

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

Stress-induzierte Nierenfibrose – Komponenten des Endothels und der Epithelien

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von
Adelina Stößel
aus Pawlodar (Kasachstan)

1.: Prof. Dr. S. Bachmann

2.: Prof. Dr. med. R. Veelken

3.: Prof. Dr. med. A. Patzak

Datum der Promotion: 08.04.2011

Abstract (deutsch)

Stress-induzierte Nierenfibrose – Komponenten des Endothels und der Epithelien

Stickstoffmonoxid (NO) übt eine Reihe von Einflüssen auf die Nierenfunktion aus, die Endothelien sowie auch Epithelien betreffen. Der Mangel an verfügbarem NO führt zu renalen Funktionsstörungen, die in eine Nephrosklerose münden können. Diese wie auch die parallel auftretende tubulointerstitielle Vernarbung, können den Fortschritt chronischer Nierenerkrankungen beeinflussen. Die vorliegende Arbeit untersucht die Hypothese, dass eine primär endotheliale, durch geringgradigen NO-Mangel (0,3 und 0,8 mg/ml über 3-6 Monate) bedingte Funktionsstörung in Abwesenheit zusätzlicher profibrotischer Faktoren eine Schädigungskaskade in der Niere begründen kann. Zuvor war ein Kandidatengen, das für die Progression NO-Mangel-bedingter Nierenschädigung relevant ist (Kollagen XVIII und sein anti-angiogenes Fragment Endostatin), von uns identifiziert worden. Experimentell wurde bei Mäusen unter L-NMMA-induziertem NO-Mangel eine mäßiggradige endotheliale Pathologie des äußeren Nierenmarks mit kapillarer Rarifizierung in der Niere beobachtet. Endothelien wurden hierzu immunhistochemisch mit CD31 identifiziert. Die Endostatinwerte waren im Modell der subpressorischen NO-Verarmung erhöht. Die Gefäßregression war mit einer leichten Gefäßpathologie mit Thrombozytenaggregation, Leukozyteninfiltration und –adhäsion sowie Lipofuszingranula-Einlagerungen vaskulärer Zellen und Masson-Trichrom-positiven, fibrotischen Arealen in perivaskulärer Lage identifizierbar. NO-Mangel erzeugte auch in Maus-Endothelzelllinie signifikant erhöhte Endostatinproduktion, die den Zusammenhang zur Gefäßschädigung stützte. Im Modell der unilateralen Ureterobstruktion (UUO), das durch progressive Nierenfibrose und tubulo-interstitielle Narbenbildung charakterisiert ist, wurde ebenfalls die Wirkung geringgradiger L-NMMA-Gabe zur Drosselung des endothelialen NO-Systems im chronischen Verlauf nach Auflösung der Obstruktion getestet. Es kam hier zu einer signifikanten Verminderung der Rekrutierung verschiedener Stammzellpopulationen; diese ist jedoch eine wichtige Voraussetzung für die Regeneration des Nierengewebes nach Auflösung der Obstruktion. Ein indirekter Zusammenhang zwischen NO-Verfügbarkeit und Nierenregeneration nach UUO konnte durch diese Studie hergestellt werden. In einem dritten Ansatz wurde die renale Verteilung der Connexine (Cx) beleuchtet, die funktionelle Daten zur Gefäßbiologie Zelltyp-spezifisch untermauern sollten. Die vaskuläre Verteilung von Cx37 wies auf eine mögliche Rolle dieses Cx bei regionalspezifischen Gefäßreaktionen bei Nierenerkrankungen hin. Hinzu kam eine differenzierte Analyse der Verteilung von Cx37 in renalen Epithelien. Die Resultate können als Grundlagen für die Wirkung von NO bei der interzellulären Kommunikation vaskulärer Zellen über Cx37 verstanden werden, welche für die Tonuseinstellung bedeutsam ist. Durch NO beeinflussbare Interaktionen auf epithelialer Ebene müssen ebenfalls in Betracht gezogen werden.

Zusammenfassend sind in den aufgeführten Arbeiten Daten erhoben worden, die die Rolle von NO bei chronischer Nierenerkrankung modellhaft anhand von Veränderungen der Gefäßbiologie bei subpressorischer NOS-Inhibition beleuchten. Zusätzlich wurde die Verteilung

von Cx37 als Mittler von Zell-Zellkommunikation und Zielprotein für NO-abhängige Interaktion analysiert.

Schlagwörter: Endotheliale Dysfunktion, Stickstoffmonoxid (NO), L-NMMA

Abstract (english)

Deficiency of nitric oxide (NO) represents a consistent manifestation of endothelial cell dysfunction, and the accumulation of asymmetric dimethylarginine occurs early in renal disease. Here, we confirmed in vitro and in vivo the previous finding that a fragment of collagen XVIII, endostatin, was upregulated by chronic inhibition of NO production and thought to support a hypothesis that primary endothelial dysfunction contributes to nephrosclerosis in the absence of other profibrotic factors. To emulate more closely the indolent course of endothelial dysfunction, the study was expanded to an in vivo model with NG-monomethyl-L-arginine (L-NMMA; mimics effects of asymmetric dimethylarginine) administered to mice in the drinking water at subpressor doses of 0.3 and 0.8 mg/ml for 3–6 months. This resulted in subtle but significant morphological alterations detected in kidneys of mice chronically treated with L-NMMA: 1) consistent perivascular expansion of interstitial matrix components at the inner stripe of the outer medulla and 2) collagen XVIII/endostatin abundance. Ultrastructural abnormalities were detected in L-NMMA-treated mice: 1) increased activity of the interstitial fibroblasts; 2) occasional detachment of endothelial cells from the basement membrane; 3) splitting of the vascular basement membrane; 4) focal fibrosis; and 5) accumulation of lipofuscin by interstitial fibroblasts. Preembedding labeling of microvasculature with anti-CD31 antibodies showed infiltrating leukocytes and agglomerating platelets attaching to the visibly intact or denuded capillaries. Collectively, the data indicate that the mouse model of subpressor chronic administration of L-NMMA is not a robust one (endothelial pathology visible only ultrastructurally), and yet it closely resembles the natural progression of endothelial dysfunction, microvascular abnormalities, and associated tubulointerstitial scarring. In another approach, the role of long-term, subpressor inhibition of NOS was studied during the recovery phase after unilateral ureteral obstruction (UUO, RUUO). As a major result, vascular stem cell accumulation during healing was impaired, suggesting a role of NO in the surge of vascular stem cells during recovery from renal damage. Analysis of the gap junctional protein, connexin 37, addressed its possible role in vascular and epithelial cell-cell communication in the light of renal disease.

In sum, data have been raised to model the role of NO in chronic kidney disease. Alterations in vascular biology have been studied under subpressor inhibition of NOS. The role of stem cell surge under subpressor dose of NOS inhibition has been elucidated in RUUO. In addition, a basic analysis has been performed to characterize the distribution of a gap junctional channel protein, Cx 37, as a potential mediator of cell-cell communication and target protein for NO-dependent processes.

