

Aus dem Institut für Vegetative Anatomie  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Der Einfluss von antidiuretischem Hormon auf die  
medulläre Genexpression in Brattleboro Ratten**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anja Dietrich  
aus Brandenburg an der Havel

Datum der Promotion: 09.09.2016

# Inhaltsverzeichnis

Abstract (englisch und deutsch).....	5
Abkürzungen.....	8
1. Einleitung.....	9
1.1 Grundlagen der Osmorezeption.....	10
1.2 ADH und der Harnkonzentrierungsmechanismus.....	10
1.3 Die medulläre Gefäßversorgung.....	13
1.4 Harnkonzentrierung unter dem Gesichtspunkt des Energieverbrauchs.....	14
1.5 HIF: Hypoxie als Regulationsmechanismus der Proteinsynthese.....	16
1.6 Das Tiermodell.....	16
1.7 Herleitung einer Aufgabenstellung.....	17
2. Material und Methoden .....	19
2.1 Behandlungsprotokoll.....	19
2.2 Blutdruckmessung.....	20
2.3 Blut- und Urinalysen.....	20
2.4 Gewebeaufbereitung.....	20
2.5 RNA-Aufbereitung und cDNA-Synthese.....	21
2.6 Genexpressionsanalyse.....	22
2.6.1 Microarray.....	22
2.6.2 Gene ontology-Analysen.....	23
2.7 Biochemische Färbemethoden.....	23
2.7.1 Sirius-Rot-Färbung .....	23
2.8 Antikörperbasierte Färbemethoden.....	24
2.8.1 Pimonidazol-Färbung.....	24
2.8.2 Fluoreszenz .....	25
2.8.3 HIF-1 $\alpha$ .....	26
2.9 In-situ-Hybridisierung für Kollagen 1.....	26
2.10 Statistik.....	29
2.11 Literaturrecherche.....	29
3. Ergebnisse.....	30
3.1 Etablierung der Pimonidazolfärbung.....	30
3.2 Klinische Chemie.....	31

3.3	NKCC2 und AQP2.....	32
3.4	Pimonidazolfärbung.....	33
3.5	Immunhistochemie für HIF-1 $\alpha$ .....	37
3.6	Die medulläre Genexpression .....	38
3.7	Histomorphologischer Kollagennachweis.....	42
4.	Diskussion.....	45
5.	Literaturverzeichnis.....	52
6.	Eidesstattliche Versicherung.....	67
7.	Lebenslauf.....	69
8.	Publikationsliste.....	70
9.	Danksagung.....	71

## **Abstract (english)**

*Introduction:* Regulation of renal solute and water transport by the antidiuretic hormone arginine vasopressin (AVP) contributes essentially to extracellular fluid homeostasis. Emerging evidence further suggests that AVP, together with renal hypoxia, contribute to the development of renal disease, but the effects of AVP on renal oxygen levels have not been determined. The hypothesis of the present study was that activation of AVP-signaling reduces medullary oxygen availability and causes activation of hypoxia-inducible gene expression.

*Methods:* Adult AVP-deficient Brattleboro rats (n = 26) and age-matched Sprague Dawley rats (n = 10) were randomized to treatment with the V2 receptor agonist desmopressin (dDAVP, 5 ng/h for 3 d) or its vehicle via osmotic minipump. Blood pressure was measured in a subset of Brattleboro rats using tail plethysmography (n = 5 for dDAVP and vehicle treatment, respectively). Brattleboro and Sprague Dawley rats for morphological studies (n = 5 per rat strain and treatment) received an intraperitoneal injection of pimonidazole (60 mg/kg) 30 min before perfusion fixation on day 3. Hypoxic areas of the kidney were identified by immunostaining for pimonidazole or the hypoxia-inducible transcription factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ). Regulation of established HIF-target genes was studied by Affymetrix microarray analysis (n = 3 per group).

*Results:* Treatment of Brattleboro rats with dDAVP caused a significant reduction of urine output ( $24 \pm 8$  ml/7 h for dDAVP- vs.  $68 \pm 37$  ml/7 h for vehicle-treated animals;  $p < 0.05$ ) and a concomitant increase in urine osmolality ( $853 \pm 257$  mOsm/kg for dDAVP- vs.  $382 \pm 303$  mOsm/kg for vehicle-treated animals;  $p < 0.05$ ). Blood pressure was elevated at d3 ( $134 \pm 11$  mm Hg for dDAVP- vs.  $119 \pm 6$  mm Hg for vehicle-treated animals;  $p < 0.05$ ). Staining for pimonidazole and HIF-1 $\alpha$  was detected in the medulla of dDAVP-treated Brattleboro and Sprague Dawley rats whereas staining in the respective control animals was weak or absent. Gene expression analysis revealed significant enrichment of known HIF-target genes in dDAVP-treated Brattleboro rats ( $p = 2.6 \cdot 10^{-21}$ ). Regulated products included insulin-like growth factor binding proteins 1 and 3, angiotensin 2, fibronectin, cathepsin D, hexokinase 2 and cyclooxygenase 2.

*Conclusion:* Chronic activation of the renal urine concentrating mechanism by AVP causes a marked decline of medullary oxygen levels and an upregulation of hypoxia-



inducible gene expression. These findings provide a mechanistic link between AVP-mediated antidiuresis and hypoxia-induced kidney damage and establish AVP as a permissive factor during the development of renal disease.

## **Abstrakt (deutsch)**

**Einleitung:** Die Aktivierung renaler Elektrolyt- und Wassertransportprozesse durch das antidiuretische Hormon (ADH) gilt als zentraler Mechanismus für die Aufrechterhaltung der Osmo- und Volumenhomöostase. Gleichzeitig gibt es Hinweise auf eine Rolle von ADH bei der Entwicklung von Nierenerkrankungen. Der Effekt von ADH auf die renale Oxygenierung wurde bisher nicht systematisch untersucht. In der vorliegenden Arbeit soll die Hypothese getestet werden, dass eine Aktivierung des ADH-Signalweges zur Reduktion der medullären Oxygenierung und damit zur Aktivierung Hypoxie-induzierbarer Genexpression führt.

**Methoden:** Erwachsene ADH-defiziente Brattleboro Ratten (n = 26) und gleichaltrige Sprague Dawley Ratten (n = 10) wurden nach dem Zufallsprinzip in Gruppen eingeteilt und mittels osmotischer Minipumpe mit dem V2-Rezeptoragonisten Desmopressin (dDAVP, 5 ng/h für 3d) oder seinem Vehikel behandelt. In einer Teilmenge der Brattleboro Ratten (n = 5 pro Gruppe) wurde der systolische Blutdruck mittels Schwanzplethysmographie gemessen. Brattleboro Ratten und Sprague Dawley Ratten erhielten für morphologische Analysen (n = 5 pro Gruppe und Behandlung) 30 min vor ihrer Tötung eine intraperitoneale Pimonidazolinjektion (60 mg/kg KG; n = 5 pro Gruppe). Hypoxische Areale in der Niere wurden mittels immunhistochemischer Markierungen für Pimonidazol oder für den Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) identifiziert. Die Genexpression bekannter HIF-Zielgene wurde durch Affymetrix-Microarray-Analysen untersucht (n = 3 pro Gruppe).

**Ergebnisse:** Die Behandlung mit dDAVP führte bei Brattleboro Ratten zu einer signifikanten Reduktion der Urinausscheidung ( $24 \pm 8$  ml/7 h für dDAVP- vs.  $68 \pm 37$  ml/7 h für Vehikel-behandelte Tiere;  $p < 0,05$ ) bei gleichzeitigem Anstieg der Urinosmolalität ( $853 \pm 257$  mOsm/kg für dDAVP- vs.  $382 \pm 303$  mOsm/kg für Vehikel-behandelte Tiere;  $p < 0,05$ ). Der Blutdruck war an Tag 3 erhöht ( $134 \pm 11$  mm Hg für dDAVP- vs.  $119 \pm 6$  mm Hg für Vehikel-behandelte Tiere;  $p < 0,05$ ). Ein Signal für Pimonidazol und HIF-1 $\alpha$  fand sich in der Medulla von dDAVP-behandelten Brattleboro- und Sprague Dawley Ratten. In den Kontrolltieren war das Signal schwach oder fehlte vollständig. Analysen der Genexpression zeigten in dDAVP-behandelten Brattleboro Ratten einen signifikanten Anstieg bekannter HIF-Zielgene ( $p = 2.6 \cdot 10^{-21}$ ). Dazu

gehörten insulin-like growth factor binding proteins 1 und 3, Angiopoietin 2, Fibronectin, Cathepsin D, Hexokinase 2 und Cyclooxygenase 2.

Schlussfolgerung: Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die chronische Stimulation der renalen Urinkonzentrierung durch ADH zu einem deutlichen Rückgang der medullären Oxygenierung und einer Steigerung der hypoxie-induzierbaren Genexpression führt. Diese Ergebnisse weisen auf einen kausalen Zusammenhang zwischen ADH-vermittelter Antidiurese und Hypoxie-induziertem Nierenschaden hin und weisen ADH eine wesentliche Rolle in der Entstehung von Nierenerkrankungen zu.

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADH	Antidiuretisches Hormon
AQP	Aquaporin
ATL	<i>Ascending thin limb</i> (Pars ascendens des Intermediärtubulus)
ATP	Adenosintriphosphat
CD	<i>Collecting duct</i> (Sammelrohr)
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CNT	<i>Connecting tubule</i> (Verbindungstubulus)
COX-2	Cyclooxygenase 2
DAB	3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DCT	<i>Distal convoluted tubule</i> (Pars convoluta des distalen Tubulus)
dDAVP	Desmopressin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTL	<i>Descending thin limb</i> (Pars descendens des Intermediärtubulus)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENaC	<i>Epithelial sodium channel</i>
EPO	Erythropoetin
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GO	<i>Gene Ontology</i>
HIF	<i>Hypoxia-inducible factor</i>
HRE	<i>Hypoxia response element</i>
IGFBP	<i>Insulin-like growth factor binding protein</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
mTAL	<i>medullary TAL</i>
NCC	Na <sup>+</sup> -Cl <sup>-</sup> -Kotransporter
NKCC2	Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -2Cl <sup>-</sup> -Kotransporter
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PCT	<i>Proximal convoluted tubule</i> (Pars convoluta des proximalen Tubulus)
PFA	Paraformaldehyd
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
PST	<i>Proximal straight tubule</i> (Pars recta des proximalen Tubulus)
pVHL	VHL-Protein
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
TAL	<i>Thick ascending limb</i> (Pars recta des distalen Tubulus)
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VHL	von Hippel-Lindau Tumorsuppressorgen

## 1. Einleitung

Eine konstante Osmolalität der extrazellulären Flüssigkeit ist Voraussetzung für die normale Funktion von Säugetierzellen. Dies gilt insbesondere für die Neurone des zentralen Nervensystems. Hier führen plötzliche Änderungen der Osmolalität zu Fehlfunktionen, welche sich in Verwirrtheit, Übelkeit, Erbrechen und Störungen des Bewusstseins bis hin zum Koma manifestieren können.

Die Regulation der Osmolalität der extrazellulären Flüssigkeit erfolgt durch ein komplexes Zusammenspiel mehrerer Organsysteme und unterliegt der zentralen Kontrolle durch osmosensible Neurone im Organum vasculosum der Lamina terminalis und in angrenzenden hypothalamischen Arealen. Bei steigender Osmolalität generieren diese Neurone Signale, welche zu einer Aktivierung zentraler Durstzentren führen. Gleichzeitig werden über eine Freisetzung des antidiuretischen Hormons (ADH) aus dem Hypophysenhinterlappen Mechanismen in Gang gesetzt, welche in ihrer Gesamtheit dazu dienen, die Wassermenge im Körper zu erhöhen. Zentrales Zielorgan für das ADH-Signal ist die Niere. Hier führt ADH in einem komplexen Mechanismus zu einer gesteigerten Wasserresorption aus der Tubulusflüssigkeit und damit zu einer Konzentrierung des Urins.

Eine Störung der ADH-vermittelten Harnkonzentrierung führt zum Krankheitsbild des Diabetes insipidus, welches sich mit einer erhöhten Ausscheidung von freiem Wasser und einer daraus resultierenden Erhöhung der Plasmaosmolalität manifestiert. Eine unkontrollierte Aktivierung von ADH führt zu einer Hyponatriämie und tritt zum Beispiel beim Syndrom der inadäquaten Antidiurese auf. Neuere Daten weisen zusätzlich auf eine Rolle von ADH bei der Pathogenese der arteriellen Hypertonie, dem kardiorenalen Syndrom, der Kontrastmittelnephropathie und der diabetischen Nephropathie hin (1-4). Ein möglichst umfassendes Verständnis der komplexen Mechanismen der ADH-vermittelten Harnkonzentrierung könnte daher auch zu einem besseren Verständnis dieser Erkrankungen und zur Entwicklung neuer, Mechanismus-basierter Therapiemöglichkeiten beitragen (5; 6).

## 1.1 Grundlagen der Osmorezeption

Die Osmorezeption basiert auf der Reaktion osmosensibler Neurone auf der Bildung eines osmotischen Gradienten zwischen intra- und extrazellulärem Raum. Steigt die Osmolalität im Blut, kommt es zum Wasserausstrom aus der Zelle und damit zu einem Schrumpfungsprozess. Es wird vermutet, dass die Osmorezeptoren Mechanorezeptoren sind, die primär auf die Dehnung der Zellmembran reagieren. Bei Stimulation nimmt die Leitfähigkeit der Membran für Kationen unselektiv zu. Verantwortlich hierfür sind wahrscheinlich Mitglieder aus der Familie der *transient receptor potential vanilloid*-Kanalproteine. Der Einwärtsstrom von Kationen führt zu einer Depolarisation und schließlich zur Ausbildung eines Aktionspotentials. Die osmosensitiven Neurone projizieren u.a. auf ADH-bildende Zellen in den Nuclei supraopticus und paraventricularis (7). Die renalen Effekte von ADH werden durch V1a und V2 Rezeptoren vermittelt. V1a-Rezeptoren sind dabei hauptsächlich in Gefäßen und in den Glomeruli lokalisiert und bewirken eine Vasokonstriktion. Die G-Protein gekoppelten V2-Rezeptoren werden epithelial im dicken aufsteigenden Ast der Henle Schleife (TAL), im distalen Konvolut (DCT), im Verbindungstubulus (CNT) und im Sammelrohr (CD) exprimiert (8) und sind für die antidiuretische Wirkung von ADH verantwortlich.

## 1.2 ADH und der Harnkonzentrierungsmechanismus

Der Prozess der Harnkonzentrierung ist eine Leistung der renalen Medulla und erfordert das Zusammenwirken verschiedener epithelialer und vaskulärer Strukturen (Abb. 1). Durch die enge räumliche Nähe von absteigendem und aufsteigendem Schenkel der Henle Schleife wird ein Austausch von Soluten und Wasser begünstigt. NaCl, welches im Interstitium angereichert vorliegt, wird dabei vom Pars descendens des Intermediärtubulus (DTL) passiv aufgenommen. Angetrieben vom osmotischen Gradienten zwischen Tubuluslumen und medullärem Interstitium kommt es im DTL auch zu einer Resorption von Wasser. Dieser Prozess wird durch Expression von Aquaporin 1 (AQP1) und die damit verbundene, konstitutiv hohe Wasserpermeabilität des DTL begünstigt. Durch die beschriebenen differentiellen Transportprozesse nimmt die Salzkonzentration im Verlauf des DTL zu und erreicht am Scheitelpunkt der Henle Schleife ein Maximum. Mit Übergang in den Pars ascendens des Intermediärtubulus (ATL) sistiert die Expression von AQP1 wodurch die Wasserpermeabilität des Epithels

drastisch reduziert wird. Die Zusammensetzung der Tubulusflüssigkeit bleibt dadurch im Verlauf des ATL relativ konstant. Im anschließenden TAL kommt es dann durch einen sekundär aktiven Transportprozess zur Rückresorption von NaCl. Dieses akkumuliert im medullären Interstitium und erzeugt damit den notwendigen Gradienten für die oben beschriebenen Transportprozesse. Die Resorption von NaCl im TAL erfolgt zum überwiegenden Teil durch die Aktivität des Furosemid-sensitiven  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Kontransporters (NKCC2) in der apikalen Membran der Zellen. Treibende Kraft für diesen Transportprozess ist der elektrochemische Gradient für  $\text{Na}^+$ , welcher durch die Arbeit der  $\text{Na}^+\text{/K}^+\text{-ATPase}$  in der basolateralen Membran aufgebaut wird. Das dafür benötigte Adenosintriphosphat (ATP) wird durch Mitochondrien bereitgestellt, welche sich in großer Zahl im basolateralen Labyrinth der TAL-Zellen befinden. Die effektive Trennung von Wasser und Salz wird weiterhin durch eine extrem niedrige Wasserpermeabilität des TAL unterstützt, welche aus wasserdichten Zell-Zellkontakten und dem Fehlen von Aquaporinen resultiert.

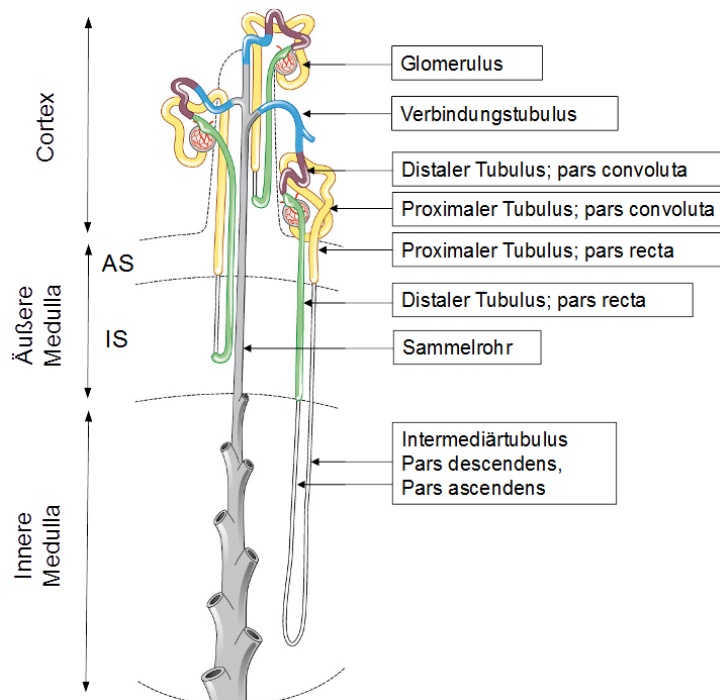


Abb. 1: Schematische Darstellung unterschiedlich langer Nephrone in ihrem Verlauf: Glomerulus, proximaler Tubulus mit Pars convoluta und Pars recta, Intermediär-tubulus mit Pars descendens und Pars ascendens, distaler Tubulus mit Pars recta und Pars convoluta, Verbindungstubulus, Sammelrohr. „AS“ Außenstreifen. „IS“ Innenstreifen (Graphik verändert nach (9), Seite 763).

Im Anschluss an den TAL gelangt der Urin in den DCT, den CNT und den CD. Hier werden dem Harn über den Thiazid-sensitiven  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ -Kotransporter (NCC) und den epithelialen Natriumkanal (ENaC) weiter Salz entzogen und der Urin damit verdünnt.

Die endgültige Regulation der Wasserausscheidung erfolgt im CNT und CD. Der apikale Eintrittsweg für Wasser ist dabei abhängig von AQP2, welches in Abwesenheit von ADH in Speichervesikeln der Hauptzellen lokalisiert ist und unter Einfluss von ADH in die apikale Zellmembran integriert wird. Die Signaltransduktionskaskade von ADH beinhaltet eine Aktivierung von Adenylatzyklase 6 mit resultierendem Anstieg von zyklischem Adenosin Monophosphat (cAMP) und eine Aktivierung von Proteinkinase A. Diese phosphoryliert AQP2, welches daraufhin aus intrazellulären Speichervesikeln in die apikale Zellmembran eingebaut wird. Erst wenn sich sowohl apikal AQP2 als auch basolateral AQP 3 und 4 in der Zellmembran befinden, ist die Zelle wasserdurchlässig und der Harn wird konzentriert. Das Interstitium in der äußeren Medulla ist mit dem NaCl aus dem TAL angereichert, wodurch dem Urin, dem osmotischen Gradienten folgend, im CD Wasser entzogen wird.

Ein weiterer Mechanismus zur Maximierung der Harnkonzentrierungsfähigkeit beruht auf einer differentiellen Permeabilität der Nephron epithelien für Harnstoff. Harnstoff wird im Glomerulus frei filtriert und im proximalen Tubulus durch Resorption von Wasser und Soluten aufkonzentriert. Das Epithel des DTL weist durch Expression des Harnstofftransporters UTA2 eine hohe Permeabilität für Harnstoff auf. Dem Konzentrationsgradienten zwischen Interstitium und Tubulusharn folgend kommt es hier zu einem Übertritt von Harnstoff aus dem Interstitium in das Tubuluslumen. Die anschließenden Nephronsegmente weisen nur eine geringe Harnstoffpermeabilität auf, wodurch dieser im Tubuluslumen akkumuliert. Erst im Bereich des distalen Sammelrohrdrittels in der inneren Medulla finden sich ADH-regulierte UTA1 Harnstofftransporter, durch welche Harnstoff nun vom Sammelrohrlumen ins Interstitium übertreten kann. Hier reichert er sich an und verstärkt dadurch den osmotischen Gradienten und damit die Wasserresorptionskapazität. Die maximale Harnkonzentrierung findet also ADH-abhängig in der inneren Medulla statt (Übersichtsarbeit 10).



### 1.3 Die medulläre Gefäßversorgung

Der renale Blutfluss beträgt ca. 20% des Herzzeitvolumens, die äußere Medulla erhält davon jedoch nur etwa 7% und die innere Medulla 1%. Nur das Blut aus den Vasa efferentia der juxtamedullären Glomeruli dient über die Vasa recta der Versorgung der Medulla (Abb. 2).

