

Aus der Universitätsklinik für Anästhesiologie und operative  
Intensivmedizin der Medizinischen Fakultät der

Martin-Luther-Universität-Halle-Wittenberg

(Direktor: Prof. Dr. med. Michael Bucher)

**Expressionsregulation der organischen Anionentransporter  
OAT1 und OAT3 im Ischämie-Reperfusion-Modell**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von: Christina Braun, geb. Preising

geboren am 20.01.1987 in Nordhausen (Thüringen)

Betreuer: Prof. Dr. med. Michael Bucher

Gutachter: Prof. Dr. med. Michael Bucher

Prof. Dr. med. Matthias Girndt

Univ.-Prof. Dr. med. Alexander Zarbock

10.10.2017

11.06.2018

## Referat

Der akute ischämisch bedingte Nierenschaden (acute kidney injury, AKI) stellt nach wie vor eine große therapeutische Herausforderung dar und ist mit einer hohen Mortalität verbunden. Prostaglandine spielen für die renale Hämodynamik sowie die Beeinflussung der glomerulären Filtrationsrate und Harnkonzentrierung eine entscheidende Rolle und sind in die Pathogenese des akuten Nierenschadens erheblich involviert.

Die organischen Anionentransporter Typ 1 und 3 (OAT1/SLC22A6; OAT3/SLC22A8) befinden sich in den proximalen Tubuluszellen der Nieren und sind für die Ausscheidung von potentiell toxischen Stoffen verantwortlich. Sie befinden sich in der basolateralen Zellmembran und vermitteln den terminalen Schritt eines tertiär aktiven Transportes zur Elimination organischer Anionen.

Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass es durch eine Ischämie-Reperfusion zur Herunterregulation dieser organischen Anionentransporter kommt. Außerdem führt Prostaglandin E<sub>2</sub> nach Langzeitexposition in Epithelzellen des proximalen Tubulus zu einer verminderten Expression von OAT1 und OAT3 (Sauvant C et al. 2006). Sowohl in der akuten, als auch bei chronischer Niereninsuffizienz sind die Prostaglandinlevel im Nierencortex erhöht.

Indometacin als unspezifischer Hemmer der Prostaglandin-E<sub>2</sub>-Synthese kann eine Herunterregulation von OAT1 und OAT3 im Tiermodell nach erfolgter Ischämie-Reperfusion abschwächen. Auch in proximalen Tubuluszellen von Ratten konnte diese Wirkung nachgewiesen werden. Zudem wurde nicht nur die Herunterregulation vermindert, sondern auch das renale Outcome, gemessen an der GFR, verbessert (Schneider R et al. 2009). Diese Effekte wurden vor allem über COX1-Hemmer mediiert, während selektive COX2-Hemmer eine eher untergeordnete Rolle zu spielen scheinen. Eine Abschwächung der Expression von OAT1 und OAT3 scheint also mechanistisch in die Schädigung durch eine Ischämie-Reperfusion involviert zu sein.

Folglich wurde in dieser Arbeit ein tieferer Einblick in die Expressionsregulation der genannten Transporter nach Ischämie-Reperfusion vorgenommen um weitere Erkenntnisse über die pathogenetischen Vorgänge des ischämischen Nierenschadens zu erhalten. Dabei konnte in Fluorescein-Aufnahme-Versuchen und Promotor-Gen-Assays anhand der sekretorischen alkalische Phosphatase (SEAP) die Regulation dieser bisher bekannten Effekte auf transkriptioneller Ebene beobachtet werden und außerdem die Vermittlung über den Prostaglandin-E<sub>4</sub>-Rezeptor und einer nachgeschalteten Signalkaskade nachgewiesen werden. Durch Verwendung einer humanen Zelllinie lässt sich über eine Übertragbarkeit dieser Aussagen auf den Menschen spekulieren. Das verwendete Ischämie-Reperfusions-Modell und die Promotor-Gen-Assays sind für weitere Expressionsforschung an hOAT1 und hOAT3 geeignet.

Braun, Christina: Expressionsregulation der organischen Anionentransporter OAT1 und OAT3 im Ischämie-Reperfusions-Modell, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 61 Seiten, 2017

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Die akute Nierenschädigung.....	1
1.1.1 Definition und Inzidenz .....	1
1.1.2 Ätiologie .....	2
1.1.3 Pathophysiologie.....	2
1.1.4 Prävention und Therapie .....	5
1.2 Cyclooxygenasen .....	7
1.2.1 Prostaglandinsynthese.....	8
1.2.2 Prostaglandinrezeptoren .....	9
1.3 Organische Anionentransporter OAT1 und OAT3.....	10
1.3.1 Der organische Anionentransporter Typ 1 (OAT1) .....	12
1.3.2 Der organische Anionentransporter Typ 3 (OAT3) .....	12
1.3.3 Regulation des renalen Transportes organischer Anionen.....	12
1.4 Das in-vitro Ischämie-Reperfusion-Modell .....	14
<b>2. Zielstellung</b> .....	<b>15</b>
<b>3. Material und Methodik</b> .....	<b>16</b>
3.1 Zell-Kultur .....	16
3.2 In vitro Ischämie-Reperfusion-Modell .....	16
3.3 Fluorescein-Aufnahme .....	17
3.4 Bestimmung des Proteingehaltes mittels Bichinoninsäure (BCA).....	18
3.5 Klonierung der fraglichen hOAT1- und hOAT3 Promotorsequenzen.....	19
3.6 Reporter-Gen-Assay (SEAP).....	20
3.6.1 Transfektion von hOAT1 und hOAT3 .....	20
3.6.2 Transfektion des SEAP-Basic .....	20
3.6.3 Hypoxiebehandlung mit anschließender Reperfusion.....	21
3.6.4 Analyse der SEAP-Aktivität und $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmung .....	21
3.7 R(erverse)-T(ranscriptase)-PCR.....	22
3.8 Datenanalyse.....	23

<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>25</b>
4.1 Fluorescein-Transport in proximale Tubuluszellen (OK-Zellen) auf die Expressionsregulation von hAOT1 und hOAT3.....	25
4.1.1 Effekte von Proteinkinase-A- und Phospholipase-C-Inhibitoren auf die Expressionsregulation von hAOT1 und hOAT3 .....	25
4.1.2 Effekte von EP2- und EP4-Antagonisten auf die Expressionsregulation von hAOT1 und hOAT3 .....	26
4.1.3 Effekte von EP2- und EP4-Agonisten auf die Expressionsregulation von hAOT1 und hOAT3 .....	28
4.2 Reporter-Gen-Assays.....	29
4.2.1 Effekte von COX-Inhibitoren auf die Expressionsregulation von hAOT1 und hOAT3 .....	29
4.2.2 Effekte von EP2- und EP4-Antagonisten auf die Expressionsregulation von hAOT1 und hOAT3 .....	33
4.2.3 Effekte von EP2- und EP4-Agonisten auf die Expressionsregulation von hAOT1 und hOAT3 .....	35
4.2.4 Nachweis von EP2- und EP4-mRNA .....	38
<b>5. Diskussion</b> .....	<b>39</b>
5.1 Allgemeines .....	39
5.2 Fluorescein-Transport in proximale Tubuluszellen (OK-Zellen) .....	39
5.3 Reporter-Gen-Assays.....	41
5.4 Einordnung der Ergebnisse in bisher veröffentlichte Literatur .....	42
<b>6. Zusammenfassung</b> .....	<b>44</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>46</b>
<b>8. Thesen</b> .....	<b>61</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ADH	Antidiuretisches Hormon
ADP	Adenosindiphosphat
AKI	<i>acute kidney injury</i> , akute Nierenschädigung
AKIN	Acute Kidney Injury Network
ANV	akutes Nierenversagen
ASS	Acetylsalicylsäure
AT-II	Angiotensin II
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i> , Bicinchoninsäure
bp	Basenpaare
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffmonoxid
COX	Cyclooxygenase
CRE	<i>c-responsive element</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i> , Epidermaler Wachstumsfaktor
EP1	Prostaglandin-(Rezeptor) E <sub>1</sub>
EP2	Prostaglandin-(Rezeptor) E <sub>2</sub>
EP3	Prostaglandin-(Rezeptor) E <sub>3</sub>
EP4	Prostaglandin-(Rezeptor) E <sub>4</sub>
ESRD	End Stage Renal Disease
ET-1	Endothelin 1
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
h	<i>hour</i> , Stunde
HEK	<i>Human Embryonal Kidney</i> , humane embryonale Nieren (-Zellen)
IGFBP-7	<i>insulin-like growth factor-binding protein-7</i>
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IP	Inositolphosphat
K <sup>+</sup>	Kalium
kDa	Kilo-Dalton
KDIGO	<i>Kidney Disease: Improving Global Outcomes</i>
KG	Körpergewicht
K <sub>i</sub>	Dissoziationskonstante der Enzym-Inhibitor-Verbindung
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
Na <sup>+</sup>	Natrium
Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase	Natrium-Kalium-ATPase
NGAL	<i>neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NSAID	<i>non-steroidal anti-inflammatory drug</i> , nichtsteroidale Anti-rheumatika
OA <sup>-</sup>	organisches Anion
(h)OAT1	(humaner) Organischer Anionentransporter Typ 1
(h)OAT3	(humaner) Organischer Anionentransporter Typ 3

OK (-Zellen)	<i>Opposum Kidney</i>
P	Phosphat
PAH	p-Aminohippurat
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandin D <sub>2</sub>
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PGF <sub>2α</sub>	Prostaglandin F <sub>2α</sub>
PGG <sub>2</sub>	Prostaglandin G <sub>2</sub>
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandin H <sub>2</sub>
PKA	Proteinkinase A
PLC	Phospholipase C
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
RAAS	Renin-Aldosteron-Angiotensin-System
RIFLE	Akronym für Risk, Injury, Failure, End Stage Renal Disease
RIPC	<i>remote ischaemic preconditioning</i> , ischämische Fernpräkonditionierung
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> , Drehzahl pro Minute
RT-PCR	<i>r(everse)-T(ranscriptase) polymerase chain reaction</i> , Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
SEAP	<i>secretory alkaline phosphatase</i>
sog.	sogenannt
Std	Stunden
TIMP-2	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase-2</i>
TNFα	Tumor-Nekrose-Faktor α
TXS	Thromboxan
αKG <sup>2-</sup>	Alpha-Ketoglutarat
αSMA	<i>Alpha-smooth-muscle-actin</i>

# 1. Einleitung

## 1.1 Die akute Nierenschädigung

### 1.1.1 Definition und Inzidenz

Der Begriff des "akuten Nierenversagens" (ANV) ist durch den Terminus "akute Nierenschädigung" (acute kidney injury, AKI) ersetzt worden. AKI kann bei zuvor normaler Nierenfunktion oder als akute Schädigung auf eine vorbestehende Niereninsuffizienz auftreten und ist prinzipiell reversibel. Es kommt zu einer raschen Abnahme der Nierenfunktion innerhalb von Stunden bis Tagen, verbunden mit der Retention harnpflichtiger Substanzen und zunehmender Überwässerung des Organismus, sowie einer Störung des Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushaltes. Die Einführung des neuen Ausdrucks soll die Erfassung eines Funktionsverlustes mit reduzierter glomerulärer Filtrationsrate (GFR), als auch eine Nierenschädigung mit (noch) nicht reduzierter Funktion ermöglichen. Denn auch bei einer nicht dialysepflichtigen Reduktion der Nierenleistung ist die Mortalität signifikant erhöht (Hoste EA et al. 2006, Uchino S et al. 2006). In der Gesamtbevölkerung kommt es bei 5.000 Erwachsenen/Jahr pro 1.000.000 Einwohner zu einer akuten Nierenschädigung. Je nach Patientenkollektiv sind auf Intensivstationen bis zu 30% der Patienten davon betroffen (Bellomo R et al. 2012, Susantithaphong P et al. 2013 und Rewa O, Bagshaw SM, 2014).

Die 2004 entwickelten RIFLE-Kriterien (Risk, Injury, Failure, Loss, Endstage renal disease) zur Einteilung des Schweregrades wurden in den Folgejahren durch das Acute Kidney Injury Network (AKIN) überarbeitet und präzisiert. Hierbei wurde durch einen Serum-Kreatinin-Anstieg von bereits  $\geq 0,3$  mg/dl innerhalb von 48 Stunden die Sensitivität in der Diagnosestellung erhöht (Mehta RL et al. 2007). Die KDIGO-Leitlinie (Kidney Disease: Improving Global Outcome) aus dem Jahr 2012 fasst diese Kriterien nun zusammen. Eine Schweregradeinteilung ist in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: KDIGO-Kriterien der akuten Nierenschädigung (nach KDIGO AKI Work Group, 2012)

AKI-Stadium	Serum-Kreatinin	Urinausscheidung
1	1,5-1,9-facher Kreatinin-Anstieg in 7 Tagen oder Kreatinin-Anstieg $\geq 0,3$ mg/dl (26,5 $\mu$ mol/l) innerhalb 48 h	<0,5 ml/kgKG/h in 6 h
2	2-2,9 -facher Kreatinin-Anstieg	<0,5 ml/kgKG/h in 12 h
3	>3-facher Kreatinin-Anstieg oder Kreatinin >4mg/dl (353 $\mu$ M) + akuter Anstieg $\geq 0,5$ mg/dl (44,2 $\mu$ mol/l)	<0,3 ml/kgKG/h in 24 h oder Anurie für $\geq 12$ h

Insgesamt handelt es sich bei einer AKI immer noch um einen häufig auftretenden Organschaden mit vielfältigen Ursachen und unterschiedlichsten klinischen Verlaufsmöglichkeiten. Festzuhalten ist, dass eine AKI als Langzeitfolge auch nach kompletter Remission kardiovaskuläre und nephrologische Erkrankungen, sowie eine erhöhte Mortalität, nach sich ziehen kann (Amdur RL et al. 2009, Coca SG et al. 2009 und Wald R et al. 2009).

### **1.1.2 Ätiologie**

Die Ursachen lassen sich nach Lokalisation der Entstehung der AKI in prä-, intra- und postrenale einteilen. Eine postrenale Nierenschädigung ist mit etwa 5% relativ selten und häufig die Folge einer Harnstauung durch angeborene Missbildungen, erworbene Abflusshindernisse wie beispielsweise Steine oder auch maligne Tumoren (Herold G, 2010). Dem zu etwa 35% auftretendem intrarenalen Nierenversagen werden mikro- und makrovaskuläre Krankheiten, interstitielle und glomeruläre Nephritiden oder auch ischämisch, toxisch oder septisch bedingte akute Tubulusnekrosen zugeordnet (Herold G, 2010).

Die mit Abstand häufigste Ursache mit etwa 60% ist jedoch eine prärenale Störung (Herold G, 2010). Hierbei ist die tubuläre und glomeruläre Struktur zunächst noch intakt, durch eine verminderte Perfusion kommt es jedoch zum Funktionsverlust der Nieren. So kann beispielsweise bei Hypovolämie oder Vasodilatation im Rahmen eines Schockgeschehens die Autoregulation der Niere bei einem arteriellen Mitteldruck unterhalb 60 bis 80 mmHg nicht mehr aufrechterhalten werden (Badr KF, 1988, Conger JD et al. 1988).

### **1.1.3 Pathophysiologie**

Die Pathogenese des AKI ist weiterhin Gegenstand der aktuellen Forschung, da die komplexen Abläufe noch nicht vollständig verstanden sind. Die meisten pathophysiologischen Hintergründe wurden anhand Tiermodellen untersucht (Heyman SN et al., 2002 und 2010). So kann beispielsweise durch Abklemmen der Nierenarterien eine künstliche prärenale Nierenschädigung erzeugt werden, was die Aktivierung des sympathischen Nervensystems sowie eine umfangreiche neurohumorale Antwort nach sich zieht (Schrier RW und Wang W 2004, Ramchandra R et al. 2009). Durch die hierbei auftretende ischämische Minderperfusion und die Reduktion des effektiven Blutvolumens kommt es zu einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Aus den juxtaglomerulären Zellen der Niere wird Renin freigesetzt. Dieses Enzym spaltet Angiotensinogen zu Angiotensin I, welches seinerseits wiederum durch das Angiotensin Converting Enzyme (ACE) zu Angiotensin II konvertiert wird. Dieses wirkt stark vasokonstriktorisch und vermittelt die Ausschüttung des adiuretischen Hormons (ADH), sowie die Aktivierung des tubuloglomerulären Feedback-Mechanismus (Loutzenhiser R 2006). Gleichzeitig werden vasodilatierende Prostaglandine und Stickstoffmonoxid (NO)

freigesetzt. So kann der hydrostatische Druck und die Filtrationsfraktion in den Glomeruli durch eine Dilatation der afferenten Arteriolen und eine efferente Vasokonstriktion zunächst aufrechterhalten werden. Die renale Filtrationsreservekapazität ist jedoch begrenzt. Fällt der arterielle Mitteldruck unter 60-80 mmHg zu einem Zeitpunkt, an dem die afferenten Arteriolen bereits maximal dilatiert sind, fällt der renale Blutfluss schnell ab und es kommt zu schwerwiegenderen Endothelschäden (Badr KF und Ichikawa I 1988).

Das Aktin-Zytoskelett der renalen Tubuluszellen hat unter physiologischen Bedingungen eine wichtige Funktion für die Aufrechterhaltung der normalen Zellstruktur, Polarität, tight-junction-Integrität und Adhäsion von Epithelzellen an der tubulären Basalmembran des Nephrons (Lieberthal W 1997). Beim Auftreten einer Hypoxie nimmt die Dichtigkeit der tight-junctions ab (You Y et al. 1992) und es kommt zum Rückstrom des Ultrafiltrats ins Interstitium (Kroshian VM 1994). Dadurch fällt das transepitheliale Potential und die Tubuluszellen verlieren ihre Polarität. Die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase dissoziiert von der basolateralen Membran, in der sie unter physiologischen Bedingungen vom Aktin-Zytoskelett gehalten wird (Molitoris BA 1991 und 1993, Kellerman PS et al. 1992). Ein normaler Transport von Salzen und Wasser kann im Epithel des proximalen Tubulus so nicht mehr aufrechterhalten werden. Die Zellen schwellen an und die Integrität der Bürstensaummembran geht durch den voranschreitenden Zusammenbruch des Zytoskeletts verloren. Bleibt die Ischämie weiter bestehen werden Apoptose- und Nekrosevorgänge der Tubuluszellen weiter voran getrieben. Proteine und Zellreste verlegen das Lumen des Tubulus, wodurch der Primärharn ins Interstitium übergeht (Schrier et al. 2004).

Besonders anfällig für ischämisch bedingte Schädigungen ist die Medulla, da hier bereits unter physiologischen Bedingungen die geringste Perfusion vorliegt (Brezis M und Rosen S 1995, Lieberthal W und Nigam SK 1998, Bonventre JV 2007). Beim Auftreten einer Ischämie kommt es wie bereits beschrieben zu einer intrarenalen Vasokonstriktion, die eine Stase von Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten im medullären Kapillarbett nach sich zieht (Lieberthal W 1997). Durch die Schädigung des vaskulären Endothels kommt es zu einer Imbalance der Antagonisten Endothelin (ET-1) und Stickstoffmonoxid (NO), welche beide im Nierengewebe produziert werden (Kohan DE 1993).

