

Aus der Klinik für Nephrologie  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

## DISSERTATION

# **Einfluss von tubulärem Knockout des Von-Hippel-Lindau-Proteins auf die durch Cyclosporin-A ausgelöste chronische tubulo-interstitielle Nierenfibrose der Maus**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Julia Katharina Scheidl

aus Aachen

Datum der Promotion: 05.12.2014

Für meinen Vater

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis, Begriffserläuterung.....	5
Kurzfassung .....	9
Kurzfassung Englisch.....	10
<b>Einleitung</b> .....	<b>11</b>
Chemische Struktur und immunsuppressive Wirkung von Cyclosporin-A .....	11
Nierentoxizität von Cyclosporin-A.....	13
Experimentelle durch Cyclosporin-A bedingte Nierentoxizität.....	14
Die Chronische-Hypoxie-Hypothese.....	15
Hypoxie-induzierbare Faktoren und das Von-Hippel-Lindau-Protein.....	16
Nachweis von Gewebhypoxie mittels Pimonidazol-Verbindungen .....	20
<b>Arbeitshypothesen</b> .....	<b>21</b>
<b>Material und Methoden</b> .....	<b>22</b>
Reagenzien .....	22
Versuchstiere .....	22
Niedrigsalzdiät ..	22
Cylosporin-A-Behandlung.....	24
Auslösung eines tubulus-spezifischen VHL-Knockouts.....	24
Nachweis von Gewebhypoxie mittels Pimonidazol-Verbindungen.....	24
Tierexperimentelle Protokolle .....	24
Mausmodell für CyA-induzierte tubulo-interstitielle Fibrose (Na <sup>+</sup> ↓/CyA).....	24
Einfluss von VHL-Knockout auf die durch Na <sup>+</sup> ↓/CyA induzierte tubulo-interstitielle Fibrose ..	26
Organentnahme, Fixierung und Aufbereitung .....	28
Blut- und Urinuntersuchung.....	29
Immunhistochemische Färbungen.....	31
HIF-1α .....	32
Pimonidazol-Verbindungen .....	32
Histologische Auswertung .....	33
Semiquantitative Bestimmung der tubulo-interstitiellen Fläche .....	33
Statistische Auswertung .....	34
<b>Ergebnisse</b> .....	<b>35</b>
Na <sup>+</sup> ↓/CyA führt zu tubulo-interstitieller Nierenfibrose .....	35
Na <sup>+</sup> ↓/CyA führt zu Hypoxie in Teilen des Nephrons.....	36
Na <sup>+</sup> ↓/CyA führt zu HIF-Aktivierung in Teilen des Nephrons .....	36
VHL-KO/Na <sup>+</sup> ↓/CyA führt zu HIF-Aktivierung im gesamten Nephron.....	36

VHL-KO verstärkt die durch Na <sup>+</sup> ↓/CyA ausgelöste tubulo-interstitielle Nierenfibrose .....	41
<b>Diskussion</b> .....	47
Eidesstattliche Versicherung .....	61
Lebenslauf.....	62
Danksagung .....	63

## Abkürzungsverzeichnis, Begriffserläuterung

<b>bHLH</b>	basic helix loop helix
<b>C<sub>Krea</sub></b>	Kreatinin-Clearance
<b>CTGF</b>	connective tissue growth factor
<b>CyA</b>	Cyclosporin-A
<b>DAB</b>	Diaminobenzidin
<b>Da</b>	Dalton
<b>DMOG</b>	Dimethyloxallylglyzin
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>Dox</b>	Doxyzyklin
<b>EPO</b>	Erythropoietin
<b>FGF</b>	fibroblast growth factor
<b>FITC</b>	Fluoresceinisothiocyanat
<b>HIF</b>	Hypoxie-induzierbarer Faktor
<b>HRP</b>	horseradish peroxidase
<b>GFR</b>	glomeruläre Filtrationsrate
<b>IL-2</b>	Interleukin-2
<b>Krea</b>	Kreatinin
<b>mRNA</b>	messenger Ribonukleinsäure
<b>Na<sup>+</sup>↓</b>	Niedrigsalzdiät= 0,05% Na <sup>+</sup> und destilliertes Trinkwasser

<b>Na<sup>+</sup>↓/CyA</b>	Tiermodell zur Induktion von chronischer CyA-Nierentoxizität in der Maus mithilfe von subkutaner Injektion von CyA und Niedrigsalzdiät
<b>NFAT</b>	nuclear factor of activated T-cells
<b>NF-κB</b>	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
<b>OPN</b>	Osteopontin
<b>PAI-1</b>	plasminogen activator inhibitor-1
<b>PAS</b>	Per-ARNT-Sim
<b>PDH</b>	HIF-Prolyl-Hydroxylase
<b>PDGFB</b>	platelet derived growth factor-B
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
<b>P<sub>Hst</sub></b>	Harnstoffkonzentration im Plasma
<b>PIM</b>	Pimonidazol
<b>P<sub>Krea</sub></b>	Kreatininkonzentration im Plasma
<b>pNFAT</b>	phosphorylierter nuclear factor of activated T-cells
<b>p.o.</b>	per os
<b>RAAS</b>	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>ROS</b>	reactive oxygen species
<b>s.c.</b>	subkutan

<b>SDF-1</b>	stromal derived factor-1
<b>spry</b>	sprouty
<b>TBS</b>	tris buffered saline
<b>TBST</b>	tris buffered saline with Tween® 20
<b>TGF-β</b>	transforming growth factor-beta
<b>TIMP-1</b>	tissue inhibitor of metalloproteinase-1
<b>TMD</b>	Tetramethylbenzidin
<b>TXA<sub>2</sub></b>	Thromboxan A <sub>2</sub>
<b>U<sub>Alb</sub></b>	Albuminkonzentration im 24h-Urin
<b>U<sub>Na</sub></b>	Natriumkonzentration im 24h-Urin
<b>VHL</b>	Von-Hippel-Lindau-Protein
<b>VHL-KO</b>	Knockout des Von-Hippel-Lindau-Proteins
<b>VEGF</b>	vascular endothelial growth factor
<b>YC-1</b>	[3-(50-Hydroxymethyl-20-Furyl)-1-Benzyl-Indazol]

Die **Chronische-Hypoxie-Hypothese** ist eine von Jill Norman und Leon Fine [1] formulierte Theorie zur Entstehung der tubulo-interstitiellen Nierenfibrose; demnach führt Tubulushypoxie zu einer Fehlanpassung mit Hochregulation von fibrosefördernden Genen, somit zu einer Erweiterung der tubulo-interstitiellen Räume, einer verlängerten O<sub>2</sub>-Diffusionsstrecke, und zu einer verstärkten Tubulushypoxie; dadurch entsteht ein Teufelskreis; später wurde (u.a. von Masaomi Nangaku [2]) HIF als *das* fibrosefördernde und hypoxieabhängige Element postuliert.

**HIF-Aktivierung** ist die nukleäre Akkumulation von HIF- $\alpha$ -Protein; Der Nachweis erfolgt in der vorliegenden Arbeit durch HIF- $\alpha$ -Immunhistochemie.

**HIF-Prolyl-Hydroxylase** (PHD) ist ein O<sub>2</sub>-abhängiges Enzym, welches die  $\alpha$ -Untereinheit des Hypoxie-induzierbaren Faktors (HIF) hydroxyliert, und somit dessen Proteolyse einleitet.

**Hypoxie** ist das Ungleichgewicht von O<sub>2</sub>-Angebot und –Verbrauch. Der immunhistochemische Nachweis von Pimonidazol bzw. von Hypoxie-induzierbaren Faktoren gilt als Hinweis auf Gewebhypoxie. Das Fehlen dieser Marker schließt Hypoxie jedoch nicht aus.

Der **Hypoxie-induzierbare Faktor (HIF)** ist ein Transkriptionsfaktor, der die Anpassung an Hypoxie vermittelt; HIF ist ein Heterodimer aus einer konstitutiven  $\beta$ -Untereinheit (HIF- $\beta$ ) und einer von drei variablen und O<sub>2</sub>-abhängig regulierten  $\alpha$ -Untereinheiten (HIF-1 $\alpha$ , -2 $\alpha$ , -3 $\alpha$ ), unter denen HIF-1 $\alpha$  die am besten erforschte ist.

**Knockout des Von-Hippel-Lindau-Proteins** (VHL-KO) führt zur normoxischen Akkumulation von HIF- $\alpha$ , und somit zur Aktivierung des HIF-Systems

**Pimonidazol** (PIM) ist ein Nitroimidazol-Abkömmling, der in vivo verabreicht wird, unterhalb einer O<sub>2</sub>-Spannung von 10 mmHg an Thiol-Gruppen bindet, und dort mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden kann; dies gilt landläufig als Hypoxienachweis; streng genommen kann jedoch unterhalb einer O<sub>2</sub>-Spannung von 10 mmHg die O<sub>2</sub>-Homöostase erhalten bleiben; ebenso kann sich oberhalb der 10mmHg-Grenze eine Hypoxie ausbilden.

Die **tubulo-interstitielle Nierenfibrose** ist die Verbreiterung der intertubulären Räume durch Zellen, Matrix, Ödem oder einer Kombination der dreien, nicht jedoch durch Kapillaren.

Das **Von-Hippel-Lindau-Protein** (VHL) bindet an hydroxyliertes HIF- $\alpha$  und leitet dessen Abbau durch das 26-S-Proteasom ein.



## Kurzfassung

**Hintergrund:** Chronische Cyclosporin-A (CyA) Gabe führt zu tubulo-interstitieller Nierenfibrose. Die dafür verantwortlichen Mechanismen sind zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht hinreichend verstanden. CyA könnte renale Hypoxie über Vasokonstriktion und/oder direkten tubulären Schaden auslösen. Hypoxie-induzierbare Faktoren (HIF) sind Hauptregulatoren von Hypoxieanpassung. HIF werden hauptsächlich über Sauerstoff-abhängige Proteolyse, welche das von Hippel-Lindau Protein (VHL) benötigt, reguliert. VHL Knockout (KO) führt zu HIF Aktivierung unter Normoxie. Abhängig von den beteiligten Zielgenen könnte HIF entweder tubuläres Überleben oder tubulo-interstitielle Fibrose fördern. Das Hauptziel dieser Studie war es, die Rolle von HIF in CyA-induzierter tubulo-interstitieller Nierenfibrose zu charakterisieren.

**Methoden:** Zuchtmäuse der Linie Pax8-rtTA mit einem induzierbaren, Doxycyclin-abhängigen und Nephron-spezifischen VHL-KO wurden für sechs Wochen nach einem der folgenden Protokolle behandelt: I) unbehandelte Kontrollen, II) Niedrigsalzdiät (0,05% Na<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>↓), III) Na<sup>+</sup>↓/CyA, und IV) VHL-KO Induktion gefolgt von Na<sup>+</sup>↓/CyA. Die Nierenfunktion wurde mithilfe von metabolischen Käfigen beurteilt. Histologische Untersuchungen wurden anhand von perfusionsfixierten Nieren durchgeführt. Gewebhypoxie wurde mithilfe von Pimonidazol(PIM)-Addukten kenntlich gemacht. Hypoxieanpassung wurde durch nukleäre HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation detektiert.

**Ergebnisse:** Der Vergleich mit Kontrolltieren zeigte, dass Na<sup>+</sup>↓/CyA zu tubulo-interstitieller Fibrose führt. Dem vorangegangen war tubuläre Akkumulation von PIM und HIF-1 $\alpha$ . Der Vergleich von Na<sup>+</sup>↓/CyA und Na<sup>+</sup>↓/CyA/VHL-Ko zeigte, dass Na<sup>+</sup>↓/CyA/VHL-KO zu einer signifikant stärkeren Niereninsuffizienz (Serum-Kreatinin 0,6 mg/dl vs. 0,3 mg/dl, Serum-Harnstoff 105 mg/dl vs. 71 mg/dl, Kreatinin-Clearance 0,8  $\mu$ l/min vs. 0,6  $\mu$ l/min) sowie tubulo-interstitiellen Fibrose (tubulo-interstitielle Fläche 43 % vs. 63% der kombinierten tubulären und interstitiellen Fläche) führt. In beiden Gruppen waren die CyA-Talspiegel (3100  $\mu$ g/l vs. 3254  $\mu$ g/l) sowie die Natriumkonzentrationen im Urin (16 mmol/l vs. 15 mmol/l) vergleichbar.

**Schlussfolgerungen:** Wir haben ein Mausmodell für CyA-Toxizität, dass zu tubulo-interstitieller Fibrose und funktionellen Nierenschädigung führt, entwickelt. Nierenhypoxie und Hypoxieanpassung sind frühe Ereignisse in der CyA-Toxizität. Chronische renal-tubuläre HIF-Aktivierung verstärkt die durch CyA ausgelöste Niereninsuffizienz und die tubulo-interstitielle Fibrose.

## Abstract

**Background:** Chronic cyclosporine A (CyA) exposure leads to renal tubulo-interstitial fibrosis, but the mechanism responsible are insufficiently understood. CyA may cause renal hypoxia due to vasoconstriction and/or direct tubular toxicity. Hypoxia-inducible factors (HIF) are master regulators of hypoxia adaptation. HIF are mainly regulated by oxygen dependent proteolysis which requires von Hippel-Lindau protein (VHL). VHL knockout (KO) leads to HIF activation under normoxia. Depending on the target genes engaged, HIF may either promote tubular survival or tubulo-interstitial fibrosis. The principal aim of the study was to determine the role of HIF in CyA-induced tubulo-interstitial renal fibrosis.

**Methods:** For six weeks mice with Pax8-rtTA-based, inducible, doxycycline dependent, and nephron-specific VHL-KO were subjected to one of the following protocols: I) untreated controls, II) low sodium diet (0.05% Na<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>↓), III) Na<sup>+</sup>↓/CyA, and IV) VHL-KO induction followed by Na<sup>+</sup>↓/CyA. Renal function was assessed with help of metabolic cages. Fine histology was performed in perfusion-fixed kidneys. Tissue hypoxia was visualized with help of pimonidazole (PIM) adducts. Hypoxia adaptation was detected by nuclear HIF-1 $\alpha$  accumulation.

**Results:** When compared with controls, Na<sup>+</sup>↓/CyA led to tubulo-interstitial fibrosis, which was preceded by tubular accumulation of both PIM and HIF-1 $\alpha$ . When compared with Na<sup>+</sup>↓/CyA, VHL-KO/Na<sup>+</sup>↓/CyA animals developed significantly more pronounced renal insufficiency (serum creatinine 0.6 mg/dl vs. 0.3 mg/dl, serum urea 105 mg/dl vs. 71 mg/dl, creatinine clearance 0.6  $\mu$ l/min vs. 0.8  $\mu$ l/min), as well as tubulo-interstitial fibrosis (tubulo-interstitial area 43 % vs. 63 % of the combined tubular and tubulo-interstitial area). In both groups CyA trough levels were comparable (3100  $\mu$ g/l vs. 3254  $\mu$ g/l), as was urinary sodium concentration (17 mmol/l vs. 16 mmol/l).

**Conclusions:** We developed a mouse model of CyA toxicity leading to tubulo-interstitial fibrosis, and renal functional impairment. Renal hypoxia and hypoxia adaptation are early events in CyA toxicity, and precede fibrosis. Chronic renal tubular HIF activation aggravates renal insufficiency and tubulo-interstitial fibrosis induced by CyA.

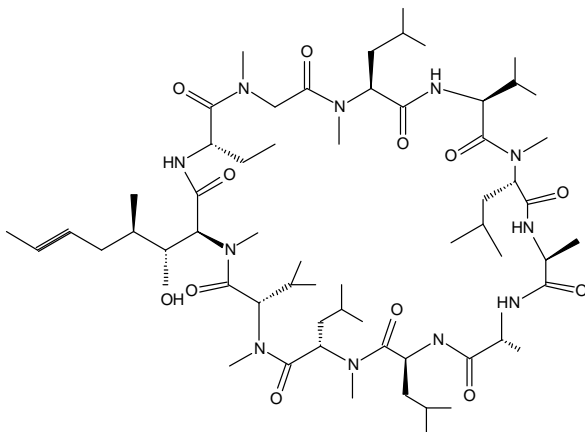
Key words: cyclosporine A, hypoxia-inducible factor, von Hippel-Lindau protein, Pax8-rtTA

## Einleitung

### Chemische Struktur und immunsuppressive Wirkung von Cyclosporin-A

Cyclosporin-A (CyA) wird aus dem norwegischen Schlauchpilz „Tolylocadium inflatum Gams“ gewonnen. Die Substanz ist ein neutrales zyklisches Peptid (Summenformel  $C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$ ) aus 11 Aminosäuren (**Abbildung 1**). Sein Molekulargewicht beträgt 1203 Da. Die immunsuppressive Eigenschaft erhält CyA über hydrophile Aminosäurereste in Position 1, 2, 3, und 11 [3].

**Abbildung 1:**  
**Strukturformel von Cyclosporin-A**



Die immunsuppressiven Eigenschaften von Cyclosporin-A wurden 1970 von Borel et al. entdeckt [4]. In den frühen 1980er Jahren wurde CyA erstmalig als prophylaktisches Medikament gegen akute Transplantatabstoßung bei Patienten nach allogener Herz-, Leber- und Nierentransplantation durch die US Food and Drug Administration zugelassen. Durch die Einführung von CyA konnte das 1-Jahres-Überleben von Nierenallotransplantaten von 75% auf 90% verbessert werden [5], und es wurde erstmals möglich, nicht HLA-identische Herzen und Lungen zu transplantieren [6].

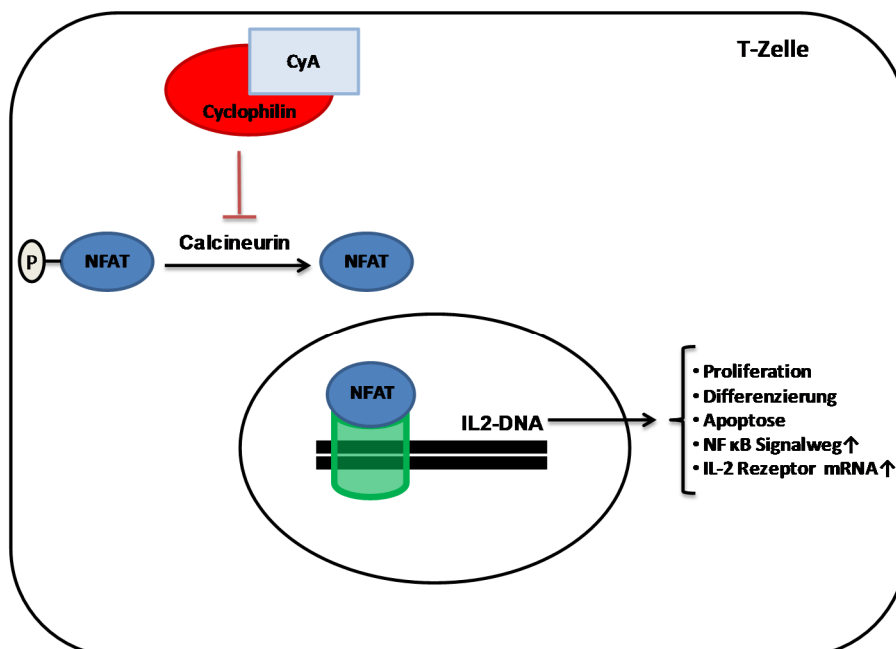
Heutzutage findet CyA klinische Anwendung als Basisimmunsuppressivum bei Organtransplantation sowie in der Therapie von Autoimmunerkrankungen (wie Lupus erythematoses, multipler Sklerose, rheumatoider Arthritis, primär biliärer Zirrhose) [7].

CyA wird überwiegend in der Leber über Cytochrom-P450-3A4-abhängige Oxidation metabolisiert und anschließend biliär ausgeschieden [8].