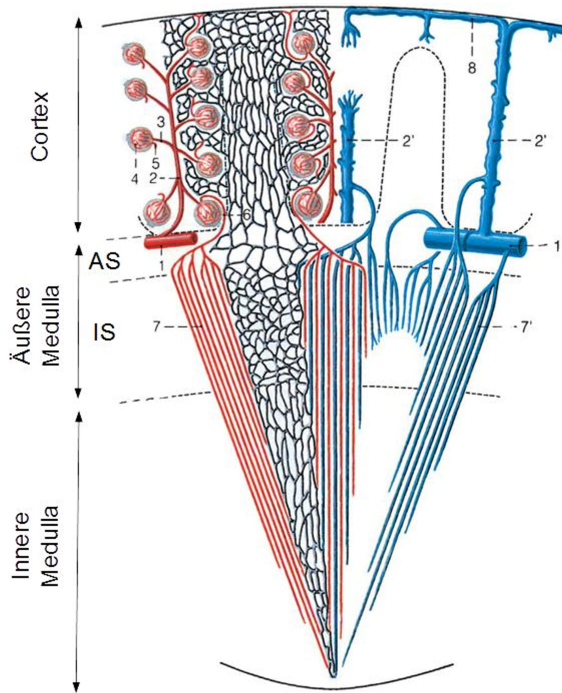


Abb. 2: Schema der Gefäßversorgung des Nierenparenchyms. Die arteriellen Gefäße sind rot, die Kapillaren grau, die venösen Gefäße blau. 1 und 1' = A. und V. arcuata; 2 und 2' = A. und V. corticalis radiata; 3 = A. afferens; 4 = Glomerulus; 5 = A. efferens; 6 = A. efferens eines juxtamedullären Nierenkörperchens; 7 und 7' = arterielle und venöse Vasa recta; 8 = V. stellata. „AS“ Außenstreifen. „IS“ Innenstreifen (Graphik aus (9), Seite 766).

Die Architektur der Vasa recta begünstigt eine effektive Harnkonzentrierung und verhindert ein Auswaschen interstitiell angereicherter Osmolyte. Die aufsteigenden und absteigenden Vasa recta liegen in enger räumlicher Nachbarschaft, wodurch sich ein weiteres Gegenstromsystem bildet. Die Gefäßwände sind permeabel für Wasser, NaCl und Harnstoff. Das in den absteigenden Vasa recta befindliche Blut ist im Vergleich zum umgebenden Interstitium hypoosmotisch. Dadurch strömt NaCl in das Lumen und reichert sich dort an. In den aufsteigenden Vasa recta ist die Salzkonzentration dadurch immer etwas höher als in den absteigenden Vasa recta auf gleicher Höhe. Da die Gefäßwände salzpermeabel sind, diffundiert NaCl vom aufsteigenden in den absteigenden Ast. Durch diesen Mechanismus wird der perfusionsbedingte Verlust osmotisch aktiver Teilchen minimiert.

Harnstoff wird über ein ähnliches System im Nierenmark gehalten. Auch Harnstoff bildet entlang der arteriellen und venösen Vasa recta einen Konzentrationsgradienten mit steigender Konzentration in Richtung des inneren Nierenmarks. Der im letzten Sammelrohrdrittel ADH-abhängig ins Interstitium übergetretene Harnstoff gelangt über aufsteigende Vasa recta vom inneren Bereich des Nierenmarks in die äußere Zone, wo es durch Diffusion in absteigende Vasa recta übertritt und dadurch wieder dem Strom in Richtung Nierenmark folgt. Teilweise gelangt so der Harnstoff durch den engen Kontakt zwischen Vasa recta und den DTLs erneut in das Tubuluslumen und reichert sich dort an (Übersichtsarbeit 10).

Die Anatomie des vaskulären Gegenstromsystems bedingt auch eine Angleichung der Sauerstoffpartialdrücke ( $pO_2$ ) zwischen absteigenden und aufsteigenden Vasa recta, wodurch der Sauerstoffzustrom in die Medulla abnimmt. Ein weiterer *Shunt*-Mechanismus im Bereich der Vasae arcuatae bis hin zu den Interlobulargefäßen schränkt die medulläre Sauerstoffzufuhr zusätzlich ein (11). Begünstigt wird dieser *Shunt*-Mechanismus durch den engen Kontakt zwischen Arterien und Venen und dem kapillarähnlichen Wandaufbau der venösen Gefäße (12). Eine weitere Reduktion des medullären Blutflusses wird durch die ADH-abhängige Vasokonstriktion der afferenten Arteriolen juxtamedullärer Nephrone und der absteigenden Vasa recta ausgelöst. Diese Effekte werden sowohl durch V1a- als auch durch V2-Rezeptoren vermittelt (13-18).

#### **1.4 Harnkonzentrierung unter dem Gesichtspunkt des Energieverbrauchs**

Der Energiebedarf der Niere resultiert zum größten Teil aus den unterschiedlichen tubulären Transportprozessen und wird durch die Aktivität der  $Na^+/K^+$ -ATPase determiniert (Übersichtsarbeit 19). Den größten Anteil am renalen Sauerstoffverbrauch hat dabei der medulläre TAL (20). ADH führt hier über eine Aktivierung von V2-Rezeptoren (Abb. 3) zu einer kräftigen Steigerung der transepithelialen NaCl-Resorption (8; 21; 22) und damit zu einer Steigerung des ATP- und Sauerstoffbedarfs. Auch in den nachgeschalteten Tubulussegmenten von DCT, CNT und CD führt ADH über eine Aktivierung von NCC und ENaC zu einer gesteigerten  $Na^+$ -Reabsorption und damit zu einem erhöhten Sauerstoffverbrauch (23). Eine Stimulation des V2-Rezeptors führt zudem mittelfristig zu einer de-novo Synthese von Transportern und Kanalproteinen wie NKCC2, NCC, ENaC, UTA2 Harnstofftransporter und Aquaporinen

(24-26). Indirekt stimuliert ADH auch die ATP-abhängige Synthese von organischen Osmolyten und Prostaglandinen in epithelialen und interstitiellen Zellen (27-29). Bei chronischer Aktivierung des ADH-Signalweges lassen sich insbesondere im Innenstreifen bzw. dem dort lokalisierten TAL Wachstumsprozesse mit einer Steigerung des Zellvolumens und der Mitochondrienzahl nachweisen (30). Trinh-Trang-Tan et al. zeigten, dass in Brattleboro Ratten unter chronischer ADH-Behandlung die Aktivität der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase im medullären TAL zunahm (31). Insgesamt führen diese morphologischen Veränderungen unter chronischer V2-Rezeptorstimulation zu einer Steigerung der Resorptionskapazität im TAL sowie zu der damit verbundenen Steigerung des Energieverbrauchs.

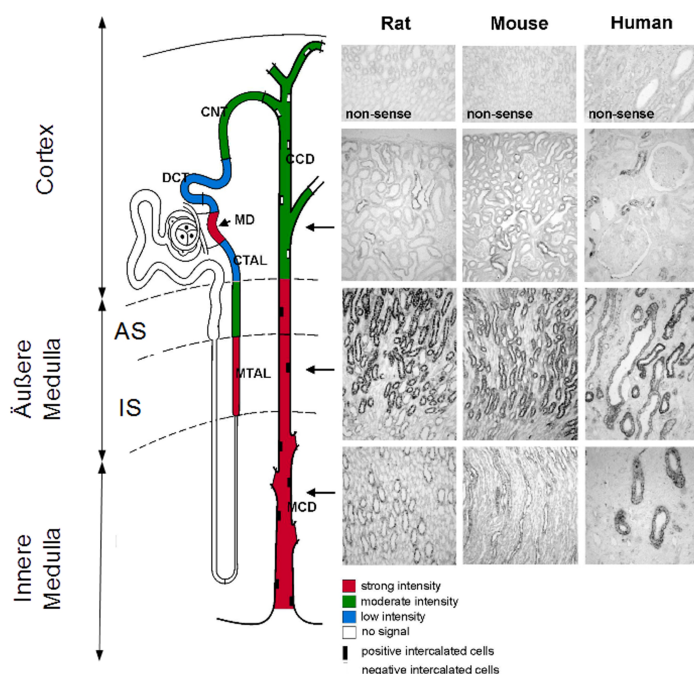


Abb. 3: Schematisches Verteilungsmuster der V2-Rezeptor-mRNA entlang des Tubulussystems bei Mäusen, Ratten und Menschen. Außenstreifen „AS“ und Innenstreifen „IS“. Tubulussegmente kürzen sich folgendermaßen ab: medullärer und corticaler dicker aufsteigender Schleifenschenkel „MTAL“ und „CTAL“, Macula densa „MD“, distales Convolut „DCT“, Verbindungstubulus „CNT“, corticales und medulläres Sammelrohr „CCD“ und „MCD“. Rot: Starke Intensität. Grün: moderate Intensität. Blau: niedrige Intensität. Weiß: kein Signal. Schwarzes Rechteck: positive Schaltzellen. Weißes Rechteck: negative Schaltzellen (Grafik aus (8)).

Zusammengefasst steigert ADH im TAL die aktive NaCl-Resorption, sowie im CNT und im CD die Wasserpermeabilität, die Harnstoffpermeabilität und den Natriumtransport. Mechanismen hierfür liegen in der Steigerungen von Transportaktivität, Proteinsynthese und Wachstumsprozessen als stark energieverbrauchende Prozesse. Die Folge ist ein erhöhter Sauerstoffbedarf. Dem gegenüber steht die eingeschränkte Blutversorgung der Medulla, die unter dem Einfluss von ADH weiter abnimmt.

## 1.5 HIF: Hypoxie als Regulationsmechanismus der Proteinsynthese

Hypoxie-induzierbare Transkriptionsfaktoren (HIFs) sind ein wesentlicher Schlüsselfaktor bei der Hypoxie-regulierten Proteinsynthese. Unter HIF versteht man Transkriptionsfaktoren, die mit ihren mehreren hundert direkten und indirekten Zielgenen hauptsächlich für die Reaktion des Organismus auf einen verminderten  $pO_2$  verantwortlich sind. Klassische Zielgene sind zum Beispiel beteiligt an Erythropoese, Eisenstoffwechsel, Angiogenese, Entzündungsreaktionen, Energiestoffwechsel, Zellproliferation und Apoptose.

Der aktive HIF-Transkriptionsfaktor besteht aus einer konstitutiv exprimierten  $\beta$ -Untereinheit und einer von 3 hypoxieabhängigen HIF- $\alpha$  Untereinheiten (HIF-1, HIF-2, HIF-3), die unter Normoxie abgebaut werden bevor es zu einer Dimerisierung kommen kann. Erst bei Sauerstoffmangel kommt es zu einer Stabilisierung der HIF- $\alpha$  Untereinheiten und zur Bildung von aktiven Heterodimeren. Der wahrscheinlich wichtigste Regulationsmechanismus für die HIF-Aktivität läuft über das von Hippel-Lindau Tumorsuppressorgen (VHL) beziehungsweise dessen Genprodukte. Das VHL-Protein (pVHL) ist Teil des E3-Ubiquitin-Ligasekomplexes. Damit HIF- $\alpha$  von VHL gebunden werden kann, muss es an verschiedenen Prolylresten hydroxyliert werden. Diese Reaktion wird in Abhängigkeit von molekularem Sauerstoff durch sogenannte HIF-Prolylhydroxylasen katalysiert. Nach Bindung an pVHL werden die HIF- $\alpha$  Moleküle ubiquitinyliert und damit dem proteasomalen Abbauweg zugeführt. Findet aufgrund von Sauerstoffmangel keine Hydroxylierung von HIF-1 $\alpha$  statt, kommt es zu einer Stabilisierung des Proteins und zu einer Dimerisierung mit HIF-1 $\beta$ . Der Proteinkomplex rekrutiert weitere Kofaktoren, transloziert in den Zellkern und aktiviert hier durch die Bindung an *Hypoxia response elements* (HRE) innerhalb des Promotors bzw. *Enhancers* die Transkription seiner Zielgene (Übersichtsarbeit 32).

## 1.6 Das Tiermodell

Die Nierenfunktion wird durch vielfältige interagierende Mechanismen gesteuert. Das Studium isolierter ADH-Effekte im gesunden Tier ist daher mit großen Schwierigkeiten verbunden. So führt z.B. ein Wasserentzug im Durstversuch zu einer rapiden Volumendepletion der Tiere und dadurch zu einer starken Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems. Weiterhin weisen Nagetiere eine hohe basale ADH-

Aktivität auf und konzentrieren ihren Urin bereits unter Kontrollbedingungen erheblich. Eine Möglichkeit zur Umgehung dieser Schwierigkeiten besteht in der Verwendung von ADH-defizienten Tiermodellen wie zum Beispiel der Brattleboro Ratte. Diese Tiere weisen eine Mutation des ADH-Gens auf, welche eine Sekretion des Hormons verhindert. Dadurch entsteht bei den Tieren das Vollbild eines angeborenen zentralen Diabetes insipidus mit Polyurie und erhöhter Plasmaosmolalität. In der Originalarbeit zu diesem Tiermodell von Valtin & Schroeder wurde bereits 1964 eine deutlich erhöhte Wasseraufnahme und Urinausscheidung bei erniedrigter Urinosmolalität beschrieben (33). Die peripheren Rezeptoren für ADH und die nachgeschalteten Signaltransduktionskaskaden sind nicht beeinträchtigt und können pharmakologisch zum Beispiel durch die Gabe des synthetischen V2-Rezeptoranalogs Desmopressin (1-desamino-8-D-Arg-vasopressin; dDAVP) gezielt stimuliert werden. Die Applikation von dDAVP mittels osmotischer Minipumpe ermöglicht zudem einen konstanten Spiegel und damit eine hohe interindividuelle Vergleichbarkeit. Durch präferentielle Stimulation des V2-Rezeptors ist es außerdem möglich, die epithelialen Effekte von ADH in den Vordergrund zu stellen. Zur besseren Interpretierbarkeit der Resultate wurden die Versuche parallel mit genetisch unveränderten Sprague Dawley Ratten durchgeführt.

### **1.7 Herleitung einer Aufgabenstellung**

Die Regulation der Osmolalität der extrazellulären Flüssigkeit durch die ADH-abhängige Modulation der freien Wasserclearance gehört zu den zentralen Aufgaben der Niere. Die Bildung eines konzentrierten Harns erfolgt dabei in einem koordinierten Prozess, welcher die Synthese und Aktivierung von medullären Salz- und Harnstofftransportern und von wassertransportierenden Aquaporinen beinhaltet. Sowohl für die Proteinbiosynthese als auch für den Salztransport werden dabei große Mengen ATP benötigt, welches unter Sauerstoffverbrauch durch oxidative Phosphorylierung erzeugt werden muss. Gleichzeitig reduziert ADH durch Vasokonstriktion der zuführenden Gefäße die medulläre Perfusion, sodass einem vermehrten Sauerstoffbedarf ein reduziertes Angebot gegenübersteht. Die Auswirkung von ADH auf die medulläre Sauerstoffversorgung wurde bisher nur unzureichend charakterisiert. In der hier vorliegenden Arbeit sollte daher die Hypothese überprüft werden, dass es in Folge der Wirkung von ADH zu einer Hypoxie medullärer Strukturen kommt. Dazu wurden ADH-

defiziente Brattleboro Ratten und Sprague Dawley-Kontrollratten für drei Tage mit dem ADH-analogen dDAVP behandelt um die Harnkonzentrierung zu induzieren. Die Detektion von Strukturen mit niedrigem  $pO_2$  sollte unter Verwendung des *Hypoxyprobe Kits* in einem immunhistochemischen Verfahren erfolgen. Parallel dazu sollte der Effekt von dDAVP auf die nukleäre Akkumulation des Hypoxie-sensitiven Transkriptionsfaktors HIF-1 $\alpha$  untersucht werden. Zur Überprüfung der funktionellen Relevanz der erhobenen Befunde sollte weiterhin der Einfluss von ADH auf die medulläre Expression bekannter HIF-Zielgene durch *Affymetrics Microarray* Genexpressionsanalyse untersucht werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Behandlungsprotokoll

Alle Tierversuche wurden entsprechend den Vorschriften der Tierschutzbehörde von Berlin (LAGESO; Tierversuchsgenehmigungen G006-02/05 und G0285/10) durchgeführt. Brattleboro Ratten (n=26) und Sprague Dawley (n=10) Ratten wurden den lokalen Kolonien in der FEM Tierversuchseinrichtung der Charité-Universitätsmedizin Berlin entnommen. Die lokale Kolonie von Brattleboro Ratten geht auf Zuchtpaare zurück, welche von Harlan Winkelmann (USA) bezogen wurden. Die Mutation im ADH-Gen wurde durch Inzuchtkreuzung konserviert. Zusätzlich erfolgte der gleiche Versuchsaufbau mit genetisch unveränderten Sprague Dawley Ratten. Für alle hier beschriebenen Versuche wurden erwachsene männliche Ratten verwendet um zyklusbedingte hormonelle Fluktuationen auszuschließen. Das Mindestalter der Tiere lag bei 8 Wochen (Körpergewicht zwischen 200-400g). Die Tiere hatten zu jedem Zeitpunkt freien Zugriff auf Trinkwasser und Standardfutter. Die Etablierung der Pimonidazol-Färbung erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. C. Rosenberger (Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin) an adulten männlichen C57/Bl6 Mäusen (n = 3; Charles River, Sulzfeld, Deutschland).

Alle Brattleboro Ratten wurden nach dem Zufallsprinzip in 6 Gruppen eingeteilt (jeweils n = 5 pro Gruppe für morphologische Studien und Blutdruckmessungen, n = 3 pro Gruppe für *Microarray*-Analysen) und mit dDAVP (Sigma-Aldrich, Deutschland) oder mit dessen Vehikel behandelt. Die Applikation von dDAVP erfolgte für 3 Tage mittels subkutan implantierter osmotischer Minipumpe (5 ng/h in isotonischer NaCl-Lösung; ALZET Modell 2001, Charles River, Sulzfeld, Deutschland). Die Dosis wurde in Anlehnung an bereits publizierte Arbeiten gewählt (34; 35). Vehikelbehandelte Tiere dienten als Kontrollen. An Tag 3 wurde Urin in Stoffwechsellkäfigen über einen Zeitraum von 7 h gesammelt. Im Anschluss wurden die Tiere entweder perfusionsfixiert oder ohne weitere Behandlung getötet. Bei den für die Herstellung der *Complementary Desoxyribonukleinsäure* (cDNA) und Proteinbiochemie vorgesehenen Tieren wurden zusätzlich vor der Tötung 2 ml Blut aus der Vena cava entnommen und mit Heparin versetzt. Anschließend wurden die Nieren entnommen und mit einer sterilen

Rasierklinge in Cortex und Medulla aufgeteilt. Das Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Tiere, die für die Perfusionsfixierung vorgesehen waren, erhielten 30 min vor ihrer Tötung eine intraperitoneale Injektion mit Pimonidazol (60 mg/kg Körpergewicht). Die Dosierung entspricht der Empfehlung des Herstellers (*Hypoxyprobe<sup>TM</sup>-1 Kit for the Detection of Tissue Hypoxie*, Chemicon International, USA & Canada). Optimale Inkubationszeiten wurden in Vorversuchen etabliert.

## **2.2 Blutdruckmessung**

Die Blutdruckmessung erfolgte mittels Schwanzplethysmographie an wachen Tieren. Um eine stressbedingte Verfälschung zu minimieren, wurden die Tiere vorher an die Prozedur für je 2 h an 3 aufeinanderfolgenden Tagen gewöhnt. Für die eigentliche Messung wurden am Ende des dritten Tages 30 Einzelmessungen durchgeführt und gemittelt. Parallel wurde die Pulskurve überwacht und artefaktbedingte Verzerrungen der Messergebnisse verworfen (36).

## **2.3 Blut- und Urinalysen**

Alle Blut- und Urinalysen erfolgten im Zentrallabor der Charité.

## **2.4 Gewebeaufbereitung**

Für Vorversuche zur Immersions- und Perfusionsfixierung bei Pimonidazolfärbung erhielten adulte C57/BL6-Mäuse 30 min vor ihrer Tötung eine intraperitoneale Injektion mit Pimonidazol (60 mg/kg Körpergewicht in isotonischer NaCl-Lösung). Nach 30 min wurde das Abdomen der Tiere durch eine mediane Laparotomie eröffnet und die Präparationsschritte für die Perfusionsfixierung wie oben beschrieben durchgeführt. Vor Beginn der Perfusion wurde der rechte Nierenstiel mit einem Faden abgebunden. Die Niere wurde entnommen, geteilt und in einer 300 mOsm Saccharoselösung entweder bei 4 °C oder bei 37 °C für 4 min inkubiert. Die linke Niere wurde zunächst für 30 s mit der 300 mOsm Saccharoselösung durchspült und dann genauso wie die rechte Niere behandelt. Nach der Inkubation wurden die Gewebestücke in 3 % Paraformaldehyd (PFA) in Phosphatpufferlösung (PBS) überführt und über Nacht bei 4 °C fixiert. Anschließend wurde ein Teil der Gewebestücke eingefroren oder in Paraffin eingebettet.



Für die Hauptexperimente zur Untersuchung der Effekte von ADH auf die Harnkonzentrierung und die damit assoziierte Oxygenierung der renalen Medulla wurden Sprague Dawley und Brattleboro Ratten verwendet. Für die Perfusionsfixierung mit Kryopräparation und Paraffineinbettung wurden die Tiere mit Isofluran (Abbott, Wiesbaden, Deutschland) und einer anschließenden intraperitonealen Injektion von Pentobarbital (0,06 mg/g KG, FAGRON, Barsbüttel, Deutschland) narkotisiert. Es folgte die Eröffnung des Abdomens durch eine mediane Laparotomie und die Freipräparation der Aorta abdominalis. In diese wurde anschließend ein Teflonschlauch (KRONLAB, Dinslaken, Deutschland) eingeführt und mittels eines vorher platzierten Fadens fixiert. Nach Eröffnung der Vena cava zum Druckausgleich erfolgte die Gewebefixierung mit frisch angesetztem, 3 %igem PFA (Merck, Darmstadt, Deutschland) in PBS; bestehend aus 8 g NaCl (Merck, Darmstadt, Deutschland), 240 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck, Darmstadt, Deutschland), 1,78 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland), und 200 mg KCl (Roth, Karlsruhe, Deutschland) in 1000 ml  $\text{H}_2\text{O}$  330 mosmol, pH 7,4) bei 220 cmH<sub>2</sub>O. Anschließend wurden die Nieren entnommen.