Auch inflammatorische Prozesse spielen bei der akuten Nierenschädigung eine Rolle. Leukozyten haften an Endothelzellen und infiltrieren den interstitiellen Raum. Es kommt zu einer Aktivierung von reaktiven Sauerstoffspezies und der Synthese von Phospholipasemetaboliten. Im weiteren Verlauf entsteht ein Gewebsödem, das die Mikrozirkulation weiter kompromittiert (Linás SL et al. 1988, Willinger CC et al. 1992). Diese komplexen Vorgänge sind in der Abbildung 1 vereinfacht schematisch dargestellt, und zeigen die Vielschichtigkeit der Pathogenese des akuten Nierenversagens.

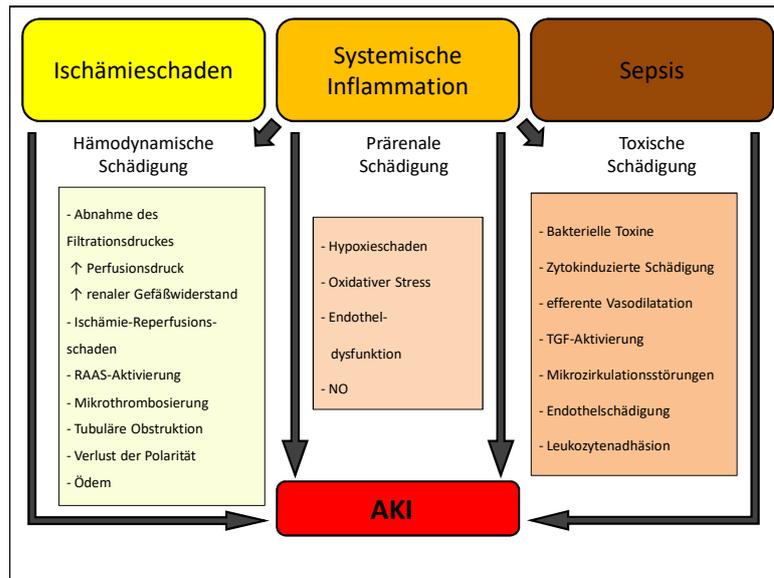


Abbildung 1: potentielle Kaskade der Pathogenese des akuten Nierenversagens (in Anlehnung an Bellomo R 2012)

Durch die dargestellten hämodynamischen, inflammatorischen und toxischen Vorgänge verliert die Niere ihre Funktion der Wasser- und Elektrolythomöostase sowie der Ausscheidung von potentiell toxischen Stoffen. Doch trotz dieser teils erheblichen Beeinträchtigungen ist das Organ in Lage, sich zu regenerieren. Je nach Dauer und Intensität der zuvor stattgehabten Schädigung können sich Tubuluszellen erneut teilen, differenzieren und ihre Funktion schließlich wiederaufnehmen (Bonventre JV 2003). Diese Abläufe sind in Abbildung 2 dargestellt und demonstrieren, wie renale Tubulusepithelzellen in der Lage sind, sich nach einer Schädigung wieder zu teilen und durch Differenzierung und Wiederherstellen der Polarität ihre Funktion erneut aufzunehmen.

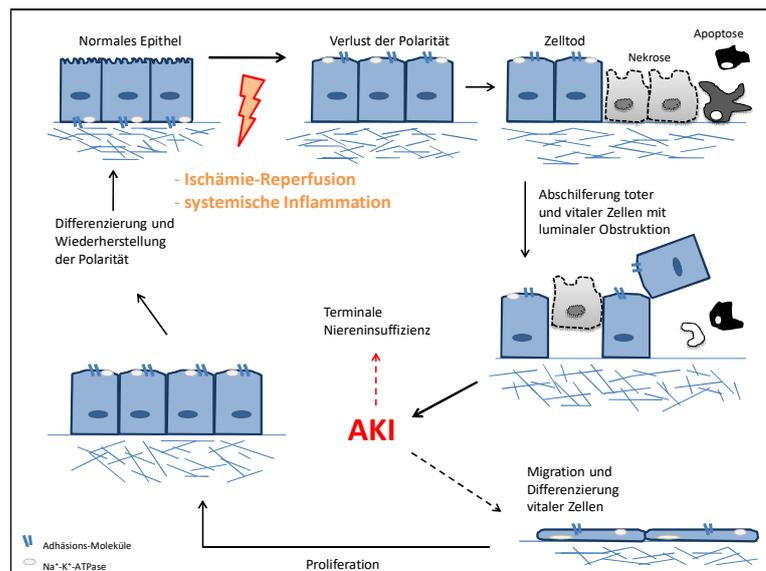


Abbildung 2: Schädigungs- und Reparaturmechanismen tubulärer Epithelzellen (in Anlehnung an Sheridan AM 2001)

#### 1.1.4 Prävention und Therapie

Eine frühzeitige Diagnostik der AKI ist aufgrund der hohen Morbiditäts- und Mortalitätsraten von entscheidender Bedeutung. Trotz Fortschritten in der intensivmedizinischen Behandlung konnte bisher noch kein Medikament entwickelt werden, das eine akute Nierenschädigung zuverlässig therapiert.

Patienten mit erhöhtem Risiko für eine AKI sollten engmaschigen Verlaufskontrollen von Serum-Kreatinin und Urinproduktion unterzogen werden. Außerdem ist eine sorgfältige Überwachung der Hämodynamik empfehlenswert. Hypotensionen mit einer Minderperfusion der Nieren müssen zwingend vermieden werden. Nephrotoxische Substanzen sollten wenn möglich abgesetzt, oder in ihrer Dosis der eingeschränkten Nierenfunktion angepasst werden. Bei hämodynamisch instabilen Patienten ist die Optimierung von Blutdruck und Herzzeitvolumen durch Einsatz von vasoaktiven Substanzen wie Noradrenalin und Flüssigkeit, beispielsweise in Form von balancierten Elektrolytlösungen, anzustreben. Bei kritisch kranken Patienten tritt häufig auch eine gestörte Glukoseregulation auf, welche eine engmaschige Überwachung des Blutzuckers und eine möglichst normoglykämie Einstellung erfordert. Die Diuretikatherapie wird kontrovers diskutiert: im klinischen Alltag werden Schleifendiuretika häufig eingesetzt, jedoch konnte weder für die prophylaktische, noch für die therapeutische Gabe von Furosemid ein Einfluss auf Prävention oder Prognose einer AKI gezeigt werden (Ho KM und Power BM 2010). Wenn bereits eine Schädigung der Niere eingetreten ist, muss die Erkrankungsursache identifiziert und therapiert werden. Hierbei spielt vor allem die Antibiotikatherapie eine große Rolle, da etwa die Hälfte aller AKIs durch infektiöse Komplikationen verursacht werden (Bellomo R 2006). Die Nebenwirkungen dieser Medikamente betreffen jedoch häufig ebenfalls die Nieren. Beispielsweise sind Aminoglykoside als hochpotente Antiinfektiva mit breitem Wirkspektrum zweifellos nephrotoxisch. Daher ist es empfehlenswert, ebenso wirksame und weniger nephrotoxische Substanzen einzusetzen. Spiegelbestimmungen sind bei einigen Antibiotika möglich und sollten zur Vermeidung einer weiteren Nierenschädigung frühzeitig und regelhaft erfolgen.

Wenn alle konservativen Maßnahmen ausgeschöpft sind, ohne dass sich eine Rekompensation der Nierenfunktion eingestellt hat, kann eine Nierenersatztherapie erforderlich werden. Wann damit bei kritisch kranken Patienten begonnen werden sollte, ist noch umstritten. Eine Dialysetherapie wird zweifelsfrei erforderlich, sobald lebensbedrohliche Komplikationen, wie Hyperkaliämie oder ausgeprägte Störungen des Säure-Basen-Haushaltes, auftreten (Meersch M et al. 2016). Die beiden randomisierten kontrollierten Studien AKIKI und ELAIN suchten den optimalen Zeitpunkt zum Beginn einer Nierenersatztherapie (Gaudry S et al. 2016, Zarbock A et al. 2016). Aufgrund großer Unterschiede im Studiendesign kamen sie zu gegensätzlichen Ergebnissen: die Autoren der AKIKI-Studie konnten keinen Überlebensvorteil nach 60 Tagen feststellen, während Zarbock A et al. eine signifikant reduzierte 90-Tages-Überlebensrate bei früher Initiierung einer Dialysetherapie nachwies. Nach aktueller Studienlage lässt sich über einen Vorteil beim

früheren Beginn der Nierenersatztherapie spekulieren, jedoch sind hierzu weitere randomisierte kontrollierte Studien erforderlich (Meersch M et al. 2016).

Gegenstand intensiver Forschungsarbeit ist die Suche nach Biomarkern, die eine AKI früh detektieren oder gar verhindern können. Das Neutrophilen-Gelatinase assoziierte Lipocalin (NGAL) ist bei einer normalen Nierenfunktion im Urin praktisch nicht messbar, jedoch bei ischämischen oder nephrotoxischen Ereignissen deutlich erhöht (Meersch M et al. 2016). NGAL wird in verschiedenen Geweben eines Organismus exprimiert, und existiert in unterschiedlichen Isoformen. Daher ist die Anwendung dieses Nieren-Akutmarkers aktuell kritisch zu betrachten (Martensson J und Bellomo R 2014). Der Gewebeinhibitor der Metalloproteinase-2 (TIMP-2) sowie das Insulin-like Growth Factor Binding Protein-7 (IGFBP-7) greifen in den G1-Zellzyklusarrest ein und sind in renalen Stresssituationen hochreguliert. Die gleichzeitige Bestimmung beider Biomarker hat eine hohe Sensitivität und kann die Ausbildung eines Nierenschadens innerhalb der nächsten 12 Stunden anzeigen (Hoste EA et al. 2014). Diese neuen Nieren-Akutmarker könnten ein Ansatz für die Prävention einer akuten Nierenschädigung sein.

Ein weiteres einfaches und sicheres Verfahren zur Verhinderung einer AKI bei kritisch kranken Patienten könnte die sogenannte ischämische Fernpräkonditionierung (remote ischaemic preconditioning, RIPC) sein. Dieses zuerst bei Tieren beschriebene Phänomen ist gekennzeichnet durch kurze Abfolgen von Ischämie- und Reperusionsphasen eines Gewebes oder Organs. Durch noch nicht vollständig geklärte neurohumorale Mechanismen kommt es zur Ausschüttung von Mediatoren und Aktivierung von Signalwegen, die einen protektiven Effekt auch für entfernte Organe haben. Durch intermittierendes In- und Desufflieren einer Blutdruckmanschette von drei bis vier Zyklen an der oberen Extremität werden subkritische Ischämien mit nachfolgender Reperfusion erzeugt, deren potentiell nephroprotektive Wirkung in verschiedenen Studien untersucht wurde (Meersch M und Zarbock A 2016). Dabei konnte in diversen kleineren Untersuchungen, und auch in der RenalRIP-Studie (Zarbock A et al. 2015), ein positiver Effekt auf die Entstehung einer AKI und die Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie bei Hochrisikopatienten nach kardiochirurgischen Eingriffen gezeigt werden. Die beiden großen multizentrischen Studien RIPHeart (Meybohm P et al. 2015) und ERICCA (Hausenloy DJ et al. 2015) untersuchten ebenfalls Patienten, die sich einer herzchirurgischen Operation unterzogen. Hierbei ließ sich jedoch kein signifikanter Unterschied im Hinblick auf Inzidenz einer AKI nachweisen. Zusammenfassend lässt sich für die ischämische Fernpräkonditionierung bei kardiochirurgischen Eingriffen ein möglicher nephroprotektiver Effekt postulieren, insbesondere Hochrisikopatienten könnten profitieren.

Die bei einer bereits eingetretenen Nierenschädigung beteiligten Prostaglandine scheinen einen weiteren möglichen Therapieansatz zu bieten. Bereits in einigen dieser Arbeit vorangegangenen Studien konnte entsprechende positive Effekte durch eine Hemmung von PGE<sub>2</sub> gezeigt werden (Schneider R 2009, Sauvants C 2010, Bischoff A 2014). Da auch in dieser Arbeit weiter an die bereits erzielten Ergebnisse angeknüpft werden soll, wird nun im

Folgenden zunächst die Cyclooxygenase, als unmittelbar an der Entstehung von Prostaglandinen beteiligtes Enzym, genauer betrachtet.

## 1.2 Cyclooxygenasen

Diese Enzyme sind für die Umwandlung von Arachidonsäure in die verschiedenen Eikosanoide verantwortlich. Es handelt sich bei dieser Reaktion um den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Prostaglandinsynthese. Die Cyclooxygenase (COX) liegt in zwei Isoformen (COX-1 und COX-2) vor (Simmons DL et al. 1989, Kujubu DA 1991, Hla T und Neilson K 1992, Guan Y et al. 1997), welche sich in ihrer Verteilung im Organismus und ihrer Expression unterscheiden. Die COX-1 hat eine "house-keeping" Funktion inne, in der sie eine wichtige Rolle in der Instandhaltung der basalen physiologischen Abläufe, wie beispielsweise die Mukosaprotektion des Magens oder auch die Thrombozytenaggregation, einnimmt (Smith WL 1992, Herschman HR 1996, Smith WL und Langenbach R 2001). Nachdem die COX-2 entdeckt wurde, vermutete man zunächst eine rein pathologische Funktion. Tatsächlich scheint sie eine Schlüsselrolle bei inflammatorischen Vorgängen oder auch Angiogenese oder Tumorentstehung zu haben (Smith WL 1992, Herschman HR 1996, Hla T et al. 1999, Smith WL und Langenbach R 2001). Jedoch erfüllt auch die 2. Isoform physiologische Funktionen im Organismus. So ist die COX-2 in die Wundheilung, Ovulation und Weheninduktion, sowie die Nierendurchblutung involviert (Karow T und Lang-Roth R 2010).

In der Niere sind die beiden Isoformen der COX unterschiedlich verteilt. Hohe Konzentrationen der COX-1 findet man vor allem in den Sammelrohren, niedrige in den interstitiellen und glomerulären mesangialen Zellen, sowie den Endothelzellen der Arteriolen (Harris RC et al. 1994, Yang T et al. 1998, Castrop H et al. 2001, Campean V et al. 2003). Im Kontrast dazu findet man die COX-2 vor allem in den medullären Interstitialzellen, im dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife, sowie den Macula-densa-Zellen (Harris HC et al 1994, Guan Y et al. 1997, Hao CM et al 1999).

Im klinischen Alltag spielt die Hemmung der Cyclooxygenasen eine große Rolle. Die Medikamentengruppe der nicht-steroidalen Antiphlogistika (NSAID, NSAR) vermindert durch Hemmung der COX die Prostaglandinsynthese (Vane JR 1971, Oates JA 1982). Über diesen Wirkmechanismus werden analgetische, antipyretische und antiphlogistische Eigenschaften in unterschiedlicher Ausprägung erzielt. Die verschiedenen Wirkstoffe der älteren Generation, wie beispielsweise Acetylsalicylsäure (ASS), Paracetamol, Ibuprofen oder Indometacin, hemmen beide COX-Isoformen und verursachen so auch unerwünschte COX-1-vermittelte Wirkungen. Hier sind vor allem Magenbeschwerden bis hin zu Ulcerationen mit gastrointestinalen Blutungen durch die verminderte Zytoprotektion der Mukosa, akute Nierenfunktionsstörungen oder bronchiale Nebenwirkungen (sog. "Aspirin-Asthma") zu nennen. Unter der neueren Generation der selektiven COX-2-Hemmer treten diese gastrointestinalen und gerinnungshemmenden Wirkungen seltener auf. Als typische

Vertreter wären hier Celecoxib, Etoricoxib oder Parecoxib zu nennen (Karow T und Lang-Roth R 2010).

In vorangegangenen Studien wurde die Wirkung von Indometacin als klassisches NSAID unter Ischämie-Reperfusion-Bedingungen untersucht (Schneider R 2009, Sauvant C 2010). Im Folgenden soll diese Substanz näher betrachtet werden.

Es zählt zu den unselektiven COX-Hemmern und hat eine Halbwertszeit von drei bis elf Stunden. Die COX-1-Inhibierung überwiegt und ist zeit- und konzentrationsabhängig. Die Substanz wird zu 10 bis 20% unverändert renal ausgeschieden, während die Metabolite über den enterohepatischen Kreislauf und die Niere eliminiert werden. Die Plasma-Eiweißbindung ist mit etwa 90% hoch. Das Medikament ist Mittel der ersten Wahl beim akuten Gichtanfall und wird hauptsächlich bei Erkrankungen im rheumatischen Formenkreis, wie beispielsweise rheumatoide Arthritis, aktivierte Arthrosen oder Morbus Bechterew, angewendet. Des Weiteren zeigt es günstige Effekte bei therapierestistentem Fieber und findet in der Geburtshilfe Anwendung zur Tokolyse. Der Einsatz bei Frühgeborenen zum Verschluss eines offenen Ductus arteriosus Botalli ist in Deutschland nicht zugelassen und daher mit einem "off-label-use" verbunden (Karow T und Lang-Roth R 2010, Bühler C 2011).

Nachdem die Cyclooxygenase mit ihren ubiquitären Funktionen im gesamten Organismus und als Schlüsselenzym für die Synthese von Eikosanoiden betrachtet wurde, soll nun im Folgenden auf die Prostaglandine, vor allem im Hinblick auf ihre Funktion in der Niere, genauer eingegangen werden.

### **1.2.1 Prostaglandinsynthese**

In einem zweistufigen Prozess entsteht aus freier Arachidonsäure zunächst Prostaglandin G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) durch die *bis*-Oxygenase, anschließend wird das instabile PGG<sub>2</sub> durch die Peroxydaseaktivität der COX zum Prostaglandin H<sub>2</sub> weiterverarbeitet (Herschman HR 1996). Dieses wird durch die jeweiligen Synthasen in fünf bioaktive Metabolite weiterverarbeitet: Prostaglandin E<sub>2</sub>, I<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>, F<sub>2α</sub> und Thromboxan (PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, TxS). In Abbildung 3 ist die Prostaglandinsynthese und die Indometacin-induzierte COX-Hemmung schematisch dargestellt. Die weitere Metabolisierung der Fettsäurederivate ermöglicht die auto- oder parakrine Wirkung an ihrem spezifischen Rezeptor. Im Falle des PGE<sub>2</sub> handelt es sich um die E-Prostaglandin-Rezeptoren 1 bis 4 (EP1-4), welche nachfolgend genauer betrachtet werden.

Durch den raschen Abbau direkt nach der Synthese bleibt der Effekt meist auf die Umgebung des Produktionsortes limitiert (Hao CM und Breyer MD 2008).

