

Aus der Urologischen Klinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Ackermann

**Molekulare Kinetik der Endotheline bei Unilateraler
Ureteraler Obstruktion im Rattenmodell**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Frank Zoerner

2006

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab

Dekan

Referent: Priv.-Doz. Dr. Grimm

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Germing

Inhaltsverzeichnis

I. EINLEITUNG	5
I.1 POSTRENALE OBSTRUKTION.....	5
<i>I.1.I Pathogenese der Unilateralen Ureteralen Obstruktion</i>	5
I.2 ENDOTHELIN UND ENDOTHELINREZEPTOREN.....	9
<i>I.2.I Endothelin-1</i>	9
<i>I.2.II Endothelin-2 und Endothelin-3</i>	9
<i>I.2.III Biochemie und Molekularbiologie der Endothelin-Peptide</i>	10
<i>I.2.IV Endothelinrezeptoren</i>	11
<i>I.2.V Die physiologischen Funktionen der Endotheline</i>	13
<i>I.2.VI Pathophysiologische Bedeutung der Endotheline</i>	14
I.3 FRAGESTELLUNG UND ZIELE.....	15
II. MATERIAL	16
II.1 CHEMIKALIEN UND ENZYME.....	16
II.2 PRIMER.....	16
II.3 PUFFER UND STAMMLÖSUNGEN.....	17
II.4 GEBRAUCHSWAREN.....	19
II.5 GERÄTE.....	19
III. METHODEN	20
III.1 STANDARDISIERTES RATTENMODELL.....	20
III.2 RNA-EXTRAKTION.....	20
III.3 PHOTOMETRIE.....	21
III.4 GEL-ELEKTROPHORESE VON NUKLEINSÄUREN.....	21
<i>III.4.I Horizontalelektrophorese</i>	22
<i>III.4.II Elektrophorese von RNA im Agarosegel</i>	22
III.5 TECHNIK DER POLYMERASE- KETTENREAKTION (PCR).....	23
<i>III.5.I Synthese von cDNA (Reverse Transkription)</i>	24
<i>III.5.II RT-PCR</i>	25
<i>III.5.III Semiquantitative Duplex-PCR</i>	26
III.6 TRANSFERTECHNIKEN VON NUKLEINSÄUREN.....	28
<i>6.I Southern-Blotting (DNA)</i>	28
<i>6.II Northern-Blotting (RNA)</i>	28
III.7 LUMINESZENZ-DETEKTION.....	29
<i>III.7.I Prinzip der Chemolumineszenz-Detektion mit Digoxigenin und Random Priming</i>	29
<i>III.7.II Arbeitsschritte der Lumineszenz-Detektion</i>	30
III.8 DATENVERARBEITUNG UND STATISTISCHE ANALYSE.....	30
III.9 ISOLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN.....	31
III.10 HYBRIDISIERUNG RADIOAKTIVER SONDEN AN MEMBRANGEBUNDENE RNA.....	32
<i>III.10.I Endmarkierung von Oligonukleotiden</i>	32
<i>III.10.II Reinigung der radioaktiven Sonden</i>	32
<i>III.10.IV Hybridisierung der radioaktiven Sonden an membrangebundene RNA</i>	33
IV. ERGEBNISSE	34
IV.1 METHODIK.....	34
<i>IV.1.I Polymerase-Kettenreaktion</i>	34
<i>IV.1.II Semiquantitative Duplex-PCR</i>	36
IV.2 EXPRESSION VON FAKTOREN DES ENDOTHELINSYSTEMS.....	39

IV.2.I Endothelin-Converting-Enzyme.....	40
IV.2.II Endothelin-1	42
IV.2.III Endothelin A-Rezeptor.....	43
IV.2. IV Endothelin B-Rezeptor.....	45
IV.3 NORTHERN BLOT.....	47
V. DISKUSSION	50
V.1 METHODISCHER TEIL	50
V.1.I Polymerase-Kettenreaktion	50
V.1.II Validierung der RT-PCR mit Northern-Blot.....	54
V.2 ROLLE DER ENDOTHELIN BEI UUO	55
V.2.I Expression in der Frühphase	56
V.2.II Expression in der Spätphase.....	59
V.2.III Quantitative Veränderungen des Expressionsniveaus.....	62
V.3 KLINISCHE BEDEUTUNG	63
VI. AUSBLICK	65
VII. ZUSAMMENFASSUNG	67
FRÜHPHASE DER UUO:.....	67
ECE-1.....	67
ET-1.....	67
ETAR.....	67
ETBR.....	67
SPÄTPHASE DER UUO:	68
ECE-1.....	68
ET-1.....	68
ETAR.....	68
ETBR.....	68
VIII. LITERATURVERZEICHNIS	70
IX. ANHANG.....	79
IX.1 VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN	79
IX.2 VERZEICHNIS DER TABELLEN	79
IX.3 ABKÜRZUNGEN.....	80
IX.4 OLIGONUKLEOTID-SEQUENZEN.....	81
IX.5 STATISTIK	82
IX.5.I ECE-1	82
IX.5.II ET-1.....	82
IX.5.III ETAR.....	83
IX.5.IV ETBR.....	83
IX.5.V Legende der Proben von Abbildung 16, Seite 39.....	84
X. DANKSAGUNG	85
XI. ERKLÄRUNG	86
ABSTRACT	89

I. Einleitung

I.1 Postrenale Obstruktion

Die postrenale Obstruktion der Niere ist der häufigste pathologische Zustand des Urogenitalsystems. Die Prävalenz der obstruktiven Nephropathie liegt bei etwa 1 : 1000^[144]. Insgesamt handelt es sich also um häufige Krankheitsbilder. Trotzdem liegen zur Inzidenz und Prävalenz keine Daten aus unselektierten Populationen vor; vielmehr handelt es sich bei den meisten epidemiologischen Studien um selektionierte Populationen^[46,80,116] oder um Daten aus Autopsien^[55].

Die klinische Bedeutung besteht in einem zunehmenden Funktionsverlust der betroffenen Niere, welcher einer zeitlichen Kinetik folgt. Diese unterteilt man in verschiedene Phasen (s. Seite 6). Von besonderer therapeutischer Relevanz ist dabei, daß erstens der Funktionsverlust um so ausgeprägter ist, je länger die Obstruktion andauert und zweitens mit zunehmender Obstruktionsdauer die Wahrscheinlichkeit eines irreversiblen Schadens steigt^[73]. In der vorliegenden Arbeit wurden die Veränderungen der Expression von Teilen des Endothelinsystems bei anhaltender unilateraler ureteraler Obstruktion (UUO) über einen Zeitraum von 30 Tagen an einem standardisierten Rattenmodell untersucht.

I.1.1 Pathogenese der Unilateralen Ureteralen Obstruktion

Die partielle oder komplette Obstruktion des Ureters sind eine häufige Ursache für den Verlust von Nephronen. Um die Veränderungen auf zellulärem Niveau zu verstehen, bedarf es eines tieferen Verständnisses der pathophysiologischen Vorgänge bei der unilateralen ureteralen Obstruktion.

Eine der Hauptaufgaben der Niere besteht in der Reabsorption von Wasser und damit der Konzentrierung von Urin auf das bis zu Vierfache der Plasmaosmolalität. Dieser sehr energieaufwendige Prozeß findet im Nierenmark mittels Gegenstromprinzip^[24] statt. Obwohl die Niere in Relation zu ihrem Gewicht das meistdurchblutete Organ ist, herrschen im Nierenmark, anders als in der Rindenregion, relative hypoxische Verhältnisse mit Sauerstoffpartialdrücken von lediglich 10-20 mmHg^[21], was für die Funktion jedoch notwendig und somit physiologisch ist. In der Regulation dieser Balance sind mehrere Systeme involviert^[138], welche die Perfusion des Nierenmarkes in Abhängigkeit der Kreislaufverhältnisse und des lokalen Sauerstoffbedarfes kontrollieren^[22].

Besonders relevant sind hier Regulationsvorgänge der vasoaktiven Mediatoren, wie Angiotensin II und Stickstoffmonoxid (NO) auf molekularer Ebene, aber auch neuronale und zelluläre Signalübertragung sowie homöostatische Mechanismen^[153].

Der Ausfall eines dieser Systeme stellt nur in seltenen Fällen eine akute Bedrohung der Nierenfunktion dar und kann meist kompensiert werden. Bei einer gravierenden Schädigung dieser Systeme sinkt jedoch im Nierenmark der Sauerstoffpartialdruck unter die kritische Schwelle und es kommt erst zur Ischämie, bzw. Anoxie^[22]. Sind beide Nieren betroffen, zeigt sich klinisch das Bild eines akuten oder chronischen Nierenversagens. Auch bei UUO kommt es zur Anoxie der betroffenen Niere, wohingegen der Ausfall in der Regel von der kontralateralen Niere kompensiert werden kann.

In Tabelle 1 sind mögliche Ursachen für UUO aufgeführt^[144]. Die klinische Symptomatik ist von den jeweiligen Ursachen abhängig und somit variabel^[144].

Als Spätfolge der UO kann es zur Ausbildung einer Hydronephrose kommen, welche ebenfalls kein einheitliches Krankheitsbild ist, sondern den Endzustand einer Reihe von unterschiedlichen pathologischen Zuständen darstellt. Der zugrundeliegende Mechanismus ist jedoch ähnlich (z.B. Nephrolithiasis, M. Ormond). Die obstruktive Nephropathie ist weiterhin ein bedeutender Risikofaktor für das Auftreten einer arteriellen Hypertonie.

Angeborene Ursachen für UO	Sekundäre Ursachen für UO
Nierenbeckenabgangsstenose	Nephrolithiasis
Obstruktiver Megaureter	Tumoren (Urothelkarzinom, Metastasen)
Retrokavalärer Harnleiter	Harnleiterstenose
Fehlmündung des Harnleiters	entzündlich
Hufeisenniere	M. Ormond
V.-ovarica-dextra-Syndrom	

Tabelle 1: Ursachen für UO

Einteilung der Stadien bei UO

Young et al. ^[153] haben eine triphasische Beziehung zwischen renalem Blutfluß (RBF) und ureteralem Druck während kompletter unilateraler ureteraler Obstruktion wie folgt charakterisiert:

In der ersten Phase zwischen 0 und 90 Min. nach Eintritt einer UO steigen sowohl der renale Blutfluß, als auch der ureterale Druck an. Dies geschieht hauptsächlich aufgrund einer Vasodilatation des Vas afferens.

In der zweiten Phase im Zeitraum von 90 Min. bis 5 h fällt der RBF ab, wohingegen der ureterale Druck weiter ansteigt. Die Abnahme des RBF beruht auf einer Vasokonstriktion des Vas efferens.

In der dritten Phase, 5 h bis 18 h nach UO, kommt es durch die Vasokonstriktion des Vas afferens zu einem weiteren Rückgang der renalen Perfusion sowie zum Abfall des ureteralen Druckes.

Besteht die Obstruktion dauerhaft, so spricht man von chronischer ureteraler Obstruktion (CUO).

Andere Autoren ^[106] teilen die UO auch in ein biphasisches Modell ein, welches zwar pathophysiologisch weniger exakt, jedoch im klinischen Alltag gebräuchlicher ist. Dabei wird die erste Phase des triphasischen Modells nicht berücksichtigt und mit der zweiten Phase zusammengefaßt.

Multifaktorielle Ätiologie

Vasoaktive Mediatoren

Um die Vorgänge bei obstruktiver Nephropathie zu klären, wurden eine Reihe potentiell beteiligter vasoaktiver Mediatoren untersucht. Diese können in verschiedene Gruppen eingeteilt werden:

1. Hypoxieinduzierbare Gene
2. NO-System
3. Renin, Angiotensin und Angiotensin-1-Rezeptor
4. Gene, die an der Prostaglandinsynthese beteiligt sind
5. Interleukine und Akut-Phase Proteine
6. Endothelinsystem (wird eigens im folgenden Abschnitt behandelt)

Allen et al. ^[2] konnten zeigen, daß der Prostaglandin-Synthesehemmer Indometacin die frühe renale Vasodilatation bei UUO verhindert. Stickstoffmonoxid (NO) spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei den Veränderungen der renalen Hämodynamik. So haben Lanzone et al. ^[91] gezeigt, daß durch Infusion von L-Arginin, einem NO-Liberator, die durch Prostaglandinsynthese-Inhibitoren verursachte Unterdrückung der physiologischen Steigerung von RBF und ureteralem Druck rückgängig gemacht werden konnte. NO ist damit als ein potenterer Vasodilatator als das Prostaglandinsystem bei UUO anzusehen ^[123]. Die Inhibition von NO prädisponiert zu Markschäden und Nierenversagen ^[21].

Bei akuter UUO kommt es zu einer erhöhten Ausschüttung von Angiotensin II. Es gibt Hinweise darauf, daß unabhängig vom zirkulatorischen Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) auch innerhalb der Niere die Bildung von Angiotensin II möglich ist ^[76], zumal Rezeptoren für Angiotensin II im Nierenmark nachgewiesen werden konnten ^[22]. Dies könnte erklären, warum es bei akuter UUO in der ipsilateralen Niere nicht zu einer anhaltenden Erhöhung des RBF kommt ^[57].

Des Weiteren spielt Adenosin bei der Steuerung des renalen Sauerstoffangebotes eine wichtige Rolle; Adenosin entsteht durch Verbrauch von ATP, etwa bei Hypoxie, und ist allgemein als Vasodilatator bekannt. In der Niere fungiert Adenosin jedoch einerseits als Vasokonstriktor im Bereich der Nierenrinde, was zu einer Verminderung der GFR führt sowie andererseits als Vasodilatator im medullären Bereich, wo es auch den tubulären Transport hemmt. Dies deutet darauf hin, daß Adenosin eine Sonderrolle bei der renalen Hypoxieregulation spielt und durch Umverteilung des Sauerstoffangebotes homöostatische Eigenschaften hat ^[43].

Bei Urodilatin handelt es sich um einen weiteren renalen Vasodilatator ^[36], der in seiner Struktur dem ANP (atrialess natriuretisches Peptid) homolog ist und in den distalen Tubuli exprimiert wird.

Die Bedeutung von Histamin hinsichtlich einer antizipierten vasodilatierenden Wirkung ^[10] ließ sich nicht bestätigen. Banks et al. konnten lediglich die reaktive Hyperämiephase nach Noradrenalininfusion als Histaminwirkung nachweisen ^[9].

Als weiterer Arachidonsäuremetabolit konnte neben Prostaglandinen auch eine erhöhte Thromboxan A₂-Ausschüttung nachgewiesen werden. Thromboxan A₂ ist möglicherweise an der renalen Vasokonstriktion beteiligt ^[126]. Botting et al. konnten zeigen, daß die Gabe von ET-1 und ET-3 sowohl einen Anstieg von Arachidonsäuremetaboliten (Thromboxan A₂, Prostaglandin E₂), als auch von NO bewirken ^[19]. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf eine zentrale Rolle der Endotheline im komplexen Autoregulationsmechanismus der renalen Perfusion.

Für die Spätphase der UUO konnten bisher noch keine Botenstoffe gefunden werden, die eindeutig für den Rückgang des RBF verantwortlich sind. Bei chronischer UUO konnte hingegen eine renale Endothelin-1-Ausschüttung bei Hunden nachgewiesen werden ^[82],

welche auch nach der Gabe des Kalziumantagonisten Verapamil fortbesteht. Dies deutet darauf hin, daß das Endothelinsystem unabhängig vom Prostaglandinsystem bzw. diesem übergeordnet ist, da ET-1 nicht downreguliert wird. Diese Downregulation wäre aber nach Absinken der Plasmakonzentration der vasodilatierenden Prostaglandine (vermittelt durch Verapamil als Ausdruck einer Gegenregulation) zu erwarten. Auch in der Frühphase scheint Endothelin-1 produziert zu werden, was aber durch die Vasodilatation maskiert wird, bzw. sogar mit dieser in Verbindung steht.

Neuronale Signalübertragung

Es ist bekannt, daß NO ein wichtiger Neurotransmitter ist. Um die Rolle von NO bei ureteraler Relaxation zu untersuchen, haben Stief et al. ^[134] ein in vitro Modell verwendet. Es gelang jedoch nicht, einen sicheren Nachweis zu erbringen, so daß die Rolle von NO als Neurotransmitter bei UUU weiterhin ungeklärt ist.

Prozesse der Homöostase

Aquaporine sind Tunnelproteine, über die freies Wasser die Zellmembran permeieren kann. Vasopressin hemmt den Einbau von Aquaporin-2 in den distalen Tubuli, was zu einer Flüssigkeitsretention und höher konzentriertem Urin führt. Dies geschieht durch Rückresorption des freien Wassers im Gegenstromprinzip.

Frokiaer et al. ^[58] haben die Vorgänge bei bilateraler ureteraler Obstruktion (BUO) untersucht und konnten nachweisen, daß auch nach Beendigung der BUO die verminderte Aquaporin-2 Expression noch einige Tage anhält. Dies erklärt beispielsweise die klinisch häufig beobachtete polyurische Phase im Anschluß an ein akutes Nierenversagen (ANV). Die hierbei auftretende Downregulierung von Aquaporin-2-mRNA als Ausdruck der Störung der Fähigkeit zur Konzentrierung des Harns ist bei UUU in der ipsilateralen Niere stärker ausgeprägt, als in der kontralateralen Niere, die meist noch kompensieren kann ^[56]. Diese Entdeckung spricht für das Vorhandensein von nicht-systemischen intrarenalen Faktoren, die für die Downregulierung von Aquaporin-2 hauptverantwortlich sind.

Zellproliferation und Apoptose

Bei chronischer ureteraler Obstruktion (CUO) kommt es zu einem irreversiblen, progredienten Untergang des Nierenparenchyms mit Kortextrophie. Bei diesem komplexen Geschehen herrscht ein gestörtes Verhältnis zwischen Zellproliferation und programmiertem Zelltod in der obstruierten Niere. Truong et al. ^[141,142] haben diese Zusammenhänge untersucht und konnten zeigen, daß die Apoptoserate in den Tubuluszellen am stärksten zunimmt und ihren Gipfel etwa am 6. Tag nach Einsetzen der Obstruktion erreicht. Weiterhin kommt es zu einer gesteigerten Proliferation von Fibroblasten im Interstitium und später dort auch zum Einwandern von Entzündungszellen.

1.2 Endotheline und Endothelinrezeptoren

Die Familie der Endotheline wurde erstmals 1988 von Yanagisawa ^[151] isoliert und identifiziert. Zu dieser Familie gehören die Peptide Endothelin-1, Endothelin-2 und Endothelin-3. Die Endotheline sind Peptide mit einer Länge von 21 Aminosäuren, deren Aminosäuresequenz an zehn Positionen identisch ist ^[137] (s. Abbildung 1). Sie werden in verschiedenen Geweben exprimiert, wo sie an der Regulation des vasomotorischen Tonus, der Zellproliferation sowie der Hormonproduktion beteiligt sind. Ihre Wirkungen werden über spezifische Rezeptoren, den Endothelin-A-Rezeptor und den Endothelin-B-Rezeptor vermittelt ^[48]. ET-1 konnte auf Chromosom 6 ^[6], ET-2 auf Chromosom 1 ^[18] und ET-3 auf Chromosom 20 ^[110] lokalisiert werden.

1.2.1 Endothelin-1

Von den drei bekannten Endothelinen wird nur ET-1 in Endothelzellen exprimiert. Außerdem findet sich ET-1 in vaskulären glatten Muskelzellen. Weiterhin konnte ET-1 auch noch in Neuronen und Astrozyten, im Endometrium, Hepatozyten, Mesangiumzellen der Niere, Sertolizellen sowie in Epithelzellen nachgewiesen werden ^[113,129]. Die Transkription der ET-1 mRNA sowie die Synthese und Sekretion des Proteins kann als Reaktion auf verschiedene Stimuli wie Hypoxie, Ischämie oder Zunahme der Wandspannung innerhalb von Minuten erfolgen. Die Halbwertszeit der mRNA beträgt im Mittel zwischen 15 und 20 Min. ^[78], die Plasma-Halbwertszeit von ET-1 ca. 4-7 Min. Damit kann die endotheliale ET-1-Produktion dynamisch und bedarfsgerecht zur Regulation der Vasomotorik eingesetzt werden. 80 bis 90 Prozent des zirkulierenden ET-1 wird in den Lungen während der ersten Passage abgebaut ^[41]. Nur 25 Prozent der ET-1-Ausschüttung gelangen nach intraluminal. Drei Viertel werden vom Endothel parakrin in Richtung der glatten Muskelzellen sezerniert ^[152], was dort zu einer Rezeptor-vermittelten Kontraktion und so zur Vasokonstriktion führt. Da dieser Hauptteil der ET-1-Produktion nicht an der Plasmakonzentration beteiligt ist, handelt es sich bei ET-1 eher um ein parakrines als ein endokrines Peptidhormon. Trotzdem korrelieren ET-1-Plasmakonzentrationen z.B. eng mit dem Schweregrad eines kardiogenen Schockgeschehens ^[48].

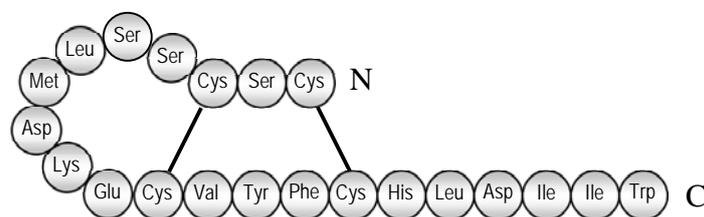


Abbildung 1: Aminosäuresequenz und Struktur von Endothelin-1

1.2.II Endothelin-2 und Endothelin-3

Endothelin-2 (ET-2) wird vorwiegend intrarenal und intestinal produziert. Kleinere Mengen konnten auch in Myokard, Plazenta und Uterus nachgewiesen werden, wobei allerdings die

produzierenden Zellen selbst nicht identifiziert werden konnten. Bisher sind für ET-2 keine anderen physiologischen Funktionen als bei ET-1 nachgewiesen worden^[48].

Endothelin-3 (ET-3) ist wie ET-1 im Plasma nachweisbar, der Herkunftsort ist jedoch noch nicht gefunden worden. Im Gehirn konnte ET-3 in hohen Konzentrationen nachgewiesen werden, wo es möglicherweise bei komplexen Regulationsmechanismen, etwa bei der Proliferation und der Entwicklung von Neuronen und Astrozyten, beteiligt ist. Außerdem wurde ET-3 in der Niere, der Lunge sowie im Gastrointestinaltrakt gefunden^[48].

I.2.III Biochemie und Molekularbiologie der Endothelin-Peptide

Jedes Endothelin ist das Produkt eines separaten Gens, welches für eine große sogenannte Precursor-Protein-mRNA kodiert. Das menschliche ET-1-Gen enthält 5 Exons und vier Zwischensequenzen. Die für Endothelin kodierenden Nukleotidsequenzen befinden sich im zweiten Exon. Das menschliche ET-1-Gen ist auf Chromosom 6 lokalisiert^[17,94]. Eine Reihe von Wachstumsfaktoren und vaskulären Proteinen kann mit der Promotorregion interagieren und so die Transkription des ET-1-Gens modulieren sowie die Translation in mRNA regulieren^[74,75].

ET-1 wird aus zwei Vorstufen gebildet; Präproendothelin-1 ist 203 Aminosäuren (AS) lang und wird zum 38 AS langen Prohormon Big Endothelin-1 gespalten, welches sezerniert wird und im Plasma nachweisbar ist. Big ET-1 besitzt lediglich 1/100 der vasomotorischen Wirksamkeit wie ET-1, aber seine Plasmakonzentration ist hoch genug, um bei Bedarf mittels extrazellulärer Spaltung die ET-1-Konzentration auf ein vasokonstriktorisch wirksames Niveau zu erhöhen^[48].

1994 gelang Xu et al.^[150] der Nachweis von ECE-1, dem Endothelin-Converting-Enzyme, welches Big ET-1 in ET-1 umwandelt und in großer Menge im Endothel exprimiert wird. Es handelt sich um das Schrittmacherezym der ET-1-Synthese, eine membranständige Metalloprotease, die Big ET-1 spezifisch zwischen den AS 21-Trp und 22-Val spaltet.

Das in der Ratte gefundene ECE-1 verfügt über unterschiedliche Affinität zu den jeweiligen Vorstufen der drei Endotheline, wobei das Verhältnis ET-1 : ET-2 : ET-3 etwa 4 : 1 : 2 beträgt^[127]. Zusätzlich zum extrazellulären ECE-1 wurde ein zweites, ebenfalls membranständiges, jedoch intrazelluläres ECE-2 gefunden^[47].

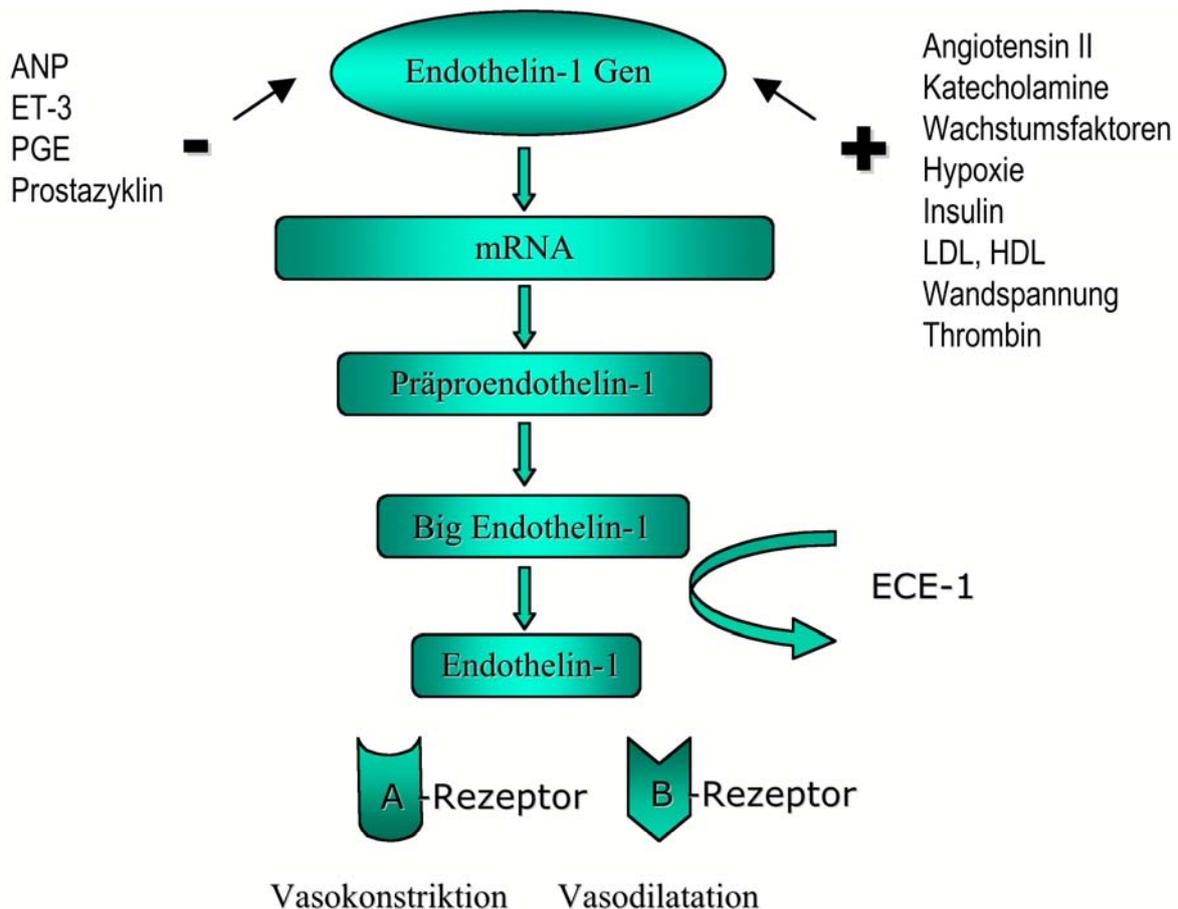


Abbildung 2 : Expression und Wirkung von ET-1

I.2.IV Endothelinrezeptoren

Alle drei Endotheline binden an zwei Rezeptoren (A und B) die zur Familie der G-Proteingekoppelten Rezeptoren gehören. Ihr molekulares Gewicht beträgt 45 bis 50 kDa und ihre Aminosäuresequenz ist zu ca. 50% homolog. Beide Sequenzen sind in Säugetieren hoch konserviert (85 bis 90 Prozent)^[48]. Pharmakologische Studien lassen auf wenigstens zwei Subtypen beider Rezeptoren schließen (ET_{A1} und ET_{A2} sowie ET_{B1} und ET_{B2})^[135,146]. Außerdem gibt es Hinweise auf einen dritten Subtyp, den ET_C-Rezeptor^[29,95].

Endothelin A-Rezeptor

Endothelin A-Rezeptoren besitzen eine zehnfach höhere Affinität zu ET-1 als zu ET-3^[4]. Sie werden vorwiegend auf glatten Gefäßmuskelzellen sowie auf kardialen Myozyten exprimiert. Über diesen Rezeptortyp wird der vasokonstriktorische Effekt von ET-1 vermittelt. Bei Rezeptoraktivierung wird intrazellulär die Phospholipase C aktiviert, was zur Produktion von IP-3 (Inositol-1,4,5-Trisphosphat) und DAG (Diacylglycerol) als sog. Second Messenger führt. IP-3 führt über einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration zu einer Vasokonstriktion^[130], die aufgrund der weiterhin erhöhten intrazellulären Kalziumkonzentration fortbesteht, auch nachdem ET-1 nicht mehr an den Rezeptor gebunden ist^[37]. NO kann die Dauer dieser Vasokonstriktion vermindern, indem es die Rückkehr der

intrazellulären Kalziumkonzentration zum Basalwert beschleunigt^[61]. Diacylglycerol und Ca^{2+} stimulieren mittels Proteinkinase C die mitogenen Effekte von ET-1^[131].

Endothelin B-Rezeptor

Abhängig vom Gewebetyp kann es entweder zur Vasodilatation oder Vasokonstriktion kommen, was auf Unterschiede in der postrezeptorischen intrazellulären Signaltransduktionskaskade hinweist.

Endothelinrezeptoren vom B-Typ werden hauptsächlich von Endothelzellen^[120], in geringerem Maße aber auch von glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert. Die Affinität der B-Rezeptoren zu ET-1 und ET-3 ist annähernd gleich. Bei einer Bindung an den B-Rezeptor kommt es wie beim A-Rezeptor zu einer Aktivierung der Phospholipase C mit Synthese von IP-3 und DAG zur Mobilisation von Kalzium. Darüber hinaus sind die B-Rezeptoren an inhibitorische G-Proteine gekoppelt, was in manchen Zellen zur Inhibition von zyklischem AMP (cAMP) sowie zur Aktivierung eines Na^+/H^+ -Antiportes führt^[5,88].

Wahrscheinlich wird durch die Bindung von ET-3 an den B-Rezeptor die vorübergehende Vasodilatation ausgelöst, welche nach ET-3-Infusion zu beobachten ist. Es wird angenommen, daß die Vasodilatation durch Produktion von NO und Prostazyklinen^[41,54,70] sowie das Öffnen von Kaliumkanälen verursacht wird.

Regulation und Expression der Endothelinrezeptoren

Die Regulation der Endothelinrezeptoren ist derjenigen der Endotheline sehr ähnlich. Für beide ist Hypoxie ein wesentliches Stimulans^[129]. Weitere Stimuli und deren Auswirkung auf die Expression der Endothelinrezeptoren sind in Tabelle 2 wiedergegeben^[48].

A-Rezeptor		B-Rezeptor	
Upregulation	Downregulation	Upregulation	Downregulation
Epidermal GF	ET-1, ET-2, ET-3	ANP Typ C	cAMP
Basic Fibroblast GF	Angiotensin II	Angiotensin II	Katecholamine
cAMP	PDGF	Basic Fibroblast GF	
Östrogen	TGF beta		

Tabelle 2: Regulation der Endothelinrezeptoren

Wie bereits beschrieben ist die Gewebeverteilung der beiden Rezeptortypen unterschiedlich. Aber auch innerhalb eines Gewebes können sich Unterschiede ergeben, wie z.B. in der Niere; hier werden die A-Rezeptoren vorwiegend in den Vasa rectae und Aa. arcuatae exprimiert, die B-Rezeptoren dagegen hauptsächlich in den Sammelrohren, was auf eine unterschiedliche Rolle im Salz- und Wasserhaushalt hindeutet^[129].

I.2.V Die physiologischen Funktionen der Endotheline

Die Produktion von ET-1 führt über Aktivierung des A-Rezeptors zu einer Vasokonstriktion, bei Aktivierung des B-Rezeptors kommt es dagegen durch Synthese von NO zur Vasodilatation. NO sowie Prostazyklin wiederum wirken ihrerseits mittels cGMP-Synthese hemmend auf die ET-1-Produktion^[20,107]. Darüber hinaus werden über die ET-1-Expression mitogene Effekte vermittelt und die Expression von Wachstumsfaktoren reguliert^[48]. Beispielsweise wird die Umwandlung von Angiotensin I zu Angiotensin II durch ET-1 beschleunigt, was sich auch in einer erhöhten Aldosteronkonzentration zeigt^[39]. Angiotensin II ist ein potenterer Vasokonstriktor als Angiotensin I. Es erhöht den intraglomerulären Druck aufgrund einer Vasodilatation des Vas afferens und einer Vasokonstriktion des Vas efferens. Außerdem bewirkt Angiotensin II die Ausschüttung von Aldosteron im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS). Die Hauptwirkung von Aldosteron besteht in einem Austausch von Kalium- und Wasserstoffionen gegen Natriumionen im distalen Tubulus, wodurch die Ausscheidung von Natrium vermindert wird.

Die ET-1-Sekretion wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst, wie z.B. das atriale natriuretische Peptid (ANP), welches vermehrt bei Hypervolämie sezerniert wird und als Gegenregulation die Diurese verstärkt. Kohno et al. konnten die Stimulation der ET-1-Sekretion durch Angiotensin II und Thrombin sowie die Inhibition durch ANP nachweisen^[89]. Daraus ist ersichtlich, daß die physiologischen Effekte von ET-1 sowie des RAAS hinsichtlich der Vasokonstriktion sowie der Natriumretention synergistisch sind.

