

LOKALISATION VON CYTOCHROMOXIDASEN UND LIPOXYGENASEN IN DER RATTENNIERE



Universität Regensburg

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES
DOKTORGRADES DER
ZAHNMEDIZIN
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND
VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
Christos Lattas

aus
Hof

im Jahr
2024

LOKALISATION VON CYTOCHROMOXIDASEN UND LIPOXYGENASEN IN DER RATTENNIERE



Universität Regensburg

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES
DOKTORGRADES DER
ZAHNMEDIZIN
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND
VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
Christos Lattas

aus
Hof

im Jahr
2024

Dekan: Prof. Dr. Ralph Witzgall

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Armin Kurtz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Rudolf Fuchshofer

Tag der mündlichen Prüfung: 08. Oktober 2024

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	S.5
I.1. Aufbau und Funktion der Niere	S.5
I.2. Cyclooxygenasen	S.8
I.3. Lipoxygenasen	S.8
I.3.1. Lox-5	S.9
I.3.2. Lox-12	S.11
I.3.3. Lox-15	S.13
I.4. Cytochromoxidasen	S.14
I.4.1. Cyp4A1, Cyp4A2, Cyp4A3	S.15
I.4.2. Cyp2C11, Cyp2C23	S.17
I.5. Ziele der Versuche	S.22
II. Material	S.23
II.1. Geräte	S.23
II.2. Verbrauchsmaterial	S.24
II.3. Chemikalien	S.24
II.4. Enzyme	S.25
II.5. Biochemikalien	S.26
II.6. Lösungen, Puffer und Gel	S.26
II.7. Tiere	S.28
III. Methoden	S.29
III.1. Mikrodissektion	S.29
III.2. Isolierung der RNA	S.30
III.2.1. Schutzmaßnahmen	S.30
III.2.2. Isolierung der RNA der Tubuli	S.31
III.3. Reverse Transkription (RT)	S.32
III.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	S.33
III.4.1. Durchführung der PCR-Versuche	S.33
III.5. Auswertung der PCR	S.35
III.5.1. Gelelektrophorese	S.35
IV. Ergebnisse	S.36
IV.1. Lox-12	S.44
IV.2. Lox-15	S.46
IV.3. Lox-5	S.49
IV.4. Cyp4A1	S.52
IV.5. Cyp4A2 und Cyp4A3	S.54
IV.6. Cyp2C23	S.57
IV.7. Cyp2C11	S.59
IV.8. Gesamtübersicht der graphischen Verteilung der Lipoxygenasen und Cytochromoxidasen an der Rattenniere	S.61

V. Diskussion	S.65
V.1. Lox-12	S.65
V.2. Lox-15	S.66
V.3. Lox-5	S.67
V.4. Cyp4A1	S.68
V.5. Cyp4A2 und Cyp4A3	S.69
V.6. Cyp2C23	S.70
V.7. Cyp2C11	S.72
VI. Zusammenfassung	S.74
VII. Literaturverzeichnis	S.76
VIII. Anhang	S.81
VIII.1. Abkürzungsverzeichnis	S.81
VIII.2. Abbildungen und Tabellen	S.83
IX. Danksagung	S.86
X. Lebenslauf	S.87

I. Einleitung

I.1. Aufbau und Funktion der Niere

Die Niere ist ein paariges, retroperitoneal beidseits der Wirbelsäule gelegenes Organ mit exkretorischer und inkretorischer Funktion. Sie wird umhüllt von der Capsula fibrosa, der Capsula adiposa und der Fascia renalis (39). Morphologisch kristallisieren sich zwei Zonen heraus, nämlich die äußere Rindenschicht (=Cortex) und eine innere Markschiicht (=Medulla). Die Markschiicht lässt sich nochmals in eine äußere und eine innere Medulla differenzieren. Die Niere besteht aus zahlreichen funktionellen Einheiten, den Nephronen, in denen der Harn gebildet wird. Das Nephron besteht aus einem Glomerulus und einem Tubulusapparat, der in proximale und distale Abschnitte und das Sammelrohr unterteilt werden kann.

Der genaue Aufbau des Nephrons wird in Abbildung 1 dargestellt.

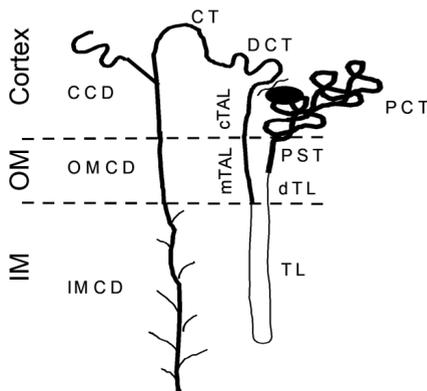


Abbildung 1: Aufbau des Nephrons.

Die gestrichelten Linien unterteilen das Nephron von außen nach innen in Kortex (Cortex), äußere Medulla (OM) und innere Medulla (IM). PCT bezeichnet den proximalen konvoluten Tubulus, PST den proximalen geraden Tubulus, dTL und TL den ab- und aufsteigenden dünnen Teil der Henle-Schleife in der äußeren und inneren Medulla, mTAL und cTAL den aufsteigenden dicken Teil der Henle-Schleife, DCT den distalen konvoluten Tubulus, CCD und CT das kortikale Sammelrohr mit verbindendem Tubulisegment und OMCD und IMCD Sammelrohre der äußeren und inneren Medulla.

Die Niere übernimmt lebenswichtige Funktionen. Eine große Rolle spielt die Exkretion von harnpflichtigen Substanzen, Stoffwechselendprodukten und Giften, wie Harnsäure, Harnstoff und Medikamente. Gleichzeitig kann sie wertvolle Blutbestandteile, wie z. B. Glukose und Aminosäuren aus dem Ultrafiltrat konservieren. Daneben übernimmt sie wichtige Funktionen, wie z.B. die Produktion von Harn und die Konzentrierung des Harns zur Regulierung des Wasser- und Elektrolythaushalts (Osmoregulation) (39). Damit ist eine Konstanz des Volumens und der Osmolalität des Extrazellulärraumes gewährleistet (47). Dies geschieht durch kontrollierte Resorption und Sekretion der filtrierten Elektrolyte im Tubulussystem der Niere. Darüber hinaus erfolgt in den distalen Abschnitten und im Sammelrohr eine regulierte Wasserresorption. Sie ist außerdem an der Regulation des Säure-Base-Haushalts und am Calcium- und Phosphatstoffwechsel beteiligt (39). Schließlich werden in der Niere Hormone und Metabolite wie renales Angiotensin II, Erythropoetin, Kalzitriol und Prostaglandine produziert (39) (47). Bei diesen Prozessen ist eine Vielzahl von Mediatoren beteiligt. Eine wichtige Gruppe dieser Mediatoren wird über Cyclooxygenasen, Lipoxygenasen und Cytochromoxidasen aus der Arachidonsäure (AS) gebildet (siehe Abbildung 2!). Die AS ist eine vierfach ungesättigte C20-Fettsäure (Eicosatetraen-Säure), ein häufiger Baustein der Phospholipide in Zellmembranen und wird durch Phospholipase A₂ freigesetzt (27).

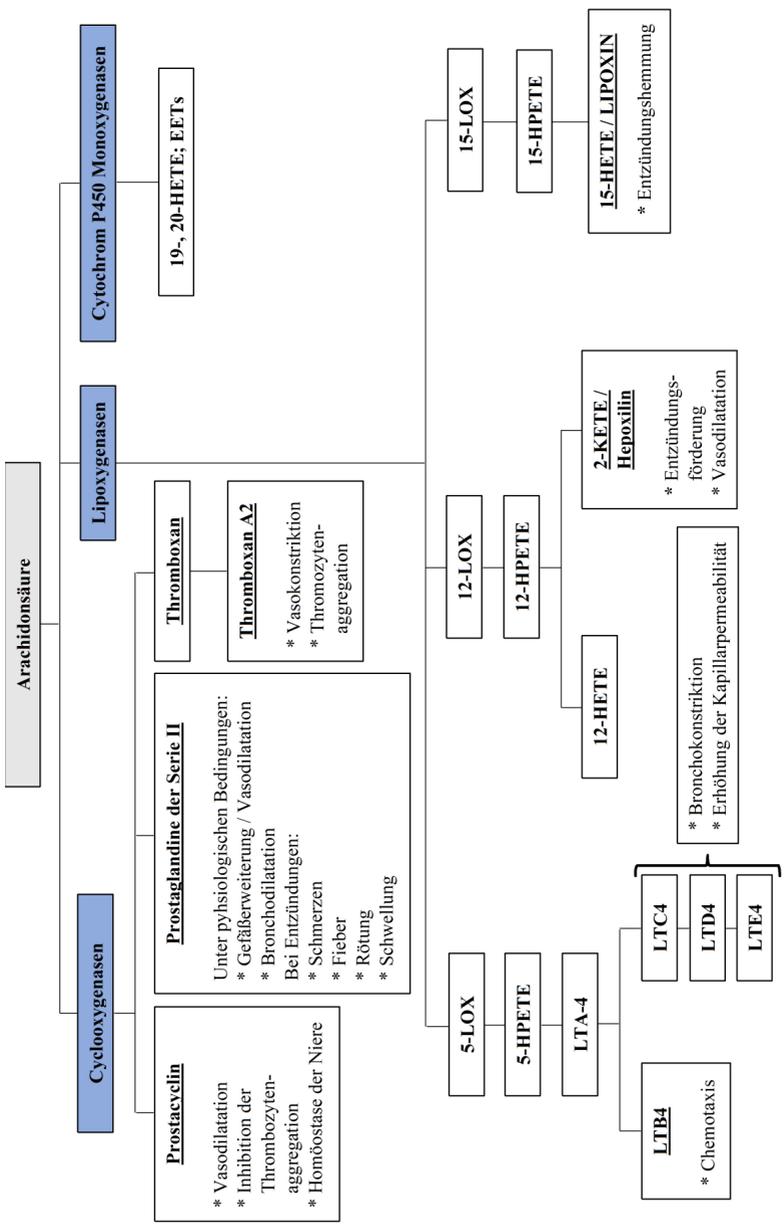


Abbildung 2: Arachidonsäurekaskade

I.2. Cyclooxygenasen

Die AS dient Cyclooxygenasen (Isoenzyme 1 und 2, Cox-1 und Cox-2) und der Lipoxygenase als Substrat. Das Isoenzym Cox-1 ist in den meisten Geweben konstitutiv exprimiert. Im Gegensatz dazu wird Cox-2 häufig erst in physiologische und pathophysiologische Prozesse induziert, z. B. unter der Einwirkung von Entzündungsmediatoren (Interleukin1 und Tumornekrosefaktor α) (27). Mittels Cyclooxygenasen entstehen schließlich über cyclische Endoperoxide die Eicosanoide Prostaglandin, Thromboxan und Prostacyclin (siehe Abbildung 2!). Prostaglandine der Serie II führen zur Vasodilatation und Bronchodilatation. Bei entzündlichen Prozessen verursachen sie Schmerzen, Fieber, Rötungen und Schwellungen. Prostaglandinderivate werden zur Weheneinleitung, zur Prophylaxe eines Magengeschwürs bei Therapie mit Säureantiphlogistika und bei Durchblutungsstörungen therapeutisch eingesetzt (27) (38). Thromboxan A₂ vermittelt seine Wirkungen über den Thromboxan-Rezeptor. Es wirkt vasokonstriktorisch und stimuliert die Thrombozytenaggregation. Prostacyclin wirkt vasodilatatorisch, hemmt die Thrombozytenaggregation und sorgt für die Homöostase der Niere.

I.3. Lipoxygenasen

Lipoxygenasen sind Enzyme, welche mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit zwei Sauerstoffatomen zu Eicosanoiden oxidieren. Sie gehören folglich zur Gruppe der Dioxygenasen. Auch mittels der Lipoxygenasen entstehen aus der Arachidonsäure eine Reihe von Produkten, die im Folgenden näher erläutert werden. In der Niere sind vor allem die Lipoxygenase 5 (Lox-5), die Lipoxygenase 12 (Lox-12) und die Lipoxygenase 15 (Lox-15) von Bedeutung (siehe Abbildung 2!).

I.3.1. Lox-5

Mittels der Lox-5 entstehen Leukotriene. Leukotriene gehören wie die Prostaglandine zu den Eikosanoiden und sind körpereigene Metabolite des AS-Stoffwechsels. Die Lox-5 katalysiert die Reaktion der AS über 5-Hydroperoxy-eicosatetraensäure (5-HPETE) und über 5-Hydroxyeicosatetraensäure (5-HETE) zu Leukotrien A₄ (LTA₄). Das sehr instabile Epoxid LTA₄ ist die direkte Ausgangsverbindung zur Biosynthese verschiedener Leukotriene. So bilden sich aus dem LTA₄ die Peptido-(Cysteinyl-) Leukotriene Leukotrien C₄ (LTC₄), Leukotrien D₄ (LTD₄), Leukotrien E₄ (LTE₄) und das Hauptprodukt der Lox-5, das Cysteinyl-freie Leukotrien B₄ (LTB₄), das chemotaktisch wirkt. LTC₄, LTD₄ und LTE₄ wirken bronchokonstriktorisch und erhöhen die Kapillarpermeabilität (siehe Abbildung 2!). Die Umwandlung der Leukotriene geschieht mithilfe der Enzyme LTA₄-Hydrolase, LTC₄-Synthase, γ -Glutamyltransferase sowie der Dipeptidase. Im Syntheseweg der Leukotriene spielt dabei das Lox-5 aktivierende Protein (FLAP) eine regulierende bzw. auslösende Rolle (21). Die Umwandlung der AS in LT erfolgt dabei nach Anlagerung freier AS an die Lox-5 durch das FLAP.

Lipoxygenasen bzw. deren Produkte können eine Reihe von wichtigen Funktionen übernehmen. So sind Leukotriene als „slow reacting substances“ stark wirksame Mediatoren entzündlicher bzw. allergischer Reaktionen. Sie wirken unter anderem chemotaktisch, d. h., sie sind in der Lage, neutrophile Granulozyten zu locken. Sie wirken außerdem bronchokonstriktorisch und vasoaktiv, d. h., sie fördern die Gefäßpermeabilität und können zur Ödembildung führen. Außerdem können sie Suppressorzellen aktivieren und mit Interleukinen und Interferonen eine Wechselwirkung eingehen. Zusammen mit den Prostaglandinen rufen sie das Spektrum der Symptome hervor, welches eine Entzündung charakterisiert. Zu diesen Symptomen zählen Rötung, Wärme, Schwellung und Schmerz.

Auch in der Niere, vor allem in den proximalen Tubuli spielt Lox-5 eine große Rolle. Hier erhöht sich der diuretische und natriuretische Effekt der Niere bei Gabe des Vasokonstriktors Endothelin. Dieser Effekt ist abhängig von einer direkten Reaktion in den proximalen Tubuli und wird wohl durch die Lox-5 bzw. ihre Produkte vermittelt, da Versuche an der Ratte zeigten, dass durch den Lox-5-Inhibitor L-651,392 eine Erhöhung der Fließrate bei intravenöser Endothelingabe verhindert wird (36). In derselben Versuchsreihe wurde gezeigt, dass auch durch den Leukotrien C4/D4-Rezeptor-Antagonist L-649,923 eine Erhöhung des diuretischen und natriuretischen Effekts bei intravenöser Endothelingabe verhindert wird. Bei einer Glomerulonephritis wird durch Leukozyten eine Reihe von Mediatoren der AS-Kaskade freigesetzt. Dazu gehören Lox-5-Produkte, wie z. B. Leukotriene D4 und B4 (LTD4 und LTB4). LTD4 und andere Leukotriene scheinen eine zentrale Rolle bei der Reduzierung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) in der akuten Phase dieser Erkrankung durch ihre vasoaktive Wirkung zu spielen und damit eine Verschlechterung der Entzündung zu bewirken. Das bedeutet, dass eine Hemmung der Lox-5 und somit ihrer Produkte eine sinnvolle Behandlungsmöglichkeit dieser Erkrankung sein könnte (5).

Bei einem Versuch wurde an Ratten eine mesangiale Zellimmunerkrankung durch einen monoklonalen Antikörper ausgelöst. Bei dieser Erkrankung kam es zu einem Abfall der GFR und des renalen Blutflusses (RBF), einer verstärkten glomerulären Leukozyten-Infiltration und zur Synthese von Thromboxan B2, 12-Hydroxyeicosatetraensäure (12-HETE) und LTB4. Wurde die Ratte mit MK-886, einem Lox-5-Inhibitor, vorbehandelt, war der Abfall der GFR und des RBF teilweise verbessert und die glomeruläre LTB4-Synthese komplett gehemmt (23). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Lox-5 bzw. ihre Produkte eine wichtige Rolle bei immun-vermittelten Nierenerkrankungen spielt und eine pharmakologische Hemmung dieser Mediatoren einen hohen therapeutischen Wert haben könnte.

Weiterhin beeinflusst die Lox-5 die Zellproliferation bei einer nephrotoxischen Serum-Nephritis (NSN) negativ. Versuche an Ratten zeigten, dass sich durch Gabe des Lox-5-Inhibitors MK-886 die glomeruläre proliferative Aktivität wieder verbesserte (56).

I.3.2. Lox-12

Die Lox-12 ist wie die Lox-5 ein Katalysator der Arachidonsäurekaskade. Ihre Endprodukte sind über das Zwischenprodukt 12-Hydroperoxy-eicosatetraensäure (12-HPETE) die 12-HETE und das Hepoxilin, das sich durch Oxidation absplattet, Entzündungsprozesse fördert und vasodilatatorisch wirkt (siehe Abbildung 2!). Die Lox-12 spielt bei Diabetes eine wichtige Rolle. So korrelieren strukturelle Veränderungen bei mesangialen Zellen von Ratten mit einer diabetischen Nephropathie bzw. bei mesangialen Zellen von Ratten, die einer erhöhten Glucosekonzentration ausgesetzt werden, mit einer gesteigerten Lox-12 mRNA (17). Diese Ergebnisse weisen der Lox-12 eine wichtige Rolle bei der Pathogenese einer diabetischen Nephropathie zu. Außerdem ist die Lox-12 an der Steuerung der renalen $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase-Aktivität im proximalen konvoluten Tubulus (PCT) beteiligt. Dieser Effekt ist jedoch altersabhängig. Denn eine Inhibition der $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase im PCT wurde bei Säuglingsratten durch den Lox-12-Inhibitor Baicalein gehemmt, nicht jedoch bei adulten Ratten. Dagegen führte der Inhibitor 17-Octadecensäure zu einer Blockierung der Inhibition der $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase bei adulten Ratten, aber nicht bei Säuglingsratten. Weiterhin blockierten sowohl die 12-HETE als auch die 20-HETE die $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase im PCT verstärkt bei den Säuglingsratten. Die Lox-12 mRNA konnte nur im Cortex von Säuglingsratten entdeckt werden (22).

Weitere Studien an kortikalen Nierenanteilen von Ratten belegen eine hemmende Wirkung der Lox-12-Produkte 12-HPETE und 12-HETE auf die Reninfreisetzung. Für die Reninhemmung wurden dabei geringere Mengen 12-HPETE als 12-HETE benötigt (3).

Prostacycline dagegen induzieren die Freisetzung von Renin. Auch hier blockierte eine Behandlung mit 12-HPETE und 12-HETE die durch Prostacycline induzierte Reninfreisetzung. Dies zeigt, dass 12-HETE nicht nur ein potentieller Modulator des Einflusses von Prostacyclinen auf Renin ist, sondern dass diese Stoffe in Zellen kritische Faktoren für die Reninfreisetzung in den juxtaglomerulären Zellen sein könnten (1). In diesem Zusammenhang scheint auch Angiotensin II (ANG II) eine Bedeutung zu haben. Bei einem weiteren Versuch unterdrückte ANG II die Reninfreisetzung und stimulierte die Lox-12-Formation in den kortikalen Nierenanteilen und in einem mit juxtaglomerulären Zellen angereicherten Präparat. Die Lox-Blocker BW755c und Baicalein schwächten die ANG II-Reninhemmung ab und senkten die 12-HETE-Formation. Cyclooxygenase- oder Lox-5-Blocker veränderten dagegen den Renin- sowie den 12-HETE-Spiegel nicht. Die hemmende Wirkung von ANG II auf Renin scheint also nicht über den Cyclooxygenase- oder den Lox-5-Weg, sondern über das Lox-12-Produkt 12-HETE vermittelt zu werden. Dies zeigt, dass die Lox-12-Produkte eine zentrale Rolle bei der Reninfreisetzung spielen könnten (2). Es gibt Beobachtungen, die auf eine physiologische Bedeutung der Renin-Sekretions-Regulation der juxtaglomerulären Zellen durch Lox-Produkte hindeuten. 12-HPETE- und 12-HETE-Blocker reduzieren den arteriellen Blutdruck und sind Stimulatoren für eine erhöhte Plasma-Renin-Konzentration (PRC). So zeigte sich bei einem Versuch an Ratten, dass durch eine Blockierung der Lox-12 die 12-HETE-Produktion unterdrückt wird und somit sich die PRC um das 2-3-fache steigert. Außerdem steigerte sich die Reninfreisetzung in der Niere. Die 12-HETE dagegen blockierte die Erhöhung der Reninfreisetzung gänzlich. In diesem Versuch bekam eine Gruppe der Versuchstiere hohe Salzmengen, die andere Gruppe eine reduzierte Salzdosis. Die Gruppe der Versuchstiere, die eine hohe Salzmenge bekamen, wies eine beträchtlich höhere 12-HETE-Konzentration am Cortex der Niere auf als die Gruppe, deren Salzdosis reduziert war. Eine chronische Gabe eines Lox-Blockers führte bei diesen beiden Gruppen zu höheren PRC-Werten als bei den Gruppen, die diesen Blocker nicht bekamen.