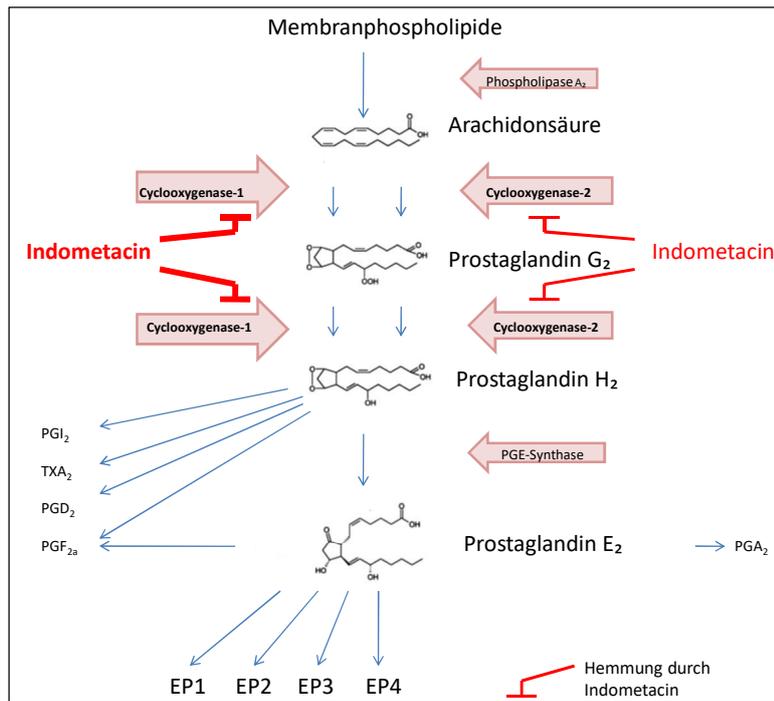


Abbildung 3: Prostaglandin E<sub>2</sub>-Biosynthese (in Anlehnung an Reid HM 2015)

### 1.2.2 Prostaglandinrezeptoren

Die Familie der Prostaglandinrezeptoren umfasst eine große Zahl an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die in der Lipidmembran von Zellen verankert sind. Der Prostaglandin-E-Rezeptor besitzt vier Subtypen (EP1-4), die gut charakterisiert sind und bereits kloniert werden konnten (Breyer MD und Breyer RM 2000, Narumiya S und FitzGerald GA 2001). Zum Teil vermitteln sie antagonistische Wirkungen, beispielsweise wirken EP1- und EP3-Rezeptoren als Konstriktoren glatter Muskelzellen, während EP2 und EP4 diese relaxieren. Die verschiedenen Prostaglandin-vermittelten Effekte variieren je nach Zelle, Expression der Rezeptoren und Art des mediierten Signalweges. Auch wenn einige der Rezeptoren die gleichen Signalwege teilen, können die nachfolgenden Ziele doch unterschiedlich sein, sodass am Ende differente physiologische Effekte erzielt werden (Hao CM und Breyer MD 2008).

EP1-Rezeptor-mRNA wird hauptsächlich in den Sammelrohren der Niere exprimiert (Guan Y et al. 1998). Eine Aktivierung hat einen Anstieg des intrazellulären Calciums zur Folge und es wird vermutet, dass die Wasser- und Salz-Reabsorption in den Sammelrohren gehemmt wird. Klinische Studien konnten diesen Effekt jedoch noch nicht belegen (Stock JL et al. 2001, Kennedy CR et al. 2007). Andere Studien hingegen zeigen, dass über EP1 eine Angiotensin-II-medierte Vasokonstriktion gebahnt wird (Guan Y et al. 2007). Außerdem soll der Rezeptor an der Vermittlung analgetischer Reize beteiligt sein.

Die humane EP2-Rezeptor-cDNA kodiert für ein 358 Aminosäuren großes Polypeptid, welches seine Wirkung durch eine intrazelluläre cAMP-Erhöhung vermittelt (Bastien L et al. 1994, Regan JW et al. 1994a). EP2-mRNA konnte in Uterus, Lunge und Milz in großen Mengen nachgewiesen werden, in der Niere fand man jedoch nur eine sehr geringe Expression (Regan JW et al. 1994, Katsuyama M et al. 1995, Boie Y et al. 1997, Nemoto JW et al. 1997). Eine EP2-Rezeptor-Aktivierung führt zur Relaxierung der glatten Muskulatur in Trachea und Blutgefäßen und scheint außerdem in die Protektion der arteriellen Hypertension involviert zu sein (Coleman RA et al. 1990 und 1994, Tilley SL et al. 1999).

Die Aktivierung des EP3-Rezeptors bewirkt eine Kontraktion glatter Muskelzellen. Der Rezeptor interagiert mit einem inhibitorischen G-Protein und reduziert hierdurch die cAMP-Synthese (Breyer MD und Breyer RM 2000b, Narumiya S und FitzGerald GA 2001). Bisher konnten sechs Splicevarianten mit einer molekularen Größe von 40 bis 45 kDa identifiziert werden (Regan JW et al 1994b, Abramovitz M et al 1995, Breyer RM et al. 1996). Der EP3-Rezeptor scheint eine Rolle in der Fieberentstehung zu spielen (Breyer MD und Breyer RM 2000b, Stock JL et al. 2001).

Der EP4-Rezeptor-Signalweg wird durch eine intrazelluläre cAMP-Erhöhung vermittelt, wodurch es zu einer Relaxierung glatter Muskelzellen kommt. Die cDNA kodiert ein 488 Basenpaare großes Polypeptid mit einer molekularen Masse von etwa 53 kDa (Bastien L et al. 1994, Regan JW et al. 1994a). Im Gegensatz zum EP2-Rezeptor wird in verschiedenen Organen, unter anderem der Niere, eine wesentlich größere Menge mRNA des EP4-Rezeptors exprimiert (Breyer MD und Breyer RM 2000b). Dem Rezeptor wird eine entscheidende Rolle bei der Kontraktion von venösen und arteriellen Gefäßen (Coleman RA et al. 1994) sowie dem Verschluss des Ductus arteriosus zugeschrieben (Nguyen M et al. 1997, Segi E et al. 1998). In der Niere wird dem Rezeptor eine Rolle bei der Mikrozirkulation sowie Reninfreisetzung zugeschrieben (Breyer MD und Breyer RM 2000b).

### **1.3 Die Organischen Anionentransporter Typ 1 und 3 (OAT1, OAT3)**

Die Niere spielt eine entscheidende Rolle bei der Ausscheidung verschiedener exogener und endogener Substanzen, um die Exposition des Körpers gegenüber diesen Stoffen zu limitieren. Dabei sind eine Vielzahl dieser potentiell toxischen Substanzen organische Anionen (Pritchard JB und Miller DS 1996, Ullrich KJ 1999, Dantzler WH 2002, Van Montfoort JE und Hagenbuch B 2003, Terlouw SA et al. 2003, Miyazaki H et al. 2004, Wright SH und Dantzler WH 2004).

Das Transportsystem für die Ausscheidung organischer Anionen befindet sich in den proximalen Tubuluszellen des Nierencortex. Dabei werden die verschiedenen Stoffe von der basolateralen Membran in das Epithel aufgenommen und nach dem transzellulären Transport auf der luminalen Seite in den Harn überführt (siehe Abbildung 4).

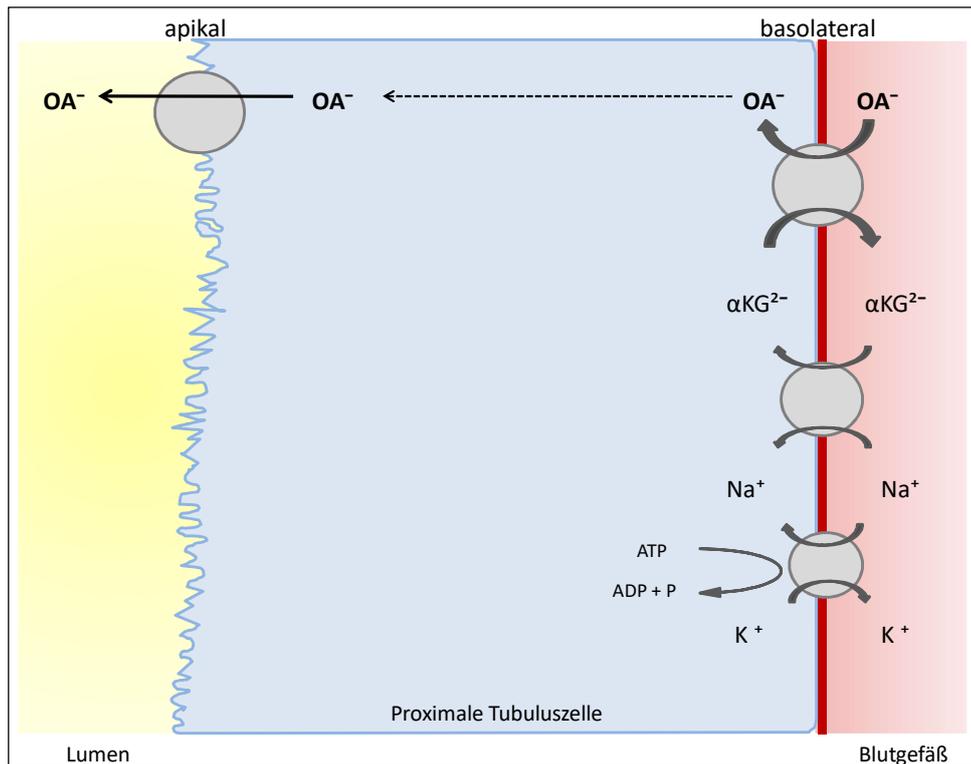


Abbildung 4: Transport organischer Anionen in einer proximalen Tubuluszelle (in Anlehnung an Silbernagl S und Klinke R, 2001)

Bei der peritubulären Aufnahme der organischen Anionen handelt es sich um den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der gesamten Sekretion, weshalb viele Untersuchungen zu diesem Teilschritt vorliegen (Ullrich KJ 1997, Wright SH und Dantzer WH 2004). Durch einen tertiär aktiven Transport, unter anderem gegen  $\alpha$ -Ketoglutarat, werden die Moleküle ins Tubulusepithel überführt (Pitchard JB 1995). Die Dicarboxylate wiederum werden natriumabhängig zurück in die Zelle geschleust (Edwards RM et al. 1997). Der dafür notwendige Natriumgradient wird durch die Natrium-Kalium-ATPase gewährleistet. Der transzelluläre Transport von der basolateralen zur luminalen Seite der Zelle erfolgt durch passive Diffusion, die aufgrund des wässrigen Zytoplasmas möglich ist. Die Vorgänge der Aufnahme und des Transportes organischer Anionen sind in Abb. 4 dargestellt.

Die Transportsysteme der luminalen Seite des Tubulus sind bisher weniger gut beschrieben. Hier scheinen verschiedene Transportproteine auf unterschiedlichen Wegen (natriumabhängig, ATP-abhängig) den Effluxschritt zu gewährleisten.

Die klassische basolaterale Aufnahme wird durch die organischen Anionentransporter Typ 1 (OAT1, SLC22A6) und Typ 3 (OAT3, SLC22A8) gewährleistet, diese werden nun genauer betrachtet. Nachfolgend wird aufgrund der besseren Übersichtlichkeit hauptsächlich die OAT-Nomenklatur verwendet.

### **1.3.1 Der organische Anionentransporter Typ1 (OAT1)**

Der OAT1 transportiert eine Vielzahl unterschiedlichster organischer Anionen und repräsentiert den klassischen Teil des multispezifischen, geschwindigkeitsbestimmenden, basolateralen Transports dieser Substanzen im proximalen Tubulus (Wright SH und Dantzer WH 2004). Das 1997 von zwei Arbeitsgruppen (Sekine TK et al. 1997, Sweet DH et al. 1997) unabhängig voneinander entdeckte Protein wurde zuvor bereits ortholog bei Mäusen kloniert (Lopez-Nieto CE et al. 1997). Initial konnte zunächst keine Funktion identifiziert werden. Im weiteren Verlauf wurden von Mensch (Reid G et al. 1998, Hosoyamada M et al. 1999, Lu R et al. 1999, Race JE et al. 1999), Cynomolgus-Affen (Tahara H et al. 2005), Kaninchen (Bahn A et al. 2002), Schwein (Hagos Y et al. 2002), Flunder (Wolff NA et al. 1999) und *C. elegans* (George RL et al. 1999) ebenfalls orthologe Proteine kloniert. Dabei zeigen die Säugerformen untereinander eine etwa 80%ige Übereinstimmung, während sie zur Flunder oder *C. elegans* nur noch 48% bzw. 19% Sequenzidentität aufweisen (Wright SH und Dantzer WH 2004). Die cDNAs der klonierten OAT1 kodieren für Proteine einer Länge von 545 bis 551 Aminosäuren (Wright SH und Dantzer WH 2004). Vom humanen OAT1 wurden vier Splicevarianten identifiziert (Bahn A et al. 2000). Wie auch OAT3 besteht es aus 12 Transmembrandomänen, ist auf dem Chromosom 11 lokalisiert und beinhaltet 10 Exons (Bahn A et al. 2000).

Der OAT1 befindet sich fast ausschließlich im proximalen Tubulus von Nierenzellen (Van Montfoort JE et al. 2003). Dabei ist die Expression auf die basolaterale Membran beschränkt (Burckhardt BC und Burckhardt G 2003). Die zelluläre Aufnahme der organischen Anionen erfolgt tertiär aktiv. Der stöchiometrische Austausch von Paraaminohippursäure (PAH) und  $\alpha$ -Ketoglutarat verläuft im Verhältnis 1:1 mit einer Sättigungskinetik (Aslamkhan A et al. 2003). Die Aufnahme von Paraaminohippursäure (PAH) in die Zelle wird von divalenten Anionen, wie beispielsweise Glutarat oder  $\alpha$ -Ketoglutarat, inhibiert, wenn sie sich auf der selben Membranseite befinden (cis-Konfiguration). Umgekehrt wird die Aufnahme von PAH stimuliert, wenn sie sich in trans-Konfiguration befinden (Sweet DH et al. 1997). Da diese Befunde mit den Daten aus den funktionellen Tests überwiegend übereinstimmen (Wright SH und Dantzer WH 2004), ging man initial davon aus, dass es sich beim OAT1 um den einzigen Vertreter des klassischen renalen Transports organischer Anionen handelt.

### **1.3.2 Der organische Anionentransporter Typ 3 (OAT3)**

Das 536 Aminosäuren große Protein konnte zunächst aus cDNA von Ratten kodiert werden (Kusuhara H et al. 1999), nachfolgend auch von Mensch (Cha SH et al. 2001), Maus (Sweet DH et al. 2002), Schwein (Hagos Y et al. 2005) und dem Cynomolgus-Affen (Tahara H et al. 2005). Beim Menschen wird OAT3 ausschließlich in der Niere exprimiert (Race JE et al. 1999, Cha SH et al. 2001), im Gegensatz zur Ratte, wo es zudem auch in Leber und Gehirn

nachgewiesen wurde (Kusuhara H et al. 1999, Kobayashi Y et al. 2002). Der humane OAT3 ist etwa dreimal stärker exprimiert als OAT1 und das Vorkommen ebenfalls auf die basolaterale Membran beschränkt (Cha SH et al. 2001, Kojima R et al. 2002). Die beiden Transporter haben teilweise gemeinsame Substrate (Burckhardt BC und Burckhardt G 2003, Van Montfoort JE et al. 2003). Wie auch der OAT1 transportiert der OAT3 eine Vielzahl organischer Anionen, vor allem die weniger hydrophilen. Jedoch haben die Transporter auch funktionelle Unterschiede, da beispielsweise Estronsulfat hauptsächlich mit OAT3 interagiert, während kaum ein Transport durch OAT1 nachweisbar ist (Lungkaphin A et al. 2004).

### **1.3.3 Regulation des renalen Transportes organischer Anionen**

Zunächst ging man davon aus, dass die renale Sekretion organischer Anionen keiner Regulation unterliegt, sondern konstant verläuft. Daher wird als Maß für die renale Perfusion die Clearance organischer Anionen, wie beispielsweise PAH, bestimmt. Jedoch zeigten experimentellen Daten, dass eine Variabilität des Transports vorliegt. Kurzfristige Regulationsmechanismen im Bereich von wenigen Minuten konnten bereits nachgewiesen werden. Hierbei wurde vor allem der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Transportes an der basolateralen Membran betrachtet. Beispielsweise konnte in vielen Studien eine hemmende Wirkung des organischen Anionentransports durch die Proteinkinase C nachgewiesen werden (Takano M et al. 1996, Miller DS 1998, Gekle M et al. 1999, Shuprisha A et al. 2000, Sauvant C et al. 2001). Hier kam es zu einer Akkumulation von PAH nach Aktivierung dieses Signalweges. Dieser Einfluss wurde zunächst für OAT1, später auch für OAT3 nachgewiesen.

Auch Transkriptionsfaktoren spielen eine wichtige Rolle bei der transkriptionellen und posttranslationalen Regulation. mRNA-Level von OAT1 und OAT3 werden von den verschiedensten physiologischen und pathophysiologischen Stimuli beeinflusst. So können beispielsweise Hormone, die eine Nukleotid-Rezeptor-Aktivität aufweisen, über eine Regulation der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase potentiell auch den Transport organischer Anionen über den tertiär aktiven Transport beeinflussen. Hierbei scheinen Sexualhormone eine entsprechende Beeinflussung der Expression von OAT1 und OAT3 zu bewirken (Ljubojevic M et al. 2004).

### **1.4 Das In-vitro Ischämie-Reperfusion-Modell**

Im Ischämie-Reperfusion-Modell werden die im Organismus stattgehabte Ischämie mit anschließender Reperfusion nachempfunden. Es handelt sich hierbei um ein etabliertes Modell (Sauvant C et al. 2009), welches bereits bei zahlreichen vorangegangenen Studien erfolgreich zur Anwendung gekommen ist. Es konnte gezeigt werden, dass die Modell-Ischämie zum Auftreten von Ischämie-Reperfusion-Markern wie beispielsweise  $\alpha$ -smooth-muscle-actin ( $\alpha$ -SMA) führt. Außerdem wird die induzierbare NO-Synthase (iNOS) hochreguliert. Beide Prozesse treten typischerweise auch unter in vivo Bedingungen

während einer Ischämie-Reperfusionsschädigung der Niere auf. Des Weiteren kam es im Ischämie-Reperfusion-Modell zu einem Anstieg von PGE<sub>2</sub> im Überstand nach 48-stündiger Reperfusion (Sauvart C et al. 2009). Auch dieser Mechanismus wurde im Nierencortex unter Reperfusion nach Ischämie beobachtet (Tokuyama H et al. 2003, Myers SI et al. 2005).

Während einer Ischämie kommt es im Organismus durch eine verminderte oder ausbleibende Blutversorgung zu einer Hypoxie und Hyperkapnie, welche den Wechsel auf anaerobe Stoffwechselprozesse mit Laktatbildung und zunehmender Azidose bedingen. Die Zufuhr von nutritiven Stoffen und der Abtransport von Stoffwechselendprodukten werden beeinträchtigt. In einem in vitro Modell ist es nicht möglich, die in vivo Vorgänge eines Ischämie-Reperfusionsschadens exakt nachzubilden. Jedoch ist das vorliegende Modell in der Lage, eine Umgebung mit kontrollierten und isolierten Bedingungen zu schaffen, um physiologische und pathophysiologische Ereignisse zu untersuchen (Russ AL 2007). Außerdem können so verschiedene Einzeloxen getrennt voneinander untersucht werden, was in vivo nicht möglich wäre.

Drei Eigenschaften einer Ischämie werden in den Versuchszellen künstlich nachgestellt: durch Zugabe einer Bicarbonat-2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (Bicarbonat-MES) gepufferten Ringerlösung wird eine Azidose mit einem pH-Wert von 6,6 erzeugt. Diese wurde zuvor in 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre gepuffert. Um einen korrekten pH-Wert sicherzustellen wird dieser vor und nach der Inkubation bestimmt. Statt Glukose wird den Zellen Mannitol zugesetzt, welches einen physiologischen onkotischen Druck gewährleistet, jedoch nicht zur Energiegewinnung verstoffwechselt werden kann und somit eine Aglykämie imitiert. Durch die Anwendung einer speziellen Hypoxiekammer werden die Zellen einer Atmosphäre von 95% Stickstoff und 5% CO<sub>2</sub> ausgesetzt. Während der Füllung der Kammer wird die Sauerstofffraktion bestimmt bis sie sicher < 1% liegt. Dies entspricht einem pO<sub>2</sub> von < 7,6 mmHg. Werte in dieser Größenordnung wurden nach einer Ischämie in Nieren gemessen und liegen unterhalb der kritischen Grenze des Sauerstoffverbrauchs im Nierenkortex (Nelmarkka O 1984, Leichtweiss HP 1969).