Keywords: endothelial dysfunction, nitric oxide (NO), L-NMMA

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	6
1. Einleitung	7
2. Zielsetzung der Arbeit	9
3. Material und Methoden	10
3.1 Tiere, Gewebeverarbeitung, Behandlungsprotokoll	10
3.2 Histochemie und Elektronenmikroskopie	11
3.2.1 Antikörper	11
3.2.2 Histochemie	11
3.2.3 Elektronenmikroskopie und Immunelektronenmikroskopie	11
3.3 Zellkultur und Western blot	12
3.3.1 Zellkultur	12
3.3.2 Western blot	12
3.4 <i>In situ</i> Hybridisierung	12
3.5 RT-PCR	12
3.6 Statistik	13
4. Resultate	13
4.1 Morphologische Analyse eines chronischen NO-Mangels im Mausmodell	13
4.2 Unilaterale Ureterobstruktion und Erholungsphase	14
4.3 Verteilung von Connexin 37 in der Niere	14
4.3.1 Epithelien	14
4.3.2 Gefäßendothelien	15
4.3.3 Verifizierung von Connexin 37	15
4.3.4 Regulation von Cx37 bei unterschiedlicher Salz-Aufnahme	15
5. Diskussion	16
5.1 Chronischer NO-Mangel in der Niere	16
5.2 Geringgradiger NO-Mangel bei UUO	17

5.3 Connexin 37 in Gefäßendothelien und in Epithelien	17
6. Literaturliste	18
Danksagung	23
Eidesstattliche Erklärung	24
Lebenslauf	
Publikationsliste	

Abkürzungen

ADMA	asymmetrisches Dimethylarginin
AQP2	Aquaporin
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	Sammelrohr
CD-31	<i>cluster of differentiation</i>
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CNT	Verbindungstubulus
Cx	Connexin
DCT	distales konvolutes Segment
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
L-NAME	N ^G -Nitro-L-Arginin-Methylester
L-NMMA	N ^G -Monomethyl-L-Arginin
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney</i>
NCC	Thiazid-sensitiver Na ⁺ , Cl ⁻ - Transporter
NKCC2	Furosemid-sensitiver Na ⁺ , K ⁺ , 2Cl ⁻ - Kotransporter
NO	Stickstoffmonoxid

NOS	Stickstoffmonoxid Synthase
PBS	Phosphat- gepufferte Lösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PT	proximaler Tubulus
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	real-time PCR
RUUO	Wiedereröffnung der Obstruktion
SDS-PAGE	<i>sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
TAL	dicker aufsteigender Schenkel der Henle-Schleife
UUO	unilaterale Ureterobstruktion
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

1. Einleitung

Im Rahmen der Progression chronischer Nierenerkrankungen spielt die Pathogenese der Nierenfibrose eine zentrale Rolle. Sie kann glomerulären, allgemein vaskulären oder epithelialen Ursprungs sein. Die Pathologie des Endothels ist bei allen vaskulären Veränderungen ein wichtiger Faktor. Endotheliale Dysfunktion entsteht durch das Zusammenwirken bekannter Risikofaktoren wie Bluthochdruck, oxidativer Stress, Entzündung, und Hypoxie bzw. Anämie (1). Herausragende Bedeutung haben hierbei unter anderem die Funktionen des L-Arginin-Stickstoffmonoxid (NO)-Systems, der Guanidinverbindung asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) (2), der lipidreichen, Caveolin-1-exprimierenden Caveolae und deren Rolle bei der Stammzell-Mobilisierung (3).

Die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) im Gefäßendothel ist für die grundlegenden Funktionen der Gefäßwand bedeutungsvoll. Über NO-Synthase (NOS) generiertes NO bewirkt eine Vasodilatation, es hemmt die Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten im Endothel, die Zellproliferation und die Radikalbildung in der Gefäßwand. Die Effekte endogener Vasodilatoren wie z.B. Histamin und Azetylcholin sind durch NO vermittelt (4). Pharmakologisch kann die Gabe eines selektiven NOS-Inhibitors innerhalb von Sekunden eine

Erhöhung des Blutdrucks bewirken; im Tierversuch beträgt diese Steigerung bis zu 40% (5). Vaskulärer NO-Mangel erzeugt Gefäßstress und ist auf diese Weise an der Entwicklung und Progression entscheidender kardiovaskulärer Erkrankungen wie Hypertonie, Arteriosklerose, Herzinsuffizienz und diabetischer Vaskulopathie beteiligt (6). Besonders in der Niere übt NO vielfältige Effekte aus und greift maßgeblich in vaskuläre, interstitielle und epitheliale Funktionsparameter ein (4,7,8,9). Ein Mangel von NO in der Niere begünstigt die Entwicklung der globalen sowie der segmentalen Glomerulosklerose, mikrovaskulärer Schädigungen mit glomerulärer Ischämie, Proteinurie und interstitieller Fibrose (1, 10). Renale Zelltypen (Podozyten, Mesangialzellen, Tubulusepithelzellen, Endothelzellen der Endstrombahn) und ubiquitäre Zellen (Makrophagen, Granulozyten, Stammzellen) sind involviert (8, 11). Gefäßstress, renale Ischämie, veränderter intratubulärer Druck, tubuläre Obstruktion, die Aktivierung von Schadensmediatoren sowie mesenchymale Transformation von Epithelzellen sind als relevante Faktoren der Progression diskutiert worden (8, 31).

Während ADMA, das durch Methylierung von Protein-Argininresten entsteht, als potenter endogener NOS-Inhibitor fungiert, kann im Tierversuch und in vitro L-NAME (N^G-Nitro-L-Arginin-Methylester) oder L-NMMA (N^G-Monomethyl-L-Arginin) erfolgreich eingesetzt werden, um nach Dosis differenziert NO-Mangelzustände zu erzeugen (12).

Strukturen der interzellulären Kommunikation sind im Endothel wie auch in Epithelien bedeutungsvoll. Hier sind in erster Linie die Connexine (Cx) zu nennen. Connexine bilden als Proteinkomplexe junctionale Kanäle zwischen den Plasmamembranen benachbarter Zellen. Diese stellen als Connexone die morphologische Basis für die *Gap junction* dar. Im menschlichen Erbgut sind heute mindestens 20 Cx-Isoformen identifiziert worden (14). Connexone kommen als homo- oder heteromere vor, auch Hemikanäle, die nur auf einer einzigen Membran exprimiert werden, sind beschrieben (14). Klassische *Gap junctions* ermöglichen ionalen und generell kleinmolekularen Austausch zwischen den Zellen; hierzu gehören insbesondere auch *Second messengers* wie Adenosin, ATP, cAMP und cGMP (14, 15, 16). In der Niere sind verschiedene Cx-Isoformen identifiziert worden, die zum Teil in Gefäßen oder Epithelien, oder in beiden Strukturen lokalisiert sind (17-19). Die Bedeutung von Cx37 in der Niere ist generell bisher nur wenig untersucht worden. Cx37 hat eine wichtige vaskuläre Komponente (17), hat jedoch auch in Epithelien eine Funktion. Für Gefäße wurde gezeigt, dass NO die interzelluläre Kommunikation über Cx37 inhibiert (20) und dass Cx37 und endotheliale NOS miteinander interagieren (21).