Die immunsuppressive Wirkung von CyA beruht überwiegend auf einer Blockade der Transkription des Interleukin-2 (IL-2) Gens [3]. IL-2 fördert Wachstum und Differen-

zierung von T-Zellen. CyA interagiert mit T-Lymphozyten, indem es an deren zytosolischen Rezeptor Cyclophilin bindet (**Abbildung 2**), das zur Familie der Immunophiline gehört [9]. Der Cyclophilin/CyA-Komplex hemmt die Phosphatase Calcineurin [10]. In Immunzellen führt Calcineurin zur Dephosphorylierung von nuclear factor of activated T-cells (NFAT), welcher dadurch von seiner inaktiven in seine aktive Form überführt wird, und die Transkription von IL-2 induziert [11]. CyA verschiebt das Gleichgewicht zwischen pNFAT und NFAT zur inaktiven phosphorylierten Form und hemmt auf diese Weise die Transkription von IL-2.

**Abbildung 2:**  
**Wirkmechanismus von Cyclosporin-A auf die IL-2-Synthese in T-Lymphozyten**



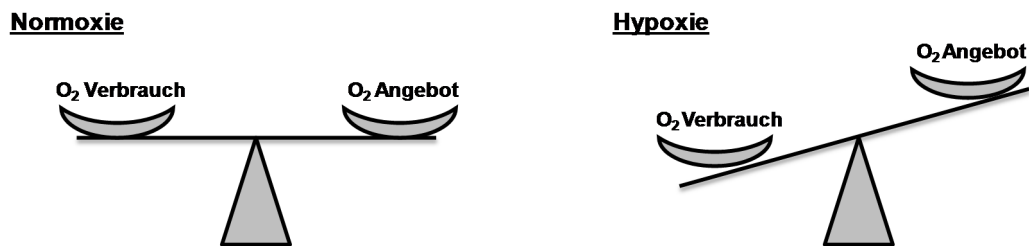
## Nierentoxizität von Cyclosporin-A

Akut führt CyA zu einer präglomerulären Vasokonstriktion und zum Abfall des effektiven glomerulären Filtrationsdruckes [12], einem potenziell reversiblen Prozess. Chronisch führt CyA zu einem schleichenden, meist irreversiblen Verlust der glomerulären Filtrationsleistung [13]. Die histologischen Kennzeichen sind unspezifisch und umfassen hyaline Arteriopathie, Tubulusepithel-Vakuolisierung und streifige tubulo-interstitielle Fibrose [14]. Die Mechanismen dieser chronischen CyA-Nephrotoxizität sind weitgehend unbekannt. Diskutiert wird u.a. eine chronische Hypoxie der Niere [15].

Hypoxie (**Abbildung 3**) kann als das Ungleichgewicht von O<sub>2</sub>-Angebot und –Verbrauch zugunsten des O<sub>2</sub>-Verbrauchs betrachtet werden [16].

### Abbildung 3:

**Begriffsdefinition: Normoxie= Gleichgewicht von O<sub>2</sub>-Angebot und –Verbrauch, Hypoxie= Überwiegen von O<sub>2</sub>-Verbrauch gegenüber O<sub>2</sub>-Angebot**

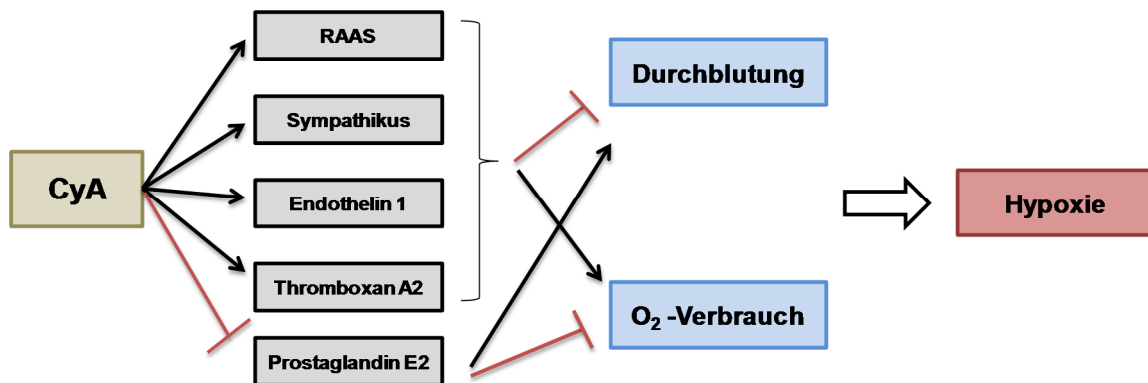


Für die chronische Hypoxie Hypothese spricht das Muster des Zellschadens in der Niere. Dieser betrifft überwiegend Markstrahlen, eine Region, in der das Kapillarnetz weniger dicht ist als im Labyrinth [17]. Das Nebeneinander von relativ gut oxygeniertem Labyrinth und O<sub>2</sub>-armen Markstrahlen erklärt die erheblichen Schwankungen der mittels Clark-Elektroden gemessenen O<sub>2</sub>-Spannung im normalen Nierenkortex [18]. Eine mögliche Erklärung für die durch CyA erzeugte, überwiegend Markstrahlen betreffende Fibrose ist eine verstärkte Hypoxie in diesem Bereich.

Theoretisch kann eine solche Hypoxie durch ein vermindertes O<sub>2</sub>-Angebot, durch einen erhöhten O<sub>2</sub>-Verbrauch oder durch eine Kombination von beiden entstehen. CyA verändert eine Reihe von Systemen, die sowohl die renale Durchblutung als auch die tubuläre Na<sup>+</sup>-Rückresorption und somit den O<sub>2</sub>-Verbrauch steuern (**Abbildung 4**):

Abbildung 4:

CyA-induzierte Veränderung von Systemen, die renale Durchblutung oder renalen O<sub>2</sub>-Verbrauch steuern



- **RAAS:** Chronische CyA-Gabe führt zu einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Die genauen Mechanismen der RAAS-Aktivierung sind ungeklärt. Eine Hypothese besagt, dass CyA die Reninproduktion in juxtaglomerulären Zellen steigert und somit renale Vasokonstriktion fördert (Übersicht in [19]).
- **Sympathikus:** Elzinga et al. zeigten, dass chronische CyA-Gabe über direkte Sympathikusaktivierung zu einer Erhöhung des renalen Gefäßwiderstandes führt [20].
- **Endothelin:** Endothelin-1 ist ein potenter Vasokonstriktor, eine Wirkung, die über ET<sub>A</sub>-Rezeptoren vermittelt wird. Ramirez et al. zeigten, dass die Hypersekretion von Endothelin-1 bei der durch CyA vermittelten Vasokonstriktion beteiligt ist [21].
- **Prostaglandine** (PGE<sub>2</sub>) und **Thromboxane** (TXA<sub>2</sub>): Unter Einfluss von CyA wird das vasokonstriktorische Thromboxan A<sub>2</sub> verstärkt, während das vasodilatatorische Prostaglandin E<sub>2</sub> vermindert gebildet wird [13, 22].

### Experimentelle durch Cyclosporin-A bedingte Nierentoxizität

In Ratten führt chronische CyA-Gabe unter gleichzeitiger Natriumrestriktion (Na<sup>+</sup>↓) über mindestens vier Wochen zu tubulo-interstitieller Fibrose.

**Tabelle 1** gibt einen Überblick über gängige Versuchsbedingungen zur Induktion chronischer renaler CyA-Toxizität an Ratten.

**Tabelle 1:****Experimentelle Modelle für durch CyA bedingte Nierentoxizität**

Krea= Kreatininkonzentration im Serum, GFR= Glomeruläre Filtrationsrate, Kontr= Kontrolle

Literaturstelle	Stamm	CyA-Dosis mg/kg · d	Form der CyA-Gabe	Na <sup>+</sup> ↓	Beobachtungs- zeitraum	GFR (ml/min), Krea (mg/dl)	Histologie
Klawitter et al. 2012	Wistar	10	p.o.	ja	28 Tage	CyA <sub>Krea</sub> 1,16 Kontr <sub>Krea</sub> 0,54	semi- quantitativer Score
Shihab et al. 2006	Sprague-Dawley	10	s.c.	ja	28 Tage	CyA <sub>Krea</sub> 0,91 Kontr <sub>Krea</sub> 0,63	semi- quantitativer Score
Rosen et al. 1993	Sprague-Dawley	15	s.c.	ja	28 Tage	CyA <sub>GFR</sub> 0,32 Kontr <sub>GFR</sub> 0,48	semi- quantitativer Score
Burdmann et al. 1995	Sprague-Dawley	15	s.c.	ja	28 Tage	CyA <sub>GFR</sub> 0,04 Kontr <sub>GFR</sub> 0,72	semi- quantitativer Score
Rosen et al. 1990	Sprague-Dawley	12,5	s.c.	ja	8-10 Wochen	CyA <sub>Krea</sub> 1,09 Kontr <sub>Krea</sub> 0,75 CyA <sub>GFR</sub> 0,7 Kontr <sub>GFR</sub> 1,7	semi- quantitativer Score

In der Maus ist bisher kein zuverlässiges Modell der chronischen CyA-induzierten tubulo-interstitiellen Nierenfibrose beschrieben. Die Etablierung des Mausmodells ist ein Ziel der vorliegenden Arbeit. Fester Bestandteil des Tiermodells ist eine Niedrigsalzdiät. Diese führt zu einer RAAS-Aktivierung, wie sie aufgrund von Grund- und Begleiterkrankungen auch bei den meisten Patienten mit chronischer CyA-Therapie besteht [23].

### Die Chronische-Hypoxie-Hypothese

Es gibt zunehmend Hinweise dafür, dass für die Pathophysiologie der chronischen Nierenfibrose eine regionale Hypoxie der Niere eine wichtige Rolle spielt [24]. Eine Reihe von Mechanismen kann zu einer Hypoxie der Niere führen:

Glomerulärer Schaden und durch Angiotensin-II vermittelte Vasokonstriktion von efferenten Arteriolen sind verantwortlich für einen reduzierten postglomerulären und peritubulären Blutfluss. Erhöhter oxidativer Stress erhöht den O<sub>2</sub>-Verbrauch in Tubuluszellen. Relative Hypoxie resultiert aus einer erhöhten Stoffwechselleistung in Tubuluszellen. Außerdem erschwert eine renal induzierte Anämie die O<sub>2</sub>-Bereitstellung (Übersicht in [24]).

Pathoanatomische Analysen zeigten, dass die funktionelle Beeinträchtigung der Niere sowie deren Prognose besser mit dem Ausmaß der tubulo-interstitiellen Fibrose korrelieren als mit dem glomerulären Schaden [25, 26].

In humanen Biopsien und experimentellen Modellen war die tubulo-interstitielle Fibrose mit einem peritubulären Kapillarverlust assoziiert [27-29]. Dies spricht für ein vermindertes O<sub>2</sub>-Angebot mit konsekutiver Tubulushypoxie und verstärkter Fibrose, was einen Teufelskreis in Gang bringt.

Laut der Chronischen-Hypoxie-Hypothese von Norman und Fine ist Tubulushypoxie die gemeinsame Endstrecke aller chronisch progredienten Nierenerkrankungen [1]. Hypoxie von Tubuluszellen führt zu deren Apoptose [30] und möglicherweise zu epithelial-mesenchymaler Transdifferenzierung [31], auch wenn diese Theorie umstritten ist [17]. Hypoxie wirkt als profibrotischer Stimulus [32]. Interstitielle Fibroblasten wandeln sich um in Myofibroblasten [33] und bilden vermehrt interstitielle Matrix.

### **Hypoxie-induzierbare Faktoren und das Von-Hippel-Lindau-Protein**

Hypoxieanpassung wird größtenteils über Hypoxie-induzierbare Faktoren (HIF) vermittelt. HIF sind Heterodimere aus einer von drei möglichen O<sub>2</sub>-abhängigen  $\alpha$ -Untereinheiten (HIF- $\alpha$ ) und einer konstitutionellen  $\beta$ -Untereinheit (HIF- $\beta$ ). Beide Untereinheiten gehören zur basic helix-loop-helix (bHLH) Per-ARNT-Sim (PAS) Superfamilie. HIF sind Transkriptionsfaktoren, die über eine O<sub>2</sub>-abhängige Proteolyse von HIF- $\alpha$  reguliert werden. Zurzeit sind einige Hundert HIF-Zielgene bekannt, über die wichtige Zell- und Gewebefunktionen gesteuert werden. (Übersicht in [34-36])

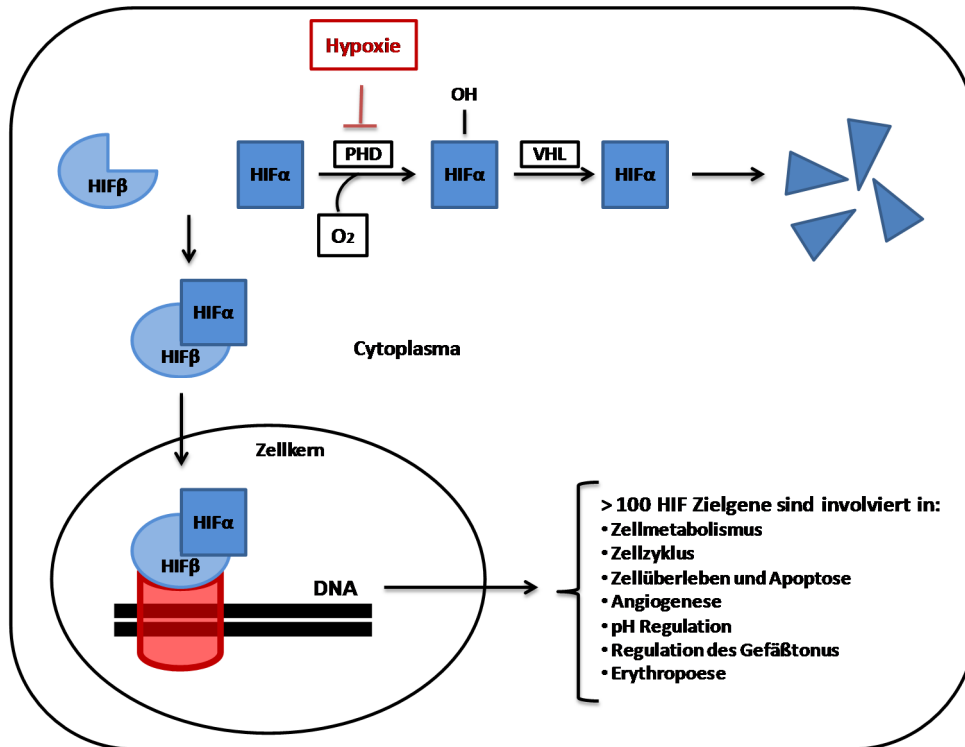
Unter Normoxie werden ständig  $\alpha$ -Untereinheiten gebildet und abgebaut (mit einer Halbwertszeit im Bereich von Minuten) [34, 37, 38]. Die Hydroxylierung von HIF- $\alpha$  durch O<sub>2</sub>-abhängige HIF-Prolyl-Hydroxylasen (PHDs) ermöglicht die Bindung des Von-Hippel-Lindau-Proteins (VHL), welches den Abbau von HIF- $\alpha$  durch das 26-S-Proteasom einleitet (23). HIF- $\beta$  wird bei ausreichendem O<sub>2</sub>-Angebot durch Caspase 3 und 9 gespalten, wodurch die Dimerisierungsfähigkeit aufgehoben wird [34].

Unter Hypoxie unterbleibt der Abbau von HIF- $\alpha$ , da PHDs inaktiv sind. Es kommt nach Akkumulation zum Übertreten von HIF- $\alpha$  in den Zellkern. HIF- $\alpha$  bindet an HIF- $\beta$  und die HIF- $\alpha\beta$ -Dimere agieren als Transkriptionsfaktoren [39, 40].



HIF- $\alpha$ -Dimere binden an hypoxieabhängige Promoter-Enhancer-Regionen der DNA und vermitteln über vermehrte Transkription von HIF Zielgenen die Hypoxieanpassung.

**Abbildung 5:**  
**Regulation der Transkriptionsaktivität von HIF** (angepasst nach [34])



Zurzeit sind einige Hundert HIF-Zielgene bekannt [36], welche eine Vielfalt von Prozessen steuern, die eine Anpassung an Hypoxie bewerkstelligen (**Tabelle 2**). Dazu gehören: Umstellung des Metabolismus auf gesteigerte Glykolyse und Glukoseaufnahme, Gefäßwiderstand (Vasodilatation), Zellzyklus (Stopp in der G1-Phase, DNA-Reparatur), Blut- und Gefäßneubildung, Radikalfang [36, 41] u.a.. Etliche der bisher bekannten HIF-Zielgene fördern Zell- und Gewebeüberleben. Andere dagegen sind proapoptotisch (Bnip3) bzw. profibrotisch (connective tissue growth factor (CTGF), tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP1) und plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) und somit potentielle Förderer einer tubulo-interstitiellen Nierenfibrose [35, 42]. Zur Veranschaulichung HIF-vermittelter Antworten auf Hypoxie wird im Folgenden eine Auswahl von Adaptationsprozessen erläutert:

- **Erythropoese:** Erythropoietin (EPO) ist das am längsten bekannten HIF-Zielgen [35]. Das Glycoprotein wird im adulten Organismus physiologisch überwiegend in der Niere gebildet und bindet an EPO-Rezeptoren auf Progenitorzellen der Erythropoese, deren Transkription ebenfalls durch HIF gesteigert ist, und fördert somit Zelldifferenzierung und –überleben [43, 44]. Desweiteren koordiniert HIF die Expression von Genen, welche die Hämoglobinsynthese begünstigen, indem sie die intestinale Aufnahme von Eisen (Hepcidin) und die Bereitstellung von Eisen für das Knochenmark (Transferrin, Transferrin-Rezeptor, Caeruloplasmin) fördern [45-48].
- **Angiogenese:** HIF aktiviert vascular endothelial growth factor (VEGF), stromal derived factor-1 (SDF-1), Angiopoietin 1 und 2 sowie platelet derived growth factor-B (PDGFB) [49-51]. Diese Faktoren binden an Rezeptoren auf Endothelzellen, endothelialen Vorläuferzellen und mesenchymalen Stammzellen und bewirken u.a. über Gefäßneubildung eine verbesserte Versorgung des Gewebes mit O<sub>2</sub> [52].
- **Glucose- und Energie-Metabolismus:** Unter Hypoxie fördert HIF die anaerobe und hemmt die aerobe Energiegewinnung [53]. Dies ist nicht nur zur Einsparung von O<sub>2</sub> sinnvoll, sondern verhindert auch, dass in den Mitochondrien unter O<sub>2</sub>-Mangel schädliche Radikale (ROS= reactive oxygen species) gebildet werden [54]. HIF hemmt die Produktion von Acetyl-CoA, das in den Citratzyklus und in die Atmungskette eingeschleust wird [55]. HIF transaktiviert die Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase [56], welche den Citratzyklus hemmt. Desweiteren transaktiviert HIF Bnip3, welches Mitophagie und somit den Abbau von hypoxisch geschädigten Mitochondrien fördert [57].
- Da unter anaeroben Bedingungen nur 2 Moleküle ATP pro Mol Glukose entstehen anstatt der 36 Moleküle, die unter aeroben Bedingungen gebildet werden [58], muss zum Ausgleich mehr Glukose verstoffwechselt werden. Die HIF-abhängige Umstellung auf anaerobe Energiegewinnung wird flankiert von einer Erhöhung der **Glukoseaufnahme in die Zelle** über den Glukosetransporter GLUT-1 [59], von einer Steigerung der Glukoneogenese über Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase und von einer erhöhten Glykogenolyse [39].