Lox-Blocker sind also mögliche Stimulatoren der PRC. Das zeigt, dass es eine physiologische Unterdrückung der Reninfreisetzung durch Lox-Produkte gibt, die während hoher Salzeinnahmen wirksam sind. Hohe Salzeinnahmen verstärken also die Unterdrückung der PRC durch die kortikale Lox-12-Aktivität (51). Beobachtungen bei einer nephrotoxischen Serumnephritis (NSN), die einen signifikanten Abfall der glomerulären Filtrationsrate (GFR) sowie des renalen Blutflusses (RBF), eine Erhöhung der glomerulären polymorphkernigen Leukozyten und eine Steigerung der Synthese von Thromboxan B₂, LTB₄ und 12-HETE bewirkt, zeigten, dass sich bei einer Blockierung der Lox-12 und somit der 12-HETE das Absinken der GFR und RBF vermindert (55). Der gleiche Effekt wurde bei Blockierung der Lox-5 beobachtet. Dies zeigt, dass die Lox-12 und Lox-5, und besonders deren Produkte 12-HETE, sowie LTB₄, LTD₄ und LTC₄ auch bei der NSN eine besondere Rolle spielen. Man nimmt außerdem an, dass der Lox-12-Metabolit 12-HETE und andere Metabolite am mesangialen Zellwachstum beteiligt sind, denn bei Tests mit einem Lox-12-Inhibitor wurde eine Hemmung des Zellwachstums beobachtet (34).

I.3.3. Lox-15

Eines der Produkte der AS ist die entzündungshemmende 15-Hydroxyeicosatetraensäure (15-HETE) bzw. Lipoxin (LX). Sie wird durch die Lox-15 über die Zwischenstufe der 15-Hydroperoxy-eicosatetraensäure (15-HPETE) katalysiert (siehe Abbildung 2!). Die Lox-15 und ihre Produkte wirken vermutlich als Antagonisten der Lox-5-Derivate LTC₄, LTD₄ und LTB₄ und können somit möglicherweise deren Eigenschaften bei einer Glomerulonephritis, wie z.B. die Reduzierung der GFR, die vermehrte Proteinurie und die verstärkte glomeruläre Schädigung, die durch polymorphkernige neutrophile Leukozyten verursacht wird, unterdrücken. Auf die Erkrankung folgend werden die glomeruläre LT-Synthese unterdrückt, die polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten durch Makrophagen ersetzt und die

glomeruläre Bildung des Lox-15-Derivats 15-HETE, einem Vorgängermolekül für die Lipoxin-Biosynthese, steigt im Laufe der Tage bis Wochen zunehmend an. D. h., dass die Aktivierung der Lox-15 und ihrer Produkte als Folge der Lox-5-Aktivität ein antiphlogistisches Signal sein könnte, welches den entzündlichen Prozessen der Leukotriene entgegenwirkt (4). Tests an Rattennieren zeigten dies bereits. Bei diesen Tests wurde das menschliche Lox-15-Gen in die Nieren transfiziert und drei Tage später eine antikörpervermittelte Glomerulonephritis erzeugt. Bei den Nieren, in denen die humane Lox-15-mRNA exprimiert wurde, konnten die glomerulären Funktionen, wie GFR und die Proteinexkretion, sowie ex vivo die Biosynthese von LTB₄ erhalten bleiben bzw. wieder normalisiert werden. Bei den Kontrollgruppen dagegen, in denen keine Lox-15-mRNA transfiziert wurde, war das nicht der Fall (31). Schließlich üben die Lox-15-Produkte 15-HPETE und 15-HETE ebenso wie die Lox-12-Produkte 12-HPETE und 12-HETE, wie schon vorher beschrieben, eine hemmende Wirkung auf die Reninfreisetzung aus. Bei den Lox-15-Produkten werden jedoch höhere Konzentrationen zur Hemmung der Reninfreisetzung benötigt (3).

I.4. Cytochromoxidasen

Neben Cyloxygenasen und Lipxygenasen sind Cytochromoxidasen bzw. Cytochrom P450 Monooxygenasen (Cyp) an der AS-Kaskade als Katalysatoren beteiligt. Cytochromoxidasen sind Endoxidasen der Atmungskette. Sie sind Hämoproteine und bestehen aus 8-13 Polypeptiduntereinheiten. Sie enthalten neben den Cytochromen a und a₃, die als prosthetische Gruppen das Häm besitzen, zwei Kupferionen und katalysieren den Elektronentransport von Cytochrom c auf Sauerstoff (40). Bei dieser Oxidase wird reduziertes Cytochrom c direkt mit Sauerstoff reoxidiert, was Wasserbildung zur Folge hat (25). Atemgifte wie Blausäure oder

Kohlenmonoxid können sich mit dem Fe der Cytochrome verbinden. Sie blockieren diese und somit auch die innere Atmung. Cytochrom P450 ist ein Derivat des Häm, das als Coenzym vieler Monooxygenasen zusammen mit NADPH + H⁺ und einem Flavinnukleotid vor allem an Oxidationsreaktionen in der Biosynthese der Steroide sowie der Biotransformation von Pharmaka, Hormonen u. a. beteiligt ist (40). Über Cytochromoxidasen werden aus der AS durch die ω/ω -1-Hydroxylierung 19- und 20-Hydroxyeicosatetraensäure (HETE) und per Epoxidation die 5,6-, 8,9-, 11,12-, und 14,15-Epoxyeicosatriensäuren (EET) gebildet (33) (siehe Abbildung 2!). Die Cyp4-Familie besteht aus elf Untereinheiten (Cyp4A-Cyp4M), die konstitutive und induzierbare Isoenzyme kodieren, welche sowohl bei Säugetieren als auch bei Insekten exprimiert sind. Die Cyp4A-Unterfamilie verschlüsselt mehrere Cytochrom P450-Enzyme, die genauso wie Enzyme bei der ω -Hydroxylierung verschiedener Prostaglandine die Fähigkeit besitzen, das terminale ω -Carbon und in einem geringeren Ausmaß die ω -1- Position gesättigter und ungesättigter Fettsäuren zu hydroxylieren (48).

I.4.1. Cyp4A1, Cyp4A2, Cyp4A3

Die Cyp4A1-, Cyp4A2- und Cyp4A3-Gene sind die am meisten untersuchten Enzyme der Cyp4-Familie. Sie sind sowohl in der Leber als auch in der Niere konstitutiv exprimiert. Ihre Expression wird durch Peroxisom-Proliferatoren hervorgerufen, wie z.B. das lipidsenkende Medikament Clofibrat. Die Induktion der Cyp4A-Expression entsteht durch Clofibrat mittels Aktivierung der Transkription, die möglicherweise über einen Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor (PPAR) vermittelt wird. Die Expression der Cyp4A-Gene wird hormonell reguliert. Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die Cyp4A1-3-mRNA und -Proteine über die Laktation und über die Plazenta induziert werden. Es gibt einen sehr engen Zusammenhang zwischen der mikrosomalen Cyp4A1-Induktion, der Peroxisom-Proliferation und der Induktion des peroxisomal metabolisierenden Systems für Fettsäuren. Die Cyp4A-

Gene könnten auch am Metabolismus der Arachidonsäure und an physiologisch wichtigen Prozessen, wie z. B. den Blutfluss in der Niere, in der Augenhornhaut und im Gehirn beteiligt sein (48). Insgesamt exprimieren sowohl männliche als auch weibliche Rattennieren Cyp4A1, Cyp4A2, Cyp4A3 und Cyp4A8. Bei weiblichen Rattennieren scheinen Cyp4A1 und Cyp4A8 vorherrschend zu sein. Die Cyp4A2-Expression bei den weiblichen Rattennieren ist viermal kleiner als bei den männlichen. Die Expression der Cyp4A-Isoformen ist also vermutlich geschlechtsabhängig und es scheint, dass unterschiedliche Cyp4A-Isoformen in den verschiedenen Nierensegmenten und Nierengefäßen von Ratten hindurch exprimiert sind (14). Um die wichtige Rolle der Cyp4A-Isoformen bei der 20-HETE-Synthese in der Niere zu untersuchen, wurden bei einem Versuch an Ratten spezifische Antisense-Oligonukleotide (ODN) entwickelt und verabreicht. Eine Gabe von Cyp4A2 Antisense-ODN i.v. für 5 Tage reduzierte die vaskuläre 20-HETE-Synthese um 48% ohne Effekt auf die tubuläre Synthese. Eine Gabe von Cyp4A1 Antisense-ODN dagegen verminderte sowohl die vaskuläre als auch die tubuläre 20-HETE um 52% bzw. 40%. Messungen ergaben außerdem eine Reduzierung des Blutdrucks um 17 +/- 6 mmHg bei der Gruppe, die Cyp4A1 Antisense-ODN erhielt, und eine Reduzierung um 16 +/- 4 mmHg bei der Gruppe, die Cyp4A2 Antisense-ODN bekam. Dies zeigt, dass Cyp4A1 der Hauptpromotor für die Bildung der 20-HETE in der Rattenniere ist und dass man durch ODN die 20-HETE-Synthese hemmen und somit ihre Rolle bei der Regulation der Nierenfunktion und des Blutdrucks erforschen kann (53).

Der lebensgefährliche Bluthochdruck, der die Funktion des Herzens, des Gehirns und der Niere erheblich beeinträchtigen kann, wird besonders durch Androgene beeinflusst. Das zeigten bereits Versuche an Ratten. Denn eine Behandlung mit 5 α -Dihydrotestosteron (DHT) steigerte die Aktivität der AS- ω / ω -1-Hydroxylase in der Niere und die Biosynthese der vasokonstriktorisch wirkenden 20-HETE bei männlichen und weiblichen Ratten um 165% bzw. 177% und somit den systolischen Blutdruck bei männlichen und weiblichen Ratten um 46 mmHg bzw. 57 mmHg. Durch die Androgene steigerte sich die Cyp4A8-mRNA in den

Nierenabschnitten. Die Konzentration der Cyp4A1-Transkripte nahm dagegen ab. In seziierten Mikrogefäßen der Niere zeigte sich eine androgen-abhängige Hochregulation der vaskulären Cyp4A8 mRNA und eine vierfache Steigerung der 20-HETE-Synthase-Aktivität. Umgekehrt wurden die Konzentrationen der Cyp4A2- und Cyp4A3-Transkripte durch DHT geschlechtsspezifisch geregelt. Männliche Ratten zeigten eine geringfügige Abnahme, weibliche dagegen eine Erhöhung dieser Werte (33). Eine frühe Kastration oder Blockierung der androgenen Rezeptoren an Ratten verminderte dagegen die Entwicklung eines Bluthochdrucks. Umgekehrt erhöhte eine Testosteronbehandlung bei weiblichen Ratten mit einer Ovariectomie und bei kastrierten Männchen wiederum den Blutdruck. Eine alleinige Ovariectomie bei spontan hypertonen weiblichen Ratten führte dagegen zu keiner Veränderung des Blutdrucks. Androgene scheinen daher ein signifikanter Risikofaktor zu sein. Das gleiche Bild zeigte sich auch bei Menschen. Auch hier ist der Blutdruck bei Männern höher als bei altersentsprechenden Frauen, deren Östrogene den Blutdruck nicht erniedrigen oder gegen kardiovaskuläre Erkrankungen vorbeugen, während wiederum bei Frauen eine erhöhte Androgen-Produktion mit einem erhöhten Risiko verbunden ist (50). Diese Beobachtungen machen deutlich, dass Androgene und die androgen-vermittelte 20-HETE-Aktivierung die Nierenfunktion und den systemischen Blutdruck durch eine Kombination aus Transkriptionsmechanismen und hämodynamischen Mechanismen beeinflussen.

I.4.2. Cyp2C11, Cyp2C23

Ebenso wie die Cyp4-Gene sind auch das Cyp2C11- und das Cyp2C23-Gen in der Rattenleber und –Niere exprimiert. Außerdem wurde Cyp2C23 in Lunge, Milz, Gehirn, Herz und Hoden und Cyp2C11 ebenfalls im Gehirn von Ratten entdeckt. Cyp2C11 ist die Cyp-Isoform, die bei männlichen Ratten am meisten exprimiert ist, und wird in der Leber durch Wachstumshormone und in der Niere hauptsächlich durch Geschlechtshormone reguliert. Das

zeigte ein Versuch an erwachsenen männlichen Ratten, die einer Hypophysektomie unterzogen wurden. Sowohl eine Hypophysektomie als auch eine Neutralisation der Wachstumshormone führte zu erniedrigten Cyp2C11-Apoprotein und -mRNA-Werten in der Leber. Ein Wachstumshormonersatz verhinderte den Rückgang dieser Werte bei diesen Ratten. Ein Rattenhypophysen-Extrakt führte zu ähnlichen Ergebnissen bei gesunden oder kastrierten Ratten, die einer Hypophysektomie unterzogen wurden. Eine subkutane Testosteron-Injektion hatte dagegen keinen Effekt auf die abgesenkten Werte in der Leber. Auch in der Niere kam es zu einer Absenkung der Cyp2C11-Apoprotein und -mRNA-Werte nach einer Hypophysektomie. Eine Behandlung mit Wachstumshormonen konnte die Absenkung dieser Werte nicht verhindern, eine Ergänzung mit Testosteron oder Rattenhypophysen-Extrakt dagegen schon, wobei der Effekt des Rattenhypophysen-Extrakts nur bei gesunden Ratten auftrat (6).

Cyp2C23 bildet die Hauptepoxygenase in der Niere. In der Rattenniere ist sie teilweise verantwortlich für die Produktion der EET, wie 8,9-EET, 11,12-EET und 14,15-EET, jedoch nicht für die Produktion von 5,6-EET. Bei einem Versuch an Ratten wurde die Expression des Gens in Leber, Niere, Lunge und Hoden auch während der Entwicklungsphase untersucht. Lediglich in der Leber und der Niere fand man nennenswerte Cyp2C23 RNA-Werte. Die Expression zeigt unterschiedliche Profile in beiden Geweben. Sie ist jedoch nicht nur gewebes-, sondern auch altersabhängig. So erreicht die Expression in der Leber ihren Maximalwert schon bei den Neugeborenen und bleibt dort ziemlich stabil. Dagegen wächst der Wert in der Niere in den ersten 3 Lebenswochen fortschreitend an, bevor er allmählich wieder abnimmt (28). Der Cyp2C23-Wert wird durch DHT beeinflusst. Dies zeigte ein Versuch an männlichen und weiblichen Ratten. Hier wurde die renale vaskuläre Produktion der vasokonstriktorisch wirkenden 20-HETE und der vasodilatatorisch wirkenden EET vor und nach Behandlung mit 5 α -Dihydrotestosteron (DHT) untersucht. In den renalen interlobären Arterien der männlichen Ratten war das Verhältnis zwischen 20-HETE und EET

vor der Behandlung mit DHT doppelt so hoch als in den Arterien der weiblichen Nieren. Eine Behandlung mit DHT dagegen erhöhte in den Arterien der männlichen Ratten das Verhältnis um 85% und in den Arterien der weiblichen Ratten um 230%. Das machte die Differenz des Verhältnisses zwischen 20-HETE und EET in männlichen und weiblichen Arterien zunichte. Sowohl bei den männlichen als auch bei den weiblichen Ratten kam es zu einer Erhöhung des Blutdrucks um 21,3 +/- 4,0 mmHg bzw. um 15,3 +/- 5,1 mmHg. Durch das DHT wurde in den renalen Gefäßen, wie bereits beschrieben, vor allem Cyp4A8 ausgelöst, während der Wert des Cyp2C23 sank. Somit wird wohl ein erhöhter vaskulärer Tonus durch Androgene beeinflusst, indem die Cyp2C23- sowie die vasodilatatorischen EET-Werte sinken, Cyp4A8 induziert wird und verstärkt 20-HETE gebildet wird (49).

Transgene Ratten, die sowohl humane Renin- als auch Angiotensinogen-Gene im Überfluss exprimieren, entwickeln Bluthochdruck, Entzündungen und Nierenversagen. Diese pathologischen Symptome scheinen mit Veränderungen des P450-abhängigen AS-Metabolismus in der Niere verbunden zu sein. Bei einem Versuch wurden die transgenen Ratten mit einer Kontrollgruppe von Ratten mit normalem Blutdruck verglichen. Bei den transgenen Ratten waren nicht nur die mikrosomalen AS-Epoxygenase- und -Hydroxylase-Aktivitäten, sondern auch die Proteinwerte einiger AS-Epoxygenasen, wie z.B. Cyp2C11, Cyp2C23 und Cyp2J nach 5 bis 7 Wochen in der Niere im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich reduziert. In der Leber dagegen gab es keine mikrosomalen Veränderungen in der Expression und Aktivität der AS-Epoxygenasen und -Hydroxylasen. Die bereits beschriebenen Schäden und Entzündungen in der Niere scheinen daher mit einer gewebsspezifischen P450-abhängigen Abnahme des AS-Metabolismus verbunden zu sein. Da jedoch die Produkte der AS antiphlogistische Eigenschaften besitzen, kommt es gerade durch diese Abnahme des AS-Metabolismus zu diesen unkontrollierten entzündlichen Prozessen in der Niere der transgenen Ratten (16). Die AS unterdrückt die epithelialen Na-Kanäle über den Cytochrom P450-Epoxygenase-abhängigen Weg. Daher wurde bei einem weiteren Versuch

an Ratten getestet, ob eine geringe Na-Einnahme die Expression der Cyp2C23 unterdrückt, zumal die Cyp2C23 hauptverantwortlich für die Umwandlung von AS zu EET in der Niere ist und die hemmende Wirkung der AS auf die epithelialen Na-Kanäle abschwächt. Eine eingeschränkte Natriumgabe unterdrückte die Expression des Cyp2C23 im TAL und CD maßgeblich. Bei Ratten mit natriumreicher Ernährung wurde dagegen eine Zunahme der Expression des Cyp2C23 im Cortex und der äußeren Medulla beobachtet. Natriumarmer Ernährung führte auch zu einem Abfall des Anteils der 11,12-EET im kortikalen CD im Vergleich zu einer normalen Natriumverabreichung. Bei einer Applikation von 15 µM AS bei Ratten nach dreitägiger natriumarmer Ernährung beobachtete man eine Verminderung der Aktivität der epithelialen Natriumkanäle im CCD um 77%. Dieser inhibitorische Effekt war jedoch bei Ratten nach 14-tägiger natriumarmen Ernährung deutlich abgeschwächt. Außerdem erhöhte die Unterdrückung der Cytochrom P450-Epoxygenase die Aktivität der epithelialen Na-Kanäle in CCD. In den distalen Nephronsegmenten war die Na-Absorption deutlich erhöht, hatte aber keinen signifikanten Effekt nach einer verminderten 14-tägigen Na-Verabreichung. Somit wurde gezeigt, dass eine verminderte Na-Einnahme die Aktivität und die Expression von Cyp2C23 verringert und den unterdrückenden Effekt der AS auf den Na-Transport abschwächt (52). Auch der Tumornekrosefaktor alpha (TNF-alpha) wirkt sich auf die Expression des Cyp2C23 aus. Das zeigt ein weiterer Versuch an männlichen Sprague-Dawley-Ratten, denen eine hohe Salzdosis verabreicht wurde (8% NaCl) und eine osmotische Minipumpe implantiert wurde, um für 14 Tage Angiotensin II (ANG II) freizusetzen. Diese wurden in drei Gruppen unterteilt. Der ersten Gruppe wurde eine hohe Salzdosis, der zweiten Gruppe eine hohe Salzdosis in Kombination mit Angiotensin und der dritten Gruppe eine Salz-Angiotensin-Dosis in Verbindung mit dem TNF-alpha-Blocker Etanercept verabreicht. Die Ergebnisse fielen im Vergleich zur zweiten Gruppe eindeutig zugunsten der letzten Gruppe trotz Erhöhungen des Blutdrucks in den ersten zwei Wochen aus. Die Gruppe mit dem TNF-alpha-Blocker hatte eine geringere Erhöhung der Blutdruckwerte als die zweite

Gruppe. Die Werte der Albuminurie, Proteinurie, die Urin-Monozyten-Chemoattraktator-Protein-1-Ausscheidung und die Monozyten/Makrophagen-Infiltration waren in der zweiten Gruppe viel höher als in der dritten Gruppe. Die zweite Gruppe hatte außerdem eine geringere renale Cyp2C23-Expression und eine höhere renale Epoxidhydrolase-Expression. In der Gruppe mit dem TNF-alpha-Blocker Etanercept war die Cyp2C23-Expression erhöht und die Epoxid-Hydrolase-Expression erniedrigt. D.h. also, dass sich TNF-alpha negativ auf die Expression von Cyp2C23, die Blutdruckregulation und anderen Nierenerkrankungen auswirkt (8). Bei einem weiteren Versuch zeigte eine hohe Verabreichung von Salz an Ratten für 14 Tage eine Erhöhung der Cyp2C11-Protein-Werte im renalen Cortex und eine bedeutende Erhöhung der Cyp2C11- und Cyp2C23-Protein-Werte in renalen Mikrogefäßen. Eine Kombination der hohen Salzgabe in Verbindung mit Angiotensin II verhinderte dagegen Erhöhung der Cyp2C11-Proteinexpression im Cortex und erniedrigte die Expression der Cyp2C11-, Cyp2C23- und Cyp2J-Proteine in den renalen Mikrogefäßen signifikant. Zusätzlich war die Reaktionsfähigkeit der afferenten Arteriolen auf Acetylcholin und Natriumnitroprussid bei Angiotensin II-Verabreichung deutlich abgeschwächt. Diese Abschwächung war bei einer Kombination mit einer erhöhten Salzgabe deutlich höher. Dies lässt vermuten, dass eine chronische Angiotensin II-Zufuhr bedingt durch Salz zu einem erhöhten systolischen Blutdruck beiträgt, welcher größer ist als bei einer alleinigen Verabreichung von Salz (59).