In meiner vorliegenden Hauptarbeit (13) wurden im Tiermodell Effekte eines chronischen NO-Mangels in der Niere unter physiologischen und pathologischen Bedingungen charakterisiert. In einem drastischeren Schadensmodell, in welchem der Effekt einer partiellen NO-Deprivation durch die zusätzliche Belastung der einseitigen Ureterobstruktion und Wiedereröffnung nach 10 Tagen beobachtet wurde, sind zusätzliche Daten erarbeitet worden, die ich anteilig miterhoben habe (53). Aufgrund der publizierten Assoziation zwischen dem NO-Status und der Expression von Cx37 im Herzen habe ich die Verteilung dieses *Gap junction*-Proteins in der Niere

analysiert, um Einblicke in seine potenzielle Beteiligung an NO-vermittelten Effekten zu gewinnen (54).

2. Zielsetzung der Arbeit

Trotz der Vielzahl an Publikationen zum Thema NO-Mangel und dessen Auswirkungen auf die endotheliale Funktion sind nierenbezogene Aspekte bis jetzt nur wenig erforscht. Außerdem sind die meisten Studien auf Effekte eines drastischen NO-Mangels ausgerichtet. Allerdings ist die Progression einer Reihe renaler Defekte vermutlich nur mit einem geringgradigen NO-Mangel assoziiert. In den vorliegenden Studien wird u.a. der Hypothese nachgegangen, dass auch ein geringer, chronisch vorherrschender NO-Mangel zu signifikanten Veränderungen des renalen Gefäßbetts führen kann; Gefäßstress infolge von NO Mangel kann eine vaskuläre Regression, Fibrose und letztlich chronisches Nierenversagen induzieren.

Ausgangspunkt war ein Befund, der bei NOS-Inhibition in HUVEC-Zellen eine Vermehrung von Kollagen XVIII und seines antiangiogenetischen Fragments Endostatin anzeigte. Dieser Befund sollte bei NO-Mangel-bedingten Nierenveränderungen validiert werden. In der vorliegenden Arbeit haben wir uns daher zum Ziel gesetzt, durch NO-Mangel ausgelöste endotheliale Dysfunktion der Niere an verschiedenen Mausmodellen und kultivierten Maus-Endothelzellen zu untersuchen. Um die Grundlagen der interzellulären Kommunikation bei diesen pathophysiologischen Prozessen zu beleuchten, wurde die Verteilung und Regulation von Cx37 in der Niere analysiert.

3. Material und Methoden

3.1 Tiere, Gewebeverarbeitung, Behandlungsprotokoll

Die unten dargestellten Versuche wurden in der lokalen Tierabteilung durchgeführt (Tierversuchsgenehmigungen G 0178/03 und G 0357/97). Tiere mit unilateraler Ureterobstruktion (UUO) und Wiedereröffnung der Obstruktion sowie Erholungsphase (RUUO) wurden im Labor von Michael Goligorsky (Valhalla, NY, USA) behandelt und aufgearbeitet; dieser Versuch ist gemäß meiner Eigenbeteiligung hier nur in Teilaspekten geschildert.

NO-Blockade bei Mäusen

45 männliche 129-J Mäuse (Charles River Laboratories) wurden verwendet. Nach 3-tägiger Anpassungsphase wurden die Tiere in 5 Gruppen von je 9 Tieren unterteilt. Die Tiere erhielten L-NMMA im Trinkwasser (0,3 mg/ml für 3 bzw. 6 Monate als niedrige Dosis; 0,8 mg/ml für 3 bzw. 6 Monate als höhere Dosis; Kontrolle Trinkwasser). An allen Tieren wurde wöchentlich über Schwanzplethysmographie der Blutdruck gemessen. Vier Mäuse wurden am Ende der Untersuchung anästhesiert und retrograd über die abdominale Aorta mit 3% PFA perfusionsfixiert. Um hypoxische Veränderungen histologisch zu erfassen, wurde während der Perfusionsfixierung Pimonidazol (60 mg/kg) infundiert. 5 Mäuse pro Gruppe wurden getötet, die Nieren entnommen und biochemisch aufgearbeitet. Zusätzlich wurden Caveolin1-defiziente Mäuse und passende Wildtypmäuse (Lisanti, New York) für die Spezifitätskontrolle der Caveolin1-Inkubationen eingesetzt.

Unilaterale Ureterobstruktion und Erholungsphase

54 FVB/N Mäuse wurden für die UUO mit einer einseitigen Ureterstenose versehen, die nach 10 Tagen eröffnet wurde. Eine anschließende Erholungsphase (RUUO) während 3 Wochen wurde angeschlossen. Die intakte Niere diente als Kontrolle. Über die ganze Studiendauer erhielten die Mäuse eine geringgradige, subpressorische NOS-Inhibition durch L-NMMA (0,3 mg/ml Trinkwasser) bzw. Vehikelgabe. Am Versuchsende wurde die Tiere getötet und die Nieren zur weiteren Untersuchung entnommen bzw. für die morphologische Auswertung perfusionsfixiert.

Untersuchung von Connexin37

30 männliche Sprague Dawley-Ratten wurden für die Untersuchung von Cx37 verwendet. Zum Studium der Regulation von Cx37 wurden Salzdiäten verabreicht. Die Tiere wurden nach Randomisierung in 3 Gruppen von je 10 Ratten unterteilt. Die Gruppen erhielten entweder eine niedrig-Salzdiät (mit 0,03% NaCl-Gehalt) sowie eine intraperitoneale Injektion von 2 mg/kg Furosemid am Tag 0, oder eine salzreiche Diät (mit 3% NaCl-Gehalt und dazu 0,45% NaCl im Trinkwasser), oder Standarddiät (0,2% NaCl). Cx37 knockout-Mäuse (A. Kurtz, Regensburg) sowie die passenden Wildtypmäuse wurden als Kontrollen für die Antikörperspezifität eingesetzt.

3.2 Histochemie und Elektronenmikroskopie

3.2.1. Antikörper

Antikörper	Wirt	Herkunft
CD31	Ratte	BD Pharmingen
Endostatin	Ziege	R&D Systems
VEGF	Kaninchen	Santa Cruz BT
Cx37	Kaninchen	Zymed
Phalloidin	Alexa 488	Invitrogen
NKCC2	Meerschwein	K. Mutig
NCC	Meerschwein	D. H. Ellison
Calbindin	Maus	Sigma
AQP2	Ziege	Santa Cruz
Renin	Huhn	A. Kurtz

3.2.2 Histochemie

Die Massonsche Trichromfärbung wurde an Paraffinschnitten durchgeführt. Zur immunhistochemischen Färbung wurden Gefrierschnitte oder Paraffinschnitte verwendet. Nach Inkubation über Nacht mit dem Primärantikörper (4°C) erfolgte die Detektion des Signals durch geeignete Fluorochrome (Cy2, Cy3) oder HRP-konjugierte Antikörper. Die Blockade der unspezifischen Proteinbindungen erfolgte mit 5% Milch in PBS verdünnt. Pimonidazol-Immunfärbung wurde mit Hypoxyprobe Plus kit (Chemikon) an Gefrierschnitten durchgeführt.