**Tabelle 2:**  
**HIF-Zielgene mit potentielltem Einfluss auf tubulo-interstitielle Nierenfibrose**

<b>Gene</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Funktion</b>	<b>Referenz</b>
Angiopoietin-1,2	ANGPT-1,2	Angiogenese	[51]
Chemokine receptor 4	CXCR4	Chemotaxis	[60]
Connective tissue growth factor	CTGF	Fibrose	[61]
Erythropoietin	EPO	Erythropoese	[62]
Glucose transporter-1	Glut-1	Glucoseaufnahme	[59]
Inducible nitric oxide synthase	iNOS	Vasodilatation	[63]
Matrix metalloproteinase-2	MMP-2	Fibrose	[64]
BCL2/adenovirus E1B 19-kDa interacting protein	Bnip3	Apoptose/ Autophagie	[65] [57]
NIP3-like	NIX	Apoptose	[66]
Plasminogen activator inhibitor-1	PAI-1	Fibrose	[67]
Plateled derived growth factor-B	PDGFB	Angiogenese	[51]
Stromal cell derived factor-1	SDF-1	Angiogenese	[50]
Vascular endothelial growth factor	VEGF	Angiogenese	[68]

## Nachweis von Gewebhypoxie mittels Pimonidazol-Verbindungen

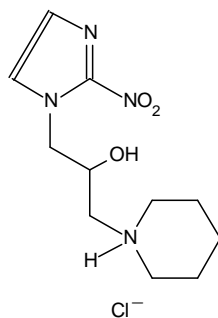
Durch die Entwicklung von Hypoxiemarkern wie Pimonidazol (PIM) ist es möglich, O<sub>2</sub>-Spannung unterhalb 10mmHg [69] im Gewebe sichtbar zu machen. Eine immunhistologische Technik ermöglicht die Detektion von PIM-Verbindungen mit einer Auflösung im Bereich einzelner Zellen oder sogar Zellbestandteile [70, 71].

PIM gehört zu der Gruppe der 2-Nitroimidazole und wurde ursprünglich als ein Verstärker für die Strahlentherapie hergestellt. Bei einem O<sub>2</sub>-Partialdruck <10mmHg wird PIM durch das Enzym 2-Nitro-Reduktase reduziert und bindet an freie Thiolgruppen [72, 73]. Diese PIM-Verbindungen lassen sich mit Hilfe von spezifischen Anti-PIM-Antikörpern immunhistologisch nachweisen.

Hypoxie kann allerdings bereits bei einem O<sub>2</sub>-Partialdruck >10mmHg auftreten. Negative immunhistologische Ergebnisse für PIM schließen eine Hypoxie also nicht aus [74].

In der Niere besteht unter physiologischen Bedingungen ein O<sub>2</sub>-Gradient zwischen Rinde und Mark [18, 75]. Ein O<sub>2</sub>-Partialdruck <10 mmHg herrscht physiologisch in der tiefen Papille, während im Cortex die Werte bei 50-70mmHg liegen [41].

**Abbildung 6:**  
**Strukturformel von Pimonidazol**



## Arbeitshypothesen

In dieser Arbeit werden die folgenden Arbeitshypothesen überprüft:

- Eine Kombination aus Nidrigsalzdiät und CyA ( $\text{Na}^+\downarrow/\text{CyA}$ ) führt in der Maus zu renaler Fibrose
- $\text{Na}^+\downarrow/\text{CyA}$  führt zu renaler Hypoxie
- $\text{Na}^+\downarrow/\text{CyA}$  führt zu renaler Aktivierung von HIF
- VHL-KO fördert die durch  $\text{Na}^+\downarrow/\text{CyA}$  bedingte renale Fibrose

Ein Mausmodell für chronische CyA-Toxizität soll etablieren werden. Daran soll getestet werden, ob im Verlauf der chronischen CyA-Toxizität renale Hypoxie und Hypoxieanpassung (HIF-Aktivierung) vorkommen. Durch ein transgenes Modell soll HIF dauerhaft aktiviert, und dessen Rolle bei der Fibroseentstehung untersucht werden. Die Pax8-rtTA-abhängige VHL-KO-Maus bietet hierzu ein gutes Werkzeug. Die dadurch erzielte HIF-Aktivierung ist ausgeprägt, anhaltend, tubulus-spezifisch und erfasst das gesamte Nephron [76].

## Material und Methoden

### Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders beschrieben, von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

### Versuchstiere

Es wurden insgesamt 40 Zuchtmäuse (weiblich, Mausstamm: Pax8-rtTA (VHL<sup>flox/flox</sup>) von der Universität Heidelberg (Prof. Dr. R. Koesters, Pathologie, Deutsches Krebsforschungszentrum) mit induzierbarem VHL-KO verwendet.

Die Tiere wurden in Gruppen zu maximal sechs Tieren in einem 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus unter konstanten 22°C gehalten. Trinkwasser und Futter waren frei zugänglich. Befinden und Gewicht wurden täglich kontrolliert.

### Niedrigsalzdiät

Eine Niedrigsalzdiät (Na<sup>+</sup>↓; Natriumgehalt 0,05%) wurde von Altromin, Lage, Deutschland (#TD94268) bezogen (**Tabelle 4**). Die Tiere erhielten destilliertes Wasser zu trinken. Kontrolltiere erhielten eine konventionelle Nahrung (**Tabelle 3**) für Ratten und Mäuse (Natriumgehalt 0,2%, Proteingehalt 22,5%) vom selben Hersteller (#1311).

**Tabelle 3:**  
**Normale Nahrung für Ratten und Mäuse (Na<sup>+</sup>-Gehalt 0,2%)**

<b>Inhaltsstoffe</b>	<b>Menge [g/kg]</b>
Rohprotein	22,50%
Lysin	1,20%
Rohfett	5,00%
Rohfaser	4,50%
Rohasche	6,50%
Kalzium	0,90%
Phosphor	0,70%
<b>Zusatzstoffe</b>	
Vitamin A	15.000 IE
Vitamin D <sup>3</sup>	600 IE
Vitamin E	75mg
Kupfer	5mg

**Tabelle 4:**  
**Niedrigsalzdiät (Na<sup>+</sup>↓; Na<sup>+</sup>-Gehalt 0,05%)**

<b>Inhaltsstoffe</b>	<b>Menge [g/kg]</b>
Weizen	350
Getreide	313,49
Sojabohnen	190
Gluten	50
Alfalfa Meal, dehydriert	30
Maiskeimöl	33
Dikalziumphosphat (18,5% P, 21% Ca)	14
Kalziumkarbonat	12
Natriumchlorid	1
<b>Zusatzstoffe</b>	
Mineral Mix	1,5
Vitamin Mix	3
DL-Methionin	1
Lysin	1
Ethoxyquin, Antioxidans	0,01

## **Cylosporin-A-Behandlung**

CyA (50mg/ml) wurde als gebrauchsfertige Lösung von der Firma Novartis (Nürnberg, Deutschland) bezogen. CyA ist lipophil und gelöst in einer Mischung aus Macrogol-40-glycerolricinoleat (Cremophor) und 96%igem Ethanol im Volumenverhältnis 2/1. Weitere Verdünnungsschritte erfolgten mit destilliertem Wasser. Die Mäuse erhielten, je nach Protokoll, alle 24h oder alle 48h je 20mg/kg, 30mg/kg oder 60mg/kg CyA subkutan in einem Gesamtvolumen von 0,3 ml. Kontrolltiere erhielten im Vergleich zu den CyA-behandelten das gleiche Volumen des reinen Lösungsmittels subkutan: Cremophor / 96%iger Ethanol im Volumenverhältnis 2/1.

## **Auslösung eines tubulus-spezifischen VHL-Knockouts**

Zur Induktion des VHL-KO wurde Doxyzyklin (Dox, 20mg/ml) von der Firma Hexal (Holzkirchen, Deutschland) 1:2 mit destilliertem Wasser verdünnt, und davon einmalig 0,3 ml subkutan verabreicht.

## **Nachweis von Gewebehypoxie mittels Pimonidazol-Verbindungen**

Pimonidazol-Hydrochlorid (Hypoxyprobe-1, Chemicon International, Hofheim, Deutschland) Trockenpulver wurde in destilliertem Wasser gelöst, und in einer Dosis von 60mg/kg, entsprechend einem Volumen von 0,3 bis 0,5 ml, zwei Stunden vor geplanter Organentnahme intraperitoneal verabreicht.

## **Tierexperimentelle Protokolle**

### **Mausmodell für CyA-induzierte tubulo-interstitielle Fibrose**

Zur Etablierung eines Mausmodells für CyA-induzierte tubulo-interstitielle Fibrose wurden vier Versuchsprotokolle von je *sechs Wochen* Dauer (**Abbildung 7**) durchgeführt (N= 6 pro Gruppe):

- *Kontrolle*: unbehandelte Tiere unter konventioneller Nahrung (0,2% Na<sup>+</sup>)
- *Na<sup>+</sup>↓/Cremophor*: Niedrigsalzdiät (Na<sup>+</sup>↓; 0,05% Na<sup>+</sup>) für die gesamte Versuchsdauer; ab der 2. Woche tägliche subkutane Injektion von CyA-Lösungsmittel (Cremophor / 96%iger Äthanol im Verhältnis 2/1)
- *Na<sup>+</sup>↓/CyA30mg·kg<sup>-1</sup>*: Niedrigsalzdiät für die gesamte Versuchsdauer; ab der 2. Woche tägliche subkutane Injektion von 30mg/kg CyA

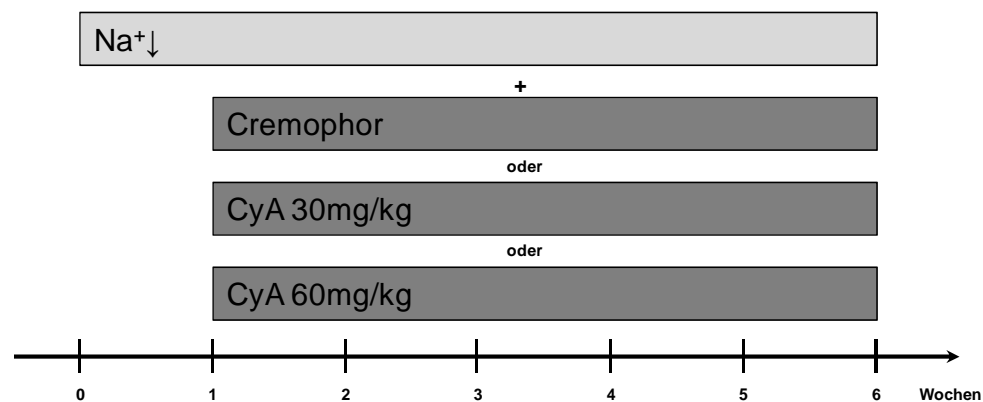


- $\text{Na}^+\downarrow/\text{CyA}60\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ : Niedrigsalzdiät für die gesamte Versuchsdauer; ab der 2. Woche tägliche subkutane Injektion von 60mg/kg CyA

#### Abbildung 7:

#### Protokoll zur CyA-Dosisfindung für die Induktion einer chronischen tubulo-interstitiellen Nierenfibrose in der Maus

$\text{Na}^+\downarrow$ = Niedrigsalzdiät mit 0,05%  $\text{Na}^+$  und destilliertem Wasser; Cremophor= Lösungsmittel für CyA;  $\text{Na}^+\downarrow$  wurde kombiniert mit entweder Cremophor oder mit CyA in zwei unterschiedlichen Dosierungen.



#### Nachweis von Hypoxie und HIF-Aktivierung in der Frühphase der durch $\text{Na}^+\downarrow/\text{CyA}$ induzierten tubulo-interstitiellen Fibrose

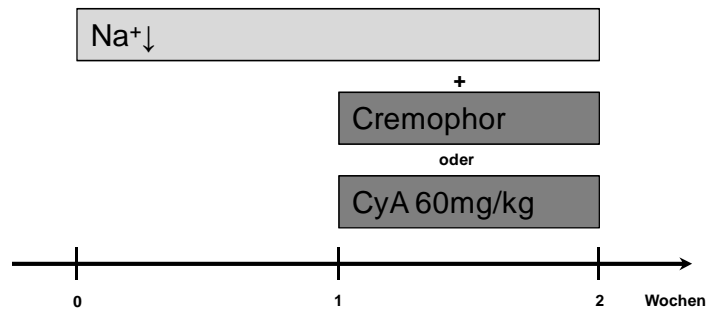
Die CyA-Dosisfindung ergab, dass das Regime mit  $\text{Na}^+\downarrow/\text{CyA}60\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  innerhalb von sechs Wochen eine tubulo-interstitielle Nierenfibrose in unserem Mausstamm auslöst. Um der Frage nachzugehen, ob intrarenale Hypoxie und eventuelle HIF-Aktivierung im Verlaufe der Fibroseentstehung vorkommen, wurden zwei Versuchsprotokolle von je zwei Wochen Dauer (**Abbildung 8**) durchgeführt (N= 4 pro Gruppe):

- $\text{Na}^+\downarrow/\text{Cremophor}$ : Niedrigsalzdiät für die gesamte Versuchsdauer; ab der 2. Woche tägliche subkutane Injektion von CyA-Lösungsmittel; zwei Stunden vor Organentnahme Gabe von Pimonidazol ( $60\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) intraperitoneal
- $\text{Na}^+\downarrow/\text{CyA}60\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ : Niedrigsalzdiät für die gesamte Versuchsdauer; ab der 2. Woche tägliche subkutane Injektion von 60mg/kg CyA; zwei Stunden vor Organentnahme Gabe von Pimonidazol ( $60\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) intraperitoneal

### Abbildung 8:

#### Protokoll zum Nachweis von Hypoxie und HIF-Aktivierung in der Frühphase der durch Natriumrestriktion und CyA induzierten tubulo-interstitiellen Fibrose

Na<sup>+</sup>↓ = Natriumrestriktion mit 0,05% Na<sup>+</sup> und destilliertem Wasser; Cremophor = Lösungsmittel für CyA; Pimonidazol (60mg/kg) wurde zwei Stunden vor Organentnahme intraperitoneal verabreicht.



#### Einfluss von VHL-Knockout auf die durch Na<sup>+</sup>↓/CyA induzierte tubulo-interstitielle Fibrose

In einem Pilotprojekt stellte sich heraus, dass CyA-Talspiegel nach Induktion des VHL-KO höher liegen, und die Dosis auf ein Drittel reduziert werden muss, um vergleichbare CyA-Talspiegel zu erzielen wie in Tieren ohne Induktion des VHL-KO.

Um das Ausmaß der HIF-Aktivierung durch die Kombination aus VHL-KO und Na<sup>+</sup>↓/CyA zu überprüfen, wurden vier Tiere für zwei Wochen wie folgt behandelt (**Abbildung 9**):

- *VHL-KO/Na<sup>+</sup>↓/CyA20mg·kg<sup>-1</sup>*: Natriumrestriktion für die gesamte Versuchsdauer; ab der 2. Woche tägliche subkutane Injektion von 60mg/kg CyA; VHL-KO wurde drei Tage vor Beginn der Natriumrestriktion durch eine einzige Gabe von Doxzyklin subkutan induziert.

### Abbildung 9:

#### Protokoll zum Nachweis der HIF-Aktivierung unter einer Kombination aus VHL-Knockout, Natriumrestriktion und CyA

$\text{Na}^+\downarrow$  = Natriumrestriktion mit 0,05%  $\text{Na}^+$  und destilliertem Wasser; VHL-KO = Knockout des Von-Hippel-Lindau-Proteins, der drei Tage vor Beginn der Natriumrestriktion durch eine einzige Gabe von Doxycyclin subkutan induziert wird.



Nun wurde der Einfluss einer durch VHL-KO ausgelösten tubulären HIF-Aktivierung auf die tubulo-interstitielle Fibrose untersucht. Es wurden zwei Gruppen à sechs Tiere für jeweils sechs Wochen wie folgt behandelt (**Abbildung 10**):

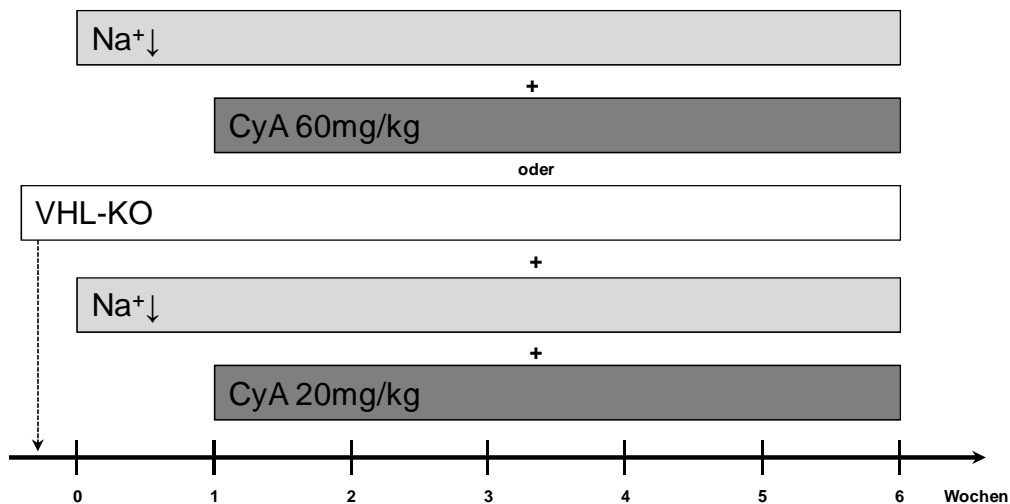
- $\text{Na}^+\downarrow/\text{CyA}60\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ : Natriumrestriktion für die gesamte Versuchsdauer; ab der 2. Woche subkutane Injektion von 60mg/kg CyA
- $\text{VHL-KO}/\text{Na}^+\downarrow/\text{CyA}20\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ : Natriumrestriktion für die gesamte Versuchsdauer; ab der 2. Woche subkutane Injektion von 20mg/kg CyA; VHL-KO wurde durch eine einzige subkutane Injektion von Doxycyclin drei Tage vor Beginn der Natriumrestriktion induziert

Aufgrund von Gewichtsverlust und reduziertem Allgemeinbefinden der Tiere in der  $\text{VHL-KO}/\text{Na}^+\downarrow/\text{CyA}20\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ -Gruppe wurden ab der 3. Woche die CyA-Gaben in beiden Versuchsgruppen von täglich auf alle zwei Tage reduziert.

### Abbildung 10:

#### Protokoll zum Einfluss von VHL-KO auf die CyA-bedingte tubulo-interstitielle Nierenfibrose

Alle Tiere erhalten  $\text{Na}^+\downarrow$  = Niedrigsalzdiät mit 0,05%  $\text{Na}^+$  und destilliertem Wasser; VHL-KO = Knockout des Von-Hippel-Lindau-Proteins, der drei Tage vor Beginn der Nidrigsalzdiät durch eine einzige Gabe von Doxyzyklin subkutan induziert wird. Unter VHL-KO sind die CyA-Talspiegel höher als in Tieren ohne VHL-KO. Deshalb wird, um vergleichbare Talspiegel zu erreichen, die CyA-Dosis in VHL-KO-Tieren auf ein Drittel reduziert.



### Organentnahme, Fixierung und Aufbereitung

Am Ende des Versuches wurden die Tiere mittels Isofluran (Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) inhalativ in eine Vornarkose versetzt. Um eine tiefe Narkose zu erzielen, erhielten die Tiere zusätzlich 0,001mg/kg einem Gemisch aus Ketamin (100mg/kg), Xylazin (20mg/kg) und Acepromazin (3mg/kg) intraperitoneal. Die Nieren wurde mit mikrochirurgischem Instrumentarium unter einem Stereomikroskop (Carl Zeiss AG, Deutschland) gemäß der Methode von Dawson et al. [77] perfusionsfixiert. Im Wesentlichen wurden dabei die Nieren bei konstantem Druck (für eine Minute 200mmHg, für weitere 4 Minuten 100mmHg) unter Raumtemperatur retrograd mit 3% Paraformaldehyd (pH 7,4) über einen Polyäthylenschlauch in der infrarenalen Aorta gespült, wobei der Abfluss über die breit eröffnete Vena cava inferior erfolgte.

Die Nieren wurden von ihrer Kapsel befreit, mit einer Rasierklinge in 2mm dicke koronare Scheiben geschnitten, und über Nacht bei 4°C nachfixiert: für Semidünnschnitte in Cacodylat (0,1M)/Glutardialdehyd (0,05%) bzw. für Paraffinschnitte in Cacodylat (0,1M)/PFA (3%). Anschließend wurden die Gewebe bis zur Einbettung in Kunstharz bzw. Paraffin bei 4°C in Cacodylat (0,1M)/Natriumazid (0,02%) gelagert.