Cyp2C11 scheint eine besondere Rolle bei der Regulation des zerebralen Blutflusses und damit bei der Verhinderung eines Hirnschlags zu spielen. Bei einem Versuch an hirschlagnanfälligen spontan hypertonen Ratten mit Bluthochdruck, welche auf eine Salzergänzung empfindlich reagieren, wurden P450-Isoformen im Gehirn untersucht. Im Alter von 9 Wochen wurde ihnen eine reguläre Kost mit bzw. ohne 0,25% Clofibrat verabreicht und für 10 Tage eine 1% NaCl-Lösung zum Trinken gegeben. Die anfälligen Ratten starben nach Salzzufuhr innerhalb von 60 Tagen. Clofibrat dagegen verlängerte das

Überleben um Einiges, ohne den erhöhten Blutdruck signifikant zu vermindern. Die Cyp2C11- und die Cyp4A1-Expression im zerebralen Cortex der hirschlagnanfälligen spontan hypertonen Ratten waren im Vergleich zu den altersentsprechenden spontan hypertonen männlichen Ratten erniedrigt. Die Salzzufuhr erniedrigte die Cyp2C11-Expression im zerebralen Cortex der hirschlagnanfälligen spontan hypertonen Ratten. Deutliche Veränderungen der Cyp4A1-Expression im zerebralen Cortex gab es weder bei den hirschlagnanfälligen spontan hypertonen Ratten noch bei den spontan hypertonen Ratten. Clofibrat dagegen erhöhte die Cyp2C11-Expression im Gehirn und schwächte deren Unterdrückung erheblich ab. Zusätzlich erhöhte Clofibrat den Durchmesser der Blutgefäße und den zerebralen Blutfluss um Einiges (57). Auch bei bestimmten Erkrankungen, wie der Urämie, werden Cyp2C11 und andere Cyp-Isoformen vermindert exprimiert. Bei einem Versuch an Ratten wurde gezeigt, dass sich deren Werte nach einer Hämodialyse auf über 80% der Werte der Kontrollgruppe erhöhten (30).

I.5. Ziele der Versuche

HETE und Leukotriene können eine Reihe von wichtigen Reaktionen in der Niere beeinflussen, wie z.B. die Regulierung der glomerulären Filtrationsrate, der renalen Vasokonstriktion und des Blutdrucks. Das kann mit Erkrankungen in der Niere und in anderen Organen verbunden sein. In diesem Zusammenhang scheint daher die Lokalisierung der bereits beschriebenen Enzyme Lox-5, Lox-12, Lox-15, Cyp4A1, Cyp4A2, Cyp4A3, Cyp2C11 und Cyp2C23 entlang der Rattenniere sehr wichtig zu sein. In den folgenden Versuchen wurde deren Lokalisation untersucht.

II. Material

II.1. Geräte

Analysenwaage	Mettler, P210n Mettler, Toledo AB54
Autoklav	KSG 112
Beheizbarer Magnétführer	Heidolph, Typ MRI
Binokular	Nikon, SMZ-2B Zeiss, Stemi 2000 Zeiss, Stemi, DV4
Computerprogramm	Bioprofil D1 Software, Firma Labortechnik Fröbel
Polytron-Homogenisator	Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik, Ultra-Turrax T25
PCR-Gerät	Perkin Elmer,
pH-Meter	Knick, Digital pH-Meter
Photometer	Pharmazia Biotech, GeneQuant II
Pipetten	Gilson Pipetman P10, P20, P100, P1000
Schwanenhalsleuchte	Zeiss, KL 1500 LCD Schott, KL 1500 electronic
Spannungsquelle	Pharmazia LKB GPS 200/400
Speed Vac	Fröbel, Univapo 150 H
Sterilbank	Gelaire Flow Laboratories HF A 72
UV-Leuchttisch	Renner, Fluorescent Tables
Vortexer	Janke & Kunkel, MS1 Minishaker

	Heidolph, Typ Reax I
Wasserbad	Haake, D1/W13
Zentrifugen	Sigma
	Eppendorf Centrifuge 5415C
	Sorvall, RC 5C

II.2. Verbrauchsmaterial

Auslaufpipetten	Sarstedt, 10 ml und 25 ml
Falcontubes	Sarstedt, 50 ml mit und ohne Fuß, 15 ohne Fuß
Pipettenspitzen	Biozym Safe-Seal-Tips; 10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl; Sarstedt; 20 µl und 100 µl; ohne Filter
Petri-Schalen	Sarstedt, Tissue culture dish (10 x 35 mm)
Reagiergefäße	Sarstedt; 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml;
Sterile Filter	Sarstedt; Porengröße 0,2 µm

II.3. Chemikalien

Borsäure (Merck)
Bovine Serum Albumine (BSA) (PAA Laboratories GmbH)
Diethylpyrocarbonat (DEPC) (Fluka)
Eiessig (Meck)
Ethanol (Roth)
Ethidiumbromid (Sigma)

EDTA (Sigma)
Glycin (Fluka, 5 mM)
Guanidinthiocyanat (GTC) (Fluka)
Isopropanol (Merck)
Mercaptoethanol (Sigma)
Mineralöl
Natriumacetat (Merck)
Natriumcitrat (Sigma)
Natriumhydroxid (Merck)
Salzsäure (Roth)
Saures Phenol (Merck)
Sodium-N-lauroyl-sarcosinate (Sarcosyl) (Fluka)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) (Merck)

II.4. Enzyme

Collagenase (Worthington biochemical corporation, 0,5 mg / ml)
Deoxyribonuclease I (Sigma, 50 U / µl)
Rnasin Ribonuclease Inhibitor (Promega, 2500 U, 40 U / µl)
M-MLV Reverse Transcriptase (GIBCO BRL, 40000 U, 200 U / µl)
Soybean trypsin inhibitor (Sigma, 48 µg Taq DNA Polymerase (Roche, 250 U, 1 U / µl)

II.5. Biochemikalien

Agarose (Biozym)

BSA

5 x First Standard buffer (GIBCO BRL)

dNTP (Amersham Pharmacia Biotech Inc., 100 mM)

Eagle´s minimal essential medium (MEM) (Biochrom)

Loading dye (10 x)

Oligo(dT) (12 - 18) Primer (GIBCO GRL; Invitrogen, 0,5 µg / µl)

PCR buffer (Roche, 10 x Conc., MgCl₂)

Ready-Load φX 174 RF DNA/Hae III Fragments (GIBCO BRL, 0,1 µg / µl)

Total RNA aus der Bierhefe (5 µg / µl in DEPC-Wasser)

II.6. Lösungen, Puffer und Gel

Lösungen zur Mikrodissektion

Verdauungslösung:	12,5 mg Collagenase
	9,4 mg Glycine
	1,2 mg Trypsin Inhibitor
	25 µl DNase
	25 ml MEM
Stopplösung (1 %-ig):	0,6 g BSA
	60 ml MEM

Lösungen zur Isolierung der total RNA

DEPC-Wasser: 800 ml Bidest

800 µl DEPC über Nacht geöffnet im Abzug stehen gelassen,
anschließend autoklaviert

Sarcosyl (30 %-ig): 30 g Sarcosyl

100 ml DEPC-Wasser auf 250 ml aufgefüllt
mit ca. 6,0 ml 1 M HCl auf pH 7 eingestellt

Lösung D: 500 g Guanidinium Thiocyanat (4 M)

35,2 ml Natriumcitrat (25 mM, pH 7)

17,6 ml Sarcosyl

586 ml DEPC-Wasser

360 µl Mercaptoethanol pro 50 ml Lösung D

Saures Phenol, wassergesättigt

2 M Natriumacetat: 54,43 g Natriumacetat

mit ca. 75 ml Eiessig auf pH 4,8 bis 5,2 eingestellt

Chloroform

total RNA: 6 mg total RNA aus der Bierhefe

1,2 ml DEPC-Wasser

Ethanol, 70 % und 100 %

Isopropanol

Nukleotidmix (Endkonzentration 2,5 mM) für RT und PCR

dNTP: 25 µl á Nukleotid (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)

900 µl DEPC-Wasser

Puffer für Gelelektrophorese

EDTA (0,5M): 93.05 g EDTA

auf 500 ml mit DEPC-Wasser

mit ca. 10 g NaOH-Plätzchen auf pH 8 eingestellt

5x TBE-Puffer: 54 g Borsäure

27,5 g Borsäure

20 ml EDTA (0,5 M, pH 8)

auf 1000 ml mit Bidest aufgefüllt

1x TBE-Puffer: 100 ml 5x TBE-Puffer

400 ml Bidest

Gel

Agarosegel 2 %: 2 g Agarose

100 ml 1x TBE-Puffer

2 µl Ethidiumbromid

II.7. Tiere

Für die Untersuchung wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem Gewicht zwischen 200-250 g verwendet.

III. Methoden

III.1. Mikrodissektion

Zur Gewinnung der isolierten Nephronsegmente Glomerulus (Glom), proximaler konvoluter und proximaler gerader Tubulus (PCT, PST), dünne ab- und aufsteigende Teile der Henle Schleife (dTL, TL), dicke Teile der Henle Schleife (mTAL, cTAL), distaler konvoluter Tubulus (DCT) und Sammelrohre (CT/CCD, OMCD, IMCD) wurde nach einer modifizierten Kollagenase-Verdau-Methode nach Schafer et al. (45) vorgegangen. Die Versuchstiere wurden nach CO₂-Betäubung dekaptiert und ihre Nieren entnommen. Die so erhaltenen Nieren wurden unter Binokular-Kontrolle und mit Hilfe eines Skalpell auf Eis in die Zonen Cortex, äußere und innere Medulla getrennt. Die Zonen wurden wiederum längs der Tubuli in ca. 2 - 5 mm schmale Streifen geschnitten und anschließend getrennt voneinander bei 37° C in 2 ml Kollagenaselösung (=Verdaulösung) inkubiert. Nach den in Tabelle 1 aufgeführten Zeitabständen wurde der Überstand in 2 ml 1 % BSA-Lösung auf Eis abpipettiert und erneut Verdaulösung zu den verbliebenen Nierenstücken zugegeben. Dieser Vorgang wurde bis zu achtmal wiederholt.

Zone	Zeit
Cortex (C)	15' - 20'
Äußere Medulla (OM)	20' - 25'
Innere Medulla (IM)	25' - 30'

Tabelle 1: Die Zonen der Rattenniere. Die Zonen C, OM und IM wurden bei 37° C in 2 ml Verdaulösung inkubiert. Je nach Zone differierten die Inkubationszeiten.

Die durch Kollagenaselösung aus dem Gewebeverband gelösten Nephronsegmente sedimentierten in der Stopplösung, wurden anschließend aufgenommen und in Kulturschalen überführt. Unter der visuellen Kontrolle des Binokulars (maximale Vergrößerung 50- bzw. 100-fach) wurden die verschiedenen Teilstrukturen gesammelt. Diese konnten aufgrund ihrer Struktur, Form und Farbe unterschieden werden. Von allen Nephronsegmenten – PCT, PST, dTL, TL, mTAL, cTAL, DCT, CT/CCD, OMCD und IMCD – wurden mindestens 11 mm von den Glomeruli mit bzw. ohne Arteriole mindestens 22 und von den Gefäßbündeln mindestens 6 Stück gesammelt. Gelegentlich wurden Glomeruli mit Arteriole gesammelt, die mit 0,9%-iger NaCl-Lösung gespült wurden, um Verunreinigungen mit Blutbestandteilen auszuschließen. Nach der Vermessung der Tubuli wurden sie in 400 µl Lösung D mit Mercaptoethanol (360 µl / 50 ml Lösung D) überführt und bei – 80° C bis zur Isolierung der RNA aufbewahrt. Durch die Lösung D wurden Proteine und unter anderem auch RNasen denaturiert und auf diese Weise die RNA vor weiterem Abbau geschützt.

III.2. Isolierung der RNA

III.2.1. Schutzmaßnahmen

Um einen Abbau der RNA durch die stabilen und ubiquitären RNasen zu verhindern, wurden entsprechende Vorsichtsmaßnahmen ergriffen:

Alle verwendeten Glas- und Metallgerätschaften (z. B. Spatel) wurden vor Gebrauch über Nacht im Hitzeschrank bei 180° C ausgeglüht, um dadurch die gegenüber dem Autoklavieren unempfindlichen RNasen zu zerstören. Die Lösungen selbst wurden mit RNase-freiem DEPC-Wasser angesetzt. Das mit DEPC versetzte Wasser wurde vor Verwendung über Nacht im Abzug abgedampft und anschließend bei 120° C und 2 bar 20 min autoklaviert. Zum RNase-

freien Arbeiten wurden stets Latex-Handschuhe benutzt, um dadurch Kontaminationen mit auf der Haut befindlichen RNasen zu verhindern. Die verwendeten Verbrauchsmaterialien (Eppendorf-Cups, Filterspitzen) waren RNase-frei.

Um die Aktivitäten eventuell trotzdem vorhandener RNasen zu minimieren, wurden die Proben bei der Isolierung auf Eis bearbeitet und Kühlzentrifugen benutzt.

III.2.2. Isolierung der RNA der Tubuli

Die gesammelten Nephronsegmente in Lösung D wurden auf Eis aufgetaut, stark gevortext und zentrifugiert. Anschließend wurde der gesamte Inhalt der Cups (400 µl) in 1,5 ml Eppendorf-Cups überführt und nacheinander jeweils folgende Reagenzien zugegeben:

- 12 µg total RNA aus der Bierhefe
- 40 µl (= 1 / 10 Volumen) Na (CH₃COO)
- 400 µl (1 Volumen) saures Phenol, Wasser gesättigt
- 80 µl (2 / 10 Volumen) CHCl₃ (Chloroform)

Zwischen den Schritten wurde stark gevortext und kurz zentrifugiert. Nach 15 min auf Eis wurden die Proben anschließend 20 min bei 4° C und 12000 g zentrifugiert. Es bildeten sich zwei Phasen. Eine obere wässrige und eine untere organische Phase. Die obere Phase wurde abpipettiert (4 x 80 µl bis 90 µl) und mit 400 µl (=1 Volumen) Isopropanol (100 %) vermischt. Die untere Phase wurde verworfen. Nachdem die Cups mit dem Isopropanol-Gemisch mindestens 1 h zur Fällung bei – 20° C aufbewahrt blieben, wurde zweimal 20 min bei 4° C und 12000 g zentrifugiert, wobei der jeweils gebildete Überstand verworfen wurde. Das nach dem ersten Zentrifugieren erhaltene Pellet wurde mit 500 µl Ethanol (70 %)

gewaschen. Das nach dem zweiten Zentrifugieren erhaltene Pellet wurde an der Luft getrocknet bzw. in der Speed Vac äußerst vorsichtig 2 min - 5 min getrocknet und mit 9 μ l DEPC-Wasser resuspendiert. Die gesamten 9 μ l RNA in DEPC-Wasser wurden für die folgende RT- Reaktion eingesetzt.

III.3. Reverse Transkription (RT)

Für die reverse Transkription der Glomeruli- und Tubuli-RNA in cDNA wurde die gesamte RNA-Menge (9 μ l) eingesetzt. Zu den 9 μ l RNA wurden je 1 μ l Oligo (dT) (12-18) (0,5 μ g / μ l) gegeben. Die Ansätze wurden bei 65° C für 5 min inkubiert, um die Tertiärstruktur der RNA zu zerstören und somit eine fehlerfreie Translation der RNA zu ermöglichen. Auch wurde dadurch die Hybridisierung des Oligo (dT)-Primers mit den Poly-A-Enden des 3'-OH-Endes der mRNA gewährleistet. Danach wurde auf Eis weitergearbeitet, um eine erneute Ausbildung der Tertiärstruktur zu verhindern.

Zu jedem Ansatz wurden 12 μ l des folgenden RT-Mixes gegeben:

- 4 μ l dNTP
- 4 μ l First Strand Buffer (5 x)
- 2 μ l DEPC-Wasser
- 0,5 μ l BSA
- 0,5 μ l Rnasin (Ribonuclease Inhibitor)
- 1 μ l M-MLV Reverse Transkriptase (RT)

Nach Vortexen und Zentrifugieren wurde der Ansatz für 1h bei 37° C inkubiert, wodurch eine Anpolymerisation der Desoxyribonukleotide in 5' → 3'-Richtung durch die RT erfolgte. Danach wurde das Enzym durch zweiminütiges Erwärmen auf 94° C hitzedenaturiert. Die so erhaltene cDNA der Tubuli wurde anschließend mit Wasser (Bidest) verdünnt, so dass 1 mm Nephronsegment bzw. zwei Glomeruli 2 µl cDNA entsprachen. Bis zur weiteren Verwendung wurde die cDNA bei – 20° C aufbewahrt.

III.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Nach der Transkription der RNA in einzelsträngige cDNA können mit Hilfe spezifischer Primer und der thermostabilen Taq-DNA-Polymerase beliebige DNA-Sequenzen amplifiziert werden.

III.4.1. Durchführung der PCR-Versuche

Als Vorbereitung zur PCR wurde ein Mix aus folgenden Komponenten hergestellt:

- 1 µl Sense-Primer (10 - 20pmol/µl)
- 1 µl Antisense-Primer (10 - 20pmol/µl)
- 2 µl dNTP (2,5 mM)
- 2 µl PCR-Puffer (10 x)
- 1 µl Taq (1 U / µl)
- auf 18 µl mit Bidest auffüllen

Zu je 18 µl des Mixes wurden 2 µl der cDNA pipettiert. Folgende Tabelle zeigt die Auswahl der verwendeten Primer für die PCR:

Primer	Sequenzen
5-LOX-1	5'- ACCCCCTTTTCAAGCTGCTGG - 3'
5-LOX-2	5'- CGGCAATCACGCTGACGATG - 3'
12-LOX-1	5'- TGACAAGGCAATGAGCACAGGT - 3'
12-LOX-2	5'- CAACAAAGCAGGAGTCTGGGGAT - 3'
15-LOX-1	5'- GTGGGACTGGCTACTGGC - 3'
15-LOX-2	5'- CATGCTTGGCTGAGCAGG - 3'
CYP4A1-a	5'- CAGCTGGCAGGTCAAGACT - 3'
CYP4A1-b	5'- GAATCTGGTCCAGGTGAT - 3'
CYP4A2-a	5'- CCTGCCAGATTGCTCAT - 3'
CYP4A2-b	5'- GAGCTGAGCTCTCGACTC - 3'
CYP4A3-a	5'- GGTGCCTGCTTTACAGTGG - 3'
CYP4A3-b	5'- GGAGACATAGTGGAAGATC - 3'
CYP4A3-c3	5'- TCCAGGTCCTACACCAAGG - 3'
CYP4A3-d3	5'- AGTGCCTCTTCTCCTG - 3'
CYP2C11-1	5'- CAATCCGAGTCTGAGTT - 3'
CYP2C11-2	5'- TGCTGAGAATGGCATAAA - 3'
CYP2C23-1	5'- TGGCTGTCTGTGGGTCTAACT - 3'
CYP2C23-2	5'- AATCACACGGTCAAGTTCCTCAT - 3'

Tabelle 2: Verwendete Primer und deren Sequenzen

Nach Zentrifugieren und Vortexen wurde je ein Tropfen Mineralöl auf den Ansatz gegeben, um ein Verdampfen während der PCR zu verhindern. Die Reaktion der PCR fand im Thermocycler statt. Die Proben wurden 30'' auf 94° C erwärmt, um die doppelsträngige DNA aufzuschmelzen. Anschließend wurde für 30'' bei 60° C inkubiert, wodurch ein Annealing

der Primer erfolgte. Nochmaliges Erhitzen auf 72° C für 1' setzte die Polymerasekettenreaktion in Gang (72° C=Temperaturoptimum der Taq). Dieser Vorgang wurde für 30 - 36 Zyklen wiederholt. Wählt man eine zu hohe Zyklenzahl, gelangt man in den Sättigungsbereich, in dem sich die PCR-Fragmente nicht mehr exponentiell vervielfachen. In diesem Sättigungsbereich sind die Stärken der erhaltenen DNA-Banden nicht mehr vergleichbar. In der PCR entstandene DNA kann bei 4° C aufbewahrt werden.