3.2.3 Elektronenmikroskopie und Immunelektronenmikroskopie

Für die morphologische Feinanalyse wurde perfusionsfixiertes Gewebe über Nacht nachfixiert in 1,5% Glutaraldehyd-1,5% PFA-0,05% Pikrinsäuregemisch in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer (pH 7,4) und in Epon 812 (Serva, Heidelberg) eingebettet. Mit einem Mikrotom (Reichert Ultracut S, Leica) wurden ultradünne (60nm) Schnitte angefertigt und mit Uranylacetat und Bleicitrat nachkontrastiert. Die Präparate wurden mit einem Transmissionselektronenmikroskop (EM 900, Zeiss) analysiert und fotografiert.

Für eine ultrastrukturelle Immunperoxidase-Markierung wurden 30µm dicke Gefrierschnitte mit anti-CD31 in Mikrotiterplatten inkubiert und anschließend mit 1% Osmiumtetroxid nachfixiert, mit Maleatpuffer gewaschen, mit Uranylacetat markiert und in Epon eingebettet (22). Die danach hergestellten Semi- und Ultradünnschnitte wurden mit einem Licht bzw. Elektronenmikroskop ausgewertet.

Für die Immunelektronenmikroskopie wurden fixierte Gewebestücke in London LR-White Harz eingebettet (Science Service, München). Hiervon angefertigte ultradünne Schnitte wurden über Nacht mit anti-Cx37-Antikörper inkubiert, gewaschen, und mit Immunogold-IgG und anschließender Versilberung markiert (IntenSE-System, Amersham).

3.3 Zellkultur und Western blot

3.3.1 Zellkultur

Immortalisierte Mausendothel-Zellen von Myokardgefäßen (My End-Zellen) wurden uns von J. Waschke (Würzburg) überlassen. MyEnd-Zellen wuchsen an Gelatine-beschichteten Petrischalen bis zur Subkonfluenz. Anschließend wurden sie mit L-NMMA (Endkonzentration 1mM) für 24 oder 48 Stunden inkubiert.

3.3.2 Western blot

Zellen, Nierenkortex und Nierenmark wurden in Homogenisierungspuffer aufbereitet, zentrifugiert und die Zellysate bzw. Gewebshomogenate bis zur Verwendung bei -80°C eingefroren. Diese wurden später gelelektrophoretisch (SDS-PAGE) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Zur Blockierung unspezifischer Proteinbindung wurde Milchpulver (5% in PBS) verwendet; zur Detektion spezifischer Proteine wurde die Membran mit dem jeweiligen Primärantikörper, gefolgt von einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Mit Hilfe eines Chemilumineszenz-Kits wurde das Signal erzeugt.

3.4 *In situ* Hybridisierung

Die Expression von Cx37 und Renin wurde mit Digoxigenin-markierten RNA *antisense*-Sonden (in vitro Transkription aus 500 bp Cx37 und 300 bp Renin cDNAs) auf Nierengewebe durch *In situ* Hybridisierung untersucht. Nach Inkubation mit einem alkalische Phosphatase-konjugierten anti-Digoxigenin-Antikörper wurden die gebundenen Transkripte visualisiert. *Sense*-Proben dienten zur Kontrolle.

3.5 RT-PCR

Die RNA aus Gesamtniere, isolierten Glomeruli und Tubuli von Salzdiät-behandelten Ratten wurde mit RNeasy Minikit (Qiagen) extrahiert, mit DNase I (Invitrogen) behandelt, spektrophotometrisch bei 260 nm quantifiziert und anschließend mit Sensiscript RT kit (Qiagen) revers transkribiert. Passende Oligonukleotidprimer für Maus-Cx37 (cDNA Mm01179783_m1)

und für Ratten-Cx37 (cDNA Rn01518948_m1) sowie für GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) wurden zur Amplifizierung der cDNA mittels Taq Polymerase eingesetzt. Nach der Auftrennung im Agarosegel und Ethidiumbromidfärbung wurden die spezifischen cDNA Fragmente im Ultraviolettlicht überprüft.

3.6 Statistik

Die Signifikanz der Messergebnisse wurde mit Hilfe des Studentschen *t*-Tests ermittelt. Für jede Messreihe wurden der Mittelwert, die Standardabweichung und der SEM (standard error of the mean) berechnet. Alle Werte sind als Mittelwert±SEM gegeben. Die morphologischen Unterschiede wurden doppelt verblindet von zwei unabhängigen Beobachtern ausgewertet.

4. Resultate

4.1 Morphologische Analyse eines chronischen NO-Mangels im Mausmodell

NO-Inhibition durch Gabe von L-NMMA in My-End-Zellen (1mM) resultierte in einer graduellen Erhöhung des profibrotischen Angiogenesehemmers Endostatin durch Immunfluoreszenz-Markierung und Western blot nach 24 und 48 Stunden.

Weder die niedrige noch die höhere L-NMMA Dosis führten zu einer signifikanten Blutdrucksteigerung. Die höhere Dosis L-NMMA (0.8 mg) bewirkte in fixiertem, Masson-Trichrom-gefärbtem Nierengewebe eine perivaskuläre Vermehrung von interzellulären Matrixbestandteilen im Innenstreifen des äußeren Marks. Die Expression von Endostatin war gegenüber Kontrollen gleichzeitig deutlich erhöht. Über CD31-Markierung der Endothelzellen zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Kapillardichte im inneren Mark. Pimonidazolfärbung wurde verwendet, um hypoxische Gebiete (pO_2 unter 10 mm Hg) zu charakterisieren; die Markierung fand sich in Sammelrohrethelien und Interstitialzellen, es bestanden jedoch keine größeren Unterschiede zwischen L-NMMA-behandelten Tieren und Kontrollen. Da die Pimonidazol-Färbung für die Visualisierung einer Gewebshypoxie allerdings nicht sehr empfindlich ist, analysierten wir als nächstes die Expression des Wachstumsfaktors *vascular endothelial growth factor* (VEGF). Die densitometrische Analyse zeigte einen nahezu 2-fachen Anstieg des VEGF im Western blot. Das Interstitium der äußeren Medulla wurde dann elektronenmikroskopisch untersucht. Die Anzahl der interstitiellen Fibroblasten war in Gebieten, in denen bei den behandelten Tieren ein vermehrtes Masson-Trichromsignal lichtmikroskopisch bestand, erhöht. Hier fanden sich auch in höherer Zahl elektronendichte Lipofuchsin granula in den Fibroblasten, die als Anzeichen für Zellalterung gewertet werden können.

Die Immunzytochemie mit anti-CD31 Antikörper zeigte eine ausgeprägte Färbung der Perikarya und der fenestrierten Strecken von Endothelien arterieller und venöser Vasa recta des äußeren Marks. Besondere Intensitätsunterschiede der CD31-Immunfärbung wurde bei L-NMMA-Gabe allerdings nicht beobachtet, was die LM Ergebnisse bestätigte. Jedoch zeigten sich intravasale Leukozyten und Thrombozytenaggregate, die sich an morphologisch intakten Kapillaren

angeheftet hatten. Interessanterweise lagerten sich die Thrombozyten an Endothelzellbereiche, die frei von CD31 waren; in der Gefäßwand der *Vasa recta* fanden sich zudem Bündel von Kollagenfibrillen. Ablösungen des Endothels, die im Schnitt eine Omega-Form zeigten, kamen in CD31-positiven Endothelien häufiger vor.