Für eine Einbettung in Paraffin wurden Nierenschnitte für 12 Stunden nachfixiert (Raumtemperatur, 4%iges Formalin, pH 7,4), für eine Stunde unter fließendem Leitungswasser gespült, und in einer aufsteigende Alkoholreihe entwässert (1 Stunde 70% Ethanol, 1 Stunde 96% Ethanol, 2 · 30 Minuten absoluter Ethanol). Es folgte ein Inkubationsschritt für 2 · 30 Minuten in Xylol, anschließend wurden die Schnitte für 12 Stunden bei 69°C in flüssigem Paraffin gelagert. An der Ausgießstation (TES 4004, Produkte für die Medizin AG, Köln) wurden die Nierenschnitte mit frischem Paraffin zu Blöcken gegossen und zur Aushärtung auf einer Kühlplatte (-10°C) gelagert. Von den fertigen Blöcken wurden 1-2µm dicke Gewebeschnitte an einem manuell betriebenen Rotationsmikrotom (Rotary 3003, Produkte für die Medizin AG, Köln) angefertigt und anschließend in einem Wärmeschrank (40°C) über Nacht gelagert.

Für eine Einbettung in Kunstharz wurden Nierenschnitte über Nacht in Postfixierlösung (2% Osmiumtetroxid, ChemPur, Karlsruhe, Deutschland) nachfixiert, für 4x 10 Minuten in 0,1M Cacodylatpuffer gespült und mittels aufsteigender Alkoholreihe (10 Minuten 50% Alkohol, 10 Minuten 70% Alkohol, 2x 10 Minuten 80% Alkohol, 2x 10 Minuten 96% Alkohol, 3x 10 Minuten absoluter Alkohol) entwässert. Nach Lagerung in Propylenoxid für 2x 15 Minuten folgten drei Immersionsschritte mit einer Mischung aus Propylenoxid und Epon im Verhältnis 2:1, 1:1 sowie 1:2 für je eine Stunde. Im Anschluss wurden die Schnitte in reinem Epon über Nacht gelagert. Es folgte eine Polymerisation bei 60°C für 48 Stunden. Daraufhin wurden am Mikrotom RM 2065 (Leica, Bensheim, Deutschland) 0,5-1µm dicke Semidünnschnitte angefertigt. Nach dem Trocknen auf einer Heizplatte bei 120°C erfolgte die Färbung der Schnitte mit Richardson Färbelösung (Methylenblau/Azur 1:1) über 1 Minuten bei 80°C. Die überschüssige Farbe wurde unter fließendem Leitungswasser abgespült, die Schnitte bei Raumtemperatur getrocknet und mit Eukitt (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) eingedeckelt.

### **Blut- und Urinuntersuchung**

In den Wochen 0 und 6 wurde Blut aus dem Wangenplexus (Details unter [http://www.ahc.umn.edu/rar/facial\\_vein.html](http://www.ahc.umn.edu/rar/facial_vein.html)) und 24-Stunden-Urin im metabolischen Käfig (Metabolic Cage- 3M12D100, Techniplast, Bagaggiato, Italien) unter freiem Zugang zu Futter und Trinkwasser gewonnen.

Plasma-Kreatinin, -Harnstoff und -Natrium sowie Urin-Kreatinin und -Natrium wurden in einem COBAS C8000 der Firma Roche/Hitachi bestimmt. Der Cyclosporin-A Spiegel aus EDTA-Blut wurde über einen automatisierten Immunoassay (Architect i2000 der Firma Abbott) bestimmt. Der Hämoglobingehalt des Blutes wurde über ein Blutgasanalysegerät (ABL 800 Flex, Radiometer GmbH, Willich-Schiefbahn, Deutschland) bestimmt. Die Kreatinin-Clearance wurde anhand folgender Formel errechnen:

**Abbildung 11:**

**Formel zur Berechnung der Kreatinin-Clearance**

$C_{Krea}$ = Kreatinin-Clearance,  $U_{Krea}$ = Kreatinin im Urin,  $P_{Krea}$ = Kreatinin im Plasma,  $U_{Volumen}$ = Urinvolumen, T= Zeit,  $\mu$ l= Mikroliter, min= Minute, mg= Milligramm, dl= Deziliter

$$C_{Krea} [\mu\text{l}/\text{min}] = \frac{U_{Krea} [\text{mg}/\text{dl}] \times U_{Volumen} [\mu\text{l}]}{P_{Krea} [\text{mg}/\text{dl}] \times T [\text{min}]}$$

Die quantitative Bestimmung der Albuminkonzentration im 24h-Urin erfolgte in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte mithilfe eines im Handel erhältlichen ELISA (Mouse Albumin Elisa Quantification Set, Bethyl, Montgomery, Texas) (für Reagenzien siehe **Tabelle 5**) nach folgendem Protokoll:

- Coating-Antikörper (Ziege-anti-Maus-Albumin, 1:100)
- Blockungsschritt mit Postcoat Solution
- Urinproben 1:1000 und 1:5000 verdünnt
- Detektions-Antikörper (Ziege-anti-Maus Albumin, mit horseradish peroxidase (HRP) gekoppelt, 1:35000)
- Farbreaktion bei Dunkelheit: Chromogen Tetramethylbenzidin (TMB)
- Stoppreaktion: 0,18 M Schwefelsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Ablesen der Extinktion am Plattenphotometer Tecan Sunrise (Tecan Austri GmbH, Österreich) bei einer Wellenlänge von 450nm und Vergleich mit einer Standardreihe in einer Konzentrationsspanne des Referenzserums von 10.000ng/ml bis 7,8ng/ml.

**Tabelle 5:**  
**Reagenzien zur Urin-Albuminbestimmung**

---

### **Materialien**

---

1. Microtiter Platte  
Nunc MaxiSorp C bottom well Modules&Frames #445101
2. Coating buffer  
Carbonate-bicarbonat buffer capsules, Sigma Chemical #C3041
3. Wash solution  
50mM Tris buffered saline, pH 8.0, 0,05% Tween20, Sigma Chemical T903950
4. Postcoat solution  
50mM Tris buffered saline, pH 8.0, 1% BSA, Sigma Chemical T6789
5. Sample/ conjugate diluent  
50mM buffered saline, pH 8.1, 1% BSA, 0,05% Twen20 Sigma Chemical #P7949
6. Enzyme substrate  
TMS peroxidase substrate & peroxidase solution B; Kirkegaard & Perry
7. Mouse reference serum RS10-101-5 45ng/ml albumin

### **Immunhistochemische Färbungen**

Sämtliche immunhistochemischen Färbungen wurden an 1,5 bis 2 µm dicken Paraffinschnitten in folgenden Schritten durchgeführt:

- Entparaffinierung in abgestufter Xylol- und Alkoholreihe
- eventuell Antigendemaskierung
- Blockung
- erster Antikörper
- zweiter Antikörper
- eventuell Amplifizierungsschritte
- Farbreaktion: Peroxidase mit dem Chromogen Diaminobenzidin

Waschschritte mit entsprechendem Puffer wurden, wenn erforderlich, dazwischengeschaltet. Die Inkubationen erfolgten in einer feuchten Kammer.

## HIF-1 $\alpha$

Es wurde ein CSA<sup>®</sup>-Kit (Catalyzed Signal Amplification System, #K1500, DAKO, Hamburg, Deutschland) der benutzt, aus dem alle unten aufgeführten Reagenzien stammen. Als Waschpuffer wurde Tris Buffered Saline with Tween 20 (TBST) benutzt (**Tabelle 6**). Die Antigendemaskierung erfolgte durch 12-minütiges Kochen in target retrieval solution (pH 9; Zusammensetzung nicht publiziert, #1699, Dako, Hamburg) im Dampfkochtopf bei höchster Stufe (gemäß Herstellerangaben bei ca. 117°C). Nach Blockungsschritten mit Avidin, Biotin, Wasserstoffperoxid bzw. Protein wurde der erste Antikörper (anti-humanes HIF-1 $\alpha$  aus Kaninchen, Cayman, Biomol, Hamburg) in einer Verdünnung von 1:30.000 angewandt. Der zweite Antikörper (Ziege-anti-Kaninchen, DAKO-Cytomation, Hamburg) wurde in einer Verdünnung von 1:400 angewandt. Die Amplifizierungsschritte basieren auf der Bildung von Komplexen aus Streptavidin, Biotin, und Peroxidase. Zu diesem Zweck wurden drei weitere Inkubationsschritte mit Streptavidin-Biotin-Komplex, Biotinyltyramid-Wasserstoffperoxid bzw. Streptavidin-HRP durchgeführt. Zum Abschluss erfolgte die Entwicklung einer Braunfärbung mit Diaminobenzidin und Wasserstoffperoxid unter mikroskopischer Kontrolle.

**Tabelle 6:**  
**Zubereitung von 4 Liter 10-fach konzentriertem TBST-Puffer pH 7,6**

Inhaltsstoffe	Menge
Tris-HCl	242,28g
NaCl	701,28g
HCl 37%	125ml
Tween 20	40ml
Aqua dest.	bis zu 4 Liter Gesamtvolumen

## Pimonidazol-Verbindungen

Alle verwendeten Materialien wurden dem Hypoxyprobe<sup>TM</sup>-1 Plus Kit der Firma Chemicon International, Hofheim, Deutschland entnommen. Als Waschpuffer wurde Tris Buffered Saline plus Tween-20 (TBS + Tween-20) benutzt (**Tabelle 7**). Diese Methode erforderte Antigendemaskierung mittels 6-minütigen Kochens in 10mM Natriumcitratpuffer (pH 6,0). Blockungsschritte erfolgten mittels Wasserstoffperoxid-Methanol bzw. Protein.



Der erste Antikörper (Hypoxyprobe-1 Mab 1), welcher an Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelt ist, wurde in einer Verdünnung von 1:50 angewandt. Der zweite Antikörper (Anti-FITC secondary Mab HRP) wurde ebenfalls in einer Verdünnung von 1:50 angewandt. Zum Abschluss erfolgte die Entwicklung einer Braunfärbung mit Wasserstoffperoxid und Diaminobenzidin unter mikroskopischer Kontrolle.

**Tabelle 7:**  
**Zubereitung von 100 Millilitern TBST-Puffer pH 7,4-7,6**

Inhaltsstoffe	Menge	
TBS + Tween 20	TBS 10x	10ml
	Aqua dest.	90ml
	Tween 20	0,5ml

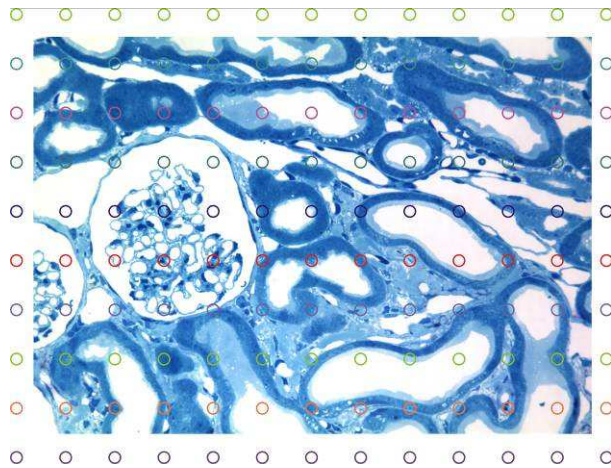
### Histologische Auswertung

Die histologische Auswertung erfolgte an einem mit differentiellm Interferenz-Kontrast ausgestatteten Leica-DMRB-Mikroskop (Leica, Wetzlar, Deutschland). Die Bilder wurden mit einer SPOT RT 2.3.0 Digitalkamera (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA) unter Verwendung des Computerprogramms MetaVue (Molecular Devices, Downingtown, PA, USA) aufgenommen.

### Semiquantitative Bestimmung der tubulo-interstitiellen Fläche

Die tubulo-interstitielle Fläche wurde semiquantitativ mithilfe eines Gitters bestimmt. **Abbildung 12** veranschaulicht das Verfahren: Gewertet wird ausschließlich der Inhalt der kleinen farbigen Kreise, entsprechend den Kreuzungspunkten eines Gitters. Die darin abgebildete Fläche wird einer der folgenden Kategorien zugeordnet wird: 1) Tubulus, 2) Tubulo-Interstitium (Matrix- und Zellanteil zusammen; Kapillaren ausgeschlossen) und 3) andere (Glomerulus, großes Gefäß, Vasa-recta-Bündel, Kapillare, Gewebespalt). Enthält eine Messfläche verschiedene Gewebeanteile, so ist der rechte obere Quadrant, und davon wiederum der überwiegende Gewebeanteil für die Wertung maßgeblich. Der tubulo-interstitielle Fibrose-Score in Prozent wird wie folgt berechnet:  $100 \cdot \text{tubulo-interstitielle Fläche} / (\text{tubulo-interstitielle Fläche} + \text{tubuläre Fläche})$ . Cortex, Außenstreifen und Innenstreifen wurden jeweils getrennt ausgewertet.

Auf die Auswertung der Innenzone/Papilla wurde aus methodischen Gründen verzichtet, da hier am histologischen Präparat eine Unterscheidung zwischen Kapillaren und dünnen Henlesche Schleifen nicht möglich ist. Pro Tier und Nierenzone wurden zwei repräsentative Ausschnitte in 100-facher Vergrößerung angefertigt.



**Abbildung 12:**

**Semiquantitative Bestimmung der tubulo-interstitiellen Fläche**

0,5µm Semidünnschnitte; Gegenfärbung mit Richardson-Reagenz; Die Fläche in den bunten Kreisen wird einer der folgenden Kategorien zugeordnet: Tubulus (Epithel oder Lichtung), Tubulo-Interstitium, andere (Glomerulus, Gefäß, Gewebespalt). Ist die Stichprobe im Kreis inhomogen, gilt der obere rechte Quadrant; tubulo-interstitieller Fibrose-Score [%]=  $100 \cdot \text{tubulo-interstitielle Fläche} / (\text{tubulo-interstitielle Fläche} + \text{tubuläre Fläche})$

**Statistische Auswertung**

Unterschiede zwischen einzelnen Versuchsgruppen wurden mittels t-Test bzw. Mann-Whitney U-Test auf Signifikanz geprüft. Ein p-Wert von <0,05 wurde als signifikant gewertet. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte ± Standardfehler.

## Ergebnisse

### ***Na<sup>+</sup>↓/CyA führt zu tubulo-interstitieller Nierenfibrose***

Um ein Modell für tubulo-interstitiellen Nierenfibrose im Pax8-rtTA-Mausstamm zu etablieren, wurden die Tiere chronisch mit Na<sup>+</sup>↓ und zwei unterschiedlichen CyA-Dosierungen behandelt (**Abbildung 7**). Der VHL-KO wurde nicht induziert. Die Ergebnisse sind in (**Tabelle 8**;) zusammengefasst:

**Tabelle 8:**

#### **Etablierung einer tubulo-interstitiellen Fibrose in der Maus durch Na<sup>+</sup>↓/CyA**

P<sub>Krea</sub>= Plasma-Kreatinin, P<sub>Hst</sub>= Plasma-Harnstoff, C<sub>Krea</sub>= Kreatinin-Clearance, U<sub>Na+</sub>= Natriumkonzentration im Urin, U<sub>Alb</sub>= Albuminurie, Fibrose-Score= 100 · interstitielle Fläche / (interstitielle Fläche + tubuläre Fläche); (#= p<0,05 gegenüber Kontrolle; \*= p<0,05 gegenüber Na<sup>+</sup>↓/Cremophor).

Parameter	Einheit	Kontrolle	Na <sup>+</sup> ↓/Cremophor	Na <sup>+</sup> ↓/CyA30mg·kg <sup>-1</sup>	Na <sup>+</sup> ↓/CyA60 mg·kg <sup>-1</sup>
CyA Tal-Spiegel	µg/l	entfällt	entfällt	2200 ± 151,5	4450 ± 151,9 *, #
Ausgangs-Gewicht	g	24,8 ± 0,7	24,6 ± 0,8	26,0 ± 0,9	26,3 ± 1,1
End-Gewicht	g	27,1 ± 0,6	26,5 ± 0,6	25,5 ± 1,2	23,1 ± 0,5 *, #
P <sub>Krea</sub>	mg/dl	0,2 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,33 ± 0,01 *, #
P <sub>Hst</sub>	mg/dl	43,17 ± 2,02	41,83 ± 3,64	41,0 ± 2,03	52,5 ± 2,38 *, #
C <sub>Krea</sub>	µl/min	1,27 ± 0,02	1,21 ± 0,06	1,25 ± 0,05	0,85 ± 0,06 *, #
U <sub>Na+</sub>	mmol/l	118,83 ± 1,64	16,0 ± 1,69 #	18,33 ± 1,61 #	15,67 ± 1,76 #
U <sub>Alb</sub>	mg/24h	0,113 ± 0,01	0,099 ± 0,01	0,122 ± 0,01	0,041 ± 0,01 *, #
Fibrose-Score Cortex	%	20,47 ± 0,67	20,25 ± 2,64	22,83 ± 0,49	43,61 ± 0,70 *, #
Fibrose-Score Außenstreifen	%	20,05 ± 0,46	21,35 ± 0,93	22,7 ± 0,29	44,98 ± 0,75 *, #
Fibrose-Score Innenstreifen	%	20,72 ± 0,48	20,88 ± 0,50	22,23 ± 0,40	45,83 ± 0,90 *, #

Im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen war U<sub>Na+</sub> in allen drei Gruppen mit Niedrigsalzdiät signifikant auf etwa ein Sechstel reduziert. Die Gabe von CyA hatte hingegen keinen Einfluss auf U<sub>Na+</sub>.

Na<sup>+</sup>↓/Cremophor und Na<sup>+</sup>↓/CyA30mg·kg<sup>-1</sup> unterschieden sich mit Ausnahme der erniedrigten U<sub>Na+</sub> nicht von unbehandelten Kontrollen.

Demgegenüber waren unter Na<sup>+</sup>↓/CyA60mg·kg<sup>-1</sup> sämtliche bestimmten Parameter signifikant verschieden von den Kontrollen. Die Tiere verloren etwa 10% ihres Körpergewichtes. Erhöhtes P<sub>Krea</sub> und P<sub>Hst</sub> sowie erniedrigte C<sub>Krea</sub> belegen eine Nierenfunktionseinschränkung. Die tubulo-interstitielle Fläche war in Cortex und den beiden Zonen des äußeren Markes in etwa verdoppelt, was einer tubulo-interstitiellen Fibrose entspricht. Einzelne Tubuli wiesen degenerative Veränderungen auf, die so ausgeprägt

waren, dass histologisch keine Zuordnung zu einem bestimmten Nephronsegment mehr möglich war (Sternchen in **Abbildung 13B, D, F, H**). Weitgehend unauffällige und schwer veränderte Tubuli lagen nebeneinander (**Abbildung 13**).  $U_{\text{Alb}}$  war unter  $\text{Na}^+\downarrow/\text{CyA}60\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  signifikant niedriger als in den übrigen Gruppen (**Tabelle 8**).

### ***$\text{Na}^+\downarrow/\text{CyA}$ führt zu Hypoxie in Teilen des Nephrons***

Um zu überprüfen, ob  $\text{Na}^+\downarrow/\text{CyA}$  zu einer lokalen Hypoxie in der Niere führt, bevor sich eine tubulo-interstitielle Fibrose ausbildet, wurden Mäuse für zwei Wochen mit dem Regime  $\text{Na}^+\downarrow/\text{CyA}60\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  (**Abbildung 8**) behandelt, und der Hypoxiemarker Pimonidazol immunhistochemisch bestimmt. In unbehandelten Kontrollen und unter  $\text{Na}^+\downarrow/\text{Cremophor}$  waren Signale lediglich in der tiefen Papille nachweisbar (nicht gezeigt). Zusätzlich dazu fanden sich unter  $\text{Na}^+\downarrow/\text{CyA}60\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Pimonidazol-Signale in Tubuli des Cortex und des äußeren Markes. Die meisten dieser Pimonidazol-positiven Tubuli verliefen parallel zur cortico-medullären Achse, in Markstrahlen (**Abbildung 14A**), und in deren Basis (**Abbildung 14C**). Darüber hinaus waren dicke aufsteigende Henlesche Schleifen im Innenstreifen markiert (**Abbildung 14E**).