III.5. Auswertung der PCR

III.5.1. Gelelektrophorese

18 µl des PCR-Produkts wurden unter dem Mineralöl abpipettiert und mit 2 µl Loading Dye vermischt. Dieses soll das PCR-Produkt beschweren, so dass es in den Taschen des Agarosegels herabsinkt. Die Ansätze und der Längenstandard (φX RF DNA/Hae III Fragments) wurden in jeweils eine Tasche des 2 %-igen Agarosegels mit Ethidiumbromid aufgetragen und bei ca. 120 V aufgetrennt. Mit Hilfe des Längenstandards kann kontrolliert werden, ob die Länge des gebildeten PCR-Produkts mit der Fragmentlänge des gewünschten PCR-Produkts übereinstimmt. Nach etwa 30' wurde das Gel aus der Gelelektrophoresekammer genommen und weiter ausgewertet.

IV. Ergebnisse

Die folgenden Ergebnisse basieren auf mindestens zehn Sammlungen der Nephronsegmente Glomeruli mit bzw. ohne Arteriole (Glom⁻/Glom⁺), proximale konvolute Tubuli (PCT), proximale gerade Tubuli (PST), absteigende dünne Teile der Henle-Schleife der äußeren Medulla (dTL), ab- und aufsteigende dünne Teile der Henle-Schleife der inneren Medulla (TL), medulläre und kortikale Teile der dicken aufsteigenden Henle-Schleife (mTAL, cTAL), distale konvolute Tubuli (DCT), Sammelrohre aus dem Kortex mit verbindendem Tubulisegment (CCD/CT), der äußeren Medulla (OMCD) und der inneren Medulla (IMCD) sowie Bündel von Vasa recta (VR). Einzelne Segmente wurden gelegentlich öfter gesammelt. Aus diesen verschiedenen Segmenten wurde die total RNA isoliert und durch reverse Transkription (RT) die cDNA gebildet. Im Anschluss daran wurde eine Aktin-PCR mit Aktinprimern bei 30 Zyklen durchgeführt und die Aktinsignale der einzelnen Proben mittels Gelelektrophorese auf 2%-igem Agarosegel kontrolliert. Abbildung 3 zeigt dabei beispielhaft in oben genannter Reihenfolge die deutlichen Aktin-DNA-Signale. Zur Lokalisation der Lipoxygenasen und Cytochromoxidasen wurden nur Proben verwendet, die ein deutliches Aktinsignal ergaben, wie auf der Abbildung dargestellt. Alle anderen wurden verworfen.

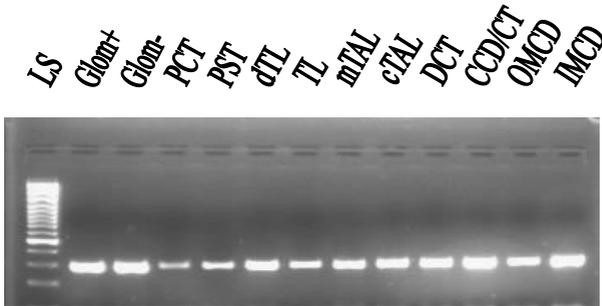


Abbildung 3: Charakteristisches Bild für Aktinbanden am Beispiel einer Sammlung aller Nephronsegmente der Rattenniere (außer Vasa recta) bei 30 Zyklen. Obiges Schema zeigt die Banden der einzelnen Nephronsegmente unterteilt in Glomeruli mit und ohne Arteriole (Glom⁺, Glom⁻), proximale konvolute Tubuli (PCT), proximale gerade Tubuli (PST), absteigende dünne Teile der Henle-Schleife der äußeren Medulla (dTL), ab- und aufsteigende dünne Teile der Henle-Schleife der inneren Medulla (TL), medulläre und kortikale Teile der dicken aufsteigenden Henle-Schleife (mTAL, cTAL), distale konvolute Tubuli (DCT) sowie Sammelrohre (CCD/CT) mit Verbindungsstück (CT) aus dem Kortex, der äußeren (OMCD) und inneren Medulla (IMCD). LS beschreibt den Längenstandard.

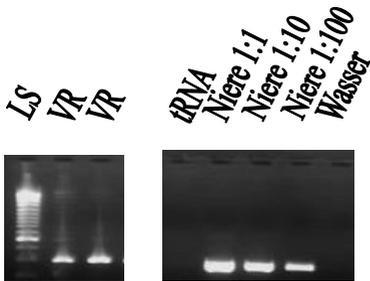


Abbildung 4: Aktinbanden am Beispiel von Vasa recta (VR) und verschiedenen konzentrierten Nierenverdünnungen bei 30 Zyklen. In den Vasa recta ist jeweils eine deutliche Bande zu erkennen, d. h., die RNA wurde erfolgreich isoliert, und die Sammlung konnte also für weitere Tests verwendet werden. Bei den Nierenverdünnungen zeigte sich mit abnehmender RNA-Konzentration wie erwartet eine Abnahme der Intensität der Banden. Die tRNA der Bierhefe und Wasser dienten bei den PCR-Versuchen dabei als Negativkontrolle.

Zur Bestätigung der Reinheit der gesammelten Nephronsegmente wurden Marker benutzt. Dabei werden als Marker Genprodukte bezeichnet, deren genaue Lokalisation und Verteilung in den verschiedenen Nephronsegmenten bereits beschrieben war. Verwendet wurden folgende Genprodukte: Natrium-Kalium-2-Chlorid-Cotransporter (Isoform A: NKCC2-A), der Parathyreoidhormonrezeptor (PTH/PTHrP), Aquaporin-4 (AQ-4), thiazidsensitive Natrium-Chlorid-Cotransporter (NCC) und Natrium-Glucose-Cotransporter (Isoform 2: SGLT-2). Tabellen 3, 4 und 5 zeigen dabei, in welchen Nephronsegmenten bei richtiger Zuordnung positive (+) bzw. negative (-) Banden zu erwarten waren. Da nur in einer Zone gesammelt wurde, wurden die Marker so gewählt, dass sie die Strukturen in einer Zone differenzieren. Der AQ-4-Marker sollte lediglich in den Sammelrohren (CCD/CT, OMCD und IMCD), der SGLT-2- in PCT, der NCC in DCT, der NKCC2-A in mTAL und der PTH/PTHrP-Marker sowohl in PST als auch in mTAL positive Signale ergeben.

	Glom	PCT	cTAL	DCT	CCD/CT
AQ-4	-	-	-	-	+
SGLT-2	-	+	-	-	-
NCC	-	-	-	+	-

← **Kortexstrukturen** →

Tabelle 3: Lokalisation und Verteilung der Markergene AQ-4, SGLT-2 und NCC an den Kortexstrukturen Glom, PCT, cTAL, DCT und CCD/CT bei richtiger Zuordnung der Nephronsegmente.

	PST	dTL	mTAL	OMCD
NKCC2-A	-	-	+	-
PTH/PTHrP	+	-	+	-
AQ-4	-	-	-	+

← **OM-Strukturen** →

Tabelle 4: Lokalisation und Verteilung der Markergene NKCC2-A, PTH/PTHrP und AQ-4 an PST, dTL, mTAL und OMCD. Die Tabelle zeigt die bei richtiger Zuordnung zu erwartende Verteilung der positiven und negativen Signale.

	TL	IMCD
AQ-4	-	+

← **IM-Strukturen** →

Tabelle 5: Lokalisation und Verteilung des Markergens AQ-4 an TL und IMCD bei richtiger Zuordnung der Nephronsegmente.

Abbildung 5 veranschaulicht die Markerverteilung des PTH/PTHrP in den mTAL- und PST-Segmenten. Die positiven Signale in mTAL und PST bestätigen, dass die gesammelten Nephronsegmente PST oder mTAL sind. Zur Unterscheidung der beiden Nephronsegmente wurde zusätzlich der Test mit dem Marker NKCC2-A durchgeführt, wie in Abbildung 6 zu sehen ist. Hierbei sollte sich ein positives Signal in mTAL und ein negatives Signal in PST ergeben.

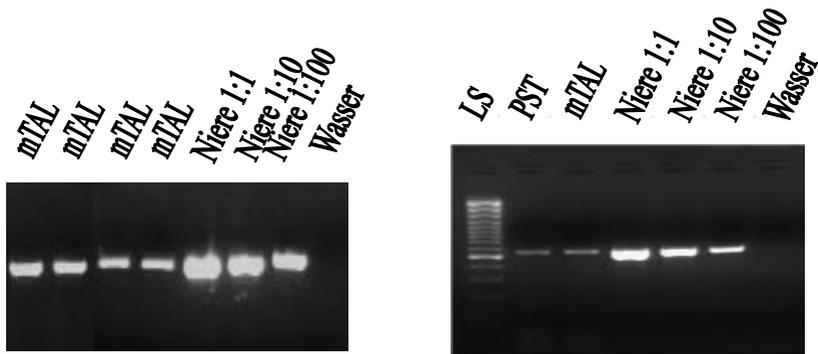


Abbildung 5: Markertest mit dem Parathyreoidhormonrezeptor (PTH/PTHrP) bei 36 Zyklen an mTAL und PST. Deutlich zu erkennen sind die positiven Signale der Segmente der mTAL und PST.

Die folgende Abbildung zeigt beispielhaft die Lokalisation des NKCC2-A in PST und mTAL. Somit kann durch die Kombination der beiden Marker PTH/PTHrP und NKCC2-A eine Unterscheidung und damit Bestätigung der Zuordnung bei der Sammlung zwischen PST und mTAL getroffen werden. Zwar sind in diesem Beispiel die NKCC2-A-Banden in den mTAL etwas schwächer zu erkennen, dennoch wurde aufgrund der ebenso schwachen NKCC2-A-Bande der 1:100-Verdünnung der cDNA der Niere hier das Signal als NKCC2-A positiv gewertet.

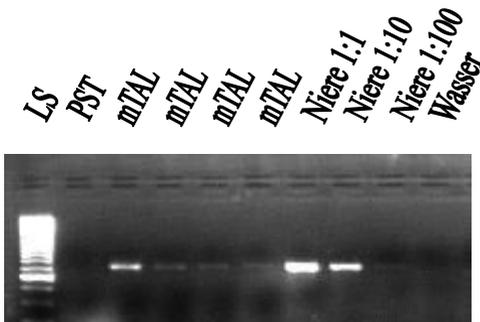


Abbildung 6: Markertest mit NKCC2-A bei 36 Zyklen an PST und mTAL. Deutlich wird hier, dass die NKCC2-A-Bande in PST negativ und in mTAL positiv ist. Somit konnten all diese Proben für weitere Tests verwendet werden.

Abbildung 7 zeigt den Markertest mit AQ-4. Zu erwarten waren die positiven AQ-4-Signale in CCD/CT und OMCD, und die negativen Signale in den Glomeruli (Glom⁻/Glom⁺), PCT, cTAL, dTL und mTAL. Auffallend war hier lediglich die schwach positive AQ-4-Bande der DCT, welche in diesem Fall negativ sein sollte. Wahrscheinlich ist diese auf eine geringfügige Verunreinigung mit Verbindungstubulus aus dem Kortex (C) zurückzuführen, da dieser direkt an die DCT-Segmente anschließt. Diese DCT-Probe wurde jedoch weiterhin zur Untersuchung der Lokalisation der Lipoxxygenasen und Cytochromoxidasen verwendet, zumal die AQ-4-Bande der 1:100-Verdünnung der Nieren-cDNA stärker ausfiel als die AQ-4-Bande der DCT.

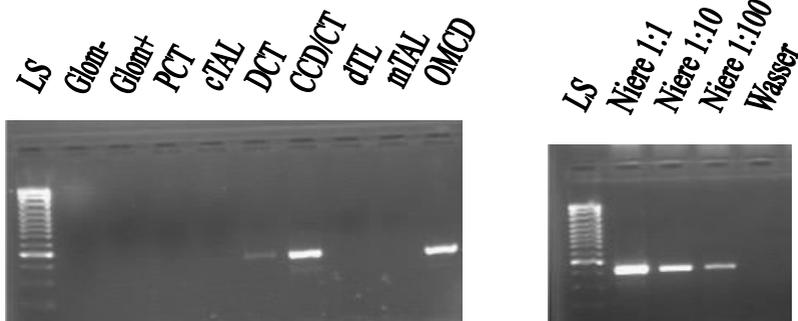


Abbildung 7: Markertest mit Aquaporin-4 (AQ-4) bei 36 Zyklen an einigen Segmenten der Niere.

Negative AQ-4-Signale sieht man in den Glom⁻, Glom⁺, PCT-, cTAL-, dTL- und mTAL-Nephronsegmenten. Positive Signale erkennt man in CCD/CT und OMCD. Das schwache AQ-4-Signal der DCT wurde als negativ gewertet. Somit wurden in diesem Fall alle Proben zur weiteren Untersuchung verwendet.

Abbildung 8 zeigt den Markertest mit SGLT-2. Da nur in PCT, jedoch in keinen weiteren der hier untersuchten Nephronsegmente, SGLT-2-mRNA gefunden wurde, konnte von der Reinheit der untersuchten Segmente ausgegangen werden.

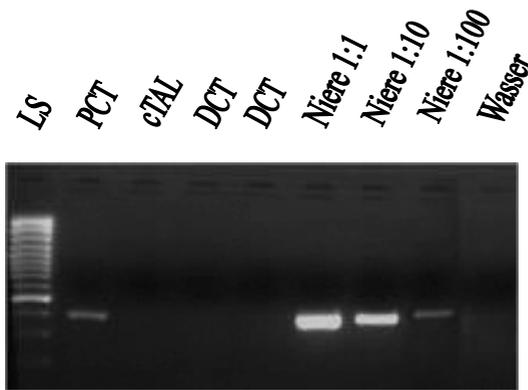


Abbildung 8: Markertest mit SGLT-2 bei 30 Zyklen. Sichtbar werden hier das positive SGLT-2-Signal des PCT und die negativen Signale in den cTAL- und DCT-Segmenten, d. h., man konnte diese Proben für die Tests zur Lokalisation der Lipoxygenasen und Cytochromoxydasen weiterhin verwenden.

Nephronsegmente, deren Zuordnung ohnehin eindeutig war, wie z. B. Glom⁻, Glom⁺, dTL und Sammelrohre des Kortex und der äußeren sowie der inneren Medulla (CCD/CT, OMCD, IMCD), wurden nur punktuell, d. h. ein Teil der cDNA-Proben mit Markern getestet. Die Zuordnung der Tubuli zu PST und mTAL wurde jedoch regelmäßiger mit den Markern überprüft. Mit dem PTH/PTHrP wurden nur PST und mTAL geprüft. Dabei konnte man bei sechs von acht PST- und zwölf von 13 mTAL-Sammlungen positive Signale finden. Die PST- und mTAL-Proben, die hier keine Signale zeigten, wurden verworfen. Mit NKCC2-A wurden

sechs PST-, zwei dTL und drei OMCD-Proben getestet. Hier zeigten drei von sechs PST-, beide getesteten dTL- und alle OMCD-Sammlungen ein negatives Signal, was somit die richtige Zuordnung bis auf drei PST-Proben bestätigt. Bei acht von insgesamt zwölf getesteten mTAL-Sammlungen waren positive Signale für NKCC2-A zu sehen. D. h., dass die Lokalisation der Lipoxygenasen und Cytochromoxidasen bei acht mTAL- und drei PST-Proben untersucht werden konnte. Somit konnte bei vier der zwölf mTAL- Proben sowie fünf PST-Proben keine Aussage bezüglich der Expression der Lipoxygenasen und Cytochromoxidasen gemacht werden. Der Test mit AQ-4 ergab bei allen $Glom^{-/+}$ (3), PCT (2), PST (2), dTL (3), mTAL (3), cTAL (2) und DCT (2) keine cDNA-Banden. Die zwei getesteten CCD/CT- und drei getesteten OMCD-Proben zeigten ein positives Signal. Somit konnte auch die Zuordnung dieser Segmente durch den Markertest mit AQ-4 bestätigt werden. Die Nephronsegmente der PCT, cTAL und DCT wurden zusätzlich mit SGLT-2 und NCC getestet. Bei allen vier getesteten PCT- und den zwei getesteten cTAL-Proben waren, wie bei richtiger Zuordnung zu erwarten, keine NCC-Signale zu beobachten. Die vier getesteten DCT-Proben zeigten ein deutliches Signal bei NCC, so dass die Zuordnung ebenso bestätigt wurde. Zwei cTAL- und vier von fünf der getesteten DCT-Sammlungen zeigten keine positiven Signale bei SGLT-2, die vier geprüften PCT-Sammlungen dagegen schon. Die DCT-Probe, bei der ein positives SGLT2-Signal zu sehen war, wurde daher verworfen. Somit wurden aufgrund der durchgeführten Markertests alle $Glom^{-}$, $Glom^{+}$, PCT-, drei von acht PST-, alle dTL- und TL-, acht von dreizehn mTAL-, alle cTAL-, alle bis auf eine DCT- und alle Sammelrohr-Proben (CCD/CT, OMCD, IMCD) zur Untersuchung der Lipoxygenasen und Cytochromoxidasen verwendet. Fünf PST-, fünf mTAL-Proben und eine DCT-Probe wurden verworfen.

IV.1. Lox-12

Lox-12 wurde an zwei verschiedenen Sammlungen aller in der folgenden Abbildung aufgeführten Nephronabschnitte getestet, wobei eine der Sammlungen keine Glomeruli mit Arteriole (Glom⁺) enthielt. Bei einer der beiden Sammlungen wurde nicht an PST getestet. Zusätzlich wurde die Expression der Lox-12 an drei verschiedenen cDNA-Proben von VR untersucht. Es traten dabei deutliche Lox-12-Signale in beiden Glom⁻-Sammlungen und ein etwas schwächeres Signal in der Glom⁺-Sammlung auf. Aber auch in einer von zwei mTAL-, cTAL-, DCT-, CCD/CT- und OMCD-Proben konnten positive Lox-12-Signale beobachtet werden, welche jedoch deutlich schwächer als bei der 1:100- Verdünnung ausfielen, wie auch in Abbildung 9 zu erkennen ist. Eine zusätzliche Kontrolle über drei cDNA-Proben von mTAL, die mit Hilfe des PTH/PTHrP- und des NKCC2-A-Markers eindeutig zugeordnet werden konnten, ergab zwei äußerst schwache Signale. Bei der Untersuchung der VR-Proben und aller übrigen Nephronabschnitte waren keine Signale festzustellen. Daraus schloss man, dass das Lox-12-Gen im Glom⁻-Segment, nicht jedoch in den PCT-, PST-, dTL-, TL-, IMCD und VR-Segmenten exprimiert ist. Unklar ist dagegen die Expression der Lox-12 in den Nephronabschnitten der Glom⁺, mTAL, cTAL, DCT, CCD/CT und OMCD, deren Signale jedoch äußerst schwach ausfielen.

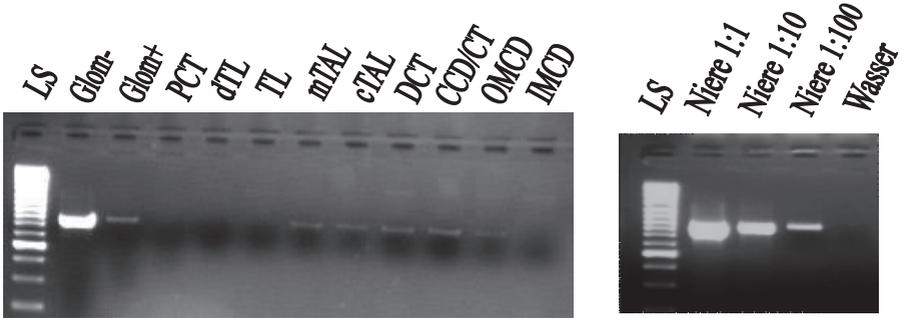


Abbildung 9: Verteilung der Lox-12 im Nephron der Rattenniere bei 36 Zyklen. Auffallend sind hier das Signal in Glom⁻, das etwas schwächere Signal in Glom⁺ und die viel schwächeren Lox-12-Banden in mTAL, cTAL, DCT, CCD/CT und OMCD. Nicht aufgeführt sind auf dieser Abbildung die cDNA-Proben der PST und VR.