## 2. Zielstellung

Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) führt zur Herunterregulation von OAT1 und OAT3 nach Langzeitexposition in den proximalen Nierentubuli (Sauvant C et al. 2006). Im Ischämie-Reperfuionsmodell an Ratten konnte gezeigt werden, dass Indometacin als Inhibitor der Prostaglandin-Synthese in geringer Dosierung (1mg/kg) eine ischämisch induzierte Herunterregulation verhindern kann. In diesem Zusammenhang steht auch die verminderte Herunterregulation der Ausscheidung der organischen Anionen und der Eliminierung von endogenen organischen Anionen, wie zum Beispiel PGE<sub>2</sub> (Schneider R et al. 2009). Diese Effekte konnten ebenfalls im Ischämie-Reperfuionsmodell (Sauvant C et al. 2009) an proximalen Tubuluszellen von Ratten nachgewiesen werden (Sauvant C et al. 2010). Neben dem positiven Effekt von Indometacin auf den verminderten Anionentransport konnten ebenfalls ein signifikant verbessertes Outcome beim akuten Nierenversagen (anhand der gemessenen GFR) im Tiermodell festgestellt werden ohne dabei Einschränkungen auf die Nierenperfusion zu verursachen (Schneider R et al. 2009). Dieser Effekt wurde vor allem nach Applikation von selektiven COX1-Hemmern beobachtet (Bischoff A et al. 2014). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass eine Ischämie mit nachfolgender Reperfusion eine verminderte Expression von OAT1 und OAT3 durch COX1-Mediatoren induziert. Eine Minderexpression von OAT1 und OAT3 ist vermutlich maßgeblich am Zellschaden bei einer AKI beteiligt (Schneider R et al. 2015).

Folglich ergaben sich aus den bisherigen Ergebnissen der vorangegangenen Arbeiten folgende Fragestellungen:

- (1) Findet eine Regulierung der organischen Anionentransporter Typ 1 und 3 (OAT1, OAT3) durch COX-Metabolite im Ischämie-Reperfuions-Modell auf transkriptioneller Ebene statt?
- (2) Gehen die erhobenen Daten mit den neu gewonnenen Ergebnissen der Expressionsregulation konform?
- (3) Auf welchem Signalweg werden diese Effekte vermittelt?

Die Frage nach der Regulierung auf transkriptioneller Ebene wurde anhand eines Transport-Assays untersucht, in dem die zelluläre Aufnahme organischer Anionen am Beispiel von Fluorescein untersucht wurde. Mit dem Gen-Reporter-Assay (SEAP) wurden die geklonten Promotorsequenzen der humanen OAT1 und OAT3 auf ihre Expressionsregulation und die beteiligte(n) Signalkaskade(n) getestet.

### **3. Material und Methodik**

#### **3.1 Zell-Kultur**

HEK293-Zellen (human embryonic kidney, humane embryonale Nierenzellen) von ATCC (Rockville, MD, USA) wurden in DMEM-HAM F-12 Medium mit 10 % fetalem Kälberserum kultiviert. Die Nierenzelllinie des Opossums (opossum kidney cells, OK-Zellen) stammt von Dr. Biber aus dem Department für Physiologie der Universität Zürich und wurde wie HEK293-Zellen kultiviert. Für den Reporterassay wurden die OK-Zellen auf permeablen Filtereinsätzen (Falcon, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) bei pH 7,4, 37°C und einem Luftgemisch aus 95% Luft und 5% CO<sub>2</sub> gehalten. Die Aussaatdichte lag bei 0,4x10<sup>6</sup>cm<sup>-2</sup>. Das Medium wurde jeden dritten Tag gewechselt und die Zellen wurden am Tag zehn nach Aussaat für die Experimente verwendet. Alle Experimente wurden durchgeführt, nachdem die Zellen für 24 Stunden in serumfreiem Medium verblieben.

#### **3.2 In vitro Ischämie-Reperfusion-Modell**

Die Kontrollzellen wurden mit Bikarbonat-4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethanesulfonsäure-Lösung (Bicarbonat-HEPES) kultiviert, die auf einen pH von 7,4 gepuffert war. Durch den Zusatz von 5mM Glukose wurde die Energieversorgung der Zellen sichergestellt. Im Brutschrank wurden sie bei 37°C und einem physiologischen Sauerstoffpartialdruck von 21 kPa kultiviert.

1ml der jeweiligen Puffer wurde den Kulturschalen mit den darin enthaltenen Zellen hinzugegeben, die Zusammensetzung von Bicarb-HEPES und -MES ist nachfolgend aufgelistet (Tabelle 2). Anschließend wurden die Zellen für eine Dauer von zwei Stunden entweder als Kontrolle unter Standardbedingungen behandelt oder der Ischämie, bestehend aus Azidose, Hypoxie und Aglykämie, zugeführt.

Unmittelbar nach der Modell-Ischämie bzw. Behandlung unter Standardbedingungen der Kontrollzellen erfolgte die Applikation von Inhibitoren (U-73122, H89; SC560 und SC58125 von Tocris Bioscience, Bristol, Großbritannien) oder Antagonisten (AH6809, L161,982; beide von Tocris Bioscience, Bristol, Großbritannien). Anschließend wurden die Zellen unter Standardbedingungen für Zellkulturen weiterbehandelt und so eine Reperfusion für sechs Stunden simuliert. Im Anschluss wurden die Zellen lysiert und die SEAP-Aktivität bzw. die Fluorescein-Aufnahme bestimmt.

Tabelle 2: Chemikalien zur Herstellung von Bicarb-HEPES und -MES-Puffer

<b>Chemikalien</b>	<b>Bicarb-HEPES</b>	<b>Bicarb-MES</b>
NaHCO <sub>3</sub>	24 mM	4,5 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,8 mM	0,8 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 mM	0,2 mM
NaCl	86,5 mM	106 mM
KCl	5,4 mM	5,4 mM
CaCl <sub>2</sub>	1,2 mM	1,2 mM
MgCl <sub>2</sub>	0,8 mM	0,8 mM
HEPES bzw. MES	20 mM	20 mM
Titration mit	1 N NaOH auf pH 7,4	1 N NaOH auf pH 6,6

### 3.3 Fluorescein-Aufnahme

Fluorescein repräsentiert als klassisches Substrat der organischen Anionentransporter OAT1 und OAT3 den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der basolateralen Aufnahme von organischen Anionen und den Transport durch die proximalen Tubuluszellen der Niere. Durch die Bestimmung der zellulären Fluoresceinaufnahme kann so die Funktion der OATs quantifiziert werden.

Die epithelbildende OK-Zelllinie wurde auf 24-Well-Filtern (Falcon, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) ausgesät und wuchs bis zur Konflueszenz. Diese konnte bereits ab dem vierten bis fünften Tag beobachtet werden, die Versuche wurden an Tag sieben oder acht bei 37°C durchgeführt. Zur Vorbereitung für den Fluoresceinaufnahmeversuch wurden die Ischämie-Reperfusionen-Zellen (model I/R) einer zweistündigen Behandlung in der Hypoxiekammer ausgesetzt, während die Kontrollzellen (control) unter Standardbedingungen weiter kultiviert wurden. Unmittelbar im Anschluss daran erfolgte die Zugabe der entsprechenden Inhibitoren bzw. Antagonisten (siehe Tabelle 3 und 4), sowie die Reperfusionenphase von 48 Stunden unter Standardbedingungen.

Tabelle 3: Auftragung der PLC- und PKA-Inhibitoren im Ischämie-Reperfusionen-Modell.

<b>Kontrollzellen (control)</b>	<b>Ischämie-Reperfusionen-Zellen (model I/R)</b>
control	model I/R
control +5µM H89 (PKA-Inhibitor)	model I/R +5µM H89 (PKA-Inhibitor)
control +5 µM U-73122 (PLC-Inhibitor)	model I/R +5µM U-73122 (PLC-Inh.)

Die Auftragung der EP2- und EP4-Antagonisten im Ischämie-Reperfusion-Modell erfolgte analog zum oben dargestellten Schema für die Kontrollzellen und die Ischämie-Reperfusion-Zellen:

Tabelle 4: Auftragung der EP2- und EP4-Antagonisten im Ischämie-Reperfusion-Modell.

<b>Kontrollzellen (control)</b>	<b>Ischämie-Reperfusion-Zellen (model I/R)</b>
control	model I/R
control +35µM AH6809 (EP2-Antag.)	model I/R +35µM AH6809 (EP2-Antag.)
control +5µM L161,982 (EP4-Antag.)	model I/R +5µM L161,982 (EP4-Antag.)

Die Applikation der EP2- und EP4-Agonisten Butaprost und TCS2510 wurde in steigender Dosis lediglich unter Standardbedingungen ohne Ischämie-Reperfusion-Behandlung durchgeführt.

Für die Fluoresceinaufnahmeversuche wurden die Filter in vorbereitete Well-Schalen gesetzt. Als Transportpuffer wurde phosphatgepufferter Ringerlösung (PBS; 138 mmol/l NaCl, 1 mmol/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4 mmol/l NaH<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, 4 mmol/l KCl, 1 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 1 mmol/l CaCl<sub>2</sub>, 5 mmol/l glucose, pH 7.4) mit einem Zusatz von 10µM Fluorescein verwendet. Um eine identische Meniskushöhe zu gewährleisten wurde in das basolaterale Kompartiment 0,5ml und in das apikale Kompartiment 0,2ml Volumen eingebracht. Die Fluoresceinaufnahme erfolgte bei 37°C im Wasserbad für zwei Minuten. Zum Abstoppen des zellulären Transports wurden die Filter in eiskaltes Transport-PBS umgesetzt und viermal gründlich von apikal und basolateral mit PBS bei 4°C gewaschen, um am Filter und zwischen den Zellen verbliebene Fluoresceinreste abzuspielen.

Für die Messung wurden die Zellen mittels einem ml 0,1% Triton-X100 in 20mM MOPS (3-(N-morpholino)propanedulfonic acid) bei pH 7,4 lysiert und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation wurde der Fluorescingehalt des Zelllysates im Multiplate Reader (Victor<sup>2</sup>, Wallac Instruments, Finnland) ausgezählt.

Da bei 4°C sämtliche Transportvorgänge der Zellen zum Erliegen kommen wurde die identische Versuchsdurchführung auf Eis wiederholt um eine Korrektur für extrazelluläre Bindung und unspezifische Adhäsionen an den Zellen gewährleisten zu können. Die Fluoresceinzählung wurde normalisiert auf den Proteingehalt im Lysat, welches mittels BCA-Protein-Assay (Pierce, Rockford, USA) bestimmt wurde.

### **3.4 Bestimmung des Proteingehaltes mittels Bicinchoninsäure (BCA)**

Dieser Test zur Proteinbestimmung zeichnet sich durch eine hohe Spezifität und geringe Störanfälligkeit aus. Hierbei wird sich die Biuret-Reaktion zunutze gemacht, in dem das nachzuweisende Protein Cu<sup>2+</sup> unter Abgabe eines Elektrons zu Cu<sup>+</sup> reduziert wird. Dieses Kupferion bildet mit zwei BCA-Molekülen einen Komplex und kann schließlich bei 560nm im Counter gemessen werden.

BCA-Reagenz A und B wurden im Becherglas im Verhältnis von 50:1 gemischt, anschließend verfärbte sich die entstehende Lösung grün. Die Eichkurve wurde mittels 5µl Lysat und Zugabe von je 15µl der Standardverdünnungen 100, 300, 500 und 700 µg/ml aufgetragen. Zu 5µl des oben beschriebenen Lysates wurden pro Well 200µl BCA-Reagenz hinzugegeben und anschließend für 30 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Hierbei kam es zu einem Farbumschlag von grün zu violett. Die Absorption wurde anschließend im Tecan Sunrise (Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz) gemessen werden. Mittels der Eichkurve konnte so der Proteingehalt der Proben bestimmt werden.

### 3.5 Klonierung der putativen hOAT1- und hOAT3-Promotorsequenzen

Die Klonierung der hOAT1- und hOAT3-Promotorsequenzen erfolgte bereits im Vorfeld dieser Arbeit, sie lagen also für die Versuche bereits vor. Im Folgenden werden die Arbeitsschritte der Klonierung kurz erläutert. Aus humaner genomischer DNA (von Clontech, CA, USA) und den ausgewählten Primern für hOAT1 und hOAT3 (unten aufgeführt) wurden die 1999 bp bzw. 2083 bp großen Produkte mittels PCR (Qiagen, Hilden, Deutschland) gemäß Beschreibung im Handbuch erzeugt und vervielfältigt. Im nächsten Schritt erfolgte die Elution des PCR-Produktes und die Ligation des PCR-Amplifikats in den pCR2.1-Vektor. Anschließend wurden die Plasmide in kompetente TOP10-Zellen transformiert, die weißen Klone selektiert und eine Plasmidpräparation durchgeführt. Als letzter Schritt erfolgte die Bestimmung der DNA-Sequenz, also der Nukleotid-Abfolge. Diese Sequenzierung erfolgte durch Eurofins/MWG Operon (Martinsried, Deutschland). Die Plasmide mit der vollständigen Länge wurden als hOAT1-Prom bzw. hOAT3-Prom bezeichnet.

#### Primer hOAT1-Prom:

Gen: hOAT1 / SLC22A6

Lokalisation: 62754161 bis 62752162

accessionno.: NC\_000011.9

sense (Nhe I): GGG**GCTAGC**AGTGAGGATGTGGGTCCAAG

antisense (Xho I): GG**CTCGAGT**GGGCCAGGCCAGCCCAAGT

kodiert für ein 1999 bp großes PCR-Produkt

#### Primer hOAT3-Prom:

Gen: hOAT3 / SLC22A8

Lokalisation: 62784509 bis 62782427

accessionno.: NC\_000011.9

sense (Nhe I): GGG**GCTAGC**GTGATAGATCCCCAATAAGG

antisense (Xho I): GG**CTCGAGG**CAGCTCAGCTCTAACAAGC

kodiert für ein 2082 bp großes PCR-Produkt

### **3.6 Reporter-Gen-Assay (SEAP)**

Beim SEAP-Assay handelt sich um ein Verfahren zur Quantifizierung von Promotoraktivitäten oder Genexpressionen.

Hierbei werden die OK-Zellen zunächst mit den hOAT1/3-Prom und einer sekretorischen alkalischen Phosphatase (SEAP) enthaltenen Plasmid transfiziert. Durch die Stimulation des Promotors kommt es zur Bildung der Phosphatase und Sekretion nach extrazellulär. Je stärker dabei der Signalweg aktiviert wird, desto ausgeprägter ist die zu bestimmende SEAP-Aktivität im Medium. Dabei wird ein chemolumineszentes Substrat von der alkalischen Phosphatase dephosphoryliert, wodurch ein instabiles Anion entsteht. Dieses zerfällt und emittiert Licht mit einer maximalen Intensität bei etwa 480 nm. Diese Eigenschaft wird verwendet, um die Aktivität des Promotors und die Regulation der Genexpression zu bestimmen.

#### **3.6.1 Transfektion von hOAT1 und hOAT3**

Die HEK-Zellen wurden in 24-well-Schalen angesät und wuchsen, bis eine Konflueszenz von 50-80% erreicht war. Für die Transfektion wurde zunächst ein Mastermix steril hergestellt. Hierfür wurden pro Well 0,6µg des jeweiligen Plasmides von hOAT1 bzw. hOAT3 und 0,006 µg lacZ in 20µl serumfreies Medium gegeben. Anschließend wurde 1,6µl FuGene® (FuGene® transfection kit von Promega, Madison, Wisconsin, USA) zugefügt und gemischt. Während der Mastermix 15 bis 20 Minuten bei Raumtemperatur ruhte, wurde den Zellen das Medium abgenommen und pro well 200µl frisches serumhaltiges Medium zugegeben. Anschließend wurden 20µl des Mastermixes auf die Zellen gegeben, leicht geschwenkt, und anschließend in den Brutschrank gestellt. Nach 24 Stunden erfolgte ein erneuter Wechsel auf 500µl serumfreies Medium. Nach weiteren 24 Stunden wurde das gesamte Medium in beschriftete Eppendorf-Gefäße überführt und bei -20°C im Gefrierschrank aufbewahrt. Hierbei handelte es sich um die "Null"-Werte als Ausgang für die Bestimmung der SEAP-Aktivität.

#### **3.6.2 Transfektion des SEAP-Basic**

Die HEK-Zellen wurden in 24-well-Schalen angesät und das Medium unmittelbar vor der Transfektion abgenommen und verworfen. Die Transfektion wurde bei einer Konflueszenz von 40-80% durchgeführt. Für den Reaktionsansatz wurden 0,6µl des leeren Plasmids in 20µl serumfreiem Medium gelöst. Anschließend wurden 2,4µl des Transfektionsreagens Polyfect hinzugegeben und durch mehrfaches Aufnehmen mit der Pipette gut gemischt. Der Ansatz wurde fünf bis zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde den Zellen 300µl frisches serumhaltiges Medium zugegeben. Im Anschluss wurde 120µl serumhaltiges Medium zum Transfektionsansatz gegeben und ebenfalls gut vermischt. 142µl dieser Mischung wurde auf die Zellen gegeben und für 24 Stunden im

Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte ein Wechsel auf 500µl serumfreies Medium. Nach weiteren 24 Stunden wurde das gesamte Medium in beschriftete Eppendorf-Gefäße überführt und bei -20°C im Gefrierschrank aufbewahrt. Auch hier handelte es sich um die "Null"-Werte als Ausgang zur Bestimmung der SEAP-Aktivität.

### 3.6.3 Hypoxiebehandlung mit anschließender Reperfusion

Anschließend wurden die Kontroll-Zellen unter Standardbedingungen für zwei Stunden weiter kultiviert, während die Ischämie-Zellen in der Hypoxiekammer einer modellhaften Ischämie bestehend aus Hypoxie, Azidose und Aglykämie unterzogen wurden. Hierfür wurde den Zellen unmittelbar vor der Behandlung 500µl des entsprechenden Puffers zugefügt: den Kontrollzellen der Bicarb-HEPES-Puffer und den Ischämie-Zellen der Bicarb-MES-Puffer. Direkt im Anschluss an die Ischämie bzw. die Behandlung unter Standardbedingungen wurden die entsprechenden Antagonisten und Inhibitoren zugegeben und einer 6-stündigen Reperfusion unter Standardbedingungen zugeführt. Dabei erfolgte die Auftragung der EP2- und EP4-Antagonisten für hOAT1, hOAT3 und SEAP Basic analog zu Tabelle 4 schematisch dargestellten Versuchen zur Fluoresceinaufnahme. Die Belegung der Kontroll- und Ischämiezellen mit Zugabe der verschiedenen COX-Hemmer ist nachfolgend dargestellt. Auch hier wurden für den hOAT1-, hOAT3- und SEAP-Basic jeweils zwei 24-Wellplatten (Kontroll- und Ischämiezellen) hergestellt.

Tabelle 5: Auftragung der verschiedenen COX-Hemmer für den SEAP-Assay.