ET-1 reduziert den RBF, indem es den renalen Gefäßwiderstand erhöht^[53]. Dabei kontrahieren sowohl Vas afferens, Vas efferens als auch A. arcuata und Interlobararterie. Bei systemischer Gabe von ET-1 kommt es Endothelin A-Rezeptor vermittelt^[48] zum Rückgang der GFR und zu Natriumretention durch Induktion von Aldosteron^[59]. In Abbildung 2, Seite 11 sind Einflußgrößen der ET-1-Regulation dargestellt^[48,137].

Die durch ET-3 vermittelte Vasodilatation erfolgt analog zu ET-1 über eine Stimulation der NO-Synthese^[11], was dafür spricht, daß es ebenfalls Teil des parakrinen und autokrinen Regelkreises der anderen beteiligten Substanzen sein könnte.

Sowohl ET-1 als auch ET-3 stimulieren die Produktion von Prostaglandinen und sind so ebenfalls an der Hemmung der Thrombozytenaggregation^[139], der Prostazyklin-vermittelten transienten Vasodilatation^[102] sowie der pulmonalen Bronchokonstriktion durch Thromboxan^[97] beteiligt.

Bei selektiver Blockierung des A-Rezeptors mit BQ-123 kommt es im Unterarm durch Verminderung des basalen Gefäßtonus zu einem Anstieg der Durchblutung um 64%^[64]. ET-1 ist der potenteste endogene Vasokonstriktor, der bisher entdeckt wurde. Bei äquimolarer Konzentration ist seine Wirkung beispielsweise ca. 100-fach stärker, als die von Noradrenalin^[1]. In manchen Geweben ist wahrscheinlich der B-Rezeptor ebenfalls an der Vasokonstriktion beteiligt^[125]. Noradrenalin und ET-1 verstärken außerdem gegenseitig ihre vasokonstriktorisches Effekte. In atherosklerotischen Gefäßen ist die vasokonstriktorisches Wirkung von ET-1 deutlich erhöht, da im vorgeschädigten Endothel kein NO als Gegenspieler mehr produziert werden kann^[96].

Bei der Regulation von ET-1 und den Interaktionen der in Abbildung 2 dargestellten Faktoren handelt es sich also um Feedbackmechanismen (z.B. NO^[61]). Dies weist auf die wichtige Rolle der Endotheline bei der Regulierung des vasomotorischen Tonus hin, woraus sich Möglichkeiten zu pharmakologischen Interventionen nicht nur bei Erkrankungen des Endothels entwickeln lassen sollten^[48].

I.2.VI Pathophysiologische Bedeutung der Endotheline

Endothelin (ET) ist ein potentes vasokonstriktives Peptid, welches 1988 erstmals aus Endothelzellen in Zellkultur isoliert werden konnte. Es wurden Details zu Isolation und Identifikation, Aminosäuresequenz, cDNA-Sequenz sowie Pharmakologie von ET publiziert [151].

Aufgrund der Bedeutung von ET-1 als stärkster bekannter Vasokonstriktor im menschlichen Körper hat die Familie der Endotheline daraufhin große Aufmerksamkeit erlangt. Es wurden weitere Untersuchungen durchgeführt wobei sich herausstellte, daß ET-1 ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen spielt [4,37,53,78,120]. Nachdem es gelungen ist, ET-Isoformen, ET-Rezeptoren sowie das Endothelin-Converting-Enzyme (ECE) zu klonieren, wurden verschiedene ET-Rezeptor-Antagonisten und ECE-Inhibitoren entwickelt. Davon erhofft man sich neue Erkenntnisse und Therapiemöglichkeiten kardiovaskulärer und anderer Erkrankungen.

Es konnte gezeigt werden, daß ET eine wichtige Rolle bei der Embryonalentwicklung des Nervensystems sowie weiterer Organe spielt. Masaki et al. (2004) gehen in einer Übersichtsarbeit auf die vielfältigen Funktionen des Endothelinsystems näher ein.

Im Folgenden sollen einige wichtige Erkrankungen genannt werden, bei denen die Endotheline mit hoher Wahrscheinlichkeit Teil des Pathomechanismus sind [48,101]:

Wahrscheinliche Beteiligung:

- Myokardischämie und Reperfusionsschaden
- cyclosporininduzierte Nephrotoxizität
- Postischämisches Nierenversagen
- Vasospasmen nach Subarachnoidalblutung

Mögliche Beteiligung:

- Asthma
- Pulmonale Hypertonie
- Persistierender ductus arteriosus Botalli
- Vasospasmen
- Akute zerebrovaskuläre Insuffizienz

Für diese Arbeit ist hauptsächlich die Rolle und Funktion des Endothelinsystems bei unilateraler ureteraler Obstruktion (UUO) von Bedeutung, weshalb darauf näher eingegangen werden soll.

Bei UUO tritt durch mechanische Verlegung des Harnleiters ein Rückstau von Urin auf. Es resultiert ein Druckanstieg in Harnleiter und Nierenbecken, wodurch es zur Ischämie des Nierenparenchyms kommt. In der Folge entwickelt sich ein postischämisches Nierenversagen (PINV), welches durch den Funktionsverlust der betroffenen Niere gekennzeichnet ist. Dieser Zustand ist reversibel, sofern die Ursache behoben werden kann, beispielsweise durch das Entfernen eines Harnleitersteines. Dauert die UUO jedoch an, führt das PINV zum irreversiblen Untergang von Nephronen, den kleinsten renalen Funktionseinheiten.

Über die Rolle der Endotheline bei UUO ist immer noch wenig bekannt. Allerdings deuten neuere Untersuchungen über die Physiologie und Pathophysiologie der Endotheline auf eine Beteiligung bei der Pathogenese der UUO hin [101]:

Der Einfluß der Endotheline auf glomeruläre Mesangiumzellen (MZ) wurde von Sorokin et al. untersucht [132]. Hierbei handelt es sich um Vorgänge beim PINV, etwa als Folge von UUO. Es konnte gezeigt werden, daß MZ ET-1 als Antwort auf eine Reihe von Faktoren sezernieren, deren Expressionsniveau bei glomerulärer Schädigung erhöht ist. Dazu zählen

u.a. Arachidonsäure-Metabolite, NO sowie Angiotensin II. Außerdem exprimieren MZ Endothelin-Rezeptoren, deren Aktivierung über eine komplexe Signaltransduktionskaskade zu Stimulation von Hypertrophie, Proliferation und Kontraktion der MZ führt.

Lariviere et al. haben zwei direkte Wirkmechanismen von ET-1 auf die Nierenfunktion beim PINV gefunden^[92]. Sie konnten zeigen, daß die Regulation der renalen Hämodynamik und der glomerulären Filtrationsrate (GFR) sowie die Modulation der renalen Natrium- und Wasserexkretion durch ET-1 zur Regulation des Extrazellulärvolumens und des Blutdruckes beitragen. Im Rattenmodell des chronischen Nierenversagens wurde nachgewiesen, daß die ET-1 Produktion in Nierengewebe und in Blutgefäßen erhöht ist. Diese Veränderungen sind mit einer erhöhten Expression von Präpro-ET-1 verbunden und korrelieren mit dem Blutdruckanstieg und dem Grad der Niereninsuffizienz als Ausdruck der renalen Schädigung. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die selektive Blockade des Endothelin A-Rezeptors (ETAR) das Fortschreiten der Schädigung renaler Gefäße sowie die Hypertension verhindert^[92]. Auch hier konnte bei einem Anstieg der ET-1 Expression ein erhöhtes Expressionsniveau von lokalen Mediatoren wie Angiotensin II, Transforming Growth Factor beta-1 (tgf- β) und Stickstoffmonoxid (NO) nachgewiesen werden, was die Bedeutung von ET-1 bei der Pathogenese der chronischen Niereninsuffizienz unterstreicht.

1.3 Fragestellung und Ziele

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Rolle der Endotheline bei postrenaler Obstruktion zu untersuchen. Dazu soll die Expression der mRNA beteiligter Faktoren bestimmt werden, um die postrenale Obstruktion auf molekularer Ebene in ihrer zeitlichen Kinetik zu charakterisieren.

Es wird die Hypothese aufgestellt, daß die das Endothelinsystem maßgeblich an der anhaltenden Vasokonstriktion beteiligt ist, welche in der obstruierten Niere für den Abfall des RBF und der GFR verantwortlich ist und später zum Funktionsverlust der betroffenen Niere führt..

Aus dieser Hypothese ergibt sich die konkrete Fragestellung;

„Welche Rolle spielt das Endothelinsystem bei der Entstehung der UUO?“

- 1. Rolle der Endotheline in der Früh- und Spätphase der UUO*
- 2. Welche Bedeutung hat das Schrittmacherenzym (ECE-1)?*
- 3. Sind die Endothelin-Rezeptoren entscheidend?*

Durch diese Erkenntnisse könnten Hinweise für Medikamente gesammelt werden, die für die Protektion der Nierenfunktion geeignet sind.

II. Material

II.1 Chemikalien und Enzyme

Agarose	NuSieve GTG, Biozyme, Hameln
Blocking-Reagenz	Boehringer, Mannheim
BSA	Biomol, Hamburg
cDNA-Synthese-Kit	Promega, Serva, Heidelberg
CSPD	Roche Diagnostics, Mannheim
DEPC	Sigma, Deisenhofen
DIG Luminescent Detection Kit	Boehringer, Mannheim
DMSO	Merck, Darmstadt
DNA-Längenstandard VI	Boehringer, Mannheim
dNTP-Set [100 mM]	Pharmacia
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Ethanol	Apothek der Medizinischen Einrichtungen, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ficoll 400	Pharmacia, Freiburg
Formaldehyd	Gibco, Eggenstein
Lachsspermien-DNA	Sigma, Deisenhofen
Mineralöl	Sigma, Deisenhofen
NaCl	Sigma, Deisenhofen
PCR-Purification-Kit QIA-Quick	Qiagen, Hilden
Polyvinylpyrrolidon	Pharmacia, Freiburg
PrimeZyme Buffer	Biometra, Göttingen
Radioaktiv markierte Reagenzien:	Amersham, Braunschweig
Reverse Transkriptase	Gibco, Eggenstein
RNAase-Inhibitor	Boehringer, Mannheim
RNA-Längenstandard I	Gibco, Eggenstein
SDS	Serva, Heidelberg
Taq-Polymerase	Biometra, Göttingen
Tris	Sigma, Deisenhofen
Triton X-100	Promega, Serva, Heidelberg
Trizol	Gibco
Tween-20	Sigma, Deisenhofen

II.2 Primer

Die Synthese der Oligodesoxynukleotide (Fa. Pharmacia) erfolgte nach den von Brown et al. ^[25] sowie Wang et al. ^[145] beschriebenen Sequenzen. Die Primersequenzen finden sich im Anhang unter IX.4.

II.3 Puffer und Stammlösungen

Tris-Puffer	100 mM 100 mM 50 mM pH 9,5	Tris NaCl MgCl ₂
Ansatz für radioaktive Markierung	10 pmol 1 µl 5 µl 10 U	Oligonukleotid 10x Kinase [γ- ³² P]-dATP Polynukleotidkinase
Anti-Digoxigenin-AP Puffer	Anti-Dig-AP-Antikörper 1:10.000 in Blocking-Reagenz	
Blocking-Puffer (Puffer 1)	100 mM 150 mM pH 7,5	Maleinsäure NaCl
Blocking-Reagenz	2% Blocking-Reagenz (4g) ad 200 ml Puffer 1 4h bei 50-60°C inkubieren, bei 4°C aufbewahren	
CSPD 1:10.000 Denaturierungspuffer	z.B. 5µl CSPD ad 50 ml Tris-Puffer 1,5 M NaCl 0,5 M NaOH pH 8,0	
Denhardt's Lösung (50x)	1% BSA 1% Polyvinylpyrrolidon 1% Ficoll 400 in 20x SSC, pH 7,0	
Dig-dNTP-Mix 2 mM	10 mM 1 mM ad 200 µl Aqua ad inf.	dNTPs 40 µl Dig-dUTPs (1nmol/µl)
dNTP-Mix 1,25 mM	je 10µl dATP, dCTP, dGTP, dUTP ad 800 µl Aqua ad inf.	
Fa-Puffer	6.5% Formaldehyd, 50% Formamid, 20 mM MOPS 5 mM Natriumacetat, 0.5 mM EDTA, pH 8.0	
Hybridisierungslösung I	5x SSPE-Lösung 5x Denhardt's-Lösung 0,1% SDS	
Hybridisierungspuffer (30 ml)	15 ml Na ₂ HPO ₄ 1M pH 7,2	

	0,3 g BSA 15 ml SDS 14% 60 µl EDTA 0,5 M 600 µl Lachsspermien DNA [100 µg/ml]
Lachsspermien-DNA Ladepuffer für RNA-Elektrophorese	100 µg/ml für 12 µl RNA Probenvolumen [1 µg/µl]: 8,5 µl Formaldehyd 37% pH 7,5 24 µl Formamid deionisiert 2,5 µl Fa-Puffer
MOPS-Puffer (10x)	0,4 M MOPS 0,1 M NaAcetat 10 mM EDTA pH 7,2
Neutralisationspuffer	1,5 M NaCl 0,5 M Tris, pH 7,2
SSC 20x	3 M NaCl 0,3 M NaCitrat, pH 7,0
SSPE (20x)	0,02 M EDTA 0,2 M NaH ₂ PO ₄ H ₂ O 3,6 M NaCl, pH 7,0
Stammlösungen für Tris-Puffer	1 M Tris 5 M NaCl 1 M MgCl ₂ , pH 9,5
TAE-Gel 1,2%	1,2% Agarose Formaldehyd 37%
TAE Puffer (100x)	1,2 M Tris 600 mM Na-Acetat x 3 H ₂ O 30 mM EDTA
Washing-Puffer	0,1 M Maleinsäure 3 M NaCl 5% Tween 20, pH 8,0
TX-Puffer	20 mM Tris-HCl, pH 8,0 150 mM NaCl 2 mM CaCl 1 mM EDTA, 2% Triton X-100 (v/v)
Waschlösung II	SSC 0,2x

II.4 Gebrauchswaren

Alufolie	Melitta
Autoklavierband	Scotch
Frischhaltefolie	Melitta
Hybond Blotting-Nylonmembran N	Amersham, Braunschweig
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilme	Eastman Kodak, Rochester, NY, USA
Skalpelle, Größe 22	Feather, Japan
Sterile Einwegreaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Trockeneis	Geländeapotheke
Whatman Chromatographiepapier 3MM	Whatman, Maidstone, UK
Zentrifugenröhrchen	Nalgene
Glaswolle	Pharmacia
Sephadex G-50	Amersham Biosciences

II.5 Geräte

Elektrophorese-Kammer	OWL, angewandte Gentechnik GmbH, Heidelberg
Heizblock	Eppendorf, Hamburg
Mörser aus Porzellan	Braun, Melsungen
PCR-Cycler	Biometra, TRIO-Thermblock
Potter	Braun, Melsungen
Speed-Vac	Heraeus
Spektralphotometer Ultrospec Plus	Pharmacia
UV-Transilluminator	Biometra
Vacuum-Blotter	BIO-RAD, Kalifornien
Zentrifuge	Beckmanmn
NAP50-Säule	Pharmacia
Rollerofen	Bachofer, Reutlingen

III. Methoden

III.1 Standardisiertes Rattenmodell

Es wurde das standardisierte Rattenmodell der unilateralen ureteralen Obstruktion gewählt. Hierbei wurde der linke Harnleiter während einer Ätherkurznarkose mit einem Seidenfaden ligiert. Damit entspricht das gewählte Modell am ehesten der klinischen Situation eines vollständigen akuten Verschlusses wie er z.B. bei Nephrolithiasis vorkommen kann. Die männlichen Sprague-Dawley-Ratten wurden in zehn Gruppen, entsprechend genau definierten Zeitintervallen vom Zeitpunkt Null bis zu 30 Tagen (s. Tabelle 3), eingeteilt. In jeder Gruppe wurden als Kontrolle Tiere scheinoperiert, um den Operationsstreß als Einflußgröße zu beschreiben. Anschließend wurden die Tiere geopfert und die Nieren entnommen. Nach Abpräparieren des Nierenbeckens wurden die Nieren in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Obstruktionsdauer:	0 Min.	30 Min.	1 Std.	2 Std.	6 Std.	12 Std.	1 Tag	2 Tage	4 Tage	30 Tage
Tiere je Gruppe:	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Davon untersucht:	4	4	4	4	4	4	4	4	3	3
Gesamtzahl:	38 Tiere, entsprechend 76 Nieren									

Tabelle 3: standardisiertes Rattenmodell

III.2 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion wurde unter Verwendung von Trizol nach einer modifizierten Methodik nach Chomczynski & Sacchi ^[35] vorgenommen. Beim Umgang mit RNA-Proben wurde besonders sorgfältig darauf geachtet, eine Kontamination mit RNAasen zu verhindern. Hierfür wurden die Reaktionsgefäße mit in Aqua dest. gelöstem DEPC vorbehandelt und autoklaviert. Die Gel-Elektrophorese-Kammern sowie andere Oberflächen, die in Kontakt mit den RNA-Proben kamen, wurden zuvor mit 75% Ethanol und Aqua dest. gereinigt.

Xiang et al. ^[149] haben bei einem Vergleich dreier RNA-Extraktionstechniken gezeigt, daß mit der Trizol-Methode die höchste RNA-Ausbeute und –Reinheit erzielt werden konnte. Trizol bindet Proteine incl. der Nukleasen in der intermediären und organischen Phase und erlaubt so einen reinen Transfer der sich in der wäßrigen Phase befindlichen RNA ^[128]. Dies ist von Bedeutung, da manche Gewebe reich an Nukleasen sind und bei anderen Geweben ein zu großer Austausch zwischen wäßriger, organischer und intermediärer Phase während der Extraktion stattfinden kann.

Nach Vorbereiten des Arbeitsfeldes für den Umgang mit RNA wurden die bei –70 °C gelagerten Nieren in flüssigem Stickstoff gekühlt. Nach dem Wiegen der Präparate wurden jeweils etwa 500 mg des Gewebes mechanisch im Mörser sowie im Potter zerkleinert. Um ein Auftauen auch während der Extraktion zu verhindern, wurde die Arbeitsfläche ebenfalls mit Trockeneis und Stickstoff gekühlt. Ca. 100 mg Gewebe wurden in 1 ml Trizol 5 Min. lang inkubiert und anschließend 200µl Chloroform zugegeben. Nach Durchmischen und weiteren 5 Min. Inkubationszeit wurden die Reaktionsgefäße 15 Min. lang bei 12.000 g

zentrifugiert. Der Überstand der wässrigen Phase wurde dann abpipettiert und für 10 Min. mit 500 µl Isopropanol inkubiert. Anschließend erfolgte ein erneutes Zentrifugieren der Proben für 10 Min. mit 12.000 g und 4 °C. Die Pellets wurden nun in 75% Ethanol/DEPC-H₂O nach abpipettieren des Überstandes erneut gelöst und 5 Min. bei 7.500 g und 4°C zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde 5 Min. bei Raumtemperatur die restliche Flüssigkeit abgedampft und das Pellet anschließend in autoklaviertem DEPC-Wasser aliquotiert. Nach 10 Min. Inkubation bei 55°C im Heizblock wurden die Proben dann bei -70 °C eingefroren.

III.3 Photometrie

Die Konzentration der aliquotierten RNA wurde mit einem Spektralphotometer bestimmt. Das Prinzip dieser Messung besteht darin, daß Nukleinsäuren, Proteine und andere Substanzen Extinktionsmaxima bei einer spezifischen Wellenlänge besitzen (s. Tabelle 4). Aus diesen Werten kann dann die Konzentration sowie eine etwaige Verunreinigung nach Abgleich der Leerextinktion unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors errechnet werden. Dazu bedient man sich folgender Formel nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz:

$$C[\mu\text{g} / \mu\text{mol}] = (E_{260} - E_{320}) \cdot f \cdot c$$

Gleichung 1: Konzentrationsberechnung

C: Konzentration der gemessenen Probe

E: Extinktion bei jeweiliger Wellenlänge

f: Verdünnungsfaktor

c: Kalibrierungsfaktor; OD für RNA beträgt 40 [µg/ml]

OD für DNA beträgt 50 [µg/ml]

E [nm]	Substanz
230	Salze
260	RNA und DNA
280	Viele Proteine
320	Aqua dest.

Tabelle 4: Extinktionsmaxima

Um den Verunreinigungsgrad der Probe mit Proteinen zu bestimmen wird der Quotient aus E_{260}/E_{280} gebildet. Der Toleranzbereich für reine RNA liegt bei $2,0 \pm 0,2$ ^[121].

III.4 Gel-Elektrophorese von Nukleinsäuren

Die Gel-Elektrophorese ist ein verbreitetes Verfahren zum Auftrennen von Nukleinsäuren, bei dem die Proben in einem Trägermedium (z.B. Agarosegel und Ladepuffer) im elektrischen

Feld entsprechend ihren unterschiedlichen Eigenschaften wandern. Durch variieren der Versuchsbedingungen läßt sich das Verfahren leicht an die zu trennenden Fragmente anpassen. Für die Wanderungsgeschwindigkeit sind vor allem die Gelkonzentration, die Fragmentgrößen, die angelegte Spannung sowie Pufferzusammensetzung und –konzentration von Bedeutung.

III.4.I Horizontalelektrophorese

Die Horizontalelektrophorese wurde zum Auftrennen von PCR-Amplifikationsprodukten verwendet. Da die Fragmentgrößen im Bereich zwischen 300 bp und 700 bp lagen, wurden Gelkonzentrationen zwischen 1,2% und 2,0% gewählt. Die Agarose wurde mit 1xTAE-Puffer aufgeköcht und nach Abkühlen auf 60°C in die Elektrophoresekammer gegossen. Anschließend wurden die Proben in das erstarrte Gel zusammen mit einem Marker als Laufkontrolle pipettiert, die Gelkammer mit 1xTAE als Puffer bis eben über das Gel gefüllt und eine Spannung von 4-8 V/cm angelegt.

Zur Darstellung der aufgetrennten Nukleinsäuren wurde das Agarosegel 20 Min. im Ethidiumbromidbad gefärbt und anschließend im Wasserbad kurz von unspezifischen Farbstoffen gereinigt. Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der mit Nukleinsäuren interkaliert, so daß diese durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht werden können. Die Gels wurden dann im Transilluminator bei Licht der Wellenlänge 260 nm begutachtet und ggf. fotografiert.

Digoxigenin-markierte Proben wurden nicht mit Ethidiumbromid gefärbt, sondern zur weiteren Analyse auf Nylonmembranen transferiert.

III.4.II Elektrophorese von RNA im Agarosegel

Bei der Elektrophorese von RNA wurden ein spezieller Ladepuffer sowie Formaldehyd im Agarosegel verwandt, um zu verhindern, daß die RNA während der Elektrophorese Sekundärstrukturen bildet. Die Proben wurden vor dem Beladen des Agarosegels mit 6,6% Formaldehyd im Gel 10 Min. bei 68°C denaturiert und anschließend 5 Min. auf Eis gekühlt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 4°C und 80 mA Stromstärke.

Weitere RNA-Gelelektrophoresen wurden zur Beurteilung der Qualität der extrahierten Proben vorgenommen um sicherzustellen, daß keine Degradierung der RNA z.B. aufgrund einer Kontamination mit RNAasen vorliegt.

In Abbildung 3 sind unterhalb der Slots zwei deutliche Banden zu erkennen, die der rRNA in den 28S sowie 18S Untereinheiten der Ribosomen entsprechen. Eine schwächere Bande darunter, etwa in Höhe der zweiten Markierung durch den RNA-Längenstandard I, zeigt das Vorhandensein von 5S rRNA an.

Beträgt das Verhältnis von 28S : 18S : 5S der rRNA 4 : 2 : 1, so liegt die RNA in idealer Form vor. In Abbildung 3 ist das Verhältnis zu Gunsten der kleineren Fragmente in der Nähe der positiv geladenen Anode verschoben. Die Qualität ist jedoch gut genug und für weitere Untersuchungen geeignet.

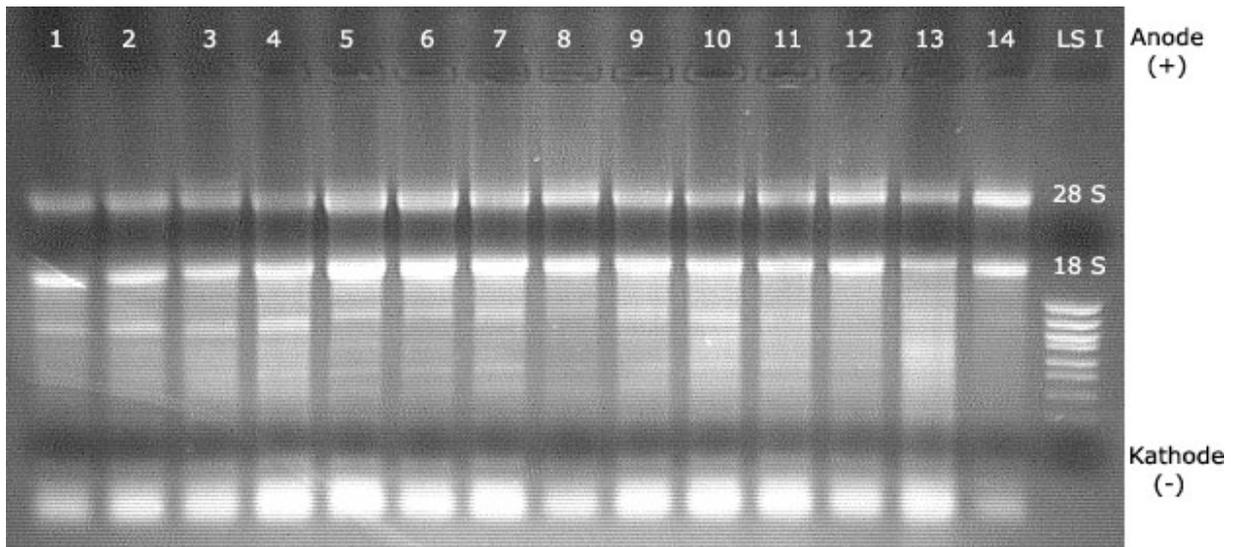


Abbildung 3: Gel-Elektrophorese von RNA

III.5 Technik der Polymerase- Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein Standardverfahren zur selektiven Amplifikation von DNA-Abschnitten das erstmals 1985 von Mullis et al. ^[103,104,119] angewendet wurde. Das Prinzip besteht in einer selektiven Neusynthese von zwischen zwei synthetischen Oligonukleotiden gelegenen DNA-Sequenzen mittels Taq-Polymerase ^[34] durch die exponentielle Anreicherung ausgehend von geringen Mengen DNA.

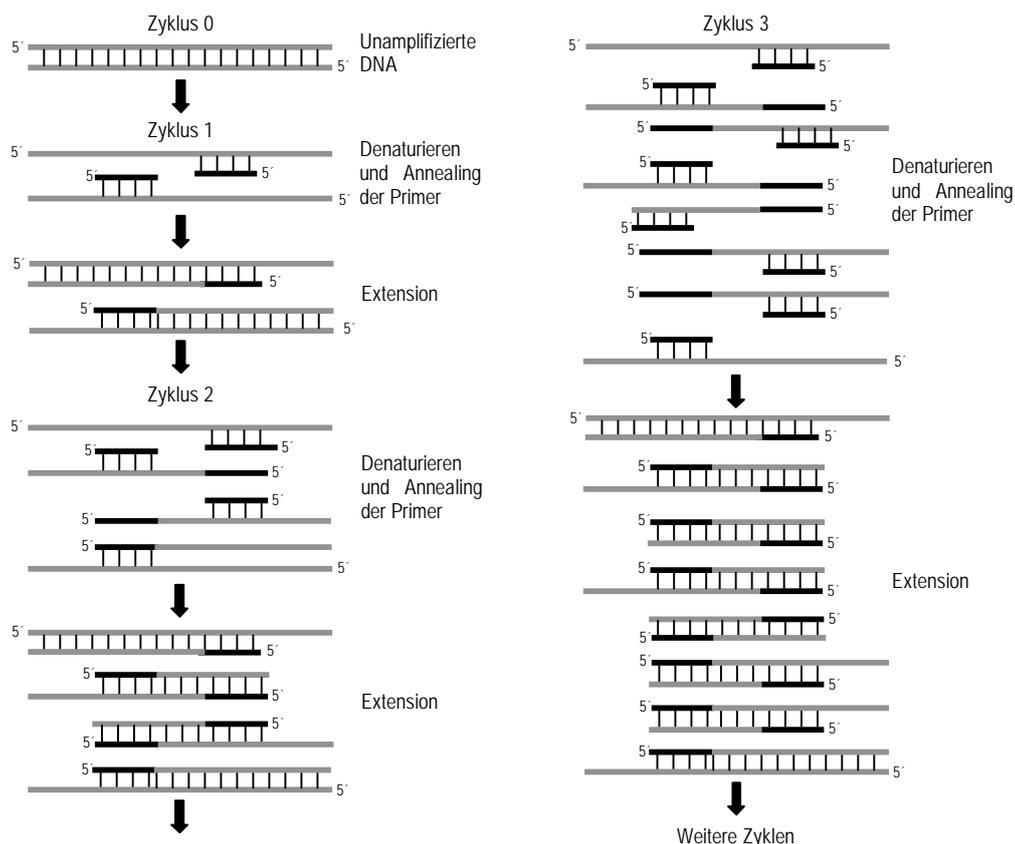


Abbildung 4: Schema der PCR-Amplifikation

In Abbildung 4 ist das Prinzip der PCR-Amplifikation schematisch dargestellt; ein Zyklus besteht aus drei thermischen Phasen: Denaturieren, Annealing und Extension. Während der Denaturierungsphase trennen sich bei ca. 96°C die komplementären DNA-Stränge, was in der Annealingphase nach Abkühlen auf etwa 60°C das spezifische Anlagern der Primer (zwei zum 5'- bzw. 3'-Ende komplementäre Oligonukleotide) an den Einzelsträngen ermöglicht. Nachdem die Primer gebunden haben, verlängert die Polymerase während der Extensionsphase dann bei ihrem Temperaturoptimum von ca. 72°C die Stränge (Neusynthese durch Einbau von Desoxynukleotidphosphaten). Nachdem so ein neuer Doppelstrang entstanden ist, folgen weitere Zyklen, bei denen die neu entstandenen DNA-Fragmente als Matrizen dienen. Dadurch kommt es rechnerisch zu einer Verdoppelung der Kopienzahl des gewünschten Abschnittes in jedem Durchlauf (exponentielle Amplifikation).

III.5.1 Synthese von cDNA (Reverse Transkription)

Die Degradierung von cDNA aufgrund Zersetzung durch RNAasen ist im Vergleich zu RNA bei gleicher Temperatur weniger ausgeprägt. Deshalb wurden die RNA-Proben mittels Reverser Transkriptase in komplementäre DNA transkribiert, um die praktische Durchführung der Versuche zu vereinfachen.

Dabei wird die RNA zusammen mit Oligonukleotiden (Oligo(dT)'s) bei 42°C inkubiert, welche an das Poly(A) Ende der mRNA binden und es so der Reversen Transkriptase ermöglichen, die komplementären DNA-Stränge zu synthetisieren.

Die cDNA-Synthese wurde mit einem Kit der Firma Promega entsprechend des Protokolls durchgeführt. Es wurden 2 µg RNA und 4 µl Oligo(dT)'s bei einem Probenvolumen von 10 µl 10 Min. bei 70°C denaturiert und anschließend sofort 5 Min. auf Eis gekühlt. Anschließend wurden jeweils 10 µl Mastermix (s. Tabelle 5) hinzugegeben und die Proben dann nach kurzem Zentrifugieren 75 Min. bei 42°C inkubiert. Nach 45 Min. wurde nochmals 5U/Ansatz AMV-RT pipettiert und erneut zentrifugiert, um eine maximale Ausbeute zu erhalten. Am Ende wurden die Ansätze 5 Min. bei 95°C denaturiert, anschließend direkt auf Eis gekühlt und dann bei -20°C gelagert.

Reagenz	Menge
MgCl ₂	10 mM
RT-Puffer	2x
dNTP's	2 mM
RNAsin [25 U/µl]	20 U/Probe
AMV-RT [10 U/µl]	8 U/Probe

Tabelle 5: RT Mastermix

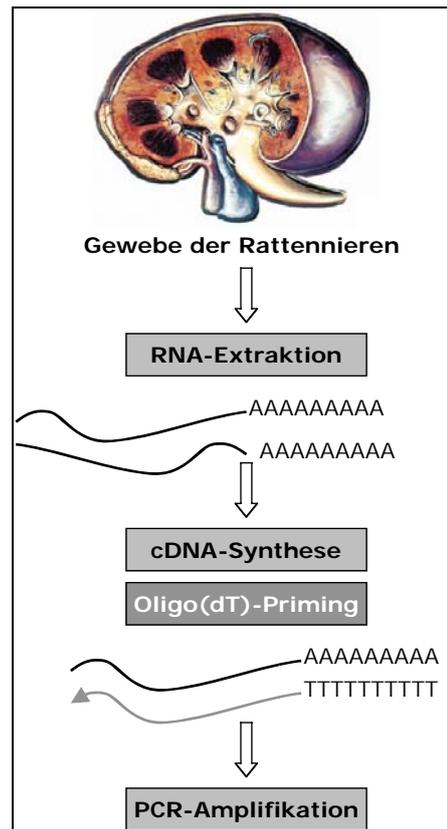


Abbildung 5: Schema der Arbeitsschritte

III.5.II RT-PCR

Die optimalen Reaktionsbedingungen, insbesondere die geeignete Annealing-Temperatur für die unterschiedlichen Primer wurden ausgehend von errechneten Werten empirisch ermittelt. Die Kenntnis der optimalen Annealing-Temperatur ist entscheidend, da mit steigender Temperatur in der Annealingphase die Spezifität der Primerhybridisierung zunimmt, bis das Überschreiten eines Temperaturmaximums das Anlagern der komplementären Stränge verhindert. Die Annealing-Temperatur wurde zunächst mittels der Formel in Gleichung 2 errechnet.

$$T_m = 4 * (G + C) + 2 * (A + T) - 2^\circ C$$

Gleichung 2: G-Guanin, C-Cytosin, A-Adenin, T-Thymin – Anzahl in der Primersequenz

Dafür wird die Anzahl der vier Basen Guanin, Cytosin, Adenin und Thymin aus der Sequenz des Primers ermittelt. Da Guanin und Cytosin drei Wasserstoffbrückenbindungen, Adenin und Thymin aber nur zwei miteinander eingehen, resultiert eine unterschiedlich starke Affinität des Primers. Je größer der Anteil von Guanin oder Cytosin, desto mehr Energie ist nötig, um die Bindung der Primer an die cDNA wieder zu lösen, was eine höhere errechnete Annealing-Temperatur zur Folge hat.

