

Aus dem  
CharitéCentrum für Innere Medizin,  
Kardiologie, Gastroenterologie, Nephrologie  
Klinik für Nephrologie und Internistische Intensivmedizin  
Direktor: Professor Dr. Ulrich Frei

## **Habilitationsschrift**

# **Aktivierung von Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktoren in der Niere der Ratte und des Menschen**

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

**Dr. med. Christian Rosenberger**  
**geboren am 17.09.1966 in Temeschburg/Rumänien**

Eingereicht: im Dezember 2007  
Dekan: Professor Dr. med. M. Paul  
1. Gutachter: Professor Dr. med. H. Pavenstädt  
2. Gutachter: Professor Dr. med. W. Jelkmann

für Alina, Nora Maria, Adrian und meine Eltern

## Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Renale Sauerstoffversorgung	1
1.2	Was ist Hypoxie	3
1.3	Hypoxie als möglicher pathophysiologischer Faktor in der Niere	3
1.4	Hypoxie-induzierbare Faktoren als Indikatoren für zelluläre Hypoxie	4
1.5	Pimonidazol-Verbindungen als Indikatoren für zelluläre Hypoxie	7
1.6	Wissenschaftliche Fragestellung und Konzept	8
2.	Originalarbeiten	9
2.1	Expression von Hypoxie-induzierbarem Faktor-1 $\alpha$ und -2 $\alpha$ in hypoxischen und ischämischen Nieren	9
2.2	Zelluläre Antworten auf Hypoxie nach segmentalem Niereninfarkt	12
2.3	Hochregulation von HIF im experimentellen akuten Nierenversagen: Hinweis auf eine protektive transkriptionelle Antwort auf Hypoxie	14
2.4	Hypoxie-induzierbare Faktoren und Überleben von Tubuluszellen in der isoliert perfundierten Niere	17
2.5	Immunhistochemischer Nachweis von Hypoxie-induzierbarem Faktor-1 $\alpha$ in humanen Nierentransplant-Biopsien	20
2.6	Anpassung an Hypoxie in der Niere der diabetischen Ratte	22
2.7	Hinweise für anhaltende renale Hypoxie und vorübergehende Hypoxie-anpassung im experimentellen Rhabdomyolyse-induzierten akuten Nierenversagen	25
3.	Diskussion, Schlußfolgerungen, offene Fragen	27
3.1	Definition der Hypoxie im Lichte der eigenen Daten	27
3.2	Validität der angewandten Methoden für den Nachweis von Hypoxie in vivo	27
3.3	Zellspezifische Expression von HIF $\alpha$ in der Niere	28
3.4	Tubulärer O <sub>2</sub> -Verbrauch als wesentliche Komponente bei der Entstehung renaler Hypoxie	29
3.5	Akutes Nierenversagen	29
3.6	Das Nierentransplantat	30
3.7	Therapeutische Eingriffsmöglichkeiten über das HIF-System	31
4.	Literatur	33
5.	Weitere Publikationen des Autors zum Thema	44

# Aktivierung von Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktoren in der Niere der Ratte und des Menschen

## 1. Einleitung

### 1.1 Renale Sauerstoffversorgung

Obwohl sie etwa 20% des Herzzeitvolumens erhalten [Bolomey et al, Razzak et al] und nur etwa 0,5% des Körpergewichtes ausmachen, gehören die Nieren zu den mit Sauerstoff (O<sub>2</sub>) unterversorgten Organen [Übersicht bei Brezis und Rosen]. Dies trifft insbesondere auf das Nierenmark zu, dessen Blutversorgung gänzlich aus Vasa afferentia der juxtamedullären Glomeruli stammt [Kriz und Kaissling] und nur etwa 20% der gesamten Nierendurchblutung [Aukland und Wolgast] umfaßt. Physiologisch besteht ein O<sub>2</sub>-Gradient von der Rinde zum Mark [Aukland und Krog]. Der Grund dafür liegt im Harnkonzentrierungsmechanismus, der nur bei verminderter Durchblutung des Nierenmarkes und Rückdiffusion zwischen absteigenden (arteriellen) und aufsteigenden (venösen) Vasa recta aufrechterhalten werden kann [Hargitay und Kuhn, Wirz et al, Lassen und Longley, Übersicht bei Pallone et al 2003].

Aber auch in der Nierenrinde ergaben O<sub>2</sub>-Elektroden-Messungen durchgehend Werte unterhalb des Niveaus der Arteria renalis [Baumgärtl et al, Leichtweiss et al, Schurek et al 1990, Welch et al]. Demgegenüber liegt die O<sub>2</sub>-Spannung in den Venae arcuatae über dem Niveau der Nierenrinde [Welch et al]. Beatmung mit 100% O<sub>2</sub> erhöht den pO<sub>2</sub> der Nierenrinde nur von 45 auf 80 mmHg, während der pO<sub>2</sub> des systemischen arteriellen Blutes von 90 auf 600 mmHg steigt [Schurek et al 1990]. Eine solche Konstellation lässt sich mit einem präglomerulären arterio-venösen O<sub>2</sub>-Kurzschluß (Shunt) erklären [Levy und Imperial, Schurek et al 1990, O'Connor et al], auch wenn das anatomische Korrelat dafür bisher nicht identifiziert werden konnte. Innerhalb der Nierenrinde sind die O<sub>2</sub>-Spannungen sehr heterogen [Aukland und Krog, Leichtweiss et al], wenn auch bisher keine genauere anatomische Zuordnung möglich war.

Wahrscheinlich jedoch entsprechen die Markstrahlen den Rindenbereichen mit der niedrigsten  $O_2$ -Spannung [Brezis und Rosen]. Die Blutversorgung der Markstrahlen erfolgt nämlich, im Gegenteil zum Rindenlabyrinth, aus aufsteigenden (also venösen) Vasa recta [Übersicht in Kriz 1982].

Das  $O_2$ -Gefälle zwischen Nierenrinde und -mark wird offensichtlich nur bei glomerulärer Filtration und tubulärem  $O_2$ -Verbrauch für die Rückgewinnung von Wasser und Salzen aufrechterhalten. Bei Abfall des Nierenperfusiondruckes unter die Nierenautoregulationsschwelle verschwindet dieses  $O_2$ -Gefälle [Brezis et al 1994a]. Dadurch kann ein Abfall der Nierenfunktion, wie im akuten Nierenversagen, paradoxerweise eine Verbesserung des Nieren- $pO_2$  hervorrufen, was den Organerhalt fördern kann. Dies führte Thureau et al zu der Überlegung, daß aus Sicht der Niere ein akutes Nierenversagen (ANV) ein „akuter Nierenerfolg“ bedeuten kann [Thureau et al]. Hemmung des tubulären Rücktransportes erhöht regional den  $pO_2$ : Schleifendiuretika im Mark und Acetazolamid in der Rinde [Brezis et al 1994b].

Eine weitere Besonderheit der renalen  $O_2$ -Versorgung besteht darin, daß der kapilläre Hämatokrit nur etwa die Hälfte des Wertes der Nierenarterie bzw. -vene ausmacht [Pappenheimer und Kinter, Zimmerhackl et al]. Erythrozyten werden bei laminarem Blutfluß in die Gefäßmitte gedrängt, was als „skimming phenomenon“ bezeichnet wird. Betrachtet man die renalen Interlobulararterien auf ihrem senkrechten Verlauf von der Arteria arcuata in Richtung Nierenkapsel, so könnte durch das „Skimming“ in den frühen Gefäßabgängen (also in den afferenten Arteriolen der juxtamedullären Nephrone) mehr Plasma als Erythrozyten eingespeist werden. Dies würde den verminderten Hämatokrit in den Vasa recta [Zimmerhackl et al] erklären. Demgegenüber würde der Hämatokrit der Interlobulararterien nach jedem Abgang von afferenten Arteriolen zunehmen, was einen erhöhten kapillären Hämatokrit in der oberflächlichen Rinde zur Folge hätte. Viel wahrscheinlicher ist aber ein Kurzschluß von

Erythrozyten zwischen Arteria und Vena interlobularis, was einen verminderten kapillären Hämatokrit in der gesamten Niere erzeugen könnte. Auch wenn ein solcher Kurzschluß anatomisch bisher nicht belegt werden konnte, erklären diese Daten, warum ein Abfall des systemischen Hämatokrits erhebliche Auswirkungen auf die renale O<sub>2</sub>-Versorgung hat [Johannes et al].

Eine Reihe von lokalen Anpassungsvorgängen stellen innerhalb der Niere einen ausgeglichenen O<sub>2</sub>-Haushalt sicher. So führen z.B. Stickstoffmonoxyd (NO) und Prostaglandine sowohl zu einem höheren medullären Blutfluß [Kirschenbaum et al, Lemley et al, Agmon und Brezis, Agmon et al 1994, Cowley et al, Dickhout et al] (also zu einem erhöhten O<sub>2</sub>-Angebot), als auch zu einer verminderten tubulären Rückresorption von Salzen (also zu einem geringeren O<sub>2</sub>-Verbrauch) [Jabs et al, Kaji et al, Lear et al, Wald et al 1990, Ortiz et al 2001].

## **1.2 Was ist Hypoxie**

Für den Begriff „Hypoxie“ gibt es z.Z. keine allgemein gültige Definition. Biochemische Studien belegen, dass Zellen unter O<sub>2</sub>-Armut entweder ihren ATP-Verbrauch (und somit den O<sub>2</sub>-Verbrauch) drosseln, was zu einem neuen Gleichgewicht führt, oder aber Schaden nehmen [Übersicht in Hochachka et al]. Für die nachfolgende Arbeit wird folgende Begriffsbestimmung vorgeschlagen: Hypoxie ist ein Ungleichgewicht zwischen O<sub>2</sub>-Angebot und O<sub>2</sub>-Verbrauch auf zellulärer Ebene. Demnach wäre die Niere physiologisch normoxisch.

## **1.3 Hypoxie als möglicher pathophysiologischer Faktor in der Niere**

Lokal begrenzte Hypoxie wird heutzutage als ein wichtiger Faktor bei der Entstehung und Progression verschiedener Nierenerkrankungen angesehen [Übersichten in Nangaku, Fine et al]. Historisch gesehen dürften in erster Linie drei Beobachtungen zu dieser Auffassung geführt haben: Erstens, durch Abklemmen und Wiedereröffnen der Nierenarterie (sog. warme Ischämie und Reperfusion) lässt sich bei

Nagern ein ANV auslösen [Shanley et al]. Zweitens, die Progression von chronischen Nierenerkrankungen korreliert am besten mit dem Ausmaß der tubulo-interstitiellen Fibrose [Bohle et al], also mit der Entfernung von O<sub>2</sub>-spendenden Kapillaren zu den O<sub>2</sub>-verbrauchenden Tubuli. Drittens, in Nierentubuluszellkulturen führt O<sub>2</sub>-Mangel zu erhöhter Matrixproduktion [Orphanides et al].

Obwohl diese Hypoxie-Theorie sehr attraktiv erscheint, ist sie keineswegs bewiesen. Das ANV des Menschen tritt äußerst selten nach kompletter Unterbrechung der Nierendurchblutung auf und O<sub>2</sub>-Messungen an Versuchstieren mit chronischer Nierenfunktionseinschränkung ergaben sogar höhere Werte im Vergleich zu gesunden Nieren [Priyadarshi et al]. Folglich ist es von Interesse, Methoden des Hypoxienachweises zu entwickeln und diese an Nieren von Versuchstieren und Menschen einzusetzen.

#### **1.4 Hypoxie-induzierbare Faktoren als Indikatoren für zelluläre Hypoxie**

Anfang der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts führte die Erforschung der Regulation des blutbildenden Hormons Erythropoietin (EPO) zur Entdeckung eines weit verbreiteten Systems von Transkriptionsfaktoren [Semenza und Wang 1992] sowie später von zellulären O<sub>2</sub>-Fühlern [Ivan et al, Jaakkola et al]. Die sog. Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktoren (HIF) sind Heterodimere, bestehend aus einer variablen und O<sub>2</sub>-abhängigen Alpha-Untereinheit (HIF $\alpha$ ), nebst einer konstitutiven Beta-Untereinheit (HIF $\beta$ ) [Übersichten in Maxwell, Semenza 2004]. Die Regulation von HIF $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$  und -2 $\alpha$  sind die am besten erforschten Isoformen) erfolgt durch O<sub>2</sub>-abhängige Proteolyse [Übersichten in Maxwell, Semenza 2004, Wenger].