Kontrollzellen (control)	Ischämie-Reperfusions-Zellen (model I/R)
control	model I/R
control +10µM indom. (Indometacin, Unspezifischer COX-Hemmer)	model I/R + 10µM indom. (Indometacin, Unspezifischer COX-Hemmer)
control +10µM SC560 (Spezifischer COX2-Hemmer)	model I/R + 10µM SC560 (Spezifischer COX2-Hemmer)
control + 10µM SC58125 (Spezifischer COX2-Hemmer)	model I/R + 10µM SC58125 (Spezifischer COX2-Hemmer)

### 3.6.4 Analyse der SEAP-Aktivität und $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmung

Nach erfolgter Reperfusion wurden sowohl die Kontroll-, als auch die Ischämiezellen mittels 100µl MOPS/Triton lysiert und für etwa 30 Minuten inkubiert. Dann wurden die Zellen mittels Pipette vom Boden der Wells abgekratzt und mehrfach resuspendiert, um eine sichere Lyse der Zellen zu erreichen. Anschließend wurde das Gemisch eines jeden Wells in Eppendorf-Gefäße überführt und für 10 Minuten bei 12000 rpm zentrifugiert.

Für die Probenaufbereitung und Messung des SEAP-Assays war zunächst die Herstellung des SEAP-Puffers erforderlich. Dieser wurde aus 60 mM L-Homoarginin, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM ZnCl<sub>2</sub> und 100mM Tris-HCl hergestellt und bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Im

Anschluss wurden jeweils 60µl der SEAP-Proben mit 60µl SEAP-Puffer vermischt und für 30 Minuten bei 65°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Proben kurz auf Eis gestellt und dann bei Raumtemperatur belassen. Jeweils 100µl dieses Gemisches wurde in eine lichtundurchlässige 96-well-Platte gegeben und erst kurz vor Messung der Fluoreszenzentwicklung wurde 100µl AttoPhos-AP-Lösung zugegeben. Die SEAP-Aktivität wurde anschließend im Tecan infinite M200 (Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz) bestimmt. Nachfolgend ist der zeitliche Ablauf des SEAP-Assays schematisch dargestellt.

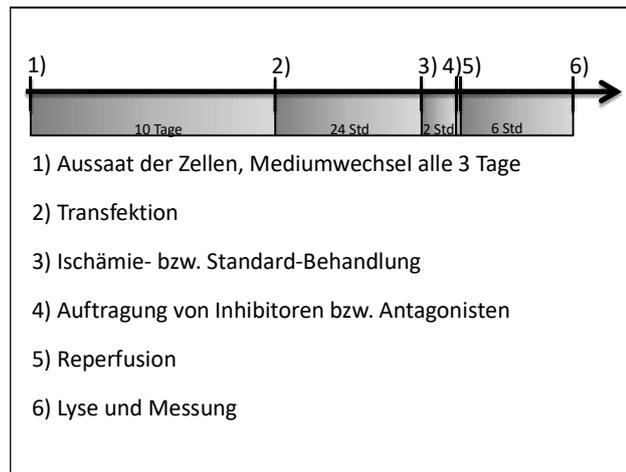


Abb. 5: Zeitlicher Ablauf des SEAP-Assays, Zeitangaben nicht maßstabsgetreu

Durch die Bildung der  $\beta$ Galaktosidase kann die erfolgreiche Transfektion getestet werden. Das LacZ-Gen kodiert die Bildung des Enzyms  $\beta$ -Galaktosidase, welches zuvor gemeinsam mit den Primern für hOAT1 und hOAT3 in die HEK-Zellen transfiziert wurde. Wenn diese Transfektion erfolgreich war, wird das Enzym gebildet und ein gelber Farbstoff erzeugt, der die positive Reaktion anzeigt. Für die Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase wurden 10µl des Lysates gemeinsam mit 50µl Cleavage Buffer und 20µl ONPG (*o*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert bis eine Gelbfärbung eintrat. Dann wurde die Reaktion mit 125µl Stop-Puffer abgestoppt und die Absorption in einem Multiwellplattenreader (Tecan Sunrise, Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz) bei 405nm gemessen.

### 3.7 R(everse)-T(ranskriptase)-PCR

Bei einer Polymerase-Kettenreaktion handelt es sich um eine sehr sensitive Methode zum Nachweis von RNA und zur Quantifizierung der Stärke der Gentranskription.

Die DNA einer jeden Zelle enthält den verschlüsselten Code zur Herstellung einer Vielzahl von Proteinen. Den Vorgang der Umsetzung dieses Bauplans bis hin zum fertigen Protein nennt man Proteinbiosynthese. Hierbei werden von unterschiedlichen Abschnitten doppelsträngiger DNA einzelsträngige RNA-Kopien hergestellt. Diese können mittels einer

Reversen Transkriptase in stabilere cDNA umgeschrieben werden, die dann wiederum durch die Polymerase Kettenreaktion vervielfältigt wird und nachgewiesen werden kann. Um die gewünschte RNA nachweisen zu können, müssen sich an die jeweilige cDNA spezifische Primer anlagern, die sich mit den entsprechenden Basenstränge verbinden und diese kopieren. Wenn eine bestimmte Menge an DNA-Kopien vorliegt, können diese mittels Agarose-Gel-Elektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt und anschließend mittels Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht werden.

Die RNA der HEK-Zellen wurde mittels des RNA-Isolationskits extrahiert (Qiagen, Hilden, Germany). Nach Bestimmung der RNA-Konzentration wurde die cDNA mittels iScript (Biorad, CA, USA) ermittelt und die RT-PCR nach dem iQ SYBR-Green Supermix-Protokoll (Biorad, CA USA) durchgeführt. Hierbei erfolgte die initiale Denaturierung und Enzymaktivierung bei 95°C für drei Minuten. Die anschließende PCR-Amplifikation wurde mit 40 Zyklen durchgeführt, wobei zunächst die Trennung der DNA-Stränge ebenfalls bei 95°C für 15 Sekunden erfolgte, dann die Anlagerung der Primer für 30 Sekunden bei 60°C und schließlich die Synthese des komplementären Stranges für 30 Sekunden bei 72°C.

Die verwendeten Primer und die daraus entstandenen Produkte für die humanen Prostaglandin-Rezeptoren-E2 und -E4 sind nachfolgend aufgelistet:

Primer humaner Prostaglandin-E2-Rezeptor (hEP2):

sense: 5'- AGA GGG GAA AGG GTG TCC AT -3'  
antisense: 5'- CCA AAG GCC AAG TAC CAT GC -3'  
kodiert für ein 562 bp großes RT-PCR-Produkt  
Intron: 11829 bp groß (accession no. NT\_026437.12)

Primer humaner Prostaglandin-E4-Rezeptor (hEP4):

sense: 5'- TGC TTC ATC GAC TGG ACC AC -3'  
antisense: 5'- TTC TCG CTC CAA ACT TGG CT -3'  
kodiert für ein 408 bp großes RT-PCR-Produkt  
Intron: 9918 bp groß (accession no. NT\_006576.16)

Die RT-PCR-Produkte wurden im Anschluss mittels Agarose-Gel-Elektrophorese und Schmelzpunktanalyse auf ihre korrekte Größe getestet. Anschließend wurden die PCR-Produkte eluiert und durch Eurofins/MWG Operon (Martinsried, Germany) sequenziert.

### **3.8 Datenanalyse**

Die Fluoreszenzmessung erfolgte im Victor<sup>2</sup>-Fluorencounter und die SEAP-Aktivität wurde im Tecan Sunrise gemessen. Die Berechnung und Auswertung dieser Daten wurde mittels Microsoft Excel 2007 durchgeführt. Die Darstellung erfolgte als Mittelwert ± SEM (standard error of means, mittlerer Fehler des Mittelwertes). Der mit *n* angegebene Wert wird im Text definiert oder in jedem Graph angegeben und entspricht der Anzahl an

durchgeführten Versuchen. Die statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA (analysis of variance, Varianzanalyse) und dem Student-Newman-Keuls-Test bestimmt. Als statistisch signifikant wurde eine Fehlerwahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  angesehen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Basolaterale Fluorescein-Aufnahme

#### 4.1.1 Effekte von Proteinkinase-A- und Phospholipase-C-Inhibitoren auf die Expressionsregulation von hAOT1 und hOAT3

In Abbildung 7 ist die Aufnahme von Fluorescein als klassisches organisches Anion in einer OK-Zelllinie im Ischämie-Reperfusion-Modell dargestellt. Die OK-Zellen wurden entweder unter Standardbedingungen (control) oder unter ischämischen Bedingungen (model I/R) jeweils in An- oder Abwesenheit von 10  $\mu$ M des Proteinkinase-A-Hemmers H89 inkubiert (control + H89 vs. model I/R + H89). Es zeigte sich eine signifikante Abschwächung der Aufnahme von Fluorescein nach erfolgter Ischämie-Reperfusion gegenüber den unter Standardbedingungen kultivierten Modellzellen. Durch Zugabe des Proteinkinase-A-Hemmers H89 konnte die durch Ischämie-Reperfusion induzierte Verminderung der zellulären Fluoresceinaufnahme vollständig aufgehoben werden. Unter Kontrollbedingungen konnte hingegen kein Effekt des Proteinkinase-A-Hemmers auf die zelluläre Fluoresceinaufnahme beobachtet werden.

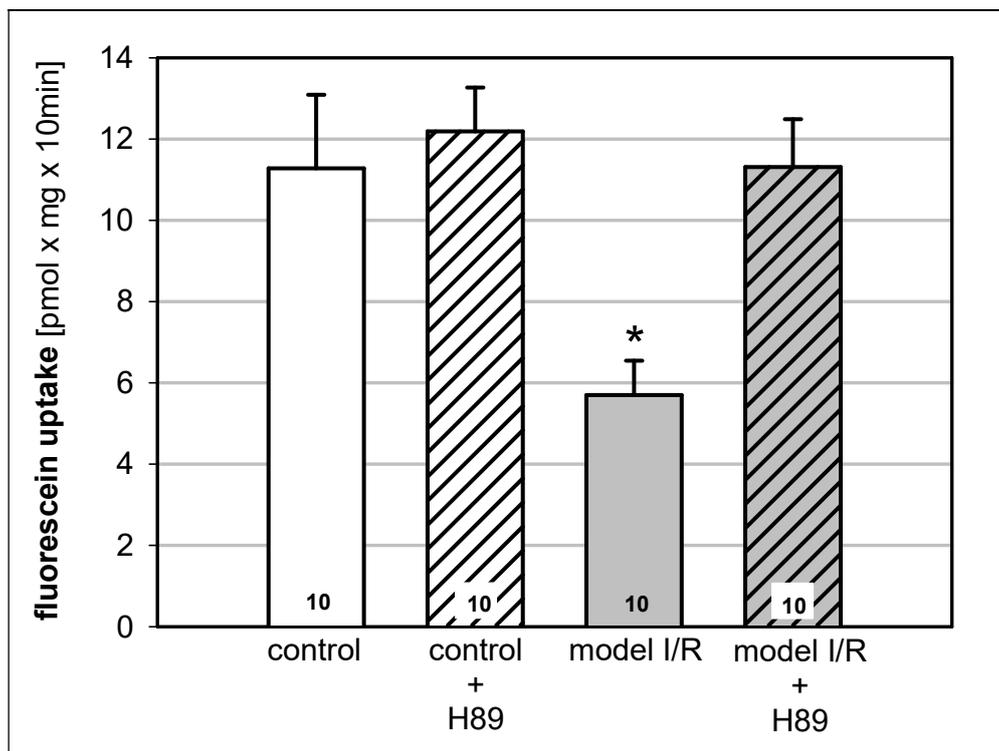


Abbildung 7: Basolaterale Aufnahme von organischen Anionen in OK-Zellen im Ischämie-Reperfusion-Modell: Effekt der PKA-Inhibitoren. \* statistische Signifikanz zu "control"

Die Beeinflussbarkeit der zellulären Fluoresceinaufnahme durch Hemmung der Phospholipase-C ist in Abbildung 8 gezeigt. Wie in dem vorangegangenen Experiment wurden die OK-Zellen entweder unter Standardbedingungen (control) oder ischämischen Bedingungen (model I/R) kultiviert. 5µM des Phospholipase-C-Hemmers U-73122 wurde jeweils zu einer Gruppe der Kontroll- und Ischämiegruppe hinzu gegeben. Die Modellischämie (model I/R) führte gegenüber der unbehandelten Kontrolle (control) zu einer signifikanten Reduktion der Aufnahme. Dieser Effekt wurde durch Zugabe des PLC-Inhibitors (model I/R + U-73122) nicht beeinflusst.

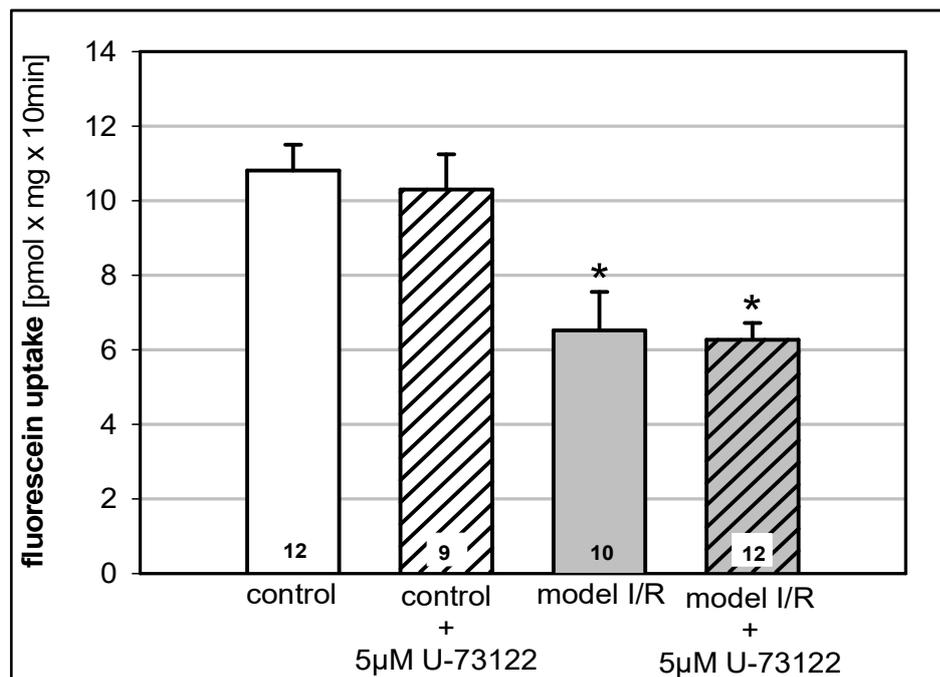


Abbildung 8: Basolaterale Aufnahme von organischen Anionen in OK-Zellen im Ischämie-Reperfusions-Modell: Effekt der PLC-Inhibitoren. \* statistische Signifikanz zu "control"

Durch den positiven Effekt der Proteinkinase-A-Inhibierung und des Ausbleiben einer Wirkung durch Hemmung der Phospholipase-C liegt nahe, dass die abgeschwächte Fluoresceinaufnahme durch die EP2- und/oder EP4-Rezeptoren vermittelt sein könnten. Entsprechend wurde deren Antagonisierung nachfolgend getestet.

#### 4.1.2 Effekte von EP2- und EP4-Antagonisten auf die Expressionsregulation von hAOT1 und hOAT3

Im nächsten Schritt wurde die Beeinflussbarkeit der Fluoresceinaufnahme durch Antagonisierung der Prostaglandin-E2- und E4-Rezeptoren mittels Applikation von AH6809 und L161,982 untersucht.

Wie in Abbildung 9 dargestellt, wurden die OK-Zellen in An- oder Abwesenheit von 35µM des EP2-Antagonisten AH6809 und 5µM des EP4-Antagonisten L161,982 entweder unter Standardbedingungen (control) oder ischämischen Bedingungen (model I/R) kultiviert. Analog zu den vorangegangenen Experimenten ist auch hier die Fluoresceinaufnahme der unbehandelten Ischämie-Reperfusionen-Gruppe (model I/R) gegenüber den Kontrollzellen (control) signifikant reduziert.

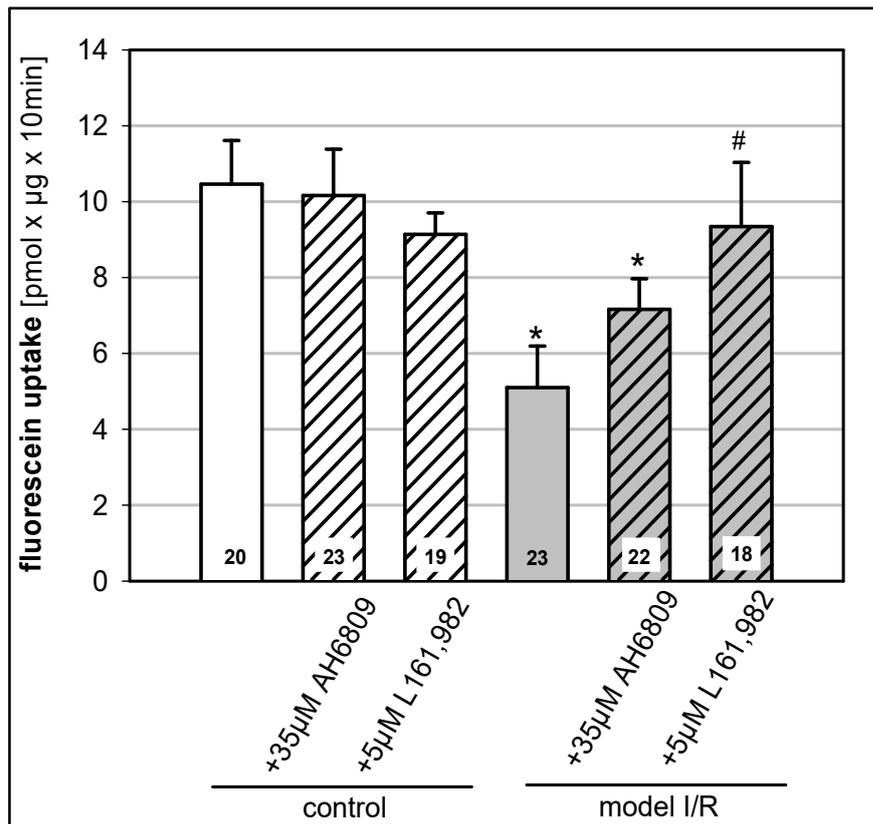


Abbildung 9: Basolaterale Aufnahme von organischen Anionen in OK-Zellen im Ischämie-Reperusions-Modell: Effekt von EP2- und EP4-Antagonisten. \* statistische Signifikanz zu "control", # statistische Signifikanz zu "model I/R"

Es wurde kein Effekt des EP2-Antagonisten AH6809 auf die zelluläre Fluoresceinaufnahme der Kontrollgruppe (control + 35µM AH6809) beobachtet. Unter ischämischen Bedingungen zeigte sich in Gegenwart des EP2-Antagonisten AH6809 (model I/R + 35µM AH6809) eine Abschwächung der Ischämie-induzierten Verminderung der Fluoresceinaufnahme, jedoch war diese zur unbehandelten Kontrollgruppe (control) weiterhin signifikant reduziert.