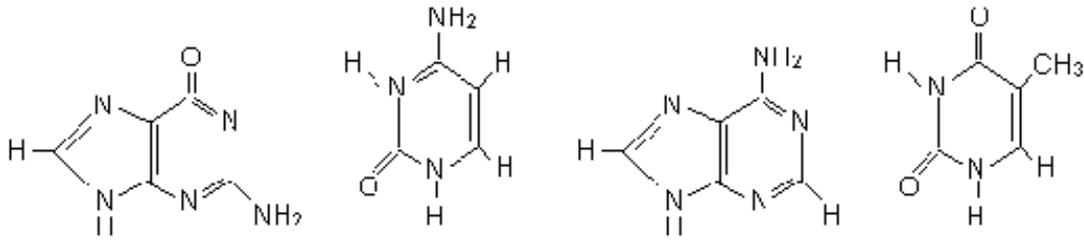


Abbildung 6: Guanin, Cytosin, Adenin, Thymin

Die PCR wurde mit GAPDH als Primer unter den in Abschnitt III.5.III aufgeführten Bedingungen durchgeführt. In Abbildung 11, Abschnitt IV.1.I ist das PCR-Programm wiedergegeben.

III.5.III Semiquantitative Duplex-PCR

Die Multiplex Polymerase Kettenreaktion ist eine Variante der PCR, bei der zwei (wie hier bei der Duplex-PCR) oder mehr Loci simultan in derselben Reaktion amplifiziert werden. Dieses Prinzip wurde erstmals 1988 von Chamberlain et al.^[32] beschrieben und kommt heute in vielen Bereichen, u.a. auch bei der semiquantitativen RT-PCR analog zur Anwendung^[40].

Bei der Duplex-PCR wird die Nachweisintensität zweier Fragmente miteinander verglichen. Diese Relation der Fragmente bezieht sich auf die RNA-Menge des zu untersuchenden Materials. Es handelt sich um einen semiquantitativen Nachweis, da das Ergebnis das Verhältnis dieser beiden Fragmente zueinander darstellt (= relative Expression), im Unterschied zu einer Mengenangabe. Um den Vergleich der Fragmente mit der RNA-Menge zu ermöglichen, wird ein sogenanntes „Housekeeping-Gen“ verwendet.

Das „Housekeeping-Gen“ wird in jedem Gewebe annähernd gleich exprimiert, wodurch idealerweise keine Schwankungen zwischen verschiedenen Zelltypen, Geweben, Organen oder Individuen vorliegen. Die Expression des „Housekeeping-Gens“ ist proportional zur RNA-Menge.

Als Schlüsselenzym in der Regulation der Glykolyse^[42] wird Glutamat-Adenosin-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) in vielen Geweben exprimiert und ist deshalb als Referenz gut geeignet. Außerdem lassen sich so Schwankungen, die durch Degradation von mRNA sowie durch unterschiedliche RNA-Mengen entstehen, ausgleichen^[45].

Zusammen mit dem jeweils zu untersuchenden Fragment wurde GAPDH als Housekeeping-Gen koamplifiziert, um die Expression der zu untersuchenden Fragmente in Relation zu derjenigen des Housekeeping-Gens setzen zu können (relative Expression).

Die geeigneten Versuchsbedingungen müssen empirisch ermittelt werden, wodurch dann eine semiquantitative Aussage über das Expressionsniveau der Genprodukte möglich ist.

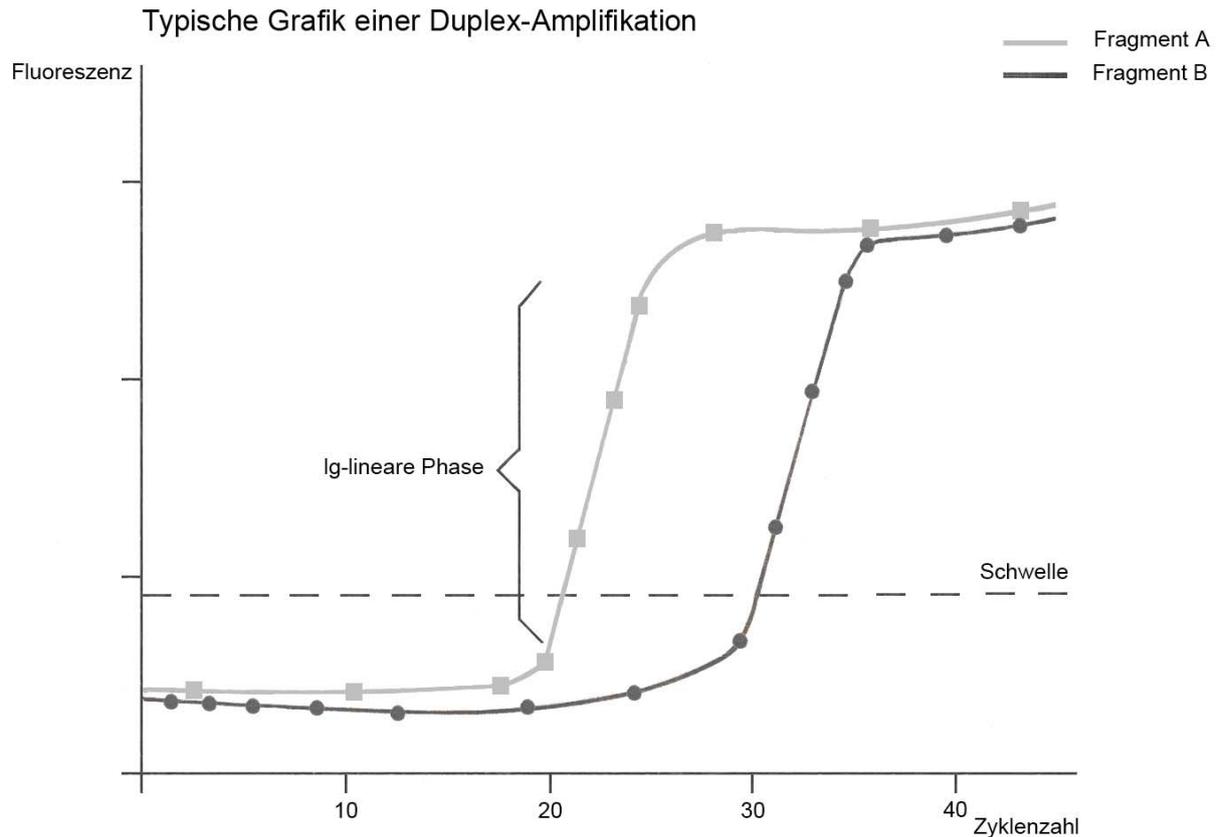


Abbildung 7: Modell einer Multiplex PCR

Bei Abbildung 7 handelt es sich um ein beispielhaftes Diagramm einer Duplex-PCR. Die beiden Kurven entsprechen den Fragmenten A, bzw. B. Fragment A steht hierbei für das Housekeeping-Gen GAPDH, Fragment B für ECE-1, ET-1, ETAR sowie ETBR. Auf der Ordinate ist die gemessene dimensionslose Fluoreszenz, auf der Abszisse die Zyklenzahl aufgetragen.

Anhand des Kurvenverlaufes beider Fragmente, lassen sich drei Phasen unterscheiden; zu Beginn der Amplifikation ist die durch die Fluoreszenz nachgewiesene Menge beider Fragmente unterhalb der Nachweisgrenze nahe der Nulllinie, es besteht kein meßbarer Zusammenhang zwischen Fluoreszenz und Kopienzahl. Ab einer bestimmten Zyklenzahl tritt die Kurve von Fragment A und B in die logarithmisch-lineare Phase ein. Nur in diesem Bereich ist ein semiquantitativer Vergleich mittels Fluoreszenzdetektion möglich, da die Fluoreszenz hier direkt proportional zur Kopienzahl der Fragmente ist.

Anschließend münden beide Kurven in eine Sättigungskinetik (Plateauphase), bei der die Fluoreszenz nicht mehr mit der Kopienzahl der Fragmente korreliert.

In der vorliegenden Arbeit wurden Duplex-PCR Systeme für Endothelin-Converting-Enzyme, Endothelin-1, Endothelin A-Rezeptor sowie Endothelin B-Rezeptor etabliert:

Etablierte Duplex-PCR Systeme

Für die Amplifikation wurden bei einem Einzelprobenvolumen von 50 µl jeweils 2 µl cDNA in einem 500 µl Eppendorf-Reaktionsgefäß eingesetzt. Der Mastermix enthielt PCR-Puffer (Biometra), dig-dNTP-Mix [50 mM], Primer A [25 pM] sowie Taq-Polymerase [1 U/Probe]. Nach dessen Zugabe wurden zwei Tropfen Mineralöl hineingegeben, um das Evaporieren der Flüssigkeit zu verhindern. Primer A (ECE-1, ET-1, ETAR sowie ETBR) wurde nun mit

seiner spezifischen Zyklen-Anzahl voramplifiziert. In der darauf folgenden Pause wurde bei 72°C in jedes Reaktionsgefäß 1 µl GAPDH-Primer [25 pM] pipettiert und das Programm weiter fortgeführt. Nach Beendigung des Programms wurden die Reaktionsgefäße wurden dann bis zur weiteren Verwendung bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

III.6 Transfertechniken von Nukleinsäuren

6.I Southern-Blotting (DNA)

Erstmals wurde der Transfer von DNA auf positiv geladene Nylonmembranen von Southern 1975 ^[133] beschrieben (Southern-Blot). Das Prinzip dieser Technik besteht darin, daß die in einem Agarose-Gel aufgetrennte DNA durch den Kapillartransfer eines Lösungsmediums (z.B. SSC) auf eine adhärente positiv geladene Nylonmembran übertragen wird. Die außen negativ geladene DNA-Doppelhelix bleibt haften, während das Medium durch die Membran hindurchtritt. Auf diese Weise entsteht ein zweidimensionales Abbild der dreidimensionalen Gel-Matrix auf der Membran.

Diese Technik fand hier für den Transfer Digoxigenin-markierter DNA-Proben in einer modifizierten Form Anwendung: Zunächst wurden die Agarose-Gele für das Blotting durch 20 Min. Inkubieren in Denaturierungslösung, zweimaliges Inkubieren für 10 Min. in Neutralisierungslösung sowie 5 Min. Schwenken in SSC [2x] vorbereitet. Die Nylonmembran wurde erst 5 Min. in Aqua dest. und dann 5 Min. in SSC [10x] vorbereitet, die Whatman-Papiere wurden direkt mit SSC [10x] vorbehandelt. Das Blotting wurde auf einem Unterdruck-Blotter vorgenommen; dabei kam das Agarose-Gel luftblasenfrei oberhalb der Nylonmembran zu liegen, welche wiederum auf zwei Whatman-Papieren auf der abgedichteten Unterlage des Vakuum-Blotters ebenfalls luftblasenfrei auflag. Eine Schablone aus Kunststoffolie, deren mittige rechteckige Öffnung etwas kleiner als das aufliegende Agarose-Gel war, überlagerte die restliche Fläche des Vakuum-Blotters und ermöglichte so das Anlegen des Unterdruckes. Die Zeit für die Dauer des Blot-Vorganges betrug 45 Min. Nach Beenden des Blottings wurde die Membran noch 5 Min. in SSC [2x] inkubiert, um sie von Gelresten zu befreien und die DNA anschließend nach einer von Khandjian et al. ^[86,87] 1986 beschriebenen Methode mit 120 J/cm² UV-Strahlung auf der Membran zu fixieren (sog. Cross-linking, wobei Khandjian et al. einen 10- bis 40-fachen Anstieg der Signalintensität beobachten konnten). Die Membran konnte nun entweder trocken zwischen zwei Whatman-Papieren bei 4°C gelagert werden, oder direkt in Blocking-Reagenz überführt werden.

6.II Northern-Blotting (RNA)

Die Transfertechnik von RNA auf eine Nylonmembran wird in Anlehnung an Southern als Northern-Blotting bezeichnet. Es wurde erstmalig 1977 von Alwine et al. ^[3] beschrieben, wobei das Prinzip das Gleiche ist (s.o.).

Zunächst wurde das Agarose-Gel mit den RNA-Proben für 30 Min. in NaOH [50 mM] denaturiert, für 30 Min. in Tris/HCl (pH 7,0) neutralisiert sowie 5 Min. in SSC [2x] vorbereitet. Die Nylonmembran wurde erst 5 Min. in Aqua dest. und dann 5 Min. in SSC [10x] getränkt und die Whatman-Papiere direkt mit SSC [10x] vorbehandelt.

Das Blotting erfolgte, indem das Agarose-Gel luftblasenfrei auf drei Whatman-Papiere gelegt wurde, von denen das unterste in eine mit SSC [10x] gefüllte Wanne eintauchte. Die Nylonmembran kam hierbei im Unterschied zum Unterdruck-Blotting auf der Oberseite des Agarosegels zu Liegen. Darüber wurden zwei weitere Whatman-Papiere und mehrere Lagen Zellulosetücher gestapelt, um Sog durch Kapillarkraft zu ermöglichen. Das Gel wurde mit Plastikstreifen soweit unterlegt und abgegrenzt, daß der Transport des Mediums ausschließlich durch das Gel hindurch erfolgen konnte. Die Konstruktion wurde oben mit ca. 500 g beschwert, um eine gute Auflage der Kontaktflächen zu gewährleisten. Die Blotdauer war mit ca. 18h deutlich länger, als bei der Vakuummethode. Nach dem Entfernen der Gelreste sowie Cross-linking der Membran (s.o.) wurde diese trocken zwischen zwei Whatman-Papieren in Alufolie gehüllt und bei -80°C eingefroren.

III.7 Lumineszenz-Detektion

III.7.1 Prinzip der Chemolumineszenz-Detektion mit Digoxigenin und Random Priming

Der Nachweis der Digoxigenin-markierten DNA geschah mittels Enzymimmuno-Assay unter Verwendung des Dig Luminescent Detection Kit (Boehringer Mannheim). Die Dig-Methodik wurde erstmals 1990 von Höltke et al. etabliert^[71].

Das Dig-System basiert auf dem Steroid-Hapten Digoxigenin, das sogenannte Aglukon des Steroids Digoxin, welches in bestimmten Digitalis-Pflanzen vorkommt^[84]. Aglukon bedeutet, daß die drei Zuckerreste am CH_3OH -Ende des Digoxin beim Digoxigenin fehlen. Durch Koppelung an ein geeignetes Trägermolekül wurden Schaf-Antikörper gegen das Hapten Digoxigenin hergestellt.

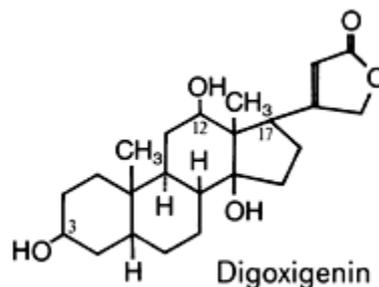


Abbildung 8: Das Digoxigenin-Molekül

Da Digoxigenin ausschließlich in den Digitalis-Pflanzen vorkommt, entstehen weniger Probleme mit endogenen Hintergrundsignalen als beispielsweise bei Methoden mit Biotin-Markierung. Außerdem kann Digoxigenin direkt mit Nukleotiden wie z.B. dUTP gekoppelt und so durch die Taq-Polymerase bei der PCR in die Genprodukte eingebaut werden (sog. Random Priming)^[51,72,124].

Beim Random Priming wird Dig-dUTP dem dNTP-Mix in einem Verhältnis von 1:20 zu dTTP eingesetzt und dann während der PCR zufällig an Stelle des dTTP in diesem Verhältnis eingebaut. Diese Proben können nach Gel-Elektrophorese und Southern-Blotting per Chemolumineszenz-Enzymimmuno-Assay detektiert werden^[99]. Der Vorteil dieses Verfahrens liegt in dem vollständigen Verzicht auf Radioaktivität.

Die gegen Digoxigenin gerichteten Antikörper des Nachweissystems sind mit dem Enzym Alkalische Phosphatase (Anti-Dig-AP) gekoppelt. Durch diese Enzymaktivität wird das Substrat CSPD umgesetzt, was in einer Lichtemission resultiert, welche durch Exposition auf einen Röntgenfilm sichtbar gemacht werden kann.

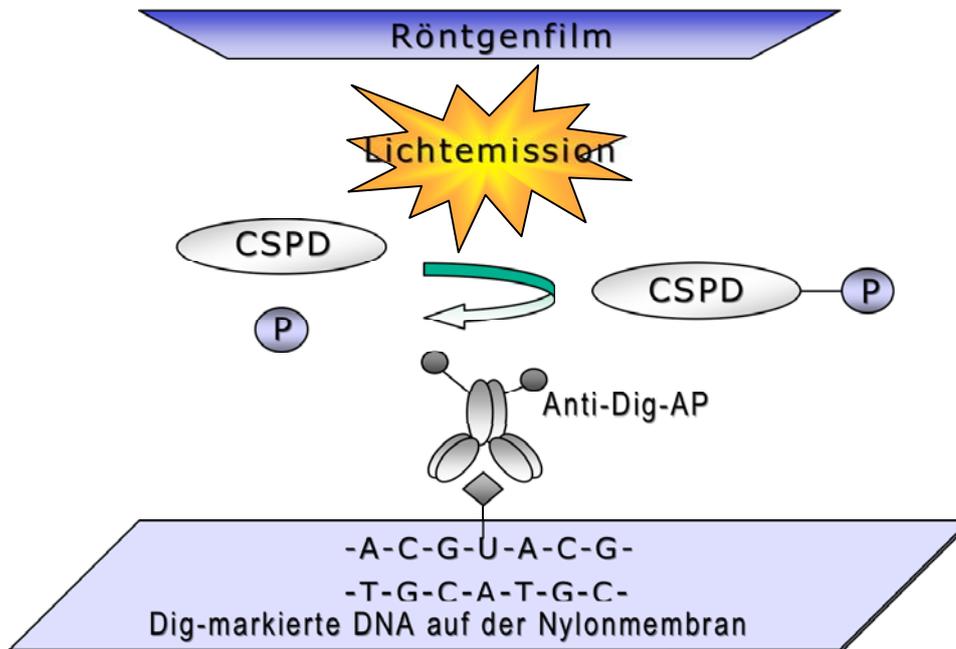


Abbildung 9: Lumineszenz-Detektion

II.7.II Arbeitsschritte der Lumineszenz-Detektion

Die vorbereiteten Nylonmembranen wurden zunächst 5 Min. in Washing-Puffer geschwenkt und dann mind. 60 Min. mit Blocking-Reagenz inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Anti-Dig-AP Lösung, zum Binden der Antikörper mit dem PCR-Produkt. Im Anschluß daran folgten vier je 10 minütige Waschschrte mit Washing-Puffer um die Membran von ungebundenen Antikörpern zu reinigen. Die Membran wurde dann 5 Min. in der Pufferlösung für „alkalische Bedingungen“ auf die Inkubation mit dem Substrat CSPD vorbereitet. Die Expositionszeit mit CSPD betrug ebenfalls 5 Min. Danach wurde die Membran um sie feucht zu halten, in Frischhaltefolie verpackt und in einer Filmkassette befestigt. In der Dunkelkammer wurde die Kassette mit Filmen beladen und nach einer Belichtungszeit von 5 bis 20 Min. bei 37°C erfolgte die Entwicklung im Fotolabor bzw. eine Nachbelichtung, sofern notwendig. Die Membranen wurden ggf. trocken bei 4°C gelagert.

III.8 Datenverarbeitung und statistische Analyse

Die entwickelten Röntgenfilme wurden am PC eingescannt und ggf. optisch nachbearbeitet. Mit dem Programm One-D-Scan (Scanalytics, Version 1.2), wurde die Auswertung der

Banden durch Berechnung des Integrals der optischen Dichte der Banden [IntOD] vorgenommen. Die Division der IntOD des Zielgens (ECE-1, ET-1, ETAR, ETBR) durch den Wert für GAPDH ergab die relative Expression. Zur Darstellung der Meßwerte wurde MS Excel, Version 8.0, eingesetzt.

Die statistische Analyse wurde mit Unterstützung von Dr. rer. nat. Reinhardt Willers (Universitätsrechenzentrum, Heinrich-Heine-Universität) durchgeführt. Dazu wurde das Statistikprogramm SAS, Version 10.0, verwendet. Um die Daten auszuwerten war es notwendig, das klassische 2-faktorielle Verfahren ANOVA (Analysis of Variance = Varianzanalyse) zu modifizieren und um einen dritten Faktor zu ergänzen. Im klassischen Verfahren wird auf zwei Haupteffekte getestet:

1. „Zeit“: Ändert sich gemittelt über die Behandlungen der Wert mit der Zeit?
2. „Behandlung“: Gibt es im Mittel über die Zeiten einen Unterschied zwischen den Behandlungen?

Zusätzlich wird die Wechselwirkung zwischen „Zeit“ und „Behandlung geprüft“: Ist der Abstand zwischen den Behandlungen bei allen Zeiten gleich? Gibt es signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen?

„Behandlung“ steht hier konkret für das erfolgte bzw. nicht erfolgte Ligieren des linken Ureters. Wenn nun alle Nieren unabhängig voneinander auf die „Behandlung“ reagieren würden, könnte man es dabei belassen und das 2-faktorielle ANOVA-Verfahren verwenden. In der vorliegenden Untersuchung mußte dieses Modell um den Faktor „Versuchstier“ erweitert werden, um die linke und rechte Niere desselben Versuchstieres voneinander zu trennen. Dies wäre normalerweise zu vernachlässigen, wenn der Faktor „Behandlung“ bei allen Tieren auf die gleiche Weise beobachtet worden wäre. Eine Behandlung fand nur bei den operierten Tieren statt, nicht bei den Scheinoperierten. Da jedoch bei der Kontrollgruppe zwangsläufig dieser Faktor fehlt und zudem manche Proben mehrfach gemessen wurden, ist dies nicht zulässig.

Im Anhang sind die Ergebnisse der Schätzungen auf Signifikanz für jede Gruppe nach Faktoren geordnet aufgeführt. Die dort angegebenen p-Werte müssen jeweils durch den Faktor 10 geteilt werden, da 10 Tests durchgeführt wurden. Dies nennt man Bonferroni-Adjustierung. Ein signifikantes Ergebnis liegt bei einem p-Wert von maximal 0,5% ($P < 0.005$) vor. Die Fehlerbalken in den Abbildungen stellen die Standardabweichung der Einzelwerte vom statistischen Mittelwert dar und zeigen somit die „Streuung“ der Meßwerte an.

III.9 Isolierung von DNA-Fragmenten

Zur Herstellung von DNA-Sonden für die radioaktive Hybridisierung der Northern Blots wurde das QIA-Quick PCR Purification Kit (Qiagen) verwendet. Dabei wurden die PCR-Fragmente direkt aus den Reaktionsgefäßen isoliert. Angaben zu PCR-Produkten und Primern finden sich in Abschnitt IX.4., PCR-Ablauf s. Abschnitt III.5.III. Das Prinzip besteht darin, daß die in Gelen oder Reaktionsgefäßen enthaltene DNA an einer speziellen Siliziumgel-Membran adsorbiert und von den anderen Reaktionsbestandteilen wie Primer, Gelreste, Enzyme und Mineralöl befreit werden. Nach dem Ausfällen der DNA wurden die Proben in Aqua dest. aufgenommen. Es wurde hierzu streng nach dem Protokoll des Herstellers verfahren^[109].

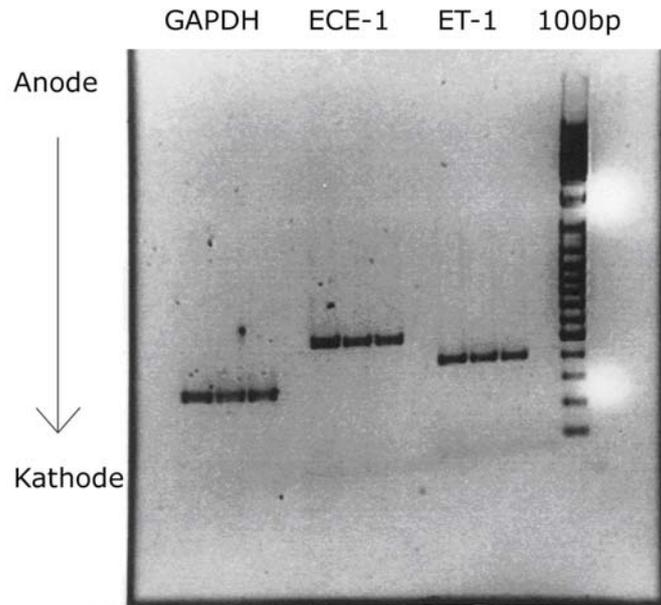


Abbildung 10: Gel mit PCR-Proben für DNA-Sonden

III.10 Hybridisierung radioaktiver Sonden an membrangebundene RNA

Die Herstellung der radioaktiv markierten Sonden, die Hybridisierung dieser mit den Northern Blots sowie die Detektion auf Röntgenfilm wurde freundlicherweise von Frau Dr. rer. nat. Ute Brosius (Arbeitsgruppe Fr. Prof. Gärtner, Kinderklinik, Heinrich-Heine-Universität) vorgenommen.

III.10.I Endmarkierung von Oligonukleotiden

Die radioaktive 5'-Endmarkierung der Oligonukleotide wurde nach Maniatis et al. mittels T4-Polynukleotidkinase vorgenommen (Ansatz s. Abschnitt II.3).

Die Lösung wurde zunächst 45 Min. bei 37°C und dann kurz in 0,5 M EDTA, pH 8,0 inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz über eine NAP-50 Säule gereinigt.

III.10.II Reinigung der radioaktiven Sonden

Die Trennung der radioaktiven Sonden von Nukleotiden und niedermolekularen Substanzen erfolgte durch Gelfiltration über eine Sephadex G-50 Medium Säule. Es wurde eine 1 ml Spritze mit etwas Glaswolle gefüllt und das in TX-Puffer gelöste Sephadex G-50 Material hineingefüllt. Anschließend wurde 2 Min. bei 800 g zentrifugiert und das Eluat verworfen. Die fertigen Säulen wurden in ein Reaktionsgefäß gegeben und in ein 15 ml Falcon-Gefäß gestellt. Dem Markierungsansatz (50 µl) wurden 50 µl Aqua dest. zugefügt, der Ansatz auf die Säule aufgetragen und nochmals 2 Min. bei 800 g zentrifugiert. Das radioaktive Eluat enthielt nun die markierten Fragmente, während Primer und Nukleotide in der Säule verblieben.

Die Oligonukleotide wurden mittels NAP50-Säulen (Pharmacia) aufgereingt, indem diese zweimal mit Aqua dest. gespült, dem 50 µl Reaktionsansatz 450 µl Aqua dest. zugegeben und der gesamte Ansatz in die Säule gegeben wurde. Das radioaktiv markierte DNA-Fragment wurde dann mit 1 ml Aqua dest. in ein Schraubdeckelreaktionsgefäß gegeben.

III.10.IV Hybridisierung der radioaktiven Sonden an membrangebundene RNA

Die Membran mit der gebundenen RNA wurde 10 Min. in 2x SSC-Lösung gelegt und die Hybridisierungstubes mit 2x SSC-Lösung gefüllt. Nach Entfernung von Luftblasen wurden die Filter 2 Std. mit 12 ml Hybridisierungslösung I bei 60°C im Rollerofen inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen an der Membran abzusättigen. Die radioaktiv markierte Lachsspermien-DNA (10 mg/ml) wurde durch Ultraschall abgeschert, 5 Min. durch Kochen denaturiert und dann auf Eis abgekühlt. Der benutzte Hybridisierungspuffer wurde verworfen. In die Hybridisierungstubes wurde 15 µl frischer Hybridisierungspuffer zusammen mit der radioaktiv markierten Probe gegeben.

Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 60°C im Rollerofen. Nach Beendigung der Hybridisierung wurde die Membran 10 Min. mit 2x SSC bei Raumtemperatur und anschließend bei 60°C gereinigt. Anschließend wurde die Membran 10 Min. mit Waschlösung II gereinigt. Die Membran wurde luftgetrocknet, in Folie gelegt und in einer Röntgenkassette verpackt. Die Detektion erfolgte durch Exposition auf Röntgenfilm. Die Filme wurden einige Minuten bis wenige Tage bei -70°C exponiert, entwickelt und anschließend mit OneDScan-Software ausgewertet.

IV. Ergebnisse

IV.1 Methodik

IV.1.1 Polymerase-Kettenreaktion

Obwohl die PCR unter standardisierten Bedingungen erfolgte, war es erforderlich, für jedes Primerpaar das Temperaturoptimum experimentell zu bestimmen. Dies war eine Voraussetzung für die weitere Feinabstimmung der Duplex-PCR und Lumineszenz-Detektion. Diese Methodik ist ein wesentlich sensitiveres Verfahren als der Nachweis von PCR-Produkten mit Ethidium-Bromid-Färbung^[99]. Die Lumineszenz-Methode mit Digoxigenin erlaubt die Detektion von nur 0,1 pg homologer DNA ohne relevanten Hintergrund^[84]. Je sensitiver ein solches Verfahren ist, desto eher können jedoch auch unspezifische Nebenprodukte das Ergebnis überlagern, da auch zunehmend schwächer amplifizierte Fragmente dargestellt werden.

Optimierung der Reaktionsbedingungen

Nachdem als Ausgangspunkt für die Bestimmung der Annealing-Temperaturen zunächst die mit Gleichung 2, Seite 35 ermittelten Werte eingesetzt wurden, konnten die PCR-Reaktionen experimentell optimiert werden. In Tabelle 6 sind die empirisch ermittelten Annealing-Temperaturen für die jeweiligen Primerpaare angegeben.

Primer	Annealing-Temperatur
GAPDH	60°C
ECE-1	65°C
ET-1	60°C
ETAR	65°C
ETBR	60°C

Tabelle 6: Annealing-Temperaturen

PCR mit cDNA und Ethidiumbromid Nachweis

Um einen Mehraufwand an Zeit, Material und Kosten zu vermeiden, die ohne die Kontrollen erst am Ende der Lumineszenz-Detektion nach Durchführung der Duplex-PCR hätten entdeckt werden können, wurde die cDNA-Synthese durch RT-PCR und Agarose Gelelektrophorese mit Nachweis der PCR-Produkte durch Ethidium-Bromid-Färbung kontrolliert. Die Kontrolle der cDNA ist auch notwendig, um einen Rückschluß auf die RNA-Konzentration zu erlauben. Die empirisch ermittelten Reaktionsbedingungen sind in Abbildung 11 dargestellt:

1. Denaturieren:	96 ___ °C / 5 min. _	
2. Annealing:	60 ___ °C / 5' ___	
3. Extension:	72 ___ °C / 1' 30" _	
4. Denaturieren:	96 ___ °C / 45" ___	32 Zyklen
5. Annealing:	60 ___ °C / 45" ___	
6. Extension:	72 ___ °C / 1' ___	
7. Extension:	72 ___ °C / 7' ___	
8. Pause:	4 ___ °C / 48 h ___	
⇒ insgesamt 33 Zyklen		

Abbildung 11: Reaktionsbedingungen für cDNA-Synthese

Die PCR-Ergebnisse wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung ausgewertet (s. Abbildung 12, Laufrichtung immer von Kathode (oben) nach Anode (unten), Längenstandard: 100 bp ladder, GAPDH bei 308 bp sichtbar).