Schlüsselenzyme des HIF $\alpha$ -Abbaus sind sogenannte HIF-Prolyl-Hydroxylasen (PHD), welche zwei Hydroxylgruppen an HIF $\alpha$  hängen [Ivan et al, Jaakkola et al]. Hydroxyliertes HIF $\alpha$  wird von dem von-Hippel-Lindau-Protein (pVHL, einer Ubiquitin-

Ligase) als Substrat erkannt, womit eine Kaskade von proteasomalen Abbauschritten des HIF $\alpha$  eingeleitet wird. PHD enthalten in ihrem katalytischen Zentrum ein Fe $^{2+}$ -Ion, benötigen O $_2$  als Substrat und  $\alpha$ -Ketoglutarat als Kosubstrat. Ihre Michaelis-Menten-Konstante liegt im Bereich physiologischer O $_2$ -Spannungen, womit diese Enzyme wichtige Anforderungen an einen zellulären O $_2$ -Fühler erfüllen [Epstein et al]. Gleichzeitig liegt in der pharmakologischen Blockade von PHD eine sehr wirksame Methode der HIF-Aktivierung. Übergangsmetallionen (wie Co $^{2+}$ , Cu $^{2+}$ , Zn $^{2+}$ ), Eisenchelatoren und  $\alpha$ -Ketoglutarat-Analoga gelten als unspezifische Inhibitoren der PHD.

Die HIF $\alpha\beta$ -Dimere wirken im Zellkern, wo sie die Transkription einer Reihe von Genen steuern, von denen die meisten eine Hypoxie-Anpassung fördern. Unter den mittlerweile fast 100 HIF-Zielgenen [Übersichten in Wenger, Rosenberger et al 2005] finden sich Schlüsselenzyme der Glykolyse, Vasodilatoren (induzierbare NO-Synthase [iNOS], Adrenomedullin), EPO, Radikalfänger (Häm-Oxygenase-1 [HO-1]), angiogenetische Faktoren (vascular endothelial growth factor [VEGF] und VEGF-Rezeptor-Typ-2 [Flt-1]), Zellzyklusenzyme (p21).

Untersuchungen an verschiedenartigen Zelltypen belegen, dass HIF ein ubiquitäres System darstellt [Tanks et al], rasch unter Hypoxie aktiviert und ähnlich schnell nach Reoxygenierung abgebaut wird (innerhalb von Minuten) [Jewell et al]. Die HIF-Aktivierung ist halbmaximal bei einer O $_2$ -Spannung von 11 bis 15 mmHg, erreicht ein Maximum bei 4 mmHg und nimmt danach ab [Jiang et al]. Eine solche O $_2$ -Beziehung erscheint sinnvoll, da Zellen unter extremer O $_2$ -Armut vermutlich keine Überlebenschance besitzen. Das HIF-System ist ein für die Zelle recht kostspieliges Rettungssystem (unter Normoxie wird HIF $\alpha$  dauernd gebildet und gleich wieder abgebaut), welches auch nur mit einer Verzögerung von mehreren Stunden (der Zeit, die für Transkription und Translation der Zielgene erforderlich ist) zum Tragen kommt.



Da sich etliche physiologische Vorgänge unter recht niedrigen  $O_2$ -Spannungen abspielen (z.B. im Nierenmark), und HIF die Hypoxieanpassung fördert, liegt die Vermutung nahe, daß HIF in solchen Geweben physiologisch aktiviert sein müßte. Demgegenüber steht die Erkenntnis, daß PHD (insbesondere die Isoform PHD-2) selber HIF-Zielgene sind [D'Angelo et al], also durch HIF-Aktivierung auch eine negative Rückkopplung in Gang gesetzt wird. Theoretisch erscheint es daher plausibel, daß in normalerweise dauerhaft  $O_2$ -armen Geweben keine physiologische HIF-Aktivierung stattfindet. Ob HIF in normalen Geweben nachweisbar ist oder nicht, hätte wesentliche Auswirkungen auf unsere Vorstellung und Definition von Hypoxie.

Wenn nun tatsächlich Hypoxie ein Ungleichgewicht aus  $O_2$ -Angebot und – Nachfrage ist, dann bietet  $HIF\alpha$ -Protein eine neue Möglichkeit, Hypoxie in Geweben nachzuweisen. Demgegenüber ist, aufgrund der überwiegend auf Proteinebene stattfindenden HIF-Regulation [Übersichten in Maxwell, Semenza 2004, Wenger], der Nachweis von  $HIF\alpha$ -mRNA zu diesem Zwecke nachrangig. Zu betonen ist, dass ausschließlich ein nukleärer Nachweis von  $HIF\alpha$  mit einem transkriptionell aktiven HIF-System vereinbar ist.

Die Spezifität von  $HIF\alpha$ -Protein für Hypoxie wurde kürzlich in Frage gestellt, nachdem in Zellkulturen unter Raumluft  $HIF\alpha$  durch eine Reihe von Hormonen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren hochreguliert werden konnte [Übersichten in Haddad und Harb, Hellwig-Burgel et al, Dery et al]. Diese sog. normoxische HIF-Aktivierung erfolgt über Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) und/oder mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK), die eine Steigerung der  $HIF\alpha$ -Protein-Synthese und/oder der  $HIF\alpha$ -Transkription herbeiführen [Übersicht in Hellwig-Burgel et al]. Im Gegensatz zur hypoxischen HIF-Aktivierung, die in vitro innerhalb von Minuten nachweisbar ist [Jewell et al], benötigt die normoxische HIF-Aktivierung Stunden [Literaturstellen in Haddad und

Harb, Hellwig-Burgel et al, Dery et al]. In vivo gelingt der Nachweis einer HIF-Aktivierung in der Regel frühestens nach ein bis zwei Stunden eines anhaltenden hypoxischen Reizes [siehe Kapitel 2.1]. Höchstwahrscheinlich liegt auch in vivo eine Zeitspanne von weiteren Stunden zwischen relativ schneller hypoxischer und langsamerer normoxischer HIF-Aktivierung. In vivo gibt es allerdings bisher noch keine Belege für eine normoxische HIF-Aktivierung. Vermutlich spielen Hormone, Zytokine und Wachstumsfaktoren in vivo eine modulierende Wirkung auf die hypoxische HIF-Aktivierung.

### ***1.5 Pimonidazol-Verbindungen als Indikatoren für zelluläre Hypoxie***

Nitroimidazole wie Pimonidazol (PIM) bieten eine weitere Möglichkeit, niedrige O<sub>2</sub>-Spannungen (<10mmHg) in Geweben nachzuweisen [Gross et al]. Ob es sich dabei um echte Hypoxie im Sinne der obigen Definition handelt, oder lediglich um O<sub>2</sub>-Armut bei ausgeglichenem zellulären O<sub>2</sub>-Haushalt, vermag diese Methode nicht zu unterscheiden.

Nitroimidazole wurden als Bestrahlungsverstärker (Radiosensitizer) entwickelt. Sie müssen in vivo verabreicht werden und binden unterhalb eines Gewebe-pO<sub>2</sub> von 10 mmHg kovalent an Thiol-Gruppen [Gross et al], wo sie mit Hilfe käuflicher Anti-Pimonidazol-Antikörper nachgewiesen werden können. Nitroimidazol-Addukte entstehen intra- und extrazellulär weitgehend unabhängig von Redox-Potential und pH [Arteel et al]. Einzelne Vertreter dieser Substanzklasse sind in den USA in der Strahlenmedizin zugelassen, allerdings nicht in der Europäischen Gemeinschaft, weshalb hierzulande der Einsatz nur an Versuchstieren möglich ist.

### ***1.6 Wissenschaftliche Fragestellung und Konzept***

Pharmakologische Beeinflussung des HIF-Systems (mittels moderner synthetischer und spezifischerer PHD-Inhibitoren) ist eine attraktive

Behandlungsmethode für eine Reihe von Nierenerkrankungen, bei denen Hypoxie eine pathophysiologische Rolle spielt [[Übersichten in Nangaku, Rosenberger et al 2005](#)].

Der Autor hat sich die folgenden Fragestellungen gesetzt: 1) ist HIF in der normalen Niere nachweisbar?; 2) ist HIF in experimentellen und humanen Nierenerkrankungen nachweisbar?; wenn ja, 3) was ist die Lokalisation und Kinetik von HIF?; 4) wie verhält sich HIF räumlich und zeitlich zu Pimonidazol-Verbindungen, zu HIF-Zielgenen, Zellschaden und Nierenfunktion?

Schon bald nach Beginn des Projektes stellte sich heraus, daß HIF in der Niere zelltyp-spezifisch aktiviert wird. Da die Niere über 20 verschiedene Zelltypen enthält, birgt die Verwendung von Gewebekomplexen die Gefahr, daß Signale eingeebnet werden. Das Projekt stützt sich deshalb in erster Linie auf Methoden, die eine zelluläre Zuordnung von Veränderungen ermöglicht, also auf Morphologie und Immunhistochemie.

## **2. Originalarbeiten**

### **2.1 Expression von Hypoxie-induzierbarem Faktor-1 $\alpha$ und -2 $\alpha$ in hypoxischen und ischämischen Nieren**

Dies ist eine der ersten immunhistochemischen HIF-Studien in vivo, die erste dieser Art in der Niere der Ratte und quasi die Positivkontrolle für die Methode. HIF wurde über die EPO-Forschung entdeckt [Semenza und Wang 1992], daher wurden als HIF-Positivkontrollen solche Bedingungen gewählt, in denen EPO nachweislich hochreguliert wird: systemische Hypoxie (8% O<sub>2</sub> [Eckardt et al], oder Zumischung von CO zur Atemluft [Eckardt et al] – sog. funktionelle Anämie), Pseudohypoxie (durch CoCl<sub>2</sub> [Beru et al] – einem Hemmer der nachträglich entdeckten HIF-Prolyl-Hydroxylase [Ivan et al, Jaakkola et al], isovolämische Hämodilution [Beru et al].

Der Nachweis von HIF in vivo stellte sich außerordentlich schwierig dar und gelang nur unter Beachtung mehrere Details: standardisierte Fixierung, Kochen im Dampfkochtopf, Benutzung einer speziellen Lösung der Firma DAKO („target retrieving solution“, TRS®, deren Zusammensetzung vom Hersteller geheimgehalten wird) zur Antigendemaskierung, Signalamplifikation auf der Grundlage von Streptavidin-Biotin-Peroxidase („catalyzed signal amplification kit“ der Firma DAKO, CSA®). Ferner war das Signal-zu-Rausch-Verhältnis deutlich günstiger unter Einsatz von Perfusionsfixierung.

Die wichtigsten Erkenntnisse dieser Studie sind folgende: 1) In Kontrollnieren ist, zumindest mit dieser hochempfindlichen Methode, kein HIF nachweisbar, obwohl bekanntermaßen in der Niere physiologische O<sub>2</sub>-Spannungen regional sehr niedrig sein können; 2) Praktisch jeder Zelltyp der Niere besitzt die Fähigkeit, HIF zu aktivieren; 3) Der Nachweis von HIF gelingt in vivo etwa ein bis 2 Stunden nach Beginn eines anhaltenden hypoxischen Reizes; 4) Die beiden Hauptisoformen HIF-1 $\alpha$  und -2 $\alpha$  werden, mit wenigen Ausnahmen, in verschiedenen Zelltypen aktiviert; 5) Die Fähigkeit,

HIF zu aktivieren ist in den verschiedenen Zelltypen der Niere sehr unterschiedlich ausgeprägt; 6) Das Muster der HIF-Aktivierung variiert je nach verwendetem hypoxischen Reiz; 7) HIF-Aktivierung wird begleitet von Hochregulierung von HIF-Zielgenen; 8) Nach Abklemmen der Nierenarterie, der vermutlich ausgeprägtesten Hypoxie, ist die HIF-Aktivierung paradoxerweise deutlich geringer als unter CO<sub>2</sub>-Zumischung zur Atemluft, was dafür spricht, daß die Aktivierbarkeit des HIF-System unter extremer Hypoxie abnimmt.