Für die Kryokonservierung wurde das Gewebe über Nacht in einer hochosmolaren Saccharose (Merck, Darmstadt, Deutschland)-PBS-Lösung (800 mosm/kg in PBS, pH 7,4) inkubiert. Die so vorbehandelten Gewebestücke wurden auf Styroporplättchen aufgebracht und in stickstoffgekühltem Isopentan (Riedel-de Haen, Seelze, Deutschland) eingefroren. Die anschließende Lagerung erfolgte bei -80 °C. Für die Paraffineinbettung wurden die entnommenen Nieren in einer 3 %igen PFA-Saccharose-PBS-Lösung (330 mosm/kg in PBS, pH 7,4) über Nacht nachfixiert. Die Einbettung in Paraffin erfolgte in einem automatisierten Verfahren in der Abteilung für Kinderpathologie der Charité.

Für *Microarray*-Analysen verwendete Brattleboro Ratten wurden nach erfolgter dDAVP- oder Vehikelbehandlung getötet und ihre Nieren entfernt. Die äußere Medulla wurde isoliert und für die cDNA-Bildung und darauffolgende *Microarray*-Analysen verwendet.

## **2.5 RNA-Aufbereitung und cDNA-Synthese**

Die gesamte Ribonukleinsäure (RNA) der äußeren Medulla von dDAVP- und Vehikel-behandelten Tiere wurde den Anweisungen des *Qiagen RNeasy mini kit* (Qiagen,

Hilden, Deutschland) folgend isoliert. cDNA wurde mittels des *Applied Biosystems cDNA Synthese Kit* (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) via reverse Transkription hergestellt. Für die Expressionsanalyse mittels quantitativer real-time PCR (= TaqMan) von NKCC2 wurden *Applied Biosystems probes Rn.01485101* und das *7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) unter Befolgung der Herstelleranleitung verwendet. Die cDNA-Level von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurden im gleichen Ansatz bestimmt und dienten als Ladekontrolle (catalog no. 4352338E, Applied Biosystems). Alle Expressionslevel wurden entsprechend der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode ermittelt (37).

## 2.6 Genexpressionsanalyse

### 2.6.1 Microarray

Die Analyse der *Microarray*-Daten (*GenChip® Rat Genome 230 2.0 Array*, Affymetrix) wurde im "Zentrum für Medizinische Forschung" an der Universität Mannheim (Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Die gesamte mRNA der Medulla von dDAVP- und Vehikel-behandelten Tieren (n = 3 pro Gruppe) wurde den Anweisungen des *Qiagen RNeasy mini kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) folgend isoliert. cDNA und cRNA wurden entsprechend des Affymetrix Standard-Markierungs-Protokoll (*standard labeling protocol*) hergestellt. Die Hybridisierung mit dem Affymetrix Ratten Genom 230 2.0 Array wurde in einem *GeneChip* Hybridisierungssofen (*GeneChip incubator 640*) durchgeführt. Chips wurden in der *GeneChip Fluidics Station 450* gefärbt und anschließend mit einem *GeneChip Scanner 3000* gescannt. Alle verwendeten Materialien stammten von Affymetrix (Affymetrix, High Wycombe, UK). Die Auswertung der Daten erfolgte mit einer kommerziellen Software (*JMP Genomics version 4*, SAS, Cary, USA). Zur Annotierung des *Arrayes* wurde eine mit *Custom CDF Version 9* individuell gefertigte, *UniGene*-basierte Datenbank verwendet ([http://brainarray.mbni.med.umich.edu/Brainarray/Database/CustomCDF/CDF\\_download\\_v9.asp](http://brainarray.mbni.med.umich.edu/Brainarray/Database/CustomCDF/CDF_download_v9.asp)). Die Rohdaten der Fluoreszenzintensität wurden mittels Quantilnormalisierung normalisiert. Roh- und normalisierte Daten wurden in die *Gene Expression Omnibus database* übertragen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>; GEO Zugangsnummer: GSE34225).

## **2.6.2 Gene ontology-Analysen**

*Gene Ontology* (GO) Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Ralf Mrowka im Institut für Experimentelle Nephrologie, KIM III, Universitätsmedizin Jena, durchgeführt. Dabei wurde ein Web-basiertes *GOSSIP Gene Ontology biological profiling Toolkit* verwendet (38). In die Analysen wurden alle Gene mit gesteigerter Expression eingeschlossen. Um der Frage nachzugehen, ob unter den veränderten Genen ein überproportionaler Anteil an HIF-regulierten Genen zu finden ist, wurden publizierte Listen von HIF-Zielgenen verwendet (39; 40) und um eine eigene Literaturrecherche ergänzt. Die Parameter der Literaturrecherche werden unter Punkt 2.11 definiert. Insgesamt wurden 173 HIF-Zielgene identifiziert von denen 109 im *Microarray* vertreten waren. Die Anzahl regulierter, HIF-abhängiger Genprodukte wurde verglichen mit der bei randomisierter Verteilung zu erwartenden Häufigkeit.

## **2.7 Biochemische Färbemethoden**

### **2.7.1 Sirius-Rot-Färbung**

Die *Microarray*-Daten zeigten eine deutliche Induktion verschiedener extrazellulärer Matrixbestandteile. Zur Klärung der Frage, ob die Behandlung mit dDAVP zu einer Fibrosierung des Nierenparenchyms führt, wurden Nierenschnitte mittels Sirius-Rot-Färbung angefärbt.

Dies ist eine etablierte Methode zur histochemischen Darstellung von fibrillären Kollagenen (41). Die Färbung führt zu einer intensiven Rotfärbung von fibrillären Kollagenen wie Kollagen I, III und V. Weiterhin kommt es zu einer Färbung von retikulären Fasern und von Bestandteilen der Basalmembran. Die Färbung erfolgte nach einem Protokoll von Junqueira et al. (42). 4 µm dicke Paraffinschnitte wurden zunächst durch Immersion in Xylol (Merck, Darmstadt, Deutschland) entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Anschließend wurden die Schnitte für 60 min in einer 0,1 %igen Sirius-Rot-Lösung [0,2 g Sirius-Rot (Merck, Darmstadt, Deutschland) in 200 ml gesättigter wässriger Pikrinsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland), pH 2] inkubiert. Nach einem kurzen Waschschrift in einer 0,01 M HCL (Merck, Darmstadt, Deutschland)-Ethanollösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und mit Eukitt

(Sigma-Aldrich, Hannover, Deutschland) eingedeckt. Die Analyse der gefärbten Schnitte erfolgte mit Hilfe eines Leica-DMLB-Mikroskops (Leica, Wetzlar, Deutschland).

## 2.8 Antikörperbasierte Färbemethoden

### 2.8.1 Pimonidazol-Färbung

Pimonidazol wird sowohl als Radio- und Chemosensitizer in der Onkologie als auch als Hypoxiemarker in der pathologischen Diagnostik und Forschung eingesetzt. Charakteristisches Merkmal dieser Substanz ist ihre Redoxsensitivität. Bei normalem  $pO_2$  liegt Pimonidazol in seiner oxidierten inaktiven Form vor (Abb. 4). Erst bei einem  $pO_2 < 10$  mm Hg wird Pimonidazol reduziert und damit aktiviert. Folge ist eine gesteigerte Affinität insbesondere zu Thiolgruppen, welche eine irreversible Bindung an Proteine zur Folge hat. Diese Pimonidazol-Protein-Komplexe sind immunogen und lassen sich durch Antikörper detektieren (Übersichtsarbeit 43).

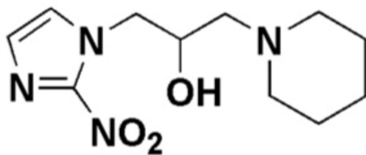


Abb. 4: Strukturformel von Pimonidazol (Grafik aus (43)).

In der Literatur finden sich sehr heterogene Angaben zu Ergebnissen der Pimonidazolfärbung in der Niere (44-49), daher wurde zunächst eine Optimierung des Protokolls durchgeführt. Als Basis wurde ein etabliertes Färbeprotokoll verwendet und in Vorexperimenten modifiziert (18). Pimonidazolbehandelte Mäuse wurden sowohl immersions- als auch perfusionsfixiert. Die Pimonidazolfärbung erfolgte in einem parallelen Ansatz mit Paraffin- und mit Kryostatschnitten. Außerdem wurden Dosis und Applikationszeit für Pimonidazol, Schnittdicke, Methoden zur Verbesserung der Antigen-Präsentation sowie Antikörperkonzentrationen und Inkubationszeiten variiert. Optimale Ergebnisse wurden erzielt mit Kryostatschnitten mit einer Schnittdicke von 12  $\mu$ m, einer Antikörperkonzentrationen von 1:100 für Primär- und Sekundärantikörper und mit Inkubationszeiten von 4 h für den Primär- und 1 h für den Sekundärantikörper. Alle weiteren Pimonidazolfärbungen wurden daraufhin mit diesen Parametern durchgeführt. Dazu wurden 12  $\mu$ m Kryostatschnitte im Kryostat angefertigt (LEICA CM3050 S), auf Objektträger übertragen und im Kühlschrank bei  $-24$  °C gelagert. Zur weiteren

Verarbeitung wurden die Schnitte zunächst aufgetaut und für 2 min in einer Pufferlösung bestehend aus *Tris-buffered saline* (TBS) (für 2l 10 x TBS-Puffer: 18 g Tris-Base (Merck, Darmstadt, Deutschland) + 138 g Tris-HCl (Merck, Darmstadt, Deutschland) + 176 g NaCl (Merck, Darmstadt, Deutschland), pH 7,4 - 7,6) und 0,1 % Tween 20 (Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland) gewaschen. Für alle weiteren Waschschrte sowie als Basis für die Antikörperlösungen wurde die gleiche Pufferlösung verwendet. Gewebeperoxidasen wurden durch eine 5 minütige Inkubation mit 3 %igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol (beides von Merck, Darmstadt, Deutschland) zerstört. Unspezifische Proteinbindungsstellen wurden mit 1 %iger Albuminlösung [(Albumin bovine Fraction V (Biomol, Hamburg, Deutschland) in TBS + Tween20] abgesättigt. Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper FITC-MAb1 (Chemicon International, Hofheim, Deutschland) für 4 h und dem Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase* = HRP)-konjugiertem Sekundärantikörper anti-FITC IgG (Chemicon International, Hofheim, Deutschland) für 1 h, jeweils in der Konzentration 1:100. Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten wurden die Schnitte jeweils gewaschen. Als letzter Schritt folgte die Inkubation mit einer Färbelösung bestehend aus 3,3-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB; Kem-En-Tec, Taastrup, Dänemark; 1 Tablette a 10 mg gelöst in 40 ml Aquadest und 40 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck, Darmstadt, Deutschland)). Die Peroxidase des Antikörpers reagiert mit dem Peroxid, DAB wird oxidiert und es entsteht ein dunkelbrauner, unlöslicher Niederschlag. Unter lichtmikroskopischer Kontrolle wurde bei optimaler Ausprägung des spezifischen Signals bei möglichst geringer Hintergrundfärbung abgestoppt. Schließlich wurden die Schnitte mit 50 %iger Glycerin (Roht, Karlsruhe, Deutschland)-PBS-Lösung (pH 8,6) bedeckt und mit einem Deckgläschen versiegelt. Die Auswertung erfolgte an einem Leica-DMRB-Mikroskop (Leica, Wetzlar, Deutschland).

### **2.8.2 Fluoreszenz**

Doppelmarkierungen mit Pimonidazol und NKCC2, AQP2 oder *Cyclooxygenase 2* (COX-2) dienten einer Objektivierung der Zuordnung einzelner Nephronabschnitte bzw. Zelltypen. Nach PBS-Waschung wurden unspezifische Bindungsstellen mit 1 %iger Albuminlösung für 30 min geblockt. Es folgte die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper (siehe Tabelle 1) über Nacht. Daraufhin wurden die Objektträger

gewaschen und mit dem Sekundärantikörper (siehe Tabelle 2) für 2 h inkubiert. Die Antikörper waren jeweils in 1 %igem Albumin/PBS gelöst. Nach erneutem Waschen wurden die Schnitte mit 50 %iger Glycerin-PBS-Lösung bedeckt und mit einem Deckgläschen versiegelt.

	<b>Gattung</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Quelle</b>
NKCC2	Meerschweinchen	1:500	Geschenk von D. Ellison, Portland, Oregon, USA
COX-2	Kaninchen	1:200	Cayman, Ann Arbor, Michigan, USA
AQP2	Ziege	1:100	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland

Tabelle 1: Primärantikörper für Fluoreszenzimmunhistochemie.

	<b>Verdünnung</b>	<b>Quelle</b>
Anti-Meerschweinchen Cy2	1:100	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
Anti-Kaninchen Cy3	1:250	
Anti-Ziege Cy 2	1:100	

Tabelle 2: Sekundärantikörper.

### 2.8.3 HIF-1 $\alpha$

Die HIF-1 $\alpha$  Markierung wurde nach einem etablierten Protokoll unter Anwendung des Amplifikationskits *Catalyzed Signal Amplification (CSA) System* (Dako, Katalognummer K1500) durchgeführt (50; 51).

## 2.9 In-situ-Hybridisierung für Kollagen 1

Die in-situ-Hybridisierung ist ein Verfahren zur Markierung spezifischer DNA- oder RNA-Abschnitte mittels komplementärer DNA- bzw. RNA-Stränge. Die Detektion spezifischer RNA-Abschnitte ermöglicht einen quantitativen Vergleich der Genexpression zum Zeitpunkt der Gewebefixierung und diese in Bezug auf die Lokalisierung zu differenzieren.

Zur Identifizierung Kollagen 1-exprimierender Zellen wurde zunächst eine Digoxigenin-markierte RNA-Sonde für Kollagen 1 hergestellt. Dazu wurde mittels spezifischer DNA *Primer* und *Polymerase chain reaction* (PCR) ein Fragment vom Kollagen der Ratte amplifiziert (entspricht Position 2256 bis 2468 der *full-length-cDNA* [NM\_053356]).

*Messenger RNA* (mRNA) wurde mit dem *Qiagen RNeasy Kit* (Qiagen, Hilden, Germany) aus einem Rattenschwanzhomogenat isoliert. Via reverser Transkription wurde daraus nach Anleitung des *Bioline cDNA Synthese Kit* (Bioline, Luckenwalde, Germany) cDNA synthetisiert. Diese wurde isoliert mit Hilfe eines DNA-Aufreinigungs-Kits (Macherey & Nagel, Düren, Deutschland). Zur Amplifizierung des gewünschten cDNA-Abschnitts mittels PCR wurden bereits publizierte *Primer* verwendet (*forward*: 5'-taaggagaaaaatggcatcg-3', *reverse*: 5'-ccttctttaccagcagcacc-3'). Zur Generierung der *Antisense*-Probe wurde an den *Reverse Primer* eine Promotorstelle für die T7-RNA-Polymerase angefügt (52). Die Spezifität der Sonde wurde bereits in der Originalpublikation nachgewiesen. Schließlich wurde das erzeugte PCR Produkt nach Anleitung des *DIG RNA Labeling Kit* (Roche, Mannheim, Deutschland) transkribiert und mit Digoxigenin markiert.

Nach Herstellung der Sonde erfolgt die Hybridisierung. Alle Lösungen wurden hierfür mit zweifach destilliertem, autoklaviertem Wasser angesetzt. Sofern nicht anders angegeben wurden alle Inkubationsschritte bei 4 °C durchgeführt. Alle Reaktionsgefäße wurden durch Backen bei 180°C für mindestens 6 hn sterilisiert. 4 % PFA (Merck, Darmstadt, Deutschland; pH 7,4) in MilliQ (Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland) wurde einen Tag vorher vorbereitet und kühlgestellt. 4 µm Paraffinschnitte wurden mittels Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (3 x 10 min Xylol, je 2 x 5 min 96 %, 80 % und 70 % Ethanol). Die rehydrierten Schnitte wurden dann für 20 min in PFA nachfixiert, anschließend in PBS (pH 7,4) gewaschen. Es folgten 20 min in 0,2 M HCl zur Denaturierung von Proteinen, die eine spezifische Bindung der Sonde behindern könnten. Die Schnitte wurden in PBS gewaschen und mit Proteinase K (Roche, Berlin, Deutschland)-PBS-Lösung (50 µl auf 100 ml PBS; 37 °C) für 30 min inkubiert. Nach erneuter Spülung in PBS wurden die Schnitte für 5 min in 4 % igem PFA nachfixiert, gewaschen und durch eine aufsteigende Alkoholreihe erneut dehydriert (70 %, 80 %, 96 % für je 5 min). Die Schnitte wurden 20 min bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden sie für 2 h mit 80 µl Prähybridmix pro Schnitt (64 µl Grundmix + 16 µl H<sub>2</sub>O) bei 40 °C inkubiert. Für 32 ml Grundmix wurden benötigt 16 ml 100 % deionisiertes Formamid (Sigma-Aldrich Chemie, Hamburg, Deutschland), 3,2 ml Milli Q-Wasser (Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland), 2,4 ml 5 M NaCl (Merck, Darmstadt, Deutschland), 0,8 ml 1M Tris-HCl

pH 7,4 (Merck, Darmstadt, Deutschland), 8,0 ml 50 % Dextransulfat (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland), 0,4 ml 0,5 M Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) pH 8,0 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland), 8 ml 50 x Denhardt's (Sigma-Aldrich Chemie, Hamburg, Deutschland), 0,4 ml 100 mg/ml Blockade tRNA (Roche, Penzberg, Deutschland). Nun folgte die Inkubation mit 40 µl Hybridmix pro Schnitt bei 40 °C für 18 h. Der Hybridmix setzte sich bei 40 µl pro Schnitt aus 32 µl Grundmix, 6µl destilliertem Wasser und 2 µl RNA Lösung in 50 % deionisiertem Formamid zusammen. Die Sonde wurde zur Linealisierung der RNA gekocht. Die optimale Konzentration und Inkubationstemperatur für die Sonde wurden dabei in Vorläuferexperimenten bestimmt. Die eingesetzte RNA Menge entsprach ca. 400 ng RNA/Schnitt.

Im letzten Schritt erfolgt die Detektion. Nach 18 h Hybridisierungszeit wurden die Objektträger zur Entfernung nicht hybridisierter RNA kurz in 50 % Formamid-haltiger Natriumzitratlösung (15 % Natriumzitat und 18 % NaCl in H<sub>2</sub>O; 40 °C) kurz geschwenkt und anschließend in reiner Natriumzitratlösung bei Raumtemperatur gewaschen. Alle weiteren Arbeitsschritte fanden bei Raumtemperatur statt, wenn nicht anders angegeben. Die Schnitte wurden für 10 min in Puffer 1 inkubiert (100 mMol Tris-HCl und 150 mMol NaCl in Wasser; pH 7,5). Es folgte die Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen mit Puffer 2 [1 % Blockingreagenz (Roche, Penzberg, Deutschland) und 0,5 % bovinem Serumalbumin in Puffer 1]. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht bei 4 °C mit 50 µl des gelösten Sekundärantikörpers (Anti-Digoxigenin-alkalische Phosphatase Konjugat 1:500 in Puffer 2) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte in Puffer 1 gewaschen um nicht gebundene Antikörper zu entfernen und für 2 min in Puffer 3 equilibriert (100 mM Tris-HCl, 100 mMol NaCl, 50 mMol MgCl<sub>2</sub> in Wasser, pH 9,5). Zur Erzeugung eines Farbsignals dienten 100 µl Entwicklungspuffer (Sigma Fast, Sigma-Aldrich Chemie, Hamburg, Deutschland) pro Schnitt. Um eine möglichst starke Ausprägung des spezifischen Signals bei möglichst geringer Hintergrundfärbung zu erzielen, wurde die Signalentwicklung unter dem Lichtmikroskop beobachtet und für alle Schnitte einheitlich nach 24 h abgestoppt. Dafür wurden die Schnitte 2 x 15 min in Puffer 4 (100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA in Wasser, pH 8,0) und anschließend für 2 x 15 min in PBS gestellt. Schließlich wurden die Schnitte mit 50% iger Glycerin-PBS-Lösung bedeckt und mit einem Deckgläschen versiegelt. Die Auswertung erfolgte mit einem Leica-DMRB-Mikroskop (Leica, Wetzlar,



Deutschland). Dabei wurde ein Interphasenkontrast verwendet. Fotos wurden mit einer SPOT3-Digitalkamera (Diagnostic Instruments, USA) aufgenommen und mit der Software MetaView 4.1 (Universal Imaging Corporation, West Chester, USA) verarbeitet.

## **2.10 Statistik**

Die Quantifizierung von immunhistochemischen Signalen wurde verblindet mittels semiquantitativem Punktesystem durchgeführt (53). Färbungen der inneren und äußeren Medulla wurden separat ausgewertet. Ein Score von 1 wurde vergeben, wenn eine Fläche von bis zu 15 % des Gesichtsfeldes ein Signal zeigte, ein Score von 2 für 15 bis 30 % und ein Score von 3 für mehr als 30 %. Lag kein Signal vor, wurde das Areal mit 0 bewertet. Basierend auf diesem Scoresystem wurden die Tiere in eine Rangfolge gebracht und die Rangsumme für Kontrollen und dDAVP-behandelte Tiere ermittelt. Statistische Analysen wurden unter Verwendung des Mann-Whitney U Tests durchgeführt. Ein  $P < 0,05$  wurde als statistisch signifikant betrachtet. Für die Evaluation der *Microarray*-Daten wurde der Hochberg-Multitest verwendet. In die Analyse einbezogen wurden Werte mit einer Induktion  $\geq 1,3$ . Als statistisch signifikant wurde ein  $P < 0,01$  gewertet. Zur Gegenüberstellung des Anteils induzierter HIF-Zielgene versus der zufälligen Verteilung induzierter Gene, wurde die statistische Signifikanz mittels Chi-Quadratstest überprüft.

