen sich durch lange peritubuläre Fortsätze, die vom Zellkörper expandieren, und die Expression der Fibroblasten-/Perizytenmarker CD73 und PDGFR- β aus. Zudem konnte gezeigt werden, dass sie zusätzlich neuronale Marker wie NFL oder MAP2 exprimieren. Hinsichtlich der Expression ihrer Marker scheinen die EPO-exprimierenden Zellen jedoch eine heterogene Zellpopulation darzustellen. Unklar ist auch die Herkunft dieser Zellen, da einige Befunde für einen Ursprung aus der Neuralleiste sprechen, während andere auf eine Abstammung aus der FoxD1 $^+$ -Stromavorläuferzellpopulation hindeuten.

Da PDGFR- β^+ - Zellen sehr zahlreich in der Niere zu finden sind, jedoch nur ein kleiner Teil davon zur EPO-Synthese beizutragen scheint, war es ein Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, welchen quantitativen Beitrag die PDGFR- β - exprimierenden Zellen der Niere zur EPO-Produktion leisten. In diesem Zusammenhang sollte auch die renale Verteilung der EPO-/PDGFR- β - exprimierenden Zellen genauer analysiert werden. Außerdem sollte untersucht werden, ob sich die renalen PDGFR- β^+ - Zellen aus der Neuralleiste ableiten. Da auch in einigen anderen Organen PDGFR- β^+ - Zellen vorkommen, stellte sich zudem die Frage, ob diese PDGFR- β - exprimierenden Zellen ebenfalls prinzipiell fähig sind, EPO zu exprimieren, ihnen jedoch unter physiologischen Bedingungen der Stimulus fehlt, dies zu tun. Als Modell dienten *PDGFR- $\beta^{+/iCre}$ Vhl $^{fl/fl}$* - Mäuse, bei denen spezifisch in PDGFR- β^+ -Zellen die HIF- α -Untereinheiten mittels Deletion von Vhl induzierbar stabilisiert werden konnten.

Anhand dieses Mausmodells konnte gezeigt werden, dass sehr wahrscheinlich alle renalen PDGFR- β^+ - Zellen fähig sind, HIF-2- abhängig EPO zu produzieren. Dies zeigte sich zum einen darin, dass die Deletion von Vhl in den PDGFR- β^+ - Zellen zu einem massiven Anstieg

der EPO-mRNA- Expressionslevel und damit einhergehend zu Polyzythämie und erhöhten Plasma-EPO- Konzentrationen führte. Zum anderen deckte sich die Verteilung der EPO-exprimierenden Zellen beinahe vollständig mit dem Verteilungsmuster der interstitiellen PDGFR- β^+ - Zellen. Ähnlich zur Verteilung EPO-exprimierender Zellen unter Hypoxie waren die meisten EPO-positiven Zellen im Bereich des inneren Cortex und dem äußeren Streifen der äußeren Medulla lokalisiert, zum äußeren Cortex und der inneren Medulla hin nahm die Dichte der EPO-positiven Zellen etwas ab. Im Gegensatz zu früheren Befunden fanden sich sogar im proximalen Bereich der Papille EPO-produzierende Zellen. Die gleichzeitige Deletion von Vhl und HIF-2 α in PDGFR- β^+ - Zellen resultierte in Anämie und einer erniedrigten renalen EPO-mRNA- Expression. Die Tatsache, dass eine Inhibierung der Prolylhydroxylasen in Mäusen mit HIF-2 α - defizienten PDGFR- β^+ - Zellen im Gegensatz zu Kontrolltieren keinen stimulierenden Effekt auf die renale EPO-Produktion zeigte, lässt den Schluss zu, dass die PDGFR- β - exprimierenden Zellen die einzigen Zellen in der Niere sind, die EPO exprimieren, zumindest als Reaktion auf den akuten Stimulus der Prolylhydroxylase-Inhibierung. Obwohl auch in anderen Organen, wie Herz, Lunge oder Gehirn, zahlreiche PDGFR- β^+ - Zellen vorkommen, zeigte die Analyse der EPO-mRNA- Expressionslevel der extrarenalen Organe nur in den Nebennieren eine Induktion der EPO-Gentranskription nach Deletion von Vhl in den PDGFR- β - exprimierenden Zellen. Verglichen mit dem Anstieg der EPO-mRNA- Expressionslevel in den Nieren war der Anstieg in den Nebennieren jedoch deutlich geringer. Die *in situ*-Hybridisierung zeigte, dass die EPO-exprimierenden Zellen in den Nebennieren in Übereinstimmung zur Verteilung der PDGFR- β^+ - Zellen größtenteils im kortiko-medullären Bereich lokalisiert waren, vereinzelt aber auch im Cortex und der Medulla. Insgesamt gesehen schien jedoch nicht jede PDGFR- β - exprimierende Zelle der Nebenniere EPO zu produzieren. Um zu überprüfen, ob die Fähigkeit der renalen und adrenalnen PDGFR- β^+ - Zellen zur EPO-Produktion möglicherweise auf eine Abstammung aus der Neuralleiste zurückzuführen sein könnte, wurde das Verteilungsmuster renaler Zellen mit Ursprung in der Neuralleiste mit der Verteilung der EPO-produzierenden Zellen der induzierten *PDGFR- $\beta^{+/-Cre}$ Vhl $^{fl/fl}$* - Mäuse verglichen. Auf Grund fehlender Übereinstimmung der Expressionsmuster konnten frühere Befunde zur Abstammung EPO-produzierender Zellen der Niere aus der Neuralleiste jedoch nicht bestätigt werden. Allerdings konnten Befunde, die auf einen Ursprung in der FoxD1 $^+$ - Stromaprogenitorzellpopulation hindeuten, weiter erhärtet werden. Die Deletion von Vhl in der FoxD1-Zelllinie (*FoxD1 $^{+/-Cre}$ Vhl $^{fl/fl}$* - Mäuse) führte nämlich wie in den induzierten *PDGFR- $\beta^{+/-Cre}$ Vhl $^{fl/fl}$* - Mäusen ebenfalls zu einer Erhöhung der EPO-mRNA- Expressionslevel sowohl in den Nieren als auch in den Nebennieren. Außerdem zeigte die *in situ*- Hybridisierung, dass die EPO-produzierenden Zellen in den Nieren dieser Tiere im Interstitium des Cortex und der äußeren Medulla lokalisiert sind. Da zudem Tiere mit Vhl-

und HIF-2 α - Defizienz in der FoxD1-Zelllinie anämisch waren, jedoch kaum renale EPO-mRNA- Expression detektiert werden konnte, legen diese Befunde den Schluss nahe, dass sich wahrscheinlich alle renalen EPO-exprimierenden Zellen aus der FoxD1 $^+$ -Stromavorläuferzellpopulation ableiten.