# Expression of Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$ and -2 $\alpha$ in Hypoxic and Ischemic Rat Kidneys

CHRISTIAN ROSENBERGER,<sup>\*†</sup> STEFANO MANDRIOTA,<sup>‡</sup>  
 JAN STEFFEN JÜRGENSEN,<sup>\*</sup> MICHAEL S. WIESENER,<sup>\*</sup> JAN H. HÖRSTRUP,<sup>\*</sup>  
 ULRICH FREI,<sup>\*</sup> PETER J. RATCLIFFE,<sup>‡</sup> PATRICK H. MAXWELL,<sup>‡</sup>  
 SEBASTIAN BACHMANN,<sup>†</sup> and KAI-UWE ECKARDT<sup>\*</sup>

Departments of <sup>\*</sup>Nephrology and Medical Intensive Care and <sup>†</sup>Anatomy, Charité, Humboldt University, Berlin, Germany, and <sup>‡</sup>Wellcome Trust Centre for Human Genetics, Oxford, United Kingdom.

**Abstract.** Oxygen tensions in the kidney are heterogeneous, and their changes presumably play an important role in renal physiologic and pathophysiologic processes. A family of hypoxia-inducible transcription factors (HIF) have been identified as mediators of transcriptional responses to hypoxia, which include the regulation of erythropoietin, metabolic adaptation, vascular tone, and neoangiogenesis. *In vitro*, the oxygen-regulated subunits HIF-1 $\alpha$  and -2 $\alpha$  are expressed in inverse relationship to oxygen tensions in every cell line investigated to date. The characteristics and functional significance of the HIF response *in vivo* are largely unknown. High-amplification immunohistochemical analyses were used to study the expression of HIF-1 $\alpha$  and -2 $\alpha$  in kidneys of rats exposed to systemic hypoxia bleeding anemia, functional anemia (0.1% carbon monoxide), renal ischemia, or cobaltous chloride (which is known to mimic hypoxia). These treatments

led to marked nuclear accumulation of HIF-1 $\alpha$  and -2 $\alpha$  in different renal cell populations. HIF-1 $\alpha$  was mainly induced in tubular cells, including proximal segments with exposure to anemia/carbon monoxide, in distal segments with cobaltous chloride treatment, and in connecting tubules and collecting ducts with all stimuli. Staining for HIF-1 $\alpha$  colocalized with inducible expression of the target genes heme oxygenase-1 and glucose transporter-1. HIF-2 $\alpha$  was not expressed in tubular cells but was expressed in endothelial cells of a small subset of glomeruli and in peritubular endothelial cells and fibroblasts. The kidney demonstrates a marked potential for upregulation of HIF, but accumulation of HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  is selective with respect to cell type, kidney zone, and experimental conditions, with the expression patterns partly matching known oxygen profiles. The expression of HIF-2 $\alpha$  in peritubular fibroblasts suggests a role in erythropoietin regulation.

---

Received January 29, 2002. Accepted March 7, 2002.

Correspondence to Dr. Kai-Uwe Eckardt, Department of Nephrology and Medical Intensive Care, Charité, Campus Virchow-Klinikum, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany. Phone: ++49-30-4505-53433; Fax: ++49-30-4505-53909; E-mail: kai-uwe.eckardt@charite.de

1046-6673/1307-1721

Journal of the American Society of Nephrology

Copyright © 2002 by the American Society of Nephrology

DOI: 10.1097/01.ASN.0000017223.49823.2A

## **2.2 Zelluläre Antworten auf Hypoxie nach segmentalem Niereninfarkt**

Die Studie wurde angelegt, um die Beteiligung des HIF-Systems bei der Angiogenese in der Niere zu untersuchen. Dazu wurden segmentale Infarkte durch Ligatur eines Nierenarterienastes ausgelöst.

Darüber hinaus wird hier erstmalig durch unser Labor die Pimonidazol-Immunhistochemie angewandt, wobei der Niereninfarkt quasi die ideale Positivkontrolle für die Methode darstellt. Um den eventuellen Einfluß von Nekrosen auf die Pimonidazol-Gewebe-Bindung auszuschließen, wurde ein Nierenarterienast für nur 30 Minuten verschlossen, einen Zeitraum, in dem das Gewebe vital bleibt. Die In-vivo-Injektion von Pimonidazol erfolgte vor der Arterienligatur, um eine Verteilung der Substanz in der gesamten Niere zu erlauben.

Die Studie zeigt, daß 1) das HIF-System und HIF-Zielgene in engem zeitlichen und räumlichen Zusammenhang zur Angiogenese in der Niere aktiviert sind; 2) in normalen perfusionsfixierten Nieren, zumindest mit der hier angewandten Methode, keine Pimonidazol-Verbindungen nachweisbar sind; 3) die Pimonidazol-Immunhistochemie sehr gut in der Lage ist, den ausgeprägten O<sub>2</sub>-Mangel im Niereninfarkt darzustellen; 4) in der Infarktgrenzzone einzelne Tubuli für HIF und Pimonidazol positiv erscheinen, was für ein Ungleichgewicht von O<sub>2</sub>-Angebot und – Verbrauch in diesen Tubuli spricht.

# Cellular responses to hypoxia after renal segmental infarction

**CHRISTIAN ROSENBERGER, WANJA GRIETHE, GERTRUD GRUBER, MICHAEL WIESENER, ULRICH FREI, SEBASTIAN BACHMANN, and KAI-UWE ECKARDT**

*Department of Nephrology and Medical Intensive Care and Institute of Anatomy, Charité, Humboldt University, Berlin, Germany*

## **Cellular responses to hypoxia after renal segmental infarction.**

**Background.** Hypoxia is believed to play an important role in the pathogenesis of acute and chronic kidney disease. However, the impact of low oxygen tensions on cellular functions in the kidney and potential adaptive responses are poorly understood.

**Methods.** In order to assess the effects of regional hypoxia, we induced large segmental renal infarcts in rats by renal artery branch ligation to create an oxygen gradient vertical to the corticomedullary axis and studied the effects on cell morphology, the induction of hypoxia-inducible transcription factors (HIF), the expression of HIF target genes, and cell proliferation.

**Results.** Pimonidazol protein adduct immunohistochemistry, a marker for severe tissue hypoxia, verified a continuous area of hypoxic renal tissue extending from the cortex to the papilla, in which tubular necrosis developed subsequently. Within this area local sparing of pimonidazol staining and tissue preservation was found around arcuate veins, indicating regional oxygen supply via diffusion from venous blood. HIF-1 $\alpha$  was up-regulated within 1 hour and for up to 7 days predominantly in the border zone of the infarct in tubular cells, glomerular cells, resident interstitial cells, capillary endothelial cells, and infiltrating macrophages. HIF-2 $\alpha$  expression was less prominent and confined to resident and infiltrating peritubular cells in the cortex. HIF expression was colocalized with regional up-regulation of the hypoxia-inducible genes heme oxygenase-1 and vascular endothelial growth factor (VEGF), and was followed by capillary and tubular proliferation.

**Conclusion.** Our findings illustrate a marked potential of renal tissue to respond to regional ischemia and initiate adaptive reactions, including angiogenesis.

---

**Key words:** ischemia, hypoxia-inducible factors-1 $\alpha$  and -2 $\alpha$ , heme oxygenase-1, vascular endothelial growth factor, cell proliferation, angiogenesis.

Received for publication February 23, 2003

and in revised form March 20, 2003

Accepted for publication April 23, 2003

© 2003 by the International Society of Nephrology



### **2.3 Hochregulation von HIF im experimentellen akuten Nierenversagen: Hinweise auf eine protektive transkriptionelle Antwort auf Hypoxie**

Die Studie wurde angelegt, um die Beteiligung des HIF-Systems in einem klinisch relevanten und etablierten Modell des durch Röntgenkontrastmittel induzierten ANV (contrast-induced nephropathy, CIN) [Agmon et al] zu untersuchen. CIN tritt gehäuft im Alter, bei vorbestehender chronischer Nierenfunktionseinschränkung, oder bei Diabetikern auf [Übersicht in Heyman und Rosen]. Unter diesen Bedingungen findet sich eine verminderte Kapillarisation des Tubulointerstitiums und/oder eine verminderte Fähigkeit der Niere zur Gegensteuerung auf akute hypoxische Reize [Übersicht in Heyman und Rosen]. Das Rattenmodell vereint drei verschiedene Schädigungen, die, allein angewandt, zu keiner wesentlichen morphologischen oder funktionellen Veränderung führen, aber gemeinsam das Vollbild des ANV ergeben [Agmon et al]: Hemmung der Stickstoffmonoxyd-Synthase (NO-Synthase) mittels N<sup>G</sup>-Nitro-L-Arginine-Methylester (L-NAME) und der Zyklooxygenase mittels Indomethazin - was sowohl Nierendurchblutung als auch Ausgleichsmechanismen vermindert (NO und Prostaglandine reduzieren die tubuläre Rückresorption von Salzen und somit den O<sub>2</sub>-Verbrauch [Jabs et al, Kaji et al, Lear et al, Wald et al 1990, Ortiz et al 2001]) -, gefolgt von Röntgenkontrastmittel.

Die wichtigsten Ergebnisse der Studie sind folgende: 1) CIN führt zur Aktivierung von HIF und HIF-Zielgenen, sowie zur Akkumulation von Pimonidazol in der Niere; 2) Die einzelnen Komponenten des Modells (L-NAME, Indomethazin, Kontrastmittel) führen ebenfalls zu einer HIF-Aktivierung (Pimonidazol wurde hier in diesen Fällen nicht getestet), wenn auch in geringerem Ausmaß als das komplette ANV-Protokoll. Dies spricht dafür, daß HIF subklinische Nierenschäden nachweisen könnte. 3) Auf zellulärer Ebene überschneiden sich HIF- und Pimonidazol-Färbung nur teilweise, wobei HIF am

stärksten unter mittlerer Pimonidazol-Intensität auftritt. Dies spricht dafür, daß das HIF-System unter extremer Hypoxie erschöpflich ist.

# Up-regulation of HIF in experimental acute renal failure: Evidence for a protective transcriptional response to hypoxia

**CHRISTIAN ROSENBERGER, SAMUEL N. HEYMAN, SEYMOUR ROSEN, AHUVA SHINA,  
MARINA GOLDFARB, WANJA GRIETHE, ULRICH FREI, PETRA REINKE, SEBASTIAN BACHMANN,  
and KAI-UWE ECKARDT**

*Department of Nephrology and Medical Intensive Care, Charité University Medicine, Berlin, Germany; Department of Medicine, Hadassah Hospital, Mt. Scopus and the Hebrew University Medical School, Jerusalem, Israel; Department of Pathology, Beth Israel Deaconess Medical Center and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts; Nephrology Unit, Bikur Holim Hospital, Jerusalem, Israel; Institute of Anatomy, Humboldt-University, Berlin, Germany; and Division of Nephrology and Hypertension, University of Erlangen-Nuremberg, Germany*

## **Up-regulation of HIF in experimental acute renal failure: Evidence for a protective transcriptional response to hypoxia.**

**Background.** Medullary hypoxia is believed to play an important role in the pathogenesis of acute renal failure (ARF). Hypoxia-inducible transcription factors (HIF) are recognized as master regulators of hypoxic adaptation, but little is known about their role in renal disease.

**Methods.** A multi-insult rat model of ARF combining the application of contrast medium with nitric oxide synthase (NOS) and cyclooxygenase (COX) inhibition was used to study chronology and distribution of the oxygen regulated HIF isoforms HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  in comparison with the hypoxia-marker pimonidazole between 10 minutes and 48 hours after injury induction. Treatment with furosemide was used to study HIF expression under conditions of ameliorated tissue injury.

**Results.** Contrast medium in combination with NOS and COX inhibition resulted in widespread induction of HIF in the outer and inner medulla that was initiated within 10 minutes, reached the highest levels at 2 hours and diminished 8 hours to 24 hours thereafter. HIF isoforms were expressed in a cell type-specific fashion: HIF-1 $\alpha$  in tubular and HIF-2 $\alpha$  in interstitial and endothelial cells. The degree of HIF-1 $\alpha$  accumulation varied between nephron segments, being much stronger in collecting ducts than in medullary thick ascending limb of the loop of Henle (mTAL). Comparison with pimonidazole staining and the effect of furosemide indicated that HIF induction in mTAL is maximal with moderate hypoxia and declines with increasing severity of hypoxia.

**Conclusion.** A complex pattern of HIF activation appears to play an important role in tissue preservation as a response to regional renal hypoxia. The limited capacity of mTAL cells for HIF activation may explain their susceptibility to injury.