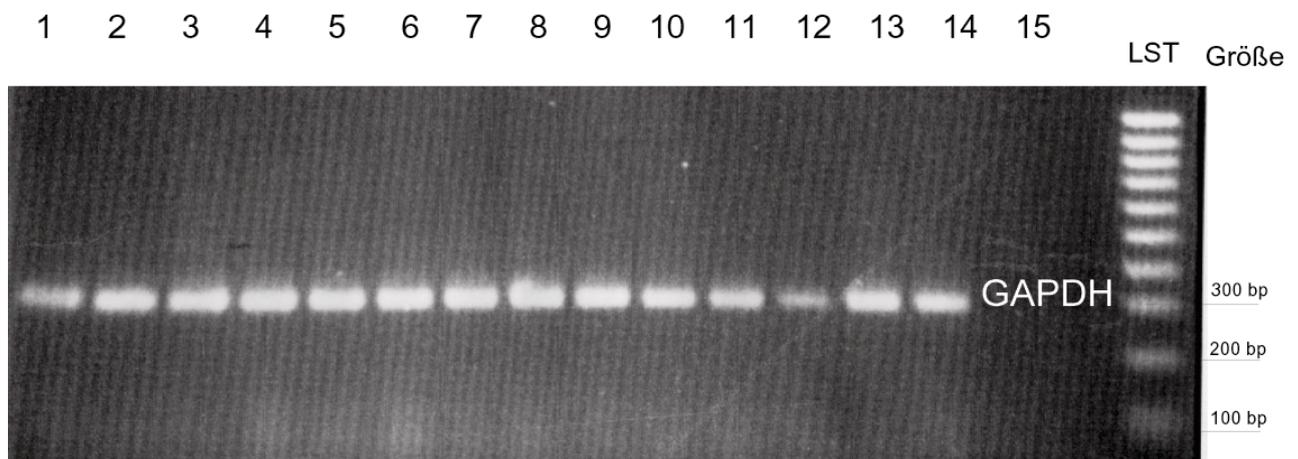


Abbildung 12: cDNA-Synthese, RT-PCR und Ethidiumbromid Nachweis

IV.1.II Semiquantitative Duplex-PCR

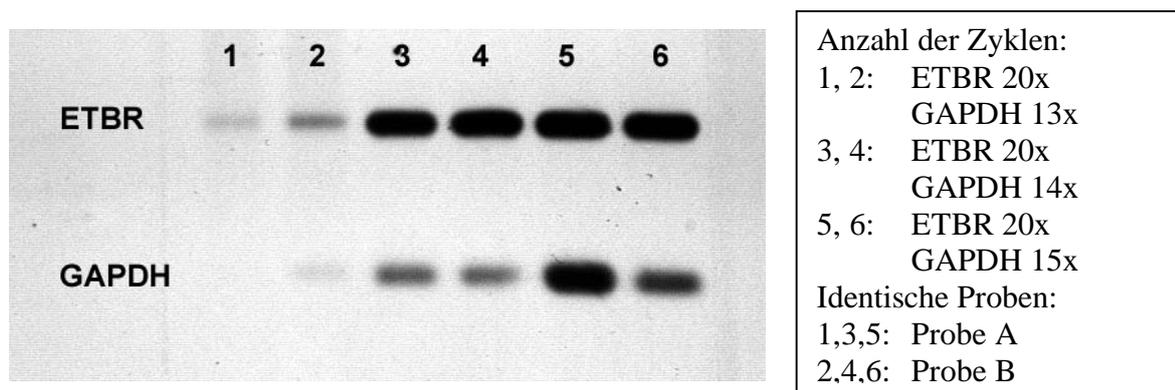


Abbildung 13: Optimieren der Zyklenzahl

Wie bereits in Abschnitt III.5.III (s. Abbildung 7, Seite 27) erläutert, ist es nur in der linearen Phase der RT-PCR möglich, eine semiquantitative Aussage zu treffen, da hier die meßbare Fluoreszenz mit dem Expressionsniveau korreliert. Bei den in dieser Untersuchung etablierten Duplex-PCR-Systemen wurde GAPDH als Housekeeping-Gen mit Genen aus der Endothelinfamilie verglichen. Die Schwierigkeit lag darin, daß GAPDH wesentlich stärker exprimiert wird, als die Gene der Endothelinfamilie. Würde man beide Fragmente bei gleicher Zyklenzahl in einer Duplex-PCR amplifizieren, so wäre die Amplifikationsreaktion für GAPDH bereits in der Plateauphase, während sich das andere Fragment noch unterhalb oder am Rande der Nachweisgrenze befände. Aus diesem Grund war es notwendig, die Kopienzahl des schwächer exprimierten Fragments mittels Voramplifikation anzuheben, damit beide Fragmente im linearen Bereich vorliegen.

Als Beispiel für die empfindliche Balance der Zyklenzahl, die es bei der Voramplifikation auszutarieren galt, sind in Abbildung 13 (Seite 36) die Veränderungen, die bei der Variation um nur einen Voramplifikations-Zyklus entstehen, gezeigt. Man sieht, daß die Intensität der unten abgebildeten Banden (GAPDH) von links nach rechts im Verhältnis zu den oben abgebildeten Banden (ETBR) mit Abnahme der Voramplifikations-Zyklen von ETBR zunimmt. Die hier ermittelte Anzahl von fünf Zyklen wurde für alle weiteren Experimente mit ETBR zur Voramplifikation verwendet.

Ermitteln der Primerkonzentrationen und Annealingtemperaturen

Auch bei der Multiplex-PCR bestimmen die Primereigenschaften und –konzentrationen sowie die Annealing-Temperatur wesentlich die Reaktion^[14]. Die Primerlänge sollte 18-24 bp betragen und der G C-Gehalt zwischen 35% und 60% liegen, um eine Annealing-Temperatur um 58°C zu erhalten und zu erreichen, daß die Schmelzpunkte der Primer beider Templates möglichst nah beieinander liegen. Als Ausgangswert sind äquimolare Primer-Konzentrationen günstig^[67].

In allen Duplex-Systemen konnte die gleiche Primerkonzentration von 25 pM verwendet werden. Eine Veränderung der Konzentrationen ergab keine Verbesserung hinsichtlich der Amplifikation: Eine erhöhte Spezifität hätte sich in der Verminderung des Auftretens unspezifischer Banden, eine erhöhte Sensitivität in einer verbesserten Detektion der jeweiligen Bande gezeigt.

Das Gleiche traf auch auf die zuvor mittels PCR und Ethidium-Bromid Nachweis ermittelten Annealingtemperaturen für die ausgewählten Primer zu.

In Abbildung 14 (Seite 37), ist eine solche Versuchsreihe exemplarisch für das Duplexsystem ET-1 und GAPDH dargestellt. Bei den Proben 1 bis 7 handelt es sich um Gewebe der obstruierten Nieren. Die Obstruktionsdauer ist von links nach rechts zunehmend. Beim Zielgen ET-1 sind deutliche Expressionsunterschiede vorhanden. Es liegt eine nahezu lineare Zunahme der Banden von ET-1 mit zunehmender Obstruktionsdauer vor. Zwar kommt es bei GAPDH zu Schwankungen, diese fallen jedoch im Vergleich mit denjenigen des Zielgens ET-1 geringer aus. Es treten keine unspezifischen Banden auf und keine Bande ist zu stark gesättigt, so daß bei allen Banden eine Analyse der Fluoreszenzdetektion aussagekräftig ist.

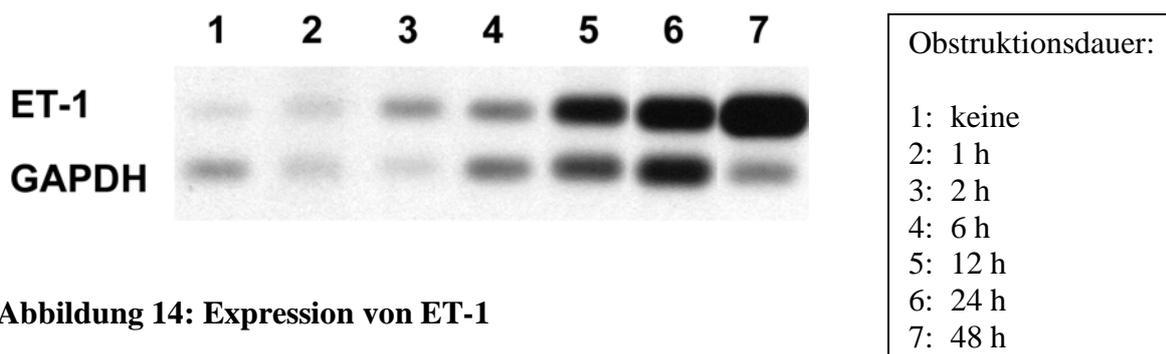


Abbildung 14: Expression von ET-1

Programmschritte der Duplex-PCR

In Abbildung 15 sind die optimierten Protokolle der Duplex-PCR für ECE-1, ET-1, ETAR sowie ETBR zusammengefaßt.

Programmschritt	Temp. / Zeit		ECE-1	ET-1	ETAR	ETBR
1. Denaturieren	96°C / 5'					
2. Annealing	60°C / 5'					
3. Extension	72°C / 1'30"					
4. Denaturieren	96°C / 45"	↻				
5. Annealing	60°C / 45"		4 Schleifen	8 Schleifen	9 Schleifen	4 Schleifen
6. Extension	72°C / 1'					
7. Pause		Zugabe v. 1 µl GAPDH [25pm/µl] in jedes Reaktionsgefäß				
8. Denaturieren	96°C / 45"	↻				
9. Annealing	60°C / 45"		12 Schleifen	13 Schleifen	12 Schleifen	14 Schleifen
10. Extension	72°C / 1'					
11. Extension	72°C / 7'					
12. Pause	4°C					
Zyklen für Primer A	insgesamt:		19 Zyklen	23 Zyklen	24 Zyklen	20 Zyklen
Zyklen für GAPDH	insgesamt:		13 Zyklen	14 Zyklen	13 Zyklen	15 Zyklen

Abbildung 15: Duplex-PCR-Systeme

Alle vier Protokolle beginnen mit einem „Hot Start“, um das Auftreten von unspezifischen Banden zu vermeiden. In den Schritten 4. bis 6. erfolgt die Voramplifikation der spezifischen Primer mit jeweils unterschiedlicher Zyklenzahl. Während der Pause in Schritt 7 wird GAPDH hinzupipettiert. Dann erfolgen in den Schritten 8 bis 10 die weiteren Amplifikationszyklen. Bevor die Proben bei 4°C gekühlt werden, erfolgt in Schritt 11 die letzte Extensionsphase.

Vergleich der Untersuchungen

In Abbildung 16 sind vier Experimente vergleichend untereinander dargestellt. Die Proben in den Slots 1 bis 27 sind bis auf wenige Ausnahmen für alle Experimente dieselben. Es fällt auf, daß die Expression des housekeeping-Gens GAPDH nicht gleichmäßig ausgeprägt ist. Vielmehr treten in jedem Experiment deutliche Unterschiede in der Intensität einzelner Banden auf.

Wenn man allerdings die Experimente untereinander vergleicht, so fällt auf, daß diese Unterschiede nicht zufällig verteilt sind, sondern das gleiche Muster in jeder Reihe wiederkehrt. Dies läßt sich damit erklären, daß für sämtliche Proben dieser Experimente die cDNA aus derselben RT-PCR Synthese stammt; die Gesamtmenge an eingesetzter RNA für die cDNA-Synthese ist trotz exakten Arbeitens nie vollkommen gleich. Es können geringfügige Unterschiede der tatsächlich eingesetzten RNA bei allen vorangehenden Arbeitsschritten, wie z.B. Photometrie, Verdünnung, Pipettieren, entstehen. Da Primer, dNTP's und Taq-Polymerase immer im Überschuß eingesetzt werden, bestimmt der Gehalt an cDNA in den unterschiedlichen Proben die Menge des Reaktionsproduktes für das Housekeeping-Gen, was sich dann entsprechend in der Darstellung der GAPDH-Banden äußert. D.h. wenn wenig cDNA vorhanden ist, steht dementsprechend wenig Template für die Reaktion zur Verfügung, was eine relativ schwache GAPDH-Bande zur Folge hat und umgekehrt.

Entscheidend ist jedoch, daß das Verhältnis innerhalb der Probe zwischen Template A und Template B nicht verschoben ist und so die Aussagekraft als semiquantitative Untersuchungsmethode nicht beeinflußt wird. Vielmehr verdeutlicht dies die hohe Sensitivität der Methodik.

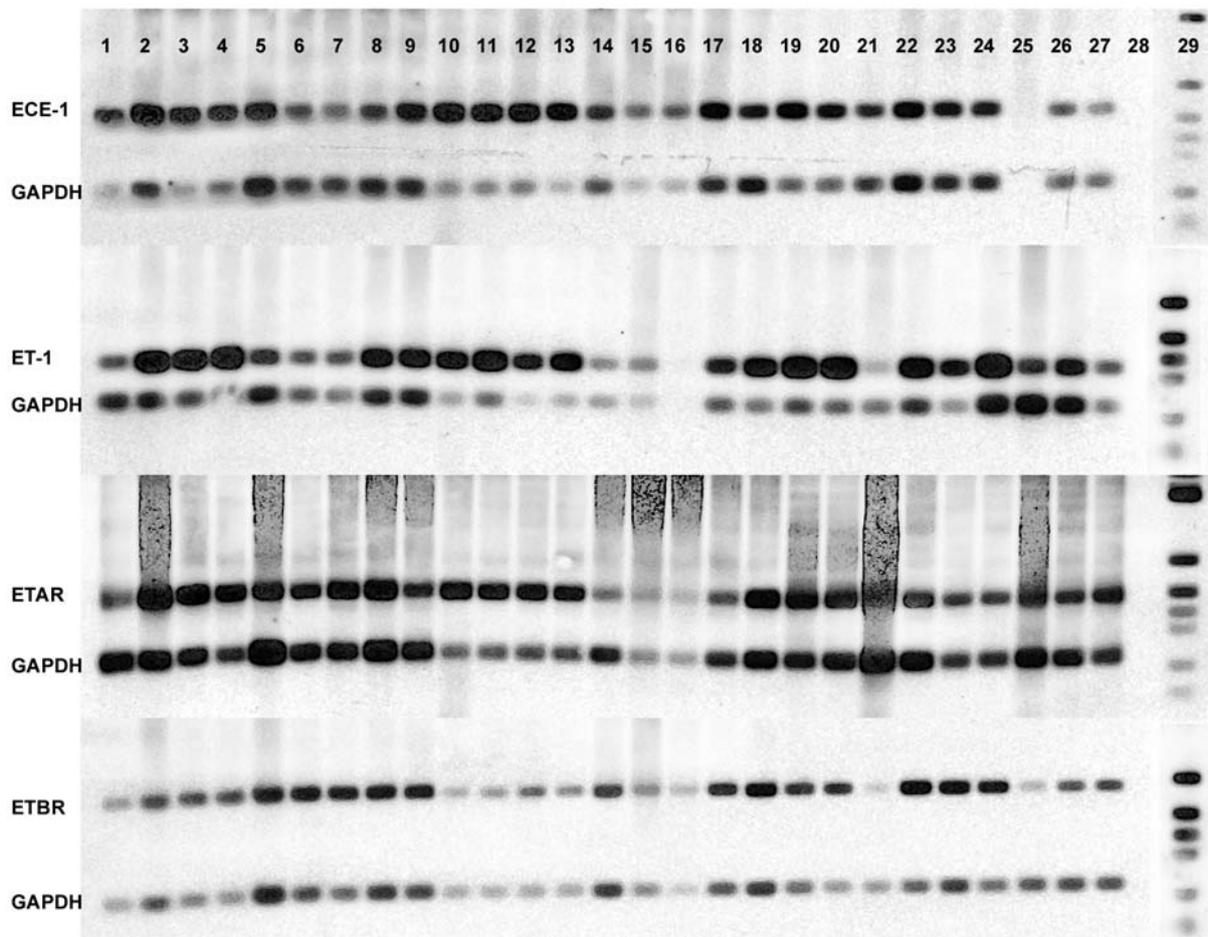


Abbildung 16: Foto von ECE-1, ET-1, ETAR und ETBR

Slots 1 – 27:	Proben aus den unterschiedlichen Experimenten
Slot 28:	Nullprobe
Slot 29:	Dig-Längenstandard VI

Eine Legende der genauen Probenbezeichnungen der Slots 1 bis 27 findet sich in Tabelle 13 (Seite 84) im Anhang.

IV.2 Expression von Faktoren des Endothelinsystems

Es wurde die Expression von vier Faktoren des Endothelinsystems bestimmt; Endothelin-1 (ET-1), Endothelin-Converting-Enzyme (ECE-1), Endothelin A-Rezeptor (ETAR) sowie Endothelin B-Rezeptor (ETBR). Dafür wurden 38 männliche Sprague-Dawley-Ratten, entsprechend 76 Nieren, in zehn Gruppen eingeteilt und nach genau definierten Zeitintervallen vom Zeitpunkt Null bis zu 30 Tagen operiert (s. Tabelle 3, Seite 20), so daß insgesamt 304 Einzelwerte untersucht wurden. Es wurde jeweils der linke Harnleiter während einer Ätherkurznarkose mit einem Seidenfaden ligiert. Damit entspricht das gewählte Modell am ehesten der klinischen Situation eines vollständigen akuten Verschlusses wie es z.B. bei Urolithiasis vorkommen kann. In jeder Gruppe wurde ein Tier als Kontrolle scheinoperiert, um durch den Operationsstreß bedingte Expressionsveränderungen der Endotheline zu

berücksichtigen. Anschließend wurden die Tiere geopfert und die Nieren entnommen. Nach Abpräparieren des Nierenbeckens wurden die Nieren in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Aus dem gewonnenen Material wurde die RNA mit der Trizol-Methode extrahiert und anschließend mittels Reverser Transkription cDNA hergestellt, womit die PCR- und Duplex-PCR-Versuche durchgeführt wurden.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Datenanalyse der untersuchten Faktoren beschrieben. In Abbildung 17 für ECE-1, Abbildung 19 für ET-1, Abbildung 21 für ETAR sowie Abbildung 24 für ETBR ist die zeitliche Kinetik der Expression aller Einzelwerte mit Fehlerbalken aufgetragen.

In Abbildung 18, Abbildung 20, Abbildung 22 sowie Abbildung 23 ist das Verhältnis der Mittelwerte der Expression zwischen obstruierter und nicht obstruierter Niere in Säulenform dargestellt.

Die Tabellen mit den Schätzungen der P-Werte finden sich im Anhang, Abschnitt IX.5. (Seite 82).

IV.2.1 Endothelin-Converting-Enzyme

ECE-1 gilt als das Schrittmacherenzym der Endothelin-1 (ET-1)-Synthese ^[150]. Der Expressionsverlauf ist in Abbildung 17 dargestellt.

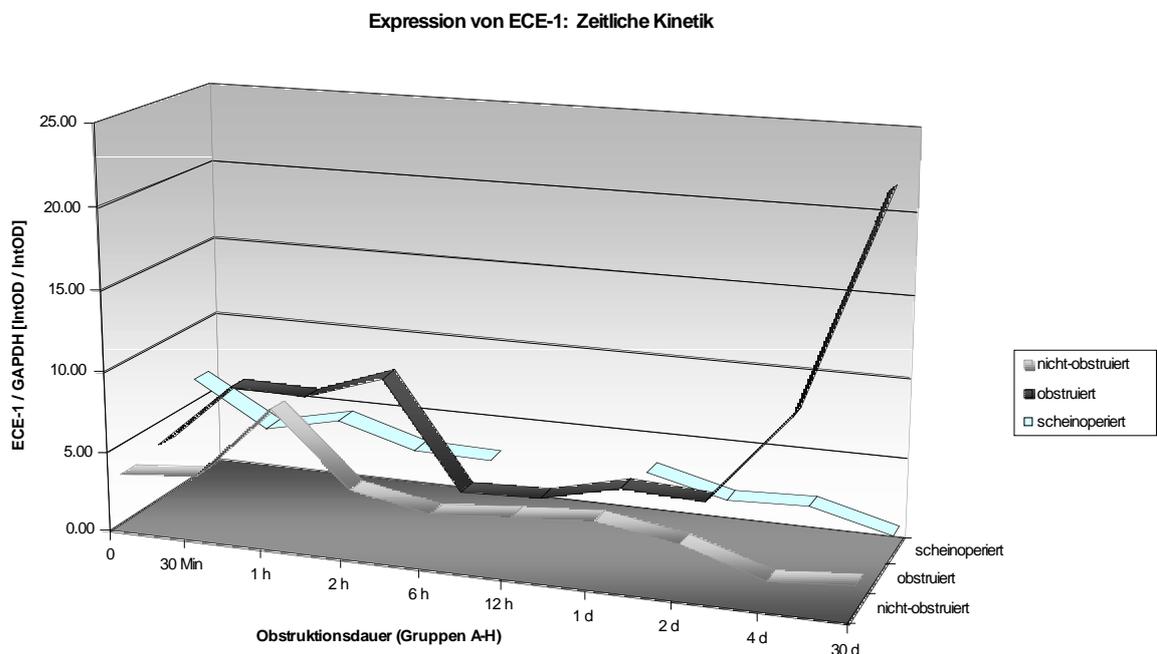


Abbildung 17: Zeitliche Kinetik der Expression von ECE-1

Expressionsverlauf von ECE-1 in der Frühphase:

Ein Anstieg der Expression von ECE-1 der Nieren mit obstruiertem Harnleiter konnte in der Frühphase der UUO zwar statistisch nicht bestätigt werden, jedoch deutet der Kurvenverlauf zumindest darauf hin. So sind die Werte nach einer Obstruktionsdauer von 30 Min., 1 Std. und 2 Std. erhöht. Ebenfalls nicht signifikant ist das Verhältnis der Expression von ECE-1 zwischen obstruierter und nicht obstruierter Niere nach 30 Min. um das zweifache und nach 2 Std. Obstruktionsdauer um das 2,1-fache erhöht (s. Abbildung 18). Dies läßt zumindest die Vermutung zu, daß die Expression von ECE-1 in den Nieren mit obstruiertem Harnleiter auch in der Frühphase ansteigen könnte.

Der Expressionsverlauf der Nieren mit nicht obstruiertem Harnleiter wies keine statistisch signifikanten Schwankungen auf. Es fielen lediglich leicht erhöhte Werte nach einer Stunde Obstruktionsdauer auf.

ECE-1: Verhältnis der Expression von obstruierter zu nicht-obstruierter Niere

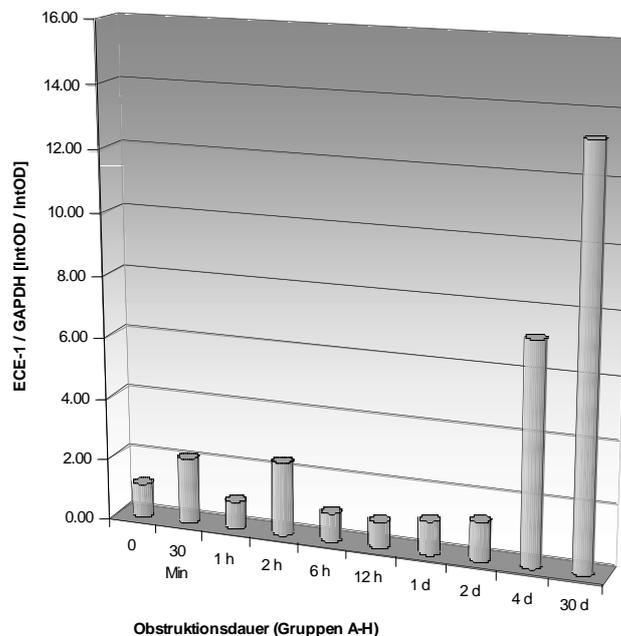


Abbildung 18: Verhältnis der Expression von ECE-1 zwischen obstruierter und nicht-obstruierter Niere

Expressionsverlauf von ECE-1 in der Spätphase:

Es konnte gezeigt werden, daß die Expression von ECE-1 in der Spätphase der UUO (4 Tage Obstruktionsdauer: $p=0,002$; 30 Tage Obstruktionsdauer: $p=0,001$) in den Nieren mit obstruiertem Harnleiter signifikant erhöht ist (s. Abbildung 17).

Das Verhältnis zwischen der ECE-1-Expression von obstruierter zu nicht obstruierter Niere ist in den letzten beiden Gruppen nach einer Obstruktionsdauer von 4 Tagen um das siebenfache, bzw. 30 Tagen um das 13-fache signifikant erhöht (s. Abbildung 18).

Der Expressionsverlauf von ECE-1 der Nieren der scheinoperierten Tiere stellt sich über die Zeit betrachtet als konstant dar. Es sind keine statistisch signifikanten Ausschläge zu beobachten. Die Expression in der Frühphase, nach einer Obstruktionsdauer von 0, 30 und 60 Min., ist geringfügig höher, als die Expression der übrigen Nieren der scheinoperierten Tiere in der Spätphase.

IV.2.II Endothelin-1

Der Expressionsverlauf von ET-1 ist in Abbildung 19 dargestellt.

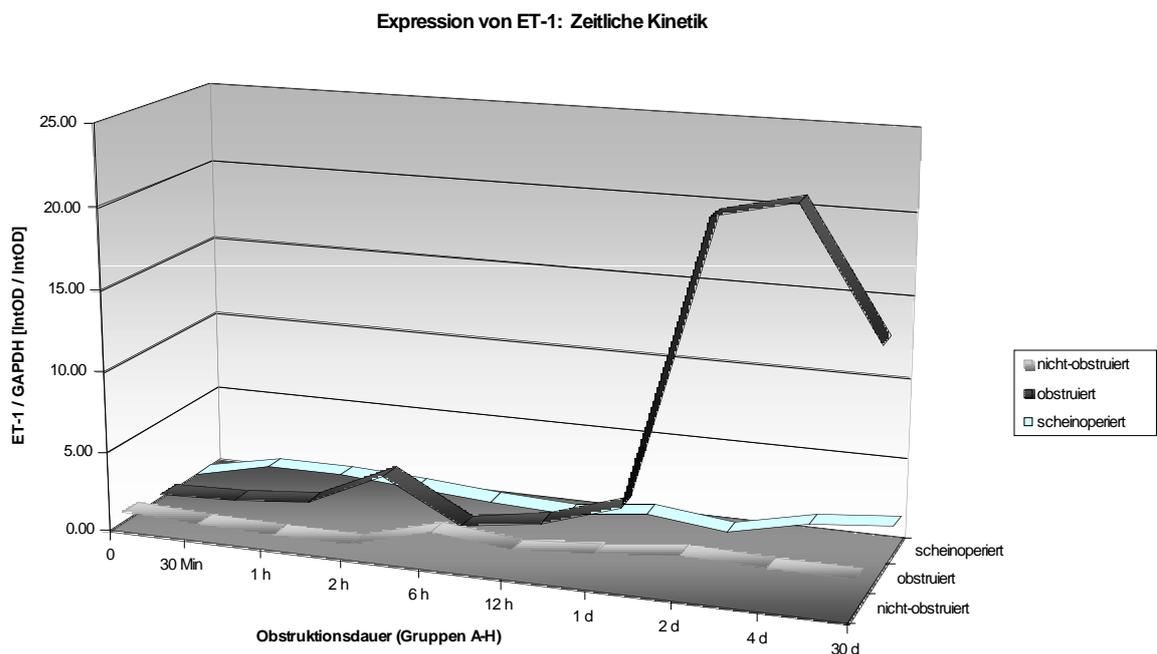


Abbildung 19: Zeitliche Kinetik der Expression von ET-1

Expressionsverlauf von ET-1 in der Frühphase:

Es zeigte sich in der Frühphase der UUO ein erster Anstieg der Expression von ET-1 in der Niere mit obstruiertem Harnleiter, nicht jedoch in der Kontralateralen. Ein Anstieg nach 2 Std. Obstruktionsdauer ($p=0,065$) ist zwar zu vermuten, konnte jedoch in der statistischen Auswertung nicht verifiziert werden.

Im Verhältnis zwischen der Expression von ET-1 von obstruierter zu nicht obstruierter Niere ist der Gipfel nach 2 Stunden gut sichtbar, wobei ein kontinuierlicher Anstieg der Expression von 0 bis 2 Std. erfolgt. Das Verhältnis der Expression von ET-1 von obstruierter zu nicht obstruierter Niere geht dann ab der 6. Std. wieder deutlich zurück.

Der Expressionsverlauf von ET-1 der Nieren mit nicht obstruiertem Harnleiter wies keine statistisch signifikanten Schwankungen auf.

ET-1: Verhältnis der Expression von obstruierter zu nicht-obstruierter Niere

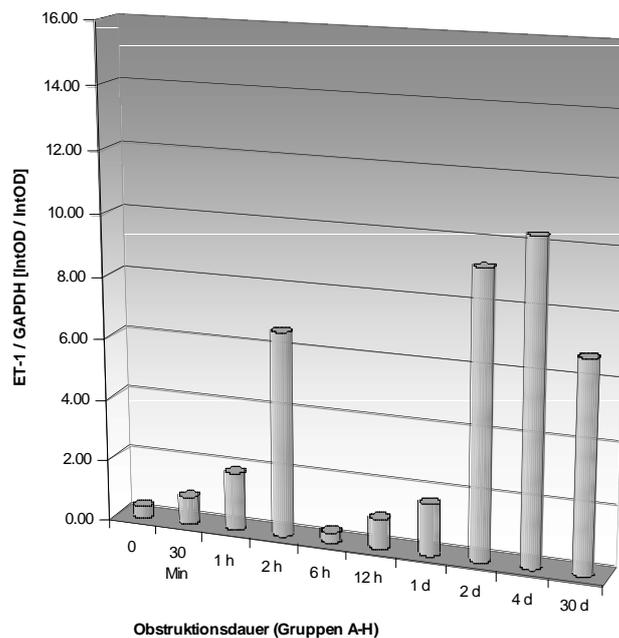


Abbildung 20: Verhältnis der Expression von ET-1 zwischen obstruierter und nicht-obstruierter Niere

Expressionsverlauf von ET-1 in der Spätphase:

Die Expression von ET-1 der Nieren mit obstruiertem Harnleiter in der Spätphase der UUO (2 Tage Obstruktionsdauer: $p=0,002$; 4 Tage Obstruktionsdauer: $p=0,049$; 30 Tage Obstruktionsdauer: $p=0,003$) war signifikant erhöht. Es läßt sich ein Expressionsanstieg von ET-1 mit zunehmender Obstruktionsdauer beobachten; 30 Tage nach Obstruktion scheint die ET-1-Expression allerdings wieder gering rückläufig..

Auch der Vergleich der Expression von ET-1 zwischen obstruierten und nicht obstruierten Nieren bestätigt die Beobachtungen; das Verhältnis ist bei einer Obstruktionsdauer von 2, 4 und 30 Tagen deutlich erhöht (s. Abbildung 20).

Der Expressionsverlauf von ET-1 der Nieren mit nicht obstruiertem Harnleiter wies dagegen keine statistisch signifikanten Schwankungen auf.

Die Meßwerte der scheinoperierten Tiere sind in Früh- und Spätphase der UUO konstant; auch hier ergeben sich keine statistisch signifikanten Auffälligkeiten.

IV.2.III Endothelin A-Rezeptor

Der Expressionsverlauf von ETAR ist in Abbildung 21 dargestellt.

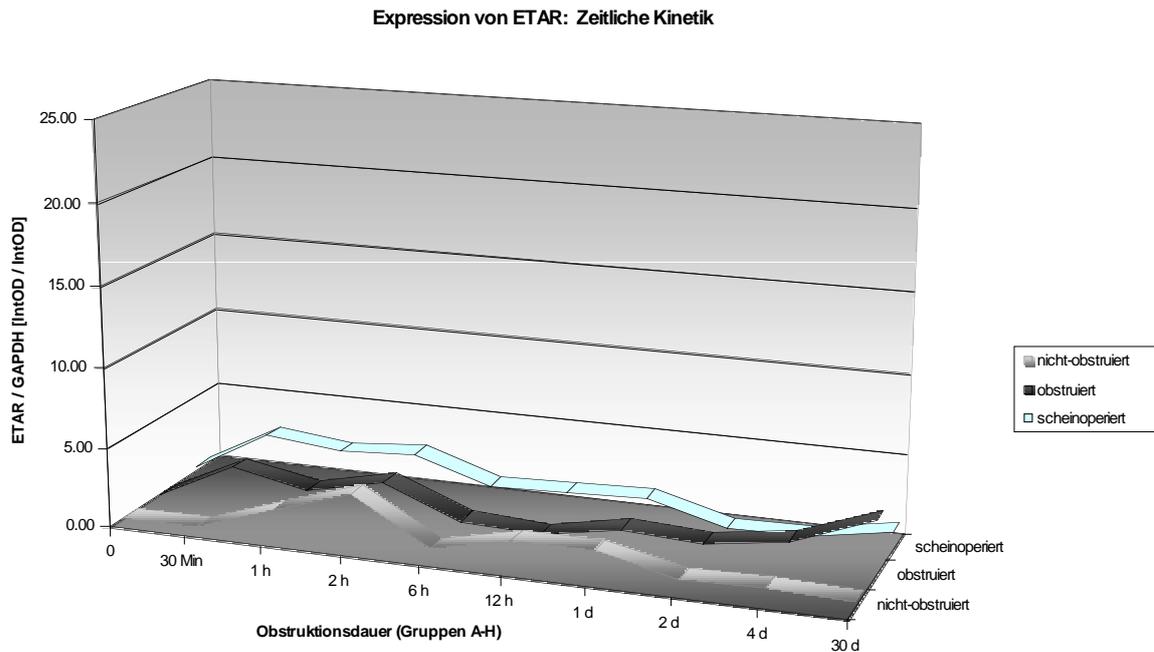


Abbildung 21: Zeitliche Kinetik der Expression von ETAR

Expressionsverlauf von ETAR in der Frühphase:

Bei der statistischen Analyse der Kurvenverläufe für den A-Rezeptor konnte bei der Expression der Nieren mit obstruiertem Harnleiter in der Frühphase eine signifikante Erhöhung für die Obstruktionsdauer von 30 Min. ($p=0,0032$) ermittelt werden. Weiterhin läßt sich bei Obstruktionsdauern von 30 Min., 1 und 2 Std. ein Anstieg aller drei Kurven erkennen (s. Abbildung 21), es handelt sich dabei jedoch um kein statistisch signifikantes Ereignis. Nach 30 Min. Obstruktionsdauer fällt in Abbildung 22 ein Gipfel im Verhältnis der Expression von ETAR zwischen den obstruierten Nieren und den scheinoperierten Kontrollen auf, bei dem dieses auf mehr als das 15-fache ansteigt. Es handelt sich dabei wahrscheinlich um einen Artefakt. Dies erscheint zwar zunächst ungewöhnlich, kann jedoch durch die extrem niedrigen Meßwerte der nicht obstruierten Nieren, nahe der Nulllinie, erklärt werden, da bei der Division durch so kleine Zahlen rasch sehr hohe Werte erreicht werden. Außerdem steigt die Expression der scheinoperierten Tiere sogar noch stärker an, als die der obstruierten Nieren.

Der Expressionsverlauf von ETAR der Nieren mit nicht obstruiertem Harnleiter wies keine statistisch signifikanten Schwankungen auf.

Expressionsverlauf von ETAR in der Spätphase:

Es konnte ein signifikantes Resultat für die Obstruktionsdauer von 30 Tagen ($p<0,001$) bei der Expression von ETAR der Nieren mit obstruiertem Harnleiter gezeigt werden. Außerdem ist zu beobachten, daß das Verhältnis zwischen den obstruierten Nieren und den scheinoperierten Kontrollen ab 12 Stunden Obstruktionsdauer kontinuierlich auf mehr als das 6,5-fache ansteigt (s. Abbildung 22).