Neben den interstitiellen Fibroblasten und Perizyten leiten sich auch Renin-produzierende Zellen, Mesangialzellen und vaskuläre Glattmuskelzellen aus der FoxD1-Zelllinie ab. Daher wurde mittels zelltypspezifischer Mausmodelle auch die Auswirkung einer Vhl-Deletion auf diese Zellen untersucht. Dabei konnte sowohl in Glomeruluspräparationen von renin- als auch von mesangialzellspezifischen Vhl-defizienten Tieren eine Induktion der EPO-Gentranskription nachgewiesen werden, was dafür spricht, dass Renin- und Mesangialzellen prinzipiell fähig sind, EPO zu exprimieren. Die Tiere mit vaskulärer glattmuskelzellspezifischer Vhl-Deletion zeigten erhöhte EPO-mRNA- Expressionslevel und damit einhergehend auch erhöhte Plasma-EPO- Konzentrationen. Allerdings konnte mittels *in situ*-Hybridisierung und immunfluoreszenter Cofärbungen an Nierenschnitten dieser Tiere gezeigt werden, dass es sich bei den EPO-positiven Zellen in diesen Nieren nicht um vaskuläre Glattmuskelzellen größerer Blutgefäße, sondern um periendotheliale perizytenartige Zellen handelt, was im Hinblick auf die Verwandtschaft dieser Zelltypen und die Expression gemeinsamer Marker durchaus möglich zu sein scheint.

Zusammen mit der Hochregulation des EPO-Gens konnte in allen untersuchten Mausmodellen auch eine Hochregulation weiterer HIF-2- Zielgene, wie PHD3, ADM, COX-2 und RGS4 detektiert werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Jelkmann W. Molecular biology of erythropoietin. *Intern Med* 2004;43(8):649-659.
2. Imai N, Kawamura A, Higuchi M et al. Physicochemical and biological comparison of recombinant human erythropoietin with human urinary erythropoietin. *J Biochem* 1990;107(3):352-359.
3. Wen D, Boissel JP, Showers M, Ruch BC, Bunn HF. Erythropoietin structure-function relationships. Identification of functionally important domains. *J Biol Chem* 1994;269(36):22839-22846.
4. Davis JM, Arakawa T, Strickland TW, Yphantis DA. Characterization of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells. *Biochemistry* 1987;26(9):2633-2638.
5. Dordal MS, Wang FF, GOLDWASSER E. The role of carbohydrate in erythropoietin action. *Endocrinology* 1985;116(6):2293-2299.
6. Brailsford JA, Danishefsky SJ. Probing the stability of nonglycosylated wild-type erythropoietin protein via reiterative alanine ligations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109(19):7196-7201.
7. Koury ST, Bondurant MC, Koury MJ, Semenza GL. Localization of cells producing erythropoietin in murine liver by *in situ* hybridization. *Blood* 1991;77(11):2497-2503.
8. Dame C, Fahnenstich H, Freitag P et al. Erythropoietin mRNA expression in human fetal and neonatal tissue. *Blood* 1998;92(9):3218-3225.
9. Haase VH. Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Rev* 2013;27(1):41-53.
10. Eckardt KU, Kurtz A. Regulation of erythropoietin production. *Eur J Clin Invest* 2005;35 Suppl 3:13-19.
11. Dame C, Sola MC, Lim KC et al. Hepatic erythropoietin gene regulation by GATA-4. *J Biol Chem* 2004;279(4):2955-2961.
12. Kapitsinou PP, Liu Q, Unger TL et al. Hepatic HIF-2 regulates erythropoietic responses to hypoxia in renal anemia. *Blood* 2010;116(16):3039-3048.
13. Obara N, Suzuki N, Kim K, Nagasawa T, Imagawa S, Yamamoto M. Repression via the GATA box is essential for tissue-specific erythropoietin gene expression. *Blood* 2008;111(10):5223-5232.
14. Tan CC, Eckardt KU, Ratcliffe PJ. Organ distribution of erythropoietin messenger RNA in normal and uremic rats. *Kidney Int* 1991;40(1):69-76.
15. Schuster SJ, Wilson JH, Erslev AJ, Caro J. Physiologic regulation and tissue localization of renal erythropoietin messenger RNA. *Blood* 1987;70(1):316-318.
16. Le HM, Eckardt KU, Kaissling B, Koury ST, Kurtz A. Structure-function correlations in erythropoietin formation and oxygen sensing in the kidney. *Klin Wochenschr* 1991;69(13):567-575.