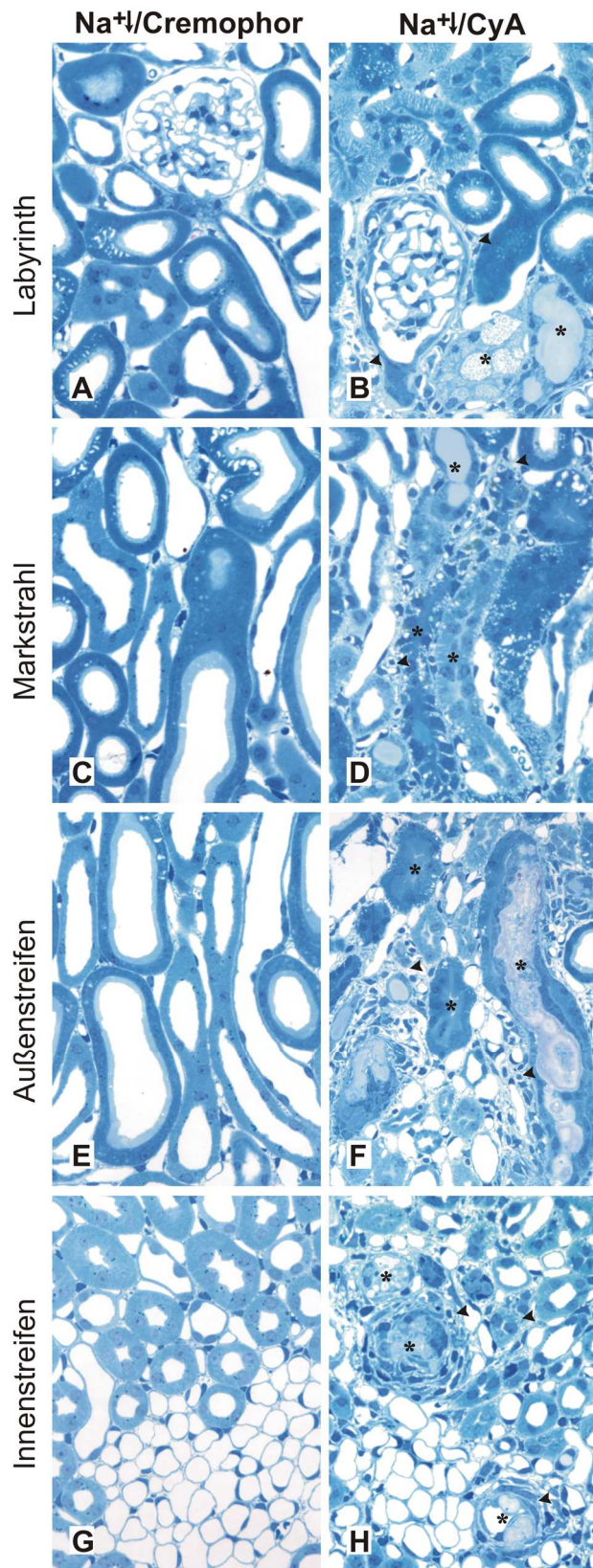
### ***$\text{Na}^+\downarrow/\text{CyA}$ führt zu HIF-Aktivierung in Teilen des Nephrons***

Um zu überprüfen, ob die durch  $\text{Na}^+\downarrow/\text{CyA}$  ausgelöste renale Hypoxie von einer HIF-Aktivierung begleitet wird, wurden Mäuse für zwei Wochen mit dem Regime  $\text{Na}^+\downarrow/\text{CyA}60\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  (**Abbildung 8**) behandelt, und HIF-1 $\alpha$  immunhistochemisch bestimmt. In unbehandelten Kontrollen und unter  $\text{Na}^+\downarrow/\text{Cremophor}$  waren Signale lediglich in der tiefen Papille nachweisbar (nicht gezeigt). Zusätzlich dazu fanden sich unter  $\text{Na}^+\downarrow/\text{CyA}60\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  HIF-1 $\alpha$ -Signale in Tubuli des Cortex und des äußeren Markes. Die meisten dieser HIF-1 $\alpha$ -positiven Tubuli verliefen parallel zur cortico-medullären Achse, in Markstrahlen (**Abbildung 14B**), und in deren Basis (**Abbildung 14D**). Darüber hinaus waren dicke aufsteigende Henlesche Schleifen im Innenstreifen markiert (**Abbildung 14F**). Die Signalhäufigkeit stieg mit der Entfernung von den Vasa-recta-Bündeln, was auf eine hypoxische HIF-Aktivierung hindeutet.

### ***VHL-KO/ $\text{Na}^+\downarrow/\text{CyA}$ führt zu HIF-Aktivierung im gesamten Nephron***

Um zu überprüfen, ob die unter  $\text{Na}^+\downarrow/\text{CyA}$  beobachtete renale HIF-Aktivierung steigerbar ist, wurden vier Mäusen für zwei Wochen nach dem Protokoll

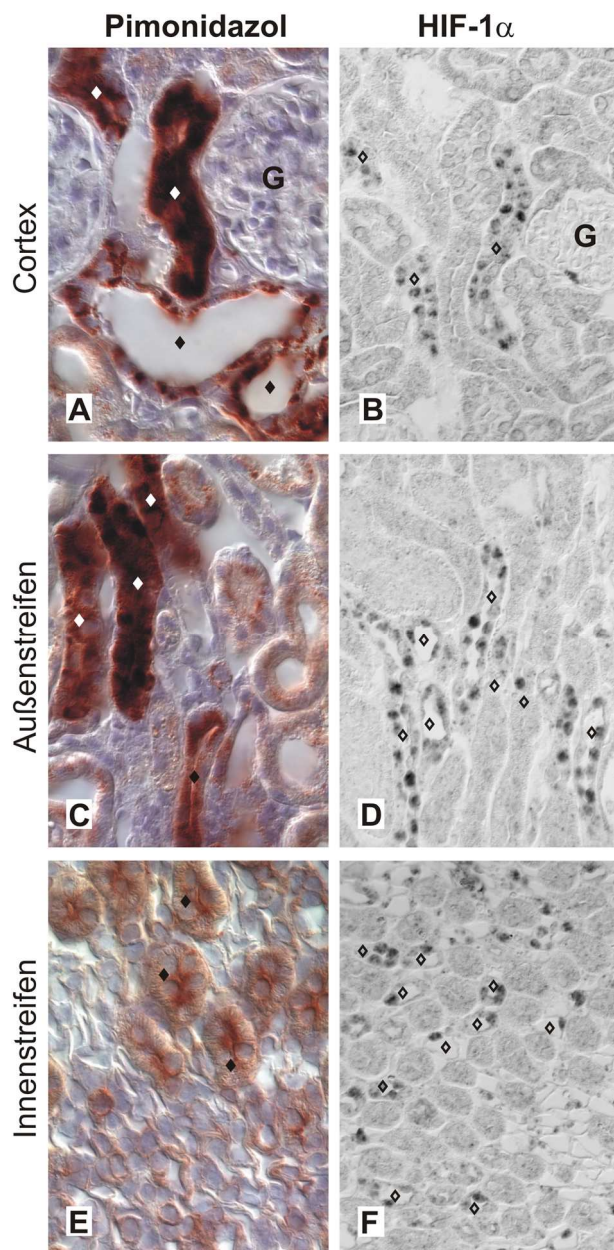
VHL-KO/Na<sup>+</sup>↓/CyA20mg·kg<sup>-1</sup> (**Abbildung 8**) behandelt, und anschließend eine Immunhistochemie für HIF-1 $\alpha$  durchgeführt (**Abbildung 15**). Es zeigt sich eine deutliche Zunahme der HIF-Signale (zum Vergleich siehe **Abbildung 14B, D, F**), die praktisch in allen Tubulusquerschnitten nachweisbar waren. Lediglich im Außenstreifen (**Abbildung 15B**) fanden sich einzelne Tubuli mit geringem oder gar fehlendem HIF-1 $\alpha$ -Signal (offene Dreiecke in **Abbildung 15C**). Insgesamt betrachtet, führte VHL-KO/Na<sup>+</sup>↓/CyA20mg·kg<sup>-1</sup> zu einer Aktivierung von HIF-1 $\alpha$  im gesamten Nephron zu einem Zeitpunkt, an dem noch keine tubulo-interstitielle Fibrose ausgebildet war.



**Abbildung 13:**

**Na<sup>+</sup>/CyA60mg·kg<sup>-1</sup> führt zu Tubulusdegeneration und tubulo-interstitieller Fibrose**

Semidünnschnitte (0,5 µm) von Mäusen nach sechswöchiger Behandlung nach dem Na<sup>+</sup>/CyA60mg·kg<sup>-1</sup>-Protokoll (Abbildung 7); G= Glomerula; VB= Vasa-recta-Bündel; Sternchen= degenerierte Tubuli; Pfeilspitzen= Fibroseareale; offene Kreise= normale Tubuli. Zwischen Na<sup>+</sup>/Cremophor und unbehandelten Kontrollen (nicht gezeigt) besteht kein Unterschied. Tubulusdegenerationen finden sich nur vereinzelt unter Na<sup>+</sup>/CyA30mg·kg<sup>-1</sup> (nicht gezeigt), jedoch ausgeprägt unter Na<sup>+</sup>/CyA60mg·kg<sup>-1</sup>, wo sie von Fibrosearealen begleitet werden (B, D, F, H). Degenerierte Tubuli stehen Seit-an-Seit mit normalen Tubuli (A). Im Markstrahl (B) und im Außenstreifen (F) sind überwiegend Tubuli betroffen, die parallel zur cortico-medullären Achse verlaufen. Im tangential getroffenen Innenstreifen finden sich besonders ausgeprägte Tubulusatrophien mit zwiebelschalenartiger Umgebungsreaktion (H). Fibroseareale finden sich bevorzugt in der Umgebung degenerierter Tubuli (B, D, F, H). Vergrößerung: 400x

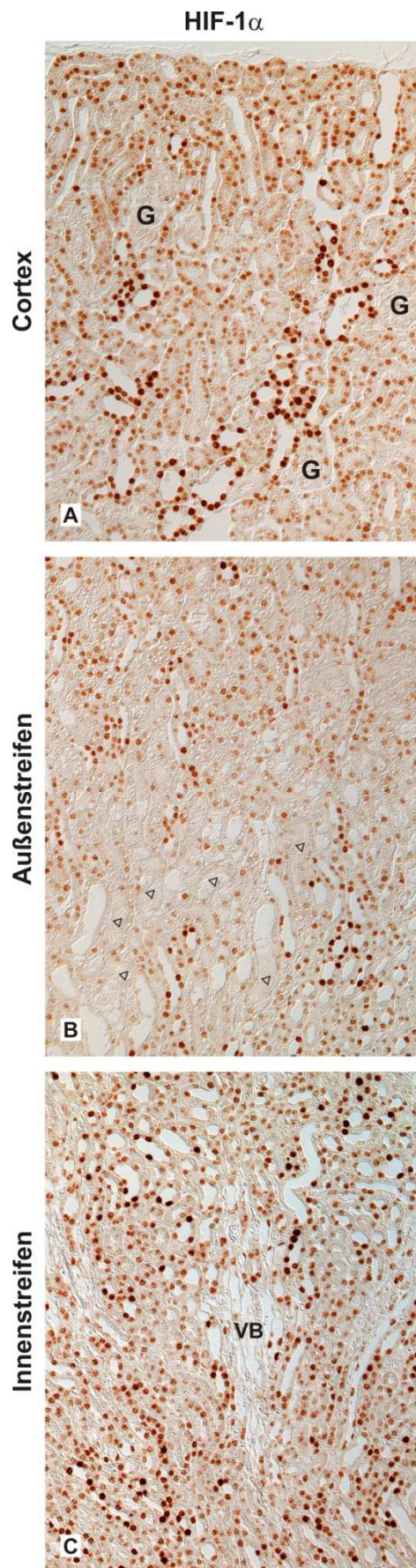


**Abbildung 14:**

**Na<sup>+</sup>↓/CyA führt zu Hypoxie und HIF-1 $\alpha$ -Aktivierung in Teilen des Nephrons**

Immunhistochemische Färbung für Pimonidazol (links) bzw. HIF-1 $\alpha$  (rechts) an Mäusen, die für zwei Wochen mit dem Na<sup>+</sup>↓/CyA60mg·kg<sup>-1</sup>-Protokoll (Abbildung 7) behandelt wurden; G= Glomerula; VB= Vasarecta-Bündel; offene Rauten= HIF-1 $\alpha$ -positive Tubuli; geschlossene Rauten= Pimonidazol-positive Tubuli

Unbehandelte Kontrollen zeigen keinerlei Signale mit Ausnahme der Papille (nicht gezeigt). Na<sup>+</sup>↓/Cremophor führt darüber hinaus zu vereinzelt HIF-1 $\alpha$ -Signalen in allen Nierenzonen (nicht gezeigt). Na<sup>+</sup>↓/CyA60mg·kg<sup>-1</sup> führt zu einer Anreicherung von Pimonidazol und HIF-1 $\alpha$  in überwiegend cortico-medullär verlaufenden Tubuli des Cortex (A, B) und des Außenstreifens (C, D). Im tangential getroffenen Innenstreifen sind dicke aufsteigende Henlesche Schleifen (E) positiv für Pimonidazol. In dieser Zone sind Sammelrohre und dünne Henlesche Schleifen (F) positiv für HIF-1 $\alpha$ . Die Signale häufen sich mit der Entfernung zu den Gefäßbündeln (F). Vergrößerung: 400x in A, C, E; 250x in B, D, F



**Abbildung 15:**

**Na<sup>+</sup>↓/CyA/VHL-KO führt zu HIF-1 $\alpha$ -Aktivierung im gesamten Nephron**

Immunhistochemische Färbung für HIF-1 $\alpha$  an Mäusen, die für zwei Wochen mit dem VHL-KO/Na<sup>+</sup>↓/CyA20mg·kg<sup>-1</sup>-Protokoll (Abbildung 8) behandelt wurden. G= Glomerula; VB= Vasa-recta-Bündel

In Cortex (A), Innenstreifen (C) und Papilla (nicht gezeigt) finden sich in nahezu jedem Tubulusquerschnitt positive Kerne. Die Signalintensität variiert. Im Außenstreifen sind einzelne Tubuli nur schwach oder gar nicht angefärbt (offene Dreiecke in B). Vergrößerung: 100x.



## **VHL-KO verstärkt die durch Na<sup>+</sup>↓/CyA ausgelöste tubulo-interstitielle Nierenfibrose**

Als nächstes wurde der Einfluss einer durch VHL-KO ausgelösten chronischen HIF-Aktivierung auf die tubulo-interstitielle Nierenfibrose untersucht. Dazu wurden zeitgleich die Protokolle Na<sup>+</sup>↓/CyA60mg·kg<sup>-1</sup> und VHL-KO/Na<sup>+</sup>↓/CyA20mg·kg<sup>-1</sup> durchgeführt (**Abbildung 10**), die bei vergleichbaren CyA-Talspiegeln (3100 ± 239µg/l ohne VHL-KO vs 3254 ± 221µg/l *mit* VHL-KO) zu folgenden Veränderungen führten:

- **Körpergewicht**

Bei vergleichbaren Anfangswerten (**Abbildung 16**) (32,9 ± 1,2g ohne VHL-KO vs 32,5 ± 0,6g *mit* VHL-KO) nahm das Körpergewicht im Verlauf in beiden Gruppen signifikant ab. In der Gruppe mit VHL-KO war das Endgewicht signifikant niedriger (26,9 ± 1,3g vs 30,4 ± 1,2g ohne VHL-KO; p < 0,05).

- **Bluthämoglobin**

Die Hämoglobinkonzentration im Blut (**Abbildung 17**) stieg von vergleichbaren Anfangswerten (14,6 ± 0,3 g/dl ohne VHL-KO vs 14,7 ± 0,4g/dl *mit* VHL-KO) lediglich in der VHL-KO-Gruppe signifikant an (18,1 ± 0,4g/dl vs 14,7 ± 0,4g/dl ohne VHL-KO).

- **Natriumkonzentration im Urin und Plasma**

U<sub>Na+</sub> (**Abbildung 18**) war zu Versuchsbeginn in beiden Gruppen vergleichbar (118,8 ± 1,6 mmol/l ohne VHL-KO vs 119 ± 2,7 mmol/l *mit* VHL-KO). Im Verlauf kam es in beiden Gruppen zu einer vergleichbaren und signifikanten Reduktion (16,7 ± 1,9 mmol/l ohne VHL-KO bzw. 15,6 ± 1,9 mmol/l *mit* VHL-KO). P<sub>Na+</sub> blieb in beiden Gruppen konstant im Vergleich zum Ausgangswert (von 148,6 ± 3,4 mmol/l auf 147,1 ± 4,4 mmol/l ohne VHL-KO bzw. von 149,3 ± 4,7 mmol/l auf 147,9 ± 5,2 mmol/l *mit* VHL-KO).

- **Kreatininkonzentration im Plasma**

P<sub>Krea</sub> (**Abbildung 19**) stieg von vergleichbaren Ausgangswerten (0,21 ± 0,01mg/dl ohne VHL-KO vs 0,22 ± 0,01mg/dl *mit* VHL-KO) in beiden Versuchsgruppen an, wobei dieser Effekt in der Gruppe mit VHL-KO signifikant ausgeprägter war (0,61 ± 0,05mg/dl vs 0,30 ± 0,05mg/dl ohne VHL-KO).

- **Harnstoffkonzentration im Plasma**

$P_{\text{Hst}}$  (**Abbildung 20**) stieg von vergleichbaren Ausgangswerten ( $43,17 \pm 2,02\text{mg/dl}$  ohne VHL-KO vs  $45,1 \pm 1,58\text{mg/dl}$  mit VHL-KO) in beiden Versuchsgruppen an, wobei dieser Effekt in der Gruppe mit VHL-KO signifikant ausgeprägter war ( $104,73 \pm 10,02\text{mg/dl}$  vs  $70,3 \pm 2,6\text{mg/dl}$  ohne VHL-KO).

- **Kreatinin-Clearance**

$C_{\text{Krea}}$  (**Abbildung 21**) fiel von vergleichbaren Anfangswerten ( $1,19 \pm 0,05 \mu\text{l/min}$  ohne VHL-KO vs  $1,19 \pm 0,04 \mu\text{l/min}$  mit VHL-KO) in beiden Versuchsgruppen im Verlauf signifikant ab. Am Ende des Versuches waren die Werte mit VHL-KO signifikant niedriger ( $0,60 \pm 0,04 \mu\text{l/min}$  vs  $0,79 \pm 0,03 \mu\text{l/min}$  ohne VHL-KO).

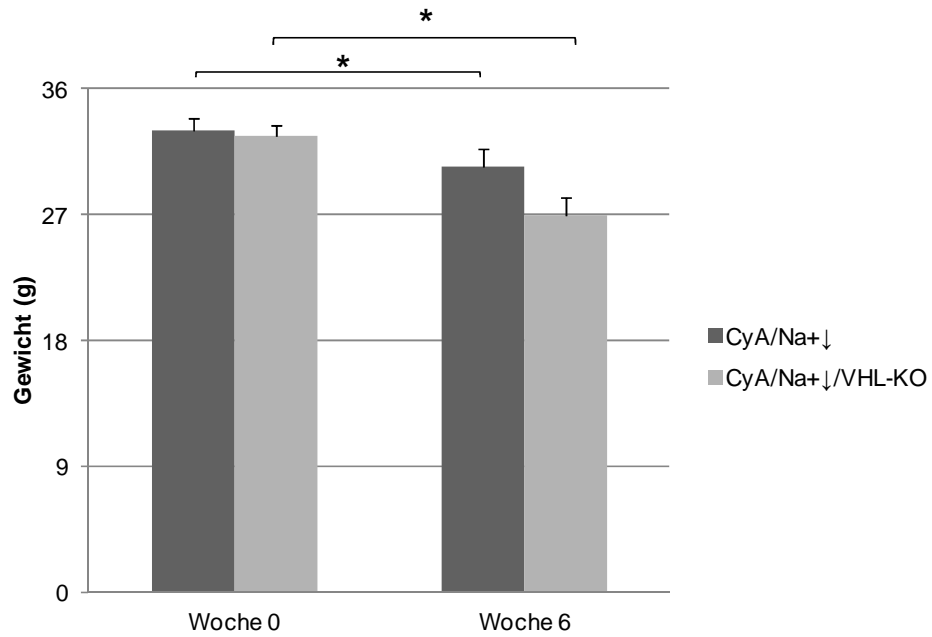
- **Albuminurie**

$U_{\text{Alb}}$  (**Abbildung 22**) nahm von vergleichbaren Anfangswerten ( $0,26 \pm 0,03\text{mg/24h}$  ohne VHL-KO vs  $0,29 \pm 0,06\text{mg/24h}$  mit VHL-KO) in beiden Versuchsgruppen signifikant ab. Dieser Effekt war in der Gruppe ohne VHL-KO tendenziell weniger ausgeprägt, wenn auch nicht statistisch signifikant ( $0,17 \pm 0,06\text{mg/24h}$  vs  $0,10 \pm 0,02\text{mg/24h}$  ohne VHL-KO).