In Folge der Behandlung der Kontrollzellen mit dem EP4-Antagonist L161,982 (control + 5µM L161,982) kam es zu keiner veränderten Fluoresceinaufnahme. Eine deutliche Wirkung zeigte sich bei den Ischämie-Zellen. Die Ischämie-induzierte Hemmung der zellulären Fluoresceinaufnahme wurde durch L161,982 vollständig aufgehoben (model I/R + L161,982). Die Fluoresceinaufnahmerate der Ischämie-Zellen in Gegenwart des EP4-

Antagonisten (control + 5 $\mu$ M L161,982) wies keine signifikanten Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle (control) auf, war jedoch gegenüber der reinen Ischämie-Reperfusion (model I/R) signifikant erhöht (gekennzeichnet mit #).

Die Ischämie-Reperfusions-induzierte Verringerung der zellulären Fluoresceinaufnahme kann durch Antagonisierung des EP4-Rezeptors vollständig aufgehoben werden, jedoch zeigt eine EP2-Hemmung keinen Unterschied. Um diese Ergebnisse zu validieren, wurden im Folgenden die Wirkungen von EP2- und EP4-Agonisten untersucht.

#### 4.1.3 Effekte von EP2- und EP4-Agonisten auf die Expressionsregulation von hAOT1 und hOAT3

In diesen Versuchen wurden die EP2- und EP4-Agonisten Butaprost und TCS2510 den unter Standardbedingungen kultivierten OK-Zellen zugefügt. Diese Untersuchung erfolgte zur Verifizierung der zuvor erhobenen Ergebnisse, da hier eine gegenteilige Wirkung gegenüber der EP2- und EP4-Antagonisten zu erwarten war. Wie in Abbildung 10 dargestellt, erfolgte eine dosisabhängige Zugabe von Butaprost zu den Kontrollzellen ohne Ischämie-Behandlung mit anschließender Bestimmung des Fluoresceintransportes in proximale Tubuluszellen. Es zeigte sich, dass nach Applikation von 5, 50 und 100 $\mu$ M Butaprost keine signifikante Änderung, zur Fluoresceinaufnahme ohne Zugabe von Butaprost, stattfand.

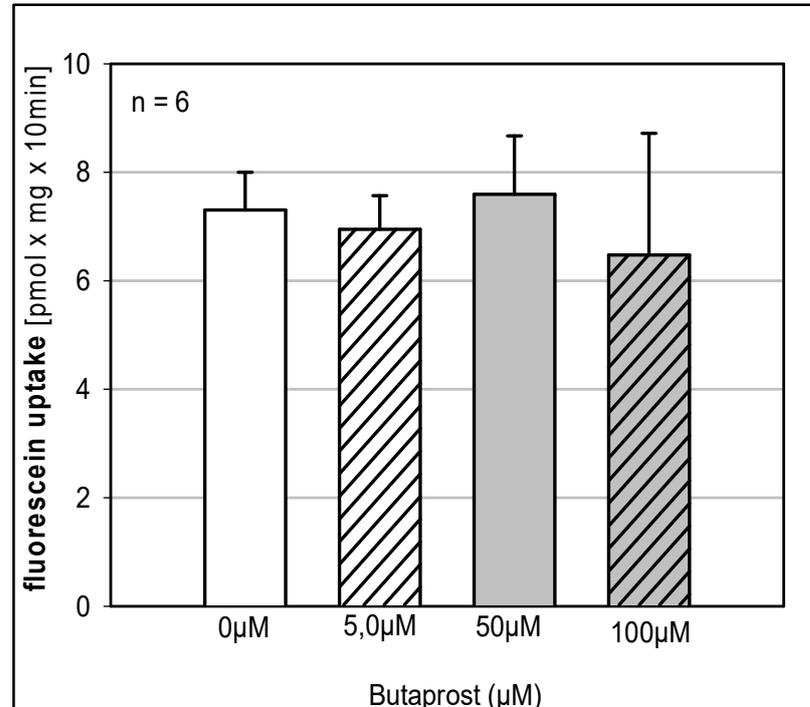


Abbildung 10: Basolaterale Aufnahme von organischen Anionen in OK-Zellen unter kontrollierten Konditionen: Effekt von EP2-Agonisten

Analog erfolgte die Zugabe von TCS2510 zu den proximalen Tubuluszellen mit anschließender Messung der Fluoresceinaufnahme. Wie in Abbildung 11 ersichtlich, erfolgte die Applikation von 0, 2,5, 25 und 50  $\mu\text{M}$  des EP4-Rezeptor-Agonisten. Nach Zugabe der kleinsten Dosis von 2,5  $\mu\text{M}$  zeigte sich kein Unterschied in der Fluoresceinaufnahme gegenüber den proximalen Tubuluszellen ohne TCS2510-Inkubation. Eine signifikante dosisabhängige Reduktion konnte jedoch nach Applikation von 25 und 50  $\mu\text{M}$  im Vergleich zu den unbehandelten Zellen beobachtet werden.

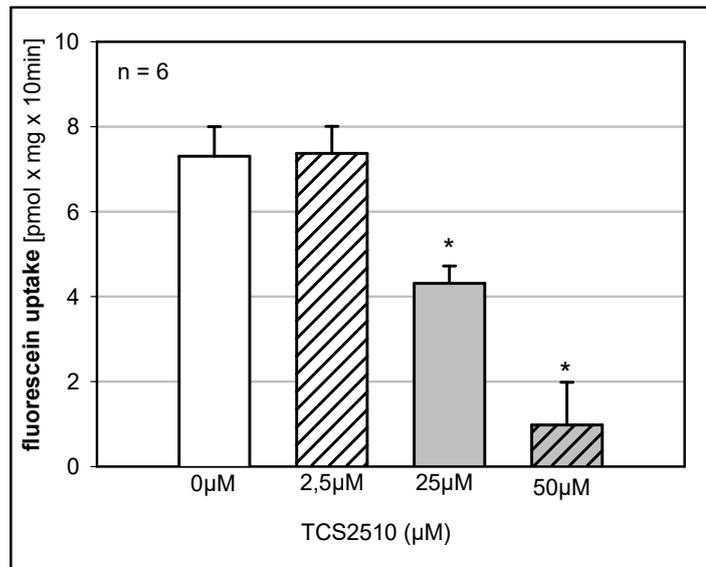


Abbildung 11: Basolaterale Aufnahme von organischen Anionen in OK-Zellen unter kontrollierten Konditionen: Effekt von EP4-Agonisten. \* statistische Signifikanz zu "control"

Der vermutete Effekt, dass eine Agonisierung des EP4-Rezeptors zu einer Abschwächung der zellulären Fluoresceinaufnahme führt, bestätigte sich. Der EP2-Agonist Butaprost blieb ohne Wirkung.

## 4.2 Reporter-Gen-Assays

### 4.2.1 Effekte von COX-Inhibitoren auf die Expressionsregulation von hOAT1 und hOAT3

Die Effekte der verschiedenen COX-Hemmer auf die Promotoraktivität der organischen Anionentransporter wurden anhand der Aktivität des SEAP-Reporter-Gen-Assays für hOAT1, hOAT3 und einem Basic-SEAP bestimmt.

In der Abbildung 12 ist das SEAP-Signal für hOAT1 dargestellt. Die HEK-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit des unspezifischen COX-Hemmers Indometacin, des COX1-Hemmers SC560 und des COX2-Hemmers SC58125 entweder unter Standardbedingungen oder ischämischen Bedingungen kultiviert.

Hierbei zeigte sich eine signifikante Reduktion des SEAP-Signals in Folge einer Ischämie-Behandlung (model I/R) im Vergleich zu den unter Standardbedingungen kultivierten Kontrollzellen (control).

Die Behandlung der Kontrollzellen mit dem unspezifischen COX-Hemmer Indometacin (control + 10µM indom.) hatte keinen Einfluss auf die SEAP-Aktivität. Die Gabe von Indometacin nach erfolgter Ischämie-Reperfusion (model I/R + 10µM indom.) bewirkte eine teilweise Aufhebung der Ischämie-induzierten Reduktion des SEAP-Signals. Die gemessene SEAP-Aktivität war im Vergleich zu den Kontrollzellen (control) signifikant erniedrigt (gekennzeichnet mit \*), im Vergleich zu den Ischämie-Reperfusionen-Zellen (model I/R) aber signifikant erhöht (gekennzeichnet mit #).

Analoge Effekte wurden bei der Behandlung der Zellen mit dem spezifischen COX1-Hemmer SC560 beobachtet. SC560 hatte keinen Einfluss auf die SEAP-Aktivität der Kontrollzellen (control), bewirkte aber eine signifikante Verminderung der Ischämie-induzierten Reduktion des SEAP-Signals (model I/R + 10µM SC560 im Vergleich zu model I/R). Mit Bezug auf die Kontrollzellen war die gemessene SEAP-Aktivität SC560-behandelter Zellen aber weiterhin signifikant reduziert.

Die Behandlung der Zellen mit dem spezifischen COX2-Inhibitor SC58125 hatte keine Auswirkung auf die gemessene SEAP-Aktivität. Im Vergleich der Kontrollzellen mit und ohne Zugabe von SC58125 (control vs. control + 10µM SC58125) zeigte sich kein Unterschied im SEAP-Signal, ebenso wie im Vergleich der Ischämie-Zellen mit und ohne Zugabe von SC58125 (model I/R vs. model I/R + 10µM SC58125).

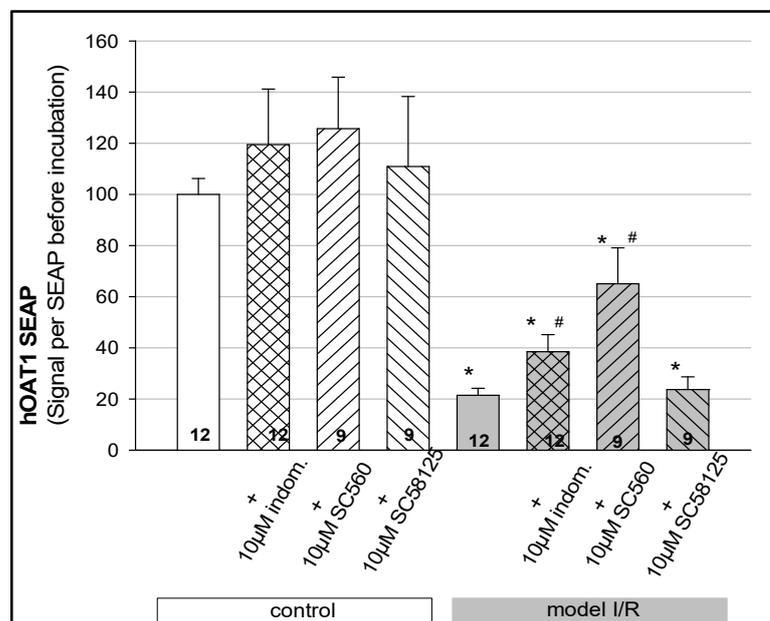


Abbildung 12: SEAP-Reporter-Gen-Assay in transfizierten HEK-Zellen im Ischämie-Reperfusionen-Modell: Effekt von COX-Inhibitoren in hOAT1-Prom. \* statistische Signifikanz zu "control", # statistische Signifikanz zu "model I/R"

Analog zu dem vorangegangenen Versuch wurde die SEAP-Aktivität des hOAT3 bestimmt. In der Abbildung 13 ist das SEAP-Signal für hOAT3 dargestellt. Die HEK-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit des unspezifischen COX-Hemmers Indometacin, des COX1-Hemmers SC560 und des COX2-Hemmers SC58125 entweder unter Standardbedingungen oder ischämischen Bedingungen kultiviert.

Die Behandlung der Kontrollzellen mit dem unspezifischen COX-Hemmer Indometacin (control + 10µM indom.) hatte keinen Einfluss auf die SEAP-Aktivität. Die Gabe von Indometacin nach erfolgter Ischämie-Reperfusion (model I/R + 10µM indom.) bewirkte eine teilweise Aufhebung der Ischämie-induzierten Reduktion des SEAP-Signals. Die gemessene SEAP-Aktivität war im Vergleich zu den Kontrollzellen (control) signifikant erniedrigt (gekennzeichnet mit \*), im Vergleich zu den Ischämie-Reperfusions-Zellen (model I/R) aber signifikant erhöht (gekennzeichnet mit #).

Ähnliche Effekte wurden bei der Behandlung der Zellen mit dem spezifischen COX1-Hemmer SC560 beobachtet. SC560 verstärkte die SEAP-Aktivität bereits in der Gruppe der Kontrollzellen (control) signifikant und bewirkte weiterhin eine signifikante Verminderung der Ischämie-induzierten Reduktion des SEAP-Signals (model I/R + 10µM SC560 im Vergleich zu model I/R). Mit Bezug auf die Kontrollzellen war die gemessene SEAP-Aktivität SC560-behandelter Zellen aber weiterhin signifikant reduziert.

Die Behandlung der Zellen mit dem spezifischen COX2-Inhibitor SC58125 hatte keine Auswirkung auf die gemessene SEAP-Aktivität. Im Vergleich der Kontrollzellen mit und ohne Zugabe von SC58125 (control vs. control + 10µM SC58125) zeigte sich kein Unterschied im SEAP-Signal, ebenso wie im Vergleich der Ischämie-Zellen mit und ohne Zugabe von SC58125 (model I/R vs. model I/R + 10µM SC58125).

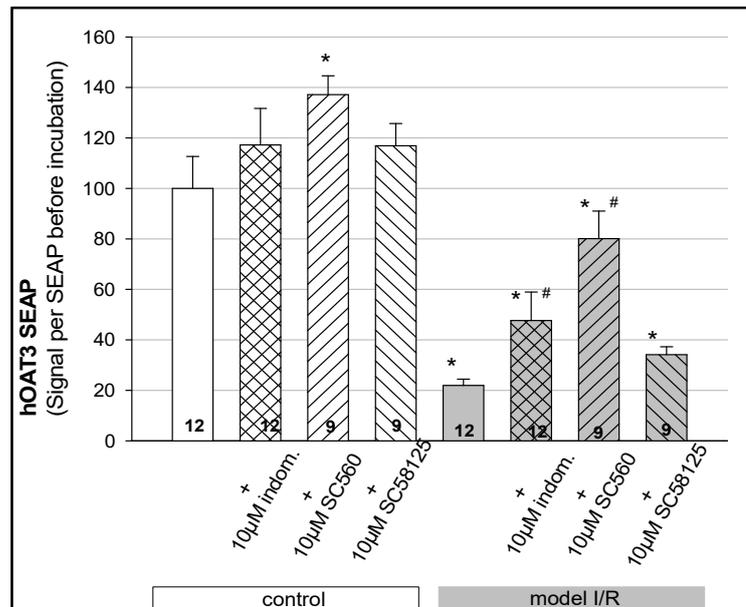


Abbildung 53: SEAP-Reporter-Gen-Assay in transfizierten HEK-Zellen im Ischämie-Reperfusions-Modell: Effekt von COX-Inhibitoren in hOAT3-Prom. \* statistische Signifikanz zu "control", # statistische Signifikanz zu "model I/R"

Die Effekte der verschiedenen COX-Hemmer im SEAP wurden auch für einen leeren Vektor untersucht. Durch Transfektion dieses leeren Vektors sollte die Ischämie-Reperfusion hier ohne Effekte bleiben.

Wie in Abbildung 14 dargestellt, wurden in An- oder Abwesenheit des unspezifischen COX-Hemmers Indometacin, des COX1-Inhibitors SC580 und des COX2-Hemmers SC58125 die SEAP-Signale unter Standardbedingungen (control) und nach stattgehabter Ischämie-Reperfusion (model I/R) untersucht. Unter ischämischen Bedingungen wurde bei allen Zellen eine signifikante Abnahme der SEAP-Aktivität beobachtet, während in den Kontrollzellen keine Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle (control) auftraten.

Die Behandlung der Ischämie-Zellen, sowohl mit Indometacin (model I/R + 10µM indom.), dem COX1-Hemmer SC580 (model I/R + 10µM Sc560) sowie dem COX2-Inhibitor SC58125 (model I/R + 10µM SC5812), konnten die Abschwächung des SEAP-Signals nicht aufheben.

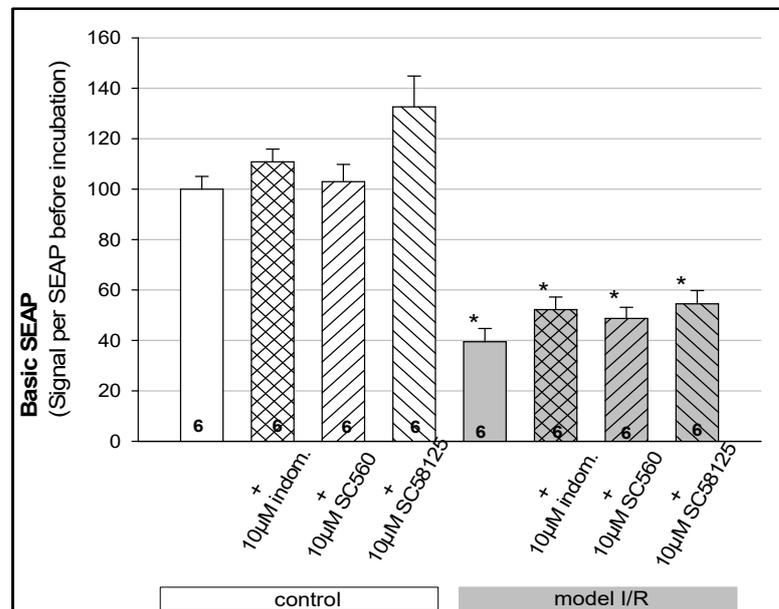


Abbildung 14: SEAP-Reporter-Gen-Assay in transfizierten HEK-Zellen im Ischämie-Reperfusions-Modell: Effekt von COX-Inhibitoren im SEAP2-Basic. \* statistische Signifikanz zu "control"

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich die abgeschwächte Expression von hOAT und hOAT3 infolge einer Ischämie-Reperfusion durch selektive COX1-Hemmer und den unspezifischen COX-Inhibitor Indometacin gegenüber den unbehandelten Ischämie-Reperfusions-Zellen aufheben lässt, während COX2-Hemmer keinen Effekt zeigen. Die Expression der SEAP-Basic-Zellen bleibt trotz Applikation der verschiedenen COX-Inhibitoren signifikant abgeschwächt.

#### 4.2.2 Effekte von EP2- und EP4-Antagonisten auf die Expressionsregulation von hAOT1 und hOAT3

Im nächsten Schritt wurden die Effekte der EP2- und EP4-Antagonisten auf Expression von hOAT1 nach stattgehabter Ischämie-Reperfusion im SEAP-Assay untersucht. Wie in Abbildung 15 dargestellt, zeigten die unter Standardbedingungen kultivierten Zellen einen leichten Anstieg des SEAP-Signals nach Zugabe der jeweiligen Antagonisten gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Unter ischämischen Bedingungen (model I/R) war das Signal in allen Gruppen signifikant reduziert im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (control). Der EP2-Antagonisten AH6809 (model I/R + 35µM AH6809) blieb auf diesen Effekt ohne Wirkung. Jedoch wurde die Ischämie-Reperfusions-bedingte Abschwächung des Signals durch den EP4-Antagonisten L191,982 (model I/R + 5µM L191,982) gegenüber den unbehandelten Ischämie-Zellen (model I/R) teilweise aufgehoben (gekennzeichnet mit #).