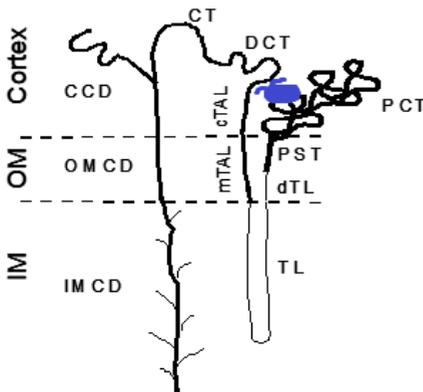


Abbildung 10: Graphische Darstellung der Verteilung der Lox-12 im Nephron der Rattenniere. Die blau markierten Bereiche kennzeichnen die Verteilung der Lox-12 in den Versuchen. Die schwarzen Abschnitte stellen die nicht vorhandenen bzw. nicht eindeutigen Signale der Lox-12 dar.

IV.2. Lox-15

Für die Untersuchung der differentiellen Lox-15-Expression wurden drei Sammlungen verwendet. Alle Nephronsegmente waren enthalten. Bei einer der Sammlungen fehlte jedoch die Struktur der PST. Zusätzlich wurden vier cDNA-Proben VR gesondert untersucht. Bei allen Sammlungen konnten deutliche Signale in allen Sammelrohren CCD/CT, OMCD, IMCD und den Nephronsegmenten cTAL und DCT nachgewiesen werden. Bei einer der Sammlungen fielen die Lox-15-Signale in cTAL und DCT ein wenig schwächer aus. Eine der drei Sammlungen zeigte ein ganz schwaches mTAL-Signal. Ein positives Lox-15-Signal war nie in den Glom⁻-, Glom⁺-, PCT-, PST-, dTL-, TL- und VR-Strukturen zu sehen. Zusätzlich wurde die Expression von Lox-15 an drei weiteren cDNA-Proben der mTAL, deren Zuordnung mit Hilfe der Marker PTH/PTHrP und NKCC2-A eindeutig gezeigt werden konnte, getestet. Hier konnte man in einer der drei Proben eine äußerst schwache Bande erkennen. Wie in Abbildung 11 deutlich wird, war die Lox-15-mRNA in den Sammelrohren CCD/CT, OMCD und IMCD deutlicher exprimiert als in den mTAL-, cTAL- und DCT-Strukturen. Auch hier wurden die PCR-Bedingungen so gewählt, dass die Nieren-cDNA-Verdünnung 1:1 ein deutliches Signal und eine Abnahme der Intensität in den verdünnten Proben ergab. Daraus konnte man schließen, dass die Lox-15 in den cTAL- und DCT-Nephronsegmenten und den Sammelrohren CCD/CT, OMCD und IMCD exprimiert ist, in allen anderen untersuchten Nephronsegmenten nicht.

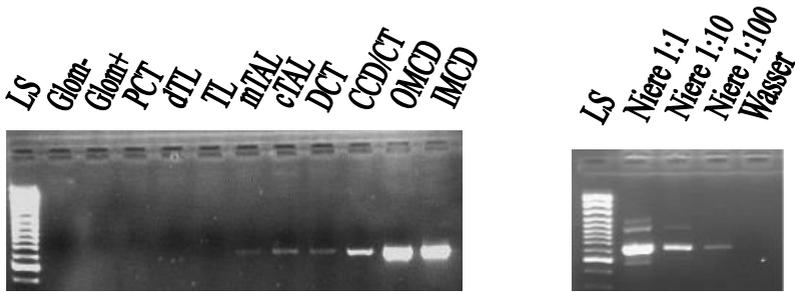


Abbildung 11: Verteilung der Lox-15 in den Tubuli der Rattenniere bei 36 Zyklen. Deutlich werden hier die Lox-15-Banden in den Sammelrohren CCD/CT, OMCD, IMCD. Außerdem erkennt man schwächere Banden in cTAL, DCT und eine noch etwas schwächere Bande in mTAL. Nicht aufgeführt sind auf dieser Abbildung die cDNA-Proben der PST.

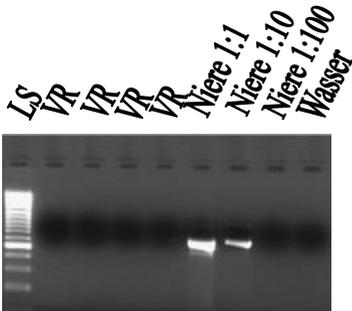


Abbildung 12: Verteilung der Lox-15 in VR der Rattenniere bei 36 Zyklen. Hier wird deutlich, dass keine Signale in VR gefunden wurden.

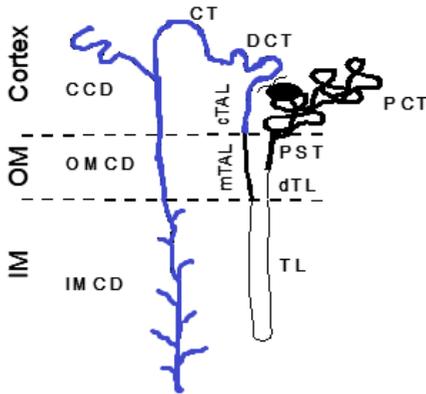


Abbildung 13: Graphische Darstellung der Verteilung der Lox-15 im Nephron der Rattenniere. Die blau markierten Bereiche kennzeichnen die Verteilung der Lox-15 in den Versuchen. Die schwarzen Abschnitte stellen die nicht vorhandenen bzw. nicht eindeutigen Signale der Lox-15 dar.

IV.3. Lox-5

Eine Aussage über die Lokalisation der Lox-5 war eher tendenziell möglich, denn die Ergebnisse bezüglich der Expression dieses Gens waren bei den Sammlungen sehr unterschiedlich. Es wurden insgesamt vier Sammlungen mit allen aufgeführten Nephronsegmenten untersucht. Eine davon enthielt keine Glomeruli mit Arteriole (Glom⁺) und nicht in jeder Sammlung wurde an PST getestet. Es wurden zusätzlich fünf mTAL-Proben getestet, bei denen die Zuordnung über den Markertest bestätigt werden konnte. Insgesamt standen vier Sammlungen von VR zur Verfügung. In allen Glomeruli-Proben (Glom⁻/Glom⁺), zwei PCT-Proben, einer cTAL-Probe, einer DCT-Probe, drei CCD/CT-Proben, einer OMCD-Probe, einer IMCD-Probe und allen vier VR-Proben konnten jeweils positive Lox-5-Signale nachgewiesen werden. Jedoch fielen die Lox-5-positiven Signale in VR schwach und in PCT, cTAL, DCT, CCD/CT, OMCD und IMCD äußerst schwach aus. Bei einer Anzahl von 36 Zyklen in der PCR können jedoch auch geringste Verunreinigungen ein Signal geben. Bei den fünf zusätzlich getesteten mTAL-cDNA-Proben gab es drei positive, jedoch schwache Signale. Somit konnte man letztendlich lediglich bei den Glomeruli mit und ohne Arteriole sicher und möglicherweise bei den VR von einer Expression der Lox-5 ausgehen. Das Lox-5-Gen konnte dagegen nie in den PST-, dTL- und TL-Nephronsegmenten gefunden werden.

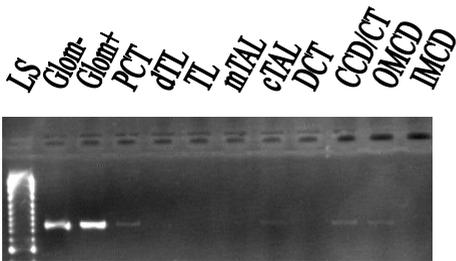


Abbildung 14: Verteilung der LoX-5 in den Tubuli der Rattenniere bei 36 Zyklen. Deutlichere LoX-5-Banden konnte man in den Glomeruli mit und ohne Arteriole sehen. Dagegen fielen die Signale in den PCT-, cTAL-, CCD/CT- und OMCD-Strukturen extrem schwach aus. Nicht aufgeführt sind auf dieser Abbildung die cDNA-Proben der PST.

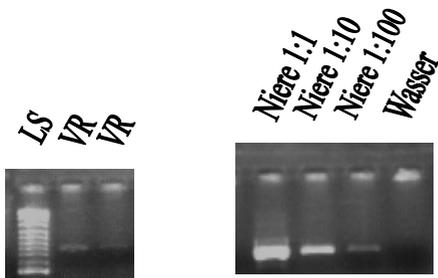


Abbildung 15: Verteilung der LoX-5 in VR der Rattenniere bei 36 Zyklen. Auf diesen Bildern sind schwache LoX-5-Banden in VR zu erkennen.

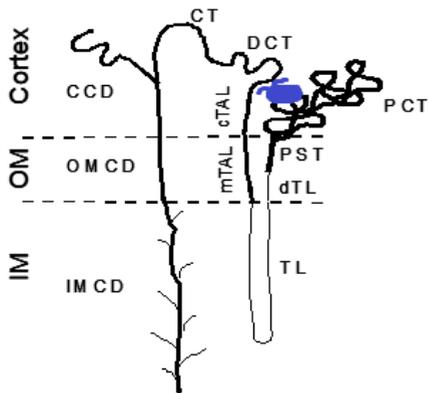


Abbildung 16: Graphische Darstellung der Verteilung der Lox-5 im Nephron der Rattenniere. Die blau markierten Bereiche kennzeichnen die Verteilung der Lox-5 in den Versuchen. Die schwarzen Abschnitte stellen die nicht vorhandenen bzw. nicht eindeutigen Signale der Lox-5 dar.

IV.4. Cyp4A1

Um die Expression der Cyp4A1-mRNA in der Rattenniere nachzuweisen, wurde die cDNA dreier Sammlungen mit den bereits aufgeführten Nephronsegmenten getestet, jedoch nicht an Glomeruli mit Arteriole (Glom⁺). Bei jeder Sammlung waren positive Signale in PCT zu sehen. Auch in einer Glom⁻-Probe konnte ein positives, jedoch schwaches Signal nachgewiesen werden. Positive, schwache Cyp4A1-Signale waren weiterhin in zwei dTL-, zwei mTAL-Proben und einer cTAL-Probe zu finden. Nie exprimiert war die Cyp4A1-mRNA in den Nephronsegmenten PST, TL, DCT sowie den Sammelrohren CCD/CT, OMCD und IMCD. Um auszuschließen, dass die gelegentlich gefundene Expression der Cyp4A1 im dTL durch eine Verunreinigung mit VR zustande gekommen ist, wurden vier cDNA-Proben VR getestet. Dieser Test ergab jedoch keine positiven Cyp4A1-Signale, so dass auf die richtige Zuordnung der dTL-Proben geschlossen werden konnte. Somit zeigte sich, dass die Cyp4A1-mRNA in PCT sicher exprimiert ist. Unsicher erschien es dagegen, ob die Cyp4A1-mRNA in dTL, mTAL, cTAL und in Glom⁻ exprimiert ist, zumal die Signale hier deutlich schwächer ausfielen. Außerdem war in nur einer der Sammlungen ein Cyp4A1-positives Signal im Glom⁻ zu sehen. Mit größerer Sicherheit lässt sich jedoch aussagen, dass in allen anderen Nephronsegmenten keine Cyp4A1 exprimiert ist.

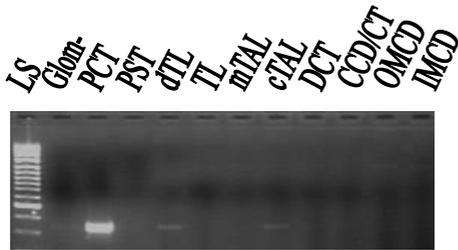


Abbildung 17: Verteilung der Cyp4A1 in den Tubuli der Rattenniere bei 32 Zyklen. Wie man auf dieser Abbildung erkennen kann, ist ein deutliches Cyp4A1-Signal in PCT zu sehen. Sehr schwache Signale sieht man hier in Glom', dTL und cTAL.

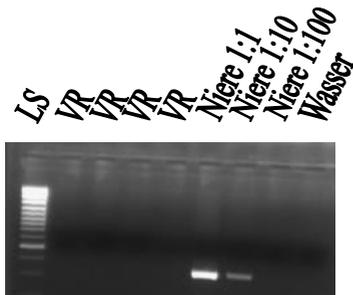


Abbildung 18: Verteilung der Cyp4A1 in VR der Rattenniere bei 32 Zyklen. Diese Abbildung zeigt, dass das Gen in den Vasa recta nicht exprimiert ist. Um eine Abnahme der Intensität der Banden der Nierenverdünnung zu erhalten, wie sie in Abbildung 14 zu erkennen ist, wurde die PCR diesmal mit 32 Zyklen durchgeführt.

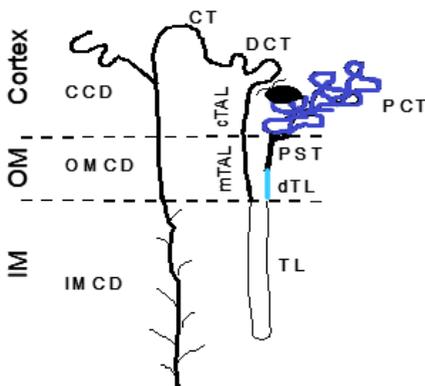


Abbildung 19: Graphische Darstellung der Verteilung der Cyp4A1 im Nephron der Rattenniere. Die blau markierten Bereiche kennzeichnen die Verteilung der Cyp4A1 in den Versuchen. Die hellblauen Anteile zeigen Signale, die schwach ausfielen, jedoch manchmal vorkamen. Die schwarzen Abschnitte stellen die nicht vorhandenen bzw. nicht eindeutigen Signale der Cyp4A1 dar.

IV.5. Cyp4A2 und Cyp4A3

Die Ergebnisse zur Expression von Cyp4A2- und Cyp4A3 konnten nicht getrennt untersucht werden, da beide Primerpaare homologe Bereiche von Cyp4A2 und Cyp4A3 erkennen. D. h., mit beiden Primerpaaren wurde die mRNA-Expression von Cyp4A2 und Cyp4A3 nachgewiesen, jedoch nicht zwischen den Isoformen differenziert. Für die Ergebnisse bezüglich der Expression der Cyp4A2 oder Cyp4A3 wurden Untersuchungen an sechs Sammlungen der schon aufgeführten Nephronsegmente durchgeführt. Vier Sammlungen enthielten Glom⁺-Proben, die anderen beiden nicht. Zusätzlich standen acht cDNA-Proben VR und drei cDNA-Proben gespülter Glom⁺ zur Verfügung. Die Spülung wurde durchgeführt, um sicherzustellen, dass die Gefäße der Glomeruli nicht mit Blutbestandteilen verunreinigt waren. Dabei zeigte sich, dass alle getesteten PCT-Proben ein positives Signal ergaben. Auch in fünf von sechs Glom⁻- und dTL-, sowie in zwei der vier Glom⁺-Proben waren positive Signale zu sehen. In den drei getesteten gespülten Glomeruli mit Arteriole konnten zwei starke Signale nachgewiesen werden. Nur bei einer von acht VR-Proben war eine Bande zu beobachten, welche sehr schwach ausgeprägt war. Nie vorhanden waren Signale in PST, TL, mTAL, cTAL, DCT und den Sammelrohren CCD/CT, OMCD und IMCD. Somit deutete alles darauf hin, dass Cyp4A2 bzw. Cyp4A3 sicher in PCT und mit großer Wahrscheinlichkeit in Glom⁻, Glom⁺ und dTL exprimiert ist, zumal auch zwei der drei gespülten Glom⁺-Proben positive Signale aufwiesen. Dagegen scheint Cyp4A2 bzw. Cyp4A3 in allen anderen Segmenten nicht exprimiert zu sein.

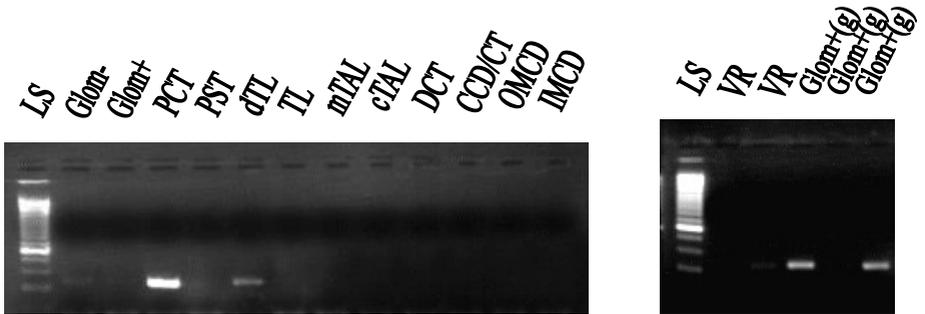


Abbildung 20: Verteilung der Cyp4A2 oder Cyp4A3 in den Tubuli und VR der Rattenniere bei 32 Zyklen. Stärkere Signale konnten in allen PCT-Proben beobachtet werden. Charakteristisch ist hier die starke Bande in PCT, eine schwächere Bande in dTL und eine noch schwächere Bande in Glom⁻. Nicht dargestellt ist auf dem linken Bild das Signal in Glom⁺, das häufig zu beobachten war. Auf dem rechten Bild sieht man die Signale in zwei der drei gespülten Glomeruli (Glom⁺(g)) mit Arteriole und ein kaum sichtbares Signal in VR.

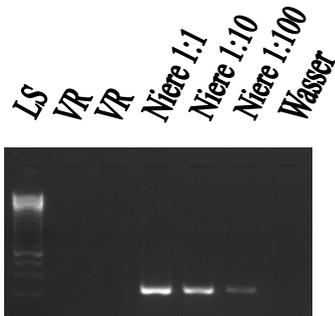


Abbildung 21: Verteilung der Cyp4A2 und Cyp4A3 in VR der Rattenniere bei 32 Zyklen. Auf diesem Bild wird deutlich, dass keine Signale in VR zu sehen sind.

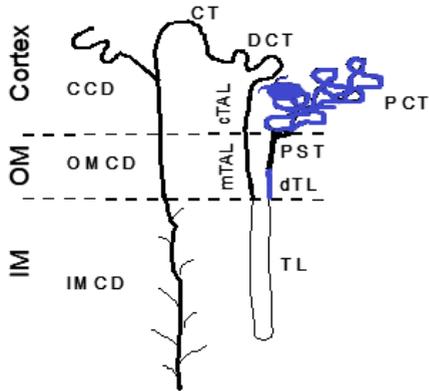


Abbildung 22: Graphische Darstellung der Verteilung der Cyp4A2 und Cyp4A3 im Nephron der Rattenniere. Die blau markierten Bereiche kennzeichnen die Verteilung der Cyp4A2 und Cyp4A3 in den Versuchen. Die schwarzen Abschnitte stellen die nicht vorhandenen bzw. nicht eindeutigen Signale der Cyp4A2 und Cyp4A3 dar.

IV.6. Cyp2C23

Für diesen Test lagen acht Sammlungen mit den ausgeführten Nephronabschnitten vor. Davon enthielten nur vier Sammlungen Glom⁺-Proben und nicht in jeder Sammlung lagen PST-Proben vor. Zusätzlich standen insgesamt acht VR-Proben und drei Proben gespülter Glom⁺ zur Verfügung. Es waren immer sehr stark ausgeprägte Banden im PCT-Nephronsegment zu sehen. Signale konnte man dagegen auch in allen IMCD, in fünf von acht Glom⁻- und in allen Glom⁺-Sammlungen beobachten. Bei IMCD fielen diese etwas schwächer aus. Lediglich in einer der acht Sammlungen gab es ganz schwache Signale in dTL und TL, was möglicherweise auf Verunreinigungen in der Sammlung zurückzuführen ist. Cyp2C23-Signale konnte man nie in PST, mTAL, cTAL, DCT, den Sammelrohren CCD/CT und OMCD sowie den VR feststellen. Bei den gespülten Glomeruli mit Arteriole zeigten zwei von drei Sammlungen ein stark positives Signal. Somit konnte man von einer Cyp2C23-Expression in Glom⁻, Glom⁺, PCT und mit möglicherweise auch in IMCD ausgehen.