## **2.11 Literaturrecherche**

Listen hypoxiesensitiver Genprodukte wurden aktuellen Reviews entnommen (40) und um eine PubMed/MEDLINE-gestützte Literaturrecherche ergänzt. Die Suchparameter wurden limitiert auf den Zeitraum 01/2006 bis 12/2011, die Sprachen Deutsch und Englisch sowie die Suchbegriffe „*hypoxia-inducible factor AND target gene expression*“. Potentielle Kandidaten wurden auf das Vorliegen von HRE in der Promotorsequenz mittels gezielter Literaturrecherche überprüft.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Etablierung der Pimonidazolfärbung

Pimonidazolfärbung ist eine häufig verwendete Methode zum Hypoxienachweis in situ. Die Anwendung von Pimonidazol in Nieren-bezogenen Fragestellungen führte zu widersprüchlichen Ergebnissen. Ursachen für diese widersprüchlichen Ergebnisse sind vermutlich Unterschiede in der Applikation der Substanz und in der Gewebeprozessierung. So zeigten Studien an immersionsfixiertem Material regelmäßig eine starke Färbung sowohl corticaler als auch medullärer Strukturen. Im Gegensatz dazu ließ sich an perfusionsfixiertem Gewebe keine oder nur eine schwache Färbung nachweisen. Ein erstes Ziel der hier vorliegenden Arbeit war daher die Etablierung eines optimierten Protokolls für die Pimonidazol-Färbung. Dazu sollte zunächst die Frage beantwortet werden, welchen Einfluss die Gewebefixierung auf das Färbeverhalten von Pimonidazol hat. In Zusammenschau der Ergebnisse zeigte sich eine deutliche Akkumulation von Pimonidazol unter Immersionsfixierung, die zu falsch positiven Signalen führt (Abb. 5). In den folgenden Experimenten gaben wir daher der Perfusionsfixierung den Vorzug.

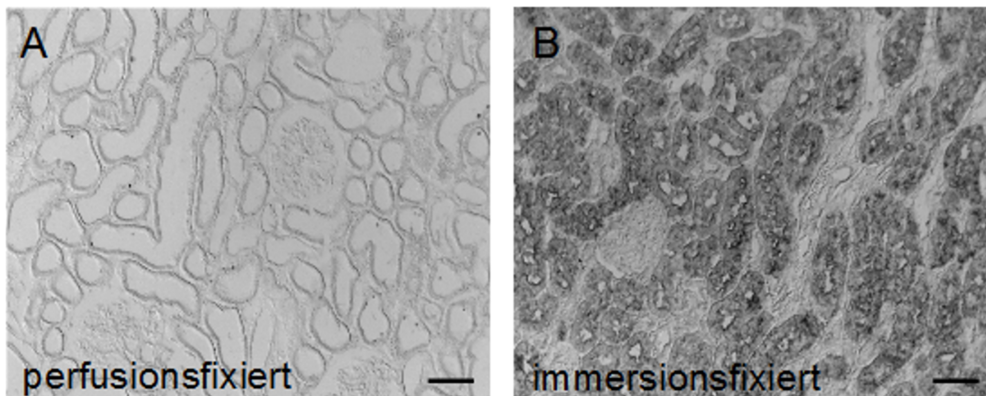


Abb. 5: Pimonidazolfärbung von perfusionsfixiertem (A) und immersionsfixiertem (B) Gewebe ansonsten gleich behandelter Mäuse. Während unter Perfusionsfixierung kein Signal zu erkennen ist, zeigt sich eine deutliche Pimonidazolakkumulation entlang der Tubuli in der Immersionsfixierung. Vergrößerung 200x. Balken 50 µm.

In weiteren Vorversuchen wurden außerdem Dosis und Applikationszeit für Pimonidazol, Schnittdicke, Methoden zur Verbesserung der Antigen-Präsentation sowie

Antikörperkonzentrationen und Inkubationszeiten optimiert. Optimale Ergebnisse konnten dabei unter Verwendung von 12 µm dicken Kryostatschnitten, Antikörperkonzentrationen von 1:100 für Primär- und Sekundärantikörper und Inkubationszeiten von 4 h für den Primär- und 1 h für den Sekundärantikörper erzielt werden.

### 3.2 Klinische Chemie

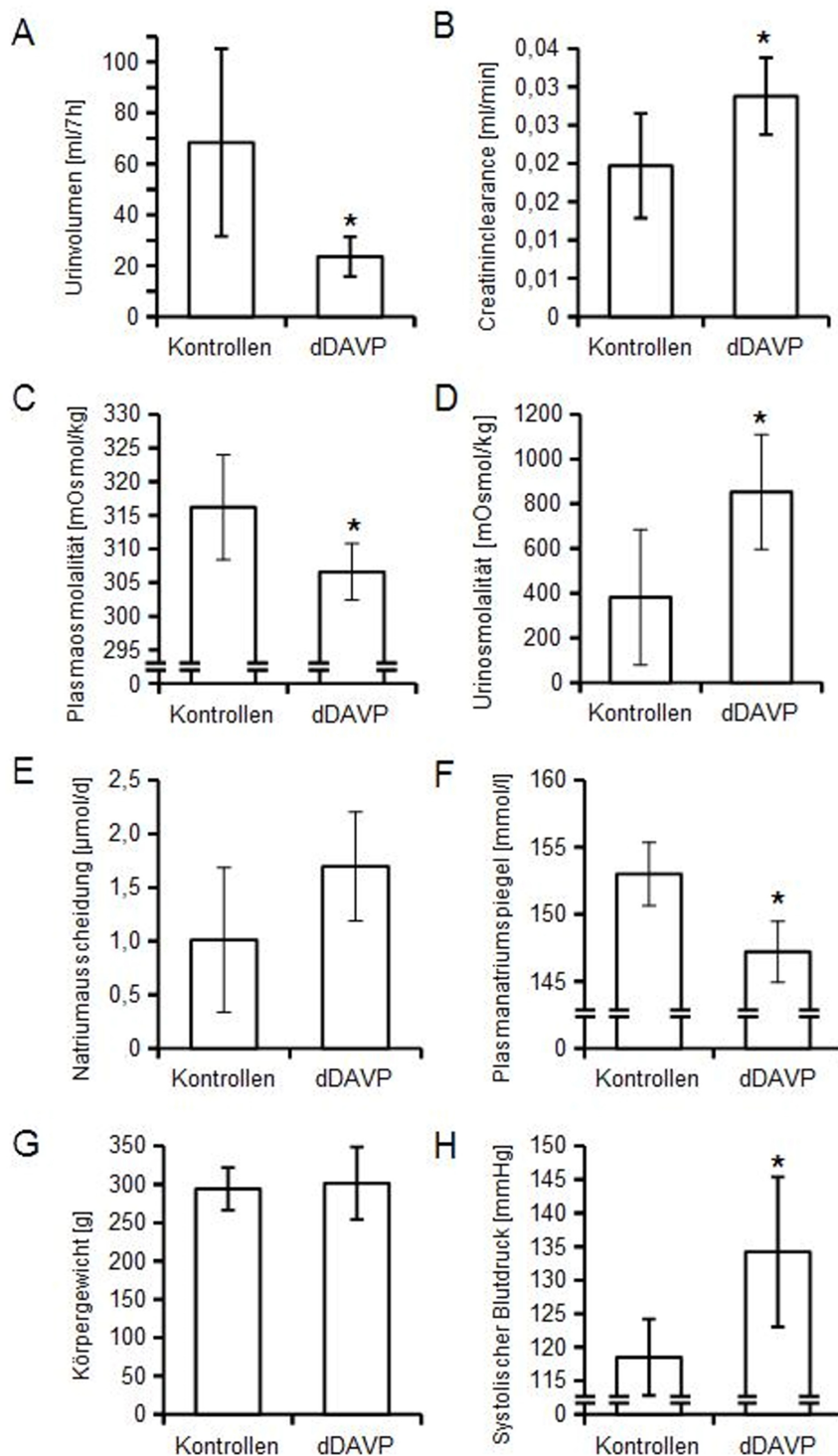


Abb. 6: Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung von Urinosmolalität (A), Plasmaosmolalität (B), Natriumausscheidung (C), Creatininclearance (D), Körpergewicht (E) und Plasmanatriumspiegel (F), Gewicht (G) und Blutdruck (H) von unbehandelten vs. mit dDAVP behandelten Brattleboro Ratten. „\*“ symbolisiert die statistische Signifikanz  $p < 0,05$  des Unterschiedes zwischen behandelten und unbehandelten Tieren.

Die Substitution von dDAVP für drei Tage führte zu einer Abnahme des Urinvolumens, des Natriumplasmaspiegels und der Plasmaosmolalität, während die Urinosmolalität und die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) anstiegen (Abb. 6, A-F). Wie zu erwarten war, führte dDAVP zu einer Verminderung der Plasmaosmolalität, da die induzierte Wasserretention die Natriumretention proportional überwiegt. Diese Befunde bestätigten die Effizienz der dDAVP-Behandlung zur Induktion der Harnkonzentrierung.

Beim absoluten Gewicht zeigte sich kein Gruppenunterschied. Betrachtet man nur die individuelle Gewichtsveränderung, kam es allerdings unter Substitution von dDAVP zu einer signifikanten Gewichtszunahme der behandelten Gruppe gegenüber der unbehandelten. Zusätzlich konnte bei den Ratten unter Gabe von dDAVP ein Blutdruckanstieg beobachtet werden (Abb. 6, G-H).

### 3.3 NKCC2 und AQP2

In der *TaqMan*-Analyse zeigte sich ein deutlicher Anstieg von NKCC2-mRNA unter dDAVP-Substitution (Abb. 7). Weiterhin konnte in unserer Arbeitsgruppe bereits früher gezeigt werden, dass es unter dem Einfluss von dDAVP zu einer Zunahme des phosphorylierten NKCC2 (pNKCC2) (8) sowie zu einem vermehrten Einbau von AQP2 unter dDAVP kommt (54).

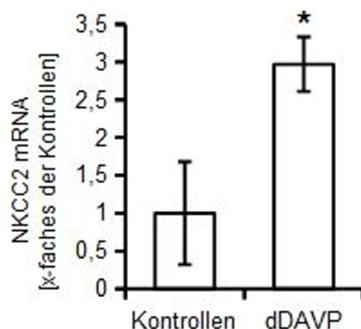


Abb. 7: Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung von NKCC2-mRNA in der *TaqMan*-Analyse von dDAVP-behandelten vs. unbehandelten Brattleboro Ratten.

Zusammengefasst bestätigen der Einbau von AQP2 in die luminale Zellmembran von Sammelrohrzellen, der Anstieg der mRNA und der Phosphorylierung von NKCC2 sowie die gesteigerte Harnkonzentrierung infolge einer dDAVP-Substitution den Erfolg des Tiermodells.

### 3.4 Pimonidazolfärbung

Die Analyse der renalen Pimonidazolakkumulation in Sprague Dawley Ratten zeigte eine signifikante Färbung im Innenstreifen der äußeren Medulla mit einer maximalen Signalintensität im initialen Teil des TAL in der Übergangszone zur inneren Medulla. Gefäßbündel, CD und die dünnen Tubulussegmente der Henle Schleife zeigten keine Färbung. Die dDAVP behandelten Tiere wiesen sowohl eine höhere Färbeintensität als auch eine größere Ausdehnung gefärbter Areale als die Kontrollen auf (Abb. 8: A,B). In der inneren Medulla von unbehandelten Sprague Dawley Ratten beschränkte sich die Färbung auf ein geringes Signal im Zentrum der Papille (Abb. 8: C). Im Gegensatz dazu, zeigte die innere Medulla von dDAVP behandelten Tieren eine homogene, intensive Färbung aller Strukturen im Zentrum der Papille, während in der Peripherie, angrenzend an das Nierenbecken, keine Pimonidazol-Immunreaktivität nachweisbar war (Abb. 8: D).

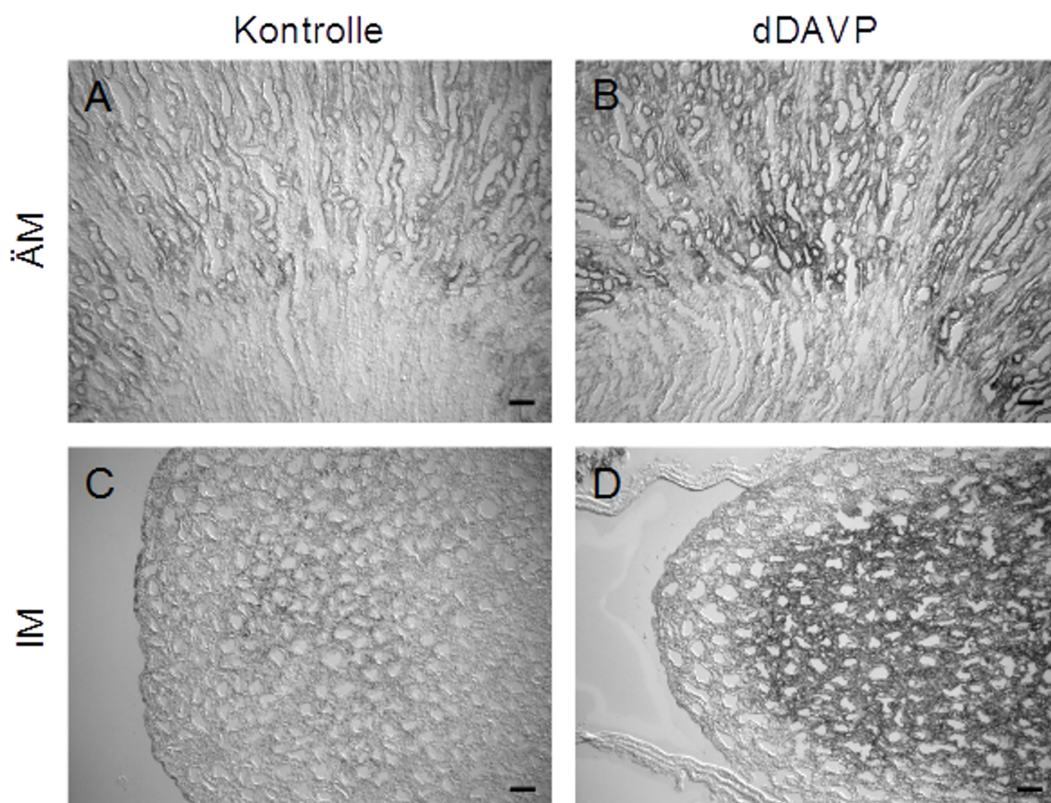


Abb. 8: Pimonidazolfärbung von unbehandelten (A,C) und dDAVP-behandelten (B,D) Sprague Dawley Ratten. Unter Gabe von dDAVP kommt es zu einer Akkumulation von immunreaktivem Pimonidazol in der äußeren (A,B) und inneren Medulla (C,D). „ÄM“ Äußere Medulla. „IM“ Innere Medulla. Größenbalken entsprechen 50  $\mu$ m.



Analysen von Pimonidazolfärbungen in Brattleboro Ratten zeigten eine ähnliche Verteilung mit einem weniger ausgeprägten Effekt von dDAVP (Abb. 9).

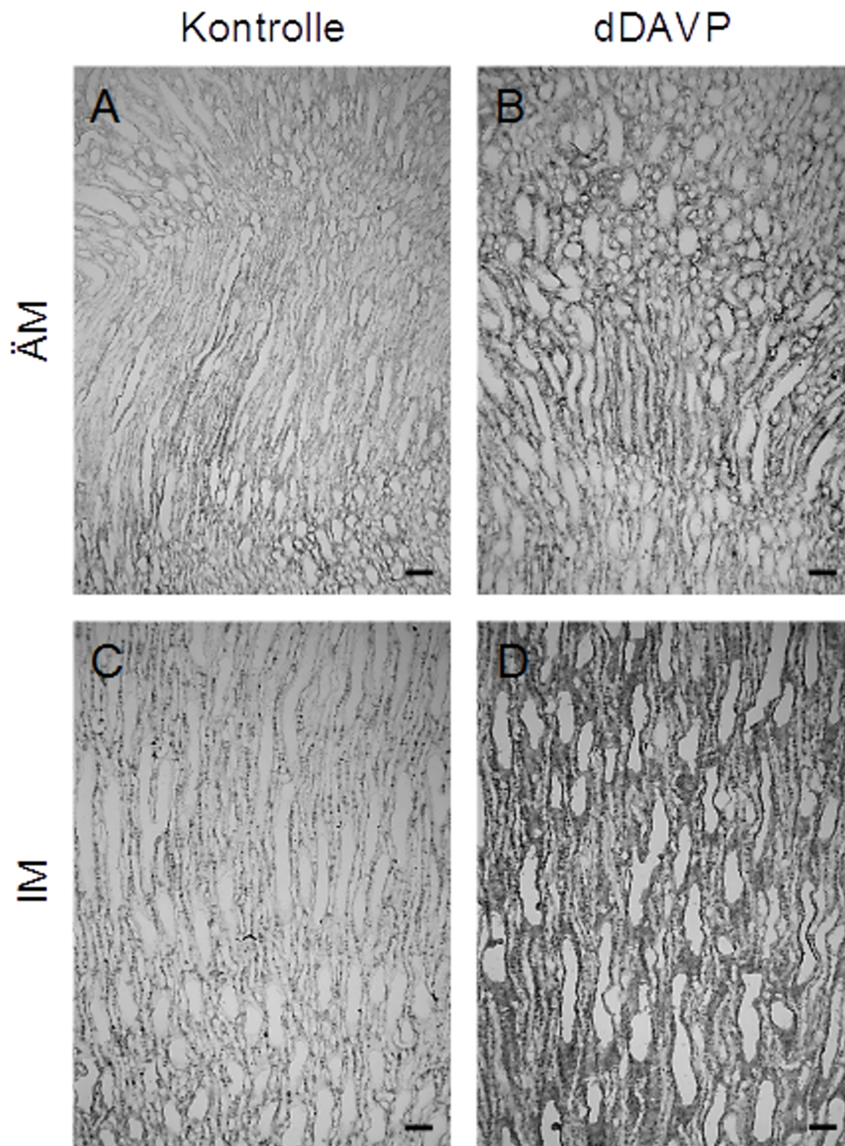


Abb. 9: Pimonidazolfärbung von unbehandelten (A,C) und dDAVP-behandelten (B,D) Brattleboro Ratten. Unter Gabe von dDAVP kommt es zu einer Akkumulation von immunreaktivem Pimonidazol in der äußeren Medulla (A,B) und inneren Medulla (C,D). „ÄM“ Äußere Medulla. „IM“ Innere Medulla. Größenbalken entsprechen 50  $\mu$ m.

Doppelmarkierungen mit Pimonidazol und Antikörpern gegen NKCC2 oder AQP2 bestätigten eine Akkumulation von Pimonidazol-Protein-Komplexen im TAL (Abb. 10) und im medullären CD (Abb. 11). Immunreaktive Pimonidazol-Protein-Komplexe verteilten sich homogen im Zytosol der entsprechenden Zielstrukturen. Zusätzlich zeigte sich unter Behandlung mit dDAVP eine vermehrte COX-2-Immunreaktivität in interstitiellen Zellen der inneren Medulla (Abb. 12).

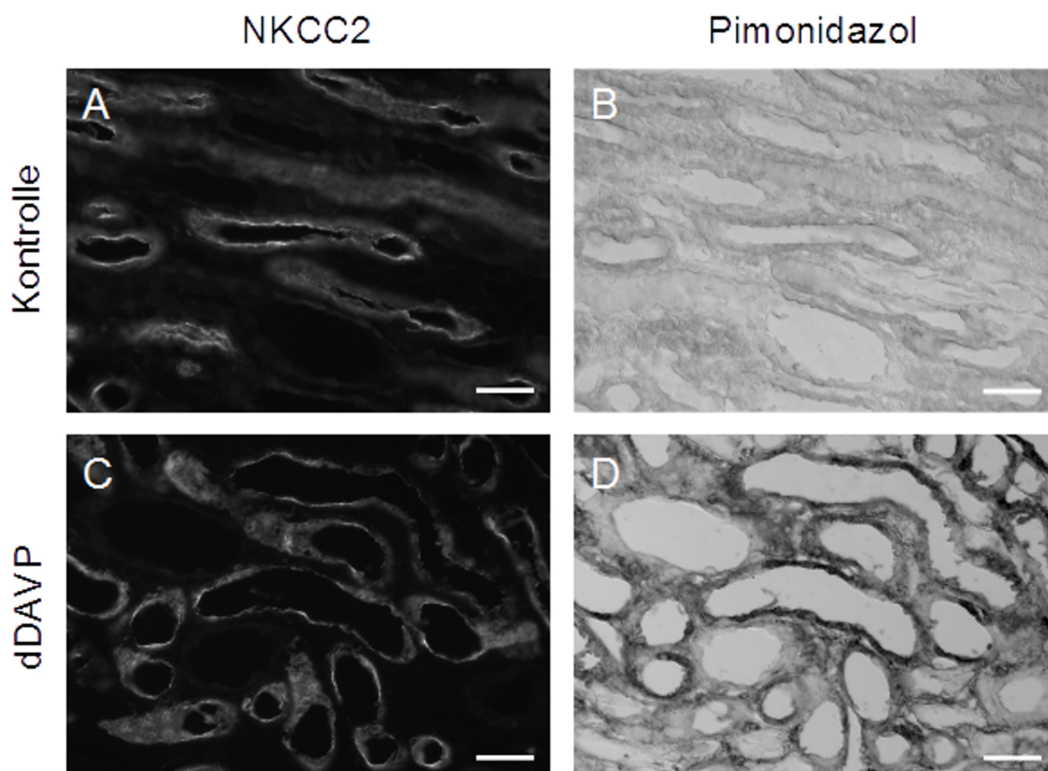


Abb. 10: Pimonidazolfärbung (B,D) und Immunfärbung für NKCC2 (A,C) von unbehandelten (A,B) und dDAVP-behandelten (C,D) Brattleboro Ratten. DDAVP führt zu einer verstärkten Akkumulation von Pimonidazol im TAL. Größenbalken entsprechen 50  $\mu\text{m}$ .