---

**Key words:** HIF, pimonidazole, hypoxia, acute renal failure, radiocontrast, heme-oxygenase-1.

Received for publication May 31, 2004  
and in revised form July 23, 2004  
Accepted for publication August 26, 2004

## 2.4 Hypoxie-induzierbare Faktoren und Überleben von Tubuluszellen in der isoliert perfundierten Niere

Die Studie untersucht die Aktivierung von HIF in der isoliert perfundierten Niere. In diesem Ex-vivo-Modell [\[Übersicht in Heyman et al 1998\]](#) ist es möglich, die Nierenoxygenierung zu verändern, die Nierenfunktion engmaschig zu kontrollieren und pharmakologische Eingriffe vorzunehmen, die am Ganztier nicht durchführbar sind. Zum Einsatz kamen folgende Bedingungen: a) zellfrei isoliert perfundierte Niere (isolated perfused kidney, IPK); Hierbei enthält das Perfusat nur physikalisch gelösten O<sub>2</sub>, was zur ausgeprägten Hypoxie führt; b) mit humanen roten Blutzellen angereichertes Perfusat, was im Vergleich zur zellfreien Perfusion das O<sub>2</sub>-Angebot verbessert; c) zellfreie Perfusion unter Zugabe von Furosemid (einem Hemmer des Na/K/Cl<sub>2</sub>-Kotransportes in dicken aufsteigenden Henle-Schleifen) oder Ouabain (einem Hemmer der Na/K-ATPase), welche durch Hemmung des tubulären Salztransportes den O<sub>2</sub>-Verbrauch senken; d) zellfreie Perfusion unter Zugabe von Albumin, wodurch der onkotische Druck des Perfusates über den glomerulären Filtrationsdruck angehoben wird. Dadurch erreicht man eine perfundierte aber nicht filtrierende Niere, in welcher der O<sub>2</sub>-Verbrauch für den tubulären Salztransport deutlich vermindert ist.

Die wesentlichen Befunde dieser Studie sind folgende: 1) in der zellfrei isoliert perfundierten Niere sind HIF-Aktivierung und Pimonidazol-Verbindungen nachweisbar (nach Zugabe von Pimonidazol zum Perfusat). 2) HIF- und Pimonidazol-Signale überlappen sich nur teilweise, wobei stärkste HIF-Signale unter mittlerer Pimonidazol-Intensität erscheinen. 3) Die Bedingung mit der stärksten anzunehmenden Nierenhypoxie (die zellfreie Perfusion) führt paradoxerweise zu weit weniger HIF-Aktivierung als die Perfusion mit roten Blutzellen, die das O<sub>2</sub>-Angebot verbessern. Dies läßt darauf schließen, daß HIF unter extremer Hypoxie erschöpflich ist. 4) Hemmung der Salzurückresorption führt zu einer Reduktion der Pimonidazol-Signale, was dafür

spricht, daß der O<sub>2</sub>-Verbrauch der Niere wesentlich zur Entstehung einer Hypoxie beiträgt. 5) Die HIF-Expression korreliert umgekehrt mit dem Zellschaden.

# Hypoxia-inducible factors and tubular cell survival in isolated perfused kidneys

C Rosenberger<sup>1</sup>, S Rosen<sup>2</sup>, A Shina<sup>3</sup>, W Bernhardt<sup>4</sup>, MS Wiesener<sup>4</sup>, U Frei<sup>1</sup>, K-U Eckardt<sup>4</sup> and SN Heyman<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Nephrology and Medical Intensive Care, Charité University Clinic, Berlin, Germany; <sup>2</sup>Department of Pathology, Beth Israel Deaconess Medical Center and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA; <sup>3</sup>Department of Medicine, Hadassah Hospital, Mt Scopus and the Hebrew University Medical School, Jerusalem, Israel and <sup>4</sup>Department of Nephrology and Hypertension, University of Erlangen-Nuremberg, Erlangen, Germany

Adaptation to hypoxic environment is conferred through hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). We have previously shown that the HIF system is transiently activated *in vivo* in radiocontrast-induced acute renal failure, associated with profound hypoxia in the renal medulla. Medullary thick ascending limbs (mTALs), the most affected nephron segments in this model, were virtually unable to mount an adaptive HIF response. Here, we study correlations between oxygenation, HIF activation, and cell viability in a related *ex vivo* model, the isolated perfused rat kidney (IPK). In IPKs perfused with cell-free oxygenated medium, severe medullary hypoxic damage developed, affecting  $42 \pm 9\%$  of mTALs in the mid-inner stripe. HIF-1 $\alpha$  tubular immunostaining was noted with a zonal and tubular pattern largely similar to our findings *in vivo*: in  $34 \pm 3\%$  of collecting ducts (CDs) within the mid-inner stripe and extensively in the papillary tip, whereas mTALs were all HIF-negative. In IPKs supplemented with RBCs (improved oxygen supply), mTAL damage was totally prevented and CDs' HIF expression was attenuated ( $22 \pm 4\%$ ). By contrast, although measures designed to reduce medullary hypoxia by decreasing tubular reabsorptive activity (furosemide, ouabain, or high-albumin-non-filtering system) reduced mTAL damage, all paradoxically resulted in increased HIF expression in CDs ( $51 \pm 4\%$ ), and  $17 \pm 3\%$  of mTALs became immunostained as well. Our data confirm that CDs and mTALs have markedly different HIF responses, which correlate with their viability under hypoxic stress. mTALs transcriptional adaptation occurs within a narrow hypoxic range, and it appears that workload reduction can shift mTALs into this window of opportunity for HIF activation and survival.

*Kidney International* advance online publication, 17 May 2006;  
doi:10.1038/sj.ki.5000395

KEYWORDS: hypoxia-inducible factors; isolated perfused kidney; thick ascending limb; furosemide; ouabain; pimonidazole

**Correspondence:** C Rosenberger, Nephrology and Medical Intensive Care, Charité University Clinic, Campus Virchow, Augustenburger Platz 1, D-13353 Berlin, Germany. E-mail: chrosenbe@aol.com

Received 2 November 2005; revised 29 January 2006; accepted 31 January 2006

## **2.5 Immunhistochemischer Nachweis von Hypoxie-induzierbarem Faktor-1 $\alpha$ in humanen Nierentransplant-Biopsien**

Dies ist die erste immunhistochemische HIF-Studie an humanen Nierenbiopsien. Eigene Vorstudien an archivierten Nierenbiopsien unterschiedlicher Pathologie hatten keine HIF-Signale ergeben. Ausgehend von unseren Versuchen an Ratten, in denen sich eine standardisierte Fixierung sowie die Vermeidung von Überfixierung als entscheidend herausgestellt hatten, wurde für Nierentransplantbiopsien ein Protokoll der Immersionsfixierung erstellt, welches ausreichende histologische Beurteilbarkeit und HIF-Immunhistochemie gleichzeitig ermöglicht.

Untersucht wurden klinisch angezeigte Biopsien und Protokollbiopsien zu folgenden Zeitpunkten: intraoperativ, etwa 30 Minuten nach Anlage der Gefäßanastomosen (entsprechend der Zeit, die für die Ureter-Blasen-Anastomose und für evtl. Blutstillung benötigt wurde); 1 bis 2 Wochen nach Transplantation; 3 Monate und später nach Transplantation.

HIF-1 $\alpha$  war in etlichen intraoperativen Biopsien nachweisbar, Primärfunktion vorausgesetzt. Dies ist ein Hinweis auf die Rolle der glomerulären Filtration mit nachfolgendem tubulären O<sub>2</sub>-Verbrauch für die Entstehung renaler Hypoxie. Ein bis 2 Wochen nach Transplantation war HIF-1 $\alpha$ , unabhängig von der Histologie, in den meisten funktionsfähigen Transplantaten nachweisbar. Demgegenüber war jenseits von 3 Monaten nach Transplantation kein HIF-1 $\alpha$  nachweisbar – mit einer Ausnahme: der Transplantatabstoßung.

# Immunohistochemical Detection of Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$ in Human Renal Allograft Biopsies

Christian Rosenberger,\* Johann Pratschke,<sup>†</sup> Birgit Rudolph,<sup>‡</sup> Samuel N. Heyman,<sup>§</sup> Ralf Schindler,\* Nina Babel,\* Kai-Uwe Eckardt,<sup>||</sup> Ulrich Frei,\* Seymour Rosen,<sup>¶</sup> and Petra Reinke\*

\*Nephrology and Medical Intensive Care, <sup>†</sup>Department of General, Visceral and Transplantation Surgery, and <sup>‡</sup>Pathology, Charité Universitätsmedizin, Berlin, Germany; <sup>§</sup>Department of Medicine, Hadassah Mt. Scopus and the Hebrew University Medical School, Jerusalem, Israel; <sup>||</sup>Department of Nephrology and Hypertension, University of Erlangen-Nuremberg, Erlangen, Germany; and <sup>¶</sup>Pathology, Beth Israel Deaconess Medical Center and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts

Although it generally is accepted that renal hypoxia may occur in various situations after renal transplantation, direct evidence for such hypoxia is lacking, and possible implications on graft pathophysiology remain obscure. Hypoxia-inducible factors (HIF) are regulated at the protein level by oxygen-dependent enzymes and, hence, allow for tissue hypoxia detection. With the use of high-amplification HIF-1 $\alpha$  immunohistochemistry in renal biopsies, hypoxia is shown at specific time points after transplantation with clinicohistologic correlations. Immediately after engraftment, in primarily functioning grafts, abundant HIF-1 $\alpha$  is present and correlates with cold ischemic time >15 h and/or graft age >50 yr ( $P < 0.04$ ). In contrast, a low HIF-1 $\alpha$  score correlates with primary nonfunction, likely reflecting loss of oxygen consumption for tubular transport. Protocol biopsies at 2 wk show widespread HIF-1 $\alpha$  induction, irrespective of histology. Beyond 3 mo, both protocol biopsies and indicated biopsies are virtually void of HIF-1 $\alpha$ , with the only exception being clinical/subclinical rejection. HIF-derived transcriptional adaptation to hypoxia may counterbalance, at least partly, the negative impact of cold preservation and warm reflow injury. Transient hypoxia at 2 wk may be induced by hyperfiltration, hypertrophy, calcineurin inhibitor-induced toxicity, or a combination of these. Lack of detectable HIF-1 $\alpha$  at 3 mo and beyond suggests that at this time point, graft oxygen homeostasis occurs. The strong correlation between hypoxia and clinical/subclinical rejection in long-term grafts suggests that hypoxia is involved in such graft dysfunction, and HIF-1 $\alpha$  immunohistochemistry could enhance the specific diagnosis of acute rejection.

*J Am Soc Nephrol* 18: 343–351, 2007. doi: 10.1681/ASN.2006070792

*This paper utilizes immunohistochemical techniques to demonstrate widespread hypoxia of multiple causes in the first 3 months after transplantation, but correlates hypoxia only with clinical/subclinical rejection after 3 months. This paper is linked to an article by Kambhan et al. in this month's issue of CJASN (pp. 135–142), which describes a new histologic system for identifying and scoring calcineurin inhibitor toxicity. Both findings have the potential to improve discrimination between rejection and calcineurin toxicity in transplant biopsies and allow more targeted therapy for a failing graft.*

Received July 26, 2006. Accepted November 1, 2006.

Published online ahead of print. Publication date available at [www.jasn.org](http://www.jasn.org).

**Address correspondence to:** Dr. Christian Rosenberger, Nephrology and Medical Intensive Care, Charité Universitätsmedizin, Virchow-Campus, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany. Phone: +49-30-450-553232; Fax: +49-30-450-553909; E-mail: [chrosenbe@aol.com](mailto:chrosenbe@aol.com)



## 2.6 Anpassung an Hypoxie in der Niere der diabetischen Ratte

Diabetes prädisponiert zur akuten und chronischen Niereninsuffizienz und ist vergesellschaftet mit oxidativem Streß [[Übersicht in Lee et al](#)]. Die Studie fahndet nach Belegen für eine Rolle von Hypoxie in der Nieren-Pathophysiologie des Diabetes. Untersucht wurde die renale Ausprägung von HIF, Pimonidazol-Verbindungen (PIM) und dem HIF-Zielgen HO-1 im experimentellen Insulin-Mangel-Diabetes, in kurzfristiger künstlicher Hyperglykämie (ausgelöst durch Glukose in Verbindung mit einem Somatostatin-Analogon), sowie nach Gabe von Flüssigkeit, Insulin, Antioxidantien bzw. Röntgenkontrastmitteln.