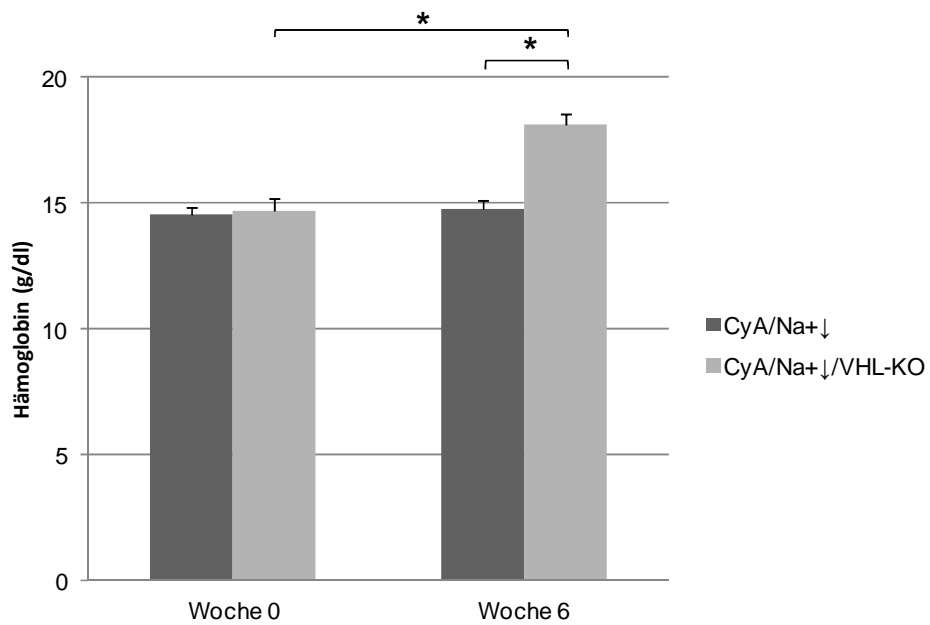
- **Tubulo-interstitielle Fibrose**

Im Vergleich zu  $\text{Na}^+\downarrow/\text{CyA}$  führte VHL-KO/ $\text{Na}^+\downarrow/\text{CyA}$  (**Abbildung 23**) zu einer signifikanten Zunahme des tubulo-interstitiellen Fibrose-Scores in Cortex ( $63,2\% \pm 1,1\%$  vs  $43,37\% \pm 0,7\%$ ), Außenstreifen ( $63,2\% \pm 1,6\%$  vs  $41,9\% \pm 1\%$ ) und Innenstreifen ( $63 \pm 1,4\%$  vs  $47\% \pm 1,0\%$ ).

**Abbildung 16:**  
**Na<sup>+</sup>↓/CyA führt zu einem Abfall des Körpergewichts (\* = p<0,05)**

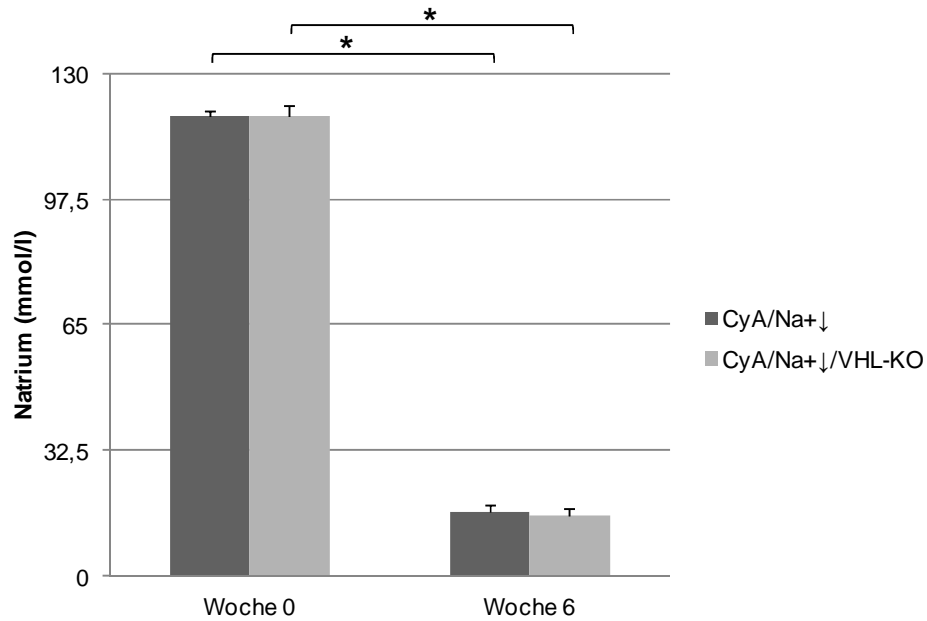


**Abbildung 17:**  
**Die Induktion des VHL-KO führt zu einem Anstieg des Hämoglobinkonzentration (\* = p<0,05)**



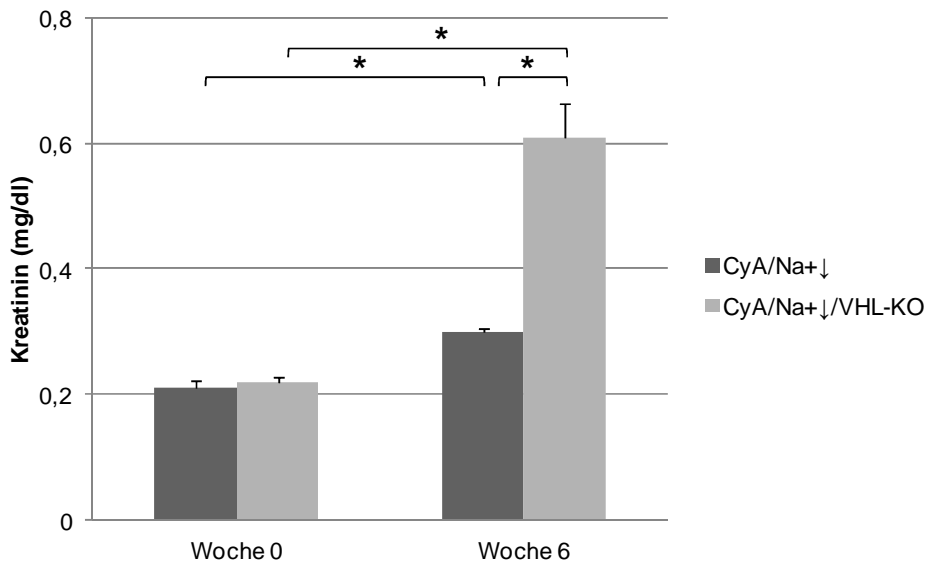
**Abbildung 18:**

**Na<sup>+</sup>↓/CyA führt zu einem Abfall der Urinnatriumkonzentration (\* = p<0,05)**



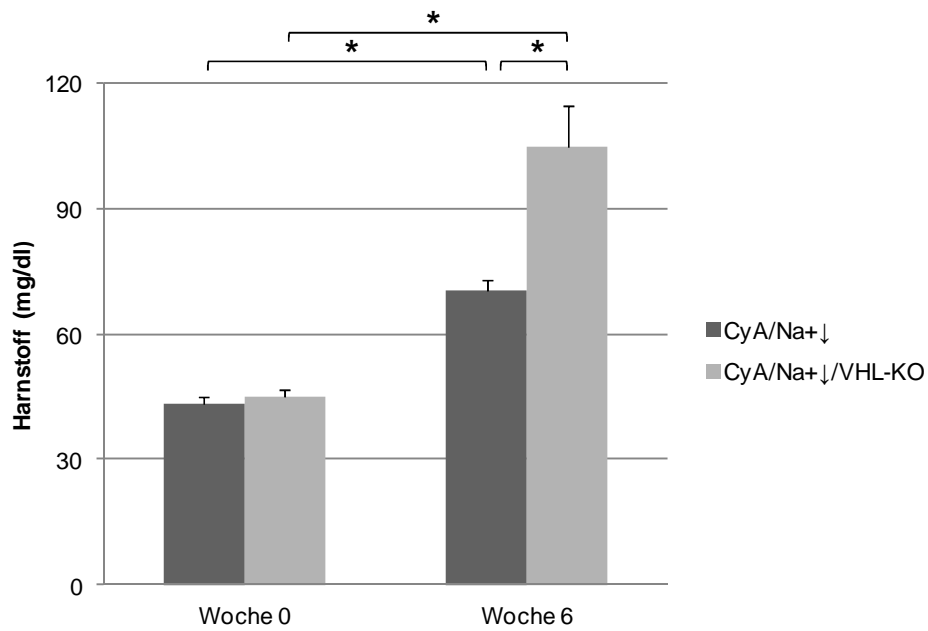
**Abbildung 19:**

**Die Induktion des VHL-KO verstärkt den durch Na<sup>+</sup>↓/CyA ausgelösten Anstieg des Plasmakreatinins (\* = p<0,05)**



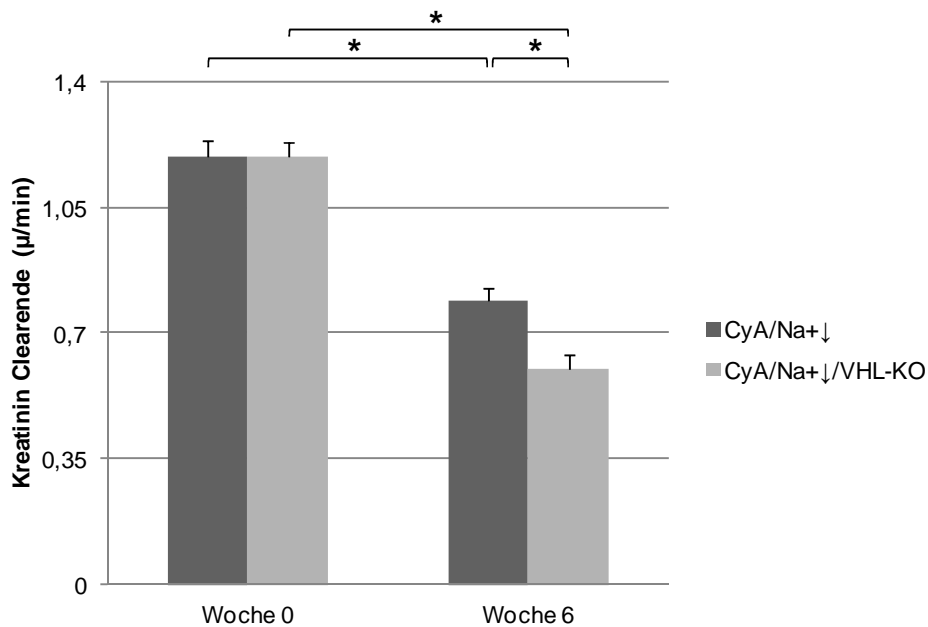
**Abbildung 20:**

Die Induktion des VHL-KO verstärkt den durch  $\text{Na}^+\downarrow/\text{CyA}$  ausgelösten Anstieg des Plasmaharnstoffes (\* =  $p < 0,05$ )



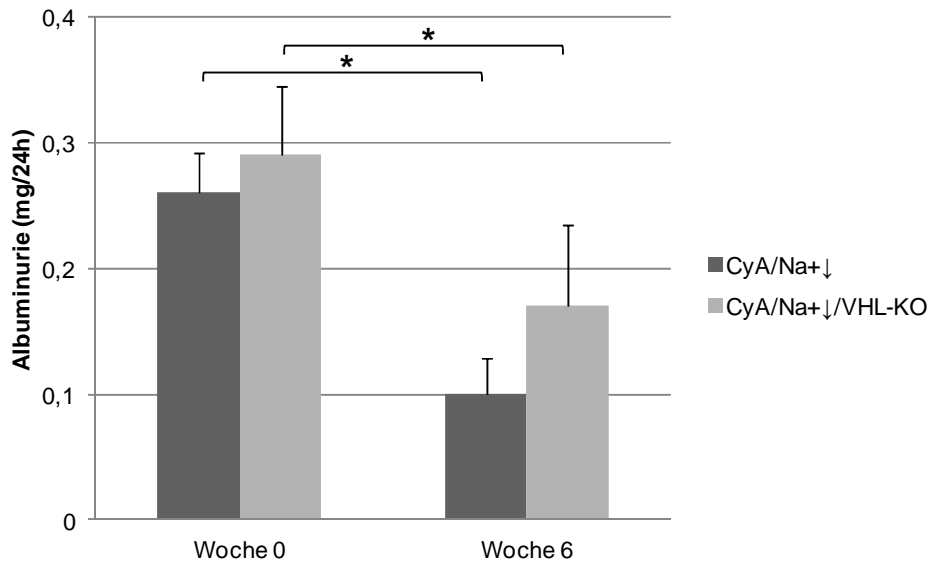
**Abbildung 21:**

Die Induktion des VHL-KO verstärkt den durch  $\text{Na}^+\downarrow/\text{CyA}$  ausgelösten Abfall der Kreatinin-clearance (\* =  $p < 0,05$ )



**Abbildung 22:**

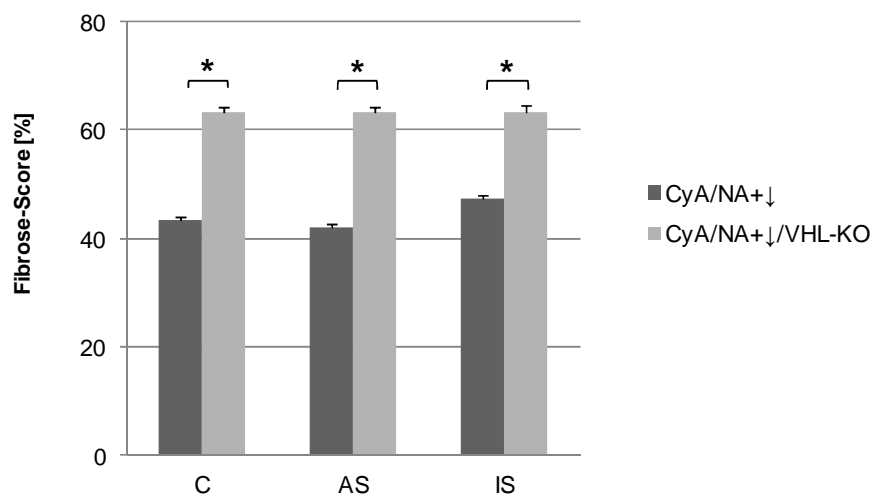
**Na<sup>+</sup>↓/CyA führt zu einem Abfall der Albuminausscheidung im 24h-Sammelurin. Ein zusätzlicher VHL-KO hat darauf keinen signifikanten Einfluss. (\* = p<0,05)**



**Abbildung 23:**

**VHL-KO führt zu einer Zunahme der durch Na<sup>+</sup>↓/CyA ausgelösten tubulo-interstitiellen Fibrose**

(C= Cortex, AS= Außenstreifen und IS= Innenstreifen); Ergebnisse nach sechs Wochen (Versuchsprotokoll in Abbildung 10); Fibrose-Score [%]= 100 x tubulo-interstitielle Fläche / (tubulo-interstitielle Fläche + tubuläre Fläche); In unbehandelten Kontrollen lag der Fibrose-Score in allen drei Zonen bei etwa 20% (vergleiche Tabelle 8); Im Vergleich zu Na<sup>+</sup>↓/CyA führt Na<sup>+</sup>↓/CyA/VHL-KO zu einer signifikanten Zunahme des Fibrose-Scores in allen drei Zonen. (\* = p<0,05)



## Diskussion

Die drei Hauptergebnisse dieser Arbeit sind: 1.) In der Maus führt  $\text{Na}^+\downarrow/\text{CyA}$  zu einer Niereninsuffizienz mit tubulo-interstitieller Fibrose; 2.) In einer frühen Phase der Krankheitsentstehung kommt es in Teilen des Nephrons zu einer Hypoxie sowie zu einer Aktivierung von HIF; 3.) Ein tubulus-spezifischer Knockout von VHL mit konsekutiver HIF-Aktivierung verstärkt die durch  $\text{Na}^+\downarrow/\text{CyA}$  ausgelöste tubulo-interstitielle Nierenfibrose.

In der Maus ist das Modell der chronischen CyA-Toxizität bisher nicht etabliert. In Anlehnung an Ergebnisse aus Rattenversuchen haben wir uns für eine Kombination aus  $\text{Na}^+\downarrow$  und CyA entschieden [78].  $\text{Na}^+\downarrow$  ist eine häufig gewählte Bedingung zur Verstärkung von renaler CyA-Toxizität im Nager. Gelegentlich gelang es in der Ratte, eine chronische Nierenfibrose durch CyA alleine, allerdings in relativ hoher Dosis, zu erzeugen [79].  $\text{Na}^+\downarrow$  verursacht eine RAAS-Aktivierung, wie sie bei Patienten mit CyA-Toxizität auf Basis der Grund- und Begleiterkrankungen angenommen werden kann. In der vorliegenden Versuchsreihe war eine histologisch erkennbare chronische tubulo-interstitielle Nierenfibrose erst durch eine Kombination von  $\text{Na}^+\downarrow$  mit deutlich höheren CyA-Dosen zu erreichen, als sie in der Literatur für die Ratte verzeichnet sind (**Abbildung 7**). Unter diesem Regime verloren die Tiere über die Versuchsdauer von sechs Wochen ca. 10% des Körpergewichtes, weshalb wir sowohl von einer Verlängerung der Versuchsdauer als auch von einer CyA-Dosiserhöhung absahen.

Die Arbeit belegt mit Hilfe von PIM-Immunhistochemie, dass  $\text{Na}^+\downarrow/\text{CyA}$  in Teilen des Nephrons zu einer erheblichen Hypoxie führt, und zwar zu einem frühen Zeitpunkt, an dem noch keine wesentliche tubulo-interstitielle Fibrose erkennbar ist. Zhong et al. hatten unter ähnlichen Bedingungen – nach einer Woche Nidrigsalzdiät und oraler CyA-Gabe in Schlündeltechnik - eine vermehrte Anreicherung von PIM in der Niere von Ratten gezeigt [15]. Die vorliegende Arbeit bestätigt zwar die Akkumulation von PIM unter  $\text{Na}^+\downarrow/\text{CyA}$ , allerdings in einem etwas anderen Verteilungsmuster als bei Zhong et al.. Letztere zeigen ein eher diffuses PIM-Signal mit Maximum im Außenstreifen des äußeren Markes, welches bereits in Kontrollen nachweisbar ist, unter  $\text{Na}^+\downarrow/\text{CyA}$  intensiver wird und sich in Richtung Cortex ausdehnt. Demgegenüber finden wir in Kontrollen, mit Ausnahme der tiefen Papilla, kein PIM-Signal, und unter  $\text{Na}^+\downarrow/\text{CyA}$  werden scharf abgegrenzte Signale in einzelnen, radspeichenartig verlaufenden Tubuli nachweisbar. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz ist die unterschiedliche Fixiertechnik: Perfusionsfixierung in der vorliegenden Arbeit bzw. Immersionsfixierung bei

Zhang et al.. Unter letzterer kann es zu diffuser und artifizieller PIM-Anreicherung kommen [70], was erklärt, warum bei Zhang et al. der Außenstreifen von Kontrollen positiv erscheint, und sich die Signale bei den  $\text{Na}^+\downarrow/\text{CyA}$ -Tieren nur relativ unscharf davon abgrenzen lassen. Unsere Daten legen, im Unterschied zu Zhang et al., den Schluß nahe, daß renale CyA-Toxizität zu einer ausgeprägten Hypoxie in einigen wenigen, parallel zur cortico-medullären Achse angeordneten Tubuli führt. Diese Verteilung erinnert an die für CyA-Toxizität typische, wenn auch nicht spezifische Streifenfibrose, und liefert ein weiteres Argument für die Hypothese, dass lokale Tubulus-Hypoxie eine treibende Kraft bei der Nephrotoxizität von CyA ist.