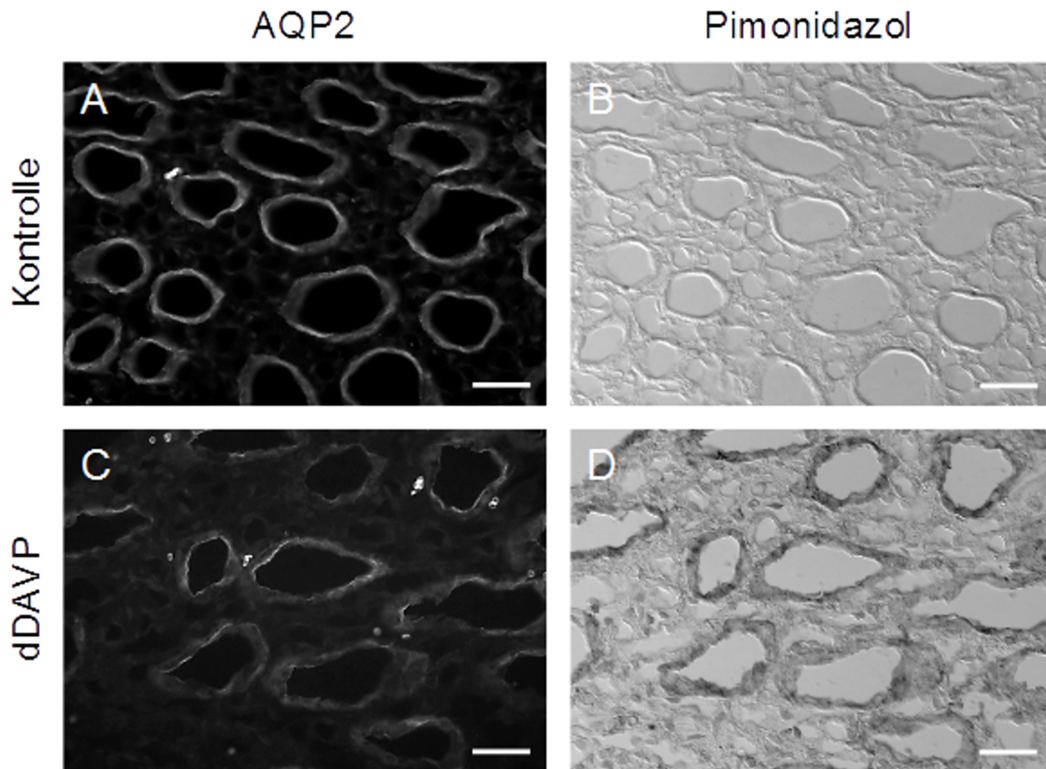


Abb. 11: Färbung für Pimonidazol (B,D) und AQP2 (A,C). Es zeigt sich eine Akkumulation von Pimonidazol im CD der inneren Medulla von dDAVP-behandelten Brattleboro Ratten (C,D) im Vergleich zu unbehandelten Tieren (A,B). Größenbalken entsprechen 50  $\mu$ m.

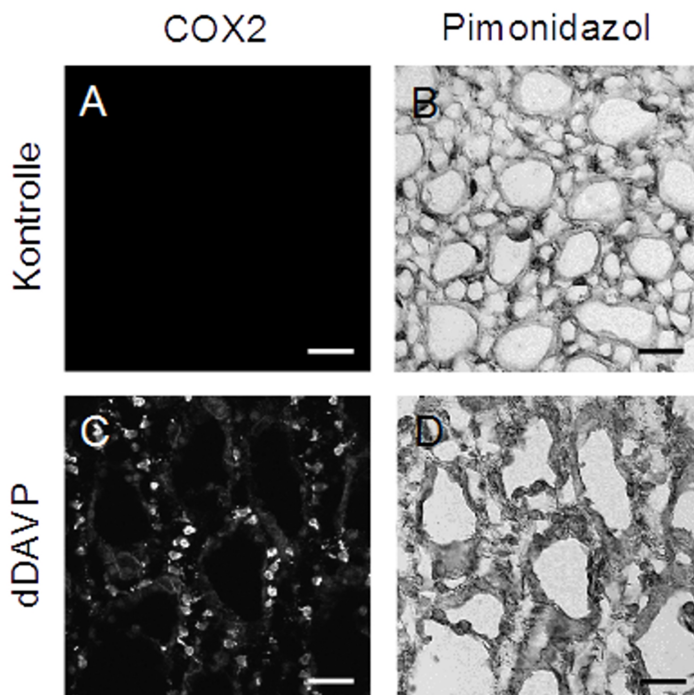


Abb. 12: Pimonidazolfärbung (B,D) und Immunfärbung für COX2 (A,C) bei unbehandelten (A,B) und dDAVP-behandelten (C,D) Brattleboro Ratten. Die Gabe von dDAVP führte zur Akkumulation von Pimonidazol in der inneren Medulla und erhöhter COX2-Immunreaktivität in interstitiellen Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren. Größenbalken entsprechen 50  $\mu$ m.



### 3.5 Immunhistochemie für HIF-1 $\alpha$

Wie erwartet, war HIF-1 $\alpha$  kaum in den Nieren von Vehikel-behandelten Brattleboro Ratten immunhistochemisch nachweisbar (Abb. 13A). Im Gegensatz dazu, war es in der Papille von dDAVP behandelten Tieren deutlich erkennbar (Abb. 13B). Bei starker Vergrößerung zeigte sich unter dDAVP-Behandlung eine HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation in Zellkernen im CD und Zellen der dünnen Tubulussegmente der Henle Schleife sowie in endothelialen und medullären interstitiellen Zellen (Abb. 13C und D). Die Verteilung HIF-immunreaktiver Strukturen in der inneren Medulla entsprach dabei weitgehend der Pimonidazolfärbung. Im Gegensatz dazu konnte in corticalen und medullären Teilen des TAL kein HIF-1 $\alpha$ -Signal nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

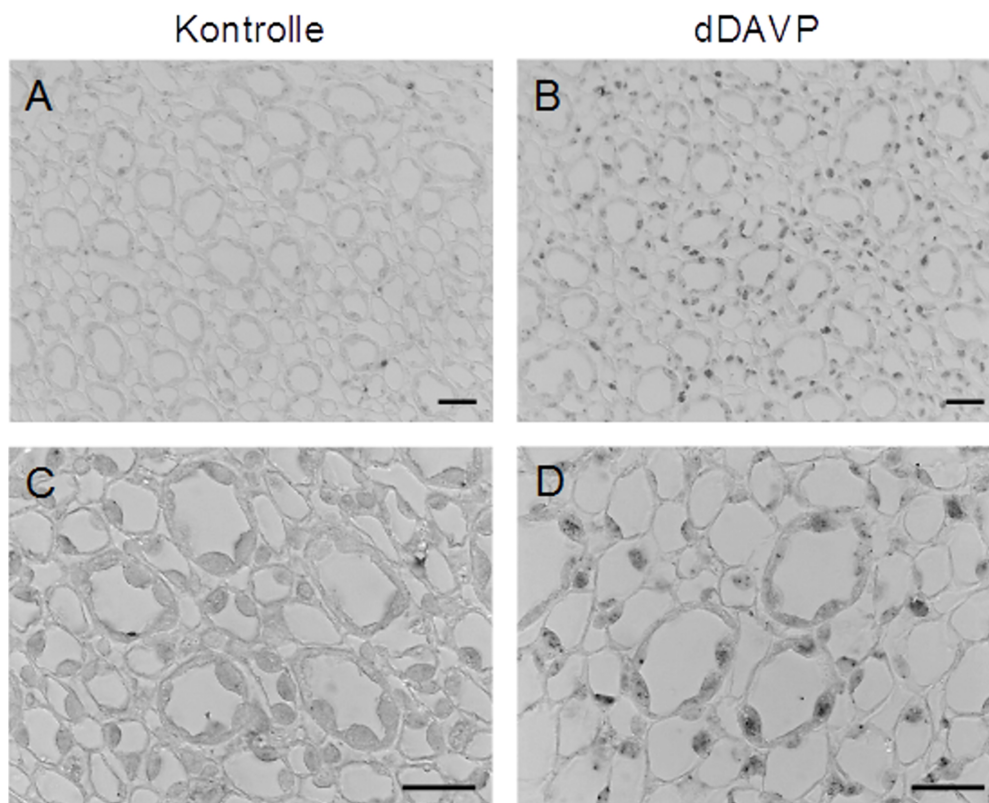


Abb. 13: HIF-1 $\alpha$ -Immunhistochemie. DDAVP führte zu einer Akkumulation von HIF-1 $\alpha$ -Protein in der inneren Medulla von Brattleboro Ratten (B,D) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (A,C). Die Detailaufnahmen zeigen eine Färbung der Nuklei von epithelialen und vaskulären als auch interstitiellen Zellen. Größenbalken entsprechen 50  $\mu$ m.

### 3.6 Die medulläre Genexpression

Der *Affymetrix Gene Chip® Rat Genome 230 2.0 Array* wurde zur Untersuchung von dDAVP-abhängigen Änderungen der Genexpression verwendet. Dafür wurde RNA der äußeren Medulla von dDAVP- und Vehikel-behandelten Brattleboro Ratten eingesetzt (34). Dieser *Array* enthält 16950 individuelle Genprodukte, wovon unter dDAVP-Gabe 75 (0.44 %) um mehr als das 2-Fache und 513 (3 %) um mehr als das 1,3-Fache erhöht waren.

Um die *Microarray*-Ergebnisse auf eine Anreicherung von HIF-Zielprodukten zu testen, wurde mittels Literaturrecherche eine umfangreiche Liste an bereits identifizierten HIF-Zielgenen erstellt. Von insgesamt 173 ermittelten Genprodukten wurden 109 im *Microarray* bestimmt (Tabelle 3). Von diesen 109 Produkten waren 21 (19 %) durch dDAVP-Behandlung signifikant induziert, während in Bezug auf die Normalverteilung aller vorhandenen Genprodukte des *Microarrays* lediglich 3 % zu erwarten gewesen wären. Die Anreicherung von HIF-Zielgenen in der Gruppe der dDAVP-regulierten Genprodukte wurde mittels Chi-Quadratstest als hoch signifikant ( $p = 2.6 \cdot 10^{-21}$ ) eingestuft. Die klassischen Vertreter *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) und Erythropoetin (EPO) waren allerdings nicht signifikant reguliert (Tabelle 4).

GO-Analysen zeigten eine signifikante Veränderung von Genprodukten aus den Bereichen der extrazellulären Matrixbildung, des *Insulin like growth factor*-Signalwegs, der Zellstressreaktion, des Zellwachstums und der Morphogenese (Tabelle 5). Mehrere dieser GO-Termini beinhalten auch HIF-Zielgene, aber bis jetzt existiert kein individueller GO-Terminus für *Hypoxia response* oder, noch spezifischer, für *HIF-target genes*.

Gene ID	Name	X fach der Kontrolle	P	Quelle
AA893484	Fibronectin 1	4,3	10 <sup>-14</sup>	(39)
AF202115	Ceruloplasmin	2,68	10 <sup>-17</sup>	(39)
BI275292	Angiopoietin 2	2,38	10 <sup>-16</sup>	(40)
NM_134334	Cathepsin D	2,33	10 <sup>-9</sup>	(39)
NM_013144	Insulin-like growth factor binding protein 1	2,21	10 <sup>-5</sup>	(39)
NM_017061	Lysyl oxidase	1,97	10 <sup>-19</sup>	(55)
AI013919	Cyclin dependent kinase inhibitor C	1,86	10 <sup>-6</sup>	(40)
U03389	Cyclooxygenase 2	1,7	10 <sup>-6</sup>	(40)
NM_134452	Procollagen, type V, alpha 1	1,65	10 <sup>-8</sup>	(39)
NM_031530	Monocyte chemoattractant protein-1	1,62	10 <sup>-7</sup>	(56)
NM_024388	Nuclear hormone receptor NUR/77	1,61	10 <sup>-3</sup>	(39)
BI282758	LDL-receptro-related protein 1	1,6	10 <sup>-14</sup>	(39)
NM_019386	Transglutaminase 2	1,55	10 <sup>-18</sup>	(39)
NM_019904	Galectin-1	1,54	10 <sup>-3</sup>	(57)
NM_012555	Erythroblastosis virus-transforming sequence	1,53	10 <sup>-14</sup>	(39)
AI713966	Insulin-like growth factor binding protein 3	1,51	10 <sup>-4</sup>	(39)
AI013470	Lysyl oxidase-like 2	1,48	10 <sup>-9</sup>	(55)
NM_031054	Matrix metallproteinase 2	1,4	10 <sup>-10</sup>	(39)
BM384099	N-myc downstream retulated gene 1	1,4	0,05	(58)
NM_017260	5-lipoxygenase activating protein	1,4	10 <sup>-9</sup>	(59)
BI294137	Hexokinase 2	1,38	10 <sup>-3</sup>	(39)
NM_031140	Vimentin	1,33	10 <sup>-5</sup>	(39)
AI103616	Ras-related C3 botulinum toxin substrat 1	1,23	0,14	(60)
BI274326	Mucin 1	1,22	0,09	(61)
U05989	Wilms'tumor suppressor-1	1,22	10 <sup>-5</sup>	(40)
BI296717	Zinc finger E-box-binding homeobox 2	1,21	0,16	(62)
AI029318	Hypoxia inducible factor 1	1,2	0,01	(63)
NM_053294	Adenosine A2a receptor	1,2	10 <sup>-9</sup>	(64)
NM_012580	Heme oxygenase	1,19	0,01	(39)
NM_080906	HIF-1 responsive protein RTP801	1,18	0,13	(39)
NM_133315	Ferroportin	1,15	0,27	(65)
BI279760	Phosphoglycerate kinase 1	1,12	0,09	(39)
NM_133409	Integrin linked kinase	1,11	10 <sup>-4</sup>	(66)
AA892254	Superoxide dismutase 2	1,11	0,05	(67)
NM_053653	Vascular endothelial growth factor C	1,11	0,1	(39)
AI177292	Integrin beta-2	1,11	0,06	(40)
NM_012715	Adrenomedullin	1,08	0,05	(39)
BI284218	Glucose transporter type 1	1,08	0,47	(39)
BE119649	Hepatocyte growth factor activator	1,06	0,1	(68)
NM_012548	Endothelin 1	1,06	0,06	(39)
M58040	Transferrin receptor	1,06	0,48	(39)
BF402869	Angiopoietin 1	1,05	0,13	(40)
NM_013124	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	1,05	0,4	(40)
NM_053595	Placental growth factor	1,05	0,46	(40)
AA848820	Human carbonyl reductase 1	1,04	0,79	(69)
U24174	Wild-type p53-activated fragment 1	1,04	0,14	(39)
NM_022266	Connective tissue growth factor	1,03	0,81	(40)
NM_013196	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha	1,03	0,35	(40)

Gene ID	Name	X fach der Kontrolle	P	Quelle
AI172079	Jumonji domain containing 1A	1,02	0,66	(70)
NM_052803	Menkes copper ATPase	1,02	0,8	(71)
AI408309	Cyclin G2	1,02	0,84	(39)
BI279646	Keratin 14	1,02	0,73	(39)
BI274746	Protein jagged 2	1,02	0,46	(72)
U36476	Matrix metalloproteinase 9	1,01	0,65	(73)
NM_031762	Cyclin dependent kinase inhibitor B	1,01	0,73	(40)
BF388057	Hairy/enhancer-of-split related with YRPW1 motif 2		1	(74)
L12562	Nitric oxide synthase 2	1	0,99	(39)
BF420349	Twist gene homolog 1	1	0,98	(75)
AB049572	Sphingosine kinase 1	1	0,95	(76)
NM_012589	Interleukin 6	1	0,99	(77)
AI230238	Procollagen, type X, alpha 1	0,99	0,7	(73)
NM_031511	Insulin-like growth factor 2	0,99	0,71	(39)
NM_013174	Transforming growth factor, beta 3	0,99	0,8	(39)
NM_013218	Adenylate kinase 3	0,99	0,91	(39)
NM_022230	Stanniocalcin 2	0,99	0,78	(40)
NM_031545	Brain-type natriuretic peptide	0,98	0,5	(78)
NM_133583	N-myc downstream regulated gene 2	0,98	0,81	(79)
NM_031797	Kangai 1	0,98	0,73	(80)
AI011836	Secretoglobin, family 3A, member 1	0,98	0,78	(81)
NM_017001	Erythropoietin	0,98	0,58	(39)
AI235414	Retinoic acid receptor-related orphan receptor $\alpha$	0,98	0,66	(40)
NM_133523	Matrix metalloproteinase 3	0,97	0,48	(73)
NM_016991	Adrenergic receptor, alpha 1b	0,97	0,41	(39)
AA858518	Sensitive to apoptosis gene	0,96	0,45	(82)
M60616	Matrix metalloproteinase 13	0,96	0,4	(73)
U04933	Sodium-calcium exchanger-1	0,96	0,18	(83)
BE107815	Hairy/enhancer-of-split related with YRPW0,95 motif 1		0,64	(74)
NM_013190	Phosphofructokinase L	0,95	0,46	(39)
NM_012497	Aldolase C	0,95	0,41	(40)
NM_019163	Presenilin 1	0,95	0,31	(40)
NM_031535	Bcl-2-like protein 1	0,94	0,25	(84)
NM_013173	Divalent metal transporter 1	0,94	0,29	(85)
NM_022528	Hypoxia inducible factor 3, alpha subunit	0,94	0,08	(86)
BM391835	Carbonic anhydrase 9	0,94	0,21	(39)
AF262319	Caspase 9	0,94	0,07	(40)
BF282125	Cockayne syndrome B	0,93	0,15	(87)
AA955211	Indian hedgehog homolog	0,93	0,21	(73)
BG670310	Transforming growth factor alpha	0,93	0,2	(39)
NM_138851	Endocrine-gland-derived VEGF	0,93	0,11	(39)
AI175616	ATP-binding cassette sub-family G member 2	0,92	0,34	(88)
U23443	p21-activated kinase-1	0,92	0,12	(60)
NM_013122	Insulin-like growth factor binding protein 2	0,92	0,36	(39)
AF080594	Vascular endothelial growth factor A	0,92	0,13	(39)
AB004454	Presenilin 2	0,92	0,04	(40)

Gene ID	Name	X fach der Kontrolle	P	Quelle
NM_013076	Leptin	0,9	0,05	(39)
D87247	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3	0,9	0,03	(39)
NM_017265	3beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1	0,9	10 <sup>-3</sup>	(89)
NM_019333	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4	0,88	10 <sup>-3</sup>	(90)
BG375952	Frataxin	0,87	0,08	(67)
NM_053524	NADPH oxidase 4	0,84	0,22	(91)
NM_031729	Protein phosphatase 5, catalytic subunit	0,83	10 <sup>-3</sup>	(92)
BI279605	Keratin 19	0,82	10 <sup>-3</sup>	(39)
NM_053698	Cbp/p300-interacting transactivator 2	0,82	10 <sup>-3</sup>	(39)
BE101119	Parathyroid hormone receptor 1	0,81	10 <sup>-3</sup>	(73)
NM_012827	Bone morphogenetic protein 4	0,8	10 <sup>-11</sup>	(93)
AF286167	Multidrug resistance 1	0,78	10 <sup>-3</sup>	(39)
AY057064	Liprin-α4	0,63	10 <sup>-4</sup>	(94)
M86708	Inhibitor of differentiation 1	0,58	10 <sup>-18</sup>	(95)

Tabelle 3: vollständige Liste von im *Microarray* vertretenen anhand einer Literaturrecherche ermittelten HIF-Zielgenen.

Gene ID	Name	X fach der Kontrolle	P	Quelle
AA893484	Fibronectin 1	4,3	10 <sup>-14</sup>	(39)
AF202115	Ceruloplasmin	2,68	10 <sup>-17</sup>	(39)
BI275292	Angiopoietin 2	2,38	10 <sup>-16</sup>	(40)
NM_134334	Cathepsin D	2,33	10 <sup>-9</sup>	(39)
NM_013144	Insulin-like growth factor binding protein 1	2,21	10 <sup>-5</sup>	(39)
NM_017061	Lysyl oxidase	1,97	10 <sup>-19</sup>	(55)
AI013919	Cyclin dependent kinase inhibitor C	1,86	10 <sup>-6</sup>	(40)
U03389	Cyclooxygenase 2	1,7	10 <sup>-6</sup>	(40)
NM_134452	Procollagen, type V, alpha 1	1,65	10 <sup>-8</sup>	(39)
NM_031530	Monocyte chemoattractant protein-1	1,62	10 <sup>-7</sup>	(56)
NM_024388	Nuclear hormone receptor NUR/77	1,61	10 <sup>-3</sup>	(39)
BI282758	LDL-receptro-related protein 1	1,6	10 <sup>-14</sup>	(39)
NM_019386	Transglutaminase 2	1,55	10 <sup>-18</sup>	(39)
NM_019904	Galectin-1	1,54	10 <sup>-3</sup>	(57)
NM_012555	Erythroblastosis virus-transforming sequence	1,53	10 <sup>-14</sup>	(39)
AI713966	Insulin-like growth factor binding protein 3	1,51	10 <sup>-4</sup>	(39)
AI013470	Lysyl oxidase-like 2	1,48	10 <sup>-9</sup>	(55)
NM_031054	Matrix metallproteinase 2	1,4	10 <sup>-10</sup>	(39)
BM384099	N-myc downstream retulated gene 1	1,4	0,05	(58)
NM_017260	5-lipoxygenase activating protein	1,4	10 <sup>-9</sup>	(59)
BI294137	Hexokinase 2	1,38	10 <sup>-3</sup>	(39)
NM_031140	Vimentin	1,33	10 <sup>-5</sup>	(39)

Tabelle 4: HIF-Zielgene mit signifikanter Induktion in *Microarray*-Analysen nach 3 tägiger Behandlung von Brattleboro Ratten mit 5 ng/h dDAVP.