17. Stockmann C, Fandrey J. Hypoxia-induced erythropoietin production: a paradigm for oxygen-regulated gene expression. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006;33(10):968-979.
18. Jelkmann W. Erythropoietin after a century of research: younger than ever. *Eur J Haematol* 2007;78(3):183-205.
19. Lappin TR, Maxwell AP, Johnston PG. EPO's alter ego: erythropoietin has multiple actions. *Stem Cells* 2002;20(6):485-492.
20. Wenger RH, Hoogewijs D. Regulated oxygen sensing by protein hydroxylation in renal erythropoietin-producing cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010;298(6):F1287-F1296.
21. Weidemann A, Kerdiles YM, Knaup KX et al. The glial cell response is an essential component of hypoxia-induced erythropoiesis in mice. *J Clin Invest* 2009;119(11):3373-3383.
22. Rankin EB, Wu C, Khatri R et al. The HIF signaling pathway in osteoblasts directly modulates erythropoiesis through the production of EPO. *Cell* 2012;149(1):63-74.
23. Jelkmann W. Regulation of erythropoietin production. *J Physiol* 2011;589(Pt 6):1251-1258.
24. Paliege A, Rosenberger C, Bondke A et al. Hypoxia-inducible factor-2alpha-expressing interstitial fibroblasts are the only renal cells that express erythropoietin under hypoxia-inducible factor stabilization. *Kidney Int* 2010;77(4):312-318.
25. Gruber M, Hu CJ, Johnson RS, Brown EJ, Keith B, Simon MC. Acute postnatal ablation of Hif-2alpha results in anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(7):2301-2306.
26. Scortegagna M, Morris MA, Oktay Y, Bennett M, Garcia JA. The HIF family member EPAS1/HIF-2alpha is required for normal hematopoiesis in mice. *Blood* 2003;102(5):1634-1640.
27. Lee FS, Percy MJ. The HIF pathway and erythrocytosis. *Annu Rev Pathol* 2011;6:165-192.
28. Haase VH. Hypoxia-inducible factors in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;291(2):F271-F281.
29. Franke K, Gassmann M, Wielockx B. Erythrocytosis: the HIF pathway in control. *Blood* 2013;122(7):1122-1128.
30. Rankin EB, Rha J, Selak MA et al. Hypoxia-inducible factor 2 regulates hepatic lipid metabolism. *Mol Cell Biol* 2009;29(16):4527-4538.
31. Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 2006;3(3):177-185.
32. Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, Keith B, Simon MC. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol* 2003;23(24):9361-9374.

33. Haase VH. Hypoxic regulation of erythropoiesis and iron metabolism. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010;299(1):F1-13.
34. Mastrogiannaki M, Matak P, Keith B, Simon MC, Vaulont S, Peyssonnaux C. HIF-2alpha, but not HIF-1alpha, promotes iron absorption in mice. *J Clin Invest* 2009;119(5):1159-1166.
35. La FK, Reimann C, Jelkmann W, Hellwig-Burgel T. Inhibition of erythropoietin gene expression signaling involves the transcription factors GATA-2 and NF-kappaB. *FASEB J* 2002;16(13):1811-1813.
36. Kurt B, Kurtz A. Plasticity of renal endocrine function. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2015;308(6):R455-R466.
37. Aprelikova O, Chandramouli GV, Wood M et al. Regulation of HIF prolyl hydroxylases by hypoxia-inducible factors. *J Cell Biochem* 2004;92(3):491-501.
38. del PL, Castellanos MC, Temes E et al. The von Hippel Lindau/hypoxia-inducible factor (HIF) pathway regulates the transcription of the HIF-proline hydroxylase genes in response to low oxygen. *J Biol Chem* 2003;278(49):48690-48695.
39. Nakayama K, Frew IJ, Hagensen M et al. Siah2 regulates stability of prolyl-hydroxylases, controls HIF1alpha abundance, and modulates physiological responses to hypoxia. *Cell* 2004;117(7):941-952.
40. Nakayama K, Qi J, Ronai Z. The ubiquitin ligase Siah2 and the hypoxia response. *Mol Cancer Res* 2009;7(4):443-451.
41. Sinclair AM. Erythropoiesis stimulating agents: approaches to modulate activity. *Biologics* 2013;7:161-174.
42. Nichols B, Shrestha RP, Horowitz J et al. Simplification of an erythropoiesis model for design of anemia management protocols in end stage renal disease. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2011;2011:83-86.
43. Jelkmann W, Bohlius J, Hallek M, Sytkowski AJ. The erythropoietin receptor in normal and cancer tissues. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;67(1):39-61.
44. Watowich SS. The erythropoietin receptor: molecular structure and hematopoietic signaling pathways. *J Investig Med* 2011;59(7):1067-1072.
45. Aapro M, Jelkmann W, Constantinescu SN, Leyland-Jones B. Effects of erythropoietin receptors and erythropoiesis-stimulating agents on disease progression in cancer. *Br J Cancer* 2012;106(7):1249-1258.
46. McMahon AP. Development of the Mammalian Kidney. *Curr Top Dev Biol* 2016;117:31-64.
47. Schlondorff D, Banas B. The mesangial cell revisited: no cell is an island. *J Am Soc Nephrol* 2009;20(6):1179-1187.
48. Castrop H, Hocherl K, Kurtz A, Schweda F, Todorov V, Wagner C. Physiology of kidney renin. *Physiol Rev* 2010;90(2):607-673.
49. Armulik A, Genove G, Betsholtz C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell* 2011;21(2):193-215.