ETAR: Verhältnis der Expression von obstruierter zu nicht-obstruierter Niere

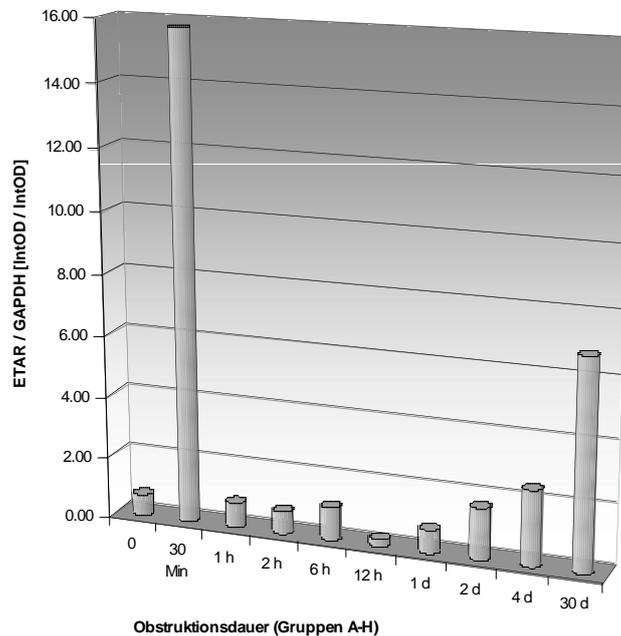


Abbildung 22: Verhältnis der Expression von ETAR zwischen obstruierter und nicht-obstruierter Niere

Für die Frühphase gilt: Es lässt sich, bei Obstruktionsdauern von 30 Min., 1 und 2 Std. in Abbildung 21 ein Anstieg aller drei Kurven erkennen. Nach dieser Zeit sinken die Werte der Expression von ETAR wieder ab, jedoch mit Ausnahme der Kurve der obstruierten Nieren. Diese steigt nach 12 Stunden wieder an und setzt diesen Trend kontinuierlich bis zur Obstruktionsdauer von 30 Tagen fort.

Dieser Anstieg der Expression von ETAR in der Spätphase ist ebenfalls in der Kurve der scheinoperierten Tiere, wenn auch in abgeschwächter Form, zu beobachten. Trotzdem untermauert die Betrachtung des Verhältnisses der Expression von ETAR zwischen den obstruierten Nieren und den scheinoperierten Kontrollen diese Beobachtung, denn auch hier steigt das Verhältnis ab 12 Stunden Obstruktionsdauer kontinuierlich auf mehr als das 6,5-fache an.

Der Expressionsverlauf der Nieren mit nicht obstruiertem Harnleiter wies keine statistisch signifikanten Schwankungen auf.

IV.2. IV Endothelin B-Rezeptor

Im gesamten Zeitraum war die Expression von Endothelin B-Rezeptor (ETBR) konstant und unterlag, verglichen mit den übrigen untersuchten Faktoren, den geringsten Schwankungen. Es traten keine signifikanten Veränderungen der Expression von ETBR auf.

Expressionsverlauf von ETBR in der Frühphase:

Nach 2 Std. und 6 Std. Obstruktionsdauer fällt das bis auf mehr als das 3-fache erhöhte Verhältnis der Expression von ETBR zwischen obstruierter Niere und der Kontrolle auf (s. Abbildung 23).

ETBR: Verhältnis der Expression von obstruierter zu nicht-obstruierter Niere

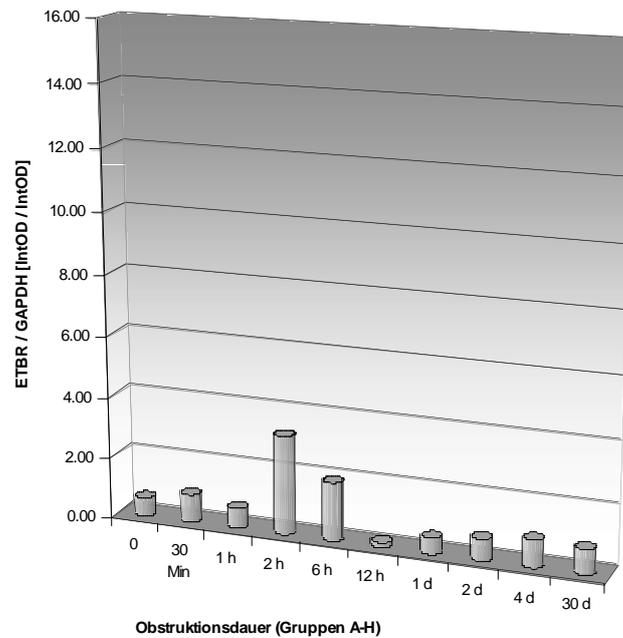


Abbildung 23: Verhältnis der Expression von ETBR zwischen obstruierter und nicht-obstruierter Niere

Es konnte jedoch weder ein signifikantes Resultat bei der Endothelin-B-Rezeptor-Expression der Nieren mit obstruiertem Harnleiter, noch bei der Expression des ETBR der Nieren ohne obstruierten Harnleiter gezeigt werden. Der Expressionsverlauf ist in Abbildung 24 dargestellt.

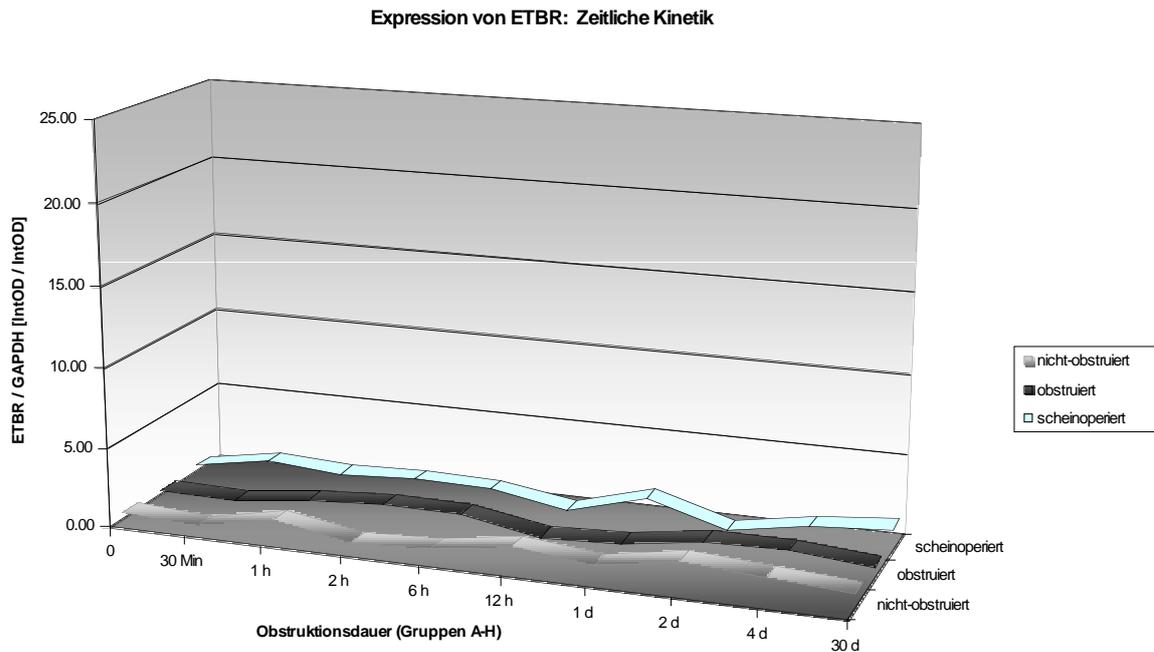


Abbildung 24: Zeitliche Kinetik der Expression von ETBR

Expressionsverlauf von ETBR in der Spätphase:

Bei der Betrachtung des Verhältnisses der Expression von ETBR zwischen den obstruierten Nieren und den scheinoperierten Kontrollen ist ein Einschnitt zum Zeitpunkt 12 Std. Obstruktionsdauer sowie ein erneuter moderater Anstieg in den darauf folgenden Gruppen gut dargestellt (s. Abbildung 23).

Die Meßwerte weisen insgesamt trotz scheinbar hoher Variabilität die geringste Schwankungsbreite auf (sie liegen zwischen 0 und 2), weshalb der Verlauf aller drei Kurven insgesamt als konstant zu bezeichnen ist. Trotzdem sieht man in Abbildung 24, wie ein gewisser Anstieg zwischen der Obstruktionsdauer von 0 und 30 Min. erfolgt und es läßt sich ebenfalls ein Einschnitt nach 12 Stunden beobachten. In dieser Gruppe fallen die Werte aller drei Kurven erneut in den Ausgangsbereich zurück, um dann im weiteren Verlauf wieder anzusteigen.

Bei dem Expressionsverlauf der Nieren der scheinoperierten Tiere ergaben sich in keiner Gruppe statistisch signifikante Besonderheiten.

IV.3 Northern Blot

Zur Validierung der RT-PCR wurde die Northern Blot Technik verwendet. Dazu wurden Sonden für GAPDH (2039bp für mRNA), ET-1 (1385 bp) sowie ECE-1 (385 bp) wie oben beschrieben (Seite 32), hergestellt. Es wurden insgesamt 21 Proben analysiert; diese wurden in drei Gruppen unterteilt: je sieben Proben von obstruierten Nieren, von nicht obstruierten Nieren sowie von scheinoperierten Kontrollen. Die Obstruktionszeiten jeweils einer Probe

aus diesen drei Gruppen waren 0 Min., 2 Std., 12 Std., 1 Tag, 2 Tage, 4 Tage und 30 Tage. Der Nachweis erfolgte wie oben (Abschnitt III.10.IV, Seite 46) beschrieben durch radioaktive Detektion.

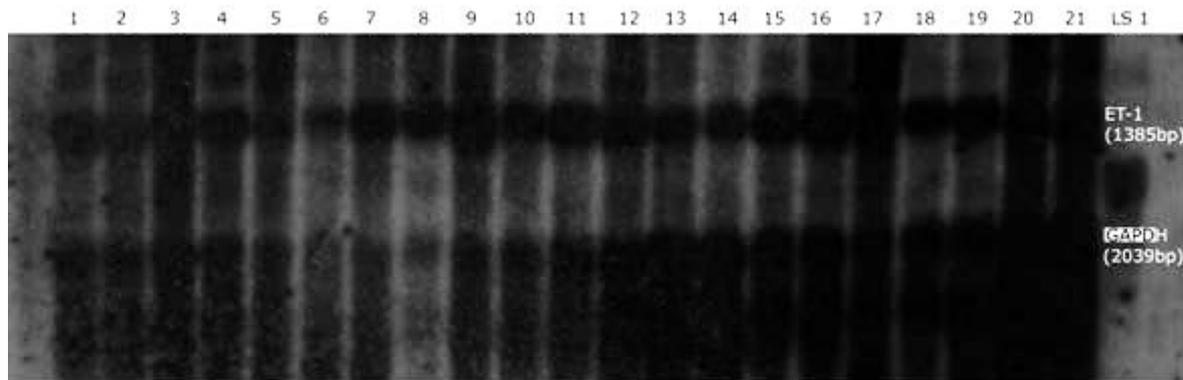


Abbildung 25: Northern Blot mit ET-1 und GAPDH

Obstruktionszeit	Obstruiert	Nicht Obstruiert	Scheinoperiert
0 Min.	1	8	15
2 Std.	2	9	16
12 Std.	3	10	17
1 Tag	4	11	18
2 Tage	5	12	19
4 Tage	6	13	20
30 Tage	7	14	21

Tabelle 7: Probennummern des Northern Blot

In Abbildung 25 ist das Foto der radioaktiven Detektion auf Röntgenfilm des Northern Blots zu sehen, mit Tabelle 7 als Legende für die eingesetzten Proben.

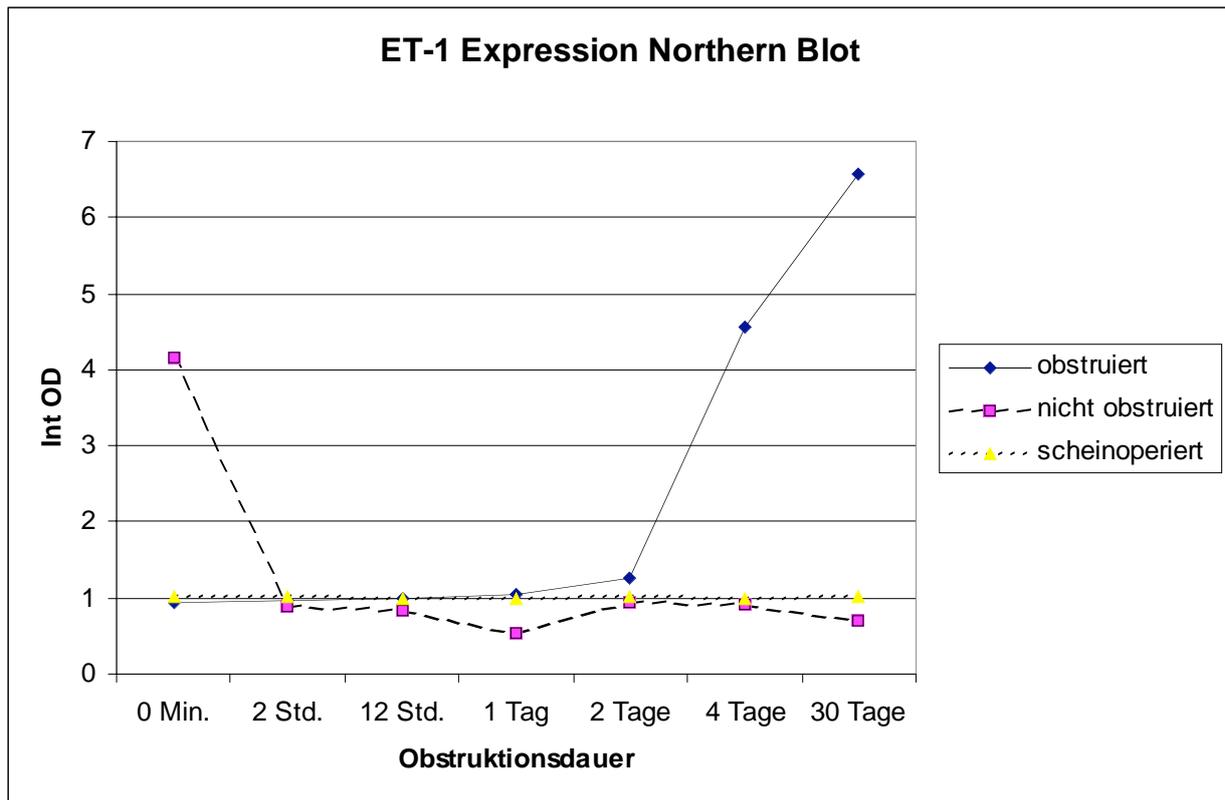


Abbildung 26: ET-1 Expression Northern Blot

Die Ergebnisse des Northern Blots stimmen mit denen der RT-PCR überein. Abbildung 26 zeigt das Expressionsniveau für ET-1. In der Spätphase der Obstruktion ist das Expressionsniveau von ET-1 der obstruierten Nieren nach 4 Tagen Obstruktionsdauer um das 4,6-fache und nach 30 Tagen um das 6,6-fache erhöht.

Das Expressionsniveau der nicht obstruierten Nieren sowie der scheinoperierten Tiere ist konstant.

Dieses Ergebnis bestätigt die vorangegangenen Untersuchungen qualitativ, obwohl quantitativ geringe Unterschiede vorhanden sind.

In der Frühphase der Obstruktion fällt ein Anstieg um das 4,2-fache im Expressionsniveau der nicht obstruierten Nieren bei 0 Min. Obstruktionsdauer auf. Es handelt sich dabei jedoch nur um den Wert eines einzelnen Tieres und würde bei der Messung mehrerer Tiere wahrscheinlich herausgemittelt werden.

V. Diskussion

Die unilaterale ureterale Obstruktion (UO) ist ein häufiges klinisches Problem. Es ist bekannt, daß UO aufgrund von Ischämie zu einem verminderten renalen Blutfluß und Gewebeuntergang in der obstruierten Niere führt. Dieser Zustand wird durch erhöhte Perfusion sowie trophische Veränderungen in der kontralateralen Niere teilweise kompensiert. Bei diesen Veränderungen spielen die Effekte vaskulärer Mediatoren eine zentrale Rolle. Von diesen Botenstoffen wiederum ist Endothelin der potenteste bekannte Vasokonstriktor [66].

Es ist wenig über die Rolle des Endothelinsystems bekannt, obwohl Faktoren des Endothelinsystems auf molekularer Ebene an der UO beteiligt sein könnten. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression von verschiedenen Faktoren des Endothelinsystems bei UO im Rattenmodell untersucht:

Die zentralen Akteure des Endothelinsystems sind Endothelin-Converting-Enzyme (ECE-1), Endothelin-1 (ET-1), Endothelin A-Rezeptor (ETAR) sowie Endothelin B-Rezeptor (ETBR). ECE-1 ist das Schrittmacherenzym bei der Synthese von ET-1 durch Spaltung von Big ET-1 [150]. Von den drei beim Menschen bekannten Vertretern der Endothelin-Peptidhormone ist ET-1 der stärkste bekannte Vasokonstriktor [1] und wird in der Niere exprimiert [105]. ET-1 bindet sowohl an den A-Rezeptor, als auch an den B-Rezeptor, wobei es entweder zur Vasokonstriktion oder zur Vasodilatation kommen kann. Die Vasodilatation wird durch Synthese von NO über den B-Rezeptor vermittelt [70]. Die Vasokonstriktion kann sowohl durch ETAR als auch durch ETBR vermittelt werden [125]. Die ETAR-vermittelte Vasokonstriktion gilt als klassischer Effekt von ET-1, weil darüber der physiologisch meßbare Haupteffekt vermittelt wird [60].

Aufgrund dieser Eigenschaften wurden die genannten Faktoren für die Untersuchungen ausgewählt. Es existieren zwar weitere Faktoren des Endothelinsystems, wie z.B. Endothelin-2 und Endothelin-3, bei denen jedoch bislang nur deutlich geringer ausgeprägte physiologische Effekte sowohl im kardiovaskulären System, als auch bei der renalen Homöostase beobachtet wurden.

Es war das Ziel dieser Arbeit, eine zeitliche Kinetik dieser vier Faktoren über die beobachtete Obstruktionsdauer von 30 Tagen zu analysieren, um so weitere Einblicke in das biphasische Modell der UO [153] und die Rolle der Endotheline gewinnen zu können. Eine Beteiligung des Endothelinsystems an der Entwicklung bzw. dem Unterhalten renoparenchymatöser Erkrankungen mit ischämischer pathophysiologischer Komponente wird vermutet [48,83,90].

Die Diskussion gliedert sich in zwei Teile; der methodische Teil umfaßt die Etablierung der Nachweissysteme, wobei näher auf die methodischen Aspekte des Nachweisverfahrens eingegangen wird. Im zweiten Teil wird die Rolle der Endotheline bei UO diskutiert.

V.1 Methodischer Teil

V.1.1 Polymerase-Kettenreaktion

Einflußgrößen der Multiplex-PCR [31,67,143]

Für jeden der untersuchten Faktoren mußte ein eigenes Duplex-PCR System gefunden werden, da schon kleine Veränderungen der beteiligten Reaktionsprodukte das Ergebnis der Amplifikation entscheidend verändern können^[77,117,118]. Dazu zählen in erster Linie:

1. Eigenschaften der PCR-Programmschritte:
 - a. Zyklen-Anzahl
 - b. Annealingtemperatur und Dauer
 - c. Variation des 1. Denaturierens und der letzten Extension
 - d. Extensionstemperatur und Dauer
2. Primer-Eigenschaften
3. Primer-Konzentrationen
4. Hot-Start der PCR
5. Pufferkonzentration
6. Zugabe von Adjuvantien (z.B. DMSO, Formamid)

Um die genannten Punkte untereinander abzustimmen und reproduzierbare Systeme zu etablieren, waren zahlreiche Versuche notwendig. Henegariu et al.^[67] haben 1997 dazu ein Step-by-Step Protokoll entwickelt, welches insbesondere zu Beginn der Experimente hilfreich ist, Fehlerquellen zu eliminieren und Versuchsbedingungen zu optimieren. Eine systematische Vorgehensweise zur Fehleranalyse war für diese Arbeit von entscheidender Bedeutung, da ein Großteil des experimentellen Arbeitsaufwandes auf das Etablieren der verschiedenen Duplex-PCR-Systeme entfiel. Es soll nun kurz auf die praktische Bedeutung der genannten Punkte eingegangen werden.

1. Fehlerquellen bei der cDNA-Synthese

In Abbildung 27 ist der Ethidium-Bromid Nachweis einer der ersten PCR-Experimente zur Kontrolle der cDNA-Synthese dargestellt. Bei dem PCR-Produkt handelt es sich um GAPDH (308 bp), der Längenstandard ist 100 bp ladder (LST).

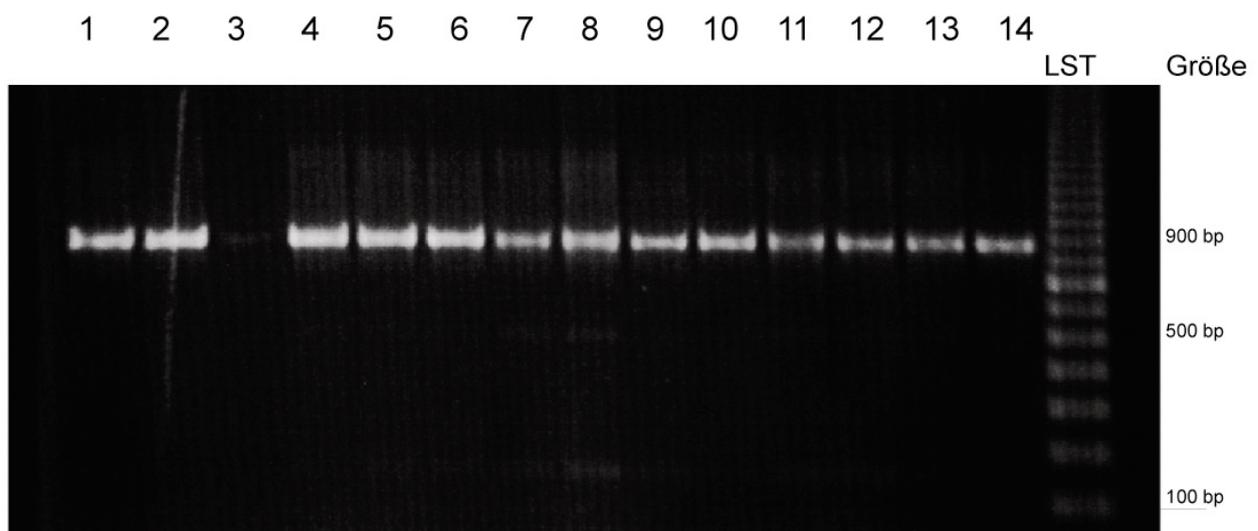


Abbildung 27: cDNA-Synthese mit Nebenreaktionsprodukten, GAPDH-Primer

Die Banden stellten sich jedoch nicht an der erwarteten Stelle bei 308 bp dar, sondern im Bereich von 900-1000 bp. Dabei handelt es sich um Amplifikationsprodukte von DNA.

Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde ein Vergleich auf Homologie von Wurmgenom über NCBI-Datenbanken vorgenommen, da zu diesem Zeitpunkt noch keine Sequenzdaten des Rattengenoms vorlagen. Die Untersuchung ergab, daß sich 62 bp downstream des Antisense Primers ein Intron befindet. Introns sind inaktive Abschnitte des Genoms, welche nur in DNA vorkommen und bei denen im Unterschied zu Exons keine Translation in RNA erfolgt.

Bei der RT-PCR geschieht die cDNA-Synthese durch Reverse Transkription der mRNA, welche ausschließlich Exons enthält. DNA wird bei der RT nicht amplifiziert, da diese kein Poly-A aufweist. Eine Poly-A-Sequenz befindet sich am 3'-Ende der mRNA, nicht aber in genomischer DNA. Diese Sequenz ist jedoch notwendig, um die cDNA-Synthese durch die Polymerase zu initiieren. Somit war bereits die RNA durch genomische DNA verunreinigt. Die cDNA-Synthese wurde wiederholt, erneut kontrolliert und konnte dann für die weiteren Experimente verwendet werden (s. Abbildung 12, Seite 35).

2. Anzahl der Zyklen

Die Anzahl der Zyklen sollte 30 Schritte nicht überschreiten, damit die Probe in ausreichender Kopienzahl amplifiziert wird, ohne daß unspezifische Banden auftreten, was mit zunehmender Zyklenzahl wahrscheinlicher wird^[67]. Außerdem kann es bei der Duplex-PCR erforderlich sein, eine Probe mehrere Zyklen lang vor Zugabe des zweiten Primerpaares zu amplifizieren, wenn ein sehr starkes Mißverhältnis zwischen den Ausgangsmengen der beiden Proben besteht. Befindet sich die PCR in einem linearen Bereich d.h., es liegt noch keine Sättigung vor und alle Reaktionsprodukte befinden sich im Überschuß, so verschiebt sich durch die Voramplifikation der einen Probe lediglich die gedachte Position im logarithmisch-linearen Bereich beider Reaktionsprodukte (s. Abbildung 7, Seite 27). Das Verhältnis zwischen den beiden Proben verändert sich jedoch kaum, so daß weiterhin eine semiquantitative Aussage getroffen werden kann. „Linear“ bezieht sich in diesem Zusammenhang auf eine logarithmische Darstellung der Reaktion, bei der aber eine exponentielle Amplifikation erfolgt (s. Abbildung 7, Seite 27).

Die Methodik selbst erwies sich als ein sehr sensibles und zuverlässiges Verfahren zur Detektion von mRNA der untersuchten Endotheline und Rezeptoren. Wie sich herausstellte, werden alle untersuchten Genprodukte in wesentlich geringerem Maße als das Housekeeping-Gen GAPDH exprimiert, so daß in allen Fällen eine Voramplifikation des Ziel-Gens notwendig war. Die experimentellen Bedingungen mußten für jeden einzelnen Faktor optimiert werden. Dies lag hauptsächlich an der Empfindlichkeit der Methodik gegenüber einer Reihe von Einflußfaktoren; schon minimale Veränderungen des Versuchsaufbaus führten dazu, daß sich die Ergebnisse nicht reproduzieren ließen. So reichte es bereits aus, die Zyklenzahl eines Fragmentes um nur wenige Schritte zu verändern, um den logarithmisch-linearen Bereich beider Fragmente zu verlassen. Dies hatte zur Folge, daß keine semiquantitative Aussage mehr getroffen werden konnte und der Versuch wiederholt werden mußte (s. dazu Abbildung 13, Seite 36).

3. Primer und Annealing

Bercovich et al. haben 1999 ein in diesem Zusammenhang relevantes Phänomen der Duplex-PCR beschrieben; sie beobachteten, daß die Quantität zweier PCR-Produkte unterschiedlicher Gene, welche zeitgleich in einer Duplex-PCR amplifiziert werden, für ein Gen signifikant geringer ausfällt, als bei getrennter Amplifikation der beiden Gene unter identischen PCR-Bedingungen. Hierfür wurden verschiedene Einflußgrößen untersucht und es stellte sich heraus, daß die Primerkonzentration den größten Effekt auf das Ergebnis der Amplifikation hatte^[14]. Alternativ zur Voramplifikation empfehlen Bercovich et al. die Vorverdünnung eines der Primer und zwar ein Mengenverhältnis der Primerkonzentrationen von 4 : 1 zugunsten des schwächer exprimierten Templates.

Henegariu et al.^[67] empfehlen ebenfalls die Verwendung von unterschiedlichen Primerkonzentrationen, was dazu führt, daß das schwächer exprimierte Template vor allem zu Beginn der Reaktion begünstigt wird. Außerdem erwies sich das exakte Ermitteln der Annealingtemperatur ebenfalls als entscheidend. Es zeigte sich, daß schon der Temperaturunterschied von 1 °C unspezifische Banden hervorbrachte (s. Tabelle 6, Seite 34).

In dieser Arbeit wurde durch Voramplifikation des schwächer exprimierten Gens für die verschiedenen Duplex-PCR-Systeme die Kopienzahl eines der Ausgangsprodukte erhöht. Es stellte sich heraus, daß das Housekeeping-Gen GAPDH stets stärker exprimiert war, als ECE-1, ET-1, ETAR und ETBR, da immer die letztgenannten Faktoren voramplifiziert werden mußten und niemals GAPDH (s. Abbildung 15, Seite 37).

Dies bestätigt einerseits die Beobachtung, daß das Housekeeping-Gen GAPDH stärker exprimiert ist, als die Gene der untersuchten Faktoren des Endothelinsystems. Andererseits weisen die Untersuchungen von Bercovich et al. darauf hin, daß durch Voramplifikation, resp. Variation der Primerkonzentration keine Verfälschung des Ergebnisses vorliegt, sondern im Gegenteil die Amplifikation der einzelnen Templates bei der Duplex-PCR denjenigen von PCR mit Amplifikation nur eines Templates besser entspricht.

4. weitere Reaktionsbedingungen

Um das Auftreten von unspezifischen Banden zu reduzieren, lassen sich Adjuvantien wie z.B. DMSO (Dimethylsulfoxid, 2-10%)^[111], Betain^[68] oder Formamid (1%)^[122] verwenden. Adjuvantien können die Spezifität der PCR erhöhen^[122], in zu hoher Konzentration aber auch einen negativen Effekt auf die Amplifikation durch Inhibition der Taq-Polymerase ausüben. Deshalb wird empfohlen, Additiva nur dann einzusetzen, wenn sich die PCR auf anderem Wege nicht weiter optimieren läßt^[67].

Außerdem kann ein „Hot-Start“ der PCR durchgeführt werden, um eine vollständige Denaturierung der initial langen DNA-Kette zu erreichen. Hierzu wird die Probe zunächst bei 96°C samt Mastermix denaturiert. Nach 5 Min. erfolgt dann die Zugabe von Taq-Polymerase (s. Abbildung 15: Duplex-PCR-Systeme, Seite 37). In ersten Versuchen wurde auf den „Hot-Start“ der PCR verzichtet, was zum Nachweis von unspezifischen Banden führte. Da ohne „Hot-Start“ stets unspezifische Banden auftraten, wurde dieses Verfahren bei allen weiteren Protokollen angewendet.

Zusätzlich kann der letzte Extensionsschritt ebenfalls verlängert werden, um so noch unvollständig elongierte Templates zu komplettieren. Schließlich kann es auch vorteilhaft sein, die Pufferkonzentration bei einer Multiplex-PCR zu verändern (0,8x bis 2,4x). Henegariu et al. führen die stark erhöhte Effizienz (Sensitivität) der Amplifikation auf die erhöhte KCl-Konzentration zurück, da KCl im Puffer enthalten ist und die alleinige Erhöhung der KCl-Konzentration den gleichen Effekt hatte^[67].

In den hier durchgeführten Versuchen zeigte sich, daß das Verwenden von DMSO oder 1% Formamid keine wesentlichen Verbesserungen der Qualität der Ergebnisse lieferte. Es traten weder weniger unspezifische Banden auf, noch konnte ein Einfluß auf die Zyklenzahl der Voramplifikation beobachtet werden, so daß auf das Verwenden von Adjuvantien verzichtet wurde.

Von den unterschiedlichen Einflußgrößen auf die Duplex-PCR-Systeme für ECE-1, ET-1, ETAR sowie ETBR, stellte sich die Optimierung des Verhältnisses der Kopienzahl beider Fragmente als entscheidend heraus, da es mit dem Verhältnis des Expressionsniveaus beider Genprodukte auf mRNA-Ebene korreliert. Dieses Problem wurde dadurch gelöst, daß das schwächer exprimierte Template einige Zyklen voramplifiziert wurde, ehe der Primer des stärker exprimierten Templates (hier in allen Fällen das Housekeeping-Gen GAPDH) hinzugegeben wurde.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß das Verfahren der semiquantitativen Duplex-PCR zum Nachweis der untersuchten Faktoren sehr gut geeignet und verläßlich reproduzierbar ist, sobald das jeweilige System etabliert ist. Außerdem verfügt die semiquantitative Duplex-PCR über eine höhere Sensitivität und Spezifität, als Northern-Blot Verfahren^[50].

V.1.II Validierung der RT-PCR mit Northern-Blot

Die mit RT-PCR durchgeführten Experimente sollten mit einer anderen Methode validiert werden, obwohl die eingesetzte RT-PCR Technik ein etabliertes und gut dokumentiertes Standardverfahren ist. Der Northern Blot ist hierfür ein geeignetes Verfahren^[121]. Es wurde diese Methodik des RNA-Nachweises ausgewählt, da sie einfach durchzuführen ist und ohnehin große RNA-Mengen vorhanden waren. Deshalb bot es sich an, die Technik des Northern-Blots zu verwenden, da hierbei ebenfalls Gelelektrophorese und ähnliche Transfertechniken zum Einsatz kamen. Ein weiterer Vorteil war die Material- und Zeitersparnis aufgrund vieler gemeinsamer Arbeitsschritte mit der RT-PCR. Außerdem sind die verwendeten Materialien sowie die Abläufe zur Durchführung der Gelelektrophorese sowie der Transfertechniken sehr ähnlich.

Dazu wurden insgesamt 21 Proben aus drei Gruppen ausgewählt: je sieben Proben von obstruierten Nieren, von nicht obstruierten Nieren sowie von scheinoperierten Kontrollen. In Abbildung 26 (Seite 49) ist das mit Northern-Blot ermittelte Expressionsniveau für ET-1 wiedergegeben.

Es konnte gezeigt werden, daß die Ergebnisse des Northern Blots mit denen der RT-PCR qualitativ übereinstimmen, obwohl quantitativ geringe Unterschiede vorhanden sind. Die quantitative Aussage des Northern-Blots ist allerdings eingeschränkt, da einerseits nicht alle Gruppen untersucht und andererseits nur wenige Proben gemessen wurden.

So wurde zu jedem Zeitpunkt nur jeweils eine Probe gemessen und nicht im Mittel vier, wie bei der Fluoreszenzdetektion der Multiplex-PCR. Somit ist keine statistische Aussage möglich, da zu wenige Meßwerte vorhanden sind. Das Auftreten eines um das 4,2-fache erhöhten Wertes der nicht-obstruierten Nieren bei 0 Min. nach Obstruktion verdeutlicht diese Probleme. Erst nach Untersuchung weiterer Proben würde sich dieser Artefakt herausmitteln.