GO-term	Name	False rate	P
5576	Extracellular region	8,4E-03	8,7E-07
5583	Fibrillar collagen	1,3E-02	2,0E-04
5518	Collagenbinding	2,3E-02	7,7E-04
7275	Development	1,2E-02	2,0E-04
6950	Response to stress	4,1E-02	2,5E-03
8361	Regulation of cell size	1,6E-02	3,6E-04
1558	Regulation of cell growth	4,1E-02	2,1E-03
902	Cellular morphogenesis	2,7E-00	1,3E-03
5520	Insulin-like growth factor binding	2,5E-02	7,7E-04

Tabelle 5: GO Analyse dDAVP-induzierter Genprodukte in Brattelboro Ratten nach 3-tägiger Behandlung mit 5 ng/h dDAVP.

### 3.7 Histomorphologischer Kollagennachweis

In der *Microarray*-Analyse zeigte sich eine vermehrte Expression von Bestandteilen der Extrazellulärmatrix. Daraus ergab sich die Frage, ob dies als Ausdruck einer Hypoxie-induzierten Fibrose zu werten sei. Zur weiteren Spezifizierung erfolgte zum Kollagennachweis eine Sirius-Rot-Färbung (Abb. 14). Deren Analyse zeigte in beiden Gruppen ein schwaches, filigranes Signal im peritubulären und periglomerulären Interstitium. Deutliche Kollagenablagerungen fanden sich in beiden Gruppen nur in unmittelbarer Nachbarschaft zu größeren arteriellen Gefäßen und in den Gefäßbündeln der äußeren Medulla. Dabei konnten keine Unterschiede zwischen den behandelten und den Kontrolltieren festgestellt werden. Diese Resultate schließen das Vorhandensein einer relevanten Fibrosierung des Nierenparenchyms weitgehend aus.

Zur exakten Lokalisation der Kollagenexpression erfolgte eine in-situ-Hybridisierung für Kollagen 1A1. Dabei zeigte sich nur im Nierenparenchym von dDAVP-behandelten Tieren ein Signal (Abb. 15). Betroffen waren perivaskuläre Fibroblasten in der Umgebung größerer arterieller Gefäße. Im Gegensatz dazu konnte keine Kollagenexpression im peritubulären Interstitium nachgewiesen werden. Größere Ansammlungen von Kollagen 1 mRNA-produzierenden Fibroblasten wurden im Nierenbecken beobachtet. Hier konnten keine behandlungs-bedingten Unterschiede festgestellt werden

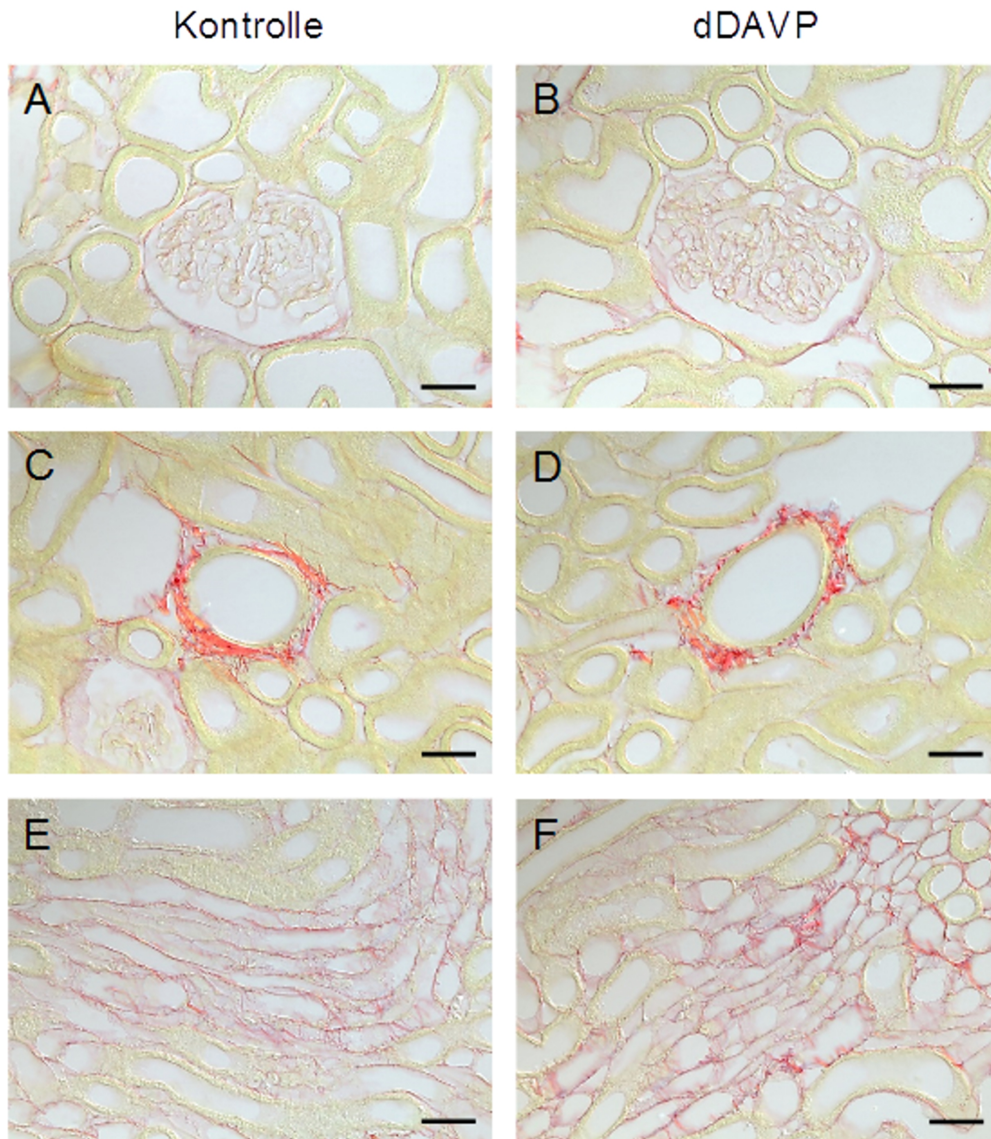


Abb. 14: Sirius-Rot-Färbung von unbehandelten (A,C,E) und dDAVP-behandelten Brattleboro Ratten (B,D,F). Fibrilläres Kollagen wird rot angefärbt. Im Cortex zeigte sich abgesehen von periglomerulären Kollagenablagerungen (A,B) nur ein schwaches Signal. Ein starkes Signal fand sich perivaskulär von arteriellen Gefäßen (C,D). In der äußeren Medulla zeigte sich das stärkste Signal in den Gefäßbündeln (E,F). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden. Größenbalken entsprechen 20  $\mu\text{m}$ .



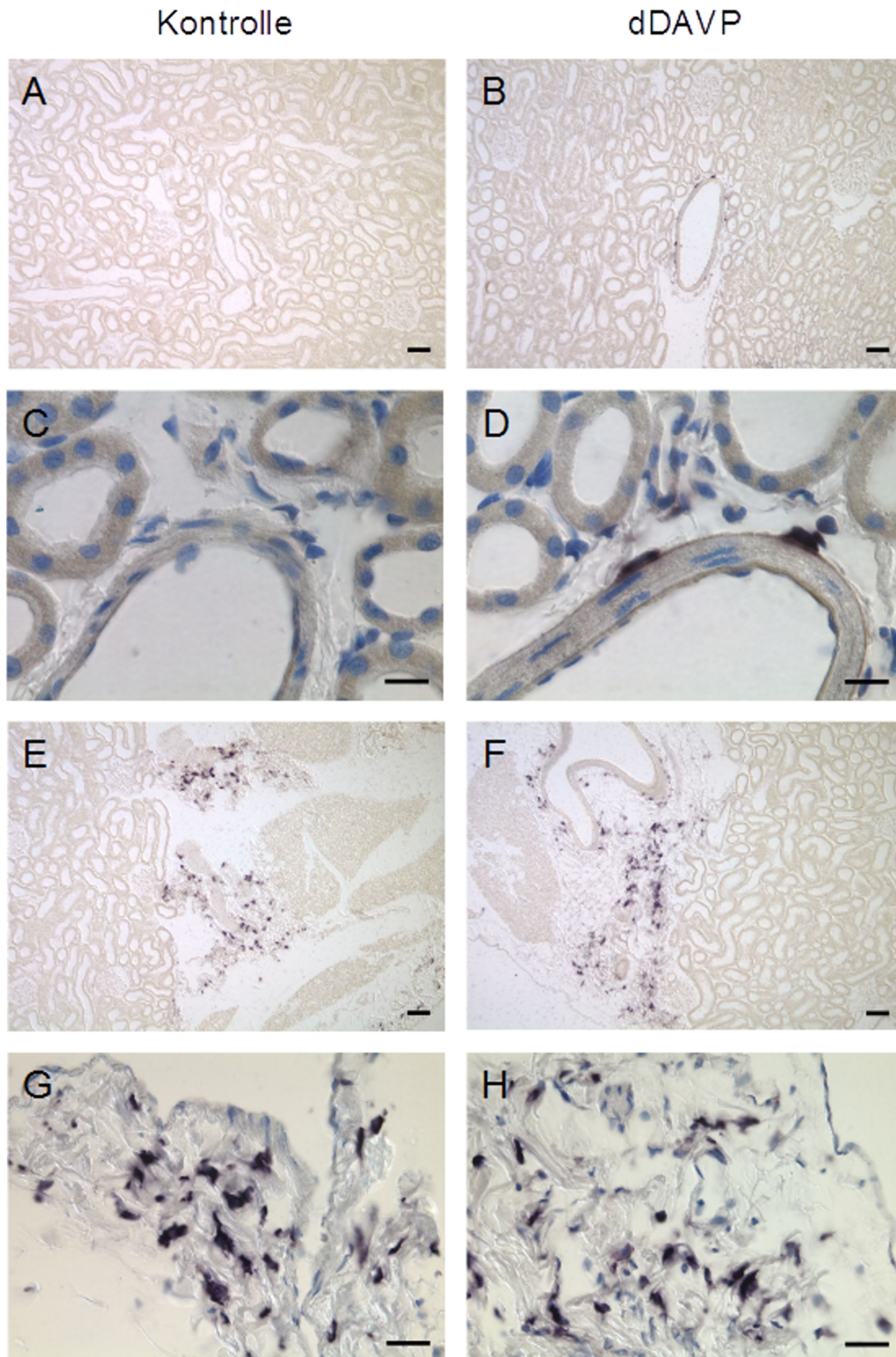


Abb. 15: Kollagen 1-in-situ-Hybridisierung von unbehandelten (A,C,E,G) und dDAVP-behandelten (B,D,F,H) Brattleboro Ratten. Nur dDAVP behandelte Tiere zeigten eine Kollagen 1 Expression im renalen Parenchym. Kollagen 1 mRNA fand sich in perivaskulären Fibroblasten großer arterieller Gefäße (B, D). In beiden Gruppen zeigten sich unabhängig von der dDAVP-Behandlung eine Kollagen 1 Expression im Bindegewebe entlang des Nierenhilus (E-H). Größenbalken entsprechen in A, B, E, F 50 µm und in C, D, G, H 20 µm.



## 4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der Auswirkungen einer chronischen, ADH-induzierten Aktivierung des Harnkonzentrierungsmechanismus auf die renale Oxygenierung und die Regulation Hypoxie-sensitiver Genprodukte. Es konnte gezeigt werden, dass die Substitution des ADH-V2-Rezeptor-Analogen dDAVP in Ratten bereits nach 3 Tagen zu einer ausgeprägten Hypoxie von Schlüsselstrukturen des Harnkonzentrierungsmechanismus führt und eine verstärkte Expression Hypoxie-induzierbarer Genprodukte auslöst.

Die renale Oxygenierung wurde ausführlich in früheren Studien untersucht. Durch Anwendung unterschiedlicher Techniken wie der Messung mit sauerstoffsensitiven Elektroden, *blood oxygen level dependent* Magnetresonanztomographie (BOLD-MR), Pimonidazolfärbungen oder anatomischen Studien wurde die renale Oxygenierung mit unterschiedlicher Sensitivität und räumlicher Auflösung erfasst (Übersicht in 18). Die Ergebnisse dieser Arbeiten zeigen einen ausgeprägten cortico-medullären Gradienten mit abfallendem  $pO_2$  in Richtung Medulla, sowie deutlich unterschiedlichen Sauerstoffpartialdrücken in dicht benachbarten Arealen (96-98). Anatomische Studien legen den Schluss nahe, dass insbesondere die Markstrahlen aufgrund der speziellen Gefäßarchitektur des Cortex im Vergleich zum umliegenden corticalen Labyrinth signifikant schlechter oxygeniert werden (Übersichtsarbeit 99). In der äußeren Medulla zeigt sich eine, mit zunehmender Distanz von den Gefäßbündeln abnehmende Oxygenierung. Alle bisherigen Untersuchungen weisen jedoch technisch bedingte Einschränkungen auf. So geben Elektrodenmessungen und BOLD-MR zwar einen guten Überblick über die Oxygenierungsverhältnisse im Gewebe, sind aber erheblich durch die geringe Auflösung auf zellulärer Ebene limitiert. Im Gegensatz dazu weist die Pimonidazolfärbung ein sehr gutes räumliches Auflösungsvermögen auf. Bei der Analyse gehen jedoch Areale mit einem Sauerstoffpartialdruck von über 10 mm Hg verloren (18). Hinzu kommt, dass für die Pimonidazolfärbung diverse unterschiedliche Protokolle mit heterogenen Ergebnissen angewendet wurden. Es steht also weiterhin keine Methode zur Verfügung, die in alleiniger Anwendung eine exakte quantitative und qualitative Beschreibung der tatsächlichen Gewebehypoxie zulässt. Weiterhin bleibt die

Frage nach der funktionellen Relevanz der gemessenen Sauerstoffpartialdrücke unbeantwortet.

Um diese Probleme zu umgehen wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene, sich ergänzende Methoden in parallelen Ansätzen kombiniert. Der Nachweis hypoxischer Areale erfolgte mittels Pimonidazolfärbung. Ausgehend von publizierten Methoden (18) wurden Gewebeprozessierung und Färbeprotokoll in Vorversuchen optimiert. Eine Gegenüberstellung von Immersions- und Perfusionsfixierung ergab deutliche Unterschiede im Verteilungsmuster des Signals. So zeigte sich in den immersionsfixierten Gewebeproben ein kräftiges, homogenes Signal in Tubulusepithelien aller Nierenzonen ohne Differenzierung zwischen Mark und Rinde. Im Gegensatz dazu wiesen die perfusionsfixierten Nierenproben von ansonsten identisch behandelten Mäusen nur eine schwache Färbung auf und reflektieren damit die Befunde aus Messungen mit sauerstoffsensitiven Elektroden (97) oder BOLD-MR (100) an gesunden Kontrolltieren. Es ist daher davon auszugehen, dass durch die Immersionsfixierung eine falsch-positive Färbung hervorgerufen wird. Ursache für dieses falsch-positive Signal ist vermutlich eine unspezifische Ablagerung von zirkulierendem Pimonidazol, welches während der Organentnahme im Gewebe verbleibt und bei der anschließenden Fixierung unabhängig vom Sauerstoffpartialdruck an Proteine gebunden wird. Alle weiteren Pimonidazol-Färbungen wurden daher an perfusionsfixierten Nierenproben durchgeführt.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Vorversuche konnte in den Nieren der Vehikel-behandelten Tiere nur in vereinzelt interstitiellen Zellen im Zentrum der Papille ein Pimonidazol-Signal nachgewiesen werden. Verteilungsmuster und Intensität des Signals in unbehandelten Sprague Dawley- und Brattleboro Ratten waren dabei vergleichbar. Die chronische Behandlung mit dDAVP führte dagegen sowohl in den Brattleboro Ratten als auch in Sprague Dawley Ratten zu einer intensiven Akkumulation von Pimonidazol im initialen Segment des TAL am Übergang zwischen innerer und äußerer Medulla. Gefäßbündel und Profile des CD waren negativ. Eine kräftige Färbung fand sich weiterhin im Zentrum der Papille der behandelten Tiere. Hier waren sowohl epitheliale als auch vaskuläre und interstitielle Strukturen in gleichem Ausmaß angefärbt. Die vergleichende Analyse der Färbeintensität beider Rattenstämme zeigte eine deutlich geringere Zunahme des Signals bei den dDAVP-behandelten Brattleboro

Ratten im Vergleich zu den Sprague Dawley Ratten. Dieser Befund ist vermutlich durch die Hypotrophie der äußeren Medulla von Brattleboro Ratten und der daraus resultierenden eingeschränkten maximalen Konzentrierungsfähigkeit zu erklären.

Die Ergebnisse der Pimonidazolfärbung decken sich gut mit bereits publizierten Daten. Manotham et al. beschrieben in scheinoperierten Kontrollratten eine Akkumulation von Pimonidazol in medullären Tubulusstrukturen, während im Cortex kein Signal nachweisbar war. 4-7 Tage nach 5/6-Nephrektomie kam es in dieser Studie zu einem vermehrten Signal im corticalen Tubulus (48). Auch Prasad et al. zeigten 2010 eine medulläre Pimonidazol-Akkumulation mit maximaler Ausprägung in der Außenzone und in der Papille (100). Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Akkumulation von Pimonidazoladdukten im initialen Segment des TAL kann leicht durch einen erhöhten Sauerstoffverbrauch in Folge dDAVP-stimulierter transzellulärer Ionentransporte erklärt werden. So konnte die Arbeitsgruppe von Prof. Bachmann in einer früheren Studie nach chronischer dDAVP-Stimulation eine gesteigerte Expression und Aktivität von NKCC2 und Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase im mTAL von Ratten nachweisen (8). Ecelbarger et al. zeigten sowohl im Durstversuch mit Sprague Dawley Ratten als auch unter dDAVP-Substitution bei Brattleboro Ratten einen Anstieg von NKCC2 in der äußeren Medulla (25). Molony et al. zeigten bereits 1987, dass ADH in isolierten TALs von Mäusen zu einem Anstieg der transepithelialen Leitfähigkeit führt (101). Eine Stimulation der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase konnte sowohl im Durstversuch mit Ratten (102) als auch in ADH-exponierten TAL-Zellen von Kaninchen (103) nachgewiesen werden. Die intensive Färbung von Strukturen im Zentrum der inneren Medulla der behandelten Tiere ist vermutlich Folge einer verminderten Durchblutung dieses Bereiches. Zusammenfassend unterstützt der Befund einer dDAVP-induzierten Pimonidazol-Akkumulation in wichtigen Schlüsselstrukturen der Harnkonzentrierung daher die Hypothese einer physiologischen, ADH-induzierten Hypoxie in der Niere.

Zur Bestätigung und zum Nachweis der funktionellen Relevanz dieses Befundes erfolgte im Anschluss eine immunhistochemische Darstellung des Transkriptionsfaktors HIF-1 $\alpha$ . Diese Versuche wurden nur in Brattleboro Ratten durchgeführt. Hier zeigte sich erwartungsgemäß in den Nieren von Vehikel-behandelten Tieren kein immunreaktives HIF-1 $\alpha$ -Protein. Im Gegensatz dazu zeigte die Untersuchung von dDAVP behandelten Tieren eine deutliche Färbung der Nuklei epithelialer, vaskulärer und interstitieller

Zellen. Dieser Befund rekapituliert weitgehend die Ergebnisse einer älteren Studie an dehydrierten Sprague Dawley Ratten (104) und unterstützt ebenfalls die Hypothese einer physiologischen medullären Hypoxie als Folge einer Aktivierung des Urinkonzentrationsmechanismus. Interessanterweise konnten weder im Durstversuch noch unter dDAVP-Behandlung eine HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation im TAL beobachtet werden. Verschiedene Daten deuten darauf hin, dass der TAL im Vergleich zum CD generell eine eingeschränkte Regulationskapazität der HIF-Aktivierung zeigt. Dies könnte eine Erklärung für die hohe Anfälligkeit des TAL gegenüber hypoxischer Schädigung sein (105-110).

Im nächsten Schritt wurde mittels *Microarray*-basierter Genexpressionsanalyse der Einfluss der dDAVP-Behandlung auf die medulläre Genexpression in Brattleboro Ratten untersucht. Hier zeigte sich eine signifikante Überrepräsentation bekannter HIF-Zielgene in der Gruppe der dDAVP-regulierten Genprodukte. Diese Gruppe beinhaltet neben Genen der Extrazellulärmatrix auch solche, die an der Regulation des *Insulin like growth factor*-Signalwegs und des Zellmetabolismus beteiligt sind. Weitere Studien werden benötigt um die Rolle dieser Produkte für die Funktionsfähigkeit des renalen Harnkonzentrationsmechanismus zu beleuchten.

Zu den klassischen Effekten der HIF-vermittelten Hypoxieantwort zählt auch die Induktion pro-angiogenetischer Zytokine wie VEGF und die daraus resultierende Bildung neuer Blutgefäße (111). Im *Microarray* zeigte sich allerdings in den dDAVP-behandelten Tieren keine Änderung der VEGF-mRNA trotz erhöhter HIF-1 $\alpha$ -Expression im CD als Hauptort der medullären VEGF-Synthese (112). Eine mögliche Erklärung für die Dissoziation von HIF-Aktivierung und VEGF-Synthese ergibt sich aus dem Umstand, dass die Genexpression von VEGF auch durch andere, z.T. inhibitorische Faktoren moduliert werden kann. Tatsächlich zeigen Analysen der *Microarray*-Ergebnisse einen starken Anstieg der mRNA für *Insulin-like growth factor binding protein* (IGFBP) 3, welches die Expression von VEGF in verschiedenen malignen und nicht-malignen Geweben hemmt (113-115). Auch die Expression anderer anti-angiogenetischer Faktoren wie Angiopoietin 2, IGFBP 5 und 6, Fibulin 1 und 5 und des Extrazellulärmatrixproteins Decorin waren signifikant erhöht (116-120). Quelle und Funktion der anti-angiogenetischen Signale in der renalen Medulla sind noch unbekannt. Vermutlich stellt jedoch die Hemmung der medullären Angiogenese

während der renalen Harnkonzentrierung einen wichtigen Mechanismus für die Aufrechterhaltung der Struktur der medullären Blutgefäße dar.