Nach einmaliger Gabe von Streptozotocin entwickelten die Versuchstiere innerhalb von 48 Stunden eine Hyperglykämie, Polyurie, und Exsikkose. Innerhalb von 2 Wochen war eine glomeruläre Hyperfiltration nachweisbar, die sich nach 3 Monaten fast zurückbildete. HIF, PIM und HO-1 waren im Nierenmark 2 Wochen nach Auslösung des Diabetes deutlich ausgeprägt, jedoch wesentlich schwächer bis gar nicht zu den übrigen untersuchten Zeitpunkten. Frühere Studien haben gezeigt, daß im experimentellen Diabetes ATP-abhängige renale Ionen-Transport-Mechanismen mit einer ähnlichen Kinetik hochreguliert sind wie HIF, PIM und HO-1 in unserer Studie [[Wald et al 1993](#)]. Dies deutet auf eine Rolle von gesteigerter tubulärer Arbeitslast mit daraus folgendem O<sub>2</sub>-Verbrauch und Hypoxie.

Flüssigkeitsgabe führte zu keiner Änderung der immunhistochemischen Marker, was gegen eine wesentliche Rolle der Exsikkose spricht. Insulin hingegen, brachte HIF, PIM und HO-1 praktisch auf Null (dem Niveau der Kontrolltiere). Wie in früheren Studien gezeigt, erhöht osmotische Diurese die tubuläre Netto-Salzurückresorption [[Leyssac et al](#)] und somit vermutlich auch den O<sub>2</sub>-Verbrauch. Insulin könnte in unserem Modell über eine Verminderung der osmotischen Diurese gewirkt haben.

Kurzfristige künstliche Hyperglykämie führte zur Aktivierung von HIF, allerdings mit einem anderen regionalen und zellulären Muster als Diabetes. Vermutlich sind die strukturellen und funktionellen Nieren-Veränderung im Diabetes für diesen Unterschied verantwortlich.

Reaktive O<sub>2</sub>-Spezies, wie z.B. das Superoxid-Anion können das HIF-System in vitro hemmen [Yang et al]. Im Nierenmark entsteht, insbesondere beim Diabetes, vermehrt Superoxid-Anion über NAD(P)H-Oxidase [Li et al, Übersicht in Evans und Fitzgerald]. Unsere Studie bringt Hinweise dafür, daß beim Diabetes das HIF-System in vivo durch Superoxid-Anion gedämpft wird, denn die Gabe des Superoxid-Dismutase-Mimetikums 4-hydroxy-2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-Oxyl (Tempol, wodurch Superoxid-Anion zu Wasserstoffperoxid umgesetzt wird [Nassar et al, Übersicht in Samuni et al]) erhöhte die Signale für HIF und HO-1 bei gleichbleibenden Signalen für PIM.

Röntgenkontrastmittel führten bei Kontrollratten zu einer vorübergehenden renalen Aktivierung von HIF und Anreicherung von PIM, wohingegen bei diabetischen Ratten diese Wirkung verstärkt und zeitlich verlängert war. Dies läßt vermuten, daß Röntgenkontrastmittel bei Diabetikern zu einer verstärkten Nierenhypoxie führen.

# Adaptation to hypoxia in the diabetic rat kidney

C Rosenberger<sup>1</sup>, M Khamaisi<sup>2,3</sup>, Z Abassi<sup>4</sup>, V Shilo<sup>2</sup>, S Weksler-Zangen<sup>3</sup>, M Goldfarb<sup>5</sup>, A Shina<sup>2</sup>, F Zibertrest<sup>2</sup>, K-U Eckardt<sup>6</sup>, S Rosen<sup>7</sup> and SN Heyman<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Nephrology and Medical Intensive Care, Charité University Clinic, Berlin, Germany; <sup>2</sup>Departments of Medicine, Hadassah Hospitals, Mt Scopus and Ein Kerem and the Hebrew University Medical School, Jerusalem, Israel; <sup>3</sup>Diabetes Research Unit, Hadassah Hospital, Ein Kerem and the Hebrew University Medical School, Jerusalem, Israel; <sup>4</sup>Department of Physiology, Technion Medical School, Haifa, Israel; <sup>5</sup>Nephrology Unit, Bikur Holim Hospital, Jerusalem, Israel; <sup>6</sup>Department of Nephrology and Hypertension, University of Erlangen-Nuremberg, Erlangen, Germany and <sup>7</sup>Department of Pathology, Beth Israel Deaconess Medical Center and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA

Hypoxia of the kidney in diabetes could predispose it to develop acute and chronic renal failure. To examine the relationship between renal hypoxia and renal failure, we measured hypoxia (as a pimonidazole adducts), hypoxia-inducible factors (HIFs), and a hypoxia target gene heme oxygenase-1. The studies were performed in rats with streptozotocin (STZ)-induced diabetes, Cohen diabetes sensitive rats, and during short-term artificial hyperglycemia in rats induced by intravenous glucose and octreotide. STZ-treated rats received insulin, the superoxide dismutase mimetic tempol, or contrast medium. Radiocontrast media causes hypoxia and HIF induction. Hypoxia, HIFs, and heme oxygenase were undetectable in controls, but transiently activated in STZ-treated and the Cohen diabetes sensitive rats. Different patterns of HIFs and pimonidazole were observed between the three models. Insulin abolished pimonidazole and HIF induction, whereas tempol lead to increased HIFs and heme oxygenase induction at similar levels of pimonidazole. When compared with control rats, STZ-treated rats exhibited more intense and protracted renal pimonidazole, with augmented hypoxia inducible factor production and reduced GFR following contrast media. Our data suggest that both regional hypoxia and hypoxia adaptation transiently occur in early stages of experimental diabetes, largely dependent on hyperglycemia or after contrast media. Tempol may augment the HIF response in diabetes.

*Kidney International* advance online publication, 3 October 2007;  
doi:10.1038/sj.ki.5002567

KEYWORDS: hypoxia; diabetes mellitus; heme oxygenase; immunohistochemistry; cell biology ; renal pathology

**Correspondence:** C Rosenberger, Nephrology and Medical Intensive Care, Charité Universitaetsmedizin, Augustenburger Platz 1, Berlin 13353, Germany. E-mail: chrosenbe@aol.com

Received 2 February 2007; revised 6 July 2007; accepted 7 August 2007

## **2.7 Hinweise für anhaltende renale Hypoxie und vorübergehende Hypoxieanpassung im experimentellen Rhabdomyolyse-induzierten akuten Nierenversagen**

Die Mechanismen, durch die Rhabdomyolyse zum ANV führt, sind komplex [Vanholder et al] und nur teilweise auf Myoglobin zurückzuführen. Myoglobin besitzt die Fähigkeit, NO wegzufangen [Flögel et al] und kann somit eine Gefäßverengung auslösen. Unsere Studie verwendet ein etabliertes experimentelles Modell [Zager et al] des Rhabdomyolyse-induzierten ANV (intramuskuläre Injektion von Glycerin in die unteren Gliedmaßen (GLY)) und untersucht Nierenveränderungen nach 3, 6 bzw. 24 Stunden. Zur Abschätzung des Beitrages von Myoglobin alleine wird, unabhängig davon, Ratten unter Narkose Myoglobin für 45 Minuten intravenös injiziert (MYO) und 3 Stunden nach Beginn des Versuches nach Nierenveränderungen gefahndet [Heyman et al 1996].

Die wesentlichen Ergebnisse der Studie sind folgende: 1) in GLY ist PIM über den gesamten Beobachtungszeitraum nachweisbar, insbesondere in proximalen Tubuli, die in diesem Modell den ausgeprägtesten morphologischen Schaden erfahren. Dies deutet auf eine Rolle tubulärer Hypoxie bei der zellulären Schädigung. 2) HIF ist im Wesentlichen in der Frühphase von GLY nachweisbar, was auf eine vorübergehende Hypoxieanpassung schließen läßt. 3) PHD-2, Schlüsselenzym des HIF-Abbaus [Appelhoff et al] und zugleich HIF-Zielgen [D'Angelo], ist nach 6 Stunden GLY hochreguliert, was eine negative Rückkopplungsschleife vermuten läßt. 4) MYO führt zu einer ähnlichen HIF-Aktivierung wie in der Frühphase von GLY.

*Original Article*

## Evidence for sustained renal hypoxia and transient hypoxia adaptation in experimental rhabdomyolysis-induced acute kidney injury

Christian Rosenberger<sup>1</sup>, Marina Goldfarb<sup>2</sup>, Ahuva Shina<sup>3</sup>, Sebastian Bachmann<sup>4</sup>, Ulrich Frei<sup>1</sup>, Kai-Uwe Eckardt<sup>5</sup>, Thomas Schrader<sup>6</sup>, Seymour Rosen<sup>7</sup> and Samuel N. Heyman<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Nephrology and Medical Intensive Care, Charité Universitaetsmedizin, Berlin, Germany, <sup>2</sup>Nephrology Unit, Bikur Holim Hospital, <sup>3</sup>Hadassah University Hospital Mt. Scopus and the Hebrew Medical School, Jerusalem, Israel, <sup>4</sup>Department of Anatomy, Humboldt University, Berlin, <sup>5</sup>Department of Nephrology and Hypertension, University of Erlangen-Nuremberg, Erlangen, Germany, <sup>6</sup>Department of Pathology, Charité Universitaetsmedizin, Berlin, Germany and <sup>7</sup>Department of Pathology, Beth Israel Deaconess Medical Center and Harvard Medical School, Boston, MA, USA

### Abstract

**Background.** Indirect evidence suggests that hypoxia contributes to the pathophysiology of rhabdomyolysis-induced acute kidney injury (AKI). However, the cellular location and kinetics of hypoxia, as well as potential hypoxia adaptation are unclear.

**Methods.** Rhabdomyolysis was induced in rats by IM glycerol (GLY) injection, which largely recapitulates the full clinical syndrome. Additional rats received IV myoglobin (MYO), in order to assess the contribution of MYO *per se*. We performed immunohistochemistry for hypoxia markers [pimonidazole (PIM) adducts and hypoxia-inducible factors (HIFs)] and the cell-protective HIF target gene heme oxygenase-1 (HO-1). Furthermore, we sought a potential negative feedback loop to terminate HIF activation, driven by HIF prolyl-hydroxylase-2 (PHD-2).

**Results.** In GLY, progressive tubular injury, mainly of proximal tubules (PT), developed over time, but its extent was heterogeneous. PIM, HIF $\alpha$  and HO-1 were all absent in controls, but strongly positive in GLY, with a specific spatiotemporal pattern. In PT, (a) PIM was detectable throughout the study with a maximum at 6 h, (b) HIF was activated only at 3 h and (c) HO-1 and PHD-2 appeared at 6 h and persisted at a lower level at 24 h. Apart from tubular cast formation, MYO did not cause overt tissue damage, but led to strong activation of HIFs, in a pattern similar to 3 h of GLY.

**Conclusions.** Our data suggest that renal hypoxia occurs in rhabdomyolysis, and that MYO, at least partly, contributes to hypoxia generation. Since in the most affected tubules transcriptional hypoxia adaptation is transient and inhomogeneous, pharmacologic HIF enhancement holds the potential to improve outcome in rhabdomyolysis-induced AKI.

**Keywords:** acute renal failure; heme oxygenase-1; HIF prolyl hydroxylase-2; hypoxia-inducible factors; pimonidazole

*Correspondence and offprint requests to:* Christian Rosenberger, Nephrology and Medical Intensive Care, Charité Universitaetsmedizin, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany. Tel: +49-30-450553232; Fax: +49-30-79741921; E-mail: chrosenbe@aol.com

### **3. Diskussion, Schlußfolgerungen, offene Fragen**

#### **3.1 Definition der Hypoxie im Lichte der eigenen Daten**

Gemäß der Auffassung, daß Hypoxie einem Ungleichgewicht zwischen O<sub>2</sub>-Angebot und –Verbrauch entspricht, welches zu Anpassungsvorgängen führt, spricht der fehlende Nachweis von HIF in normalen Nieren (wie in dieser Publikationsreihe mehrfach dargestellt) dafür, daß trotz niedriger O<sub>2</sub>-Spannungen das O<sub>2</sub>-Gleichgewicht erhalten ist. Bei der jetzigen Sensitivität unserer HIF-Nachweismethode ist vermutlich jedes positive Resultat gleichzusetzen mit einem unphysiologischen Zustand.