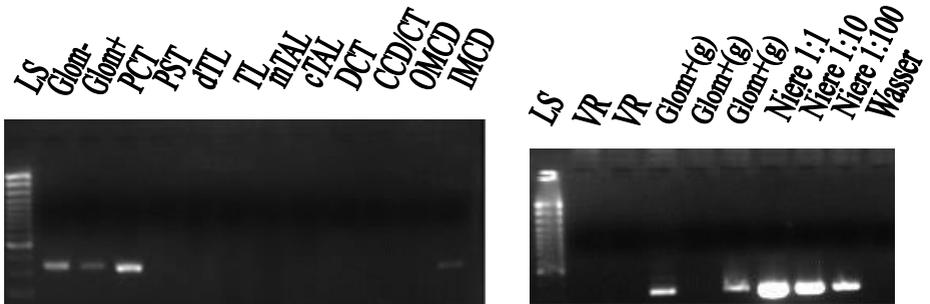


Abbildung 23: Verteilung der Cyp2C23 in den Tubuli und VR der Rattenniere bei 32 Zyklen. Auf dem linken Bild erkennt man sehr ausgeprägte Signale in PCT, relativ starke in den Glomeruli (Glom⁻/Glom⁺) und ein schwächeres in IMCD. Auf dem rechten Bild sieht man, dass zwei der drei gespülten Glom⁺-Sammlungen Signale aufweisen. Deutlich wird, dass auch hier keine Banden in VR zu sehen sind.

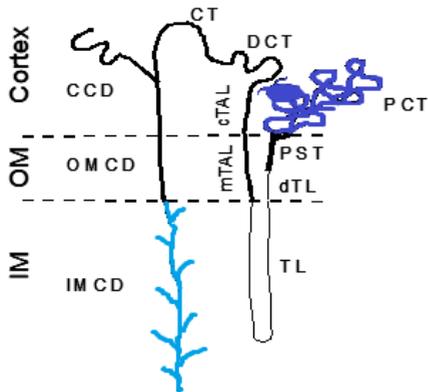


Abbildung 24: Graphische Darstellung der Verteilung der Cyp2C23 im Nephron der Rattenniere. Die blau markierten Bereiche kennzeichnen die Verteilung der Cyp2C23 in den Versuchen. Die hellblauen Anteile zeigen Signale, die schwach ausfielen, jedoch in einer bedeutenden Häufigkeit auftraten. Die schwarzen Abschnitte stellen die nicht vorhandenen bzw. nicht eindeutigen Signale der Cyp2C23 dar.

IV.7. Cyp2C11

Über die Expression des Cyp2C11 genaue Angaben zu machen war nicht möglich, da eine Vielzahl unterschiedlicher Ergebnisse vorlag. Die Cyp2C11 wurde an vier verschiedenen Sammlungen aller cDNA-Nephronsegmente getestet. Eine der Sammlungen enthielt keine Glom⁺ und PST. Zusätzlich lagen insgesamt vier VR-Proben und drei Glom⁺-Proben, die gespült wurden, vor. Es zeigte sich folgendes Bild: lediglich ein einziges Mal konnte ein starkes Signal beobachtet werden, welches in einer der IMCD-Proben zu sehen war. In einer weiteren IMCD-Probe war die Bande schwächer ausgeprägt. In den restlichen beiden Proben waren keine Cyp2C11-Signale zu finden. Drei der vier CCD/CT- und zwei PCT-Proben zeigten schwächere Signale. Die Signale in CCD/CT waren jedoch äußerst schwach. Des Weiteren konnte in nur einer der Glom⁺-Proben ein ebenso äußerst schwaches Signal nachgewiesen werden, jedoch nicht in den Glom⁺-Proben, die gespült wurden. Eine Cyp2C11-Expression wurde nie in Glom⁻, PST, dTL, TL, mTAL, cTAL, DCT, OMCD und VR nachgewiesen.

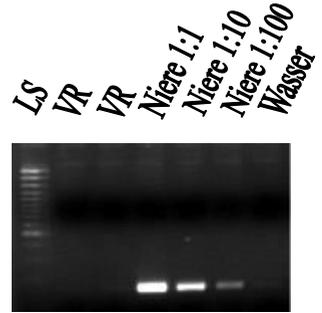
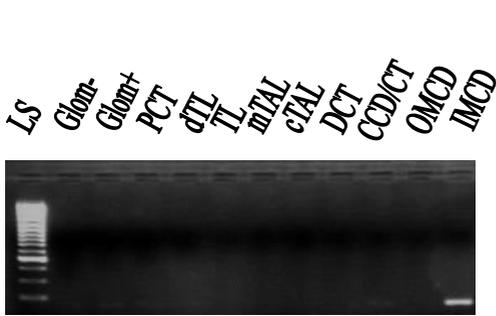


Abbildung 25: Verteilung des Cyp2C11 in den Tubuli und VR der Rattenniere bei 34 Zyklen. Auf dem linken Bild kann man eine deutliche Bande in IMCD und ganz schwache Banden in Glom⁺, PCT und CCD/CT erkennen. Wie bei allen bisher genannten Cyp-Enzymen waren keine Signale in VR zu finden. Nicht aufgeführt sind die cdNA-Proben der PST.

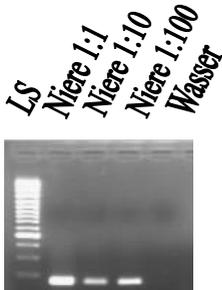


Abbildung 26: Beispiel für Banden der Nierenverdünnungen des Primers Cyp2C11 bei 34 Zyklen.

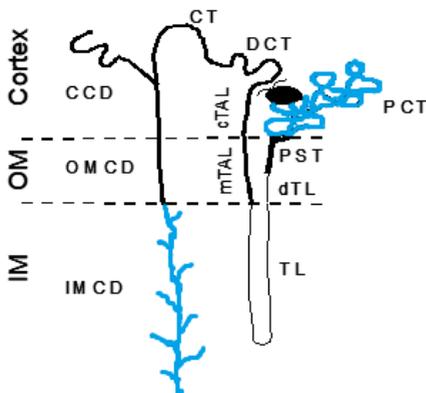


Abbildung 27: Graphische Darstellung der Verteilung der Cyp2C11 im Nephron der Rattenniere. Die hellblauen Anteile in dieser Abbildung zeigen Signale, welche nicht immer vorhanden waren, nur schwach oder nicht immer stark ausfielen. Die schwarzen Abschnitte stellen die nicht vorhandenen bzw. nicht eindeutigen Signale der Cyp2C11 dar.

IV.8. Gesamtübersicht der graphischen Verteilung der Lipoxygenasen und Cytochromoxidasen an der Rattenniere

Zur besseren Übersicht werden im Folgenden erneut die Abbildungen der graphischen Darstellung der einzelnen Enzyme, wie bereits in den Ergebnissen dieser Versuche beschrieben, in direktem Vergleich nacheinander gezeigt.

1. Lox-12

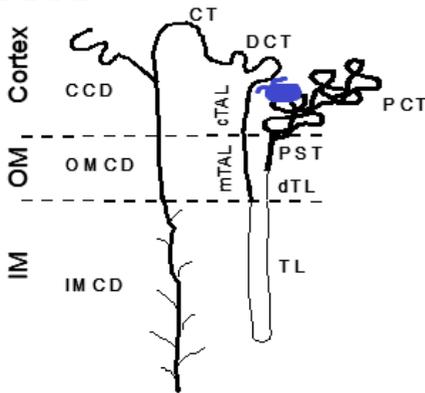


Abbildung 10: Graphische Darstellung der Verteilung der Lox-12 im Nephron der Rattenniere. Die blau markierten Bereiche kennzeichnen die Verteilung der Lox-12 in den Versuchen. Die schwarzen Abschnitte stellen die nicht vorhandenen bzw. nicht eindeutigen Signale der Lox-12 dar.

2. Lox-15

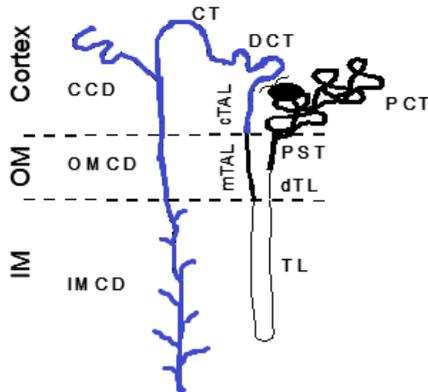


Abbildung 13: Graphische Darstellung der Verteilung der Lox-15 im Nephron der Rattenniere. Die blau markierten Bereiche kennzeichnen die Verteilung der Lox-15 in den Versuchen. Die schwarzen Abschnitte stellen die nicht vorhandenen bzw. nicht eindeutigen Signale der Lox-15 dar.

3. Lox-5

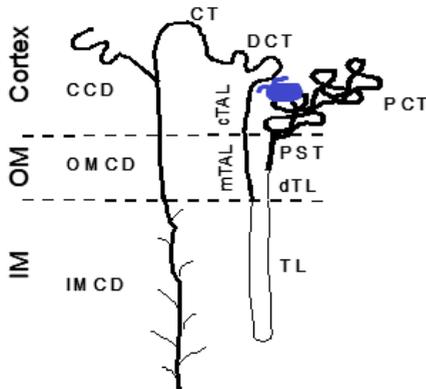


Abbildung 16: Graphische Darstellung der Verteilung der Lox-5 im Nephron der Rattenniere. Die blau markierten Bereiche kennzeichnen die Verteilung der Lox-5 in den Versuchen. Die schwarzen Abschnitte stellen die nicht vorhandenen bzw. nicht eindeutigen Signale der Lox-5 dar.

4. Cyp4A1

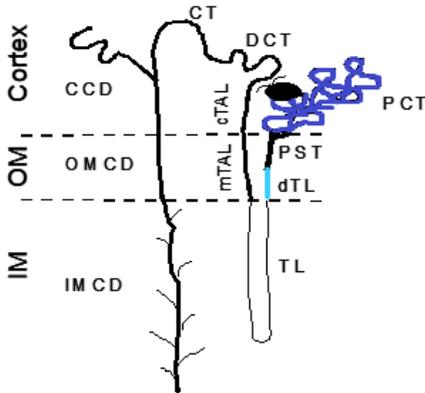


Abbildung 19: Graphische Darstellung der Verteilung der Cyp4A1 im Nephron der Rattenniere. Die blau markierten Bereiche kennzeichnen die Verteilung der Cyp4A1 in den Versuchen. Die hellblauen Anteile zeigen Signale, die schwach ausfielen, jedoch manchmal vorkamen. Die schwarzen Abschnitte stellen die nicht vorhandenen bzw. nicht eindeutigen Signale der Cyp4A1 dar.

5. Cyp4A2 und Cyp4A3

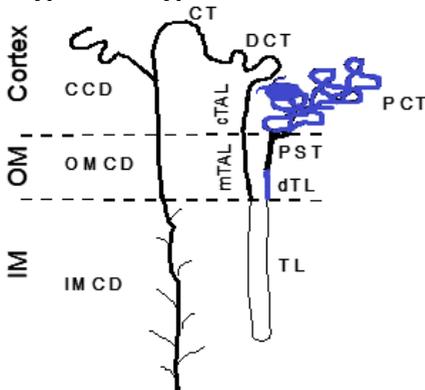


Abbildung 22: Graphische Darstellung der Verteilung der Cyp4A2 und Cyp4A3 im Nephron der Rattenniere. Die blau markierten Bereiche kennzeichnen die Verteilung der Cyp4A2 und Cyp4A3 in den Versuchen. Die schwarzen Abschnitte stellen die nicht vorhandenen bzw. nicht eindeutigen Signale der Cyp4A2 und Cyp4A3 dar.

6. Cyp2C23

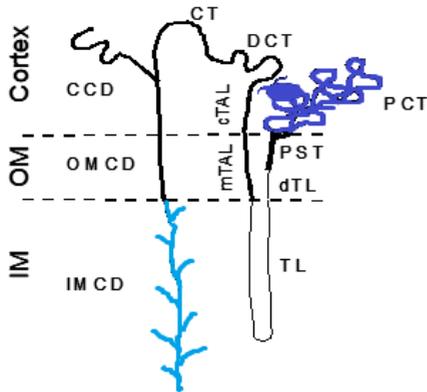


Abbildung 24: Graphische Darstellung der Verteilung der Cyp2C23 im Nephron der Rattenniere. Die blau markierten Bereiche kennzeichnen die Verteilung der Cyp2C23 in den Versuchen. Die hellblauen Anteile zeigen Signale, die schwach ausfielen, jedoch in einer bedeutenden Häufigkeit auftraten. Die schwarzen Abschnitte stellen die nicht vorhandenen bzw. nicht eindeutigen Signale der Cyp2C23 dar.

7. Cyp2C11

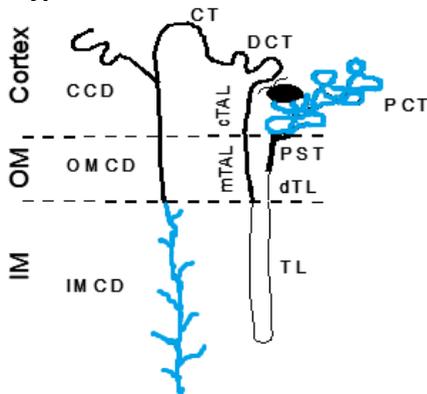


Abbildung 27: Graphische Darstellung der Verteilung der Cyp2C11 im Nephron der Rattenniere. Die hellblauen Anteile in dieser Abbildung zeigen Signale, welche nicht immer vorhanden waren, nur schwach oder nicht immer stark ausfielen. Die schwarzen Abschnitte stellen die nicht vorhandenen bzw. nicht eindeutigen Signale der Cyp2C11 dar.

V. Diskussion

V.1. Lox-12

Wie aus den hier vorliegenden Untersuchungen der mikrodisszezierten Nierensegmente hervorgeht, wurde Lox-12 in Glom⁻ gefunden. Nicht jedoch in den Segmenten PCT, PST, dTL, TL, OMCD, IMCD und VR. Lox-12-Signale wurden ebenso in Glom⁺, mTAL, cTAL, DCT und CCD/CT gefunden. Diese fielen deutlich schwächer aus. D. h., Signale konnten sowohl im Cortex als auch der äußeren Medulla beobachtet werden. Möglicherweise stammt die Lox-12-mRNA der sehr schwachen Signale aus anderen Zellen. Sie wurde bereits bei anderen Untersuchungen in Makrophagen, Endothelzellen oder glatten Muskelzellen entdeckt (9, 19, 20). Es wurde außerdem gezeigt, dass auch Podozyten die Lox-12-mRNA exprimieren (18). Die Matrixprotein-Struktur in Mesangiumzellen, die durch hohe Glucose-Konzentrationen angeregt wird, wird durch die Lox-12-mRNA gesteuert (41). Die Matrixprotein-Produktion in anderen renalen oder interstitiellen Zellen könnte ebenso durch die 12-Lox beeinflusst werden. Es wurde außerdem gezeigt, dass die ANG II-induzierte Vasokonstriktion teilweise durch die Lox-12 gesteuert werden könnte (35), und man glaubt, dass erhöhte 12-HETE-Spiegel, die im Plasma von hypertonen Ratten gemessen wurden, die Reaktion der vaskulären glatten Muskelzellen auf ANG II erhöhen (43). Die schwache Expression der Lox-12-mRNA in den anderen Segmenten könnte also möglicherweise durch die hier aufgeführten Beobachtungen begründet werden.

In dieser Arbeit wurde beobachtet, dass die Lox-12 hauptsächlich im Glomerulus hoch ist. Dies würde sich mit der vasokonstriktischen Eigenschaft der Lox-12 im Glomerulus und im Gefäßsystem decken, durch deren Produkt 12-HETE der renale Blutfluss und die glomeruläre Filtrationsrate bei einer nephrotoxischen Serumnephritis (NSN) teilweise gesenkt werden (55). Weitere Versuche bestätigen das Lox-12-Signal im Glom⁻. So konnte an Ratten bei

Prozessen wie der NSN festgestellt werden, dass sich die Lox-12-Aktivität in epithelialen und mesangialen glomerulären Zellen bereits nach wenigen Stunden steigerte (24). Ähnliches zeigte sich bereits bei einem anderen Versuch. Dort wurde die Lox-12-mRNA der glomerulären mesangialen Zellen durch Glucose stimuliert. Des Weiteren wurde gezeigt, dass bei einer experimentellen diabetischen Nephropathie die Lox-12-mRNA im Glomerulus erhöht ist (17). Eine erhöhte Lox-12-Aktivität wurde bereits in einem früheren Versuch von Kam Jim et al. (15) im Glomerulus, in epithelialen Zellen des Glomerulus und in einem geringeren Ausmaß in kortikalen Tubuli von Ratten beschrieben. In diesem Versuch wurde gezeigt, dass die Produktion von 12-HETE, für die unter anderem Glomeruli, glomeruläre epitheliale Zellen und kortikale Tubuli verantwortlich sind, durch 8,11,14-Eicosatetraensäure und 1-Phenyl-3-pyrazolidon gehemmt wird.

V.2. Lox-15

In der distalen Niere zeigten die Ergebnisse eine schwache Expression der Lox-15-mRNA im cTAL und im DCT. Dabei stieg die Expression in Richtung der Sammelrohre CCD/CT, OMCD und IMCD sehr stark an. Alle anderen Nierensegmente exprimierten in diesen Versuchen keine Lox-15-mRNA. Dies stimmt auch mit anderen Beobachtungen an der Niere überein, deren Zonen keiner Mikrodisektion unterzogen wurden. Deren Lox-15-mRNA stieg vom Cortex zur inneren Medulla hin an. Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass dieses Expressionsmuster durch Kleingefäße ausgelöst wurde, die an den Sammelrohren anhaften, wurden in diesen Versuchen vier Proben VR zusätzlich getestet. Es wurde keine Lox-15-mRNA-Expression an VR festgestellt. Somit konnte eine Verunreinigung mit anhaftenden Gefäßen nicht ausgeschlossen werden, jedoch wurde die Lokalisation in den Sammelrohren

bestätigt. Die Expression der Lox-15 wurde bereits im Blut, im Endothel und in der Lunge beobachtet (32). Den Lox-15-Produkten wurde eine hemmende Wirkung bei der Reninfreisetzung zugeschrieben (3) und man beobachtete eine aufrechterhaltene Nierenfunktion in einer Antikörper-vermittelten Glomerulonephritis aufgrund von stimulierten Lox-15-Spiegeln (31). Diese Auswirkungen könnten durch die 15-HETE gesteuert werden, indem sie sich an den Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor-gamma (PPAR-gamma) bindet (11), über den man bereits herausfand, dass er weitgehend in den mesangialen und epithelialen Zellkernen der Glomeruli, den proximalen und distalen Tubuli, der Henle-Schleife, den medullären Sammelrohren und der Intima oder Media von Blutgefäßen exprimiert ist (44). Aufgrund der hohen Expression der Lox-15 in den Sammelrohren in diesen Versuchen und unter anderem der Daten von Munger KA et al. (31) vermutet man, dass die Lox-15 einen zellprotektiven Effekt in der Niere in Anwesenheit von hochkonzentrierten möglicherweise schädlichen Substanzen im Urin ausübt und den proinflammatorischen Folgen der Lox-5 (42) im distalen Nephron entgegenwirken könnte.

V.3. Lox-5

Laut den Ergebnissen kann man wohl von einer Expression der Lox-5-mRNA in den Glomeruli mit und ohne Arteriole ausgehen. Zwar gab es gelegentliche Signale in den Segmenten mTAL, cTAL, DCT, CCD/CT, OMCD und IMCD. Diese scheinen jedoch vernachlässigbar zu sein, da sie äußerst schwach waren und geringste Verunreinigungen mit Gefäßen bei einer Zyklusanzahl von 36 in der PCR solche Signale auslösen können. Bei diesen Versuchen konnten nämlich tatsächlich positive VR-Signale gefunden werden. Jedoch könnten auch andere Zellen dafür verantwortlich sein. Denn die Lox-5-mRNA konnte auch in

Leukozyten (54), dendritischen Zellen (10), glatten Muskelzellen der Aorta (26) und renalen interstitiellen Zellen (29) entdeckt werden. Über die Regulation des renalen Blutflusses und der glomerulären Filtrationrate durch Lox-5-Produkte wurde bereits berichtet. So können die Lox-5-Produkte die Nierenfunktion bei einer nephrotoxischen Serumnephritis negativ beeinflussen (55). Die Vermittlung einer Entzündung ist wahrscheinlich der am häufigsten untersuchte Aspekt der Lox-5-Produkte und Leukozyten scheinen wohl bei Entzündungsprozessen vor allem durch Glomeruli angezogen zu werden. So glaubt man, dass Lox-5-Produkte bei einer Glomerulonephritis entzündungsfördernd sind. Das wurde bereits bei einem Versuch demonstriert. Hier wurde durch Leukozyten eine Reihe von Mediatoren der AS-Kaskade freigesetzt, wie z. B. Leukotriene D4 und B4 (LTD4 und LTB4) (5). Diese Beobachtungen, dass bestimmte Entzündungsprozesse im Glomerulus stattfinden, scheinen sich also in dieser Arbeit mit der Entdeckung der Lox-5 in den Glomeruli zu decken.