50. Kida Y, Duffield JS. Pivotal role of pericytes in kidney fibrosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2011;38(7):467-473.
51. Duffield JS. Cellular and molecular mechanisms in kidney fibrosis. *J Clin Invest* 2014;124(6):2299-2306.
52. Hung C, Linn G, Chow YH et al. Role of lung pericytes and resident fibroblasts in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;188(7):820-830.
53. Strutz F, Zeisberg M. Renal fibroblasts and myofibroblasts in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2006;17(11):2992-2998.
54. Li W, Hartwig S, Rosenblum ND. Developmental origins and functions of stromal cells in the normal and diseased mammalian kidney. *Dev Dyn* 2014;243(7):853-863.
55. Kaissling B, Hegyi I, Loffing J, Le HM. Morphology of interstitial cells in the healthy kidney. *Anat Embryol (Berl)* 1996;193(4):303-318.
56. Humphreys BD. Targeting pericyte differentiation as a strategy to modulate kidney fibrosis in diabetic nephropathy. *Semin Nephrol* 2012;32(5):463-470.
57. Kendall RT, Feghali-Bostwick CA. Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. *Front Pharmacol* 2014;5:123.
58. Humphreys BD, Lin SL, Kobayashi A et al. Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Am J Pathol* 2010;176(1):85-97.
59. Bachmann S, Le HM, Eckardt KU. Co-localization of erythropoietin mRNA and ecto-5'-nucleotidase immunoreactivity in peritubular cells of rat renal cortex indicates that fibroblasts produce erythropoietin. *J Histochem Cytochem* 1993;41(3):335-341.
60. Maxwell PH, Osmond MK, Pugh CW et al. Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice. *Kidney Int* 1993;44(5):1149-1162.
61. JACOBSON LO, GOLDWASSER E, FRIED W, PLZAK L. Role of the kidney in erythropoiesis. *Nature* 1957;179(4560):633-634.
62. Pan X, Suzuki N, Hirano I, Yamazaki S, Minegishi N, Yamamoto M. Isolation and characterization of renal erythropoietin-producing cells from genetically produced anemia mice. *PLoS One* 2011;6(10):e25839.
63. Beirao I, Moreira L, Barandela T et al. Erythropoietin production by distal nephron in normal and familial amyloidotic adult human kidneys. *Clin Nephrol* 2010;74(5):327-335.
64. Mujais SK, Beru N, Pullman TN, GOLDWASSER E. Erythropoietin is produced by tubular cells of the rat kidney. *Cell Biochem Biophys* 1999;30(1):153-166.
65. Nagai T, Yasuoka Y, Izumi Y et al. Reevaluation of erythropoietin production by the nephron. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;449(2):222-228.
66. Lacombe C, Da Silva JL, Bruneval P et al. Peritubular cells are the site of erythropoietin synthesis in the murine hypoxic kidney. *J Clin Invest* 1988;81(2):620-623.
67. Koury ST, Bondurant MC, Koury MJ. Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by *in situ* hybridization. *Blood* 1988;71(2):524-527.

68. Koury ST, Koury MJ, Bondurant MC, Caro J, Gruber SE. Quantitation of erythropoietin-producing cells in kidneys of mice by *in situ* hybridization: correlation with hematocrit, renal erythropoietin mRNA, and serum erythropoietin concentration. *Blood* 1989;74(2):645-651.
69. Eckardt KU, Koury ST, Tan CC et al. Distribution of erythropoietin producing cells in rat kidneys during hypoxic hypoxia. *Kidney Int* 1993;43(4):815-823.
70. Machura K, Neubauer B, Steppan D, Ketten R, Grobela A, Kurtz A. Role of blood pressure in mediating the influence of salt intake on renin expression in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012;302(10):F1278-F1285.
71. Maxwell PH, Ferguson DJ, Nicholls LG et al. Sites of erythropoietin production. *Kidney Int* 1997;51(2):393-401.
72. Le HM, Kaissling B. Distribution of 5'-nucleotidase in the renal interstitium of the rat. *Cell Tissue Res* 1989;258(1):177-182.
73. Asada N, Takase M, Nakamura J et al. Dysfunction of fibroblasts of extrarenal origin underlies renal fibrosis and renal anemia in mice. *J Clin Invest* 2011;121(10):3981-3990.
74. Chang YT, Yang CC, Pan SY et al. DNA methyltransferase inhibition restores erythropoietin production in fibrotic murine kidneys. *J Clin Invest* 2016;126(2):721-731.
75. Kobayashi H, Liu Q, Binns TC et al. Distinct subpopulations of FOXD1 stroma-derived cells regulate renal erythropoietin. *J Clin Invest* 2016;126(5):1926-1938.
76. Cotes PM, Pippard MJ, Reid CD, Winearls CG, Oliver DO, Royston JP. Characterization of the anaemia of chronic renal failure and the mode of its correction by a preparation of human erythropoietin (r-HuEPO). An investigation of the pharmacokinetics of intravenous erythropoietin and its effects on erythrokinetics. *Q J Med* 1989;70(262):113-137.
77. Eschbach JW, Haley NR, Adamson JW. The anemia of chronic renal failure: pathophysiology and effects of recombinant erythropoietin. *Contrib Nephrol* 1990;78:24-36.
78. Nangaku M, Eckardt KU. Pathogenesis of renal anemia. *Semin Nephrol* 2006;26(4):261-268.
79. Kaissling B, Le HM. The renal cortical interstitium: morphological and functional aspects. *Histochem Cell Biol* 2008;130(2):247-262.
80. Kriz W, Kaissling B, Le HM. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in kidney fibrosis: fact or fantasy? *J Clin Invest* 2011;121(2):468-474.
81. Souma T, Yamazaki S, Moriguchi T et al. Plasticity of renal erythropoietin-producing cells governs fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2013;24(10):1599-1616.
82. Bernhardt WM, Wiesener MS, Scigalla P et al. Inhibition of prolyl hydroxylases increases erythropoietin production in ESRD. *J Am Soc Nephrol* 2010;21(12):2151-2156.