4.2 Unilaterale Ureterobstruktion und Erholungsphase

Die 10-tägige UUO hatte eine ausgeprägte Verringerung des Nierenparenchyms zur Folge. Eine im Labor von Michael Goligorsky durchgeführte Stammzell-Analyse durch FACS zeigte einen signifikanten Anstieg von Stammzellen wie Endothel-Progenitorzellen, mesenchymalen Stammzellen und hämatopoietischen Stammzellen in den obstruierten Nieren bei Vergleich mit den gesunden Kontrollnieren. Nach RUUO (3 weitere Wochen) war das Nierenparenchym größtenteils wieder hergestellt, und die Stammzellerhöhung war auf Normalzustand restituiert. Hier herrschten nunmehr ähnliche Score-Werte für tubulointerstitielle Vernarbung in behandelten und Kontrollnieren vor. Unter chronischer, geringgradiger NOS-Inhibition durch L-NMMA war der Anstieg von Stammzellen signifikant verringert, allerdings ergaben sich hinsichtlich dem tubulo-interstitiellen Scoring durch NOS-Inhibitor keine signifikanten Unterschiede im Vergleich mit Vehikel-behandelten Tieren. Dennoch weist der Unterschied der Stammzellmobilisierung auf eine potentielle Rolle der NO-Verfügbarkeit bei der Ausheilung nach renaler Obstruktion; diese dürfte auch für das Gefäßbett der Niere gelten.

4.3 Verteilung von Connexin 37 in der Niere

Wir haben die Lokalisation von Cx37 in Zelltypen der Ratten- und Mausnieren untersucht. Hierbei ergaben sich keine nennenswerten Unterschiede zwischen den Tierspezies.

4.3.1 Epithelien

Die Cx37 mRNA-Expression wurde mittels quantitativer real time-PCR in isolierten Mausnephron-Segmenten und durch *in situ* Hybridisierung auf Paraffinschnitten der Rattenniere bestimmt. Es ergab sich aus der PCR eine Mengenverteilung von Glomeruli>TAL, DCT>CNT>PT. Das starke Signal der Glomeruli war durch den hohen Gefäßanteil zu erwarten. Die Tubulusepithelien zeigten etwa die Hälfte der glomerulären Signalintensität. Die *in situ* Hybridisierung bestätigte dies teilweise und zeigte in TAL und DCT starkes, in den PT und Sammelrohren ein schwächeres Signal.

Cx37-immunopositive Epithelien des Nierentubulus wurden durch die Doppelfärbungen identifiziert. Der proximale Tubulus zeigte eine schwache, in S3-Segmenten stärkere und in den distalen Segmenten generell stärkere Cx37-Färbung. Im Sammelrohr nahm die Intensität nach medullär ab. Elektronenmikroskopisch zeigte sich eine Markierung vorrangig der basolateralen Zellmembran der Epithelien.

4.3.2 Gefäßendothelien

Die Endothelzellen aller Arterien und Arteriolen zeigten kräftige Cx37-positive Immunmarkierung entlang der Zellgrenzen. Eine stärker ausgeprägte Färbung wurde in den interlobularen Arteriolen und absteigenden *Vasa recta* gefunden. Die glomerulären Arteriolen und intraglomerulären Kapillaren zeigten unregelmäßige, schwächere Cx37-Signale. Eine starke, punktförmige Cx37-Expression wurde in den Renin-positiven Zellen beobachtet.

4.3.3 Verifizierung von Cx37 Antikörper

Für die Überprüfung der Antikörperspezifität wurden Nieren von Cx37-Knockout-Mäusen verwendet. Im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen konnte in den Nieren der Cx37-Knockout-Mäuse kein Signal gefunden werden. Zusätzlich wurden MDCK-Zellen transient mit Cx26, Cx30, Cx37, Cx40 und Cx43 transfiziert. Der Anti Cx37-Antikörper zeigte keine Kreuzreaktion mit den anderen Connexinen in Immunhistologie und Western blot.

4.3.4 Regulation von Cx37 bei unterschiedlicher Salz-Aufnahme

Um eine mögliche physiologische Bedeutung der renalen Cx37-Expression zu untersuchen, haben wir im Rattenmodell die Gabe von niedrig-Salzdiät und hoch-Salzdiät eingesetzt. Die Reninexpression wurde als Kontrollparameter verwendet, um im Gewebe die begleitenden Volumen-bezogenen Veränderungen anzuzeigen; bei niedrig-Salzdiät war die Reninexpression signifikant erhöht, bei hoch-Salzdiät erniedrigt. Kontrolltiere lagen etwa in der Mitte. Damit war die erwartete Wirkung der Diäten auf den Volumenhaushalt indirekt bestätigt. Die renale Cx37 mRNA-Expression wurde mit TaqMan Analyse untersucht. Im Vergleich zur Kontrolle und hoch-Salzdiät zeigten die Ratten mit niedrig-Salzdiät signifikant höhere Cx37 mRNA-Expression. Zusätzlich wurde die Proteinmenge von Cx37-Menge in kortikalen Membranfraktionen mit Western blot ausgewertet. Eine einzelne, Cx37-spezifische Bande erschien in jedem Blot. Im Vergleich zu den Kontrollen und der hoch-Salzdiät-Gruppe zeigten die Tiere mit niedrig-Salzdiät eine signifikant höhere Cx37-Menge. Die Änderungen von Cx37 mRNA und Protein-Expression waren damit prinzipiell - zumindest im Nierenkortex - übereinstimmend. Ein Teil des Anstiegs von immunreaktivem Cx37 war im distalen Tubulus bei Ratten der niedrig-Salzdiät-Gruppe gefunden. Inwieweit sich im Diätenversuch auch die vaskuläre Cx37-Expression änderte, konnte nicht mit Sicherheit ermittelt werden. In medullären Membranfraktionen wurden keine klaren Effekte zwischen den Gruppen beobachtet.

5. Diskussion

5.1 Chronischer NO-Mangel in der Niere

Die physiologischen Wirkungen von NO im kardiovaskulären System sind zahlreich und komplex. Die kardiovaskulären Parameter Angiogenese, Blutgerinnung, Gefäßtonus, Blutfluss, Blutdruck sowie Gefäßzellapoptose und Vaskulitiden rechnen hierzu (23-30). Besonders der Mangel an NO in Blutgefäßen ist hier verantwortlich. Spezifische Einflüsse von NO auf die Nierenfunktion sind bekannt (31,32). In unserem Modell konnte durch chronische, subhypertensive NO-Gabe ein Zustand herbeigeführt werden, der Frühstadien chronischer Nierenerkrankungen charakterisiert. Endotheliale Pathologie, Thrombozytenaggregation in der Endstrombahn, Leukozytenadhäsion und fokale, geringgradige Fibrose sowie kapillare Rarifizierung der Niere wurden beobachtet. Diese lieferten zwar insgesamt das Bild einer geringgradigen pathologischen Veränderung, zeigten jedoch, dass primäre, chronische Störungen des Gefäßendotheliums klare Züge der Entwicklung hin zu einer Nephrosklerose führen können. Diese wie auch die parallel auftretende tubulointerstitielle Vernarbung bestimmen den Fortschritt chronischer Nierenerkrankungen (33-38). Therapeutische Strategien, die den Fortschritt einer Nephrosklerose aufhalten, umfassen daher die Gabe von L-Arginin auf ähnlicher Höhe wie Pharmaka zur RAS-Inhibition oder zur Aktivierung des Bradykinin B2-Rezeptors, die alle als Agonisten des L-Arginin-eNOS-Systems fungieren (39-41). Dessen Intaktheit ist ein wichtiger Prädiktor der individuellen Empfindlichkeit für Nierenschäden (42, 43).