V.4. Cyp4A1

Die Ergebnisse zeigten bezüglich der Expression der Cyp4A1-mRNA in allen Sammlungen positive Signale in PCT. An Glom⁺ wurde in diesem Fall nicht getestet. Gelegentliche Signale wurden ebenso in Glom⁻, dTL, mTAL und cTAL entdeckt, die jedoch extrem schwach waren. In allen anderen Nierensegmenten sowie in VR gab es keine Signale. Diese Beobachtung deckt sich insgesamt nicht zu 100 % mit den Ergebnissen von Ito O. et al. (14), denn bei diesen Versuchen wurde die Cyp4A1-mRNA weder in Arteriolen noch in einem anderen der oben aufgeführten Nierensegmente entdeckt, jedoch in der Gesamtniere. Bei diesen Versuchen gab es keine Ausführungen über die Cyp4A1-Verteilung in dTL und TL. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass Cyp4A1 in Peroxisomen und Mitochondrien von

Hepatozyten der Leber, Epithelzellen der proximalen Tubuli der Niere und Mitochondrien von absorbierenden Zellen im Ileum lokalisiert wurde (37). Außerdem wurde die Cyp4A-Familie in pulmonalen arteriellen Endothel- und glatten Muskelzellen, glatten bronchialen Muskelzellen, bronchialen Epithelzellen und Makrophagen der Lunge entdeckt (61). Somit könnten womöglich die PCT-Signale sowie die übrigen schwachen Signale aus Verunreinigungen des Interstitiums oder einer dieser beschriebenen Zellen der Niere stammen. Es gibt außerdem eine Korrelation zwischen der altersabhängigen Erhöhung der AS- ω -Hydroxylierung in der Niere und der Cyp4A-mRNA-Werte in der Gesamtniere. So erscheinen die Cyp4A1-Proteine im Alter von 3 Wochen und erreichen ihren Maximalwert nach sieben Wochen. Danach nehmen diese Werte schrittweise nach 13 bis 20 Wochen wieder ab. Der Maximalwert nach sieben Wochen in proximalen Tubuli ist bei spontan hypertonen Ratten noch höher (46). Somit könnte unter anderem das Alter der Versuchstiere für manche Signale in diesen Versuchen verantwortlich sein.

V.5. Cyp4A2 und Cyp4A3

Wie bereits beschrieben, wurden Cyp4A2 und Cyp4A3 aufgrund der Primerpaare, die homologe Bereiche von Cyp4A2 und Cyp4A3 erkennen, nicht getrennt untersucht. D. h., es wurde nicht zwischen den Isoformen untereinander differenziert. Somit wurden beide Enzyme gemeinsam untersucht und diskutiert. Die Untersuchungen ergaben Signale vor allem in PCT, Glom⁻, Glom⁺ und dTL. In dTL fielen die Signale etwas schwächer aus. Zusätzlich konnten Signale auch in gespülten Glom⁺ gefunden werden. An VR konnte lediglich eine äußerst schwache Bande unter acht Proben beobachtet werden, womöglich verursacht durch Verunreinigungen. Daher scheint diese auch vernachlässigbar zu sein. Somit kann man wohl

von einer Expression in Glom⁺, Glom⁻, PCT und dTL ausgehen. In den Nephronsegmenten PST, TL, mTAL, cTAL, DCT, CCD/CT, OMCD und IMCD waren keine Signale zu sehen. Die Ergebnisse decken sich daher nicht vollständig mit denen von Ito et al. (14). Denn bei seinen Versuchen wurde sowohl Cyp4A2 als auch Cyp4A3 in jedem Segment der Niere lokalisiert, jedoch kaum in Arteriolen. Lediglich bezüglich der Segmente Glom⁺, Glom⁻, PCT und eventuell dTL, zumal diese Struktur bei Ito et al. nicht aufgeführt wird, decken sich seine und die Beobachtungen dieser Arbeit. Für diese deutliche Abweichung der Ergebnisse untereinander können möglicherweise technische Faktoren oder andere Ursachen verantwortlich sein.

V.6. Cyp2C23

Den Ergebnissen nach kann man wohl von einer Expression der Cyp2C23 in den Nephronsegmenten Glom⁻, Glom⁺, PCT und IMCD ausgehen. In allen anderen Segmenten sowie in den VR wurden keine Signale nachgewiesen. Starke Glom⁺ und PCT-Signale gab es in jeder Sammlung. Die IMCD-Signale fielen dagegen schwächer aus. Diese konnten jedoch in jeder Sammlung beobachtet werden. Glom⁻-Signale wurden zwar nur in fünf von acht Sammlungen entdeckt, dafür fielen diese sehr stark aus. Um eine Verunreinigung der Glom⁻ mit VR auszuschließen, wurde Cyp2C23 auch an VR getestet. An VR wurde keine Expression der Cyp2C23-mRNA nachgewiesen. Das bedeutet zwar nicht, dass Glom⁻ nicht mit VR verunreinigt waren, aber es bestätigt bei diesen Versuchen die Expression der Cyp2C23-mRNA in Glom⁻. Schließlich wurden auch in zwei von drei gespülten Glom⁺-Sammlungen Signale entdeckt. Das PCT-Signal deckt sich damit, dass EET in proximalen Tubuli produziert werden und Cyp2C23 hauptverantwortlich für die Umwandlung von AS in

EET ist. Dennoch stimmen diese Ergebnisse nur teilweise mit den Ergebnissen anderer Versuche überein, bei denen die Expression der Cyp2C23 hauptsächlich in den Tubuli des Cortex und der äußeren Medulla festgestellt werden konnte. Das zeigt ein Versuch an transgenen Ratten, welche sowohl menschliche Renin- als auch menschliche Angiotensinogen-Gene übermäßig exprimieren und somit Bluthochdruck, Entzündungen und Nierenversagen entwickeln. Diese Ratten verloren ihre Cyp2C23-Enzyme zwischen der fünften und siebten Woche in den Tubuli des Cortex und der äußeren Medulla stufenweise. Über 50 % der transgenen Ratten zeigten dabei nach sieben Wochen keine Cyp2C23-Signale, über 90 % der Kontrollratten dagegen schon. Trotzdem waren die wenigen restlichen positiven Signale in den Tubuli der transgenen Ratten stärker als in den Tubuli der Kontrollgruppe. Bei diesem Versuch konnten keine Cyp2C23-Signale in den Glomeruli entdeckt werden, jedoch in den Blutgefäßen (16). Um welche Tubuli des Cortex und der äußeren Medulla es sich bei diesem Versuch genau handelt, wurde nicht beschrieben. Diese Ergebnisse sind also teilweise in Einklang mit den Beobachtungen der Versuche dieser Arbeit. Denn in dieser Arbeit konnte kein Signal in der Zone der äußeren Medulla entdeckt werden. Ähnliche Abweichung kann man bei einem anderen Versuch beobachten, der die Verteilung der Cyp2C23 konkreter beschreibt. Bei diesem Versuch konnte man nach Verabreichung natriumarmer Kost an Ratten eine verminderte Cyp2C23-Expression im Cortex und der äußeren Medulla feststellen. Hier wurde die Expression der Cyp2C23 im mTAL, cTAL, CCD und OMCD nachgewiesen, was ebenso im Widerspruch zu den Ergebnissen dieser Arbeit steht (52). Bei weiteren Versuchen hat man die Expression von Cyp2C23 in Endothelzellen von renalen Mikrogefäßen nachweisen können (13, 58). Die Abweichungen der Ergebnisse dieser Arbeit im Vergleich zu anderen sind möglicherweise auf eine eventuelle Expression der Cyp2C23 in anderen Strukturen zurückzuführen. Für die schwachen Signale in IMCD bei den Versuchen dieser Arbeit könnten also möglicherweise auch Verunreinigungen mit diesen Endothelzellen verantwortlich sein.

V.7. Cyp2C11

Bei den Versuchen bezüglich der Verteilung der Cyp2C11 konnte sich kein eindeutiges Ergebnis abzeichnen. Lediglich ein starkes IMCD-Signal in vier Sammlungen wurde beobachtet. Zwei der vier PCT-, drei der vier CCD/CT- und eine der vier Glom⁺-Proben zeigten ebenfalls Signale. Die Signale der PCT waren etwas schwächer als das IMCD-Signal. Die CCD/CT-Signale und das Glom⁺-Signal fielen sogar extrem schwach aus. In allen anderen Segmenten sowie in VR konnten keine Signale entdeckt werden. Verglichen mit dem bereits beschriebenen Versuch von Kaergel E. et al. (16) gibt es Widersprüche. Bei diesem Versuch an transgenen Ratten, welche sowohl menschliche Renin- als auch Angiotensinogen-Gene übermäßig exprimieren und somit Bluthochdruck, Entzündungen und Nierenversagen verursachen, wurde beobachtet, dass die Cyp2C11-Werte abnahmen. Dabei war die Expression der Cyp2C11 in den Tubuli der transgenen Ratten zwischen der fünften und siebten Woche im Vergleich zur Expression der Cyp2C11 in den Tubuli der altersentsprechenden Ratten aus der Kontrollgruppe deutlich verringert. Die Expression der Cyp2C11 wurde hier ausschließlich in den Tubuli der äußeren Medulla beobachtet. Bei diesem Versuch werden jedoch nicht die genauen tubulären Anteile beschrieben. In den Blutgefäßen konnte bei Kaergels Versuch keine Expression der Cyp2C11 festgestellt werden, bei einem anderen Versuch an Zucker-Ratten dagegen schon (58). Bei den Versuchen der hier vorliegenden Arbeit konnte keine Expression in der äußeren Medulla festgestellt werden, jedoch im Cortex und der inneren Medulla. Bei einem weiteren Versuch scheint es eine teilweise Übereinstimmung zu geben, was den Cortex betrifft. Bei diesem Versuch wurde adipösen Zucker-Ratten, deren Cyp2C11- und Cyp2C23- Proteinwerte erniedrigt waren, der Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor (PPAR)-alpha-Agonist Fenofibrat für vier Wochen verabreicht. Sowohl die kortikalen als auch die vaskulären Cyp2C11- und Cyp2C23-

Proteinwerte steigerten sich durch Fenofibrat erheblich (**60**). Bei den Versuchen dieser Arbeit konnten teilweise auch, wenn auch schwache Signale in den kortikalen Strukturen wie PCT, CCD/CT und Glom⁺ entdeckt werden, in VR dagegen nicht. Beim Versuch von Zhao X et al. wurden jedoch nicht die genauen kortikalen Strukturen beschrieben und als Versuchstiere keine Sprague-Dawley, sondern Zucker-Ratten verwendet. Bei einem früheren Versuch von Zhao X et al. zeichnete sich ähnliches ab. Auch hier wurden erhöhte Cyp2C11-Proteinwerte im Cortex nach 14-tägiger hoher Salzverabreichung an Ratten, sowie erheblich erhöhte Cyp2C11- und Cyp2C23-Proteinwerte in den renalen Mikrogefäßen gemessen. Eine kombinierte Verabreichung von Angiotensin II und erhöhter Salzdosis verhinderte dagegen die Erhöhung der Cyp2C11-Proteinwerte im Cortex und senkte die Proteinwerte der Cyp2C11, Cyp2C23 und Cyp2J in den renalen Mikrogefäßen sogar erheblich (**59**). Um welche Strukturen des Cortex es sich genau handelt, wurde auch bei diesem Versuch nicht exakt beschrieben. Es könnten daher also auch andere nichttubuläre Strukturen für diese Werte verantwortlich sein. Ein weiterer Versuch bestätigt die Cyp2C11-Proteinexpression in renalen kortikalen Mikrosomen von Ratten. In diesem Versuch zeigte sich, dass die Expression in den Mikrosomen der proximalen tubulären Zellen viel größer war als in den Mikrosomen der distalen tubulären Zellen (**7**). Auch in Astrozyten und in zerebralen perivaskulären Nerven, die die mittlere Hirnschlagader innervieren, konnte die Cyp2C11-Expression nachgewiesen werden (**12**). Man kann aber wohl ausschließen, dass eine Verunreinigung mit den eben genannten Zellstrukturen bei den Versuchen dieser Arbeit stattfand, zumal sich diese Strukturen im zentralen Nervensystem befinden.

Insgesamt kann man daher also nur teilweise von einer Übereinstimmung mit anderen Ergebnissen sprechen. Denn in früheren Versuchen wurde Cyp2C11 bereits im Cortex nachgewiesen, wobei darin nicht aufgeführt wird, um welche kortikalen Anteile es sich genau handelt. In den Versuchen dieser Arbeit konnte man ebenso Signale im Cortex nachweisen. Diese fielen jedoch schwach aus und traten nicht in jeder Sammlung auf.

VI. Zusammenfassung

Die Lipoxygenasen Lox-5, Lox-12 und Lox-15 sowie die Cytochromoxydasen Cyp4A1, Cyp4A2, Cyp4A3, Cyp2C23 und Cyp2C11, die unter anderem eine sehr wichtige Rolle im Arachidonsäure-Stoffwechsel spielen, übernehmen eine Reihe von entscheidenden Funktionen, wie z.B. die Vermittlung von Entzündungsreaktionen, strukturelle Veränderungen bei Diabetes, Regulierung des Blutdrucks und viele weitere Prozesse bei anderen Erkrankungen. Daher ist deren Lokalisation in den einzelnen Nephronsegmenten des Cortex sowie der äußeren und inneren Medulla von enormer Bedeutung. Rattennieren wurden hierfür in Cortex, äußerer und innerer Medulla mikrodissiziert. Die mikrodisszierten Nephronsegmente wurden nach Kollagenase-Verdau gesammelt und die mRNA-Verteilung wurde durch RT-PCR untersucht.

So konnte man in den Versuchen die Lox-12 vor allem in Glom⁻ entdecken. Die Signale in mTAL, cTAL, und CCD/CT in diesen Versuchen waren jedoch sehr schwach, so dass diese wohl daher vernachlässigt werden können. Lox-15-Expressionen fanden sich dagegen in cTAL, DCT, CCD/CT, OMCD und IMCD mit zunehmender Expressionsstärke in Richtung der Sammelrohre. Die Lox-5-mRNA konnte man hauptsächlich in Glom⁺ und Glom⁻ entdecken. Die Signale in PCT, mTAL, cTAL, DCT, CCD/CT, OMCD und IMCD waren jedoch sehr schwach, so dass auch diese vernachlässigt werden können. Sie können auch durch Verunreinigungen aus VR stammen, in denen tatsächlich die Lox-5-Expression nachgewiesen werden konnte. Was die Verteilung der Cyp4A1 angeht, konnten bei diesen Versuchen Expressionen der PCT in jeder Sammlung beobachtet werden. Gelegentliche sehr schwache Signale fanden sich außerdem in Glom⁻, dTL, mTAL und cTAL, welche durch Verunreinigungen von anderen Zellen stammen könnten, zumal die Cyp4A1-mRNA bereits in Epithelzellen der proximalen Tubuli und generell in Zellen anderer Organe entdeckt

werden konnte. Cyp4A2 bzw. Cyp4A3 wurden dagegen gemeinsam untersucht, da die Primer homologe Bereiche der beiden Enzyme erkennen. Cyp4A2- bzw. Cyp4A3-Signale konnten in diesen Versuchen in PCT, Glom⁻, Glom⁺ und dTL entdeckt werden. Die Cyp2C23-mRNA dagegen konnte in Glom⁻, Glom⁺, PCT und in schwächerer Form in IMCD lokalisiert werden. Bezüglich der Verteilung der Cyp2C11 lassen die Versuche keine eindeutige Aussage zu, da die Ergebnisse der Sammlungen sehr unterschiedlich ausfielen. Demnach ist die Cyp2C11-mRNA eventuell in PCT und IMCD exprimiert. Vernachlässigbar schwache Signale wurden in CCD/CT und Glom⁺ gefunden.

Insgesamt betrachtet kann man durch Blockierung gewisser Abbauprodukte der Arachidonsäure, wie z.B. Prostaglandine, Leukotriene oder 20-HETE, die durch Cyclooxygenasen, Lipxygenasen und Cytochromoxidasen freigesetzt werden, nicht nur Schmerzen hemmen, sondern auch Erkrankungen wie Asthma, Krebs oder Herz-Kreislauf-Erkrankungen beeinflussen. Schon daher zeigt sich die Bedeutung der Lokalisation dieser Enzyme.

VII. Literaturverzeichnis

1. Antonipillai I. 12-lipoxygenase products are potent inhibitors of prostacyclin-induced renin release. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1990 Jul;194(3):224-30.
2. Antonipillai I, Horton R, Natarajan R, Nadler J. A 12-lipoxygenase product of arachidonate metabolism is involved in angiotensin action on renin release. *Endocrinology.* 1989 Oct;125(4):2028-34.
3. Antonipillai I, Nadler JL, Robin EC, Horton R. *The inhibitory role of 12- and 15-lipoxygenase products on renin release.* *Hypertension* 1987 Jul;10: 61–66.
4. Badr KF. 15-Lipoxygenase products as leukotriene antagonists: therapeutic potential in glomerulonephritis. *Kidney Int Suppl.* 1992 Oct;38:S101-8.
5. Badr KF. Five-lipoxygenase products in glomerular immune injury. *J Am Soc Nephrol.* 1992 Oct;3(4):907-15.
6. Chen GF, Ronis MJ, Thomas PE, Flint DJ, Badger TM. Hormonal regulation of microsomal cytochrome P450 2C11 in rat liver and kidney. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997 Dec;283(3):1486-94.
7. Cummings B, Zangar RC, Novak RF, Lash LH. Cellular distribution of cytochromes P-450 in the rat kidney. *Drug Metab Dispos.* 1999 Apr;27(4):542-8.
8. Elmarakby AA, Quigley JE, Pollock DM, Imig JD. Tumor necrosis factor alpha blockade increases renal Cyp2c23 expression and slows the progression of renal damage in salt-sensitive hypertension. *Hypertension.* 2006 Mar;47(3):557-62. Epub 2006 Jan 16.
9. Funk CD, Funk LB, Fitzgerald GA, and Samuelsson B. Characterization of human 12-lipoxygenase genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 89, pp. 3962-3966, May 1992
10. Harizi Hedi and Gualde Norbert. 5-Lipoxygenase Pathway, Dendritic Cells, and Adaptive Immunity. *J Biomed Biotechnol.* 2004 Jun 30; 2004(2): 99–105.
11. Huang JT, Welch JS, Ricote M., Binder CJ, Willson TM, Kelly C, Witztum JL, Funk CD, Conrad D, Glass CK. Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature.* 1999 Jul 22;400(6742):378-82.
12. Illif JJ, Clsøe LN, Selden NR, Alkayed NJ. A novel role for P450 eicosanoids in the neurogenic control of cerebral blood flow in the rat. *Exp Physiol.* 2007 Jul;92(4):653-8.
13. Imig JD, Zhao X, Falck JR, Wei S, Capdevila JH. Enhanced renal microvascular reactivity to angiotensin II in hypertension is ameliorated by the sulfonimide analog of 11,12-epoxyeicosatrienoic acid. *J Hypertens.* 2001 May;19(5):983-92.

14. Ito O, Alonso Galicia M, Hopp KA, Roman RJ. Localization of cytochrome P-450 4A isoforms along the rat nephron. *Am J Physiol*. 1998 Feb;274(2 Pt 2):F395-404.
15. Jim K, Hassid A, Sun F., Dunn MJ. Lipoxygenase activity in rat kidney glomeruli, glomerular epithelial cells, and cortical tubules. *J Biol Chem*. 1982 Sep 10;257(17):10294-9
16. Kaergel E, Muller DN, Honeck H, Theuer J, Shagdarsuren E, Mullally A, Luft FC, Schunck WH. P450-dependent arachidonic acid metabolism and angiotensin II-induced renal damage. *Hypertension*. 2002 Sep;40(3):273-9.
17. Kang SW, Adler SG, Nast CC, Lapage J, Gu JL, Nadler JL, and Natarajan R. 12-lipoxygenase is increased in glucose-stimulated mesangial cells and in experimental diabetic nephropathy. *Kidney Int*. 2001 Apr;59(4):1354-62.
18. Kang SW, Natarajan R, Shahed A, Nast CC, LaPage J, Mundel P. Kashtan C, Adler SG. Role of 12-lipoxygenase in the stimulation of p38 mitogen-activated protein kinase and collagen alpha5(IV) in experimental diabetic nephropathy and in glucose-stimulated podocytes. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Dec;14(12):3178-87.
19. Kim JA, Gu JL, Natarajan R, Berliner JA, Nadler JL. A leukocyte type of 12-lipoxygenase is expressed in human vascular and mononuclear cells. Evidence for upregulation by angiotensin II. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995 Jul;15(7):942-8.
20. Kim YS, Reddy MA, Lanting I, Adler SG, Natarajan R. Differential behavior of mesangial cells derived from 12/15-lipoxygenase knockout mice relative to control mice. *Kidney Int*. 2003 Nov;64(5):1702-14.
21. Leukotriene. Wikipedia, Die freie Enzyklopädie. Wikipedia-Autoren, siehe Versionsgeschichte. 30. März 2016, 12:21 UTC. 153003656. <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Leukotriene&oldid=153003656>. 6. November 2016, 15:05 UTC
22. Li D, Belusa R Nowicki S, Aperia A. Arachidonic acid metabolic pathways regulating activity of renal Na(+)-K(+)-ATPase are age dependent. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000 May;278(5):F823-9.
23. Lianos EA, Bresnahan BB, Wu S. Pathophysiologic role of eicosanoids in mesangial cell immune injury. *J Lipid Mediat*. 1993 Mar-Apr;6(1-3):333-42.
24. Lianos EA, Rahman MA, Dunn MJ. Glomerular arachidonate lipoxygenation in rat nephrotoxic serum nephritis. *J Clin Invest*. 1985 Oct;76(4):1355-9.
25. Löffler G. Funktionelle Biochemie. Eine Einführung in die medizinische Biochemie. Zweite korrigierte Auflage. Springer-Verlag. Berlin · Heidelberg · New York · London · Paris · Tokyo · Hong Kong · Barcelona · Budapest. 1994. S. 178
26. Luchtefeld M, Drexler H, Schieffer B. 5-Lipoxygenase is involved in the angiotensin II-induced NAD(P)H-oxidase activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Aug 29;308(3):668-72.