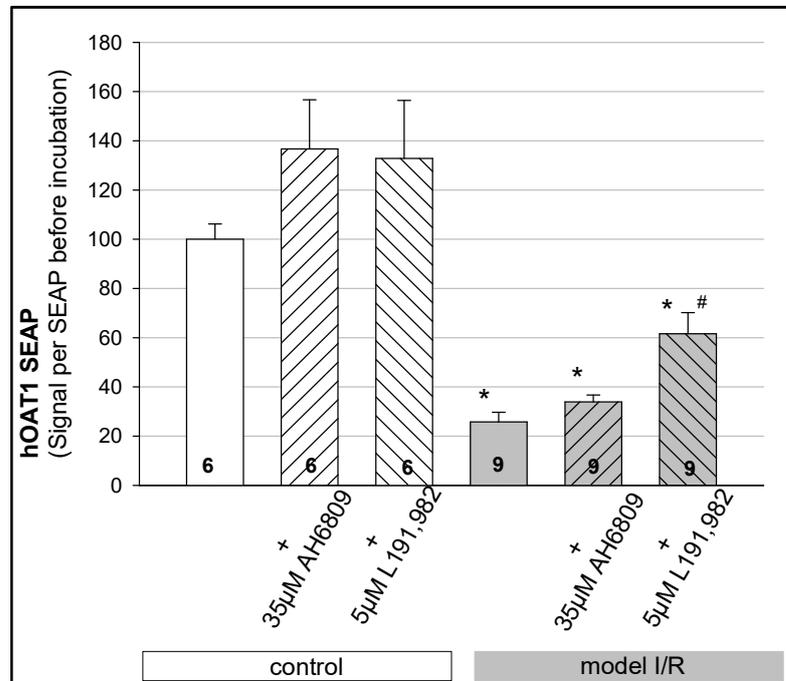


Abbildung 15: SEAP-Reporter-Gen-Assay in transfizierten HEK-Zellen im Ischämie-Reperfusions-Modell: Effekt von EP2- und EP4-Antagonisten in hOAT1-Prom. \* statistische Signifikanz zu "control", # statistische Signifikanz zu "model I/R"

Analog zum vorangegangenen Versuch erfolgte die Durchführung für den hOAT3. Die Ergebnisse des Reporter-Gen-Assays des hOAT3 sind in der Abbildung 16 zusammengefasst. Das SEAP-Signal der unter Standardbedingungen kultivierten Zellen (control) wurde durch den EP4-Antagonisten L191,982 leicht angehoben. Nach Ischämie-Reperfusion (model I/R) verringerte sich das SEAP-Signal signifikant im Vergleich zu den Kontrollzellen (control). Diese Abschwächung konnte durch den EP2-Antagonisten AH6809 nicht aufgehoben werden. Eine teilweise Aufhebung des verringerten SEAP-Signals gegenüber den

unbehandelten Ischämie-Zellen (model I/R) wurde jedoch durch den EP4-Antagonisten L191,982 (model I/R + 5µM L191,982) bewirkt (gekennzeichnet mit #).

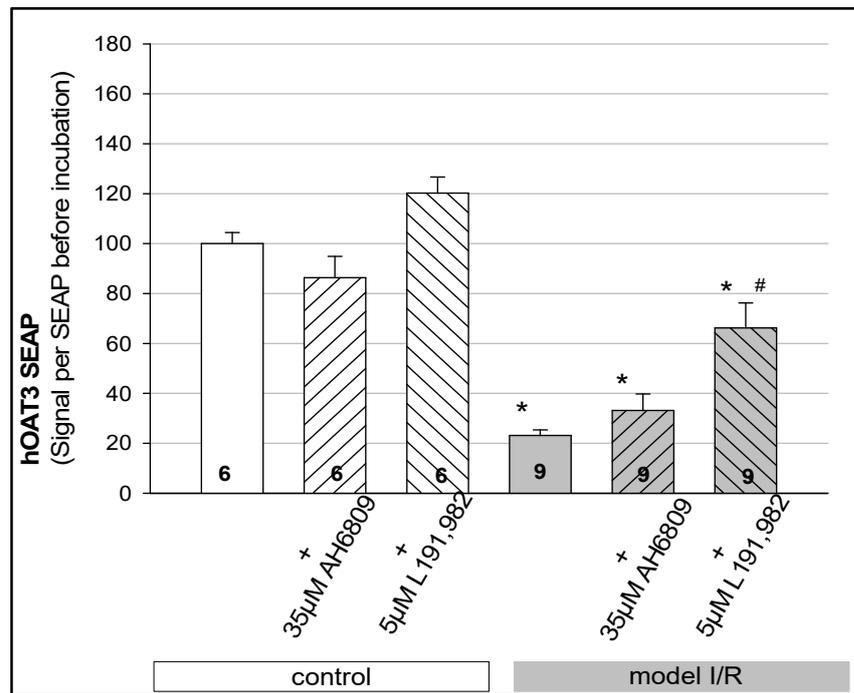


Abbildung 16:: SEAP-Reporter-Gen-Assay in transfizierten HEK-Zellen im Ischämie-Reperfusion-Modell: Effekt von EP2- und EP4-Antagonisten in hOAT3-Prom. \* statistische Signifikanz zu "control", # statistische Signifikanz zu "model I/R"

Die Effekte der EP2- und EP4-Antagonisten (AH6809 und L191,982) im SEAP wurden auch für einen leeren Vektor untersucht. Auch hier sollte durch die Transfektion des leeren Vektors kein Effekt auftreten und somit als "Negativkontrolle" zu werten sein.

Wie in Abbildung 17 dargestellt, wurden in An- oder Abwesenheit von AH6809 (EP2-Antagonist) und L191,982 (EP4-Antagonist) die SEAP-Signale unter Standardbedingungen (control) und nach stattgehabter Ischämie-Reperfusion (model I/R) untersucht. Unter ischämischen Bedingungen wurde bei allen Zellen eine signifikante Abnahme der SEAP-Aktivität beobachtet. In den Kontrollzellen bewirkte der EP4-Antagonist (control + 5µM L191,982) eine nicht signifikante Anhebung des SEAP-Signals gegenüber der unbehandelten Kontrolle (control).

Durch die Behandlung der Ischämie-Zellen, sowohl mit AH6809 (model I/R + 35µM AH6809), als auch mit L191,982 (model I/R + 5µM L191,982) konnte die Abschwächung des SEAP-Signals nicht aufgehoben werden.

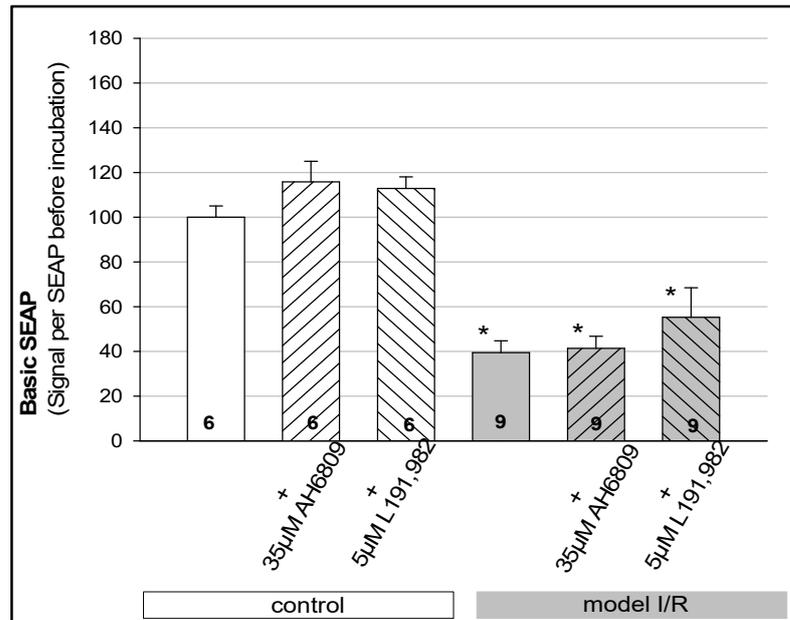


Abbildung 17: SEAP-Reporter-Gen-Assay in transfizierten HEK-Zellen im Ischämie-Reperfusion-Modell: Effekt von EP2- und EP4-Antagonisten in SEAP2-Basic. \* statistische Signifikanz zu "control"

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Abschwächung der Expression von hOAT1 und hOAT3 infolge einer Ischämie-Reperfusion-Schädigung durch Antagonisierung des EP4-Rezeptors im Vergleich zu den Ischämie-Zellen ohne weitere Behandlung aufzuheben ist. Der EP2-Antagonist hat dabei keinen Effekt. Die Expression des SEAP-Basic bleibt auch nach Applikation der Antagonisten weiterhin signifikant reduziert.

#### 4.2.3 Effekte von EP2- und EP4-Agonisten auf die Expressionsregulation von hOAT1 und hOAT3

Im Folgenden wurden auch von den jeweiligen Agonisten die SEAP-Aktivitäten bestimmt. Wie in den Versuchen zur Fluorescein-Aufnahme sollte die Applikation von EP2- und EP4-Agonisten einen gegenteiligen Effekt zur Applikation der entsprechenden Antagonisten hervorrufen. Auch hier war das Experiment zur Verifizierung der vorangegangenen Versuche durchgeführt worden. Die Abbildungen 18 und 19 zeigen die Ergebnisse für hOAT1 und hOAT3. Aufgetragen sind dabei der EP2-Agonist Butaprost in verschiedenen Dosierungen zwischen 0 und 100µM. Hierbei ließ sich kein dosisabhängiger Effekt auf das SEAP-Signal herausstellen. Die Daten des hOAT3 zeigten dabei ein ähnliches Bild. Nach Applikation von 5µM Butaprost kam es zu einer signifikanten Steigerung des SEAP-Signals gegenüber unbehandelten Zellen. In den weiteren Proben von 50 und 100µM zeigten sich keine relevanten Veränderungen.

In den Abbildungen 20 und 21 sind die Ergebnisse der Wirkung des EP4-Agonisten auf das SEAP-Signal des hOAT1 und hOAT3 dargestellt. Es wurden Konzentrationen von 0 bis 50 µM

aufgetragen. Nach Applikation von 2,5 $\mu$ M TCS2510 konnte eine signifikante Steigerung gegenüber den unbehandelten Zellen beobachtet werden. In den höheren Dosierungen von 25 und 50 $\mu$ M kam es zu einer relevanten dosisabhängigen Abnahme der SEAP-Aktivität.

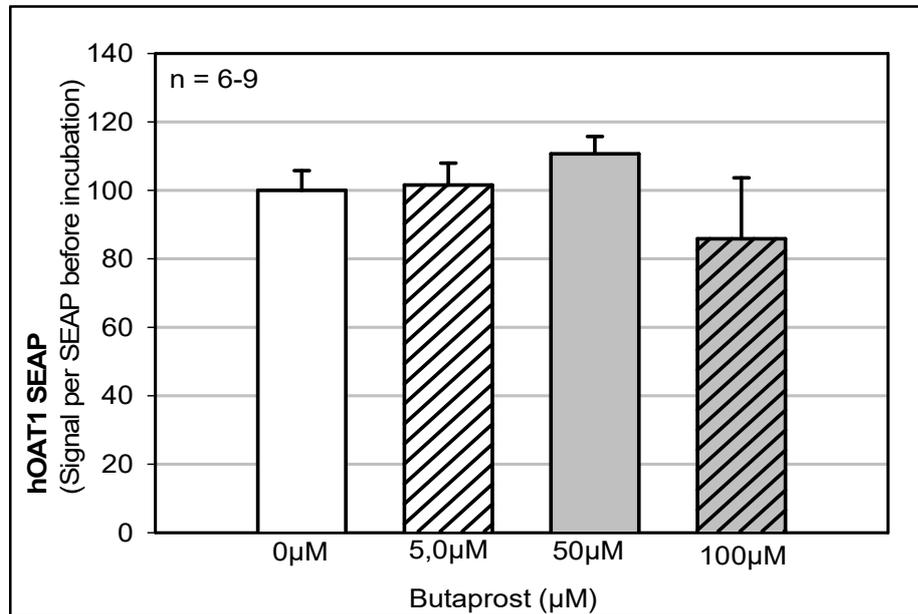


Abbildung 18: SEAP-Reporter-Gen-Assay in transfizierten HEK-Zellen im Ischämie-Reperfusion-Modell: Effekt von Butaprost in hOAT1-Prom

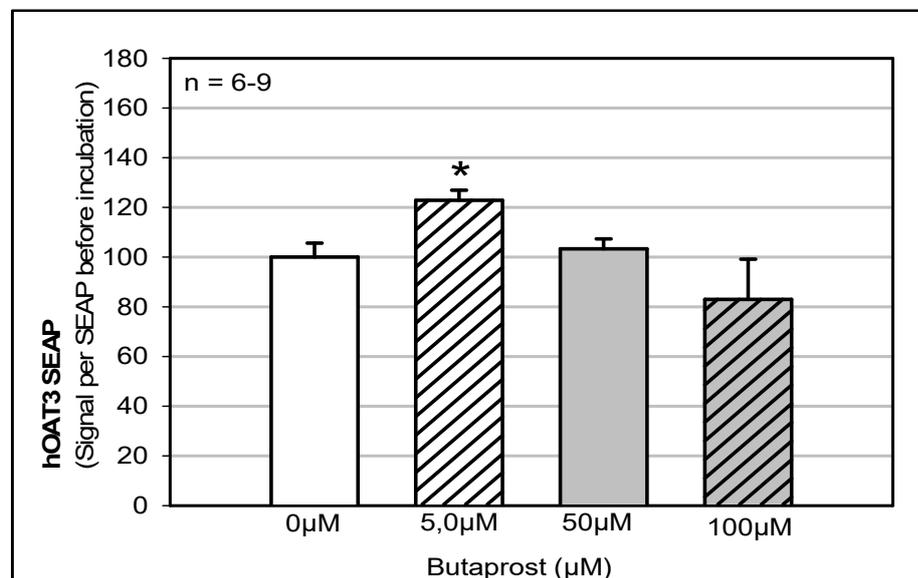


Abbildung 19: SEAP-Reporter-Gen-Assay in transfizierten HEK-Zellen im Ischämie-Reperfusion-Modell: Effekt von Butaprost in hOAT3-Prom. \* statistische Signifikanz zu "control"

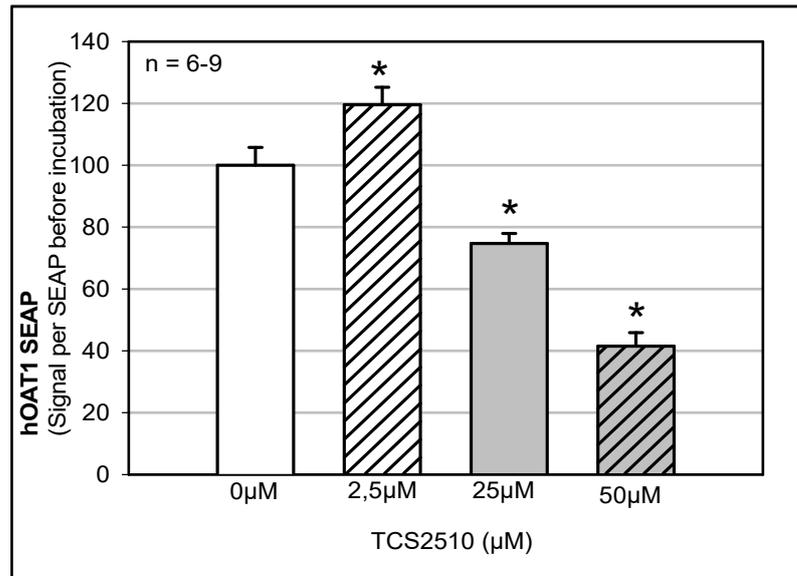


Abbildung 20: SEAP-Reporter-Gen-Assay in transfizierten HEK-Zellen im Ischämie-Reperfusion-Modell: Effekt von TCS2510 in hOAT1-Prom. \* statistische Signifikanz zu "0µM"

Ähnliche Ergebnisse wurden auch beim hOAT3 auffällig. Hierbei kam ebenfalls zunächst zu einer Steigerung des Signals nach Applikation von 2,5µM TCS2510, in den höheren Dosierungen fiel eine dosisabhängige Reduktion des Signals unter 25 und 50µM auf.

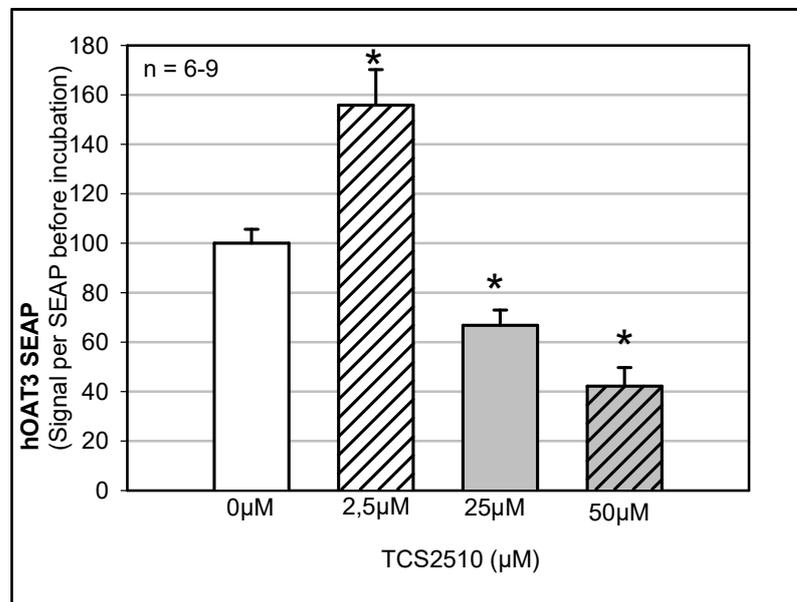


Abbildung 21: SEAP-Reporter-Gen-Assay in transfizierten HEK-Zellen im Ischämie-Reperfusion-Modell: Effekt von TCS2510 in hOAT3-Prom. \* statistische Signifikanz zu "0µM"

Zusammenfassend zeigt die Zugabe der EP4-Agonisten zu OAT1- und OAT3-Kontrollzellen eine dosisabhängige Abnahme der Expression, während der EP2-Agonist ohne Effekt auf die Expression bleibt.

#### 4.2.4 Nachweis von EP2- und EP4-mRNA

Mit dem Nachweis von EP2- und EP4-mRNA in HEK-Zellen konnte gezeigt werden, dass die beiden Rezeptoren tatsächlich in den Zellen vorhanden und die Ergebnisse damit valide sind.

Mittels RT-PCR wurde die mRNA amplifiziert und das entstandene PCR-Produkt gelelektrophoretisch untersucht und ausgeschnitten (siehe Abbildung 22). In der anschließenden Sequenzierung durch Eurofins/MWG Operon (Martinsried, Deutschland) konnten die Genprodukte mit einer Größe von 562 bp bzw. 408 bp den EP2- und EP4-Rezeptoren zugeordnet werden.



Abbildung 22: Detektion von EP2- und EP4-mRNA in HEK-Zellen

## **5. Diskussion**

### **5.1 Allgemeines**

Voruntersuchungen von Schneider et al. 2007 und 2009, sowie Sauvant C et al. 2007 belegen eine abgeschwächte Expression von OAT1 und OAT3 in Folge eines ischämischen Nierenschadens im Rattenmodell. Aufbauend auf diese bereits gewonnenen Erkenntnisse war es Ziel dieser Arbeit, die Transkriptionsregulation von hOAT1 und hOAT3 nach stattgehabter Ischämie-Reperfusion und die zu Grunde liegende Signalkaskade zu untersuchen.