83. Eckardt KU, Drueke T, Leski M, Kurtz A. Unutilized reserves: the production capacity for erythropoietin appears to be conserved in chronic renal disease. *Contrib Nephrol* 1991;88:18-31.
84. Yamazaki S, Souma T, Hirano I et al. A mouse model of adult-onset anaemia due to erythropoietin deficiency. *Nat Commun* 2013;4:1950.
85. Kurt B, Paliege A, Willam C et al. Deletion of von Hippel-Lindau protein converts renin-producing cells into erythropoietin-producing cells. *J Am Soc Nephrol* 2013;24(3):433-444.
86. Levinson RS, Batourina E, Choi C, Vorontchikhina M, Kitajewski J, Mendelsohn CL. Foxd1-dependent signals control cellularity in the renal capsule, a structure required for normal renal development. *Development* 2005;132(3):529-539.
87. Hatini V, Huh SO, Herzlinger D, Soares VC, Lai E. Essential role of stromal mesenchyme in kidney morphogenesis revealed by targeted disruption of Winged Helix transcription factor BF-2. *Genes Dev* 1996;10(12):1467-1478.
88. Kobayashi A, Mugford JW, Krautzberger AM, Naiman N, Liao J, McMahon AP. Identification of a multipotent self-renewing stromal progenitor population during mammalian kidney organogenesis. *Stem Cell Reports* 2014;3(4):650-662.
89. Reidy KJ, Rosenblum ND. Cell and molecular biology of kidney development. *Semin Nephrol* 2009;29(4):321-337.
90. Costantini F, Kopan R. Patterning a complex organ: branching morphogenesis and nephron segmentation in kidney development. *Dev Cell* 2010;18(5):698-712.
91. Michos O. Kidney development: from ureteric bud formation to branching morphogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 2009;19(5):484-490.
92. Hum S, Rymer C, Schaefer C, Bushnell D, Sims-Lucas S. Ablation of the renal stroma defines its critical role in nephron progenitor and vasculature patterning. *PLoS One* 2014;9(2):e88400.
93. Fetting JL, Guay JA, Karolak MJ et al. FOXD1 promotes nephron progenitor differentiation by repressing decorin in the embryonic kidney. *Development* 2014;141(1):17-27.
94. Yallowitz AR, Hrycav SM, Short KM, Smyth IM, Wellik DM. Hox10 genes function in kidney development in the differentiation and integration of the cortical stroma. *PLoS One* 2011;6(8):e23410.
95. Sequeira-Lopez ML, Lin EE, Li M, Hu Y, Sigmund CD, Gomez RA. The earliest metanephric arteriolar progenitors and their role in kidney vascular development. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2015;308(2):R138-R149.
96. Sheikh AQ, Misra A, Rosas IO, Adams RH, Greif DM. Smooth muscle cell progenitors are primed to muscularize in pulmonary hypertension. *Sci Transl Med* 2015;7(308):308ra159.
97. Haase VH, Glickman JN, Socolovsky M, Jaenisch R. Vascular tumors in livers with targeted inactivation of the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(4):1583-1588.

98. Matsuoka T, Ahlberg PE, Kessaris N et al. Neural crest origins of the neck and shoulder. *Nature* 2005;436(7049):347-355.
99. Srinivas S, Watanabe T, Lin CS et al. Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC Dev Biol* 2001;1:4.
100. Muzumdar MD, Tasic B, Miyamichi K, Li L, Luo L. A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis* 2007;45(9):593-605.
101. Schonig K, Schwenk F, Rajewsky K, Bujard H. Stringent doxycycline dependent control of CRE recombinase in vivo. *Nucleic Acids Res* 2002;30(23):e134.
102. Starke C, Betz H, Hickmann L et al. Renin lineage cells repopulate the glomerular mesangium after injury. *J Am Soc Nephrol* 2015;26(1):48-54.
103. Indra AK, Warot X, Brocard J et al. Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic Acids Res* 1999;27(22):4324-4327.
104. Wirth A, Benyo Z, Lukasova M et al. G12-G13-LARG-mediated signaling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension. *Nat Med* 2008;14(1):64-68.
105. Lewandoski M. Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat Rev Genet* 2001;2(10):743-755.
106. Wang F, Flanagan J, Su N et al. RNAscope: a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagn* 2012;14(1):22-29.
107. Takemoto M, Asker N, Gerhardt H et al. A new method for large scale isolation of kidney glomeruli from mice. *Am J Pathol* 2002;161(3):799-805.
108. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162(1):156-159.
109. Suzuki N. Erythropoietin gene expression: developmental-stage specificity, cell-type specificity, and hypoxia inducibility. *Tohoku J Exp Med* 2015;235(3):233-240.
110. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999;399(6733):271-275.
111. Tanimoto K, Makino Y, Pereira T, Poellinger L. Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *EMBO J* 2000;19(16):4298-4309.
112. Warnecke C, Zaborowska Z, Kurreck J et al. Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha (EPAS-1) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2alpha target gene in Hep3B and Kelly cells. *FASEB J* 2004;18(12):1462-1464.
113. Gerl K, Nolan KA, Karger C et al. Erythropoietin production by PDGFR-beta(+) cells. *Pflugers Arch* 2016;468(8):1479-1487.
114. Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 1999;79(4):1283-1316.

115. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev* 2008;22(10):1276-1312.
116. Gerl K, Steppan D, Fuchs M et al. Activation of Hypoxia Signaling in Stromal Progenitors Impairs Kidney Development. *Am J Pathol* 2017;187(7):1496-1511.
117. Kurt B, Gerl K, Karger C, Schwarzensteiner I, Kurtz A. Chronic hypoxia-inducible transcription factor-2 activation stably transforms juxtaglomerular renin cells into fibroblast-like cells in vivo. *J Am Soc Nephrol* 2015;26(3):587-596.
118. Wiesener MS, Jurgensen JS, Rosenberger C et al. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs. *FASEB J* 2003;17(2):271-273.
119. Steenhard BM, Freeburg PB, Isom K et al. Kidney development and gene expression in the HIF2alpha knockout mouse. *Dev Dyn* 2007;236(4):1115-1125.
120. Alpers CE, Seifert RA, Hudkins KL, Johnson RJ, Bowen-Pope DF. PDGF-receptor localizes to mesangial, parietal epithelial, and interstitial cells in human and primate kidneys. *Kidney Int* 1993;43(2):286-294.
121. Gerl K, Miquerol L, Todorov VT et al. Inducible glomerular erythropoietin production in the adult kidney. *Kidney Int* 2015;88(6):1345-1355.
122. Bergers G, Song S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol* 2005;7(4):452-464.
123. Fujita N, Markova D, Anderson DG et al. Expression of prolyl hydroxylases (PHDs) is selectively controlled by HIF-1 and HIF-2 proteins in nucleus pulposus cells of the intervertebral disc: distinct roles of PHD2 and PHD3 proteins in controlling HIF-1alpha activity in hypoxia. *J Biol Chem* 2012;287(20):16975-16986.
124. Olechnowicz SW, Fedele AO, Peet DJ. Hypoxic induction of the regulator of G-protein signalling 4 gene is mediated by the hypoxia-inducible factor pathway. *PLoS One* 2012;7(9):e44564.
125. Fang HY, Hughes R, Murdoch C et al. Hypoxia-inducible factors 1 and 2 are important transcriptional effectors in primary macrophages experiencing hypoxia. *Blood* 2009;114(4):844-859.
126. Bensellam M, Duvillie B, Rybachuk G et al. Glucose-induced O₂ consumption activates hypoxia inducible factors 1 and 2 in rat insulin-secreting pancreatic beta-cells. *PLoS One* 2012;7(1):e29807.
127. Takeda N, Maemura K, Imai Y et al. Endothelial PAS domain protein 1 gene promotes angiogenesis through the transactivation of both vascular endothelial growth factor and its receptor, Flt-1. *Circ Res* 2004;95(2):146-153.
128. Xue X, Shah YM. Hypoxia-inducible factor-2alpha is essential in activating the COX2/mPGES-1/PGE2 signaling axis in colon cancer. *Carcinogenesis* 2013;34(1):163-169.
129. Koh MY, Powis G. Passing the baton: the HIF switch. *Trends Biochem Sci* 2012;37(9):364-372.
130. Keith B, Johnson RS, Simon MC. HIF1alpha and HIF2alpha: sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat Rev Cancer* 2011;12(1):9-22.