27. Lüllmann H, Mohr K. Taschenatlas der Pharmakologie. 4. überarbeitete und erweiterte Auflage. Georg Thieme Verlag. Stuttgart · New York. 2001. S.200
28. Marie S., Roussel F, Cresteil T. Age- and tissue-dependent expression of CYP2C23 in the rat. *Biochim Biophys Acta*. 1993 Feb 20;1172(1-2):124-30.
29. Menegatti E, Roccatello D, Fadden K, Piccoli G, De Rosa G, Sena LM, Rifai A. Gene expression of 5-lipoxygenase and LTA4 hydrolase in renal tissue of nephrotic syndrome patients. *Clin Exp Immunol*. 1999 May;116(2):347-53.
30. Michaud J, Nolin TD, Naud J, Dani M, Lafrance JP, Leblond FA, Himmelfarb J, Pichette V. Effect of hemodialysis on hepatic cytochrome P450 functional expression. *J Pharmacol Sci*. 2008 Oct;108(2):157-63. Epub 2008 Oct 9.
31. Munger KA, Montero A, Fukunaga M, Uda S, Yura T, Imai E, Kaneda Y, Valdivielso JM, Badr KF. Transfection of rat kidney with human 15-lipoxygenase suppresses inflammation and preserves function in experimental glomerulonephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Nov 9;96(23):13375-80.
32. Nadel JA, Conrad DJ, Ueki IF, Schuster A, Sigal E. Immunocytochemical localization of arachidonate 15-lipoxygenase in erythrocytes, leukocytes, and airway cells. *J Clin Invest*. 1991 Apr;87(4):1139-45.
33. Nakagawa K, Marji JS, Schwartzman ML, Waterman MR, Capdevila JH. Androgen-mediated induction of the kidney arachidonate hydroxylases is associated with the development of hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003 Apr;284(4):R1055-62. Epub 2003 Jan 16.
34. Nakahama K, Morita I, Murota S. Effects of endogenously produced arachidonic acid metabolites on rat mesangial cell proliferation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1994 Sep;51(3):177-82.
35. Oyekan A, Balazy M, McGiff LC. Renal oxygenases: differential contribution to vasoconstriction induced by ET-1 and ANG II. *Am J Physiol*. 1997 Jul;273(1 Pt 2):R293-300.
36. Perico N, Cornejo RP, Benigni A, Malanchini B, Ladny JR, Remuzzi G. Endothelin induces diuresis and natriuresis in the rat by acting on proximal tubular cells through a mechanism mediated by lipoxygenase products. *J Am Soc Nephrol*. 1991 Jul;2(1):57-69.
37. Persohn E, Thomas H, Waechter F. Immunoelectron microscopic localization of cytochrome P-450 isoenzyme CYP4A1 in liver, ileum and kidney of nafenopin treated male rats. *Cell Biol Int*. 1993 Jan;17(1):99-103.
38. Pschyrembel 258., neu bearbeitete Auflage. Walter de Gruyter · Berlin · New York. 1998. S. 918
39. Pschyrembel 258., neu bearbeitete Auflage. Walter de Gruyter · Berlin · New York. 1998. S. 1127 f.

40. Pschyrembel 258., neu bearbeitete Auflage. Walter de Gruyter · Berlin · New York. 1998. S. 1731
41. Reddy MA, Adler SG, Kim YS, Lanting L, Rossi J, Kang SW, Nadler JL, Shahed A, Natarajan R. Interaction of MAPK and 12-lipoxygenase pathways in growth and matrix protein expression in mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002 Nov;283(5):F985-94.
42. Samuelsson B, Dahlén SE, Lindgren JA, Rouzer CA, Serhan CN. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science.* 1987 Sep 4;237(4819):1171-6.
43. Sasaki M, Hori MT, Hino T, Golub MS, Tuck ML. Elevated 12-lipoxygenase activity in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Hypertens.* 1997 Apr;10(4 Pt 1):371-8.
44. Sato K, Sugawara A, Kudo M, Uruno A, Ito S, Takeuchi K. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor isoform proteins in the rat kidney. *Hypertens Res.* 2004 Jun;27(6):417-25.
45. Schafer JA, Watkins ML, Li L, Herter P, Haxelmans S, Schlatter E. A simplified method for isolation of large numbers of defined nephron segments. *Am J Physiol.* 1997 Oct;273(4 Pt 2):F650-7.
46. Schwartzman ML, da Silva JL, Lin F, Nishimura M, Abraham NG. Cytochrome P450 4A expression and arachidonic acid omega-hydroxylation in the kidney of the spontaneously hypertensive rat. *Nephron.* 1996;73(4):652-63.
47. Silbernagel S, Despopoulos A. Taschenatlas der Physiologie. 4. überarbeitete Auflage. Georg Thieme Verlag. Stuttgart · New York. Deutscher Taschenbuchverlag. 1991. S. 120
48. Simpson AE. The Cytochrome P450 4 (CYP4) Family. *Gen Pharmacol.* 1997 Mar;28(3):351-9
49. Singh H, Schwartzman ML. Renal vascular cytochrome P450-derived eicosanoids in androgen-induced hypertension. *Pharmacol Rep.* 2008 Jan-Feb;60(1):29-37.
50. Skøtt O. Androgen-induced activation of 20-HETE production may contribute to gender differences in blood pressure regulation. *Am J Physiol regul Integr Comp Physiol.* 2003 Apr;284(4):R1053-4.
51. Stern N, Nozawa K, Kisch E, Tuck ML, Golub M, Eggena P, Knoll E. Tonic inhibition of renin secretion by the 12 lipoxygenase pathway: augmentation by high salt intake. *Endocrinology.* 1996 May;137(5):1878-84.
52. Sun P, Lin DH, Wang T, Babilonia E, Wang Z, Jin Y, Kemp R, Nasjletti A, Wang WH. Low Na intake suppresses expression of CYP2C23 and arachidonic acid-induced inhibition of ENaC. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006 Dec;291(6):F1192-200. Epub 2006 Jul 18.

53. Wang MH, Guan H, Nguyen X, Zand BA, Nasjletti A, Laniado-Schwartzmann M. Contribution of cytochrome P-450 4A1 and 4A2 to vascular 20-hydroxyeicosatetraenoic acid synthesis in rat kidneys. *Am J Physiol*. 1999 Feb;276(2 Pt 2):F246-53.
54. Wood JW, Evans JF, Ethier D, Scott S, Vickers PJ, Hearn L, Heibin JA, Charleson S, Singer II. 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase-activating protein are localized in the nuclear envelope of activated human leukocytes. *J Exp Med*. 1993 Dec 1;178(6):1935-46.
55. Wu SH, Bresnahan BA, Lianos EA. Hemodynamic role of arachidonate 12- and 5-lipoxygenases in nephrotoxic serum nephritis. *Kidney Int*. 1993 Jun;43(6):1280-5.
56. Wu SH, Lianos EA. Modulatory effect of arachidonate 5-lipoxygenation on glomerular cell proliferation in nephrotoxic serum nephritis. *J Lab Clin Med*. 1993 Dec;122(6):703-10.
57. Ying CJ, Noguchi T, Aso H, Ikeda K, Yamori Y, Nara Y. The role of cytochrome p-450 in salt-sensitive stroke in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res*. 2008 Sep;31(9):1821-7. doi: 10.1291/hypres.31.1821.
58. Zhao X, Dey A, Romanko OP, Stepp DW, Wang MH, Zhou Y, Jin L, Pollok JS, Webb RC, Imig JD. Decreased epoxygenase and increased epoxide hydrolase expression in the mesenteric artery of obese Zucker rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005 Jan;288(1):R188-96. Epub 2004 Sep 2.
59. Zhao X, Pollock DM, Inscho EW, Zeldin DC, Imig JD. Decreased renal cytochrome P450 2C enzymes and impaired vasodilation are associated with angiotensin salt-sensitive hypertension. *Hypertension*. 2003 Mar;41(3 Pt 2):709-14. Epub 2002 Dec 16.
60. Zhao X, Quigley JE, Yuan J, Wang MH, Zhou Y, Imig JD. PPAR-alpha activator fenofibrate increases renal CYP-derived eicosanoid synthesis and improves endothelial dilator function in obese Zucker rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006 Jun;290(6):H2187-95. Epub 2006 Feb 24.
61. Zhu D, Zhang C, Medhora M, Jacobs ER. CYP4A mRNA, protein, and product in rat lungs: novel localization in vascular endothelium. *J Appl Physiol* (1985). 2002 Jul;93(1):330-7.

VIII. Anhang

VIII.1. Abkürzungsverzeichnis

ANGII	Angiotensin II
AQ-4	Aquaporin-4
AS	Arachidonsäure
aTL	Aufsteigender dünner Teil der Henle-Schleife, ascending thin limb
ATPase	Adenosintriphosphatase
Bidest	Doppelt destilliertes Wasser
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cortex
CCD/CT	Kortikales Sammelrohr mit verbindendem Tubulisegment, cortical collecting duct/connecting tubule
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure, complementary deoxyribonucleic acid
Cox	Cyclooxygenase
cTAL	Aufsteigender dicker Teil der Henle-Schleife, cortical thick ascending limb
Cyp	Cytochrom P450
Cyp2C11	Cytochrom P450 2C11
Cyp2C23	Cytochrom P450 2C23
Cyp2J	Cytochrom P450 2J
Cyp4A1	Cytochrom P450 4A1
Cyp4A2	Cytochrom P450 4A2
Cyp4A3	Cytochrom P450 4A3
Cyp4A8	Cytochrom P450 4A8
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DCT	Distaler konvoluter Tubulus, distal convoluted tubule
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DHT	Dihydrotestosteron
DNA	Desoxyribonukleinsäure, deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dTL	Absteigender dünner Teil der Henle-Schleife, descending thin limb
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, ethylenediaminetetraacetic acid
EET	Epoxyeicosatriensäure
FLAP	Lox-5 aktivierendes Protein, 5-lipoxygenase activating protein
g	Gramm
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
Glom	Glomerulus
Glom ⁺	Glomerulus mit Arteriole
Glom ⁻	Glomerulus ohne Arteriole
Glom ⁺ (g)	Gespülter Glomerulus mit Arteriole

GTC	Guanidinthiocyanat
HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
HPETE	Hydroperoxy-eicosatetraensäure
IM	Innere Medulla, inner medulla
IMCD	Sammelrohr der inneren Medulla, inner medullary collecting duct
Lox-5	Lipoxygenase 5
Lox-12	Lipoxygenase 12
Lox-15	Lipoxygenase 15
LS	Längenstandard
LTA4	Leukotrien A4
LTB4	Leukotrien B4
LTC4	Leukotrien C4
LTD4	Leukotrien D4
LTE4	Leukotrien E4
LX	Lipoxin
M	Molar
MEM	Minimum essential medium
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mmHG	Millimeter Hydrargyrum
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure, messenger ribonucleic acid
mTAL	Aufsteigender dicker Teil der Henle-Schleife, medullary thick ascending limb
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NCC	Thiazidsensitiver Natrium-Chlorid-Cotransporter
NKCC2-A	Natrium-Kalium-2-Chlorid-Cotransporter
NSN	Nephrotoxische Serumnephritis
ODN	Oligonukleotid
OM	Äußere Medulla, outer medulla
OMCD	Sammelrohr der äußeren Medulla, outer medullary collecting duct
PCT	Proximaler konvoluter Tubulus, proximal convoluted tubule
PCR	Polymerasekettenreaktion, polymerase chain reaction
pH	Potentia Hydrogenii, pH-Wert
pmol	Picomol
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
PRC	Plasma-Renin-Konzentration
PST	Proximaler gerader Tubulus, proximal straight tubule
PTH/PTHrP	Parathyreoidhormonrezeptor
RBF	Renaler Blutfluß
RNA	Ribonkleinsäure, ribonucleic acid
RNase	RNA hydrolysierendes Enzym
RNasin	Ribonukleaseinhibitor
RT	Reverse Transkription
SGTL-2	Natrium-Glucose-Cotransporter
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
TL	Dünner Teil der Henle-Schleife, thin limb

TNF	Tumornekrosefaktor
tRNA	Transfer-RNA
U	Unit
UV	Ultra-violett
VR	Vasa recta
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
5-HETE	5-Hydroxyeicosatetraensäure
5-HPETE	5-Hydroperoxy-eicosatetraensäure
5,6-EET	5,6-Epoxyeicosatriensäure
8,9-EET	8,9-Epoxyeicosatriensäure
11,12-EET	11,12-Epoxyeicosatriensäure
12-HETE	12-Hydroxyeicosatetraensäure
12-HPETE	12-Hydroperoxy-eicosatetraensäure
14,15-EET	14,15-Epoxyeicosatriensäure
15-HETE	15-Hydroxyeicosatetraensäure
15-HPETE	15-Hydroperoxy-eicosatetraensäure
19-HETE	19-Hydroxyeicosatetraensäure
20-HETE	20-Hydroxyeicosatetraensäure
°C	Grad Celsius
%	Prozent

VIII.2. Abbildungen und Tabellen

Abbildungen

Abbildung 1: Aufbau des Nephrons	S.5
Abbildung 2: Arachidonsäurekaskade	S.7
Abbildung 3: Charakteristisches Bild für Aktinbanden am Beispiel einer Sammlung aller Nephronsegmente der Rattenniere (außer Vasa recta) bei 30 Zyklen	S.37
Abbildung 4: Aktinbanden am Beispiel von Vasa recta (VR) und verschiedenen konzentrierten Nierenverdünnungen bei 30 Zyklen	S.37
Abbildung 5: Markertest mit dem Parathyreoidhormonrezeptor (PTH/PTHrP) bei 36 Zyklen an mTAL und PST	S.40
Abbildung 6: Markertest mit NKCC2-A bei 36 Zyklen an PST und mTAL	S.40
Abbildung 7: Markertest mit Aquaporin-4 (AQ-4) bei 36 Zyklen an einigen Segmenten der Niere	S.41
Abbildung 8: Markertest mit SGLT-2 bei 30 Zyklen	S.42
Abbildung 9: Verteilung der Lox-12 im Nephron der Rattenniere bei 36 Zyklen	S.45

Abbildung 10: Graphische Darstellung der Verteilung der Lox-12 im Nephron der Rattenniere	S.45 und S.61
Abbildung 11: Verteilung der Lox-15 in den Tubuli der Rattenniere bei 36 Zyklen	S.47
Abbildung 12: Verteilung der Lox 15 in VR der Rattenniere bei 36 Zyklen	S.47
Abbildung 13: Graphische Darstellung der Verteilung der Lox-15 im Nephron der Rattenniere	S.48 und S.62
Abbildung 14: Verteilung der Lox 5 in den Tubuli der Rattenniere bei 36 Zyklen	S.50
Abbildung 15: Verteilung der Lox 5 in VR der Rattenniere bei 36 Zyklen	S.50
Abbildung 16: Graphische Darstellung der Verteilung der Lox-5 im Nephron der Rattenniere	S.51 und S.62
Abbildung 17: Verteilung der Cyp4A1 in den Tubuli der Rattenniere bei 32 Zyklen	S.53
Abbildung 18: Verteilung der Cyp4A1 in VR der Rattenniere bei 32 Zyklen	S.53
Abbildung 19: Graphische Darstellung der Verteilung der Cyp4A1 im Nephron der Rattenniere	S.53 und S.63
Abbildung 20: Verteilung der Cyp4A2 oder Cyp4A3 in den Tubuli und VR der Rattenniere bei 32 Zyklen	S.55
Abbildung 21: Verteilung der Cyp4A2 und Cyp4A3 in VR der Rattenniere bei 32 Zyklen Zyklen	S.55
Abbildung 22: Graphische Darstellung der Verteilung der Cyp4A2 und Cyp4A3 im Nephron der Rattenniere	S.56 und S.63
Abbildung 23: Verteilung der Cyp2C23 in den Tubuli und VR der Rattenniere bei 32 Zyklen	S.57
Abbildung 24: Graphische Darstellung der Verteilung der Cyp2C23 im Nephron der Rattenniere	S.58 und S.64
Abbildung 25: Verteilung des Cyp2C11 in den Tubuli und VR der Rattenniere bei 34 Zyklen	S.60
Abbildung 26: Beispiel für Banden der Nierenverdünnungen des Primers Cyp2C11 bei 34 Zyklen	S.60
Abbildung 27: Graphische Darstellung der Verteilung der Cyp2C11 im Nephron der Rattenniere	S.60 und S.64

Tabellen

Tabelle 1: Die Zonen der Rattenniere	S.29
Tabelle 2: Verwendete Primer und deren Sequenzen	S.34
Tabelle 3: Lokalisation und Verteilung der Markergene AQ-4, SGLT-2 und NCC an den Kortexstrukturen Glom, PCT, cTAL, DCT und CCD/CT bei richtiger Zuordnung der Nephronsegmente	S.38
Tabelle 4: Lokalisation und Verteilung der Markergene NKCC2-A, PTH/PTHrP und AQ-4 an PST, dTL, mTAL und OMCD	S.39
Tabelle 5: Lokalisation und Verteilung des Markergens AQ-4 an TL und IMCD bei richtiger Zuordnung der Nephronsegmente	S.39

IX. Danksagung

Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person. Daher ist es jetzt an der Zeit, mich bei allen Menschen zu bedanken, die mir die Erstellung meiner Doktorarbeit ermöglicht haben.

Ich möchte mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Armin Kurtz für die freundliche Überlassung des Themas und die benötigten Materialien bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Helga Vitzthum, die mich jederzeit mit ihrer konstruktiven Kritik, Unterstützung und den sorgfältigen Korrekturen bis zur Vollendung meiner Arbeit betreute.

Weiterhin möchte ich mich besonders bei Herrn Dr. med. Stephan Reinhold bedanken, der mir im Verlauf der Arbeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Auch allen Mitarbeitern des Institutes für Physiologie möchte ich für ihre Unterstützung und ihre hilfreichen Ratschläge danken.

Ein besonders herzlicher Dank gilt nicht zuletzt meinen Eltern und meinem Bruder, die mich während dieses Werkes mit all ihrer möglichen Unterstützung begleitet haben.

X. Lebenslauf

Name: Christos Lattas

Geburtsdatum: 02.12.1976

Geburtsort: Hof an der Saale in Oberfranken

Staatsangehörigkeit: griechisch-deutsch

Familienstand: ledig

Eltern: Efsthios Lattas, Sozialberater a.D.
Uranie Lattas, Schneiderin a.D.

1983-1987 Neustädter Grundschule in Hof an der Saale/Oberfranken

1987-1996 Jean-Paul-Gymnasium in Hof an der Saale/Oberfranken

1996 Studium der Zahnheilkunde an der Universität Regensburg

1997 Naturwissenschaftliche Vorprüfung

1999 Zahnärztliche Vorprüfung

2002 Zahnärztliche Prüfung

2004 – 2011 Tätigkeit als Vorbereitungsassistent und angestellter Zahnarzt in
Straubing

November 2011 Übernahme einer Zahnarztpraxis in Straubing/Niederbayern,
seitdem Tätigkeit in eigener Praxis

- Hiermit erkläre ich, dass die Dissertation von Herrn Prof. Dr. med. Armin Kurtz angeregt und meine Ausarbeitung von Frau Dr. Helga Vitzthum überwacht wurde.
- Des Weiteren erkläre ich hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.