#### **3.2 Validität der angewandten Methoden für den Nachweis von Hypoxie in vivo**

Die Wertung positiver HIF-Immunhistochemie als Hypoxie wird erschwert durch die Tatsache, daß in vitro durch etliche Zytokine und Wachstumsfaktoren HIF auch unter Raumluft aktivierbar ist [[Übersichten in Haddad und Harb, Hellwig-Burgel et al, Dery et al](#)]. Diese normoxische HIF-Aktivierung erfordert vermutlich mehr Zeit als die hypoxische, denn erstere gründet sich auf vermehrte HIF $\alpha$ -Transkription und/oder Proteinsynthese. Der Nachweis von HIF in vivo ist wesentlich schwieriger als in vitro, sodaß in der Regel längere Hypoxiezeiten (in unseren Versuchen etwa 1 bis 2 Stunden im Vergleich zu Minuten in vitro) notwendig sind. Bisher ist kein einziger Beweis einer normoxischen HIF-Aktivierung in vivo geführt worden. Man kann nur annehmen, daß ein solcher Vorgang deutlich mehr Zeit in Anspruch nehmen würde als 1 bis 2 Stunden. Folglich sind in vivo Aktivierungen von HIF innerhalb eines Zeitfensters von wenigen Stunden vermutlich durch Hypoxie ausgelöst.

Der Nachweis von PIM in Arealen mit HIF-Aktivierung bringt zusätzliche Belege für ein hypoxisches Geschehen. Dabei ist hervorzuheben, daß PIM und HIF selten deckungsgleich auf zellulärer Ebene erscheinen, was durch die unterschiedlichen Schwellen und Kinetiken der beiden Marker verständlich wird. Generell zeigt PIM vermutlich die stärkere Hypoxie an. HIF zeigt die aktuelle Hypoxie, während PIM die

integrierte Hypoxie der letzten Stunde mißt (dem Zeitraum von der In-vivo-Gabe von Pimonidazol bis zur Organentnahme).

Die PIM-Nachweismethode, die in der vorgestellten Publikationsserie zum Einsatz gekommen ist, liefert in Kontrolltieren negative Ergebnisse. Dies scheint ein Widerspruch zu O<sub>2</sub>-Elektroden-Messungen, die im Nierenmark durchaus Werte unter 10 mmHg ergaben [Aukland und Krog, Baumgärtl et al, Leichtweiss et al], was als Schwelle für die Pimonidazol-Gewebe-Bindung angesehen wird [Gross et al]. Tatsächlich konnte in unserem Labor neuerdings mit einer verbesserten Methode PIM auch im Mark von Normaltieren nachgewiesen werden. Für die alte Methode kann aber gelten, daß jedes positive Ergebnis, ähnlich wie bei HIF, einem unphysiologischen Zustand gleichzusetzen ist, der vermutlich Hypoxie bedeutet.

In sämtlichen hier vorgestellten tierexperimentellen Studien ist die Perfusionsfixierung zum Einsatz gekommen. Nach unserer Erfahrung ist diese sehr wichtig, um die Validität der HIF und PIM-Immunhistochemie zu erhöhen. Eigene unpublizierte Daten belegen, daß schlechte oder fehlende Perfusion mit artifiziellen HIF- und PIM-Signalen einhergehen kann. Eine mögliche Erklärung dafür ist, daß während der Immersionsfixierung der tubuläre O<sub>2</sub>-Verbrauch für Rückresorption, zumindest für einige Zeit, fortgesetzt wird. Demgegenüber friert die Perfusionsfixierung gleichsam den augenblicklichen Zustand ein.

### **3.3 Zellspezifische Expression von HIF $\alpha$ in der Niere**

Im Gegensatz zur Situation in vitro, wo praktisch jeder Zelltyp die Fähigkeit besitzt, HIF zu aktivieren [Talks et al], finden wir erhebliche zellspezifische Unterschiede in vivo. Dabei stellt sich, unabhängig vom verwendeten hypoxischen Reiz, vor allem das Sammelrohr als der Nierenzelltyp mit der höchsten Potenz zur HIF-Aktivierung dar. Ein fehlender Nachweis von HIF kann in vivo eine Hypoxie nicht ausschließen, denn diese kann sich in Zelltypen mit geringer HIF-Aktivierbarkeit abspielen.

### **3.4 Tubulärer O<sub>2</sub>-Verbrauch als wesentliche Komponente bei der Entstehung renaler Hypoxie**

Das Abklemmen der Nierenarterie ist ein sehr häufig verwendetes Modell zur Erzeugung eines akuten Nierenversagens [Shanley et al]. Viele unserer Vorstellungen von renaler Hypoxie sind – bewusst oder unbewußt – von diesem Modell geprägt. Interessanterweise führt das reine Abklemmen der Nierenarterie zu einer weit geringeren HIF-Aktivierung als in anderen ANV-Modellen mit erhaltener Nierenperfusion. Dies mag daran liegen, daß die Hypoxie unter dieser Bedingung zu ausgeprägt und mit dem Zellüberleben nicht mehr vereinbar ist.

Auf der anderen Seite liefern unsere Daten etliche Belege für Hypoxie gerade in funktionierenden Nieren oder Nephronen: z.B. unmittelbar nach Nierentransplantation, in morphologisch unauffälligen und nach Perfusionsfixierung offenen Tubuli (in der Grenzzone von segmentalen Infarkten, im ANV). Der vielleicht klarste Beleg für die Rolle des tubulären O<sub>2</sub>-Verbrauches bei der Entstehung renaler Hypoxie liefert die PIM-Färbung in isoliert perfundierten Nieren: Nach Zugabe von Ouabain zum Perfusat ist das Signal deutlich gemindert.

### **3.5 Akutes Nierenversagen**

Das akute intrinsische Nierenversagen wird traditionell in ein ischämisches und in ein toxisches unterteilt [Übersicht in Lieberthal und Nigam]. Unsere Daten zeigen, daß diese strenge Unterscheidung nicht mehr zeitgemäß ist. Vielmehr bieten wir Hinweise auf eine hypoxische Komponente im ANV durch Röntgenkontrastmittel und durch Rhabdomyolyse. Nierentoxizität, ein bisher nur ungenügend definierter Ausdruck, könnte allgemein auf eine Störung des zellulären Energiehaushaltes beruhen, was über die Steigerung des O<sub>2</sub>-Verbrauches Hypoxie zur Folge hat.



### **3.6 Das Nierentransplantat**

Unsere Studie liefert Hinweise, daß Nieren unmittelbar nach Transplantation hypoxisch sind. Es bleibt offen, ob HIF bereits während der Organentnahme und -Konservierung, oder aber erst nach Freigabe des Blutflusses aktiviert wurde. Das Fehlen von HIF in primär funktionslosen Transplantaten scheint jedoch letzteres zu unterstützen.

HIF ist an immunologischen Vorgängen beteiligt [[Peysonnaud et al](#), [Nakamura et al](#), [Kong et al](#), [Makino et al](#), [Übersicht in Cramer und Johnson](#)]. Eine anziehende aber bisher nicht bewiesene Theorie besagt, daß HIF nicht nur den Organerhalt fördert, sondern auch die Immunogenität vermindert. Demnach müßten primär HIF-positive Transplantate weniger akute Abstoßungen entwickeln. Bekanntermaßen veranlagt die primäre Nichtfunktion (die in unserer Serie HIF-negativ ist) zur akuten Abstoßungen [[Übersicht in Halloran](#)]. Die Fallzahl in unserer Serie war zu gering, um einen solchen Zusammenhang beweisen zu können. Es zeigte sich jedoch ein Trend zu weniger Abstoßungen in HIF-positiven Nieren.

Überraschend waren 1 bis 2 Wochen nach Transplantation etliche gut funktionierende Nieren, unabhängig von der Histologie, HIF-positiv. Dagegen waren vergleichbare Nieren nach 3 Monaten üblicherweise HIF-negativ. Mögliche Ursachen dafür sind höhere Dosen von Calcineurin-Inhibitoren in der Anfangsperiode, höhere Glukokortikoiddosen, Zytokine, Wachstumsfaktoren (z.B. im Rahmen einer kompensatorischen Hypertrophie) oder andere Faktoren. Unsere Daten legen aber auch die Vermutung nahe, daß 3 Monate nach Transplantation ein O<sub>2</sub>-Gleichgewicht herrscht. Dieses Gleichgewicht wird möglicherweise während akuter Abstoßung gestört, oder aber entzündliche Zytokine [[Krams et al](#)] führen während akuter Abstoßung zur normoxischen HIF-Aktivierung. Histologisch ist die Entzündung der HIF-positiven Abstoßung nicht zu unterscheiden von der (in unserer Serie grundsätzlich HIF-

negativen) Borderline-Veränderung [\[Racusen et al\]](#). Ferner haben mRNA-Studien gezeigt, daß inflammatorische Zytokine lokal selbst in funktionell und morphologisch unauffälligen Transplantatnieren hochreguliert sind [\[Roberts et al\]](#). Es gibt also Gründe zu der Annahme, daß HIF in abstoßenden Transplantaten tatsächlich Ausdruck einer Hypoxie ist. In diesem Fall könnte die Nierenfunktionseinschränkung von tubulärer Hypoxie mit nachfolgender Aktivierung der tubulo-glomerulären Rückkopplung [\[Übersicht in Schurek und Johns\]](#) herrühren.

Da sowohl Parenchym- als auch Entzündungszellen HIF während der Abstoßung exprimieren, ist es denkbar, daß HIF eine doppelte Rolle spielt: einerseits Organprotektion, andererseits Förderung der Abstoßung.

### **3.7 Therapeutische Eingriffsmöglichkeiten über das HIF-System**

Unsere Publikationsreihe belegt an verschiedenen Schädigungsmodellen, daß HIF und Zellschaden umgekehrt miteinander korrelieren. Darüber hinaus scheint bei akuter Schädigung das HIF-System nur vorübergehend aktiviert zu sein und sich, möglicherweise durch PHD im Sinne einer negativen Rückkopplungsschleife, selber zu deaktivieren. Eine Hemmung der PHD erscheint deshalb ein vielversprechendes therapeutisches Vorgehen.

In Canada wurden in den 1960er Jahren gehäuft Fälle von Kardiomyopathie und Polyglobulie beobachtet, die mit dem Genuß von bestimmten Biersorten in Zusammenhang gebracht werden konnten [\[Übersicht in Barceloux\]](#). Es stellte sich heraus, daß dem Bier  $\text{Co}^{2+}$ -Ionen als Entschäumungsmittel beigelegt waren. Aus heutiger Sicht ist anzunehmen, daß durch  $\text{Co}^{2+}$ -Ionen die PHD von renalen Fibroblasten gehemmt wurde, diese wiederum über HIF-2 $\alpha$  EPO hochregulierten, was die Blutbildung steigerte. Dies kann als der erste Beleg für eine pharmakologische HIF-Aktivierung gelten, wenn auch unspezifisch und mit erheblichen unerwünschten Nebenwirkungen.

Mittlerweile stehen neue synthetische Hemmer der PHD zur Verfügung, die sich teilweise bereits in vorklinischer Testung befinden [\[Übersicht in Macdougall\]](#). Im Rattenversuch konnten solche Substanzen das akute ischämische Nierenversagen [\[Bernhardt et al\]](#) und den Organschaden in der isoliert perfundierten Niere abmildern [\[Rosenberger et al, unpublizierte Daten\]](#), und das Überleben nach Nieren-Allotransplantation verbessern [\[Eckardt et al, unpublizierte Daten\]](#).

Aber auch EPO, dessen organprotektive Effekte im Tierversuch gut belegt ist [\[Bahlmann et al, Inamura et al; Übersichten in Chatterjee, Fisher\]](#), kann im Sinne einer positiven Rückkopplungsschleife in das HIF-System eingreifen. Zumindest ein Teil der organprotektiven Wirkung des EPO könnte über PI3K, Steigerung der HIF-Proteinsynthese und somit der hypoxischen HIF-Aktivierung erfolgen.

Abschließend, liefert die Publikationsserie eine Reihe von Anhaltspunkten für eine Nutzung der pharmakologischen HIF-Aktivierung zur Nierenprotektion bei akuter Schädigung.