131. Ang SO, Chen H, Gordeuk VR et al. Endemic polycythemia in Russia: mutation in the VHL gene. *Blood Cells Mol Dis* 2002;28(1):57-62.
132. Rankin EB, Biju MP, Liu Q et al. Hypoxia-inducible factor-2 (HIF-2) regulates hepatic erythropoietin in vivo. *J Clin Invest* 2007;117(4):1068-1077.
133. Yeo EJ, Cho YS, Kim MS, Park JW. Contribution of HIF-1alpha or HIF-2alpha to erythropoietin expression: in vivo evidence based on chromatin immunoprecipitation. *Ann Hematol* 2008;87(1):11-17.
134. Chavez JC, Baranova O, Lin J, Pichiule P. The transcriptional activator hypoxia inducible factor 2 (HIF-2/EPAS-1) regulates the oxygen-dependent expression of erythropoietin in cortical astrocytes. *J Neurosci* 2006;26(37):9471-9481.
135. Souma T, Nezu M, Nakano D et al. Erythropoietin Synthesis in Renal Myofibroblasts Is Restored by Activation of Hypoxia Signaling. *J Am Soc Nephrol* 2016;27(2):428-438.
136. McClellan W, Aronoff SL, Bolton WK et al. The prevalence of anemia in patients with chronic kidney disease. *Curr Med Res Opin* 2004;20(9):1501-1510.
137. Ross IL, Louw GJ. Embryological and molecular development of the adrenal glands. *Clin Anat* 2015;28(2):235-242.
138. Wang Q, Lan Y, Cho ES, Maltby KM, Jiang R. Odd-skipped related 1 (Odd 1) is an essential regulator of heart and urogenital development. *Dev Biol* 2005;288(2):582-594.
139. Muller SM, Stolt CC, Terszowski G et al. Neural crest origin of perivascular mesenchyme in the adult thymus. *J Immunol* 2008;180(8):5344-5351.
140. Gomez RA, Norwood VF, Tufro-McReddie A. Development of the kidney vasculature. *Microsc Res Tech* 1997;39(3):254-260.
141. Schlondorff D. The glomerular mesangial cell: an expanding role for a specialized pericyte. *FASEB J* 1987;1(4):272-281.
142. Smith SW, Chand S, Savage CO. Biology of the renal pericyte. *Nephrol Dial Transplant* 2012;27(6):2149-2155.
143. Xiong J, Wang Y, Zhu Z et al. NG2 proteoglycan increases mesangial cell proliferation and extracellular matrix production. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;361(4):960-967.
144. Castrop H, Huang Y, Hashimoto S et al. Impairment of tubuloglomerular feedback regulation of GFR in ecto-5'-nucleotidase/CD73-deficient mice. *J Clin Invest* 2004;114(5):634-642.
145. Morioka T, Okada S, Nameta M et al. Glomerular expression of connexin 40 and connexin 43 in rat experimental glomerulonephritis. *Clin Exp Nephrol* 2013;17(2):191-204.
146. Kurtz L, Janssen-Bienhold U, Kurtz A, Wagner C. Connexin expression in renin-producing cells. *J Am Soc Nephrol* 2009;20(3):506-512.
147. Kurtz L, Madsen K, Kurt B et al. High-level connexin expression in the human juxtaglomerular apparatus. *Nephron Physiol* 2010;116(1):1-8.