Der Nachweis von HIF-1 $\alpha$  in  $\text{Na}^+\downarrow/\text{CyA}$  ist neu. Die Signale erscheinen größtenteils in Tubuli und sind parallel zur cortico-medullären Achse angeordnet. Dieses Verteilungsmuster entspricht in etwa dem von PIM, was dafür spricht, dass es sich um eine hypoxische HIF-Aktivierung handelt. Die Lokalisation von PIM und HIF scheint die Hypothese zu unterstützen, dass Hypoxie in  $\text{Na}^+\downarrow/\text{CyA}$  über HIF zu einer tubulo-interstitiellen Fibrose führt.

Um diese Hypothese zu überprüfen wurde unter  $\text{Na}^+\downarrow/\text{CyA}$  mithilfe eines transgenen Mausmodells VHL spezifisch im gesamten Tubulussystem ausgeknockt. Die daraus folgende HIF-Hochregulation ist dauerhaft und erstreckt sich über sämtliche Nephronabschnitte. Tatsächlich war in Tieren mit VHL-KO der CyA-bedingte Nierenschaden – gemessen an  $P_{\text{Krea}}$ ,  $C_{\text{Krea}}$   $P_{\text{Hst}}$  und tubulo-interstitiellem Fibrose-Score - signifikant stärker als in Tieren ohne Induktion des VHL-KO. HIF-Aktivierung ist der bisher am besten untersuchte Effekt eines VHL-KO, was den Schluss nahelegt, dass HIF die CyA-bedingte tubulo-interstitielle Nierenfibrose fördert.

Die Literaturbelege für einen günstigen bzw. ungünstigen Effekt von HIF auf die tubulo-interstitielle Nierenfibrose halten sich in etwa die Waage (**Tabelle 2**). Dabei scheint sich eine globale HIF-Aktivierung generell positiv und eine tubulus-spezifische HIF-Aktivierung generell negativ auszuwirken.



**Tabelle 9:**

**Experimentelle Arbeiten, die den Einfluss einer HIF-Aktivierung oder –Blockade auf die chronische tubulo-interstitielle Nierenfibrose untersuchen**

Literaturstelle	Spezies	Fibrosemodell	Mechanismus der HIF-Aktivierung / Inaktivierung	Beobachtungszeitraum	Zielparameter	Effekt
Song et al. 2009	Ratte	subtotale Nephrektomie	DMOG, HIF Prolyl-Hydroxylase Inhibitor	28 Tage	Serum-Krea Proteinurie Krea-Clearance Histologie	Fibrose ↓ Oxidativer Stress ↓ Tubulointerstitieller Schaden ↓
Kimura et al. 2008	Maus	subtotale Nephrektomie	VHL-Knockout	20 Wochen	Serum-Krea Albuminurie CTGF mRNA PAI-1 mRNA Histologie	Fibrose ↑
Higgins et al. 2007	Maus	UUO (unilaterale Ureterobstruktion)	HIF-Inaktivierung mittels Tetrazyklin-abhängigen HIF1α-Knockout	8 Tage	Histologie PAI-1 mRNA	Fibrose ↓ tubulo-interstitielle Schaden ↑
Tanaka et al. 2005	Ratte	subtotale Nephrektomie	CoCl <sub>2</sub>	5-9 Wochen	Serum-Krea Proteinurie Histologie VEGF mRNA, EPO mRNA	Angiogenese ↑ tubulo-interstitieller Schaden ↓
Kobayashi et al. 2012	Maus	UUO (unilaterale Ureterobstruktion)	VHL-Knockout	8 Tage	Histologie Kollagen1α RNA VEGF A mRNA	Tubulo-interstitielle Fibrose ↑ Inflammation ↑

- In Ratten mit subtotaler Nephrektomie führte eine globale HIF-Aktivierung durch Dimethyloxallylglyzin [80] bzw. Cobalt Chlorid [81] zu einer Nephroprotektion - gemessen an Serumkreatinin, Proteinurie und tubulo-interstitieller Fibrose.
- Higgins et al. [82] untersuchten die tubulo-interstitielle Fibrose im Modell der einseitigen Ureterligatur an Mäusen mit und ohne Knockout von HIF-1 $\alpha$ , der auf proximale Tubuli beschränkt war. Der Knockout war konstitutionell und beruhte auf dem Phosphoenol-Pyruvat-Carboxykinase (PEPCK)-Promoter. Unter HIF-1 $\alpha$ -Knockout war die interstitielle Ablagerung von Siriusrot-positiver Matrix, die Infiltration von Makrophagen und die immunhistochemische Färbung für fibroblast-specific protein-1 (FSP-1) vermindert, woraus die Autoren schlossen, daß HIF die tubulo-interstitielle Fibrose fördert.
- Kimura et al. [83] knockten VHL über den oben genannten PEPCK-Promoter konstitutionell und spezifisch in proximalen Tubuli aus, und unterzogen die Mäuse einer subtotalen Nephrektomie. Zwanzig Wochen nach der Maßnahme fanden sie im Vergleich zu Wildtypmäusen vermehrt interstitielle Matrix in der Masson-Trichrom-Färbungen, vermehrte Inflammation, eine erhöhte Albuminurie, sowie vermehrt fibrose-fördernde Transkripte. Der Effekt dieses tubulus-spezifischen VHL-Knockouts konnte durch den HIF-Hemmer 3-(5-Hydroxymethyl-2-Furyl)-1-Benzyl-Indazol (YC-1) [84] teilweise aufgehoben werden. Die Daten sprechen für eine Fibrose-fördernde Wirkung von HIF. Einschränkend ist allerdings zu erwähnen, daß YC-1 kein spezifischer HIF-Inhibitor ist, sondern ebenso auch ein Aktivator der löslichen Guanylatzyklase, die über eine Absenkung der intrazellulären Calcium-Konzentration Vasodilatation vermittelt [85].
- Kobayashi et al. [86] fanden im Schädigungsmodell der einseitigen Ureterligatur eine verminderte Ablagerung von interstitieller Matrix und eine geringere Infiltration von Makrophagen, wenn VHL über den Ubiquitin-C-Promoter und Tamoxifen-abhängig in allen Körperzellen ausgeknockt wurde. Ein globales Ausknocken von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  über den Ubiquitin-C-Promoter führte zu einer erhöhten Inflammation nach einseitiger Ureterligatur. Die Autoren folgern, dass eine tubulus-spezifische Aktivierung von HIF die tubulo-interstitielle Fibrose fördert, während sich eine globale HIF-Aktivierung günstig auswirkt. Träger der HIF-abhängigen Nierenprotektion könnten myeloide Zellen sein. Tatsächlich konnte die Inflammation nach einseitiger Ureterligatur vermindert werden, wenn VHL unter dem Lysozym-M-Promoter isoliert

in myeloiden Zellen ausgeknockt wurde, und ein Ausknocken von sowohl HIF-1 $\alpha$  als auch HIF-2 $\alpha$  in myeloiden Zellen hatte den gegenteiligen Effekt [86].

Bei der Interpretation der vorliegenden Arbeit ist zu erwähnen, dass HIF-unabhängige Effekte des VHL-KO beschrieben sind, wenn auch bislang noch nicht so ausführlich erforscht wie die HIF-abhängigen. So kann, zumindest theoretisch, VHL-KO eine Fibrose über eine Anreicherung von sprouty(spry)-2 hemmen bzw. über NF- $\kappa$ B fördern [87]. Spry-2 wird, wie HIF- $\alpha$ , O<sub>2</sub>-abhängig hydroxyliert, anschließend durch VHL mit Ubiquitin beladen, und letztlich vom 26S-Proteasom abgebaut. Unter Hypoxie oder nach VHL-KO reichert sich spry-2 an [87]. Spry-2 hemmt den fibroblast growth factor (FGF) und somit die Proliferation von Fibroblasten [88].

Eine mögliche Störgröße der aktuellen Versuchsreihe ist in dem erhöhten Bluthämoglobinwert der VHL-KO-Tiere zu sehen. Dieser entsteht bei diesem Mausstamm durch Produktion von Erythropoietin in einer Subpopulation von Hepatozyten, in denen der Pax8-Promoter aktiv ist [89]. Die ursprünglich geplante Normalisierung des Bluthämoglobinwertes durch wiederholte Blutentnahmen und Gabe von Kristalloiden – im Sinne einer isovolämischen Hämodilution – scheiterte am reduzierten Allgemeinzustand der Versuchstiere. Der deutlich erhöhte Bluthämoglobinwert der Na<sup>+</sup>↓/CyA/VHL-KO-Tiere kann theoretisch über eine verschlechterte Rheologie zu einer verstärkten Tubulushypoxie und tubulo-interstitiellen Fibrose im Vergleich zu den Na<sup>+</sup>↓/CyA-Tieren geführt haben.

Erwähnenswert ist, dass in der vorliegenden Arbeit zur Erzielung vergleichbarer CyA-Talspiegel in Mäusen mit Induktion des VHL-KO lediglich ein Drittel der Dosis für Tiere ohne Induktion des VHL-KO notwendig war. Die Gründe dafür sind unklar. Am ehesten handelt es sich um einen verminderten hepatischen Abbau von CyA, da bei subkutaner Gabe die Resorption wahrscheinlich für beide Versuchsgruppen identisch war. Eine CyA-Kinetik im Blut hätte wichtige Informationen liefern können, war jedoch wegen des damit verbundenen, relativ hohen Blutverlustes nicht zu realisieren. Somit ist nicht auszuschließen, dass trotz vergleichbarer CyA-Talspiegel die CyA-Belastung höher war im Na<sup>+</sup>↓/CyA/VHL-KO-Arm als im Na<sup>+</sup>↓/CyA-Arm.

Im Gegensatz zu den meisten Modellen für tubulo-interstitielle Fibrose scheint im Falle der CyA-Toxizität die Albuminurie umgekehrt proportional zu dem histologischen Schaden zu verlaufen. In der vorliegenden Arbeit sinkt die Albuminurie unter chronischer CyA-Gabe im Vergleich zum Ausgangswert, ein Phänomen, das bereits andere

Gruppen beschrieben haben [90], jedoch bislang nicht eindeutig geklärt ist. Möglicherweise ist die CyA-bedingte Vasokonstriktion [12] und/oder ein Effekt von CyA auf das Zytoskelett von Podozyten [91] dafür verantwortlich.

Ein erhöhter ATP-Verbrauch für die tubuläre Na<sup>+</sup>-Rückresorption kann zu Tubulushypoxie führen [92]. Theoretisch kann HIF unter bestimmten Umständen in Nierentubuli die Na<sup>+</sup>-Rückgewinnung und den O<sub>2</sub>-Verbrauch drosseln. HIF-1 $\alpha$  reduziert die tubuläre Na<sup>+</sup>-Rückresorption in der Nierenmedulla. Wang et al. [93] zeigten, dass bei normalen Ratten unter Hochsalzdiät (4% Na<sup>+</sup>) PHD<sub>2</sub> herunter reguliert wird, was zur HIF-Aktivierung und verminderten Na<sup>+</sup>-Rückresorption führt. In Dahl Ratten mit salzabhängiger arterieller Hypertonie war dieser Effekt deutlich geringer und konnte durch Transfektion mit PHD<sub>2</sub> small hairpin RNA wiederhergestellt werden. In der vorliegenden Arbeit war mit und ohne VHL-KO alias HIF-Aktivierung die U<sub>Na</sub> vergleichbar, sodass ein wesentlicher Effekt von HIF auf die tubuläre Na<sup>+</sup>-Rückresorption unwahrscheinlich ist.

Die molekularen Mechanismen chronischer CyA-Toxizität erscheinen komplex, und schließen vermutlich auch HIF-unabhängige Faktoren ein. Nach chronischer CyA-Gabe ist die mRNA von transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) vermehrt in proximalen Tubuli nachweisbar [94]. Das Zytokin TGF- $\beta$  besitzt profibrotische Eigenschaften und gilt als Stimulator der Matrixexpansion und als Inhibitor des Matrixabbaus. Die Induktion verschiedener Bestandteile extrazellulärer Matrix (Kollagen, Laminin und Proteoglykane) wird durch TGF- $\beta$  vermittelt. TGF- $\beta$  reguliert, wie im übrigen auch HIF, die profibrotischen Zielgene CTGF und TIMP [95]. TGF- $\beta$  scheint neben HIF eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Progression von CyA-induzierter Nierenfibrose zu spielen [13]. In einem experimentellen Rattenmodell konnte unter Verwendung von TGF- $\beta$  neutralisierenden Antikörpern histologisch eine Reduktion der Nierenfibrose und eine Abschwächung der Funktionsverschlechterung gezeigt werden [96].

Ein anderes Zytokin, welches bei der chronischen CyA-Toxizität eine Rolle spielt, ist Osteopontin (OPN) [13]. OPN ist beteiligt an Zelladhäsion und Migration sowie Makrophagenakkumulation. Pilcher et al. zeigten anhand eines Rattenmodells, dass es unter chronischer CyA-Behandlung in der Niere zu einer vermehrten Expression von OPN-mRNA kommt und dass das Ausmaß der OPN-Expression mit dem Schweregrad interstitieller Fibrose korreliert [97]. Ein OPN-Knockout führte zu einer Milderung CyA-induzierter Nephrotoxizität [98].

Zusammenfassend legt die vorliegende Arbeit den Schluss nahe, dass chronische CyA-Toxizität eine lokale Hypoxie in der Niere erzeugt, und über eine Aktivierung von HIF im Nephron zu einer tubulo-interstitiellen Fibrose führt.

## Literaturverzeichnis

1. Fine, L.G., D. Bandyopadhyay, and J.T. Norman, *Is there a common mechanism for the progression of different types of renal diseases other than proteinuria? Towards the unifying theme of chronic hypoxia.* *Kidney Int Suppl*, 2000. **75**: p. S22-6.
2. Tanaka, T., H. Kato, I. Kojima, T. Ohse, D. Son, T. Tawakami, T. Yatagawa, R. Inagi, T. Fujita, and M. Nangaku, *Hypoxia and expression of hypoxia-inducible factor in the aging kidney.* *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2006. **61**(8): p. 795-805.
3. Kahan, B.D., *Cyclosporine.* *N Engl J Med*, 1989. **321**(25): p. 1725-38.
4. Borel, J.F., C. Feurer, H.U. Gubler, and H. Stahelin, *Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent.* 1976. *Agents Actions*, 1994. **43**(3-4): p. 179-86.
5. Hariharan, S., C.P. Johnson, B.A. Bresnahan, S.E. Taranto, M.J. McIntosh, and D. Stablein, *Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996.* *N Engl J Med*, 2000. **342**(9): p. 605-12.
6. Parekh, K., E. Trulock, and G.A. Patterson, *Use of cyclosporine in lung transplantation.* *Transplant Proc*, 2004. **36**(2 Suppl): p. 318S-322S.
7. Dougados, M. and H. Torley, *Efficacy of cyclosporin A in rheumatoid arthritis: worldwide experience.* *Br J Rheumatol*, 1993. **32 Suppl 1**: p. 57-9.
8. Ryffel, B., B.M. Foxwell, M.J. Mihatsch, P. Donatsch, and G. Maurer, *Biologic significance of cyclosporine metabolites.* *Transplant Proc*, 1988. **20**(2 Suppl 2): p. 575-84.
9. Erlanger, B.F., *Do we know the site of action of cyclosporin?* *Immunol Today*, 1992. **13**(12): p. 487-90.
10. Liu, J., J.D. Farmer, Jr., W.S. Lane, J. Friedman, I. Weissman, and S.L. Schreiber, *Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes.* *Cell*, 1991. **66**(4): p. 807-15.
11. Shaw, K.T., A.M. Ho, A. Raghavan, J. Kim, J. Jain, J. Park, S. Sharma, A. Rao, and P.G. Hogan, *Immunosuppressive drugs prevent a rapid dephosphorylation of transcription factor NFAT1 in stimulated immune cells.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(24): p. 11205-9.
12. Bobadilla, N.A. and G. Gamba, *New insights into the pathophysiology of cyclosporine nephrotoxicity: a role of aldosterone.* *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007. **293**(1): p. F2-9.
13. Yoon, H.E. and C.W. Yang, *Established and newly proposed mechanisms of chronic cyclosporine nephropathy.* *Korean J Intern Med*, 2009. **24**(2): p. 81-92.
14. Liptak, P. and B. Ivanyi, *Primer: Histopathology of calcineurin-inhibitor toxicity in renal allografts.* *Nat Clin Pract Nephrol*, 2006. **2**(7): p. 398-404; quiz following 404.
15. Zhong, Z., G.E. Arteel, H.D. Connor, M. Yin, M.V. Frankenberg, R.F. Stachlewitz, J.A. Raleigh, R.P. Mason, and R.G. Thurman, *Cyclosporin A increases hypoxia and free radical production in rat kidneys: prevention by dietary glycine.* *Am J Physiol*, 1998. **275**(4 Pt 2): p. F595-604.
16. Rosenberger, C., S. Rosen, and S.N. Heyman, *Renal parenchymal oxygenation and hypoxia adaptation in acute kidney injury.* *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2006. **33**(10): p. 980-8.