#### 4. Literatur

Agmon Y, Brezis M: Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs upon intrarenal blood flow: selective medullary hypoperfusion. *Exp Nephrol* 1(6):357-63, 1993

Agmon Y, Peleg H, Greenfeld Z, Rosen S, Brezis M: Nitric oxide and prostanoids protect the renal outer medulla from radiocontrast toxicity in the rat. *J Clin Invest* 94:1069-75, 1994

Appelhoff RA, Tian YM, Raval RR, Turley H, Harris AL, Pugh CW, Ratcliffe PJ, and Gleadle JM: Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem* 279(37):38458-65, 2004

Arteel GE, Thurmann RG, Raleigh JA: Reductive metabolism of the hypoxia marker pimonidazole is regulated by oxygen tension independent of the pyridine nucleotide redox state. *Eur J Biochem* 253:743-750, 1998

Aukland K, Krog J: Renal oxygen tension. *Nature* 188:671, 1960

Aukland K, Wolgast M: Effect of hemorrhage and retransfusion on intrarenal distribution of blood flow in dogs. *J Clin Invest* 47(3):488-501, 1968

Bahlmann FH, Song R, Boehm SM, et al: Low-dose therapy with the long-acting erythropoietin analogue darbepoetin alpha persistently activates endothelial Akt and attenuates progressive organ failure. *Circulation* 110:1006-12, 2004

Barceloux DG: Cobalt. *J Toxicol Clin Toxicol* 37(2):201-6, 1999

Baumgärtl H, Leichtweiss HP, Lübbers DW, Weiss C, Hulan H: The oxygen supply of the dog kidney: measurements of intrarenal pO<sub>2</sub>. *Microvasc Res* 4:247-257, 1972

Bernhardt WM, Campean V, Kany S, Jürgensen JS, Weidemann A, Warnecke C, Arend M, Klaus S, Günzler V, Amann K, Willam C, Wiesener MS, Eckardt KU: Preconditional activation of hypoxia-inducible factors ameliorates ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 17(7):1970-8, 2006

Beru N, McDonald J, Lacombe C, Goldwasser E: Expression of the erythropoietin gene. *Mol Cell Biol* 6(7):2571-5, 1986

Bohle A, Mackensen-Haen S, von Gise H, Grund KE, Wehrmann M, Batz C, Bogenschütz O, Schmitt H, Nagy J, Müller C, et al: The consequences of tubulo-interstitial changes for renal function in glomerulopathies. A morphometric and cytological analysis. *Pathol Res Pract* 186(1):135-44, 1990

Bolomey AA, Michie AJ, Michie C, Breed ES, Schreiner GE, Lauson HD: Simultaneous measurement of effective renal blood flow and cardiac output in resting normal subjects and patients with essential hypertension. *J Clin Invest* 28(1):10-7, 1994

Brezis M, Heyman SN, Epstein FH: Determinants of intrarenal oxygenation. II. Hemodynamic effects. *Am J Physiol* 267(6 Pt 2):F1063-8, 1994a

Brezis M, Agmon Y, Epstein FH: Determinants of intrarenal oxygenation. I. Effects of diuretics. *Am J Physiol* 267(6 Pt 2):F1059-62, 1994b

Brezis M, Rosen S: Hypoxia of the renal medulla - its implications for disease. *N Engl J Med* 332(10):647-55, 1995

Chatterjee PK: Pleiotropic renal actions of erythropoietin. *Lancet* 365:1890-2, 2005

Cowley AW Jr, Mori T, Mattson D, and Zou AP: Role of renal NO production in the regulation of medullary blood flow. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284:R1355—R1369, 2003

Cramer T and Johnson RS: A novel role for the hypoxia inducible transcription factor HIF-1alpha: critical regulation of inflammatory cell function. *Cell Cycle* 2(3):192-3, 2003

D'Angelo G, Duplan E, Boyer N, et al: Hypoxia up-regulates prolyl hydroxylase activity: a feedback mechanism that limits HIF-1 responses during reoxygenation. *J Biol Chem* 2003; 278(40):38183-7, 2003

Deetjen P, Kramer K: Die Abhängigkeit des O<sub>2</sub>-Verbrauchs der Niere von der Na<sup>+</sup>-Resorption. *Arch Ges Physiol* 273:636-650, 1961

Dery MA, Michaud MD, Richard DE: Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int J Biochem Cell Biol* 37(3):535-40, 2005

Dickhout JG, Mori T, and Cowley AW Jr: Tubulovascular nitric oxide crosstalk: buffering of angiotensin II-induced medullary vasoconstriction. *Circ Res* 91:487—493, 2002

Eckardt KU, Ratcliffe PJ, Tan CC, Bauer C, Kurtz A: Age-dependent expression of the erythropoietin gene in rat liver and kidneys. *J Clin Invest* 89(3):753-60, 1992

Epstein ACR, Gleadle JM, McNeill LA, et al: *C.elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 107:43-54, 2001

Evans RG, Fitzgerald SM: Nitric oxide and superoxide in the renal medulla: a delicate balancing act. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 14(1):9-15, 2005

Fine LG, Orphanides C, Norman JT: Progressive renal disease: the chronic hypoxia hypothesis. *Kidney Int* 65:S74-8, 1998

Fisher GW: Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp Biol Med* (Maywood) 228(1):1-14, 2003

Flögel U, Merx MW, Gödecke A, et al: Myoglobin: A scavenger of bioactive NO. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:735—740, 2001

Grimm PC, McKenna RM, Gospodarek EM, Jeffery JR, Rush DN: Low frequency of infiltrating cells intensely expressing T cell cytokine mRNA in human renal allograft rejection. *Transplantation* 59(4):579-84, 1995

Gross MW, Karbach U, Groebe K, et al: Calibration of misonidazole labeling by simultaneous measurements of oxygen tension and labeling density in multicellular spheroids. *Int J Cancer* 61:567-573, 1995

Haddad JJ, Harb HL: Cytokines and the regulation of the hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha. *Int Immunopharmacol* 5:461-483, 2005

Halloran PF, Homik J, Goes N, Lui SL, Urmson J, Ramassar V, Cockfield SM: The "injury response": a concept linking nonspecific injury, acute rejection, and long-term transplant outcomes. *Transplant Proc* 29(1-2):79-81, 1997

Hargitay B and Kuhn W. Das Multiplikationsprinzip als Grundlage der Harnkonzentrierung in der Niere. *Z Elektrochem* 55: 539–558, 1951

Hellwig-Burgel T, Stiehl DP, Wagner AE, et al: Review: hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): a novel transcription factor in immune reactions. *J Interferon Cytokine Res* 25(6):297-310, 2005

Heyman SN, Rosen S, Fuchs S, et al. Myoglobinuric acute renal failure in the rat: a role for medullary hypoperfusion, hypoxia, and tubular obstruction. *J Am Soc Nephrol* 7(7):1066-74, 1996

Heyman SN, Brezis M, Rosen S: The isolated perfused rat kidney model in experimental renal injury. In: Bennett WM, DeBroe ME, Porter GA, Verpooten GA (Eds), *Clinical Nephrotoxins: Renal Injury from Drugs and Chemicals*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 77-82, 1998

Heyman SN and Rosen S: Dye-induced nephropathy. *Semin Nephrol* 23(5):477-85, 2003

Hochachka PW, Buck LT, Doll CJ, Land C: Unifying theory of hypoxia tolerance: Molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9493-9498, 1996

Inamura R, Moriyama T, Isaka Y, Namba Y, Ichimaru N, Takahara S, Okuyama A: Erythropoietin protects the kidneys against ischemia reperfusion injury by activating hypoxia inducible factor-1alpha. *Transplantation* 83(10):1371-9, 2007

Ivan M, Kondo K, Yang H, et al: HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science* 292(5516):464-8, 2001

Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, et al: Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292(5516):468-72, 2001

Jabs K, Zeidel ML, and Silva P: Prostaglandin E2 inhibits Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity in the inner medullary collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 257:F424-F430, 1989

Jewell UR, Kvietikova I, Scheid A, et al: Induction of HIF-1alpha in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J* 15(7):1312-4, 2001

Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti H: Hypoxia-inducible factor-1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O<sub>2</sub> tension. *Am J Physiol (Cell Physiol.* 40) 271:C1172-C1180, 1996

Johannes T, Mik EG, Nohe B, Unertl KE, Ince C: Acute decrease in renal microvascular PO<sub>2</sub> during acute normovolemic hemodilution. *Am J Physiol Renal Physiol* 292(2):F796-803, 2007

Kaji DM, Chase HS Jr, Eng JP, and Diaz J: Prostaglandin E<sub>2</sub> inhibits Na-K-2Cl cotransport in medullary thick ascending limb cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 271:C354-C361, 1996

Kirschenbaum MA, White N, Stein JH, Ferris TF: Redistribution of renal cortical blood flow during inhibition of prostaglandin synthesis. *Am J Physiol* 227:801-805, 1974

Kong T, Eltzschig HK, Karhausen J, Colgan SP, Shelley CS: Leukocyte adhesion during hypoxia is mediated by HIF-1-dependent induction of beta2 integrin gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(28):10440-5, 2004

Krams SM, Falco DA, Villanueva JC, Rabkin J, Tomlanovich SJ, Vincenti F, Amend WJ, Melzer J, Garovoy MR, Roberts JP, et al: Cytokine and T cell receptor gene expression at the site of allograft rejection. *Transplantation* 53(1):151-6, 1992

Kriz W: Structural organization of the renal medulla: comparative and functional aspects. *Am J Physiol* 241 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 10):R3-R16, 1981

Kriz W, Kaissling B: Structural organisation of the mammalian kidney. In: Giebisch G, Seldin DW (editors): *The kidney: physiology and pathophysiology*, 2nd edn. New York, NY: Raven Press, pp. 707–777, 1992

Lassen NA, Longley JB: Countercurrent exchange in vessels of renal medulla. *Proc Soc Exp Biol Med* 106:743-748, 1961

Lear S, Silva P, Kelley VE, Epstein FHH: Prostaglandin E<sub>2</sub> inhibits oxygen consumption in rabbit medullary thick ascending limb. *Am J Physiol Renal Physiol* 258:F1372–78, 1990

Lee HB, Seo JY, Yu MR, Uh ST, Ha H: Radical approach to diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl* (106):S67-70, 2007

Leichtweiss HP, Lübbers DW, Weiss C, Baumgärtl H, and Reschke W: The oxygen supply of the rat kidney: measurements of intrarenal PO<sub>2</sub>. *Pflügers Arch* 309:328-349, 1969

Lemley K, Schmitt SL, Holliger C, Dunn MJ, Robertson CR, Jamison RL: Prostaglandin synthesis inhibitors and vasa recta erythrocyte velocities in the rat. *Am J Physiol* 247:F562-F567, 1984

Levy MN, Imperial ES: Oxygen shunting in renal cortical and medullary capillaries. *Am J Physiol* 200:159-162, 1961

[Leysac](#) PP, [Holstein-Rathlou](#) N-H, [Skott](#) O: Renal blood flow, early distal sodium, and plasma renin concentrations during osmotic diuresis. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 279:R1268–R1276, [2000](#)

[Li](#) N, [Yi](#) FX, [Spurrier](#) JL, [Bobrowitz](#) CA, [Zou](#) AP: Production of superoxide through NADH oxidase in thick ascending limb of Henle's loop in rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 282:F1111-9, [2002](#)

[Lieberthal](#) W and [Nigam](#) SK: Acute renal failure. II. Experimental models of acute renal failure: imperfect but indispensable. *Am J Physiol Renal Physiol* 278(1):F1-F12, [2000](#)

[Macdougall](#) IC: Recent advances in erythropoietic agents in renal anemia. *Semin Nephrol* 26(4):313-8, [2006](#)

[Makino](#) Y, [Nakamura](#) H, [Ikeda](#) E, [Ohnuma](#) K, [Yamauchi](#) K, [Yabe](#) Y, [Poellinger](#) L, [Okada](#) Y, [Morimoto](#) C, [Tanaka](#) H: Hypoxia-inducible factor regulates survival of antigen receptor-driven T cells. *J Immunol* 171(12):6534-40, [2003](#)

[Maxwell](#) PH: HIF-1's relationship to oxygen: simple yet sophisticated. *Cell Cycle* 3:156-159, [2004](#)

[Metzen](#) E and [Ratcliffe](#) PJ: HIF hydroxylation and cellular oxygen sensing. *Biol Chem* 385:223-230, [2004](#)