Unseren Untersuchungen vorausgegangen war die Ermittlung von kardiovaskulär relevanten Kandidatengenen, die für die Progression der Pathogenese durch NO-Mangel bedingten Nierenschäden bedeutsam sind. In Kulturen von HUVEC-Zellen wurde eine substantielle Hochregulation von Kollagen XVIII und seinem anti-angiogenen Fragment Endostatin beobachtet (31). Dieser Befund stützte die vermutete Rolle von NO und der endothelialen Intaktheit bei progressiver Nierenerkrankung wesentlich. Zur Bestätigung dieser Hypothese dienten unsere Experimente an der Maus-Endothelzelllinie (MyEnd-Zellen), die als Legitimation für unser *in vivo* Tiermodell dienen sollte. NO-Mangel erzeugte auch in den MyEnd-Zellen erhöhte Endostatinproduktion. Im Mausmodell waren die Endostatinwerte unter L-NMMA-induziertem, chronischem NO-Mangel zwar am Versuchsende nach 6 Monaten nicht stark erhöht, doch zeigten sich charakteristische Elemente der Gefäßregression wie Lipofuszingranula, Masson-Trichrom-positive, fibrotische Areale in perivaskulärer Lage und die oben genannten Endothelschädigungen, die zusammengenommen auch im *in vivo* Modell die Hypothese einer Rolle von NO-Mangel für die chronische Nierenerkrankung bestätigten. Die Effekte waren allerdings nicht sehr drastisch und entsprachen eher der Dynamik eines natürlichen Fortschreitens endothelialer Veränderungen. Es resultierte daher die Einsicht, geeignete Doppelbelastungen zu testen, in denen eine bestehende Nierenerkrankung mit NO-Inhibition kombiniert wird.

5.2 Geringgradiger NO-Mangel bei UUO

In diesem Sinne, dass eine Doppelbelastung vielleicht aussagefähiger wäre, wurde bei dem Modell der unilateralen Ureterobstruktion (UUO), das durch progressive Nierenfibrose und tubulo-interstitielle Narbenbildung charakterisiert ist, die Wirkung geringgradiger L-NMMA-Gabe zur Drosselung des endothelialen NO-Systems ebenfalls im chronischen Verlauf getestet. Bei der Auflösung der Obstruktion werden Nierenfunktion und strukturelle Histoarchitektur des Nierenparenchyms graduell in Abhängigkeit pathogener Faktoren wiederhergestellt (44, 45). Meine Mitwirkung beschränkte sich hier auf die anatomische Analyse der Tiere, die in einer Koautorschaft ihren Niederschlag fand (Park, Stoessel 2009). Nur ein Teil der hierzu in New York durchgeführten Arbeiten ist daher von mir selbst erledigt worden. Als Resultat konnte hier festgehalten werden, dass geringgradiger NO-Mangel bei UUO zu einer signifikanten Verminderung der Rekrutierung verschiedener Stammzellpopulationen führte; auch wenn im Endergebnis nach RUUO dieser Effekt nicht sichtbar war, da NOS-teilinhivierte und Kontrolltiere in der postobstruierten Niere ähnliche Wiederherstellungs-Score-Werte zeigten, so ist die eingeschränkte NO-Verfügbarkeit im Gefäßbett dennoch vermutlich eine wichtige Voraussetzung für die Regenerationsbedingungen des Nierengewebes nach Auflösung der Obstruktion. Bei Zusatzbelastungen, wie sie bei humaner Nierenerkrankung auftreten, könnte dies hinsichtlich der Regenerationsfähigkeit durch Stammzellmobilisierung eine erhöhte Relevanz erreichen (46).

5.3 Connexin 37 in Gefäßendothelien und in Epithelien

Unsere Daten über die endotheliale und epitheliale Lokalisierung des Gap-junctionalen Connexins Cx37 zeigten eine Reihe neuer Erkenntnisse mithilfe der eingesetzten hochauflösenden Techniken. Die vaskuläre Lokalisation war in den Endothelien konzentriert und konnte nach Gefäßtypen anatomisch zugeordnet werden. Die Verteilungsanalyse von Cx37 stützte hiermit funktionelle Daten zur Ausbreitung konstruktiver Antworten und zur Empfindlichkeit für atherogenetische Veränderungen (47, 48). Zusätzlich wurde eine signifikante epitheliale Lokalisation von Cx37 vorwiegend auf der basolateralen Seite, die mit inter- sowie intrazellulärer Kommunikation zwischen Zellfortsätzen oder mit einer Hemikanalfunktion an Zelloberflächen in Verbindung gebracht wurde; hier konnte ein Bezug zur möglichen Freisetzung von ATP hergestellt werden (49-51). Vermehrte Cx37-Expression in Ratten unter niedrig-Salzgabe bedeutete eine adaptive Antwort auf den Natrium-Reabsorptionsmechanismus der Nierentubuli, die dahingehend interpretiert wurde, dass eine assoziierte, vermehrte ATP-Freisetzung vielleicht regulierend auf den tubuloglomerulären Feedback-Mechanismus unter Salzrestriktion wirken könnte, wie andernorts beobachtet (52). Die Resultate können als Grundlagen für die Wirkung von NO bei der interzellulären Kommunikation vaskulärer Zellen über Cx37 verstanden werden, welche für die Tonuseinstellung bedeutsam ist (20, 21). Durch NO beeinflussbare Interaktionen auf epithelialer Ebene können ebenfalls in Betracht gezogen werden.

Zusammenfassend sind in meinen hier aufgeführten Arbeiten Daten dargelegt worden, die die Rolle von NO bei chronischer Nierenerkrankung in Modellen mit dem Fokus der Veränderungen der Gefäßbiologie bei geringgradiger, subpressorischer NOS-Inhibition beleuchten. Zusätzlich wurde die Verteilung des Connexins Cx37 als Mittler von Zell-Zellkommunikation und Zielprotein für NO-abhängige Interaktion analysiert. Eine weitere, hier nicht aufgeführte Arbeit von mir zu Cx43, die noch nicht publiziert, aber abgeschlossen ist, zeigt ebenfalls endotheliale und epitheliale Muster und regulatorische Aspekte, die in diesem Funktionszusammenhang von Bedeutung sein können.