In der GO-Analyse zeigte sich eine signifikante Induktion von Genprodukten mit Bezug zu Entwicklungsprozessen, Zellwachstum und Morphogenese. Diese Befunde sind vermutlich Ausdruck von Wachstumsprozessen der äußeren Medulla als Reaktion auf die Stimulation mit dDAVP (30). Zusätzlich zeigte sich auch eine Überexpression von Genprodukten der extrazellulären Matrix als Folge der dDAVP-Behandlung. Signifikante Ansammlungen von fibrillärem Kollagen fanden sich in beiden Gruppen nur in unmittelbarer Nachbarschaft zu größeren arteriellen Gefäßen und in den Gefäßbündeln der äußeren Medulla. Ein behandlungsbedingter Unterschied bestand hier jedoch nicht. Im Gegensatz dazu zeigte die Kollagen 1A1-in-situ-Hybridisierung eine erheblich gesteigerte Anzahl Kollagen-exprimierender Fibroblasten im periarteriellen Bindegewebe der dDAVP-behandelten Brattleboro Ratten. Zusammen mit den gesteigerten Blutdruckwerten an Tag 3 weisen diese Resultate auf einen Umbauprozess der arteriellen Adventitia im Rahmen einer arteriellen Hypertonie hin. Dieser Befund ist gut mit den Daten anderer Arbeitsgruppen vereinbar. So konnten Skogstrand et al. im *Two-Kidney, one clip*-Rattenmodell der renalen Hypertonie zeigen, dass eine periarterielle Kollagenvermehrung der Entwicklung einer interstitiellen Fibrose vorausgeht (121). Blutdrucksteigernde Effekte von ADH können sowohl von V1- als auch von V2-Rezeptoren vermittelt werden (Übersichtsarbeit 122). Dabei ist zu berücksichtigen, dass dDAVP nicht vollständig spezifisch für den V2-Rezeptor ist und in hohen Konzentrationen auch V1-Rezeptoren aktivieren kann. Eine eindeutige Trennung zwischen V1- und V2-Effekten ist daher bei diesem Versuchsaufbau nicht möglich. Gegen eine Überdosierung von dDAVP spricht in diesem Zusammenhang allerdings der verzögerte Blutdruckanstieg und der Umstand, dass zu keinem Zeitpunkt eine Hyponatriämie als Ausdruck einer inadäquat hohen ADH-Wirkung vorlag (123-126). Blutdrucksteigernde Effekte können jedoch auch von V2-Rezeptoren ausgelöst werden (Übersichtsarbeit 122). So führt die Bindung von dDAVP an V2-Rezeptoren im CNT und CD zu einer Aktivierung von ENaC und damit zu einer Na<sup>+</sup>- und Volumenretention. Dies könnte eine Erklärung für den beobachteten Blutdruckanstieg und die Aktivierung adventitieller Fibroblasten im Verlauf der dDAVP-Behandlung darstellen.

Ein weiteres Ergebnis der *Microarray*-Analyse ist ein deutlicher Anstieg der mRNA für COX-2, welche als Hauptenzym für die medulläre Prostaglandinsynthese fungiert. Parallel dazu fand sich auch in der Immunhistochemie eine gesteigerte Anzahl COX-2-positiver interstitieller Zellen in der inneren Medulla der dDAVP-behandelten Tiere. Diese Daten bestätigen frühere Befunde in dehydrierten Sprague Dawley Ratten und in ADH-behandelten Brattleboro Ratten (28, 127). Da Prostaglandin E<sub>2</sub> die medulläre Perfusion erhöht und gleichzeitig die TAL-Transportaktivität hemmt, wird diese Reaktion als eine Art negativer *Feedback*-Mechanismus gewertet, welcher das Ziel hat, eine medulläre Ischämie zu verhindern. Dementsprechend können Beeinträchtigungen der Prostaglandinsynthese eine Nekrose medullärer Zellen verursachen (Übersichtsarbeit 128). Auf lokaler Ebene werden ADH-Effekte weiter moduliert u.a. durch die antagonistisch wirkenden freien Radikale, Stickstoffmonoxid und Superoxid. Ähnlich zum Prostaglandin E<sub>2</sub>, verursacht Stickstoffmonoxid eine Vasodilatation der absteigenden Vasa recta und erhöht dadurch die medulläre Perfusion (129). Zusätzlich hemmt es den NaCl-Transport im TAL (130). Es wurde gezeigt, dass medulläre Stickstoffmonoxid-Level bei ADH-Behandlung ansteigen (131; 132). Allerdings besteht über den zellulären Ursprung und den spezifischen ADH-Rezeptor dieser Regulation noch keine Einigkeit (130; 133-135). Dem Effekt von Stickstoffmonoxid wird durch *Reactive oxygen species* (ROS) entgegengewirkt. Diese beeinflussen entweder direkt die medullären Blutgefäße und den TAL oder reduzieren die Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid um eine Vasokonstriktion der absteigenden Vasa recta und einen Anstieg der TAL-Transportaktivität zu bewirken (130; 135). Die Hauptquelle für ROS in der Medulla ist der TAL, wo eine Abhängigkeit der ROS-Synthese von spezifischen Oxidasen und mitochondrialen Enzymen der Atmungskette nachgewiesen wurde (136; 137). Es wurde gezeigt, dass die ROS-Syntheserate mit der NaCl-Transportaktivität korreliert (137; 138). Die Aktivierung der TAL-Transportaktivität durch ADH erhöht somit wahrscheinlich auch die ROS-Synthese. Zusätzlich ist davon auszugehen, dass auch andere vasoaktive Mediatoren wie Angiotensin 2, Endothelin, ATP, Adenosin und Eicosanoide wie 20-Hydroxyeicosatetraensäure (20-HETE) und Epoxyeicosatetraensäure (EETs) an der ADH-Singalkaskade in der renalen Medulla beteiligt sind (139-148).

In Zusammenschau der bisher präsentierten Resultate entsteht damit das Bild eines komplexen Netzwerks aus endo-, auto- und parakrinen Signalwegen, die an der

Regulation der Harnkonzentrierung beteiligt sind. Die Vielzahl der regulierten Produkte bekräftigt dabei die herausragende Bedeutung von ADH als zentralem Steuermechanismus für diesen Prozess. Weitere Studien sind hier notwendig, um die Funktion und Interaktion der einzelnen Signalwege zu charakterisieren.

Bei der Interpretation der vorliegenden Ergebnisse sind wichtige Limitationen zu berücksichtigen. So wurden die Daten an Ratten erhoben und können daher nicht ohne weiteres auf die Situation im Menschen übertragen werden. Weiterhin unterliegt der ADH-Spiegel in vivo ständigen, bedarfsorientierten Schwankungen. Im Gegensatz dazu wird durch den Einsatz der Minipumpe ein konstant hoher Plasmaspiegel erzeugt (Übersichtsarbeit 149). Charakteristisch für den vorliegenden Versuchsaufbau ist daher ein permanent erhöhter ADH-Tonus wie er zum Beispiel bei Afroamerikanern auftritt. Auch dieser Umstand kann die Translation der Studienergebnisse in das *Setting* von Patienten mit kaukasischer Abstammung erschweren.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die ADH-induzierte Aktivierung des Harnkonzentrierungsmechanismus zu einer ausgeprägten Hypoxie medullärer Strukturen mit Akkumulation von HIF-Transkriptionsfaktoren und einer vermehrten Expression Hypoxie-induzierbarer Genprodukte führt. Basierend auf diesen Ergebnissen kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die reduzierte Sauerstoffverfügbarkeit bei gleichzeitig stimulierter Transportleistung zu einer verminderten Stressresistenz des Nierengewebes führt. Eine Aktivierung des Harnkonzentrierungsmechanismus würde damit einen wichtigen Risikofaktor für die Entwicklung von Nierenschäden darstellen. Weitere Studien sind notwendig um dieses Konzept zu überprüfen.

## 5. Literaturverzeichnis

1. Bardoux P, Martin H, Ahloulay M, Schmitt F, Bouby N, et al. 1999. Vasopressin contributes to hyperfiltration, albuminuria, and renal hypertrophy in diabetes mellitus: study in vasopressin-deficient Brattleboro rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:10397-402
2. Persson PB, Hansell P, Liss P. 2005. Pathophysiology of contrast medium-induced nephropathy. *Kidney international* 68:14-22
3. Perico N, Zoja C, Corna D, Rottoli D, Gaspari F, et al. 2009. V1/V2 Vasopressin receptor antagonism potentiates the renoprotection of renin-angiotensin system inhibition in rats with renal mass reduction. *Kidney international* 76:960-7
4. Schrier RW, Masoumi A, Elhassan E. 2009. Role of vasopressin and vasopressin receptor antagonists in type I cardiorenal syndrome. *Blood purification* 27:28-32
5. Ball SG. 2007. Vasopressin and disorders of water balance: the physiology and pathophysiology of vasopressin. *Annals of clinical biochemistry* 44:417-31
6. Ellison DH, Berl T. 2007. Clinical practice. The syndrome of inappropriate antidiuresis. *The New England journal of medicine* 356:2064-72
7. Verbalis JG. 2007. How does the brain sense osmolality? *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 18:3056-9
8. Mutig K, Paliege A, Kahl T, Jons T, Muller-Esterl W, Bachmann S. 2007. Vasopressin V2 receptor expression along rat, mouse, and human renal epithelia with focus on TAL. *American journal of physiology. Renal physiology* 293:F1166-77
9. Benninghoff A, Drenckhahn D. *Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie, Bd. 1*. Hg. von Drenckhahn, 17. Auflage, München, Deutschland: Urban & Fischer bei Elsevier, 2008
10. Fenton RA, Knepper MA. 2007. Mouse models and the urinary concentrating mechanism in the new millennium. *Physiological reviews* 87:1083-112
11. Welch WJ, Baumgartl H, Lubbers D, Wilcox CS. 2001. Nephron pO<sub>2</sub> and renal oxygen usage in the hypertensive rat kidney. *Kidney international* 59:230-7
12. Frank M, Kriz W. 1988. The luminal aspect of intrarenal arteries and veins in the rat as revealed by scanning electron microscopy. *Anatomy and embryology* 177:371-6



13. Evans RG, Goddard D, Eppel GA, O'Connor PM. 2011. Factors that render the kidney susceptible to tissue hypoxia in hypoxemia. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 300:R931-40
14. Thureau K, Deetjen P, Kramer K. 1960. [Hemodynamics of kidney medullary substance. Part II. Interrelationships between the vascular and tubular counter-flow system in arterial pressure increases, water diuresis and osmotic diuresis]. *Pflugers Archiv fur die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere* 270:270-85
15. Zimmerhackl B, Robertson CR, Jamison RL. 1985. Effect of arginine vasopressin on renal medullary blood flow. A videomicroscopic study in the rat. *The Journal of clinical investigation* 76:770-8
16. Kiberd B, Robertson CR, Larson T, Jamison RL. 1987. Effect of V2-receptor-mediated changes on inner medullary blood flow induced by AVP. *The American journal of physiology* 253:F576-81
17. Harrison-Bernard LM, Carmines PK. 1994. Juxtamedullary microvascular responses to arginine vasopressin in rat kidney. *The American journal of physiology* 267:F249-56
18. Rosenberger C, Rosen S, Paliege A, Heyman SN. 2009. Pimonidazole adduct immunohistochemistry in the rat kidney: detection of tissue hypoxia. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 466:161-74
19. Rolfe DF, Brown GC. 1997. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiological reviews* 77:731-58
20. Brezis M, Agmon Y, Epstein FH. 1994. Determinants of intrarenal oxygenation. I. Effects of diuretics. *The American journal of physiology* 267:F1059-62
21. Hoffert JD, Fenton RA, Moeller HB, Simons B, Tchapyjnikov D, et al. 2008. Vasopressin-stimulated increase in phosphorylation at Ser269 potentiates plasma membrane retention of aquaporin-2. *The Journal of biological chemistry* 283:24617-27
22. Welker P, Bohlick A, Mutig K, Salanova M, Kahl T, et al. 2008. Renal Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter activity and vasopressin-induced trafficking are lipid raft-dependent. *American journal of physiology. Renal physiology* 295:F789-802
23. Blanchard A, Frank M, Wuerzner G, Peyrard S, Bankir L, et al. 2011.

- Antinatriuretic effect of vasopressin in humans is amiloride sensitive, thus ENaC dependent. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 6:753-9
24. Fenton RA. 2009. Essential role of vasopressin-regulated urea transport processes in the mammalian kidney. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 458:169-77
  25. Ecelbarger CA, Kim GH, Wade JB, Knepper MA. 2001. Regulation of the abundance of renal sodium transporters and channels by vasopressin. *Experimental neurology* 171:227-34
  26. Hasler U, Mordasini D, Bens M, Bianchi M, Cluzeaud F, et al. 2002. Long term regulation of aquaporin-2 expression in vasopressin-responsive renal collecting duct principal cells. *The Journal of biological chemistry* 277:10379-86
  27. Burger-Kentischer A, Muller E, Marz J, Fraek ML, Thureau K, Beck FX. 1999. Hypertonicity-induced accumulation of organic osmolytes in papillary interstitial cells. *Kidney international* 55:1417-25
  28. Yang T, Schnermann JB, Briggs JP. 1999. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in renal medulla by tonicity in vivo and in vitro. *The American journal of physiology* 277:F1-9
  29. Moeckel GW, Zhang L, Fogo AB, Hao CM, Pozzi A, Breyer MD. 2003. COX2 activity promotes organic osmolyte accumulation and adaptation of renal medullary interstitial cells to hypertonic stress. *The Journal of biological chemistry* 278:19352-7
  30. Bouby N, Bankir L, Trinh-Trang-Tan MM, Minuth WW, Kriz W. 1985. Selective ADH-induced hypertrophy of the medullary thick ascending limb in Brattleboro rats. *Kidney international* 28:456-66
  31. Trinh-Trang-Tan MM, Bankir L, Doucet A, el Mernissi G, Imbert-Teboul M, et al. 1985. Influence of chronic ADH treatment on adenylate cyclase and ATPase activity in distal nephron segments of diabetes insipidus Brattleboro rats. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 405:216-22
  32. Mole DR, Ratcliffe PJ. 2008. Cellular oxygen sensing in health and disease. *Pediatr Nephrol* 23:681-94
  33. Valtin H, Schroeder HA. 1964. FAMILIAL HYPOTHALAMIC DIABETES

- INSIPIDUS IN RATS (BRATTLEBORO STRAIN). *The American journal of physiology* 206:425-30
34. Paliege A, Roeschel T, Neymeyer H, Seidel S, Kahl T, et al. 2012. Group VIA phospholipase A2 is a target for vasopressin signaling in the thick ascending limb. *American journal of physiology. Renal physiology* 302:F865-74
  35. van Balkom BW, Hoffert JD, Chou CL, Knepper MA. 2004. Proteomic analysis of long-term vasopressin action in the inner medullary collecting duct of the Brattleboro rat. *American journal of physiology. Renal physiology* 286:F216-24
  36. Paliege A, Pasumarthy A, Mizel D, Yang T, Schnermann J, Bachmann S. 2006. Effect of apocynin treatment on renal expression of COX-2, NOS1, and renin in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 290:R694-700
  37. Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-8
  38. Bluthgen N, Brand K, Cajavec B, Swat M, Herzel H, Beule D. 2005. Biological profiling of gene groups utilizing Gene Ontology. *Genome informatics. International Conference on Genome Informatics* 16:106-15
  39. Semenza GL. 2003. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature reviews. Cancer* 3:721-32
  40. Rosenberger C, Rosen S, Heyman SN. 2005. Current understanding of HIF in renal disease. *Kidney & blood pressure research* 28:325-40
  41. Malkusch W, Rehn B, Bruch J. 1995. Advantages of Sirius Red staining for quantitative morphometric collagen measurements in lungs. *Experimental lung research* 21:67-77
  42. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. 1979. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *The Histochemical journal* 11:447-55
  43. Kizaka-Kondoh S, Konse-Nagasawa H. 2009. Significance of nitroimidazole compounds and hypoxia-inducible factor-1 for imaging tumor hypoxia. *Cancer science* 100:1366-73
  44. Gross MW, Karbach U, Groebe K, Franko AJ, Mueller-Klieser W. 1995.

- Calibration of misonidazole labeling by simultaneous measurement of oxygen tension and labeling density in multicellular spheroids. *International journal of cancer. Journal internationale du cancer* 61:567-73
45. Rosenberger C, Goldfarb M, Shina A, Bachmann S, Frei U, et al. 2008. Evidence for sustained renal hypoxia and transient hypoxia adaptation in experimental rhabdomyolysis-induced acute kidney injury. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 23:1135-43
  46. Basile DP, Donohoe DL, Roethe K, Mattson DL. 2003. Chronic renal hypoxia after acute ischemic injury: effects of L-arginine on hypoxia and secondary damage. *American journal of physiology. Renal physiology* 284:F338-48
  47. Zhong Z, Arteel GE, Connor HD, Yin M, Frankenberg MV, et al. 1998. Cyclosporin A increases hypoxia and free radical production in rat kidneys: prevention by dietary glycine. *The American journal of physiology* 275:F595-604
  48. Manotham K, Tanaka T, Matsumoto M, Ohse T, Miyata T, et al. 2004. Evidence of tubular hypoxia in the early phase in the remnant kidney model. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 15:1277-88
  49. Matsumoto M, Tanaka T, Yamamoto T, Noiri E, Miyata T, et al. 2004. Hypoperfusion of peritubular capillaries induces chronic hypoxia before progression of tubulointerstitial injury in a progressive model of rat glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 15:1574-81
  50. Rosenberger C, Griethe W, Gruber G, Wiesener M, Frei U, et al. 2003. Cellular responses to hypoxia after renal segmental infarction. *Kidney international* 64:874-86
  51. Paliege A, Rosenberger C, Bondke A, Sciesielski L, Shina A, et al. 2010. Hypoxia-inducible factor-2alpha-expressing interstitial fibroblasts are the only renal cells that express erythropoietin under hypoxia-inducible factor stabilization. *Kidney international* 77:312-8
  52. Hirose T, Nakazato K, Song H, Ishii N. 2008. TGF-beta1 and TNF-alpha are involved in the transcription of type I collagen alpha2 gene in soleus muscle atrophied by mechanical unloading. *J Appl Physiol (1985)* 104:170-7

53. Raleigh JA, Chou SC, Bono EL, Thrall DE, Varia MA. 2001. Semiquantitative immunohistochemical analysis for hypoxia in human tumors. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 49:569-74
54. Dathe C, Daigeler AL, Seifert W, Jankowski V, Mrowka R, et al. 2014. Annexin A2 mediates apical trafficking of renal Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter. *The Journal of biological chemistry* 289:9983-97
55. Schietke R, Warnecke C, Wacker I, Schodel J, Mole DR, et al. 2010. The lysyl oxidases LOX and LOXL2 are necessary and sufficient to repress E-cadherin in hypoxia: insights into cellular transformation processes mediated by HIF-1. *The Journal of biological chemistry* 285:6658-69
56. Mojsilovic-Petrovic J, Callaghan D, Cui H, Dean C, Stanimirovic DB, Zhang W. 2007. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) is involved in the regulation of hypoxia-stimulated expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) and MCP-5 (Ccl12) in astrocytes. *Journal of neuroinflammation* 4:12
57. Zhao XY, Chen TT, Xia L, Guo M, Xu Y, et al. 2010. Hypoxia inducible factor-1 mediates expression of galectin-1: the potential role in migration/invasion of colorectal cancer cells. *Carcinogenesis* 31:1367-75
58. Said HM, Stein S, Hagemann C, Polat B, Staab A, et al. 2009. Oxygen-dependent regulation of NDRG1 in human glioblastoma cells in vitro and in vivo. *Oncology reports* 21:237-46
59. Gonsalves CS, Kalra VK. 2010. Hypoxia-mediated expression of 5-lipoxygenase-activating protein involves HIF-1alpha and NF-kappaB and microRNAs 135a and 199a-5p. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 184:3878-88
60. Diebold I, Petry A, Djordjevic T, Belaiba RS, Fineman J, et al. 2010. Reciprocal regulation of Rac1 and PAK-1 by HIF-1alpha: a positive-feedback loop promoting pulmonary vascular remodeling. *Antioxidants & redox signaling* 13:399-412
61. Aubert S, Fauquette V, Hemon B, Lepoivre R, Briez N, et al. 2009. MUC1, a new hypoxia inducible factor target gene, is an actor in clear renal cell carcinoma tumor progression. *Cancer research* 69:5707-15
62. Katoh M. 2009. Integrative genomic analyses of ZEB2: Transcriptional regulation of ZEB2 based on SMADs, ETS1, HIF1alpha, POU/OCT, and NF-kappaB. *International journal of oncology* 34:1737-42