[Nakamura](#) H, [Makino](#) Y, [Okamoto](#) K, [Poellinger](#) L, [Ohnuma](#) K, [Morimoto](#) C, [Tanaka](#) H: TCR engagement increases hypoxia-inducible factor-1 alpha protein synthesis via rapamycin-sensitive pathway under hypoxic conditions in human peripheral T cells. *J Immunol* 174(12):7592-9, [2005](#)

[Nangaku](#) M: Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: a final common pathway to end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol* 17:17-25, [2006](#)

[Nassar](#) T, [Kadery](#) B, [Lotan](#) H, et al: Effects of the superoxide dismutase-mimetic compound tempol on endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 436:111-118, [2002](#)

[O'Connor](#) PM, [Anderson](#) WP, [Kett](#) MM, [Evans](#) RG: Hypothesis: renal preglomerular arterial-venous O<sub>2</sub> shunting is a structural antioxidant defence mechanism of the renal cortex. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33(7):637-41, [2006](#)

[Orphanides](#) C, [Fine](#) LG, [Norman](#) JT: Hypoxia stimulates proximal tubular cell matrix production via a TGF-beta1-independent mechanism. *Kidney Int* 52(3):637-47, [1997](#)

[Ortiz](#) PA, [Hong](#) NJ, and [Garvin](#) JL: NO decreases thick ascending limb chloride absorption by reducing Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransporter activity. *Am J Physiol Renal Physiol* 281:F819-F825, [2001](#)

[Pallone](#) TL, [Robertson](#) CR, [Jamison](#) RL: Renal medullary microcirculation. *Physiol Rev* 70:885–920, [1990](#)



[Pallone](#) TL, [Zhang](#) Z, and [Rhinehart](#) K: Physiology of the renal medullary microcirculation. *Am J Physiol Renal Physiol* 284:F253-F266, [2003](#)

[Peyssonnaud](#) C, [Datta](#) V, [Cramer](#) T, [Doedens](#) A, [Theodorakis](#) EA, [Gallo](#) RL, [Hurtado-Ziola](#) N, [Nizet](#) V, [Johnson](#) RS: HIF-1 $\alpha$  expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes. *J Clin Invest* 115(7):1806-15, [2005](#)

[Pappenheimer](#) JR, [Kinter](#) WB: Hematocrit ratio of blood within mammalian kidney and its significance for renal hemodynamics. *Am J Physiol* 185:377-390, [1956](#)

[Priyadarshi](#) A, [Periyasamy](#) S, [Burke](#) TJ, [Britton](#) SL, [Malhotra](#) D and [Shapiro](#) JI: Effects of reduction of renal mass on renal oxygen tension and erythropoietin production in the rat. *Kidney Int* 61:542–546, [2002](#)

[Racusen](#) LC, [Solez](#) K, [Colvin](#) RB, [Bonsib](#) SM, [Castro](#) MC, [Cavallo](#) T, [Croker](#) BP, [Demetris](#) AJ, [Drachenberg](#) CB, [Fogo](#) AB, [Furness](#) P, [Gaber](#) LW, [Gibson](#) IW, [Glantz](#) D, [Goldberg](#) JC, [Grande](#) J, [Halloran](#) PF, [Hansen](#) HE, [Hartley](#) B, [Hayry](#) PJ, [Hill](#) CM, [Hoffmann](#) EO, [Hunsicker](#) LG, [Lindblad](#) AS, [Yamaguchi](#) Y, et al: The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 55(2):713-23, [1999](#)

[Razzak](#) MA, [Botti](#) RE, [MacIntyre](#) WJ, [Pritchard](#) WH: Consecutive determination of cardiac output and renal blood flow by external monitoring of radioactive isotopes. *J Nucl Med* 11(5):190-5, [1970](#)

[Roberts](#) IS, [Reddy](#) S, [Russel](#) C, [Davies](#) DR, [Friend](#) PJ, [Handa](#) AI, [Morris](#) PJ: Subclinical rejection and borderline changes in early protocol biopsy specimens after renal transplantation. *Transplantation* 77(8):1194-8, [2004](#)

[Rosenberger](#) C, [Rosen](#) S, [Heyman](#) SN: Current understanding of HIF in renal disease. *Kidney Blood Press Res* 28:325–340, [2005](#)

[Samuni](#) A, [Mitchell](#) JB, [DeGraff](#) W, [Krishna](#) CM, [Samuni](#) U, [Russo](#) A: Nitroxide SOD-mimics: modes of action. *Free Radic Res Commun* 12-13 Pt 1:187-94, [1991](#)

[Schurek](#) HJ, [Jost](#) U, [Baumgärtl](#) H, [Bertram](#) H, [Heckmann](#) U: Evidence for a preglomerular oxygen diffusion shunt in rat renal cortex. *Am J Physiol* 259: F910-915, [1990](#)

[Schurek](#) HJ, [Johns](#) O: Is tubuloglomerular feedback a tool to prevent nephron oxygen deficiency? *Kidney Int* 51:386-392, [1997](#)

[Semenza](#) GL and [Wang](#) GL: A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 12:5447-5454, [1992](#)

[Semenza](#) GL: Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O<sub>2</sub> homeostasis. *Curr Opin Genet Dev* 8:588-594, [1998](#)

[Semenza](#) GL. Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology* 19: 176-182, [2004](#)

[Shanley PF, Rosen MD, Brezis M, et al: Topography of focal proximal tubular necrosis after ischemia with reflow in the rat kidney. Am J Pathol 122: 462-468, 1986](#)

[Talks J, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL: The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. Am J Pathol 157\(2\):411-21, 2000](#)

[Thurau K, Boylan JW: Acute renal success. The unexpected logic of oliguria in acute renal failure. Am J Med 61: 308-15, 1976](#)

[Vanholder R, Sever MS, Ereik E, Lameire N: Rhabdomyolysis. J Am Soc Nephrol 11: 1553–1561, 2000](#)

[Wald H, Scherzer P, Rasch R, Popovtzer MM: Renal tubular Na\(+\)-K\(+\)-ATPase in diabetes mellitus: relationship to metabolic abnormality. Am J Physiol 265: E96-101, 1993](#)

[Wald H, Scherzer P, Rubinger D, and Popovtzer MM: Effect of indomethacin in vivo and PGE<sub>2</sub> in vitro on MTAL Na-K-ATPase of the rat kidney. Pflügers Arch 415: 648—650, 1990](#)

[Welch WJ, Baumgärtl H, Lübbers D, Wilcox CS: Nephron pO<sub>2</sub> and renal oxygen usage in the hypertensive rat kidney. Kidney Int 59\(1\):230-7, 2001](#)

[Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub>-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O<sub>2</sub>-regulated gene expression. FASEB J 16: 1151-1162, 2002](#)

[Westra J, Brouwer E, Bos R, Posthumus MD, Doornbos-van der Meer B, Kallenberg CG, Limburg PC: Regulation of cytokine-induced HIF-1alpha expression in rheumatoid synovial fibroblasts. Ann N Y Acad Sci 1108:340-8, 2007](#)

[Wirz H, Hargitay B, and Kuhn W: Lokalisation des Konzentrationsprozesses in der Niere durch direkte Kryoskopie. Helv Physiol Pharmacol Acta 9: 196–207, 1951](#)

[Yang ZZ, Zhang AY, Yi FX et al. Redox regulation of HIF-1alpha levels and HO-1 expression in renal medullary interstitial cells. Am J Physiol Renal Physiol 284: F1207–F1215, 2003](#)

[Zager RA, Foerder C, Bredl C: The influence of mannitol on myoglobinuric acute renal failure: functional, biochemical, and morphological assessments. J Am Soc Nephrol 2\(4\):848-55, 1991](#)

[Zimmerhackl B, Robertson CR, Jamison RL: Erythrocyte flow and dynamic hematocrit in the renal papilla of the rat. Am J Physiol 249\(6 Pt 2\):F898-902, 1985](#)

## **5. Weitere Publikationen des Autors zum Thema**

Wiesener MS, Seyfarth M, Warnecke C, Jürgensen J, [Rosenberger C](#), Morgan NV, Maher ER, Frei U, Eckardt KU: Paraneoplastic erythrocytosis associated with an inactivating point mutation of the von Hippel-Lindau gene in a renal cell carcinoma. *Blood* 99(10):3562-5, 2002

Eckardt KU, [Rosenberger C](#), Jürgensen J, Wiesener M: Role of hypoxia in the pathogenesis of renal disease. *Blood Purif* 21(3):253-7, 2003

Wiesener MS, Jürgensen J, [Rosenberger C](#), Scholze CK, Hoerstrup JH, Warnecke C, Mandriota S, Bechmann I, Frei U, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Bachmann S, Maxwell PM, Eckardt KU: Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs. *FASEB J* 17(2):271-3, 2003

Jürgensen J, [Rosenberger C](#), Wiesener MS, Warnecke C, Hoerstrup JH, Grafe M, Philipp S, Griethe W, Maxwell PH, Frei U, Bachmann S, Willenbrock R, Eckardt KU: Persistent induction of HIF-1alpha and -2alpha in cardiomyocytes and stromal cells of ischemic myocardium. *FASEB J* 18(12):1415-7, 2004

Heyman SN, [Rosenberger C](#), Rosen S. Erythropoietin – a potential remedy for renal tubular injury? *Kidney Int* 65:737-738, 2004

Heyman SN, [Rosenberger C](#), Rosen S. Regional alterations in renal hemodynamics and oxygenation: a role in radiocontrast nephropathy. *Nephrol Dial Transpl* 20 (Suppl 1):i6-i11, 2005

[Rosenberger C](#), Rosen S, Heyman S. Current understanding of HIF in renal disease. *Kidney and Blood Pressure Research* 28:325-340, 2005

Eckardt KU, Bernhardt WM, Weidemann A, Warnecke C, [Rosenberger C](#), Wiesener MS, Willam C: Role of hypoxia in the pathogenesis of renal disease. *Kidney Int Suppl* (99):S46-51, 2005

Bernhardt WM, Schmitt R, [Rosenberger C](#), Münchenhagen PM, Gröne HJ, Frei U, Warnecke C, Bachmann S, Wiesener MS, Willam C, Eckardt KU: Expression of hypoxia-inducible transcription factors in developing human and rat kidneys. *Kidney Int* 69(1):114-22, 2006

Goldfarb M, [Rosenberger C](#), Abassi Z, Shina A, Zilbersat F, Eckhardt KU, Rosen S, Heyman SN. Acute-on-chronic renal failure in the rat: Functional compensation and hypoxia tolerance. *Am J Nephrol* 26:22-33, 2006

Goldfarb M, [Rosenberger C](#), Shina A, Rosen S, Heyman SN. A Role for Erythropoietin in the attenuation of contrast medium-induced acute renal failure in rats? *Renal Failure* 28:345-350, 2006

[Rosenberger C](#), Rosen S, Heyman SN. Renal Parenchymal Oxygenation and Hypoxia Adaptation in Acute Kidney Injury. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33:980-988, 2006

Heyman, SN, Rosen S, [Rosenberger C](#): Critical assessment of experimental models of acute renal failure. In: Critical Care Nephrology, 2nd Ed; Ronco C, Bellomo R & Kellum J (Eds), Springer/Kluwer Acad Pub (in press)

[Rosenberger C](#), Solovan C, Rosenberger AD, Li J, Treudler R, Frei U, Eckardt KU, and Brown LF: Upregulation of hypoxia-inducible factors in normal and psoriatic skin. J Invest Dermatol 127(10): 2445-52, 2007

[Rosenberger C](#), Rosen S, Paliege A, Heyman S: Pimonidazole adduct immunohistochemistry in the rat kidney: detection of tissue hypoxia. In "Molecular Techniques in Kidney Research" (eds TD Hewitson & GJ Becker). Humana Press, Totowa, NJ, USA. in press

[Rosenberger C](#), Rosen S, Heyman SN: Letter to the Editor concerning the article of Abuelo JR, Normotensive ischemic acute renal failure. N Engl J Med. 2007 Aug 23; 357(8):797-805. in press

May D, Gilon D, Djonov V, Itin A, Lazarus A, [Rosenberger C](#) and Keshet E: A conditional transgenic system for induction and rescue of chronic myocardial hibernation provides insights into genomic programs of hibernation and reversible heart remodeling. Proc Nat Acad Sci USA. in press

## ERKLÄRUNG

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, 17.12.2007

.....  
Datum



.....  
Unterschrift