6. Literaturliste

1. Goligorsky MS. Nephrology Forum: Endothelial cell dysfunction: the pivotal role of nitric oxide synthase. *Kidney Int* 58: 1360-1376, 2000.
2. Vallance P. Importance of ADMA in cardiovascular risk. *Lancet* 358: 2096-2097, 2001.
3. Sbaa E, Dewever J, Martinive P, Bouzin C, Frerart F, Balligand JL, Dessy C, Feron O. Caveolin plays a central role in endothelial progenitor cell mobilization and homing in SDF-1-driven postischemic vasculogenesis. *Circ Res* 98: 1219-1227, 2006.
4. Aisaka K, Gross F, Griffith OW, Levi R. L-arginine availability determines the duration of acetylcholine-induced systemic vasodilation in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 163(2): 710-717, 1989.
5. Achan V, Broadhead M, Malaki M, Leiper J, MacAllister R, Vallance P. ADMA causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by DDAH. *ATVB* 23: 1455-1459, 2003.
6. Aisaka K, Gross F, Griffith OW, Levi R. NG-methylarginine, an inhibitor of endothelium-derived nitric oxide synthesis, is a potent pressor agent in the guinea pig: does nitric oxide regulate blood pressure in vivo? *Biochem Biophys Res Commun* 160 (2): 881-886, 1989.
7. Birks EJ, Yacoub MH. The role of nitric oxide and cytokines in heart failure. *Coron Artery Dis* 8(6): 389-402, 1997.
8. Bohle A, Mackensen-Haen S, von Gise H. Significance of tubulointerstitial changes in the renal cortex for the excretory function and concentration ability of the kidney. *Am J Nephrol* 7: 421-433, 1987.
9. Brenner B. Remission of renal disease: recounting the challenge, acquiring the goal. *J Clin Invest* 110: 1753-1758, 2002.

10. Zoccali C, Bode-Boger S, Mallamaci F, Boger R. Plasma concentration of ADMA and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet* 358: 2113-2117, 2001.
11. Eitner F, Floege J. Novel insights into renal fibrosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 12: 227-232, 2003.
12. Abu-Soud H, Feldman P, Clark P, Stuehr D. Electrontransfer in the nitric oxide synthases. Characterization of L-arginine analogs that block heme iron reduction. *J Biol Chem* 269: 32318-32326. 1994.
13. Stoessel A, Paliege A, Theilig F, Addabbo F, Ratliff B, Waschke J, Patschan D, Goligorsky MS, Bachmann S. Indolent course of tubulointerstitial disease in a mouse model of subpressor, low-dose nitric oxide synthase inhibition. *Am J Renal Physiol* 295 (3): F 717-725, 2008.
14. Meşe G, Richard G, White TW. Gap junctions: Basic structure and function. *J Invest Dermatol* 127: 2516-2524, 2006.
15. Haefliger JA, Krattinger N, Martin D, Pedrazzini T, Capponi A, Döring B, Plum A, Charollais A, Willecke K, Meda P. Connexin43-dependent mechanism modulates renin secretion and hypertension. *J Clin Invest* 116(2): 405-413, 2006.
16. Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, Martinez AD, Beyer EC. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev* 83: 1359-1400, 2003.
17. Arensbak B, Mikkelsen HB, Gustafsson F, Christensen T, Holstein-Rathlou NH. Expression of connexin 37, 40, and 43 mRNA and protein in renal preglomerular arterioles. *Histochem Cell Biol* 115: 479-487, 2001.
18. Barajas I, Liu L, Tucker M. Localization of connexin43 in rat kidney. *Kidney int* 46: 621-626, 1994.
19. Hanner F, Schnichels M, Zheng-Fischhöfer Q, Yang LE, Toma I, Willecke K, McDonough AA, Peti-Peterdi J. Connexin 30.3 is expressed in the kidney but not regulated by dietary salt or high blood pressure. *Cell comm and adhes* 15: 219-230, 2008.
20. Kameritsch P, Khandoga N, Nagel W, Hundhausen C, Lidington D, Pohl U. Nitric oxide specifically reduces the permeability of Cx37-containing gap junctions to small molecules. *J Cell Physiol* 203: 233-242, 2005.
21. McKinnon R, Bolon M, Wang HX, Swarbreck S, Kidder GM, Simon AM, Tymk K. Reduction of electrical coupling between microvascular endothelial cells by NO depends on connexin 37. *AJP Heart* 297: H93-H101, 2009.
22. Câmpean V, Theilig F, Paliege A, Breyer M, Bachmann S. Key enzymes for renal prostaglandin synthesis: site-specific expression in rodent kidney (rat, mouse). *Am J Physiol Renal Physiol*. 285(1):F19-F32, 2003.

23. Kang D, Kanellis J, Hugo C, Johnson R. Role of microvascular endothelium in progressive renal disease. *J Am Soc Nephrol* 13: 806-816, 2002.
24. Kang D, Nakagawa T, Feng L, Johnson R. Nitric oxide modulates vascular disease in the remnant kidney model. *Am J Pathol* 161: 239-248, 2002.
25. Lan HY. Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation mechanisms in proximal tubule cells. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 12: 25-29, 2003.
26. Lee L, Meyer T, Pollock A, Lovett D. Endothelial cell injury initiates glomerular sclerosis in the rat remnant kidney. *J Clin Invest* 96: 953-964, 1995.
27. Li J, Bombeck CA, Yang S, Kim YM, Billiard TR. Nitric oxide suppresses apoptosis via interrupting caspase activation and mitochondrial dysfunction in cultured hepatocytes. *J Biol Chem* 274(24): 17325-17333, 1999.
28. Morbidelli L, Donnini S, Ziche M. Role of nitric oxide in the modulation of angiogenesis. *Curr Pharm Des* 9(7): 521-530, 2003.
29. Mordvintsev PI, Rudneva VG, Vanin AF, Shimkevich LL, Khodorov BI. Inhibition of platelet aggregation by dinitrosyl iron complexes with low molecular weight ligands. *Biokhimiia* 51(11): 1851-7, 1986.
30. Morris ST, McMurray JJ, Spiers A, Jardine AG. Impaired endothelial function in isolated human uremic resistance arteries. *Kidney Int* 60(3): 1077-1082, 2001.
31. O'Riordan E, Mendeleev N, Patschan S, Patschan D, Eskander J, Cohen-Gould L, Chander P, Goligorsky MS. Chronic NOS inhibition actuates endothelial-mesenchymal transformation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H285-H294, 2007.
32. Paliege A, Pasumarthy A, Mizel D, Yang T, Schnermann J, Bachmann S. Effect of apocynin treatment on renal expression of COX-2, NOS1, and renin in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290: R694-R700, 2006.
33. Papapetropoulos A, Garcia-Cardeña G, Madri JA, Sessa WC. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest* 100(12): 3131-3139, 1997.
34. Patschan S, Chen J, Polotskaia A, Mendeleev N, Cheng J, Patschan D, Goligorsky MS. Lipid mediators of autophagy in stress-induced premature senescence of endothelial cells. *Am J Physiol Heart* 294: H1119-H1129, 2008.
35. Peters H, Daig U, Martini S, Ruckert M, Schaper F, Liefeldt L, Kramer S, Neumayer H. NO mediates antifibrotic actions of L-arginine supplementation following induction of anti-thy1 glomerulonephritis. *Kidney Int* 64: 509-518, 2003.
36. Prabhakar SS. L-arginine-nitric oxide pathway in end-stage renal disease. *Am J Kidney Dis*

39(1): 195-198, 2002.

37. Quaschnig T, Voss F, Relle K, Kalk P, Vignon-Zellweger N, Pfab T, Bauer C, Theilig F, Bachmann S, Kraemer-Guth A, Wanner C, Theuring F, Galle F, Hocher B. Lack of endothelial nitric oxide synthase promotes endothelin-induced hypertension: lessons from endothelin-1 transgenic/endothelial nitric oxide synthase knockout mice. *J Am Soc Nephrol* 18(3): 730-740, 2007.

38. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 2(8567): 1057-1058, 1987.

39. Schanstra J, Neau E, Drogoz P, Gomez M, Lopez-Novoa J, Calise D, Pecher C, Bader M, Girolami J, Bascands J. In vivo bradikinin B2 receptor activation reduces renal fibrosis. *J Clin Invest* 110: 371-379, 2002.

40. Smirnova I, Kajstura M, Sawamura T, Goligorsky MS. Asymmetric dimethylarginine upregulates LOX-1 in activated macrophages: the role in foam cell formation. *Am J Physiol Heart* 287: H782-H790, 2004.

41. Smirnova I, Sawamura T, Goligorsky MS. Upregulation of lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) in endothelial cells by NO deficiency. *Am J Physiol Renal* 287: F25-F32, 2004.

42. Stroikin Y, Dalen H, Loof S, Terman A. Inhibition of autophagy with 3-methyladenine results in impaired turnover of lysosomes and accumulation of lipofuscin-like material. *Eur J Cell Biol* 83: 583-590, 2004.

43. Valkonen V, Palva H, Salonen J, Lakka T. Risk of acute coronary events and serum concentration of ADMA. *Lancet* 358: 2127-2128, 2001.

44. Brenner BM. Remission of renal disease: recounting the challenge, acquiring the goal. *J Clin Invest* 110: 1753-1758, 2002.

45. Cochrane AL, Kett MM, Samuel CS, Campanale NV, Anderson WP, Hume DA, Little MH, Bertram JF, Ricardo SD. Renal structural and functional repair in a mouse model of reversal of ureteral obstruction. *J Am Soc Nephrol* 16: 3623-3630, 2005.

46. Nakagawa T, Kang DH, Ohashi R, Suga S, Herrera-Acosta J, Rodriguez-Iturbe B, Johnson RJ. Tubulointerstitial disease: role of ischemia and microvascular disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 12: 233-241, 2003.

47. McKinnon RL, Lidington D, Bolon M, Ouellette Y, Kidder GM, Tymk K. Reduced arteriolar conducted vasoconstriction in septic mouse cremaster muscle is mediated by nNOS-derived NO. *Cardiovasc Res* 69: 236-244, 2006.

48. Wong CW, Christen T, Roth I, Chadjichristos CE, Derouette JP, Foglia BF, Chanson M, Goodenough DA, Kwak BR. Connexin37 protects against atherosclerosis by regulating monocyte adhesion. *Nature Medicine* 12: 950-954, 2006.

49. Jensen ME, Odgaard E, Christensen MH, Praetorius HA, Leipziger J. Flow-induced $[Ca^{2+}]$ increase depends on nucleotide release and subsequent purinergic signaling in the intact nephron. *J Am Soc Nephrol* 18: 2062-2070, 2007.
50. Satlin LM, Sheng S, Woda CB, Kleyman TR. Epithelial Na^{+} channels are regulated by flow. *Am J Physiol Renal Physiol* 280(6): F1010-F1018, 2001.
51. Schwiebert EM, Zsembery A. Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1615: 7-32, 2003.
52. Komlosi P, Peti-Peterdi J, Fuson AL, Fintha A, Rosivall L, Bell PD. Macula densa basolateral ATP release is regulated by luminal $[NaCl]$ and dietary salt intake. *Am J Physiol* 286: F1054-1058, 2004.
53. Park HC, Yasuda K, Ratliff B, Stoessel A, Sharkovska Y, Yamamoto I, Jasmin JF, Bachmann S, Lisanti MP, Chander PN, and Goligorsky M. Post-obstructive regeneration of the kidney is derailed when surge in renal stem cells during the course of unilateral ureteral obstruction is halted. *Am J Physiol Renal Physiol* 298(2): F 357-364, 2010.
54. Stoessel A, Himmerkus N, Bleich M, Bachmann S, Franziska Theilig F. Connexin 37 is localized in renal epithelia and responds to changes in dietary salt intake. *Am J Physiol Renal Physiol* 298(1): F216-F223, 2010.

Widmung

Für meine Eltern Swetlana Erschowa und Erich Stößel.

Danksagung

Ohne die Ermutigungen und Unterstützung von vielen lieben Menschen wäre meine Promotionsarbeit nicht zu Stande gekommen.

Mein herzlicher Dank gilt an erster Stelle Herrn Professor Dr. Sebastian Bachmann für seine stetige Unterstützung meiner wissenschaftlicher Arbeit sowie für die kontinuierliche Beratung bei der Fertigstellung der verschiedenen Manuskripte und der Dissertation.

Besonderer Dank geht meinen hochmotivierten Betreuern Dr. med. Franziska Theilig und Dr. med. Alexander Paliege; ohne ihre Beteiligung, Geduld und Lehre wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Mein Dank geht an unseren Kooperationspartner Prof. Dr. Goligorsky, mit dem gemeinsam dieses Projekt realisiert und fertiggestellt werden konnte.

Ein großes Dankeschön geht an alle meine KollegInnen in der Arbeitsgruppe Bachmann für die exzellente technische Assistenz bei der Fertigstellung einiger der in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen: Kerstin Riskowsky, Frauke Grams, Petra Schrade, Petra Landmann, und für die intra- sowie internationale Kommunikation an Pascale Schulte.

Und auch für die vielen heiteren Stunden „meines Laborlebens“ mit Musikkonzerten, Volleyballspielen und leckeren Schlemmereien möchte ich mich bei Kerim Mutig, Yuliya Sharkovska, Alexandra Böhlick, Thomas Kahl, Marcus Pohl, Jörg Mengwasser und Izumi Yamamoto bedanken.

Nicht zuletzt gebührt mein herzlicher Dank meiner lustigen Nichte Karina Stößel, meinem Bruder Eduard Stößel und ganzer Familie Gaus.

Vielen Dank.

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Adelina Stößel, erkläre, dass ich die vorgelegte Zusammenfassung mit dem Thema: „Stress-induzierte Nierenfibrose – Komponenten des Endothels und der Epithelien“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

26. 05. 2010 Berlin

Adelina Stößel

Publikationsliste

Stoessel A, Paliege A, Theilig F, Addabbo F, Ratliff B, Waschke J, Patschan D, Goligorsky MS, Bachmann S. Indolent course of tubulointerstitial disease in a mouse model of subpressor, low-dose nitric oxide synthase inhibition. *Am J Renal Physiol* 295 (3): F 717-725, 2008.

Stoessel A, Himmerkus N, Bleich M, Bachmann S, Franziska Theilig F. Connexin 37 is localized in renal epithelia and responds to changes in dietary salt intake. *Am J Physiol Renal Physiol* 298(1): F216-F223, 2010.

Park HC, Yasuda K, Ratliff B, Stoessel A, Sharkovska Y, Yamamoto I, Jasmin JF, Bachmann S, Lisanti MP, Chander PN, and Goligorsky M. Post-obstructive regeneration of the kidney is derailed when surge in renal stem cells during the course of unilateral ureteral obstruction is halted. *Am J Physiol Renal Physiol* 298(2): F 357-364, 2010.