148. Hwan SK, Beyer EC. Heterogeneous localization of connexin40 in the renal vasculature. *Microvasc Res* 2000;59(1):140-148.
149. Brunskill EW, Sequeira-Lopez ML, Pentz ES et al. Genes that confer the identity of the renin cell. *J Am Soc Nephrol* 2011;22(12):2213-2225.
150. Castellanos-Rivera RM, Pentz ES, Lin E et al. Recombination signal binding protein for Ig-kappaJ region regulates juxtaglomerular cell phenotype by activating the myo-endocrine program and suppressing ectopic gene expression. *J Am Soc Nephrol* 2015;26(1):67-80.
151. Ding M, Cui S, Li C et al. Loss of the tumor suppressor Vhlh leads to upregulation of Cxcr4 and rapidly progressive glomerulonephritis in mice. *Nat Med* 2006;12(9):1081-1087.
152. Kapitsinou PP, Sano H, Michael M et al. Endothelial HIF-2 mediates protection and recovery from ischemic kidney injury. *J Clin Invest* 2014;124(6):2396-2409.
153. Mathia S, Paliege A, Koesters R et al. Action of hypoxia-inducible factor in liver and kidney from mice with Pax8-rtTA-based deletion of von Hippel-Lindau protein. *Acta Physiol (Oxf)* 2013;207(3):565-576.
154. Schley G, Klanke B, Schodel J et al. Hypoxia-inducible transcription factors stabilization in the thick ascending limb protects against ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 2011;22(11):2004-2015.
155. Rankin EB, Tomaszewski JE, Haase VH. Renal cyst development in mice with conditional inactivation of the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Cancer Res* 2006;66(5):2576-2583.
156. Han X, Sun S, Zhao M et al. Celastrol stimulates hypoxia-inducible factor-1 activity in tumor cells by initiating the ROS/Akt/p70S6K signaling pathway and enhancing hypoxia-inducible factor-1alpha protein synthesis. *PLoS One* 2014;9(11):e112470.
157. Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC, Semenza GL. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol* 2001;21(12):3995-4004.
158. Pan Y, Mansfield KD, Bertozzi CC et al. Multiple factors affecting cellular redox status and energy metabolism modulate hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase activity in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol* 2007;27(3):912-925.
159. Geevarghese A, Herman IM. Pericyte-endothelial crosstalk: implications and opportunities for advanced cellular therapies. *Transl Res* 2014;163(4):296-306.
160. Nishimatsu H, Hirata Y, Shindo T et al. Role of endogenous adrenomedullin in the regulation of vascular tone and ischemic renal injury: studies on transgenic/knockout mice of adrenomedullin gene. *Circ Res* 2002;90(6):657-663.
161. Nagata D, Hirata Y, Suzuki E et al. Hypoxia-induced adrenomedullin production in the kidney. *Kidney Int* 1999;55(4):1259-1267.
162. Nasrallah R, Hebert RL. Prostacyclin signaling in the kidney: implications for health and disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;289(2):F235-F246.

163. Jougasaki M, Burnett JC, Jr. Adrenomedullin as a renal regulator peptide. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15(3):293-295.
164. Gu S, Cifelli C, Wang S, Heximer SP. RGS proteins: identifying new GAPs in the understanding of blood pressure regulation and cardiovascular function. *Clin Sci (Lond)* 2009;116(5):391-399.
165. Holobotovskyy V, Manzur M, Tare M et al. Regulator of G-protein signaling 5 controls blood pressure homeostasis and vessel wall remodeling. *Circ Res* 2013;112(5):781-791.
166. Gurley SB, Griffiths RC, Mendelsohn ME, Karas RH, Coffman TM. Renal actions of RGS2 control blood pressure. *J Am Soc Nephrol* 2010;21(11):1847-1851.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

α-SMA	α-Glattmuskelaktin
aA	afferente Arteriole
Abb.	Abbildung
ADM	Adrenomedullin
Akr1b7	Aldose-Ketose-Reduktase Familie 1 Mitglied B7
AKT	Proteinkinase B (PKB)
ARNT	<i>aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein</i>
AQP2	Aquaporin 2
BFU	<i>burst forming unit</i>
bzw.	beziehungsweise
cTAL	kortikaler dicker aufsteigender Ast der Henleschleife (<i>cortical thick ascending limb of the loop of henle</i>)
CCD	kortikales Sammelrohr (<i>cortical collecting duct</i>)
CD31	<i>Cluster of Differentiation 31</i> (PECAM-1)
CD73	<i>Cluster of Differentiation 73</i> (Ecto-5'-Nucleotidase)
CFU	<i>colony forming unit</i>
CKD	<i>chronic kidney disease</i>
cort. rad. Art.	kortikale radiäre Arteriole
COX-2	Cyclooxygenase 2
CREB	cAMP response element binding protein
CreER ^{T2}	Fusionsprotein aus Cre-Rekombinase und modifizierter Estrogen-Bindestelle
Cx40	Connexin 40
Cy	Cyanin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMT1	divalenter Metallionen-Transporter 1
DcytB	duodenales Cytochrom B
DT	distaler Tubulus
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
ENO1	Enolase 1
ERK 1/2	extrazelluläres Signal-regulierte Kinase 1/2, (Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen) 1/2)
EPO	Erythropoietin

EpoR	Erythropoietin-Rezeptor
EYFP	optimiertes gelb-fluoreszierendes Protein
FIH	HIF-inhibierender Faktor
FoxD1	<i>forkhead box D1</i>
G	Glomerulus
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
HCP	hämatopoietische Zellphosphatase
Hct	Hämatokrit
HIF	Hypoxie-induzierbarer Transkriptionsfaktor
HSP	Hitzeschock-Protein
iCre	induzierbare Cre-Rekombinase
ISH	<i>in situ</i> -Hybridisierung
JAK2	Januskinase 2
JG	juxtaglomerulär
JGA	juxtaglomerulärer Apparat
LC	Luciferase
mRen	Maus Renin
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MAP2	Mikrotubulus-assoziiertes Protein 2
MEK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase (MAPKK)
NBF	<i>neutral buffered formalin</i>
NFL	Neurofilament Protein leichte Kette
NG2	neurales/gliales Antigen 2
NKCC2	Na-K-2Cl-Cotransporter
LDHA	Lactat-Dehydrogenase A
pA	poly-Adenylierungsstelle
PAS	PER-ARNT-SIM
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGFR-β	<i>platelet-derived growth factor receptor β</i>
PDK1	Pyruvatdehydrogenase-Kinase 1
PER	<i>period circadian protein</i>
PFA	Paraformaldehyd
PHD	Prolylhydroxylase
PI-3K	Phosphoinositid-3-Kinase
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

RBP-J	Rekombinationssignal bindendes Protein für die Immunglobulin kappa J-Region
RFP	rot-fluoreszierendes Protein
RGS	<i>regulator of G protein signaling</i>
RPL32	ribosomales Protein L32
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
rtTA ₂	Tetracyclin-abhängiger reverser Transaktivator
s.	siehe
SIM	<i>single-minded protein</i>
SM-MHC	<i>smooth muscle myosin heavy chain</i>
STAT5	signal transducer and activator of transcription 5
TAE	Tris-Aacetat-EDTA (Puffer)
tetO ₇	sieben Tandemwiederholungen der 19-Basenpaar Operatorsequenz des tet-Operons
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiozyanat
VE-cadherin	vaskuläres-endothiales Cadherin
Vhl	von Hippel-Lindau Protein
WT	Wildtyp
ZSP	zellspezifischer Promotor

Die Kenntnis chemischer Elementsymbole und Stoffverbindungen sowie von SI-Maßeinheiten und gängigen, in den Naturwissenschaften und in der Medizin gebrauchten Begriffsabkürzungen wurden vorausgesetzt.