Außerdem wurden nicht alle Gruppen untersucht; es fehlen Meßwerte nach 30 Min., 1 Std. und 6 Std. Obstruktionsdauer. Der Kurvenverlauf der Frühphase der Obstruktion ist daher für diese Methodik nicht genau genug dokumentiert. Insbesondere in der Frühphase werden zusätzliche Meßwerte benötigt, da die mittels RT-PCR gemessene signifikante Veränderung

von ETAR der obstruierten Niere in der Frühphase im Kurvenverlauf, verglichen mit den starken Schwankungen in der Spätphase, deutlich geringer ausfällt. Ansonsten bestätigt der Kurvenverlauf in der Frühphase mit den insgesamt niedrigeren Meßwerten als in der Spätphase die Ergebnisse aus der RT-PCR.

Bei beiden Methoden wurde ein Anstieg des Expressionsniveaus der obstruierten Nieren von ET-1 in der Spätphase der UUO sowohl nach 4 Tagen, als auch nach 30 Tagen gemessen. Das Expressionsniveau der nicht obstruierten Nieren sowie der scheinoperierten Tiere blieb dabei konstant.

V.2 Rolle der Endotheline bei UUO

Die postrenale Obstruktion der Niere ist der häufigste pathologische Zustand des Urogenitalsystems. Die klinische Bedeutung besteht in dem Funktionsverlust der betroffenen Niere, welcher einer zeitlichen Kinetik folgt. Diese unterteilt man in verschiedene Phasen, wobei im Weiteren auf ein biphasisches Modell bezug genommen wird, bei dem die Obstruktion in eine Früh- und Spätphase aufgeteilt wird^[106,114].

In der Frühphase des biphasischen Modells (bis 5 Std. Obstruktionsdauer) ist der ureterale Druck hoch, wobei der RBF aufgrund zunehmender Vasokonstriktion des Vas efferens abfällt. In der Spätphase kommt es dann durch anhaltende Obstruktion zu Ischämie mit der Folge eines renalen Funktionsverlustes. Dieser ist anfänglich reversibel und durch die Abnahme des renalen Blutflusses (RBF) sowie der glomerulären Filtrationsrate (GFR) bedingt. Bei anhaltender Ischämie kommt es dann zu morphologischen Veränderungen im Sinne eines Untergangs von Nephronen; dies manifestiert sich klinisch in einer irreversiblen Niereninsuffizienz. Der renale Funktionsverlust ist um so ausgeprägter, je länger die Obstruktion andauert. Außerdem steigt mit zunehmender Obstruktionsdauer die Wahrscheinlichkeit, daß ein irreversibler Schaden gesetzt wurde^[73].

Um die Rolle der Endotheline bei postrenaler Obstruktion auf molekularer Ebene in ihrer zeitlichen Kinetik zu charakterisieren, wurde die Expression der mRNA verschiedener Faktoren des Endothelinsystems, nämlich ECE-1, ET-1, ETAR sowie ETBR, mittels semiquantitativer PCR sowie Northern-Blot untersucht.

Die vorliegende Arbeit unterscheidet sich von bisher durchgeführten Studien u.a. durch folgende Eigenschaften;

- Die Untersuchung erstreckt sich über einen langen Zeitraum von den ersten 30 Minuten bis hin zu 30 Tagen nach Beginn der UUO.
- Es wurde ein standardisiertes Rattenmodell verwendet; dabei wurden von jedem Zeitpunkt mindestens zwei Tiere untersucht.
- Um den Einfluß des Operationstreßes zu ermitteln, wurde zusätzlich ein scheinoperiertes Tier untersucht.
- Es wird eine zeitliche Kinetik der untersuchten Faktoren aufgestellt und nicht nur einige punktuelle Messungen durchgeführt, wie z.B. bei Josephson et al.^[81], die mittels Radioimmunoassay die renale Gewebekonzentration von ET-1 und ET-3 lediglich in der Spätphase gemessen haben, oder Feldman^[52] et al., welche die mRNA-Level von ECE-1, ETAR und ETBR durch Northern-Blots nach 5 Tagen gemessen haben.
- Es fand die Untersuchung von vier Faktoren gleichzeitig an denselben Versuchstieren statt. Dies hat den Vorteil, daß das untersuchte Nierengewebe für

alle Faktoren identisch war, und so Vergleiche der Kinetiken zwischen den Faktoren aussagekräftiger sind, als wenn die Daten in getrennten Untersuchungen einzeln erhoben werden.

- Es kommt eine sensitive und reproduzierbare Methodik zum Einsatz;
 - Es werden unterschiedliche Nachweissystemen verwendet, nämlich hauptsächlich Duplex-PCR mit Lumineszenz-Nachweis, da diese Technik sensitiver ist als die Northern-Blot-Technik^[50] sowie Northern-Blot-Technik zur Validierung der Meßdaten.
 - Die Messung der beteiligten Faktoren erfolgt auf mRNA-Ebene; andere Arbeiten verwenden die Bestimmung von Plasma-/Urin-Spiegeln, oder lediglich die Messung von physikalischen Einflußgrößen (RBF)^[82].

V.2.1 Expression in der Frühphase

In der Frühphase der UUO sind Besonderheiten im Expressionsmuster aller vier untersuchten Faktoren aufgetreten. Für ECE-1, ET-1 und ETBR ließ sich in der statistischen Auswertung keine Signifikanz zeigen. Dennoch fällt bei den Kurvenverläufen der obstruierten Seite von ECE-1 und ET-1 auf, daß möglicherweise ein Expressionsanstieg in der Frühphase vorliegen könnte.

Das Expressionsniveau von ET-1 bei einer Obstruktionsdauer von 2 Stunden ($p=0,065$) ist nicht signifikant erhöht, kann aber als statistischer Trend angesehen werden. D.h. eine Erhöhung der Zahl untersuchter Proben (bzw. Tiere) zum untersuchten Zeitpunkt würde möglicherweise dazu führen, daß ein signifikanter Anstieg von ET-1 nachgewiesen werden kann. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, daß bei wiederholter Anwendung statistischer Tests auf den gleichen Datensatz eine Korrektur des Signifikanzniveaus (z.B. durch die sog. Bonferroni-Korrektur, Vgl. III.8) vorgenommen werden müßte.

In der Frühphase kommt es zu einer starken Vasokonstriktion, welche über einen Anstieg von ET-1 hervorgerufen wird, was über das Schrittmacherenzym ECE-1 aus Big-ET-1 abgespalten wird. Für beide Kurven ließ sich zwar kein signifikanter Anstieg in der Frühphase zeigen, die Kurvenverläufe lassen einen solchen Zusammenhang jedoch vermuten. Dies würde zu einem Abfall des RBF in der obstruierten Niere führen.

Die Expression von ETAR der obstruierten Niere ist nach 30 Min. Obstruktionsdauer signifikant erhöht ($p=0,0032$). Der beobachtete ETAR-Expressionsanstieg deckt sich mit Untersuchungen von Bhandia et al.^[15], welche die Wirkung einer ETAR-Blockade durch Messung von RBF und GFR nach 21-stündiger UUO in Hunden untersucht haben. Sowohl RBF, als auch GFR waren nach UUO vermindert. Es konnte außerdem gezeigt werden, daß die renale Vasokonstriktion durch ETAR-Blockade zurückging. Andere Autoren bestätigen diese Ergebnisse^[49,147,148]; mehrere Arbeitsgruppen führten hämodynamische Messungen der renalen Perfusion in Abhängigkeit der verabreichten Pharmaka durch. So untersuchten Evans et al. den Effekt des ETAR-Antagonisten BQ610 sowie des ETBR-Antagonisten BQ788 auf den regionalen Blutfluß der Niere, indem die renale Perfusion gemessen wurde. Sie fanden, daß endogene Endotheline über ETAR vermittelt den medullären und kortikalen Blutfluß vermindern, während sich für ETBR jedoch kein Einfluß nachweisen ließ^[49]. Wenzel et al. konnten zeigen, daß der selektive ETAR-Antagonist BQ-123 die renale Vasokonstriktion inhibiert, welche bislang durch die Wirkung von Angiotensin- (AT) und Noradrenalin- (NA) erklärt wurde^[147]. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, daß die durch ETAR induzierte renale Vasokonstriktion wirksamer ist, als die Effekte anderer Mediatoren, wie AT oder NA. Wilhelm et al. untersuchten den Effekt von Tezosentan, einem

Endothelinrezeptorantagonisten, nach 24 Std. UUO und konnten eine Abnahme des Serum-Kreatinins sowie eine höhere glomeruläre Filtrationsrate (GFR) nach Gabe von Tezosentan zeigen. Beide Effekte sind Zeichen einer besser erhaltenen Nierenfunktion und somit Hinweise für einen nephroprotektiven Effekt einer Rezeptorblockade durch Tezosentan.

Hegarty et al. fassen in ihrer Übersichtsarbeit die vaskulären und zellulären Effekte von ET-1 sowie die Endothelinrezeptor-Blockade durch Bosentan bei UUO bis 24 Std. zusammen^[66]. Bosentan (4-tert-Butyl-N-[6-(2-hydroxyethoxy)-5-(2-methoxyphenoxy)-2-(pyrimidin-2-yl)pyrimidin-4-yl]benzolsulfonamid) ist ein Arzneistoff der Gruppe der Endothelin-Antagonisten. Er ist als Orphan Drug zur Behandlung des seltenen Lungenbluthochdrucks (pulmonale Hypertonie) zugelassen. In Deutschland ist Bosentan unter dem Handelsnamen Tracleer® auf dem Markt. Bosentan verdrängt als Antagonist das Endothelin von seinen Rezeptoren (insbesondere ETA-Rezeptoren) und unterdrückt somit akut den durch Endothelin verursachten Anstieg des (pulmonalen) Blutdrucks sowie chronisch die durch Endothelin verursachte Veränderung der Blutgefäße (Remodelling).

Außerdem beschreiben Hegarty et al. in ihrer Übersichtsarbeit, daß die ET-1 Expression nach 24 Std. UUO in der obstruierten Niere erhöht und in der nicht obstruierten Niere erniedrigt ist^[66]. Die Obstruktion ging mit einem verminderten renalen Blutfluß (RBF) einher, was durch die Endothelinrezeptor-Blockade mittels Bosentan wieder rückgängig gemacht werden konnte. Weiterhin war die Apoptoserate bei UUO deutlich erhöht, was ebenfalls durch die Endothelinrezeptor-Blockade inhibiert werden konnte. Dadurch konnte nicht nur die Beteiligung von ET-1 in der Frühphase der UUO gezeigt werden, sondern auch, daß eine Inhibition der Effekte von ET-1 gegen die vaskulären und zellulären Veränderungen schützt. Auch andere Untersuchungen deuten auf die nephroprotektiven Effekte einer Endothelinrezeptor-Blockade hin^[15,98,115,136,140].

Da in anderen Untersuchungen Anstiege der Expression aller Faktoren des Endothelinsystems nicht nur auf der obstruierten Seite gemessen wurden, sondern wenn auch z.T. weniger ausgeprägt, in den kontralateralen Nieren sowie bei den scheinoperierten Tieren, ist es wahrscheinlich, daß eine weitere Einflußgröße vorliegt. So haben Kahn et al. die Expression von ET-1 bei UUO in der Früh- und Spätphase sowie bei scheinoperierten Versuchstieren untersucht, wobei die Expression von ET-1 in allen Gruppen erhöht war, und in der scheinoperierten Gruppe am geringsten ausfiel^[82]. Diese Beobachtungen scheinen denen von Hegarty et al. zu widersprechen, da letztere Arbeitsgruppe sogar eine erniedrigte ET-1-Expression nach 24h UUO in der nicht obstruierten Niere gemessen hat^[66].

Der ET-1-Expressionsanstieg zu Beginn der Spätphase nach 24 Std. UUO in der obstruierten Niere stimmt mit den vorliegenden Ergebnissen überein^[66]. Ein Einfluss der UUO auf die ET-1-Expression in der kontralateralen Niere im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren in der Frühphase konnte in der vorliegenden Arbeit dagegen nicht bestätigt werden. Vielmehr blieb die Expression aller untersuchten Faktoren in der nicht-obstruierten Niere über den gesamten Zeitraum konstant.

Insgesamt sprechen diese und die zitierten Beobachtungen dafür, daß das Endothelinsystem bereits in der Frühphase der UUO in der o.g. Weise maßgeblich für die Regulation des RBF verantwortlich ist. Durch die initiale Vasodilatation zu Beginn der Frühphase kommt es zunächst zu einer Erhöhung des RBF, jedoch sinkt dieser nach 90 Min. deutlich ab^[153]. Dies wird in den bestehenden Modellen vorwiegend durch Angiotensin II-vermittelte Vasokonstriktion am Vas efferens erklärt. Die Beobachtungen dieser Arbeit, insbesondere der beobachtete Expressionsanstieg von ETAR nach 30 Min. Obstruktionsdauer, legen jedoch nahe, daß nicht Angiotensin II, sondern die ETAR-vermittelte Vasokonstriktion für den Abfall des RBF zu Beginn der Frühphase von entscheidender Bedeutung ist. Da die

Niere über verschiedene, z. T. redundante Systeme zur Regulierung ihrer Perfusion verfügt, wäre ein Zusammenspiel dieser beiden synergistischen Akteure ebenfalls plausibel.

Weiterhin wurde in der nicht-obstruierten Niere ein Anstieg der ETBR-Expression beobachtet. Auch wenn dieser nicht signifikant ausfiel, so ist zu vermuten, daß dieser Anstieg im Sinne einer Gegenregulation zur obstruierten Seite verstanden werden kann, bei der die gesunde Niere durch eine erhöhte Perfusion die Funktion der geschädigten Niere übernehmen soll. Dies könnte z.B. durch die Hochregulation von ETBR geschehen, was eine vermehrte Ausschüttung von NO zur Folge hätte und zu einer Vasodilatation führen würde.

Im Unterschied zu anderen Arbeiten sind in dieser Untersuchung keine Veränderungen bei den scheinoperierten Tieren aufgefallen^[82]. Die Expression von ET-1, ECE-1, ETAR und ETBR war konstant. Dieser Unterschied kann damit erklärt werden, daß in dieser Arbeit nur jeweils ein scheinoperiertes Versuchstier pro Zeitpunkt untersucht wurde. Der Nachweis einer relativ geringen Veränderung der Expression im jeweiligen Zeitraum wäre mit mehreren Tieren wahrscheinlicher, da dann durch die statistische Mittelung der Meßwerte Schwankungen bereinigt würden. Um die Fehlerwahrscheinlichkeit durch die Verwendung von nur einer scheinoperierten Kontrolle so gering wie möglich zu halten, wurden die Meßwerte dieser Tiere mehrfach gemessen.

Eine Erklärung für die in anderen Untersuchungen gemessenen Expressionsanstiege bei scheinoperierten Kontrollen könnte der unspezifische Operationsstreß der Tiere sein, da dieser eine allgemeine Reaktion des Körpers hervorruft, welche auch funktionell antagonistische Systeme betreffen kann. Aufgrund des in dieser Untersuchung deutlich erhöhten Streßniveaus, hervorgerufen durch die Operation, kommt es bei den Versuchstieren aller Gruppen zu einer unspezifischen Streßreaktion des Körpers. Dabei werden u.a. vermehrt Katecholamine (Adrenalin und Noradrenalin), Cortisol sowie andere vasoaktive Mediatoren ausgeschüttet. Veränderungen der systemischen, wie auch der renalen Perfusion könnten rein auf diese Effekte zurückzuführen sein, so daß es notwendig ist, diese durch eine scheinoperierte Gruppe zu eliminieren.

Eine Möglichkeit, dies zu überprüfen, besteht in der Messung von Interleukin-6 (IL-6). Dieses Zytokin ist bei Entzündungsprozessen sowie bei der Geweberegeneration beteiligt und wird bei unspezifischem Streß vermehrt ausgeschüttet. Deshalb handelt es sich um einen geeigneten Indikator zur Quantifizierung des Streßniveaus^[100].

Maruszynski et al. verglichen 1999 den Plasmaspiegel von IL-6 nach laparoskopischer und offener Cholezystektomie beim Menschen. Sie wiesen nach, daß der Plasmaspiegel von IL-6 nach dem Operationstrauma erhöht ist, wobei der Grad des Anstieges bei laparoskopischer Cholezystektomie geringer ausfiel, als bei offener Cholezystektomie^[100].

Es ist noch eine Reihe weiterer Gene und Proteine an den Regulationsprozessen in der Frühphase der UUO beteiligt, welche in verschiedene Gruppen eingeteilt werden können:

1. Hypoxieinduzierbare Gene
2. NO-System
3. Renin, Angiotensin und AT-1-Rezeptor
4. Gene, die an der Prostaglandinsynthese beteiligt sind
5. Interleukine und Akut-Phase Proteine

Stickstoffmonoxid (NO) spielt eine wichtige Rolle bei den Veränderungen der renalen Hämodynamik. So haben Lanzzone et al.^[91] gezeigt, daß durch Infusion von L-Arginin, einem NO-Liberator, die durch Prostaglandinsynthese-Inhibitoren verursachte Unterdrückung der

physiologischen Steigerung von RBF und ureteralem Druck rückgängig gemacht werden konnte. Die Inhibition von NO prädisponiert zu Markschäden und Nierenversagen^[21].

Bei akuter UUO kommt es zu einer erhöhten Ausschüttung von Angiotensin II. Es gibt Hinweise darauf, daß unabhängig vom zirkulatorischen Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) auch innerhalb der Niere die Bildung von Angiotensin II möglich ist^[76], zumal Rezeptoren für Angiotensin II im Nierenmark nachgewiesen werden konnten^[22]. Dies könnte erklären, warum es bei akuter UUO in der ipsilateralen Niere nicht zu einer anhaltenden Erhöhung des RBF kommt^[57].

Des Weiteren spielt Adenosin bei der Steuerung des renalen Sauerstoffangebotes eine wichtige Rolle; Adenosin entsteht durch Verbrauch von ATP, etwa bei Hypoxie, und ist allgemein als Vasodilatator bekannt. In der Niere fungiert Adenosin jedoch einerseits als Vasokonstriktor im Bereich der Nierenrinde, was zu einer Verminderung der GFR führt sowie andererseits als Vasodilatator im medullären Bereich, wo es auch den tubulären Transport hemmt. Dies deutet darauf hin, daß Adenosin eine Sonderrolle bei der renalen Hypoxieregulation spielt und durch Umverteilung des Sauerstoffangebotes homöostatische Eigenschaften hat^[43].

Bei Urodilatin handelt es sich um einen weiteren renalen Vasodilatator^[36], der in seiner Struktur dem ANP (atrialess natriuretisches Peptid) homolog ist und in den distalen Tubuli exprimiert wird.

Die Bedeutung von Histamin hinsichtlich einer antizipierten vasodilatierenden Wirkung^[10] ließ sich nicht bestätigen. Banks et al. konnten lediglich die reaktive Hyperämiephase nach Noradrenalininfusion als Histaminwirkung nachweisen^[9].

Als weiterer Arachidonsäuremetabolit konnte neben Prostaglandinen auch eine erhöhte Thromboxan A₂-Ausschüttung nachgewiesen werden. Thromboxan A₂ ist möglicherweise an der renalen Vasokonstriktion beteiligt^[126]. Botting et al. konnten zeigen, daß die Gabe von ET-1 und ET-3 sowohl einen Anstieg von Arachidonsäuremetaboliten (Thromboxan A₂, Prostaglandin E₂), als auch von NO bewirken.^[19] Dies ist ein deutlicher Hinweis auf eine zentrale Rolle der Endotheline im komplexen Autoregulationsmechanismus der renalen Perfusion.

Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Rolle der Endotheline bei der Physiologie und Pathophysiologie der UUO zu klären.

V.2.II Expression in der Spätphase

Die Produktion von ET-1 führt über Aktivierung des A-Rezeptors zu einer Vasokonstriktion, bei Aktivierung des B-Rezeptors kommt es dagegen durch Synthese von NO zur Vasodilatation. NO sowie Prostazyklin wiederum wirken ihrerseits mittels cGMP-Synthese hemmend auf die ET-1-Produktion^[20,107]. Weiterhin vermittelt ET-1 mitogene Effekte und reguliert die Expression von Wachstumsfaktoren^[48].

Die ET-1-Sekretion wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst, wie z.B. das atriale natriuretische Peptid (ANP), welches vermehrt bei Hypervolämie sezerniert wird und als Gegenregulation die Diurese verstärkt. Kohno et al. konnten die Stimulation der ET-1-Sekretion durch Angiotensin II und Thrombin sowie die Inhibition durch ANP nachweisen

^[89]. Daraus ist ersichtlich, daß die physiologischen Effekte von ET-1 sowie des RAAS hinsichtlich der Vasokonstriktion und der Natriumretention synergistisch sind.

Für die Spätphase der UUO konnten bisher noch keine Botenstoffe gefunden werden, die eindeutig für den Rückgang des RBF verantwortlich sind. ET-1 reduziert den RBF, indem es den renalen Gefäßwiderstand erhöht ^[53]. Dabei kontrahieren sowohl Vas afferens, Vas efferens als auch A. arcuata und Interlobararterie. Bei systemischer Gabe von ET-1 kommt es Endothelin A-Rezeptor vermittelt ^[48] zum Rückgang der GFR und zu Natriumretention durch Induktion von Aldosteron ^[59].

Bei chronischer unilateraler ureteraler Obstruktion (cUUO) kommt es zu einem irreversiblen, progredienten Untergang des Nierenparenchyms mit Kortexatrophie. Bei diesem komplexen Geschehen herrscht ein gestörtes Verhältnis zwischen Zellproliferation und programmiertem Zelltod in der obstruierten Niere. Truong et al. ^[141,142] haben diese Zusammenhänge untersucht und konnten zeigen, daß die Apoptoserate in den Tubuluszellen am stärksten zunimmt und ihren Gipfel etwa am 6. Tag nach Einsetzen der Obstruktion erreicht. Weiterhin kommt es zu einer gesteigerten Proliferation von Fibroblasten im Interstitium und später dort auch zum Einwandern von Entzündungszellen. Bei cUUO konnte eine renale Endothelin-1-Ausschüttung bei Hunden nachgewiesen werden ^[82]. Kahn et al. haben die renale Perfusion und Clearance bei Hunden nach 19 Std. UUO gemessen und konnten zeigen, daß die starke renale Vasokonstriktion bei UUO mit einem Anstieg von ET-1 korreliert.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß für ECE-1, ET-1 sowie ETAR eine zeitliche Kinetik in der Spätphase der UUO existiert, wodurch ihre mögliche Beteiligung bei der Pathogenese dieser Erkrankung weiter untermauert wird ^[13,83,90]. Es fällt auf, daß die Expression von ECE-1, ETAR sowie ET-1 in der Spätphase der UUO ansteigt. Es kann deshalb die Hypothese aufgestellt werden, daß der Anstieg von ET-1 über den A-Rezeptor zu einer Vasokonstriktion führt. Dieser Effekt könnte zusätzlich durch den Anstieg von ETAR verstärkt werden.

Dabei vermittelt ET-1 mit ECE-1 als Schrittmacherenzym ^[150] über den A-Rezeptor eine anhaltende renale Vasokonstriktion ^[48], die hauptsächlich das Nierenmark betrifft und in der Spätphase auch auf die Rindenregion übergreift ^[21]. Diese ischämische Noxe in Form von Minderperfusion aufgrund der anhaltenden renalen Vasokonstriktion im Bereich des ohnehin nur eben ausreichend oxygenierten Nierenmarkes ^[48] ist für den Verlust von Nephronen und letztlich somit klinisch für den Verlust der Nierenfunktion des betroffenen Organs verantwortlich. Das kann auch durch den potenten Vasodilatator NO nicht ausreichend kompensiert werden ^[20]. Der Nephronenverlust tritt bei anhaltender Ischämie durch Initiierung einer Apoptose auf zellulärer Ebene ein. Die Beobachtung, daß die Expression des B-Rezeptors, der mittels NO-Synthese Vasodilatation vermittelt dagegen nicht ansteigt, ist ein zusätzlicher Beleg für das Überwiegen der Vasokonstriktoren gegenüber den Vasodilatoren.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt existieren nur wenige quantitative Untersuchungen über die Expression von ET-1 und ETAR im Zusammenhang mit dem RBF und Vasokonstriktion. So haben Tian et al. ^[140] 7 Tage nach UUO die Expression von präpro-ET-1 mittels RT-PCR sowie die Expression von ET-1 mit Immunohistochemie (IHC) in Ratten bestimmt. Sie fanden, daß die Expression von präpro-ET-1 signifikant erhöht war und konnten außerdem eine deutliche Anreicherung von ET-1 in der IHC beobachten. Feldman et al. ^[52] untersuchten die Expression von ECE-1, ETAR und ETBR mittels Northern Blot 5 Tage nach UUO in Ratten. Sie konnten eine Zunahme der Expression von ECE-1 und ET-1 um 92%, bzw. 71% gegenüber der nicht-obstruierten Seite zeigen. Der Anstieg von ET-1 und ECE-1 bestätigt die Daten aus dieser Arbeit.

Auch für die Spätphase sind die Ergebnisse für ETBR übereinstimmend, da keine Veränderungen nachgewiesen werden konnten.

Es zeigte sich in der Frühphase der UUO ein erster Anstieg der ET-1-Expression in der obstruierten Niere, nicht jedoch in der Kontralateralen. Außerdem war die Expression von ET-1 in der Spätphase der UUO (2 Tage Obstruktionsdauer: $p=0,002$; 4 Tage Obstruktionsdauer: $p=0,049$; 30 Tage Obstruktionsdauer: $p=0,003$) signifikant erhöht, was mit Untersuchungen von Bruzzi et al. übereinstimmt ^[26], die anhand des renalen Massenverlustmodells vier Gruppen von Ratten untersucht haben und vom 14. bis 28. Tag einen Anstieg der ET-1-Expression in Verbindung mit einer Abnahme der renalen Masse beobachtet haben. Zum Zeitpunkt 7, 14, 21 und 28 Tage nach UUO wurde die Expression von ET-1 mittels Radioimmunoassay und Northern-Blot gemessen. Eine Kontrolle erfolgte mittels nicht-radioaktiver in situ Hybridisierung und bestätigte die Ergebnisse.

Bruzzi et al. ^[26] konnten in derselben Untersuchung am 14. Tag einen Anstieg von ET-1-mRNA beobachten und zeigen, daß ET-1 zu diesem Zeitpunkt hauptsächlich im Bereich der Tubuli, nicht jedoch glomerulär exprimiert wurde. Am 28. Tag konnte die Expression von ET-1 zusätzlich in den Glomeruli nachgewiesen werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit, da die ET-1 Expression ebenfalls in der Spätphase signifikant erhöht war (2 Tage Obstruktionsdauer: $p=0,002$; 4 Tage Obstruktionsdauer: $p=0,049$; 30 Tage Obstruktionsdauer: $p=0,003$).

Auch bei Bruzzi et al. war ein Anstieg der Expression von ET-1 erst nach 14 Tagen Obstruktionsdauer nachweisbar. Dies trifft sowohl auf die Methodik des Radioimmunoassay und Northern-Blot Technik zu, als auch auf die zur Kontrolle eingesetzte in situ Hybridisierung ^[26]. Die in den hier durchgeführten Untersuchungen aufgetretenen nicht-signifikanten Schwankungen in der Frühphase widersprechen den Ergebnissen von Bruzzi et al. nicht, sondern lassen sich vielmehr durch die sensitivere und spezifischere Methodik der RT-PCR begründen. Damit lassen sich auch geringere Schwankungen nachweisen, welche bei den eingesetzten Techniken von Bruzzi et al. nicht nachweisbar sind. Der Vorteil von in situ Hybridisierung und Immunhistochemie besteht darin, daß man den beobachteten Faktoren Kompartimente zuordnen kann. Dies ist mit den verwendeten Techniken nicht möglich.

Bunchman et al. ^[27] haben den Effekt von ET-1-Antagonisten auf die cyclosporininduzierte Schädigung durch Vasokonstriktion renaler Arteriolen in Zellkultur untersucht. Chan et al. haben den Effekt von ET-1-Antagonisten auf den renalen Blutfluß (RBF) und die Inulin-clearance in der einseitig perfundierten Niere bei Ischämie untersucht ^[27,33]. In beiden Fällen konnte ein nephroprotektiver Effekt ^[33,38] durch Inhibition von ET-1, u.a. mittels Endothelinrezeptorantagonisten, gezeigt werden.

Sowohl das postischämische Nierenversagen als auch die cyclosporininduzierte Nephrotoxizität werden also zumindest teilweise durch eine erhöhte ET-1-Produktion verursacht ^[27,33] oder doch zumindest begünstigt. Bei beiden Schädigungen kommt es zum Untergang von Nephronen, wobei dies im Falle des postischämischen Nierenversagens durch Hypoxie und bei Cyclosporin durch direkte Nephrotoxizität bedingt ist.

Es ist wahrscheinlich, daß die über den A-Rezeptor und ECE-1 vermittelte Wirkung von ET-1 maßgeblich am Einsetzen sowie insbesondere für die Progredienz des renalen Funktionsverlustes bei anhaltender renaler Obstruktion verantwortlich ist.

Interessant ist, daß in der Spätphase erst die Expression von ET-1 (nach 2 Tagen) ansteigt, dann ECE-1 (nach 4 Tagen) und zuletzt ETAR (Anstieg zwischen 4. und 30. Tag). Während die Expression von ET-1 relativ rasch auf die eingetretene Obstruktion mit einem Anstieg reagiert, ist dafür insbesondere für den A-Rezeptor schon eine länger andauernde Schädigung notwendig. Diese Beobachtung wirft die Frage auf, in welchem Zusammenhang die

Expression des A-Rezeptors mit den Auswirkungen in der Spätphase der UUO steht, die zu Hydronephrose führen können.

Da die Endotheline und deren Rezeptoren in verschiedenen Geweben exprimiert werden, wo sie an der Regulation des vasomotorischen Tonus, der Hormonproduktion sowie insbesondere der Zellproliferation beteiligt sind^[48], ist es denkbar, daß sie auch bei der Entstehung einer Hydronephrose bei chronischer ureteraler Obstruktion (CUO) eine Rolle spielen. Truong et al.^[141,142] konnten zeigen, daß es dabei zu einem irreversiblen, progredienten Untergang des Nierenparenchyms mit Kortextrophie kommt und ein gestörtes Verhältnis zwischen Zellproliferation und programmiertem Zelltod in der obstruierten Niere herrscht. Möglicherweise deutet die erst spät erhöhte Expression des A-Rezeptors auf eine Beteiligung an diesen Prozessen hin. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt existieren noch keine Untersuchungen zu dieser spezifischen Fragestellung. Allerdings deuten jüngste Ergebnisse von Untersuchungen an Herzzellen^[62,79] auf eine Beteiligung von ET-1 und ECE-1 an der Signaltransduktion zur Entstehung von Apoptose hin. So haben Gupta et al. die mitogenen Effekte von ECE-1 an Myozyten bei Sepsis im Rattenmodell untersucht und konnten zeigen, daß eine erhöhte Aktivität von ECE-1 mit einer gesteigerten Apoptoserate einhergeht^[62].

Darüber hinaus spielen die Gene der Endothelinfamilie bei der Pathogenese von nicht renalen Erkrankungen eine Rolle. Puffenberger et al. konnten nachweisen, daß der B-Rezeptor für die Entwicklung des Nervensystems essentiell ist und eine Mutation des ETBR-Gens beim Menschen mit einer erblichen Form des M. Hirschsprung assoziiert ist^[108]. Dabei handelt es sich um eine Erkrankung des Gastrointestinaltraktes und ist durch das Fehlen enterischer Ganglien im distalen Colon gekennzeichnet. Dies führt zu fehlerhafter Innervation des Dickdarms und äußert sich klinisch in Form von Obstruktion (Megakolon). Dies weist darauf hin, daß gerade die Endothelinrezeptoren nicht nur in der Regulation des Gefäßtonus eine wichtige Rolle spielen, sondern auch Auswirkungen auf die Zellproliferation haben. Die Rolle des A- und B-Rezeptors bei der Entstehung von Hydronephrose und ihre Rolle bei der Zellproliferation und Apoptose bedarf daher weiterer Untersuchungen. Konkret ist die Untersuchung der mitogenen Effekte der Faktoren des Endothelinsystems notwendig, welche zur Initiierung von Apoptose führen. Momentan sind lediglich Signaltransduktionskaskaden in Myozyten bekannt, bei denen ET-1 und ECE-1 eine Rolle spielen^[62,79]. Diese Untersuchungen weisen daraufhin, daß die mitogenen Effekte über den MAP-Kinase-Weg zur Phosphorylierung des Proteins p38 führen^[62]. Möglicherweise trifft dies auch auf renale Gewebe zu; dies müssen weitere Untersuchungen noch zeigen.

V.2.III Quantitative Veränderungen des Expressionsniveaus

Für die Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich der Höhe der Schwankungen des Expressionsniveaus im zeitlichen Verlauf stellte sich die Frage, ob insbesondere in der Spätphase die z.T. massiven Anstiege der Expression real sind, oder es sich um systematische Meßfehler handeln könnte.

Insbesondere die Anstiege der Expression von ET-1 nach einer Obstruktionsdauer von 2 und 4 Tagen sowie von ECE-1 nach einer Obstruktionsdauer von 30 Tagen auf das 10- bis 20-fache warfen diese Fragen auf. Andere Autoren beobachteten ähnlich starke Veränderungen der Expression, wie z.B. eine um das 29,3-fache ($p < 0.001$) und 24,3-fache ($p < 0.01$) erhöhte Expression von ETAR am 3. und 7. Tag nach Ballonangioplastie der A. carotis bei Ratten^[145]. Zum Nachweis wurde ebenfalls die Expression auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR gemessen. Außerdem ließen sich die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung durch

Wiederholung der Messungen bestätigen, so daß offenbar eine erhebliche Variabilität bei der Expression von ET-1 und ECE-1 vorliegt. Auch diese Beobachtung spricht dafür, daß das Endothelinsystem eine entscheidende Rolle bei UO spielt, denn eine so deutlich erhöhte Expression des stärksten Vasokonstriktors ET-1 könnte allein schon den ischämiebedingten renalen Funktionsverlust bei persistierender UO ausreichend erklären.

Hinsichtlich der Northern-Blot Technik existiert keine Studie, in der eine zeitliche Kinetik mit vergleichbarer Genauigkeit bestimmt wurde. Auch in anderen neueren Arbeiten wurde der Northern-Blot nicht als primäres Nachweisverfahren eingesetzt. Dies ist in der geringeren Sensitivität und Spezifität im Vergleich zur RT-PCR begründet. Zur Kontrolle der mittels RT-PCR gewonnenen Daten ist die Methodik jedoch gut geeignet und wurde hier auch verwendet. Die Ergebnisse aus dieser Untersuchung bestätigen die Ergebnisse der RT-PCR.