17. Kriz, W., B. Kaissling, and M. Le Hir, *Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in kidney fibrosis: fact or fantasy?* J Clin Invest, 2011. **121**(2): p. 468-74.
18. Leichtweiss, H.P., D.W. Lubbers, C. Weiss, H. Baumgartl, and W. Reschke, *The oxygen supply of the rat kidney: measurements of intrarenal pO<sub>2</sub>*. Pflugers Arch, 1969. **309**(4): p. 328-49.
19. Lassila, M., *Interaction of cyclosporine A and the renin-angiotensin system; new perspectives*. Curr Drug Metab, 2002. **3**(1): p. 61-71.
20. Elzinga, L.W., S. Rosen, E.A. Burdmann, D.C. Hatton, J. Lindsley, and W.M. Bennett, *The role of renal sympathetic nerves in experimental chronic cyclosporine nephropathy*. Transplantation, 2000. **69**(10): p. 2149-53.
21. Ramirez, C., A. Olmo, F. O'Valle, M. Masseroli, M. Aguilar, M. Gomez-Morales, F. Revelles, M.J. Garcia-Chicano, F. Arrebola, M.E. Reguero, and R.G. del Moral, *Role of intrarenal endothelin 1, endothelin 3, and angiotensin II expression in chronic cyclosporin A nephrotoxicity in rats*. Exp Nephrol, 2000. **8**(3): p. 161-72.
22. Parra, T., G. de Arriba, I. Arribas, G. Perez de Lema, D. Rodriguez-Puyol, and M. Rodriguez-Puyol, *Cyclosporine A nephrotoxicity: role of thromboxane and reactive oxygen species*. J Lab Clin Med, 1998. **131**(1): p. 63-70.
23. Ruster, C. and G. Wolf, *Renin-angiotensin-aldosterone system and progression of renal disease*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(11): p. 2985-91.
24. Nangaku, M., *Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: a final common pathway to end-stage renal failure*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(1): p. 17-25.
25. Striker, G.E., L.I. Schainuck, R.E. Cutler, and E.P. Benditt, *Structural-functional correlations in renal disease. I. A method for assaying and classifying histopathologic changes in renal disease*. Hum Pathol, 1970. **1**(4): p. 615-30.
26. Schainuck, L.I., G.E. Striker, R.E. Cutler, and E.P. Benditt, *Structural-functional correlations in renal disease. II. The correlations*. Hum Pathol, 1970. **1**(4): p. 631-41.
27. Bohle, A., H. von Gise, S. Mackensen-Haen, and B. Stark-Jakob, *The obliteration of the postglomerular capillaries and its influence upon the function of both glomeruli and tubuli. Functional interpretation of morphologic findings*. Klin Wochenschr, 1981. **59**(18): p. 1043-51.
28. Choi, Y.J., S. Chakraborty, V. Nguyen, C. Nguyen, B.K. Kim, S.I. Shim, W.N. Suki, and L.D. Truong, *Peritubular capillary loss is associated with chronic tubulointerstitial injury in human kidney: altered expression of vascular endothelial growth factor*. Hum Pathol, 2000. **31**(12): p. 1491-7.
29. Yuan, H.T., X.Z. Li, J.E. Pitera, D.A. Long, and A.S. Woolf, *Peritubular capillary loss after mouse acute nephrotoxicity correlates with down-regulation of vascular endothelial growth factor-A and hypoxia-inducible factor-1 alpha*. Am J Pathol, 2003. **163**(6): p. 2289-301.
30. Tanaka, T., N. Hanafusa, J.R. Ingelfinger, T. Ohse, T. Fujita, and M. Nangaku, *Hypoxia induces apoptosis in SV40-immortalized rat proximal tubular cells through the mitochondrial pathways, devoid of HIF1-mediated upregulation of Bax*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **309**(1): p. 222-31.
31. Manotham, K., T. Tanaka, M. Matsumoto, T. Ohse, R. Inagi, T. Miyata, K. Kurokawa, T. Fujita, J.R. Ingelfinger, and M. Nangaku, *Transdifferentiation of cultured tubular cells induced by hypoxia*. Kidney Int, 2004. **65**(3): p. 871-80.
32. Norman, J.T., I.M. Clark, and P.L. Garcia, *Hypoxia promotes fibrogenesis in human renal fibroblasts*. Kidney Int, 2000. **58**(6): p. 2351-66.

33. Kaissling, B. and M. Le Hir, *The renal cortical interstitium: morphological and functional aspects*. *Histochem Cell Biol*, 2008. **130**(2): p. 247-62.
34. Rosenberger, C., S. Rosen, and S.N. Heyman, *Current understanding of HIF in renal disease*. *Kidney Blood Press Res*, 2005. **28**(5-6): p. 325-40.
35. Semenza, G.L., *Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level*. *Physiology (Bethesda)*, 2004. **19**: p. 176-82.
36. Maxwell, P.H., *HIF-1's relationship to oxygen: simple yet sophisticated*. *Cell Cycle*, 2004. **3**(2): p. 156-9.
37. Gunaratnam, L. and J.V. Bonventre, *HIF in kidney disease and development*. *J Am Soc Nephrol*, 2009. **20**(9): p. 1877-87.
38. Yu, A.Y., M.G. Frid, L.A. Shimoda, C.M. Wiener, K. Stenmark, and G.L. Semenza, *Temporal, spatial, and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible factor-1 in the lung*. *Am J Physiol*, 1998. **275**(4 Pt 1): p. L818-26.
39. Semenza, G.L., *Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1*. *Physiology (Bethesda)*, 2009. **24**: p. 97-106.
40. Wiesener, M.S. and P.H. Maxwell, *HIF and oxygen sensing; as important to life as the air we breathe?* *Ann Med*, 2003. **35**(3): p. 183-90.
41. Rosenberger, C., S. Mandriota, J.S. Jurgensen, M.S. Wiesener, J.H. Horstrup, U. Frei, P.J. Ratcliffe, P.H. Maxwell, S. Bachmann, and K.U. Eckardt, *Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and -2alpha in hypoxic and ischemic rat kidneys*. *J Am Soc Nephrol*, 2002. **13**(7): p. 1721-32.
42. Metzen, E. and P.J. Ratcliffe, *HIF hydroxylation and cellular oxygen sensing*. *Biol Chem*, 2004. **385**(3-4): p. 223-30.
43. Jelkmann, W., *Control of erythropoietin gene expression and its use in medicine*. *Methods Enzymol*, 2007. **435**: p. 179-97.
44. Manalo, D.J., A. Rowan, T. Lavoie, L. Natarajan, B.D. Kelly, S.Q. Ye, J.G. Garcia, and G.L. Semenza, *Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1*. *Blood*, 2005. **105**(2): p. 659-69.
45. Lok, C.N. and P. Ponka, *Identification of a hypoxia response element in the transferrin receptor gene*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(34): p. 24147-52.
46. Mukhopadhyay, C.K., B. Mazumder, and P.L. Fox, *Role of hypoxia-inducible factor-1 in transcriptional activation of ceruloplasmin by iron deficiency*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(28): p. 21048-54.
47. Peyssonnaud, C., A.S. Zinkernagel, R.A. Schuepbach, E. Rankin, S. Vaulont, V.H. Haase, V. Nizet, and R.S. Johnson, *Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs)*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(7): p. 1926-32.
48. Rolfs, A., I. Kvietikova, M. Gassmann, and R.H. Wenger, *Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(32): p. 20055-62.
49. Bosch-Marce, M., H. Okuyama, J.B. Wesley, K. Sarkar, H. Kimura, Y.V. Liu, H. Zhang, M. Strazza, S. Rey, L. Savino, Y.F. Zhou, K.R. McDonald, Y. Na, S. Vandiver, A. Rabi, Y. Shaked, R. Kerbel, T. Lavalley, and G.L. Semenza, *Effects of aging and hypoxia-inducible factor-1 activity on angiogenic cell mobilization and recovery of perfusion after limb ischemia*. *Circ Res*, 2007. **101**(12): p. 1310-8.
50. Ceradini, D.J., A.R. Kulkarni, M.J. Callaghan, O.M. Tepper, N. Bastidas, M.E. Kleinman, J.M. Capla, R.D. Galiano, J.P. Levine, and G.C. Gurtner, *Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1*. *Nat Med*, 2004. **10**(8): p. 858-64.



51. Kelly, B.D., S.F. Hackett, K. Hirota, Y. Oshima, Z. Cai, S. Berg-Dixon, A. Rowan, Z. Yan, P.A. Campochiaro, and G.L. Semenza, *Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1*. *Circ Res*, 2003. **93**(11): p. 1074-81.
52. Okuyama, H., B. Krishnamachary, Y.F. Zhou, H. Nagasawa, M. Bosch-Marce, and G.L. Semenza, *Expression of vascular endothelial growth factor receptor 1 in bone marrow-derived mesenchymal cells is dependent on hypoxia-inducible factor 1*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(22): p. 15554-63.
53. Papandreou, I., R.A. Cairns, L. Fontana, A.L. Lim, and N.C. Denko, *HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption*. *Cell Metab*, 2006. **3**(3): p. 187-97.
54. Turrens, J.F., B.A. Freeman, J.G. Levitt, and J.D. Crapo, *The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles*. *Arch Biochem Biophys*, 1982. **217**(2): p. 401-10.
55. Kim, J.W., I. Tchernyshyov, G.L. Semenza, and C.V. Dang, *HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia*. *Cell Metab*, 2006. **3**(3): p. 177-85.
56. Semenza, G.L., B.H. Jiang, S.W. Leung, R. Passantino, J.P. Concordet, P. Maire, and A. Giallongo, *Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(51): p. 32529-37.
57. Zhang, H., M. Bosch-Marce, L.A. Shimoda, Y.S. Tan, J.H. Baek, J.B. Wesley, F.J. Gonzalez, and G.L. Semenza, *Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(16): p. 10892-903.
58. Vazquez, A., J. Liu, Y. Zhou, and Z.N. Oltvai, *Catabolic efficiency of aerobic glycolysis: the Warburg effect revisited*. *BMC Syst Biol*, 2010. **4**: p. 58.
59. Chen, C., N. Pore, A. Behrooz, F. Ismail-Beigi, and A. Maity, *Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(12): p. 9519-25.
60. Staller, P., J. Sulitkova, J. Lisztwan, H. Moch, E.J. Oakeley, and W. Krek, *Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL*. *Nature*, 2003. **425**(6955): p. 307-11.
61. Higgins, D.F., M.P. Biju, Y. Akai, A. Wutz, R.S. Johnson, and V.H. Haase, *Hypoxic induction of Ctgf is directly mediated by Hif-1*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004. **287**(6): p. F1223-32.
62. Semenza, G.L. and G.L. Wang, *A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation*. *Mol Cell Biol*, 1992. **12**(12): p. 5447-54.
63. Melillo, G., L.S. Taylor, A. Brooks, T. Musso, G.W. Cox, and L. Varesio, *Functional requirement of the hypoxia-responsive element in the activation of the inducible nitric oxide synthase promoter by the iron chelator desferrioxamine*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(18): p. 12236-43.
64. Krishnamachary, B., S. Berg-Dixon, B. Kelly, F. Agani, D. Feldser, G. Ferreira, N. Iyer, J. LaRusch, B. Pak, P. Taghavi, and G.L. Semenza, *Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1*. *Cancer Res*, 2003. **63**(5): p. 1138-43.
65. Bruick, R.K., *Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(16): p. 9082-7.

66. Sowter, H.M., P.J. Ratcliffe, P. Watson, A.H. Greenberg, and A.L. Harris, *HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors*. *Cancer Res*, 2001. **61**(18): p. 6669-73.
67. Kietzmann, T., U. Roth, and K. Jungermann, *Induction of the plasminogen activator inhibitor-1 gene expression by mild hypoxia via a hypoxia response element binding the hypoxia-inducible factor-1 in rat hepatocytes*. *Blood*, 1999. **94**(12): p. 4177-85.
68. Liu, Y., S.R. Cox, T. Morita, and S. Kourembanas, *Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer*. *Circ Res*, 1995. **77**(3): p. 638-43.
69. Tanaka, T., T. Miyata, R. Inagi, T. Fujita, and M. Nangaku, *Hypoxia in renal disease with proteinuria and/or glomerular hypertension*. *Am J Pathol*, 2004. **165**(6): p. 1979-92.
70. Rosenberger, C., S. Rosen, A. Paliege, and S.N. Heyman, *Pimonidazole adduct immunohistochemistry in the rat kidney: detection of tissue hypoxia*. *Methods Mol Biol*, 2009. **466**: p. 161-74.
71. Arteel, G.E., R.G. Thurman, J.M. Yates, and J.A. Raleigh, *Evidence that hypoxia markers detect oxygen gradients in liver: pimonidazole and retrograde perfusion of rat liver*. *Br J Cancer*, 1995. **72**(4): p. 889-95.
72. Franko, A.J. and J.D. Chapman, *Binding of <sup>14</sup>C-misonidazole to hypoxic cells in V79 spheroids*. *Br J Cancer*, 1982. **45**(5): p. 694-9.
73. Raleigh, J.A., A.J. Franko, C.J. Koch, and J.L. Born, *Binding of misonidazole to hypoxic cells in monolayer and spheroid culture: evidence that a side-chain label is bound as efficiently as a ring label*. *Br J Cancer*, 1985. **51**(2): p. 229-35.
74. Jankovic, B., C. Aquino-Parsons, J.A. Raleigh, E.J. Stanbridge, R.E. Durand, J.P. Banath, S.H. MacPhail, and P.L. Olive, *Comparison between pimonidazole binding, oxygen electrode measurements, and expression of endogenous hypoxia markers in cancer of the uterine cervix*. *Cytometry B Clin Cytom*, 2006. **70**(2): p. 45-55.
75. Gunther, H., G. Aumuller, S. Kunke, P. Vaupel, and G. Thews, *[The oxygen supply of the kidney. I. Distribution of O<sub>2</sub> partial pressures in the rat kidney under normal conditions (author's transl)]*. *Res Exp Med (Berl)*, 1974. **163**(3): p. 251-64.
76. Fahling, M., S. Mathia, A. Paliege, R. Koesters, R. Mrowka, H. Peters, P.B. Persson, H.H. Neumayer, S. Bachmann, and C. Rosenberger, *Tubular von Hippel-Lindau knockout protects against rhabdomyolysis-induced AKI*. *J Am Soc Nephrol*, 2013. **24**(11): p. 1806-19.
77. Dawson, T.P., R. Gandhi, M. Lehir, and B. Kaissling, *Ecto-5'-Nucleotidase - Localization in Rat-Kidney by Light Microscopic Histochemical and Immunohistochemical Methods*. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1989. **37**(1): p. 39-47.
78. Klawitter, J., V. Schmitz, N. Brunner, A. Crunk, K. Corby, J. Bendrick-Peart, D. Leibfritz, C.L. Edelstein, J.M. Thurman, and U. Christians, *Low-salt diet and cyclosporine nephrotoxicity: changes in kidney cell metabolism*. *J Proteome Res*, 2012. **11**(11): p. 5135-44.
79. Gillum, D.M. and L. Truong, *Effects of chronic volume expansion and enalapril on chronic cyclosporine nephropathy*. *Am J Physiol*, 1990. **258**(4 Pt 2): p. F934-9.
80. Song, Y.R., S.J. You, Y.M. Lee, H.J. Chin, D.W. Chae, Y.K. Oh, K.W. Joo, J.S. Han, and K.Y. Na, *Activation of hypoxia-inducible factor attenuates renal injury in rat remnant kidney*. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2010. **25**(1): p. 77-85.

81. Tanaka, T., I. Kojima, T. Ohse, J.R. Ingelfinger, S. Adler, T. Fujita, and M. Nangaku, *Cobalt promotes angiogenesis via hypoxia-inducible factor and protects tubulointerstitium in the remnant kidney model*. *Lab Invest*, 2005. **85**(10): p. 1292-307.
82. Higgins, D.F., K. Kimura, W.M. Bernhardt, N. Shrimanker, Y. Akai, B. Hohenstein, Y. Saito, R.S. Johnson, M. Kretzler, C.D. Cohen, K.U. Eckardt, M. Iwano, and V.H. Haase, *Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(12): p. 3810-20.
83. Kimura, K., M. Iwano, D.F. Higgins, Y. Yamaguchi, K. Nakatani, K. Harada, A. Kubo, Y. Akai, E.B. Rankin, E.G. Neilson, V.H. Haase, and Y. Saito, *Stable expression of HIF-1 $\alpha$  in tubular epithelial cells promotes interstitial fibrosis*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008. **295**(4): p. F1023-9.
84. Yeo, E.J., Y.S. Chun, Y.S. Cho, J. Kim, J.C. Lee, M.S. Kim, and J.W. Park, *YC-1: a potential anticancer drug targeting hypoxia-inducible factor 1*. *J Natl Cancer Inst*, 2003. **95**(7): p. 516-25.
85. Ko, F.N., C.C. Wu, S.C. Kuo, F.Y. Lee, and C.M. Teng, *YC-1, a novel activator of platelet guanylate cyclase*. *Blood*, 1994. **84**(12): p. 4226-33.
86. Kobayashi, H., V. Gilbert, Q. Liu, P.P. Kapitsinou, T.L. Unger, J. Rha, S. Rivella, D. Schlondorff, and V.H. Haase, *Myeloid cell-derived hypoxia-inducible factor attenuates inflammation in unilateral ureteral obstruction-induced kidney injury*. *J Immunol*, 2012. **188**(10): p. 5106-15.
87. Anderson, K., K.A. Nordquist, X. Gao, K.C. Hicks, B. Zhai, S.P. Gygi, and T.B. Patel, *Regulation of cellular levels of Sprouty2 protein by prolyl hydroxylase domain and von Hippel-Lindau proteins*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(49): p. 42027-36.
88. Hacohen, N., S. Kramer, D. Sutherland, Y. Hiromi, and M.A. Krasnow, *sprouty encodes a novel antagonist of FGF signaling that patterns apical branching of the Drosophila airways*. *Cell*, 1998. **92**(2): p. 253-63.
89. Mathia, S., A. Paliege, R. Koesters, H. Peters, H.H. Neumayer, S. Bachmann, and C. Rosenberger, *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): p. 565-76.
90. Schrijver, G., K.J. Assmann, J.F. Wetzels, and J.H. Berden, *Cyclosporin A reduces albuminuria in experimental anti-GBM nephritis independently from changes in GFR*. *Nephrol Dial Transplant*, 1995. **10**(7): p. 1149-54.
91. Faul, C., M. Donnelly, S. Merscher-Gomez, Y.H. Chang, S. Franz, J. Delfgaauw, J.M. Chang, H.Y. Choi, K.N. Campbell, K. Kim, J. Reiser, and P. Mundel, *The actin cytoskeleton of kidney podocytes is a direct target of the antiproteinuric effect of cyclosporine A*. *Nat Med*, 2008. **14**(9): p. 931-8.
92. Brezis, M., S. Rosen, P. Silva, and F.H. Epstein, *Transport activity modifies thick ascending limb damage in the isolated perfused kidney*. *Kidney Int*, 1984. **25**(1): p. 65-72.
93. Wang, Z., Q. Zhu, M. Xia, P.L. Li, S.J. Hinton, and N. Li, *Hypoxia-inducible factor prolyl-hydroxylase 2 senses high-salt intake to increase hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  levels in the renal medulla*. *Hypertension*, 2010. **55**(5): p. 1129-36.
94. Wolf, G., F. Thaiss, and R.A. Stahl, *Cyclosporine stimulates expression of transforming growth factor-beta in renal cells. Possible mechanism of cyclosporines antiproliferative effects*. *Transplantation*, 1995. **60**(3): p. 237-41.

95. Akool el, S., A. Doller, A. Babelova, W. Tsalastra, K. Moreth, L. Schaefer, J. Pfeilschifter, and W. Eberhardt, *Molecular mechanisms of TGF beta receptor-triggered signaling cascades rapidly induced by the calcineurin inhibitors cyclosporin A and FK506*. J Immunol, 2008. **181**(4): p. 2831-45.
96. Islam, M., J.F. Burke, Jr., T.A. McGowan, Y. Zhu, S.R. Dunn, P. McCue, J. Kanalas, and K. Sharma, *Effect of anti-transforming growth factor-beta antibodies in cyclosporine-induced renal dysfunction*. Kidney Int, 2001. **59**(2): p. 498-506.
97. Pichler, R.H., N. Franceschini, B.A. Young, C. Hugo, T.F. Andoh, E.A. Burdmann, S.J. Shankland, C.E. Alpers, W.M. Bennett, W.G. Couser, and et al., *Pathogenesis of cyclosporine nephropathy: roles of angiotensin II and osteopontin*. J Am Soc Nephrol, 1995. **6**(4): p. 1186-96.
98. Mazzali, M., J. Hughes, M. Dantas, L. Liaw, S. Steitz, C.E. Alpers, R.H. Pichler, H.Y. Lan, C.M. Giachelli, S.J. Shankland, W.G. Couser, and R.J. Johnson, *Effects of cyclosporine in osteopontin null mice*. Kidney Int, 2002. **62**(1): p. 78-85.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Julia Katharina Scheidl, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Einfluss von tubulärem Knockout des Von-Hippel-Lindau-Proteins auf die durch Cyclosporin-A ausgelöste chronische tubulo-interstitielle Nierenfibrose der Maus* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik und Resultaten entsprechen den URM und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum:

Unterschrift

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## **Danksagung**

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Christian Rosenberger, der mir zu jedem Zeitpunkt mit Rat und Tat zur Seite stand und die Arbeit in der praktischen Durchführung und im theoretischen Teil mit besonderer Hingabe betreut hat.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Harm Peters, der mich nach erfolgreicher Erstellung einer Hausarbeit in seine Arbeitsgruppe aufgenommen hat und mir die Gelegenheit gegeben hat, diese Arbeit im Rahmen seiner Forschungsgruppe zu erstellen.

Desweiteren danke ich insbesondere den Mitgliedern der Arbeitsgruppe, bestehend aus Susanne Mathia, Alice Mika, Tanja Loof, Christin Schelter und Dmytro Khadzhynov für ihre tatkräftige Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Zuletzt geht mein Dank an meine Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben und mich in allen Situationen bedingungslos unterstützt haben.