7.2 Kongressbeiträge

93rd Annual Meeting of the German Physiological Society, 13.03.-15.03.2014, Mainz, Deutschland – Poster

“Tamoxifen-inducible Cx40 cell specific Vhl deletion induces erythropoietin production in the kidney.”

Tagung Junge Niere 2014, 09.05.-10.05.2014, München, Deutschland – Talk

“Tamoxifen-inducible Cx40 cell specific Vhl deletion induces erythropoietin production in the kidney.”

6. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, 06.09.-09.09.2014, Berlin, Deutschland – Poster

„Induzierte Deletion des von Hippel-Lindau Proteins in juxtaglomerulären Zellen der Niere supprimiert die Renin-Expression und induziert die Erythropoietin-Expression.“

94th Annual Meeting of the German Physiological Society, 05.03.-08.03.2015, Magdeburg, Deutschland – Talk

“Inducible glomerular erythropoietin production in the adult kidney.”

10th international EPO conference, 04.06.-05.06.2015, Lübeck, Deutschland – Talk

“Inducible glomerular erythropoietin production in the adult kidney.”

5th international Symposium Bamberg: Molecular Targets in Renal Disease – Adaptation and Dysfunction of the Renal Tubules, 03.07.-05.07.2015, Bamberg, Deutschland – Poster

“Inducible glomerular erythropoietin production in the adult kidney.”

7. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, 12.09.-15.09.2015, Berlin, Deutschland – Poster

„Deletion des von Hippel-Lindau Proteins in renalen Vorläuferzellen des Stroma inhibiert HIF-2 abhängig die Nierenentwicklung.“

95th Annual Meeting of the German Physiological Society, 02.03.-05.03.2016, Lübeck, Deutschland – Talk

“Organ specificity of in vivo erythropoietin expression by PDGFR- β^+ cells.”

8. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, 10.09.-13.09.2016, Berlin, Deutschland – Talk

„In vivo Expression von Erythropoietin in PDGFR- β^+ - Zellen.“

Joint Symposium SFB699 – NCCR, November, 25.11.-26.11.2016, Regensburg,
Deutschland – Talk
“EPO production by renal interstitial cells.”

7.3 Publikationen

Im Rahmen dieser Arbeit sind folgende Veröffentlichungen entstanden:

Kurt B, **Gerl K**, Karger C, Schwarzensteiner I, Kurtz A. *Chronic hypoxia-inducible transcription factor-2 activation stably transforms juxtaglomerular renin cells into fibroblast-like cells in vivo.*

J Am Soc Nephrol 2015;26(3):587-596.

Gerl K, Miquerol L, Todorov VT, Hugo CP, Adams RH, Kurtz A, Kurt B. *Inducible glomerular erythropoietin production in the adult kidney.*

Kidney Int 2015;88(6):1345-1355.

Gerl K, Nolan KA, Karger C, Fuchs M, Wenger RH, Stolt CC, Willam C, Kurtz A, Kurt B. *Erythropoietin production by PDGFR-beta(+) cells.*

Pflugers Arch 2016;468(8):1479-1487.

Gerl K, Steppan D, Fuchs M, Wagner C, Willam C, Kurtz A, Kurt B. *Activation of hypoxia signaling in stromal progenitors impairs kidney development.*

Am J Pathol 2017;187(7):1496-1511.

7.4 Eidestattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Die im Methodenteil und in der Danksagung aufgeführten Personen haben mir in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Diese Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den 07.04.2017

Katharina Gerl

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Armin Kurtz für die Vergabe dieses spannenden Themas und die Bereitstellung der Mittel zur Durchführung dieser Arbeit. Sein großes Interesse an meiner Arbeit und seine guten Ratschläge trugen wesentlich zum Gelingen dieser Dissertation bei.

Herzlicher Dank gilt auch Frau Dr. Birgül Kurt, die mich sowohl im Hinblick auf die Laborarbeit als auch die Versuchsorganisation immer mit wertvollen Tipps unterstützt hat und mir mit Rat und Tat zur Seite stand. Birgül, für die tolle und fruchtbare Zusammenarbeit in den vergangenen Jahren danke ich dir sehr.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Charlotte Wagner für ihre Expertise im Umgang mit den Jungmäusen bedanken.

Vielen herzlichen Dank auch an Prof. Dr. Roland Wenger und Dr. Karen Nolan, die mir in Zürich die Möglichkeit zum Erlernen der RNAscope-Methode gegeben haben.

Großer Dank gilt auch Rosmarie Heydn und Gerda Treuner, deren technische Unterstützung immer eine sehr große Hilfe war.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, Maria und Rainer, meinen Schwestern Stephanie und Caroline und meinem Freund Carsten:

Meine lieben Eltern, vielen Dank für eure Unterstützung in allen Lebenslagen, ohne die ein Studium und das darauffolgende Anfertigen der Dissertation nicht möglich gewesen wären. Für euer Verständnis, eure Rücksichtnahme und dass ihr alle immer für mich da seid, danke ich euch von ganzem Herzen.

Carsten, danke, dass du für mich da bist, mich beruhigst und aufmunterst und mir so hilfst, auch schlechtere Tage gut zu meistern.