V.3 Klinische Bedeutung

Eine Protektion der Nierenfunktion läßt sich im Wesentlichen durch Vermeidung einer Ischämie realisieren. Um dies zu erreichen, gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten; da, wie bereits erwähnt, im Nierenmark durch Prozesse der Urin-Konzentrierung der höchste renale Sauerstoffbedarf herrscht, kann entweder das Sauerstoffangebot erhöht, oder der Sauerstoffverbrauch reduziert werden. Beides resultiert in einer Abnahme der Effizienz der Urin-Konzentrierung (Isosthenurie) ^[22]. Bei Isosthenurie kommt es zur Ausscheidung eines Harns mit »fixiertem«, d.h. von der zugeführten Flüssigkeitsmenge nicht beeinflusstem spezifischen Gewicht um 1,010 (maximale Harnosmolalität < 850 mosm/kg H₂O) als Folge mangelnder Konzentrationsfähigkeit der – insuffizienten – Niere.

Der Sauerstoffbedarf läßt sich beispielsweise durch Hemmung der Energie verbrauchenden Stoffwechselprozesse der Na⁺/K⁺-ATPase in den Tubuli mit Schleifendiuretika wie Furosemid ^[69] oder Oubain ^[23] vermindern. Weiterhin mindern auch Prostaglandin E₂ ^[93], Cytochrom-P-450-abhängige Metabolite der Arachidonsäure ^[30] sowie platelet-activating factor (PAF) ^[7] den O₂-Verbrauch im Nierenmark durch Inhibition der tubulären Rückresorption.

Das O₂-Angebot läßt sich intrarenal durch Vasodilatoren wie NO und Prostaglandine erhöhen, aber auch systemisch durch Steigerung des Herz-Zeitvolumens (HZV) mit positiv inotropen Medikamenten.

Bisher konnte noch keine wirklich spezifische medikamentöse Therapie gefunden werden. Insbesondere nach Eintreten einer Noxe, z.B. in Form von Ischämie als Folge einer einseitigen Obstruktion der ableitenden Harnwege (Harnleiterstein, oder Kompression durch Tumor) ist die Therapie auf symptomatische Maßnahmen beschränkt, bzw. auf das Beheben der Ursache, was aber häufig mit einer größeren zeitlichen Latenz verbunden ist. Deshalb spielt die Prophylaxe mit kristalloiden Infusionen zum Ausgleich und Vorbeugen eines absoluten und relativen Volumenmangels im klinischen Alltag eine entscheidende Rolle. Weder die Applikation von Dopamin ^[8] oder Mannitol ^[44] haben im Vergleich hierzu Vorteile aufweisen können. Auch Verapamil ^[16] erwies sich als unwirksam.

Deshalb könnte eine medikamentöse Intervention, die das Endothelinsystem betrifft hier weitergehende therapeutische Potentiale eröffnen.

Die durch Faktoren des Endothelinsystems vermittelten Auswirkungen lassen sich an verschiedenen Stellen dieses Systems pharmakologisch beeinflussen. Dies kann z.B. auf Ebene der Rezeptoren geschehen, etwa durch Antagonisierung des Endothelin A-Rezeptors ^[28]. So haben Benigni et al. in ihrer Übersichtsarbeit den nephroprotektiven Effekt von selektiven sowie nichtselektiven Endothelinrezeptorantagonisten bei progressiver Niereninsuffizienz in Tiermodellen untersucht ^[12]. Sie konnten feststellen, daß die

eingesetzten Peptid-Rezeptorantagonisten die Progression der Niereninsuffizienz verlangsamen, was mit einem verlangsamten Parenchymuntergang einher ging. Für den Einsatz als Pharmakon beim Menschen ist jedoch die Entwicklung von Nichtpeptid-Rezeptorantagonisten erforderlich, bevor klinische Studien durchgeführt werden können.

Auch die Inhibition der Effekte von postrezeptorieller Signaltransduktion mittels Kalziumantagonisten^[82] könnte eine therapeutische Option bieten, da die Vasokonstriktion mittels Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration ausgelöst wird. Über die G-Protein gekoppelte Aktivierung von Inositol 1,4,5-Trisphosphat (IP₃), erfolgt die Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern via IP₃-sensitive Ca²⁺ Kanäle.

Ein weiterer Ansatz könnte die pharmakologische Hemmung von ECE-1 (dem Schrittmacherenzym der ET-1-Synthese) darstellen, um die Produktion von ET-1 aus Big ET-1 zu verringern. Zwar bindet Big ET-1 ebenfalls an die Endothelinrezeptoren, jedoch ist seine vasoaktive Wirkung im Vergleich zu ET-1 um den Faktor 100 geringer^[48]. Über einen derartigen Ansatz liegen allerdings derzeit noch keine Untersuchungen vor.

Neben dem Endothelinsystem ist auch das intrarenale Renin-Angiotensinsystem (RAS) als Angriffspunkt für eine pharmakologische Intervention von großer Bedeutung und steht wahrscheinlich in enger Beziehung zu den Endothelinen. Cao et al. haben den möglichen Nutzen einer doppelten Blockade des RAS durch ACE-Hemmer und AT₁-Rezeptorantagonisten mit der relativen Effizienz von Endothelinrezeptorantagonisten verglichen^[28]. Sie haben festgestellt, daß gegenwärtig ACE-Hemmer und AT₁-Rezeptorantagonisten den Endothelinrezeptorantagonisten überlegen sind, so daß die Entwicklung effizienterer Endothelinrezeptorantagonisten abzuwarten bleibt.

Weitere Studien werden klären, ob ggf. neu entwickelte Nichtpeptid-Endothelinrezeptor-Antagonisten in der Zukunft eine therapeutische Rolle bei der Behandlung von akuter oder chronischer Niereninsuffizienz durch einen „nephroprotektiven Effekt“ spielen werden.

VI. Ausblick

Mit den Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit konnten wichtige Informationen über die Rolle der Endotheline im Verlauf einer unilateralen ureteralen Obstruktion gesammelt werden. Diese Erkenntnisse sind für das Verständnis der Interaktionen aller pathogenetisch bedeutsamen Faktoren, die im Rahmen des biphasischen Modells der UUO^[153] eine zeitliche Kinetik aufweisen, bedeutsam. Bei diesem Modell wird die Obstruktion in eine Früh- und Spätphase aufgeteilt^[106,114]. Durch die Obstruktion kommt es zu renaler Ischämie mit der Folge eines Funktionsverlustes des betroffenen Organs, welcher anfänglich reversibel ist. Bei anhaltender Ischämie kommt es dann zu morphologischen Veränderungen und Apoptose, was sich klinisch in einer irreversiblen Niereninsuffizienz manifestiert.

Diese und andere Untersuchungen deuten darauf hin, daß den Endothelinen eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese von ischämiebedingtem renalem Funktionsverlust zuzuschreiben ist^[13,83,90]. Bereits in der Frühphase wird die Ischämie durch ET-1-vermittelte Vasokonstriktion initiiert, was dann in der Spätphase insbesondere im Bereich des Nierenmarkes zum Nephronenverlust führt^[48]. Die Wirkung von ET-1 wird in diesem Zusammenhang über den ET-A-Rezeptor vermittelt, wobei ET-1 aus Big ET-1 von dem Schrittmacherenzym ECE-1 abgespalten wird.

Die Wirkung von ET-1 läßt sich an mehreren Stellen dieses Systems pharmakologisch beeinflussen, etwa durch Antagonisierung des Endothelin A-Rezeptors^[28] oder mittels Kalziumantagonisten, da die Vasokonstriktion über einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration ausgelöst wird^[82]. Neben dem Endothelinsystem ist auch das intrarenale Renin-Angiotensinsystem von großer Bedeutung und steht wahrscheinlich in enger Beziehung zu den Endothelinen, so daß auch hier pharmakologisch, z.B. mit AT₁-Rezeptorantagonisten^[28] oder ACE-Hemmern, interveniert werden kann. Auch NO als potenter Vasodilatator ist geeignet, durch seine antagonistische Wirkung den Effekten von ET-1 entgegenzuwirken. Hegarty et al. schlagen dazu die systemische Verabreichung vor^[65], da es für die selektive intrarenale Stimulation der NO-Produktion z. Zt. keine Möglichkeiten gibt.

Grundsätzlich ist der Erfolg einer solchen pharmakologischen Intervention umso wahrscheinlicher, je früher diese erfolgt. Aber auch in der Spätphase der UUO könnte dadurch renales Parenchym bis zur Behebung der Ursache (beispielsweise die Extraktion eines Nierensteines) geschont werden.

Für das klinische Handeln in Akutsituationen sind die gewonnenen Erkenntnisse in Ermangelung geeigneter Nichtpeptid-Endothelinrezeptor-Antagonisten noch nicht von Bedeutung. Allerdings ließ sich zeigen, daß in der Frühphase der Obstruktion ein zu starkes Absinken der renalen Perfusion durch die vermehrte Synthese von NO ^[65] sowie Prostaglandinen ^[126] verhindert wird, wodurch eine Ischämie in der Frühphase vermieden werden kann. Weitere Studien werden klären, ob ggf. neu entwickelte Nichtpeptid-Endothelinrezeptor-Antagonisten in der Zukunft eine therapeutische Rolle bei der Behandlung von akuter oder chronischer Niereninsuffizienz spielen werden, bzw. einen nephroprotektiven Effekt haben werden. So wurde 2001 mit dem Endothelin-Rezeptorantagonist Bosentan von der Food and Drug Administration (FDA) in den USA erstmals ein spezifischer Wirkstoff zur Beeinflussung des Endothelinsystems für die Therapie der pulmonalen Hypertonie zugelassen ^[101].

Die Umsetzung dieser gewonnenen Erkenntnisse wird in der Entwicklung geeigneter pharmakologischer Interventionsmöglichkeiten zur Therapie bzw. Prävention von Krankheitsbildern bestehen, deren Pathogenese mit diesen Faktoren verknüpft ist, was in weiteren Studien auf ihre Wirksamkeit überprüft werden muß.

VII. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von Faktoren des Endothelinsystems bei unilateraler ureteraler Obstruktion (UUO) im Rattenmodell untersucht. Ziel war es, eine zeitliche Kinetik dieser Faktoren über die beobachtete Obstruktionsdauer von 30 Tagen zu zeigen, die zur weiteren Charakterisierung des biphasischen Modells der UUO beiträgt [65,73,112,153]. Untersucht wurden Endothelin-1 (ET-1), Endothelin-Converting-Enzyme (ECE-1), Endothelin A-Rezeptor (ETAR) und Endothelin B-Rezeptor (ETBR).

Frühphase der UUO:

ECE-1

Ein Anstieg der Expression der Nieren mit obstruiertem Harnleiter konnte in der Frühphase der UUO zwar statistisch nicht bestätigt werden, jedoch deutet der Kurvenverlauf zumindest darauf hin. So sind die Werte nach einer Obstruktionsdauer von 30 Min., 1Std. und 2 Std. erhöht.

ET-1

Es zeigte sich in der Frühphase der UUO ein erster Anstieg der Expression der Nieren mit obstruiertem Harnleiter, nicht jedoch in der Kontralateralen. Ein Anstieg nach 2 Std. Obstruktionsdauer ist zwar zu vermuten, konnte jedoch in der statistischen Auswertung nicht verifiziert werden ($p=0,065$). Ebenfalls läßt sich bei Obstruktionsdauern von 30 Min., 1 und 2 Std. ein nicht signifikanter Anstieg aller drei Kurven erkennen.

ETAR

Bei der statistischen Analyse der Kurvenverläufe für den A-Rezeptor konnte bei der Expression der Nieren mit obstruiertem Harnleiter ein signifikanter Anstieg für die Obstruktionsdauer von 30 Min. ($p=0,0032$) gezeigt werden.

ETBR

In der Frühphase der UUO war die Expression von ETBR aller drei Gruppen konstant; es konnte keine statistisch signifikante Veränderung der Expression der Nieren mit obstruiertem Harnleiter gezeigt werden. Allerdings deutet der Kurvenverlauf der nicht-obstruierten Nieren auf einen möglichen Anstieg in der Frühphase hin.

Spätphase der UUO:**ECE-1**

Es konnte gezeigt werden, daß die Expression von ECE-1 in der Spätphase der UUO (4 Tage Obstruktionsdauer: $p=0,002$; 30 Tage Obstruktionsdauer: $p=0,001$) in den Nieren mit obstruiertem Harnleiter signifikant erhöht ist (s. Abbildung 17, Seite 40).

ET-1

Die Expression der Nieren mit obstruiertem Harnleiter in der Spätphase der UUO (2 Tage Obstruktionsdauer: $p=0,002$; 4 Tage Obstruktionsdauer: $p=0,049$; 30 Tage Obstruktionsdauer: $p=0,003$) war signifikant erhöht.

ETAR

Bei der Expression der Nieren mit obstruiertem Harnleiter konnte ein signifikanter Anstieg für die Obstruktionsdauer von 30 Tagen ($p<0,001$) gezeigt werden.

ETBR

Die Expression von ETBR ist in der Spätphase der UUO konstant.

Der Expressionsverlauf der Nieren mit nicht obstruiertem Harnleiter und der scheinoperierten Tiere wies weder in der Frühphase, noch in der Spätphase statistisch signifikante Schwankungen auf.

Es fällt auf, daß die Expression von ECE-1, ETAR sowie ET-1 in der Spätphase der UUO ansteigt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß für ECE-1, ET-1 sowie wahrscheinlich auch ETAR eine zeitliche Kinetik bei UUO existiert, wodurch ihre Rolle bei der Pathogenese dieser Erkrankung weiter untermauert wird^[13,83,90]

Dabei vermittelt ET-1 mit ECE-1 als Schrittmacherenzym über den A-Rezeptor eine anhaltende renale Vasokonstriktion, was auch durch den potenten Vasodilatator NO nicht ausreichend kompensiert werden kann. Diese ischämische Noxe im Bereich des ohnehin nur eben ausreichend oxygenierten Nierenmarkes^[48] ist für den Verlust von Nephronen und letztlich somit klinisch für den Verlust der Nierenfunktion des betroffenen Organs verantwortlich. Die Beobachtung, daß die Expression des B-Rezeptors, der mittels

NO-Synthese Vasodilatation vermittelt dagegen nicht ansteigt, ist ein zusätzlicher Beleg für das Überwiegen der Vasokonstriktoren gegenüber den Vasodilatoren.

Andere Untersuchungen deuten darauf hin, daß eine pharmakologische Intervention, z.B. durch ETAR-Antagonisten oder Kalziumantagonisten geeignet ist, die ET-1, bzw. ETAR vermittelte Vasokonstriktion zu inhibieren und so den Nieren-Funktionsverlust bei der UUO zu begrenzen^[63,82,85].

Weiterhin ergaben sich bei der Auswertung der Kurvenverläufe Hinweise auf Schwankungen im Expressionsniveau bei folgenden Faktoren: Ein Anstieg von ECE-1 und ET-1 in der Frühphase ist zu vermuten, konnte aber nicht als statistisch signifikant nachgewiesen werden. Ein Anstieg des Expressionsniveaus ist außerdem für den B-Rezeptor zu vermuten, da dieser Vasodilatation vermittelt, wodurch die Frühphase gekennzeichnet ist. Für das genauere Verständnis der Rolle der Endotheline bei UUO ist eine weitere Analyse an diesen Stellen erforderlich.

VIII. Literaturverzeichnis

- [1] Takasaki, C., Yanagisawa, M., Kimura, S., Goto, K. and Masaki, T., Similarity of endothelin to snake venom toxin, *Nature*, 335 (1988) 303.
- [2] Allen, J.T., Vaughan, E.D., Jr. and Gillenwater, J.Y., The effect of indomethacin on renal blood flow and uretral pressure in unilateral ureteral obstruction in awake dogs, *Invest Urol*, 15 (1978) 324-7.
- [3] Alwine, J.C., Kemp, D.J. and Stark, G.R., Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74 (1977) 5350-4.
- [4] Arai, H., Hori, S., Aramori, I., Ohkubo, H. and Nakanishi, S., Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor, *Nature*, 348 (1990) 730-2.
- [5] Aramori, I. and Nakanishi, S., Coupling of two endothelin receptor subtypes to differing signal transduction in transfected Chinese hamster ovary cells, *J Biol Chem*, 267 (1992) 12468-74.
- [6] Arinami, T., Ishikawa, M., Inoue, A., Yanagisawa, M., Masaki, T., Yoshida, M.C. and Hamaguchi, H., Chromosomal assignments of the human endothelin family genes: the endothelin-1 gene (EDN1) to 6p23-p24, the endothelin-2 gene (EDN2) to 1p34, and the endothelin-3 gene (EDN3) to 20q13.2-q13.3, *Am J Hum Genet*, 48 (1991) 990-6.
- [7] Bailly, C., Barlet-Bas, C. and Amiel, C., Platelet activating factor inhibits Cl and K transport in the medullary thick ascending limb, *Kidney Int*, 41 (1992) 269-74.
- [8] Baldwin, L., Henderson, A. and Hickman, P., Effect of postoperative low-dose dopamine on renal function after elective major vascular surgery, *Ann Intern Med*, 120 (1994) 744-7.
- [9] Banks, R.O., Vasoconstrictor-induced changes in renal blood flow: role of prostaglandins and histamine, *Am J Physiol*, 254 (1988) F470-6.
- [10] Banks, R.O., Inscho, E.W. and Jacobson, E.D., Histamine H1 receptor antagonists inhibit autoregulation of renal blood flow in the dog, *Circ Res*, 54 (1984) 527-35.
- [11] Baynash, A.G., Hosoda, K., Giaid, A., Richardson, J.A., Emoto, N., Hammer, R.E. and Yanagisawa, M., Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons, *Cell*, 79 (1994) 1277-85.
- [12] Benigni, A., Perico, N. and Remuzzi, G., Endothelin antagonists and renal protection, *J Cardiovasc Pharmacol*, 35 (2000) S75-78.
- [13] Benigni, A. and Remuzzi, G., Endothelin in the progressive renal disease of glomerulopathies, *Miner Electrolyte Metab*, 21 (1995) 283-91.
- [14] Bercovich, D., Regev, Z., Ratz, T., Luder, A., Plotsky, Y. and Gruenbaum, Y., Quantitative ratio of primer pairs and annealing temperature affecting PCR products in duplex amplification, *Biotechniques*, 27 (1999) 762-4, 766-8, 770.
- [15] Bhangdia, D.K., Gulmi, F.A., Chou, S.Y., Mooppan, U.M. and Kim, H., Alterations of renal hemodynamics in unilateral ureteral obstruction mediated by activation of endothelin receptor subtypes, *J Urol*, 170 (2003) 2057-62.
- [16] Blank, W., Mooppan, M.M., Chhajwani, B., Chou, S.Y. and Kim, H., Effects of verapamil on preservation of renal function after ischemia: functional and ultrastructural study, *J Urol*, 131 (1984) 992-4.
- [17] Bloch, K.D., Friedrich, S.P., Lee, M.E., Eddy, R.L., Shows, T.B. and Quertermous, T., Structural organization and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin, *J Biol Chem*, 264 (1989) 10851-7.

- [18] Bloch, K.D., Hong, C.C., Eddy, R.L., Shows, T.B. and Quertermous, T., cDNA cloning and chromosomal assignment of the endothelin 2 gene: vasoactive intestinal contractor peptide is rat endothelin 2, *Genomics*, 10 (1991) 236-42.
- [19] Botting, R.M. and Vane, J.R., Endothelins: potent releasers of prostacyclin and EDRF, *Pol J Pharmacol Pharm*, 42 (1990) 203-18.
- [20] Boulanger, C. and Luscher, T.F., Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium- derived nitric oxide, *J Clin Invest*, 85 (1990) 587-90.
- [21] Brezis, M., Heyman, S.N., Dinour, D., Epstein, F.H. and Rosen, S., Role of nitric oxide in renal medullary oxygenation. Studies in isolated and intact rat kidneys, *J Clin Invest*, 88 (1991) 390-5.
- [22] Brezis, M. and Rosen, S., Hypoxia of the renal medulla--its implications for disease, *N Engl J Med*, 332 (1995) 647-55.
- [23] Brezis, M., Rosen, S., Silva, P. and Epstein, F.H., Transport activity modifies thick ascending limb damage in the isolated perfused kidney, *Kidney Int*, 25 (1984) 65-72.
- [24] Briggs, J.P. and Schnermann, J., The tubuloglomerular feedback mechanism: functional and biochemical aspects, *Annu Rev Physiol*, 49 (1987) 251-73.
- [25] Brown, L.A., Nunez, D.J., Brookes, C.I. and Wilkins, M.R., Selective increase in endothelin-1 and endothelin A receptor subtype in the hypertrophied myocardium of the aorto-venacaval fistula rat, *Cardiovasc Res*, 29 (1995) 768-74.
- [26] Bruzzi, I., Corna, D., Zoja, C., Orisio, S., Schiffrin, E.L., Cavallotti, D., Remuzzi, G. and Benigni, A., Time course and localization of endothelin-1 gene expression in a model of renal disease progression, *Am J Pathol*, 151 (1997) 1241-7.
- [27] Bunchman, T.E. and Brookshire, C.A., Cyclosporine-induced synthesis of endothelin by cultured human endothelial cells, *J Clin Invest*, 88 (1991) 310-4.
- [28] Cao, Z., Cooper, M.E., Wu, L.L., Cox, A.J., Jandeleit-Dahm, K., Kelly, D.J. and Gilbert, R.E., Blockade of the renin-angiotensin and endothelin systems on progressive renal injury, *Hypertension*, 36 (2000) 561-8.
- [29] Cardell, L.O., Uddman, R. and Edvinsson, L., Evidence for multiple endothelin receptors in the guinea-pig pulmonary artery and trachea, *Br J Pharmacol*, 105 (1992) 376-80.
- [30] Carroll, M.A., Sala, A., Dunn, C.E., McGiff, J.C. and Murphy, R.C., Structural identification of cytochrome P450-dependent arachidonate metabolites formed by rabbit medullary thick ascending limb cells, *J Biol Chem*, 266 (1991) 12306-12.
- [31] Chamberlain, J.S., Gibbs, R.A., Ranier, J.E. and Caskey, C.T., Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy, *M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White (Eds.), PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press, San Diego* (1990) 272-281.
- [32] Chamberlain, J.S., Gibbs, R.A., Ranier, J.E., Nguyen, P.N. and Caskey, C.T., Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification, *Nucleic Acids Res*, 16 (1988) 11141-56.
- [33] Chan, L., Chittinandana, A., Shapiro, J.I., Shanley, P.F. and Schrier, R.W., Effect of an endothelin-receptor antagonist on ischemic acute renal failure, *Am J Physiol*, 266 (1994) F135-8.
- [34] Chien, A., Edgar, D.B. and Trela, J.M., Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*, *J Bacteriol*, 127 (1976) 1550-7.
- [35] Chomczynski, P. and Sacchi, N., Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction, *Anal Biochem*, 162 (1987) 156-9.
- [36] Chou, S.Y., Porush, J.G. and Faubert, P.F., Renal medullary circulation: hormonal control, *Kidney Int*, 37 (1990) 1-13.

- [37] Clarke, J.G., Benjamin, N., Larkin, S.W., Webb, D.J., Davies, G.J. and Maseri, A., Endothelin is a potent long-lasting vasoconstrictor in men, *Am J Physiol*, 257 (1989) H2033-5.
- [38] Clozel, M., Breu, V., Burri, K., Cassal, J.M., Fischli, W., Gray, G.A., Hirth, G., Loffler, B.M., Muller, M., Neidhart, W. and et al., Pathophysiological role of endothelin revealed by the first orally active endothelin receptor antagonist, *Nature*, 365 (1993) 759-61.
- [39] Cozza, E.N., Chiou, S. and Gomez-Sanchez, C.E., Endothelin-1 potentiation of angiotensin II stimulation of aldosterone production, *Am J Physiol*, 262 (1992) R85-9.
- [40] Crisan, D., Molecular diagnostic testing for determination of myeloid lineage in acute leukemias, *Ann Clin Lab Sci*, 24 (1994) 355-63.
- [41] de Nucci, G., Thomas, R., D'Orleans-Juste, P., Antunes, E., Walder, C., Warner, T.D. and Vane, J.R., Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85 (1988) 9797-800.
- [42] Desprez, P.Y., Poujol, D. and Saez, S., Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, E.C. 1.2.1.12.) gene expression in two malignant human mammary epithelial cell lines: BT-20 and MCF-7. Regulation of gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25-(OH)₂D₃), *Cancer Lett*, 64 (1992) 219-24.
- [43] Dinour, D., Agmon, Y. and Brezis, M., Adenosine: an emerging role in the control of renal medullary oxygenation?, *Exp Nephrol*, 1 (1993) 152-7.
- [44] Dorman, H.R., Sondheimer, J.H. and Cadnapaphornchai, P., Mannitol-induced acute renal failure, *Medicine (Baltimore)*, 69 (1990) 153-9.
- [45] Dybkaer, K., Pedersen, B., Skou Pedersen, F. and Scholer Kristensen, J., Identification of acute myeloid leukemia patients with diminished expression of CD13 myeloid transcripts by competitive reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), *Leuk Res*, 24 (2000) 497-506.
- [46] Elder, J.S., Antenatal hydronephrosis. Fetal and neonatal management, *Pediatr Clin North Am*, 44 (1997) 1299-321.
- [47] Emoto, N. and Yanagisawa, M., Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum, *J Biol Chem*, 270 (1995) 15262-8.
- [48] Epstein, F.H. and Levin, E.R., Endothelins: Mechanisms of Disease, *N Engl J Med*, 333 (1995) 356-63.
- [49] Evans, R.G., Madden, A.C., Oliver, J.J. and Lewis, T.V., Effects of ET(A) - and ET(B)-receptor antagonists on regional kidney blood flow, and responses to intravenous endothelin-1, in anaesthetized rabbits, *J Hypertens*, 19 (2001) 1789-99.
- [50] Fehr, J.E., Trotter, G.W., Oxford, J.T. and Hart, D.A., Comparison of Northern blot hybridization and a reverse transcriptase-polymerase chain reaction technique for measurement of mRNA expression of metalloproteinases and matrix components in articular cartilage and synovial membrane from horses with osteoarthritis, *Am J Vet Res*, 61 (2000) 900-5.
- [51] Feinberg, A.P. and Vogelstein, B., A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity, *Anal Biochem*, 132 (1983) 6-13.
- [52] Feldman, D.L., Mogelesky, T.C., Chou, M. and Jeng, A.Y., Enhanced expression of renal endothelin-converting enzyme-1 and endothelin-A-receptor mRNA in rats with interstitial fibrosis following ureter ligation, *J Cardiovasc Pharmacol*, 36 (2000) S255-9.
- [53] Ferrario, R.G., Foulkes, R., Salvati, P. and Patrono, C., Hemodynamic and tubular effects of endothelin and thromboxane in the isolated perfused rat kidney, *Eur J Pharmacol*, 171 (1989) 127-34.

- [54] Filep, J.G., Herman, F., Battistini, B., Chabrier, P.E., Braquet, P. and Sirois, P., Antiaggregatory and hypotensive effects of endothelin-1 in beagle dogs: role for prostacyclin, *J Cardiovasc Pharmacol*, 17 (1991) S216-8.
- [55] Fine, J., Hydronephrosis in a series of 3,400 post-mortem examinations in Zambia, with special reference to Bilharharzia, *Med J Zambia*, 9 (1975) 98-101.
- [56] Frokiaer, J., Christensen, B.M., Marples, D., Djurhuus, J.C., Jensen, U.B., Knepper, M.A. and Nielsen, S., Downregulation of aquaporin-2 parallels changes in renal water excretion in unilateral ureteral obstruction, *Am J Physiol*, 273 (1997) F213-23.
- [57] Frokiaer, J., Djurhuus, J.C., Nielsen, M. and Pedersen, E.B., Renal hemodynamic response to ureteral obstruction during converting enzyme inhibition, *Urol Res*, 24 (1996) 217-27.
- [58] Frokiaer, J., Marples, D., Knepper, M.A. and Nielsen, S., Bilateral ureteral obstruction downregulates expression of vasopressin-sensitive AQP-2 water channel in rat kidney, *Am J Physiol*, 270 (1996) F657-68.
- [59] Goetz, K.L., Wang, B.C., Madwed, J.B., Zhu, J.L. and Leadley, R.J., Jr., Cardiovascular, renal, and endocrine responses to intravenous endothelin in conscious dogs, *Am J Physiol*, 255 (1988) R1064-8.
- [60] Goldie, R.G., Endothelins in health and disease: an overview, *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 26 (1999) 145-8.
- [61] Goligorsky, M.S., Tsukahara, H., Magazine, H., Andersen, T.T., Malik, A.B. and Bahou, W.F., Termination of endothelin signaling: role of nitric oxide, *J Cell Physiol*, 158 (1994) 485-94.
- [62] Gupta, A., Aberle, N.S., 2nd, Ren, J. and Sharma, A.C., Endothelin-converting enzyme-1-mediated signaling in adult rat ventricular myocyte contractility and apoptosis during sepsis, *J Mol Cell Cardiol*, 38 (2005) 527-37.
- [63] Hammad, F.T., Wheatley, A.M. and Davis, G., Long-term renal effects of unilateral ureteral obstruction and the role of endothelin, *Kidney Int*, 58 (2000) 242-50.
- [64] Haynes, W.G. and Webb, D.J., Contribution of endogenous generation of endothelin-1 to basal vascular tone, *Lancet*, 344 (1994) 852-4.
- [65] Hegarty, N.J., Young, L.S., Kirwan, C.N., O'Neill, A.J., Bouchier-Hayes, D.M., Sweeney, P., Watson, R.W. and Fitzpatrick, J.M., Nitric oxide in unilateral ureteral obstruction: effect on regional renal blood flow, *Kidney Int*, 59 (2001) 1059-65.
- [66] Hegarty, N.J., Young, L.S., O'Neill, A.J., Watson, R.W. and Fitzpatrick, J.M., Endothelin in unilateral ureteral obstruction: vascular and cellular effects, *J Urol*, 169 (2003) 740-4.
- [67] Henegariu, O., Heerema, N.A., Dlouhy, S.R., Vance, G.H. and Vogt, P.H., Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol, *Biotechniques*, 23 (1997) 504-11.
- [68] Henke, W. and Loening, S.A., Recently, betaine has been introduced as an additive in different PCR strategies, *Nucleic Acids Res*, 26 (1998) 687.
- [69] Heyman, S.N., Brezis, M., Greenfeld, Z. and Rosen, S., Protective role of furosemide and saline in radiocontrast-induced acute renal failure in the rat, *Am J Kidney Dis*, 14 (1989) 377-85.
- [70] Hirata, Y., Emori, T., Eguchi, S., Kanno, K., Imai, T., Ohta, K. and Marumo, F., Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells, *J Clin Invest*, 91 (1993) 1367-73.
- [71] Holtke, H.J. and Kessler, C., Non-radioactive labeling of RNA transcripts in vitro with the hapten digoxigenin (DIG); hybridization and ELISA-based detection, *Nucleic Acids Res*, 18 (1990) 5843-51.
- [72] Holtke, H.J., Seibl, R., Burg, J., Muhlegger, K. and Kessler, C., Non-radioactive labeling and detection of nucleic acids. II. Optimization of the digoxigenin system, *Biol Chem Hoppe Seyler*, 371 (1990) 929-38.

- [73] Horgan, P.G., Sarazen, A.A., Lennon, G.M. and Fitzpatrick, J.M., The effect of stones on renal and ureteric physiology, *World J Urol* (1993) 7-12.
- [74] Hu, R.M., Chuang, M.Y., Prins, B., Kashyap, M.L., Frank, H.J., Pedram, A. and Levin, E.R., High density lipoproteins stimulate the production and secretion of endothelin-1 from cultured bovine aortic endothelial cells, *J Clin Invest*, 93 (1994) 1056-62.
- [75] Hu, R.M., Levin, E.R., Pedram, A. and Frank, H.J., Atrial natriuretic peptide inhibits the production and secretion of endothelin from cultured endothelial cells. Mediation through the C receptor, *J Biol Chem*, 267 (1992) 17384-9.
- [76] Ichikawi, I. and Harris, R.C., Angiotensin actions in the kidney: renewed insight into the old hormone, *Kidney Int*, 40 (1991) 583-96.
- [77] Innis, M.A. and Gelfand, D.H., Optimization of PCRs, *M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White (Eds.), PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, San Diego (1990) 3-13.
- [78] Inoue, A., Yanagisawa, M., Takawa, Y., Mitsui, Y., Kobayashi, M. and Masaki, T., The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression, *J Biol Chem*, 264 (1989) 14954-9.
- [79] Iwai-Kanai, E. and Hasegawa, K., Intracellular signaling pathways for norepinephrine- and endothelin-1-mediated regulation of myocardial cell apoptosis, *Mol Cell Biochem*, 259 (2004) 163-8.
- [80] Johnson, C.E., Elder, J.S., Judge, N.E., Adeeb, F.N., Grisoni, E.R. and Fattlar, D.C., The accuracy of antenatal ultrasonography in identifying renal abnormalities, *Am J Dis Child*, 146 (1992) 1181-4.
- [81] Josephson, S. and Hensen, A., Renal tissue endothelin in long-term complete ureteric obstruction in the young rat, *Urol Int*, 53 (1994) 57-61.
- [82] Kahn, S.A., Gulmi, F.A., Chou, S.Y., Mooppan, U.M. and Kim, H., Contribution of endothelin-1 to renal vasoconstriction in unilateral ureteral obstruction: reversal by verapamil, *J Urol*, 157 (1997) 1957-62.
- [83] Kelleher, J.P., Shah, V., Godley, M.L., Wakefield, A.J., Gordon, I., Ransley, P.G., Snell, M.E. and Risdon, R.A., Urinary endothelin (ET1) in complete ureteric obstruction in the miniature pig, *Urol Res*, 20 (1992) 63-5.
- [84] Kessler, C., Holtke, H.J., Seibl, R., Burg, J. and Muhlegger, K., Non-radioactive labeling and detection of nucleic acids. I. A novel DNA labeling and detection system based on digoxigenin: anti-digoxigenin ELISA principle (digoxigenin system), *Biol Chem Hoppe Seyler*, 371 (1990) 917-27.
- [85] Khan, M.A., Dashwood, M.R., Thompson, C.S., Mumtaz, F.H., Mikhailidis, D.P. and Morgan, R.J., Time-dependent up-regulation of endothelin-A receptors and down-regulation of endothelin-B receptors and nitric oxide synthase binding sites in the renal medulla of a rabbit model of partial bladder outlet obstruction: potential clinical relevance, *BJU Int*, 84 (1999) 1073-80.
- [86] Khandjian, E.W., UV crosslinking of RNA to nylon membrane enhances hybridization signals, *Mol Biol Rep*, 11 (1986) 107-15.
- [87] Khandjian, E.W. and Meric, C., A procedure for Northern blot analysis of native RNA, *Anal Biochem*, 159 (1986) 227-32.
- [88] Koh, E., Morimoto, S., Kim, S., Nabata, T., Miyashita, Y. and Ogihara, T., Endothelin stimulates Na⁺/H⁺ exchange in vascular smooth muscle cells, *Biochem Int*, 20 (1990) 375-80.
- [89] Kohno, M., Yasunari, K., Yokokawa, K., Murakawa, K., Horio, T. and Takeda, T., Inhibition by atrial and brain natriuretic peptides of endothelin-1 secretion after stimulation with angiotensin II and thrombin of cultured human endothelial cells, *J Clin Invest*, 87 (1991) 1999-2004.