63. Koslowski M, Luxemburger U, Tureci O, Sahin U. 2011. Tumor-associated CpG demethylation augments hypoxia-induced effects by positive autoregulation of HIF-1alpha. *Oncogene* 30:876-82
64. Ahmad A, Ahmad S, Glover L, Miller SM, Shannon JM, et al. 2009. Adenosine A2A receptor is a unique angiogenic target of HIF-2alpha in pulmonary endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:10684-9
65. Taylor M, Qu A, Anderson ER, Matsubara T, Martin A, et al. 2011. Hypoxia-inducible factor-2alpha mediates the adaptive increase of intestinal ferroportin during iron deficiency in mice. *Gastroenterology* 140:2044-55
66. Abboud ER, Coffelt SB, Figueroa YG, Zvezdaryk KJ, Nelson AB, et al. 2007. Integrin-linked kinase: a hypoxia-induced anti-apoptotic factor exploited by cancer cells. *International journal of oncology* 30:113-22
67. Oktay Y, Dioum E, Matsuzaki S, Ding K, Yan LJ, et al. 2007. Hypoxia-inducible factor 2alpha regulates expression of the mitochondrial aconitase chaperone protein frataxin. *The Journal of biological chemistry* 282:11750-6
68. Kitajima Y, Ide T, Ohtsuka T, Miyazaki K. 2008. Induction of hepatocyte growth factor activator gene expression under hypoxia activates the hepatocyte growth factor/c-Met system via hypoxia inducible factor-1 in pancreatic cancer. *Cancer science* 99:1341-7
69. Tak E, Lee S, Lee J, Rashid MA, Kim YW, et al. 2011. Human carbonyl reductase 1 upregulated by hypoxia renders resistance to apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Journal of hepatology* 54:328-39
70. Wellmann S, Bettkober M, Zelmer A, Seeger K, Faigle M, et al. 2008. Hypoxia upregulates the histone demethylase JMJD1A via HIF-1. *Biochemical and biophysical research communications* 372:892-7
71. Xie L, Collins JF. 2011. Transcriptional regulation of the Menkes copper ATPase (Atp7a) gene by hypoxia-inducible factor (HIF2{alpha}) in intestinal epithelial cells. *American journal of physiology. Cell physiology* 300:C1298-305
72. Pietras A, von Stedingk K, Lindgren D, Pahlman S, Axelson H. 2011. JAG2 induction in hypoxic tumor cells alters Notch signaling and enhances endothelial cell tube formation. *Molecular cancer research : MCR* 9:626-36

73. Saito T, Fukai A, Mabuchi A, Ikeda T, Yano F, et al. 2010. Transcriptional regulation of endochondral ossification by HIF-2alpha during skeletal growth and osteoarthritis development. *Nature medicine* 16:678-86
74. Diez H, Fischer A, Winkler A, Hu CJ, Hatzopoulos AK, et al. 2007. Hypoxia-mediated activation of Dll4-Notch-Hey2 signaling in endothelial progenitor cells and adoption of arterial cell fate. *Experimental cell research* 313:1-9
75. Gort EH, van Haaften G, Verlaan I, Groot AJ, Plasterk RH, et al. 2008. The TWIST1 oncogene is a direct target of hypoxia-inducible factor-2alpha. *Oncogene* 27:1501-10
76. Schwalm S, Doll F, Romer I, Bubnova S, Pfeilschifter J, Huwiler A. 2008. Sphingosine kinase-1 is a hypoxia-regulated gene that stimulates migration of human endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* 368:1020-5
77. Ryu JH, Yang S, Shin Y, Rhee J, Chun CH, Chun JS. 2011. Interleukin-6 plays an essential role in hypoxia-inducible factor 2alpha-induced experimental osteoarthritic cartilage destruction in mice. *Arthritis and rheumatism* 63:2732-43
78. Weidemann A, Klanke B, Wagner M, Volk T, Willam C, et al. 2008. Hypoxia, via stabilization of the hypoxia-inducible factor HIF-1alpha, is a direct and sufficient stimulus for brain-type natriuretic peptide induction. *The Biochemical journal* 409:233-42
79. Wang L, Liu N, Yao L, Li F, Zhang J, et al. 2008. NDRG2 is a new HIF-1 target gene necessary for hypoxia-induced apoptosis in A549 cells. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 21:239-50
80. Kim B, Boo K, Lee JS, Kim KI, Kim WH, et al. 2010. Identification of the KAI1 metastasis suppressor gene as a hypoxia target gene. *Biochemical and biophysical research communications* 393:179-84
81. Mazumdar J, Hickey MM, Pant DK, Durham AC, Sweet-Cordero A, et al. 2010. HIF-2alpha deletion promotes Kras-driven lung tumor development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:14182-7
82. Tan M, Gu Q, He H, Pamarthy D, Semenza GL, Sun Y. 2008. SAG/ROC2/RBX2

- is a HIF-1 target gene that promotes HIF-1 alpha ubiquitination and degradation. *Oncogene* 27:1404-11
83. Valsecchi V, Pignataro G, Del Prete A, Sirabella R, Matrone C, et al. 2011. NCX1 is a novel target gene for hypoxia-inducible factor-1 in ischemic brain preconditioning. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 42:754-63
  84. Chen N, Chen X, Huang R, Zeng H, Gong J, et al. 2009. BCL-xL is a target gene regulated by hypoxia-inducible factor-1{alpha}. *The Journal of biological chemistry* 284:10004-12
  85. Wang D, Wang LH, Zhao Y, Lu YP, Zhu L. 2010. Hypoxia regulates the ferrous iron uptake and reactive oxygen species level via divalent metal transporter 1 (DMT1) Exon1B by hypoxia-inducible factor-1. *IUBMB life* 62:629-36
  86. Tanaka T, Wiesener M, Bernhardt W, Eckardt KU, Warnecke C. 2009. The human HIF (hypoxia-inducible factor)-3alpha gene is a HIF-1 target gene and may modulate hypoxic gene induction. *The Biochemical journal* 424:143-51
  87. Filippi S, Latini P, Frontini M, Palitti F, Egly JM, Proietti-De-Santis L. 2008. CSB protein is (a direct target of HIF-1 and) a critical mediator of the hypoxic response. *The EMBO journal* 27:2545-56
  88. Martin CM, Ferdous A, Gallardo T, Humphries C, Sadek H, et al. 2008. Hypoxia-inducible factor-2alpha transactivates Abcg2 and promotes cytoprotection in cardiac side population cells. *Circulation research* 102:1075-81
  89. Lysiak JJ, Kirby JL, Tremblay JJ, Woodson RI, Reardon MA, et al. 2009. Hypoxia-inducible factor-1alpha is constitutively expressed in murine Leydig cells and regulates 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 promoter activity. *Journal of andrology* 30:146-56
  90. Jeon YK, Yoo DR, Jang YH, Jang SY, Nam MJ. 2011. Sulforaphane induces apoptosis in human hepatic cancer cells through inhibition of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase4, mediated by hypoxia inducible factor-1-dependent pathway. *Biochimica et biophysica acta* 1814:1340-8
  91. Diebold I, Petry A, Hess J, Gorlach A. 2010. The NADPH oxidase subunit NOX4 is a new target gene of the hypoxia-inducible factor-1. *Molecular biology of the cell* 21:2087-96
  92. Betigeri S, Pakunlu RI, Wang Y, Khandare JJ, Minko T. 2006. JNK1 as a



- molecular target to limit cellular mortality under hypoxia. *Molecular pharmacology* 3:424-30
93. Maegdefrau U, Amann T, Winklmeier A, Braig S, Schubert T, et al. 2009. Bone morphogenetic protein 4 is induced in hepatocellular carcinoma by hypoxia and promotes tumour progression. *The Journal of pathology* 218:520-9
  94. Mattauch S, Sachs M, Behrens J. 2010. Liprin-alpha4 is a new hypoxia-inducible target gene required for maintenance of cell-cell contacts. *Experimental cell research* 316:2883-92
  95. Wu X, Chang MS, Mitsialis SA, Kourembanas S. 2006. Hypoxia regulates bone morphogenetic protein signaling through C-terminal-binding protein 1. *Circulation research* 99:240-7
  96. Lubbers DW, Baumgartl H. 1997. Heterogeneities and profiles of oxygen pressure in brain and kidney as examples of the pO<sub>2</sub> distribution in the living tissue. *Kidney international* 51:372-80
  97. Baumgartl H, Leichtweiss HP, Lubbers DW, Weiss C, Huland H. 1972. The oxygen supply of the dog kidney: measurements of intrarenal pO<sub>2</sub>. *Microvascular research* 4:247-57
  98. Schurek HJ, Brecht JP, Lohfert H, Hierholzer K. 1975. The basic requirements for the function of the isolated cell free perfused rat kidney. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 354:349-65
  99. Kriz W. 1981. Structural organization of the renal medulla: comparative and functional aspects. *The American journal of physiology* 241:R3-16
  100. Prasad P, Li LP, Halter S, Cabray J, Ye M, Battle D. 2010. Evaluation of renal hypoxia in diabetic mice by BOLD MRI. *Investigative radiology* 45:819-22
  101. Molony DA, Reeves WB, Hebert SC, Andreoli TE. 1987. ADH increases apical Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, 2Cl<sup>-</sup> entry in mouse medullary thick ascending limbs of Henle. *The American journal of physiology* 252:F177-87
  102. Sakuma Y, Nonoguchi H, Takayama M, Yang T, Terada Y, et al. 2005. Differential effects of hyperosmolality on Na-K-ATPase and vasopressin-dependent cAMP generation in the medullary thick ascending limb and outer medullary collecting duct. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* 28:671-9

103. Welker P, Geist B, Fruhauf JH, Salanova M, Groneberg DA, et al. 2007. Role of lipid rafts in membrane delivery of renal epithelial Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase, thick ascending limb. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 292:R1328-37
104. Manotham K, Tanaka T, Ohse T, Kojima I, Miyata T, et al. 2005. A biologic role of HIF-1 in the renal medulla. *Kidney international* 67:1428-39
105. Heyman SN, Brezis M, Epstein FH, Spokes K, Silva P, Rosen S. 1991. Early renal medullary hypoxic injury from radiocontrast and indomethacin. *Kidney international* 40:632-42
106. Heyman SN, Brezis M, Reubinoff CA, Greenfeld Z, Lechene C, et al. 1988. Acute renal failure with selective medullary injury in the rat. *The Journal of clinical investigation* 82:401-12
107. Heyman SN, Rosenberger C, Rosen S. 2005. Regional alterations in renal haemodynamics and oxygenation: a role in contrast medium-induced nephropathy. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 20 Suppl 1:i6-11
108. Rosenberger C, Mandriota S, Jurgensen JS, Wiesener MS, Horstrup JH, et al. 2002. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and -2alpha in hypoxic and ischemic rat kidneys. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 13:1721-32
109. Rosenberger C, Rosen S, Shina A, Bernhardt W, Wiesener MS, et al. 2006. Hypoxia-inducible factors and tubular cell survival in isolated perfused kidneys. *Kidney international* 70:60-70
110. Rosenberger C, Rosen S, Shina A, Frei U, Eckardt KU, et al. 2008. Activation of hypoxia-inducible factors ameliorates hypoxic distal tubular injury in the isolated perfused rat kidney. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 23:3472-8
111. Semenza GL. 2003. Angiogenesis in ischemic and neoplastic disorders. *Annual review of medicine* 54:17-28
112. Maharaj AS, Saint-Geniez M, Maldonado AE, D'Amore PA. 2006. Vascular

- endothelial growth factor localization in the adult. *The American journal of pathology* 168:639-48
113. Mathur RS, Mathur SP. 2003. In vitro downregulation of growth factors by insulin-like growth factor binding protein-3 in cervical cancer. *Gynecologic oncology* 91:410-5
  114. Kim SR, Lee KS, Lee KB, Lee YC. 2012. Recombinant IGFBP-3 inhibits allergic lung inflammation, VEGF production, and vascular leak in a mouse model of asthma. *Allergy* 67:869-77
  115. Oh SH, Kim WY, Lee OH, Kang JH, Woo JK, et al. 2012. Insulin-like growth factor binding protein-3 suppresses vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer science* 103:1259-66
  116. Rho SB, Dong SM, Kang S, Seo SS, Yoo CW, et al. 2008. Insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5) acts as a tumor suppressor by inhibiting angiogenesis. *Carcinogenesis* 29:2106-11
  117. Xie L, Palmsten K, MacDonald B, Kieran MW, Potenta S, et al. 2008. Basement membrane derived fibulin-1 and fibulin-5 function as angiogenesis inhibitors and suppress tumor growth. *Exp Biol Med (Maywood)* 233:155-62
  118. Neill T, Painter H, Buraschi S, Owens RT, Lisanti MP, et al. 2012. Decorin antagonizes the angiogenic network: concurrent inhibition of Met, hypoxia inducible factor 1alpha, vascular endothelial growth factor A, and induction of thrombospondin-1 and TIMP3. *The Journal of biological chemistry* 287:5492-506
  119. Zhang C, Lu L, Li Y, Wang X, Zhou J, et al. 2012. IGF binding protein-6 expression in vascular endothelial cells is induced by hypoxia and plays a negative role in tumor angiogenesis. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 130:2003-12
  120. Bach LA, Fu P, Yang Z. 2013. Insulin-like growth factor-binding protein-6 and cancer. *Clin Sci (Lond)* 124:215-29
  121. Skogstrand T, Leh S, Paliege A, Reed RK, Vikse BE, et al. 2013. Arterial damage precedes the development of interstitial damage in the nonclipped kidney of two-kidney, one-clip hypertensive rats. *Journal of hypertension* 31:152-9
  122. Bankir L, Bichet DG, Bouby N. 2010. Vasopressin V2 receptors, ENaC, and

- sodium reabsorption: a risk factor for hypertension? *American journal of physiology. Renal physiology* 299:F917-28
123. Pittman QJ, Lawrence D, McLean L. 1982. Central effects of arginine vasopressin on blood pressure in rats. *Endocrinology* 110:1058-60
  124. Laycock JF, Penn W, Shirley DG, Walter SJ. 1979. The role of vasopressin in blood pressure regulation immediately following acute haemorrhage in the rat. *The Journal of physiology* 296:267-75
  125. Perucca J, Bichet DG, Bardoux P, Bouby N, Bankir L. 2008. Sodium excretion in response to vasopressin and selective vasopressin receptor antagonists. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 19:1721-31
  126. Knepper MA. 1998. Long-term regulation of urinary concentrating capacity. *The American journal of physiology* 275:F332-3
  127. Zhang MZ, Sanchez Lopez P, McKanna JA, Harris RC. 2004. Regulation of cyclooxygenase expression by vasopressin in rat renal medulla. *Endocrinology* 145:1402-9
  128. Sabatini S. 1996. Pathophysiologic mechanisms in analgesic-induced papillary necrosis. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 28:S34-8
  129. Cao C, Edwards A, Sendeski M, Lee-Kwon W, Cui L, et al. 2010. Intrinsic nitric oxide and superoxide production regulates descending vasa recta contraction. *American journal of physiology. Renal physiology* 299:F1056-64
  130. Edwards A, Layton AT. 2011. Modulation of outer medullary NaCl transport and oxygenation by nitric oxide and superoxide. *American journal of physiology. Renal physiology* 301:F979-96
  131. Shin SJ, Lai FJ, Wen JD, Lin SR, Hsieh MC, et al. 1999. Increased nitric oxide synthase mRNA expression in the renal medulla of water-deprived rats. *Kidney international* 56:2191-202
  132. Martin PY, Bianchi M, Roger F, Niksic L, Feraille E. 2002. Arginine vasopressin modulates expression of neuronal NOS in rat renal medulla. *American journal of physiology. Renal physiology* 283:F559-68
  133. Hirata Y, Hayakawa H, Kakoki M, Tojo A, Suzuki E, et al. 1997. Receptor subtype for vasopressin-induced release of nitric oxide from rat kidney. *Hypertension*

29:58-64

134. Park F, Zou AP, Cowley AW, Jr. 1998. Arginine vasopressin-mediated stimulation of nitric oxide within the rat renal medulla. *Hypertension* 32:896-901
135. Ahmeda AF, Johns EJ. 2012. The regulation of blood perfusion in the renal cortex and medulla by reactive oxygen species and nitric oxide in the anaesthetised rat. *Acta Physiol (Oxf)* 204:443-50
136. Li N, Yi FX, Spurrier JL, Bobrowitz CA, Zou AP. 2002. Production of superoxide through NADH oxidase in thick ascending limb of Henle's loop in rat kidney. *American journal of physiology. Renal physiology* 282:F1111-9
137. Zou AP, Li N, Cowley AW, Jr. 2001. Production and actions of superoxide in the renal medulla. *Hypertension* 37:547-53
138. Ohsaki Y, O'Connor P, Mori T, Ryan RP, Dickinson BC, et al. 2012. Increase of sodium delivery stimulates the mitochondrial respiratory chain H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in rat renal medullary thick ascending limb. *American journal of physiology. Renal physiology* 302:F95-F102
139. Sarkis A, Ito O, Mori T, Kohzuki M, Ito S, et al. 2005. Cytochrome P-450-dependent metabolism of arachidonic acid in the kidney of rats with diabetes insipidus. *American journal of physiology. Renal physiology* 289:F1333-40
140. Stricklett PK, Hughes AK, Kohan DE. 2006. Endothelin-1 stimulates NO production and inhibits cAMP accumulation in rat inner medullary collecting duct through independent pathways. *American journal of physiology. Renal physiology* 290:F1315-9
141. Dobrowolski L, Walkowska A, Kompanowska-Jeziarska E, Kuczeriszka M, Sadowski J. 2007. Effects of ATP on rat renal haemodynamics and excretion: role of sodium intake, nitric oxide and cytochrome P450. *Acta Physiol (Oxf)* 189:77-85
142. Rieg T, Pothula K, Schroth J, Satriano J, Osswald H, et al. 2008. Vasopressin regulation of inner medullary collecting ducts and compensatory changes in mice lacking adenosine A<sub>1</sub> receptors. *American journal of physiology. Renal physiology* 294:F638-44
143. Evans RG, Head GA, Eppel GA, Burke SL, Rajapakse NW. 2010. Angiotensin II and neurohumoral control of the renal medullary circulation. *Clinical and*

*experimental pharmacology & physiology* 37:e58-69

144. Kuczeriszka M, Olszynski KH, Gasiorowska A, Sadowski J, Kompanowska-Jezierska E. 2011. Interaction of nitric oxide and the cytochrome P-450 system on blood pressure and renal function in the rat: dependence on sodium intake. *Acta Physiol (Oxf)* 201:493-502
145. Novak I. 2011. Purinergic signalling in epithelial ion transport: regulation of secretion and absorption. *Acta Physiol (Oxf)* 202:501-22
146. Storkebaum E, Carmeliet P. 2011. Paracrine control of vascular innervation in health and disease. *Acta Physiol (Oxf)* 203:61-86
147. Li XC, Shao Y, Zhuo JL. 2012. AT1a receptor signaling is required for basal and water deprivation-induced urine concentration in AT1a receptor-deficient mice. *American journal of physiology. Renal physiology* 303:F746-56
148. Kennedy-Lydon TM, Crawford C, Wildman SS, Peppiatt-Wildman CM. 2013. Renal pericytes: regulators of medullary blood flow. *Acta Physiol (Oxf)* 207:212-25
149. Bankir L. 2001. Antidiuretic action of vasopressin: quantitative aspects and interaction between V1a and V2 receptor-mediated effects. *Cardiovascular research* 51:372-90

## 6. Eidesstattliche Versicherung

Ich, Anja Dietrich, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „*Der Einfluss von antidiuretischem Hormon auf die medulläre Genexpression in Brattleboro Ratten*“ 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.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, 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

## Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Anja Dietrich hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation: Dietrich, A. Mathia, S. Kaminski, H. Mutig, K. Rosenberger, C. Mrowka, R. Bachmann, S. Paliege, A. *Chronic activation of vasopressin V2 receptor signalling lowers renal medullary oxygen levels in rats*. Acta Physiol (Oxf). 2013. 207 (4): p. 721-31.

Beitrag im Einzelnen:

Gewebefixierung und Probenaufbereitung. Selbstständige Anfertigung von Gewebeschnitten, Auswertung der Vorversuche zur Gewebefixierung und Durchführung verschiedener immunhistochemischer und biochemischer Färbungen, der in-situ-Hybridisierung sowie RNA-Aufbereitung und cDNA-Synthese, morphologische Auswertungen und Fotografie von Gewebeschnitten am Lichtmikroskop, Durchführung und Auswertung der Literaturrecherche bzgl. hypoxiesensitiver Genprodukte im *Microarray*. Mitbeteiligung an der Texterstellung sowie Gestaltung von Tabellen und Abbildungen.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin



## **7. Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

## 8. Publikationsliste

Dietrich, A.Mathia, S.Kaminski, H.Mutig, K.Rosenberger, C.Mrowka, R.Bachmann, S.Paliece. A. *Chronic activation of vasopressin V2 receptor signalling lowers renal medullary oxygen levels in rats*. Acta Physiol (Oxf). 2013. 207 (4): p. 721-31.

Posterpräsentation auf dem Kongress „*Experimental Biology*“ in Washington DC und dem Jahrestreffen der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie in Berlin: *Vasopressin treatment causes widespread hypoxia in the renal medulla of Brattleboro rats*. 2011, Dietrich A, Kaminsky H, Roeschel T, Mutig K, Mrowka R, Bachmann S, Paliece A

Posterpräsentation auf dem 3. internationalem Symposium "*Molecular Targets in Renal Disease*" in Bamberg (SFB 423): *Deficiency of Hoppel-Lindau ameliorates the pathology of chronic kidney disease*, 2010, Dietrich A, Koesters R, Polzin D, Rosenberger C, Bachmann S, Theilig F

Vortrag auf der 27. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg: *Genetic renal epithelial deletion of von Hippel Lindau does not augment the progression of a rapid progressive kidney disease*, 2010, Dietrich A, Koesters R, Polzin D, Rosenberger C, Bachmann S, Theilig F

## **9. Danksagung**

Großer Dank gilt meinen Eltern und Großeltern für die niemals nachlassende Unterstützung und stets aufmunternden Worte.

Für alle technischen Hilfen im Labor und wissenschaftlichen Unterstützungen möchte ich mich besonders bei Kerstin, Frauke und Petra bedanken, aber auch Kerim und meinen Mitdoktoranden Henriette, Aljona, Christin, Hanna und Danny.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Paliege und Prof. Dr. Bachmann für die wissenschaftliche Einarbeitung, Beratung und Förderung.