- [90] Kon, V., Yoshioka, T., Fogo, A. and Ichikawa, I., Glomerular actions of endothelin in vivo, *J Clin Invest*, 83 (1989) 1762-7.
- [91] Lanzone, J.A., Gulmi, F.A., Chou, S.Y., Mooppan, U.M. and Kim, H., Renal hemodynamics in acute unilateral ureteral obstruction: contribution of endothelium-derived relaxing factor, *J Urol*, 153 (1995) 2055-9.
- [92] Lariviere, R. and Lebel, M., Endothelin-1 in chronic renal failure and hypertension, *Can J Physiol Pharmacol*, 81 (2003) 607-21.
- [93] Lear, S., Silva, P., Kelley, V.E. and Epstein, F.H., Prostaglandin E2 inhibits oxygen consumption in rabbit medullary thick ascending limb, *Am J Physiol*, 258 (1990) F1372-8.
- [94] Lee, M.E., Bloch, K.D., Clifford, J.A. and Quertermous, T., Functional analysis of the endothelin-1 gene promoter. Evidence for an endothelial cell-specific cis-acting sequence, *J Biol Chem*, 265 (1990) 10446-50.
- [95] Lipton, H.L., Hauth, T.A., Cohen, G.A. and Hyman, A.L., Functional evidence for different endothelin receptors in the lung, *J Appl Physiol*, 75 (1993) 38-48.
- [96] Lopez, J.A., Armstrong, M.L., Piegors, D.J. and Heistad, D.D., Vascular responses to endothelin-1 in atherosclerotic primates, *Arteriosclerosis*, 10 (1990) 1113-8.
- [97] Macquin-Mavier, I., Levame, M., Istin, N. and Harf, A., Mechanisms of endothelin-mediated bronchoconstriction in the guinea pig, *J Pharmacol Exp Ther*, 250 (1989) 740-5.
- [98] Maeda, S., Miyauchi, T., Iemitsu, M., Tanabe, T., Goto, K., Yamaguchi, I. and Matsuda, M., Endothelin receptor antagonist reverses decreased NO system in the kidney in vivo during exercise, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 286 (2004) E609-14.
- [99] Martin, R., Hoover, C., Grimme, S., Grogan, C., Holtke, J. and Kessler, C., A highly sensitive, nonradioactive DNA labeling and detection system, *Biotechniques*, 9 (1990) 762-8.
- [100] Maruszynski, M. and Pojda, Z., Interleukin 6 (IL-6) levels in the monitoring of surgical trauma. A comparison of serum IL-6 concentrations in patients treated by cholecystectomy via laparotomy or laparoscopy, *Surg Endosc*, 9 (1995) 882-5.
- [101] Masaki, T., Historical review: Endothelin, *Trends Pharmacol Sci*, 25 (2004) 219-24.
- [102] Miura, K., Yukimura, T., Yamashita, Y., Shimmen, T., Okumura, M., Yamanaka, S., Imanishi, M. and Yamamoto, K., Renal and femoral vascular responses to endothelin-1 in dogs: role of prostaglandins, *J Pharmacol Exp Ther*, 256 (1991) 11-7.
- [103] Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H., Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 (1986) 263-73.
- [104] Mullis, K.B., The unusual origin of the polymerase chain reaction, *Sci Am*, 262 (1990) 56-61, 64-5.
- [105] Nunez, D.J., Taylor, E.A., Oh, V.M., Schofield, J.P. and Brown, M.J., Endothelin-1 mRNA expression in the rat kidney, *Biochem J*, 275 (1991) 817-9.
- [106] Pimentel, J.L., Jr., Montero, A., Wang, S., Yosipiv, I., el-Dahr, S. and Martinez-Maldonado, M., Sequential changes in renal expression of renin-angiotensin system genes in acute unilateral ureteral obstruction, *Kidney Int*, 48 (1995) 1247-53.
- [107] Prins, B.A., Hu, R.M., Nazario, B., Pedram, A., Frank, H.J., Weber, M.A. and Levin, E.R., Prostaglandin E2 and prostacyclin inhibit the production and secretion of endothelin from cultured endothelial cells, *J Biol Chem*, 269 (1994) 11938-44.
- [108] Puffenberger, E.G., Hosoda, K., Washington, S.S., Nakao, K., deWit, D., Yanagisawa, M. and Chakravart, A., A missense mutation of the endothelin-B receptor gene in multigenic Hirschsprung's disease, *Cell*, 79 (1994) 1257-66.
- [109] Qiagen, QIAquick PCR Purification Kit Protocol, using a microcentrifuge, *QIAquick Spin Handbook*, Qiagen, Hilden (2000) 18.

- [110] Rao, V.V., Loffler, C. and Hansmann, I., The gene for the novel vasoactive peptide endothelin 3 (EDN3) is localized to human chromosome 20q13.2-qter, *Genomics*, 10 (1991) 840-1.
- [111] Rasmussen, H.N., Rasmussen, O.F., Andersen, J.K. and Olsen, J.E., Specific detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by two-step PCR using hot-start and DMSO, *Mol Cell Probes*, 8 (1994) 99-108.
- [112] Regan, M.C., Young, L.S., Geraghty, J. and Fitzpatrick, J.M., Regional renal blood flow in normal and disease states, *Urol Res* (1995) 1-10.
- [113] Rubanyi, G.M. and Polokoff, M.A., Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology, *Pharmacol Rev*, 46 (1994) 325-415.
- [114] Ryan, P.C., Maher, K.P., Murphy, B., Hurley, G.D. and Fitzpatrick, J.M., Experimental partial ureteric obstruction: pathophysiological changes in upper tract pressures and renal blood flow, *J Urol*, 138 (1987) 674-8.
- [115] Saam, T., Ehmke, H., Haas, C., Ritz, E. and Amann, K., Effect of endothelin blockade on early cardiovascular remodeling in the one-clip-two-kidney hypertension of the rat, *Kidney Blood Press Res*, 26 (2003) 325-32.
- [116] Saari-Kemppainen, A., Karjalainen, O., Ylostalo, P. and Heinonen, O.P., Ultrasound screening and perinatal mortality: controlled trial of systematic one-stage screening in pregnancy. The Helsinki Ultrasound Trial, *Lancet*, 336 (1990) 387-91.
- [117] Saiki, R.K., The design and optimization of the PCR, *H.A. Erlich (Ed.), PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*. Stockton Press, New York (1989) 7-16.
- [118] Saiki, R.K., Optimization of the polymerase chain reaction, *H.A. Erlich, R. Gibbs and H.H. Kazazian Jr. (Eds.), Current Communications in Molecular Biology*. CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989) 25-30.
- [119] Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N., Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science*, 230 (1985) 1350-4.
- [120] Sakurai, T., Yanagisawa, M., Takawa, Y., Miyazaki, H., Kimura, S., Goto, K. and Masaki, T., Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor, *Nature*, 348 (1990) 732-5.
- [121] Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York* (1989).
- [122] Sarkar, G., Kapelner, S. and Sommer, S.S., Formamide can dramatically improve the specificity of PCR, *Nucleic Acids Res*, 18 (1990) 7465.
- [123] Schulsinger, D.A., Gulmi, F.A., Chou, S.Y., Mooppan, U.M. and Kim, H., Activation of endothelium-derived relaxing factor system in acute unilateral ureteral obstruction, *J Urol*, 157 (1997) 1951-6.
- [124] Seibl, R., Holtke, H.J., Ruger, R., Meindl, A., Zachau, H.G., Rasmussen, R., Roggendorf, M., Wolf, H., Arnold, N., Wienberg, J. and et al., Non-radioactive labeling and detection of nucleic acids. III. Applications of the digoxigenin system, *Biol Chem Hoppe Seyler*, 371 (1990) 939-51.
- [125] Seo, B., Oemar, B.S., Siebenmann, R., von Segesser, L. and Luscher, T.F., Both ETA and ETB receptors mediate contraction to endothelin-1 in human blood vessels, *Circulation*, 89 (1994) 1203-8.
- [126] Sheehan, S.J., Moran, K.T., Dowsett, D.J. and Fitzpatrick, J.M., Renal haemodynamics and prostaglandin synthesis in partial unilateral ureteric obstruction, *Urol Res*, 22 (1994) 279-85.

- [127] Shimada, K., Takahashi, M. and Tanzawa, K., Cloning and functional expression of endothelin-converting enzyme from rat endothelial cells, *J Biol Chem*, 269 (1994) 18275-8.
- [128] Simms, D., Cizdziel, P.E. and Chomczynski, P., Trizol: A new Reagent for Optimal Single-Step Isolation of RNA, *Focus*, 15 99-102.
- [129] Simonson, M.S., Endothelins: multifunctional renal peptides, *Physiol Rev*, 73 (1993) 375-411.
- [130] Simonson, M.S. and Dunn, M.J., Cellular signaling by peptides of the endothelin gene family, *Faseb J*, 4 (1990) 2989-3000.
- [131] Simonson, M.S. and Herman, W.H., Protein kinase C and protein tyrosine kinase activity contribute to mitogenic signaling by endothelin-1. Cross-talk between G protein- coupled receptors and pp60c-src, *J Biol Chem*, 268 (1993) 9347-57.
- [132] Sorokin, A. and Kohan, D.E., Physiology and pathology of endothelin-1 in renal mesangium, *Am J Physiol Renal Physiol*, 285 (2003) F579-89.
- [133] Southern, E.M., Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *J Mol Biol*, 98 (1975) 503-17.
- [134] Stief, C.G., Uckert, S., Truss, M.C., Becker, A.J., Machtens, S. and Jonas, U., A possible role for nitric oxide in the regulation of human ureteral smooth muscle tone in vitro, *Urol Res*, 24 (1996) 333-7.
- [135] Sudjarwo, S.A., Hori, M., Tanaka, T., Matsuda, Y., Okada, T. and Karaki, H., Subtypes of endothelin ETA and ETB receptors mediating venous smooth muscle contraction, *Biochem Biophys Res Commun*, 200 (1994) 627-33.
- [136] Sugimoto, K., Tsuruoka, S. and Fujimura, A., Renal protective effect of YM598, a selective endothelin ET(A) receptor antagonist, against diabetic nephropathy in OLETF rats, *Eur J Pharmacol*, 450 (2002) 183-9.
- [137] Sullivan, M.E., Mumtaz, F.H., Khan, M.A., Dashwood, M.R., Thompson, C.S., Mikhailidis, D.P. and Morgan, R.J., Endothelins in the urinary tract, *BJU Int*, 86 (2000) 97-106.
- [138] Sweeney, P., Young, L.S. and Fitzpatrick, J.M., An autoradiographic study of regional blood flow distribution in the rat kidney during ureteric obstruction- the role of vasoactive compounds, *BJU Int*, 88 (2001) 268-72.
- [139] Thiemermann, C., Lidbury, P.S., Thomas, G.R. and Vane, J.R., Endothelin-1 releases prostacyclin and inhibits ex vivo platelet aggregation in the anesthetized rabbit, *J Cardiovasc Pharmacol*, 13 (1989) S138-41; discussion S142.
- [140] Tian, X.F., Tang, G.Y. and Chen, Y.P., [Renoprotective effects of nonselective endothelin receptor antagonist bosentan on rats with interstitial fibrosis following unilateral ureteral obstruction], *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 83 (2003) 510-4.
- [141] Truong, L.D., Choi, Y.J., Tsao, C.C., Ayala, G., Sheikh-Hamad, D., Nassar, G. and Suki, W.N., Renal cell apoptosis in chronic obstructive uropathy: The roles of caspases, *Kidney Int*, 60 (2001) 924-34.
- [142] Truong, L.D., Petrusavska, G., Yang, G., Gurpinar, T., Shappell, S., Lechago, J., Rouse, D. and Suki, W.N., Cell apoptosis and proliferation in experimental chronic obstructive uropathy, *Kidney Int*, 50 (1996) 200-7.
- [143] Vandenvelde, C., Verstraete, M. and Van Beers, D., Fast Multiplex polymerase chain reaction on boiled clinical samples for rapid viral diagnosis, *J Virol Methods*, 30 (1990) 215-27.
- [144] Walsh, P.C., *Campbell's Urology*, 8th edn., W.B. Saunders Company, 2002, 3954 pp.
- [145] Wang, X., Douglas, S.A., Feuerstein, G.Z. and Ohlstein, E.H., Temporal expression of ECE-1, ET-1, ET-3, ETA, and ETB receptor mRNAs after balloon angioplasty in the rat, *J Cardiovasc Pharmacol*, 26 (1995) S22-5.

-
- [146] Warner, T.D., Allcock, G.H., Corder, R. and Vane, J.R., Use of the endothelin antagonists BQ-123 and PD 142893 to reveal three endothelin receptors mediating smooth muscle contraction and the release of EDRF, *Br J Pharmacol*, 110 (1993) 777-82.
- [147] Wenzel, R.R., Ruthemann, J., Bruck, H., Schafers, R.F., Michel, M.C. and Philipp, T., Endothelin-A receptor antagonist inhibits angiotensin II and noradrenaline in man, *Br J Clin Pharmacol*, 52 (2001) 151-7.
- [148] Wilhelm, S.M., Stowe, N.T., Robinson, A.V. and Schulak, J.A., The use of the endothelin receptor antagonist, tezosentan, before or after renal ischemia protects renal function, *Transplantation*, 71 (2001) 211-6.
- [149] Xiang, X., Qiu, D., Hegele, R.D. and Tan, W.C., Comparison of different methods of total RNA extraction for viral detection in sputum, *J Virol Methods*, 94 (2001) 129-35.
- [150] Xu, D., Emoto, N., Giaid, A., Slaughter, C., Kaw, S., deWit, D. and Yanagisawa, M., ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1, *Cell*, 78 (1994) 473-85.
- [151] Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K. and Masaki, T., A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells, *Nature*, 332 (1988) 411-5.
- [152] Yoshimoto, S., Ishizaki, Y., Sasaki, T. and Murota, S., Effect of carbon dioxide and oxygen on endothelin production by cultured porcine cerebral endothelial cells, *Stroke*, 22 (1991) 378-83.
- [153] Young, L.S., Hegarty, N.J. and Fitzpatrick, J.M., Obstructive uropathy, *Curr Opin Urol*, 8 (1998) 119-124.

IX. Anhang

IX.1 Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Aminosäuresequenz und Struktur von Endothelin-1	9
Abbildung 2 : Expression und Wirkung von ET-1	11
Abbildung 3: Gel-Elektrophorese von RNA	23
Abbildung 4: Schema der PCR-Amplifikation.....	24
Abbildung 5: Schema der Arbeitsschritte	25
Abbildung 6: Guanin, Cytosin, Adenin, Thymin	26
Abbildung 7: Modell einer Multiplex PCR.....	27
Abbildung 8: Das Digoxigenin-Molekül.....	29
Abbildung 9: Lumineszenz-Detektion	30
Abbildung 10: Gel mit PCR-Proben für DNA-Sonden	32
Abbildung 11: Reaktionsbedingungen für cDNA-Synthese	35
Abbildung 12: cDNA-Synthese, RT-PCR und Ethidiumbromid Nachweis.....	35
Abbildung 13: Optimieren der Zyklenzahl	36
Abbildung 14: Expression von ET-1	37
Abbildung 15: Duplex-PCR-Systeme.....	37
Abbildung 16: Foto von ECE-1, ET-1, ETAR und ETBR.....	39
Abbildung 17: Zeitliche Kinetik der Expression von ECE-1.....	40
Abbildung 18: Verhältnis der Expression von ECE-1 zwischen obstruierter und nicht-obstruierter Niere.....	41
Abbildung 19: Zeitliche Kinetik der Expression von ET-1	42
Abbildung 20: Verhältnis der Expression von ET-1 zwischen obstruierter und nicht-obstruierter Niere.....	43
Abbildung 21: Zeitliche Kinetik der Expression von ETAR	44
Abbildung 22: Verhältnis der Expression von ETAR zwischen obstruierter und nicht-obstruierter Niere	45
Abbildung 23: Verhältnis der Expression von ETBR zwischen obstruierter und nicht-obstruierter Niere	46
Abbildung 24: Zeitliche Kinetik der Expression von ETBR	47
Abbildung 25: Northern Blot mit ET-1 und GAPDH.....	48
Abbildung 26: ET-1 Expression Northern Blot.....	49
Abbildung 27: cDNA-Synthese mit Nebenreaktionsprodukten, GAPDH-Primer.....	51

IX.2 Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Ursachen für UUO.....	6
Tabelle 2: Regulation der Endothelinrezeptoren.....	12
Tabelle 3: standardisiertes Rattenmodell.....	20
Tabelle 4: Extinktionsmaxima	21
Tabelle 5: RT Mastermix	24
Tabelle 6: Annealing-Temperaturen.....	34
Tabelle 7: Probennummern des Northern Blot	48
Tabelle 8: Primerliste (s: sense; a: antisense).....	82
Tabelle 9: Testung auf Signifikanz für ECE-1.....	82
Tabelle 10: Testung auf Signifikanz für ET-1.....	83
Tabelle 11: Testung auf Signifikanz für ETAR.....	83
Tabelle 12: Testung auf Signifikanz für ETBR.....	84
Tabelle 13: Legende der Proben von Abbildung 16, Seite 39.....	84

IX.3 Abkürzungen

A	Ampere
AK	Antikörper
AMV-RT	Avian Reverse Transkriptase
ANOVA	ANalysis Of VAriance (Varianzanalyse)
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
ANV	akutes Nierenversagen
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäuren
Asp	Asparagin
AT-1	Angiotensin-1
Bp	Basenpaare
BSA	
BUO	bilaterale ureterale Obstruktion
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
Chloroform	Trichlormethan
CSPD	Disodium 3-(4-meth-oxyspiro {1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro) tricyclo [3.3.1.1 ^{3,7}] decan}-4-yl) phenyl phosphate
CUO	chronische ureterale Obstruktion
Cys	Cystin
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
dATP	2'-Deoxyadenosin 5'-Triphosphat (C ₁₀ H ₁₂ N ₅ O ₁₂ P ₃ Na ₄)
dCTP	2'-Desoxycytidin 5'-Triphosphat (C ₉ H ₁₂ N ₃ O ₁₃ P ₃ Na ₄)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	2'-Desoxyguanosin 5'-Triphosphat (C ₁₀ H ₁₂ N ₅ O ₁₃ P ₃ Na ₄)
Dig-dUTP	Digoxigenin-11-2'-desoxy-Uridin-5'-Triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dTTP	2'-Desoxythymidin 5'-Triphosphat (C ₁₀ H ₁₃ N ₂ O ₁₄ P ₃ Na ₄)
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
ECE-1	Endothelin Converting-Enzyme-1
EDRF	Endothelium derived relaxing factor (=NO)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
ET-1	Endothelin-1
ETAR	Endothelin A-Rezeptor
ETBR	Endothelin B-Rezeptor
G	Erdbeschleunigung (9,81 m/s)
g	Gramm
GAPDH	Glutamat-Adenosin-Phosphat-Dehydrogenase
GF	Growth Factor
Glu	Glutamin
G-Protein	Guanin-Nukleotid-bindendes Protein
h	Stunden
His	Histidin

IP-3	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
Ile	Isoleucin
Isopropanol	2-Propanol
Leu	Leucin
Lys	Lysin
M	Molar (mol/L)
m	milli (1/1000)
Met	Methionin
mmHg	Quecksilbersäule in mm
MOPS	Morpholinopropan-Sulfonsäure
mRNA	messenger RNA
OD	optische Dichte
Oligo-dT	Oligonukleotid aus desoxy-Thymidinen
p	piko
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Platelet derived Growth Factor
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
Phe	Phenylalanin
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
(R)RBF	(regionaler) renaler Blutfluß
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (= Natriumdodezylsulfat)
Ser	Serin
TAE	Tris-Acetat-Puffer
Taq	Archäobakterium <i>Thermus Aquaticus</i>
TGF-β1	Transforming growth factor beta 1
TNAE	Tris-Natrium-Acetat-Puffer
TRIS	Tris-(Hydroxymethyl-)Aminomethan
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
U	Units (Einheiten)
UUO	unilaterale ureterale Obstruktion
V	Volt
Val	Valin
Vol.	Volumenanteile

IX.4 Oligonukleotid-Sequenzen

Primer	Sequenz	Fragmentgröße
GAPDH s	5'-TCCCTCAAGATTGTCAGC-3'	308 bp
GAPDH a	5'-AGATCCACAACGGATACA-3'	
ECE-1 s	5'-CGTAGCGATAGTCTTAGCAC-3'	529 bp
ECE-1 a	5'-GTGCCACACCAAACACTACAG-3'	
ET-1 s	5'-TCTTCTCTCTGCTGTTTGTGGCTT-3'	407 bp
ET-1 a	5'-TCTTTTACGCCTTTCTGCATGGTA-3'	
ETAR s	5'-AGTGCTAATCTAAGCAGCCAC-3'	491 bp
ETAR a	5'-CAGGAAGCCACTGCTCTGTAC-3'	

ETBR s 5'-TTCCA ACTCCAGTCTGATGCG-3' 638 bp
 ETBR s 5'-CTGTCTTG TAAA ACTGCATGAAG-3'

Tabelle 8: Primerliste (s: sense; a: antisense)

IX.5 Statistik

IX.5.I ECE-1

Estimates					
Gruppe	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
A	0.1140	0.2008	19	0.57	0.5767
B	-0.3236	0.2008	19	-1.61	0.1234
C	-0.1110	0.2008	19	-0.55	0.5869
D	-0.4102	0.2108	19	-1.95	0.0666
E	0.1464	0.1660	19	0.88	0.3887
F	0.06285	0.2258	19	0.28	0.7838
G	-0.01814	0.2108	19	-0.09	0.9323
H	-0.2343	0.1487	19	-1.58	0.1316
I	-0.7729	0.1669	19	-4.63	0.0002
J	-0.8104	0.1663	19	-4.87	0.0001

Tabelle 9: Testung auf Signifikanz für ECE-1

IX.5.II ET-1

Estimates					
Gruppe	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
A	0.2704	0.2482	19	1.09	0.2896
B	0.4220	0.2482	19	1.70	0.1054
C	-0.3873	0.2482	19	-1.56	0.1352
D	-0.7578	0.2482	19	-3.05	0.0065
E	-0.04148	0.2124	19	-0.20	0.8472
F	-0.1222	0.2482	19	-0.49	0.6280
G	-0.1432	0.2482	19	-0.58	0.5706
H	-0.8617	0.1888	19	-4.56	0.0002

Estimates					
Gruppe	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
I	-0.6866	0.2160	19	-3.18	0.0049
J	-0.8525	0.1957	19	-4.36	0.0003

Tabelle 10: Testung auf Signifikanz für ET-1

IX.5.III ETAR

Estimates					
Gruppe	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
A	0.07251	0.5524	19	0.13	0.8969
B	-1.8655	0.5524	19	-3.38	0.0032
C	0.4063	0.5524	19	0.74	0.4710
D	0.7965	0.5524	19	1.44	0.1656
E	-0.05602	0.4724	19	-0.12	0.9068
F	1.2333	0.5524	19	2.23	0.0378
G	0.3964	0.5524	19	0.72	0.4817
H	-0.4679	0.3973	19	-1.18	0.2535
I	-1.0879	0.4807	19	-2.26	0.0356
J	-3.0922	0.4345	19	-7.12	<.0001

Tabelle 11: Testung auf Signifikanz für ETAR

IX.5.IV ETBR

Estimates					
Gruppe	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
A	0.1741	0.3769	18	0.46	0.6496
B	0.2173	0.3769	18	0.58	0.5713
C	0.3529	0.3769	18	0.94	0.3615
D	-0.6359	0.3769	18	-1.69	0.1088
E	-0.4019	0.3354	18	-1.20	0.2464
F	0.9300	0.3769	18	2.47	0.0239
G	0.6272	0.4179	18	1.50	0.1508
H	0.2902	0.2837	18	1.02	0.3199

Estimates					
Gruppe	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
I	0.06546	0.3278	18	0.20	0.8440
J	0.2301	0.2978	18	0.77	0.4497

Tabelle 12: Testung auf Signifikanz für ETBR

IX.5.V Legende der Proben von Abbildung 16, Seite 39

Obstruktionsdauer	Niere	Probenname	Slot #
2 Tage	obstruiert	H1L	1
6 Std.	obstruiert	E2L	2
4 Tage	obstruiert	I1La	3
4 Tage	obstruiert	I2L	4
4 Tage	scheinoperiert	I5L	5
4 Tage	nicht obstruiert	I1Ra	6
4 Tage	nicht obstruiert	I2R	7
4 Tage	nicht obstruiert	I1Rb	8
4 Tage	scheinoperiert	I5R	9
30 Tage	obstruiert	J1L	10
30 Tage	obstruiert	J2La	11
30 Tage	obstruiert	J2Lb	12
4 Tage	obstruiert	I1Lb	13
30 Tage	nicht obstruiert	J1R	14
30 Tage	nicht obstruiert	J2Ra	15
30 Tage	nicht obstruiert	J2Rb	16
30 Tage	scheinoperiert	J5R	17
30 Tage	scheinoperiert	J5L	18
2 Tage	obstruiert	H2L	19
2 Tage	obstruiert	H8L	20
2 Tage	scheinoperiert	H9L	21
2 Tage	nicht obstruiert	H1R	22
2 Tage	nicht obstruiert	H2R	23
2 Tage	nicht obstruiert	H8R	24
2 Tage	scheinoperiert	H9R	25
6 Std.	obstruiert	E1L	26
6 Std.	obstruiert	E4L	27

Tabelle 13: Legende der Proben von Abbildung 16, Seite 39

X. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei meinem Betreuer, Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Marc-Oliver Grimm, für die unermüdliche Unterstützung und gewissenhafte Korrektur meiner Arbeit bedanken. Ohne seine Anregungen und Ideen wäre die Arbeit in dieser Form nicht entstanden. Auch Herrn Priv.-Doz. Dr. med. T. A. Vögeli und Herrn Dr. med. Marcello Bendhack gilt mein Dank, die mich zu Beginn der experimentellen Arbeit im Labor und auch später beraten haben.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Ulrich Germing danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Colin R. MacKenzie für seine Bereitschaft als 3. Prüfer.

Frau Dr. Ute Brosius (Kinderklinik, Heinrich-Heine-Universität) danke ich für die Herstellung der radioaktiv markierten Sonden, die Hybridisierung dieser mit den Northern Blots sowie die Detektion auf Röntgenfilm.

Dr. R. Willers vom Rechenzentrum der Heinrich-Heine-Universität danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der statistischen Berechnungen.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Schulz danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit sowie seine Unterstützung im Labor.

Über die Angeführten hinaus bedanke ich mich bei allen Angestellten und Ehemaligen des Urologischen Forschungslabors der Heinrich-Heine-Universität sowie denjenigen des Fachbereichs, die mir auf die eine oder andere Art und Weise während meiner praktischen Tätigkeit dort hilfreich und unterstützend zur Seite gestanden sind.

Meinen besonderen Dank möchte ich an dieser Stelle meiner Familie und Freunden aussprechen, die mich stets ermutigt und motiviert haben, die Arbeit zu einem erfolgreichen Abschluß zu bringen!

XI. Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß die vorliegende Arbeit selbständig von mir verfaßt ist.

Es wurden lediglich die aufgeführten Hilfsmittel verwendet sowie die vermerkten Literaturquellen herangezogen und die daraus zitierten Stellen als solche ausgewiesen.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Geburtsdatum 4. August 1973
Geburtsort Hamburg
Konfession Evangelisch-lutherisch
Staatsangehörigkeit Deutsch

ARBEITSERFAHRUNG

- Datum 27. Februar 2006 - aktuell
- Institution Universitätskrankenhaus Uppsala, Schweden
- Funktion **Assistenzarzt Anästhesie**

- Datum 1. Oktober 2004 – 30. September 2005
- Institution Kantonsspital Frauenfeld, CH-8501 Frauenfeld
- Funktion **Assistenzarzt Chirurgie**

- Datum 1. Oktober 2001 – 31. Juni 2004
- Institution Kantonsspital Frauenfeld, CH-8501 Frauenfeld
- Funktion **Assistenzarzt Anästhesie**

- Datum 2000 – 2001
- Institution
 - Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
 - Kantonsspital St. Gallen
- Tätigkeitsbereich Je 4 Monate Innere Medizin, Anästhesie und Chirurgie
- Funktion **Student im Praktischen Jahr / Unterassistent**

SCHUL- UND BERUFSBILDUNG

- Datum 1996 – 2001
- Institution Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Qualifikation Staatsexamen Humanmedizin mit der Note “gut“

- Datum 1994 – 1996
- Institution Universität Hamburg
- Qualifikation Studium der Humanmedizin, Physikum mit der Note “gut“

...

- Datum 1993 – 1994
- Institution Hospital zum Heiligen Geist, Hamburg
- Tätigkeit Wehersatzdienst in der Alten- und Krankenpflege

- Datum 1984 – 1993
- Institution Gymnasium Harksheider Straße, Hamburg
- Qualifikation Abitur mit der Note 1,8

- Datum 1980 – 1984
- Institution Ludwig-Frahm-Schule, Hamburg
- Qualifikation Grundschulabschluß

SPRACHEN

- Sehr gute Englischkenntnisse
- Ausbaufähiges Schweizerdeutsch
- Grundkenntnisse Schwedisch

Abstract

Die postrenale Obstruktion ist der häufigste pathologische Zustand des Urogenitalsystems. In der Frühphase kommt es durch eine Vasodilatation am Vas afferens zu einer Steigerung der Nierendurchblutung. Dagegen ist die Spätphase durch eine renale Vasokonstriktion geprägt (sog. biphasisches Modell der unilateralen ureteralen Obstruktion). Welche (vasoaktiven) Substanzen die Reaktion auf die unilaterale ureterale Obstruktion insbesondere im zeitlichen Verlauf bestimmen ist nicht im Detail verstanden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von Faktoren des Endothelinsystems bei unilateraler ureteraler Obstruktion (UUO) im Rattenmodell untersucht.

Die Nieren von männlichen Sprague-Dawley-Ratten wurden an zehn definierten Zeitintervallen (0 bis 30 Tage) nach Beginn einer unilateralen ureteralen Obstruktion entnommen und untersucht. In jeder Gruppe wurden scheinoperierte Tiere als Kontrolle mitgeführt, um den Einfluss des Operationsstresses zu ermitteln. Die mRNA-Expression von Endothelin-1 (ET-1), Endothelin-Converting-Enzyme (ECE-1), Endothelin A-Rezeptor (ETAR) und Endothelin B-Rezeptor (ETBR) wurde mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht. Darüber hinaus wurden Northern Blots zur Validierung der RT-PCR Ergebnisse eingesetzt.

In der Frühphase ergaben sich bei der Auswertung der Kurvenverläufe Hinweise auf Änderungen des Expressionsniveaus folgender Faktoren: Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Expression von ETAR der obstruierten Nieren. Ein Anstieg von ECE-1 und ET-1 in der obstruierten Niere wurde beschrieben, konnte aber nicht als statistisch signifikant nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde ein ebenfalls nicht-signifikanter Anstieg der Expression des Endothelin B-Rezeptors, der eine Vasodilatation vermittelt, in der nicht-obstruierten Niere beobachtet.

Als wesentlicher Befund konnte in der Spätphase der UUO ein signifikanter Expressionsanstieg von ECE-1, ETAR sowie ET-1 in der obstruierten Niere nachgewiesen werden.

Der Expressionsverlauf der untersuchten Gene in den Nieren mit nicht obstruiertem Harnleiter und der scheinoperierten Tiere wies weder in der Frühphase, noch in der Spätphase statistisch signifikante Unterschiede auf.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß für ECE-1, ET-1 sowie wahrscheinlich auch ETAR eine zeitliche Kinetik bei UUO existiert, wodurch ihre Rolle bei der Pathogenese dieser Erkrankung weiter untermauert wird. Dabei vermittelt ET-1 mit ECE-1 als Schrittmacherenzym über den A-Rezeptor eine anhaltende renale Vasokonstriktion. Die durch die ET-1 vermittelte Vasokonstriktion induzierte Minderdurchblutung des ohnehin nur eben ausreichend oxygenierten Nierenmarkes könnte maßgeblich für den Verlust von Nephronen und letztlich somit klinisch für den Verlust der Nierenfunktion des betroffenen Organs verantwortlich sein. Die Beobachtung, daß die Expression des B-Rezeptors, der mittels NO-Synthese Vasodilatation vermittelt, konstant bleibt, ist ein zusätzlicher Beleg für das Überwiegen der Vasokonstriktoren gegenüber den Vasodilatoren.

Für das genauere Verständnis der Rolle der Endotheline bei UUO ist eine weitere Analyse an diesen Stellen erforderlich.

PD Dr. med. Marc-Oliver Grimm