Um die Abläufe und Ergebnisse der Experimente auch in einem gedanklich logischen Kontext darzustellen und diskutieren zu können, wurden einige bereits im Ergebnisteil getroffenen Aussagen in der Diskussion wiederholt.

### **5.2 Fluorescein-Transport in proximale Tubuluszellen (OK-Zellen)**

In Voruntersuchungen (Sauvant C et al. 2010) konnte gezeigt werden, dass Ischämie-Reperfusion den Transport von Fluorescein und anderen organischen Anionen in proximale Tubuluszellen vermindert. Außerdem wurde festgestellt, dass eine OAT1- und OAT3-Regulation durch COX1-Metabolite stattfindet (Bischoff A et al. 2014).

Die Prostaglandinrezeptoren EP1-4 sind unter anderem im Nierengewebe befindlich und gut charakterisiert. Eine Vermittlung der genannten Effekte über einen dieser Rezeptoren schien wahrscheinlich, sodass in dieser Arbeit die Identifizierung einer möglichen Signalkaskade angestrebt wurde. Des Weiteren sollte die Abschwächung und der Einfluss von COX-Metaboliten auf die Expression, und somit auch die Funktion, der organischen Anionentransporter nach einem Ischämie-Reperfusionsschaden untersucht werden. Für diesen funktionellen Versuch wurde die basolaterale Aufnahme des klassischen organischen Anions Fluorescein in proximale Tubuluszellen nach einer Ischämie-Reperfusion bestimmt.

Die Prostaglandinrezeptoren EP2 und EP4 vermitteln ihre Effekte über eine Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). EP4 ist zudem in Lage, eine Phospholipase-C-medierte (PLC) Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) zu induzieren. In dieser Arbeit wurde der Effekt einer PKA-Inhibition mittels H89 bzw. einer PLC-Inhibition mittels U-73122 auf die Fluoresceinaufnahme in proximale Tubuluszellen untersucht, um einen möglichen Signalweg für die Herunterregulation von hOAT1 und hOAT3 zu identifizieren. Hierbei zeigte sich, dass der PKA-Inhibitor, nicht aber der PLC-Hemmer eine Aufhebung der Ischämie-induzierten Verminderung der Fluoresceinaufnahme bewirkt. Aufgrund dieses positiven Effektes des PKA-Hemmers H89 auf die zelluläre Fluoresceinaufnahme schienen die Effekte EP2- und/oder EP4-vermittelt zu sein.

Um nun zwischen diesen beiden Rezeptoren weiter differenzieren zu können, wurden im nächsten Schritt die Effekte von EP2- und EP4-Antagonisten und -agonisten auf den Fluoresceintransport in proximale Tubuluszellen untersucht.

Zunächst erfolgte die Antagonisierung der Rezeptoren ischämischer Zellen unter Einsatz der Hemmstoffe AH6809 (EP2-Rezeptor) und L161,982 (EP4-Rezeptor). In der Tat konnte die Ischämie-induzierte Verminderung der zellulären Fluoresceinaufnahme durch den EP4-Antagonisten, nicht aber durch den EP2-Antagonisten, vollständig aufgehoben werden.

Eine Zugabe der entsprechenden Agonisten zu den EP2- und EP4-Rezeptoren müsste folglich gegensätzliche Effekte zur Folge haben. Zur Validierung der bisher erhobenen Daten wurden daher OK-Zellen mit den entsprechenden Agonisten inkubiert und die zelluläre Fluoresceinaufnahme bestimmt.

Der EP4-Agonist TCS2510 zeigte dabei eine deutliche dosisabhängige Abschwächung des Fluoresceintransportes in OK-Zellen, während für den EP2-Agonisten Butaprost keine Veränderungen dargestellt werden konnten. Wie erwartet zeigte sich ein dosisabhängig zunehmender Funktionsverlust der organischen Anionentransporter hOAT1 und hOAT3 im Sinne einer weiteren Abnahme der Fluoresceinaufnahme.

Zusammengefasst haben weder Antagonisten noch Agonisten des EP2-Rezeptors einen Effekt auf die zelluläre Fluoresceinaufnahme. Im Gegensatz dazu konnte eine Antagonisierung des EP4-Rezeptors mittels L161,982 der Abschwächung der Fluoresceinaufnahme durch Ischämie-Reperfusion entgegenwirken, während eine Zugabe der Agonisten diesen Effekt weiter verstärkte. Dies ließ die Schlussfolgerung zu, dass Ischämie und Reperfusion die verminderte Aufnahme von Fluorescein vor allem über den Prostaglandin-E4-Rezeptor vermitteln (Preisig C et al. 2015).

Bisher konnte ausschließlich der EP4-Rezeptor in OK-Zellen nachgewiesen werden (Sauvant C et al. 2003). Diese Tatsache könnte eventuell erklären, warum RNA-Sequenzen des EP2-Rezeptors in den Primern, die für vorangegangene Studien verwendet wurden, nicht nachgewiesen werden konnten. Aus diesem Grund kann man keine Aussage darüber treffen, dass EP2-Antagonisten und -Agonisten keinen Effekt auf die Herunterregulation der Fluoresceinaufnahme haben. Denn es ist aktuell unklar, ob der Rezeptor in OK-Zellen nicht vorhanden ist, oder lediglich keinen Einfluss auf den Transport von organischen Anionen hat.

Die verwendeten Rezeptor-Antagonisten sind nicht absolut selektiv, sondern haben durchaus auch geringe Affinität zu anderen Prostaglandin-Rezeptoren. So inhibiert AH6809 nicht nur EP2 ( $K_i = 0,35\mu\text{M}$ ), sondern mit wesentlich geringerer Affinität auch EP1. Ebenso kann man mit L161,982 nicht nur EP4 ( $K_i = 0,0245\mu\text{M}$ ) hemmen, sondern auch EP1 ( $K_i = 19\mu\text{M}$ ), EP2 ( $K_i = 23\mu\text{M}$ ) und EP3 ( $K_i = 2\mu\text{M}$ ). Daher wurden für EP2 und EP4 spezifische Agonisten in verschiedenen Dosierungen appliziert, um die beste Dosis-Wirkungs-Beziehung zu erzielen.

### 5.3 Reporter-Gen-Assays

In den Reporter-Gen-Assays wurde mittels SEAP-Assay die Expression auf transkriptioneller Ebene für hOAT1 und hOAT3 bestimmt. Diese Versuche wurden außerdem mit einem Basic-SEAP mit leerem Vektor als Negativkontrolle durchgeführt. Denn die Beobachtungen der Expressionsregulation von hOAT1- und hOAT3 dürften in einem SEAP mit transfiziertem Leer-Vektor nicht auftreten.

Zunächst wurde der Effekt von verschiedenen COX-Inhibitoren auf die Expressionsregulation untersucht. Nach erfolgter Ischämie wurden den Zellen Indometacin als unspezifischer COX-Hemmer, ein selektiver COX-1- und COX-2-Hemmer (SC560 und SC58125) zugesetzt.

Wie erwartet kam es in allen Proben nach Ischämie-Reperfusion zu einer signifikanten Reduktion des Signals. Sowohl im hOAT1 als auch im hOAT3 konnte die Herunterregulation der Expression durch die verabreichten COX-Hemmer in unterschiedlicher Weise abgeschwächt werden. Indometacin verhinderte zum Teil die Abschwächung der SEAP-Aktivität von hOAT1 und hOAT3. Spezifische COX1-Hemmer konnten diesen Effekt sogar noch verstärken, während COX2-Hemmer keine Veränderung der Expression bewirkten. Vor allem selektive COX1-Hemmer konnten die durch Ischämie-Reperfusion verursachte Abschwächung der Expression zum Teil aufheben.

Die mit dem SEAP2-Basic-Vektor inkubierten HEK-Zellen zeigten interessanterweise eine verminderte SEAP-Aktivität nach Ischämie-Reperfusion. Im Gegensatz zu den mit putativen Promotoren transfizierten Zellen konnten Indometacin und SC560 die Herunterregulation beim SEAP-Basic jedoch nicht beeinflussen. Die Abschwächung der transkriptionalen Regulation nach Ischämie-Reperfusion scheint also auch ein allgemeiner, eher unspezifischer Effekt zu sein.

Im nächsten Schritt wurden die Effekte von EP2- und EP4-Antagonisten im SEAP-Assay auf die Regulation der Expression von hOAT1 und hOAT3 untersucht. Ziel der Experimente war es, eine mögliche Signalkaskade für die COX1-Inhibitor-induzierte Verbesserung des Outcomes zu identifizieren.

Die HEK-Zellen wurden der zweistündigen Ischämie unterzogen. Vor Beginn der Reperfusion erfolgte die Applikation der EP4- und EP2-Antagonisten AH6809 und L191,982. Auch hier wurden die Ischämiezellen gegenüber den Kontrollen deutlich herunter reguliert. Was schon für die Aufnahme von Fluorescein in proximale Tubuluszellen gezeigt wurde, war auch in der SEAP-Aktivität zu erkennen: eine Antagonisierung des EP4-Rezeptors konnte zum Teil die durch Ischämie-Reperfusion bedingte Herunterregulation von hOAT1 und hOAT3 abschwächen. Die mit dem EP4-Antagonisten behandelten Zellen zeigten eine signifikant höhere Aktivität als die Ischämiezellen ohne weitere Behandlung. Die Antagonisierung von EP2 blieb dabei ohne Effekt.

Mit dem SEAP2-Basic-Vektor inkubierten HEK-Zellen konnten AH6809 und L161,982 die durch Ischämie-Reperfusion induzierte Herunterregulation nicht abschwächen.

Anschließend wurden auch von den jeweiligen Agonisten die SEAP-Aktivitäten der Kontrollzell-Gruppe bestimmt, da hier ein gegenteiliger Effekt zur Wirkung der EP2- und EP4-Antagonisten zu erwarten war. Der EP2-Agonist Butaprost erzielte in verschiedenen Dosierungen keine wesentliche Änderung der SEAP-Signale. Jedoch konnte die Aktivierung von EP4 mittels TCS2510 sowohl für hOAT1 als auch hOAT3 ein dosisabhängiger Effekt erzielt werden. Mit dem SEAP2-Basic-Vektor transfizierte HEK-Zellen zeigten weder die EP4- noch die EP2-Antagonisierung einen Unterschied in den entsprechenden SEAP-Signalen. Diese Daten wurden im Ergebnisteil nicht grafisch dargestellt.

Aus diesen Ergebnissen kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass nach stattgehabter Ischämie-Reperfusion die COX1-Metabolite über die Aktivierung des Prostaglandin-E4-Rezeptors in die verminderte Expression von hOAT1 und hOAT3 involviert sind (Preising C et al. 2015). Diese Ergebnisse sind im Einklang mit den Daten aus der zellulären Fluoresceinaufnahme. Auch im Rattenmodell konnte diese abgeschwächte Expression von OAT1 und OAT3 bereits nachgewiesen werden (Schneider et al. 2007 und 2009, Sauvant C et al. 2007). Da auch der SEAP-Basic in ähnlicher Art und Weise verändert war, liegt möglicherweise ein allgemeiner Effekt von Ischämie-Reperfusion auf die Gentranskription vor. Da jedoch hOAT1 und hOAT3 nach Inhibition von COX1 weniger stark abgeschwächt waren als der SEAP-Basic, sind die putativen humanen Promotorsequenzen verantwortlich für die Induktion von OAT-Expression nach COX1-Hemmung. Zu bedenken ist, dass die Inhibitoren unmittelbar nach stattgehabter Ischämie und unmittelbar vor Beginn der Reperfusion zugefügt wurden, sodass auch noch während der Reperfusion eine weitere Beeinträchtigung von hOAT1 und hOAT3 auftrat. Generell scheint die Translationsregulation nicht spezifisch von diesen beiden Anionentransportern abhängig zu sein.

In der RT-PCR wurden sowohl der EP2-, als auch der EP4-Rezeptor in HEK-Zellen nachgewiesen. So lässt sich das Ausbleiben einer Wirkung der EP2-Antagonisten und -agonisten (AH6809 und Butaprost) auf die Expression der organischen Anionentransporter OAT1 und OAT3 nicht durch Abwesenheit des Rezeptors in HEK-Zellen erklären.

#### **5.4 Einordnung der Ergebnisse in bisher veröffentlichte Literatur**

Leider gibt es wenig Daten über die Regulation von hOAT1 und hOAT3 nach renaler Ischämie. Es existieren einige Versuche über geschlechtsabhängige Regulationsunterschiede bei Mäusen. Breljak et al (2013) fanden eine generell stärkere Expression von OAT1 bei männlichen Tieren. Diese konnte durch Kastration herunterreguliert werden, während eine Testosterongabe zu einer Steigerung der Expression führte. Das OAT3-Protein war in geringerer Konzentration bei den männlichen Mäusen vorhanden. Hierbei kam es anders als beim OAT1 zu einer Hochregulation durch Kastration und zur Abschwächung der Expression unter einer Behandlung der Tiere mit Testosteron. Ljubojevic M et al. (2004) untersuchten Geschlechtsunterschiede in der Regulation von renalen OAT1 und OAT3 bei Ratten. Auch hier zeigte sich eine stärkere Ausprägung der Expression von OAT1 bei

männlichen Tieren in proximalen und distalen Tubuli. Eine Kastration adulter Männchen verursachte eine starke Expressionsabschwächung beider Transporter. Eine Ovariectomie der Weibchen führte jedoch zu keiner veränderten Expression.

Habu et al. (2005) widmeten sich den Effekten auf OAT1 und OAT3 durch Hyperurikämie bei Ratten. Hierbei wurde eine Herunterregulation beider Transporter bei hyperurämischen Tieren beobachtet. Auch der Transport des organischen Anion PAH nahm unter Hyperurikämie deutlich ab. Die PAH-Aufnahme korrelierte mit der Proteinkonzentration von OAT1 mehr als mit OAT3. Die Autoren schlussfolgerten, dass es sich beim OAT1 um den dominanten Transporter für den Transport von PAH handelt. Villar et al. (2005) untersuchten den Einfluss bilateraler Ureterobstruktion auf OAT1 und OAT3 im Sinne eines postrenalen Nierenversagens. Darunter kam es zu einer Abnahme der PAH-Exkretion und einer signifikanten Reduktion der OAT1- und OAT3-Expression.

Eine Applikation von Methotrexat (MTX) führte zu einer abgeschwächten Expression von OAT1 und OAT3 in Ratten. Dieser Effekt konnte von Shibayama et al. (2006) nachgewiesen werden.

Auch Studien, die sich mit der transkriptionellen Regulation beschäftigen sind selten. Ogasawara et al. (2007) beschrieben ein cAMP-response-Element in der Promotor-Region von hOAT3, welches eine Transkriptionsaktivierung via CRE über die Aktivierung einer Proteinkinase-A vermittelt. Diese Daten entsprechen der Signalvermittlung, die auch in dieser Arbeit identifiziert wurde.

Die vorhandenen Daten zu hOAT3 gehen mit den Ergebnissen von Kadam SR et al. (2013) überein, die eine Herunterregulation von okulärem Slc22A8 bei Ratten und Kälbern nach stattgehabter Hypoxie sahen. Exakt diese Hypoxie (Sauvant C et al. 2009) tritt auch bei akutem Nierenversagen auf und ist ein Teil des Ischämie-Reperfusion-Modell.

In Zusammenschau aller dargestellter Daten lassen sich die eingangs gestellten Fragen beantworten.

- (1)** COX1-Metaboliten sind in die transkriptionelle Regulation der renalen organischen Anionentransporter OAT1 und OAT3 nach Ischämie-Reperfusion involviert.
- (2)** Die bereits veröffentlichten Daten aus den bisherigen Experimenten sind im Einklang mit der transkriptionellen Regulation der humanen organischen Anionentransporter Typ 1 und 3.
- (3)** Die Signaltransduktion für diese transkriptionelle Regulierung von hOAT1 und hOAT3 findet über den EP4-Rezeptor statt.

## 6. Zusammenfassung

Die AKI ist ein häufig auftretender Organschaden und mit einer erhöhten Mortalität verbunden. Daher stellt sie therapeutisch weiterhin eine große Herausforderung dar.

Die organischen Anionentransporter sind in die pathophysiologischen Vorgänge beim akuten ischämisch bedingten Nierenschaden involviert. Das Transportsystem in den proximalen Nierentubuli spielt eine entscheidende Rolle in der Exkretion von potentiell toxischen Verbindungen. Es besteht aus Anionenaustauschern, welche in der basolateralen Membran lokalisiert sind und den limitierenden Schritt in der Exkretion verschiedener Stoffe zur apikalen Seite darstellen. OAT1 und OAT3 gehören diesem polyspezifischen Transportsystem für organische Anionen an. Im Allgemeinen wird der klassische renale Anionenaustausch an der basolateralen Membran durch diese beiden Transportmoleküle gewährleistet.

In Voruntersuchungen konnte sowohl im Tier- als auch im Zellmodell gezeigt werden, dass die Expression der organischen Anionentransporter OAT1 und OAT3 durch COX1-Metabolite herabgesetzt ist. Eine Hemmung durch niedrig dosiertes Indometacin oder COX1-Antagonisten kann die Abschwächung der Expression vermindern und das renale Outcome nach stattgehabter Ischämie-Reperfusion verbessern.

In dieser Arbeit sollte die Regulation der Vorgänge auf transkriptioneller Ebene untersucht werden. Für die Experimente wurden humane embryonale Nierenzellen und die geklonten Promotorsequenzen der humanen OAT1 und OAT3 verwendet, um damit eine eventuelle Übertragbarkeit der Ergebnisse auf Menschen zu ermöglichen.

Die Herunterregulation von OAT1 und OAT3 im Rattenmodell nach einer ischämischen Nierenschädigung geht auch mit einer Herunterregulation der Gentranskription einher. Interessanterweise wird ist auch das SEAP-Basic Signal erniedrigt, somit scheint die verminderte Expression nach Ischämie-Reperfusion ein genereller und unspezifischer Effekt zu sein.

Der Transport von Fluorescein in proximale Tubuluszellen war nach stattgehabter Ischämie-Reperfusion abgeschwächt. Dieser Effekt ist Proteinkinase-A-abhängig, die Phospholipase C war nicht involviert. Für die abgeschwächte basolaterale Aufnahme konnten die Prostaglandin-E<sub>2</sub> und -E<sub>4</sub>-Rezeptoren (EP2, EP4) identifiziert werden. Daher wurden anschließend die entsprechenden Rezeptor-Antagonisten appliziert. Hierbei schien eher EP4 als EP2 Teil der Signalkaskade zu sein. Somit wurde im Anschluss auch die Wirkung der jeweiligen Agonisten untersucht. Bei der Abschwächung der Aufnahme von organischen Anionen in proximale Tubuluszellen nach Ischämie-Reperfusion durch COX-1-Metaboliten handelt es sich um einen EP4-Rezeptor vermittelten Effekt.

Auch die Transkription von hOAT1 und hOAT3 war nach Ischämie-Reperfusion abgeschwächt. Nach Applikation der jeweiligen Agonisten und Antagonisten konnte ebenfalls hier ein EP4-Rezeptor vermittelter Mechanismus nachgewiesen werden. Dabei

blieb der EP2-Agonist ohne Effekt. Die verminderte Transkription von OAT1 und OAT3 durch COX-1-Metabolite wird somit über den EP4-Rezeptor mediiert.

Die Daten zeigen also, dass COX-1-Metabolite in die Regulation der organischen Anionentransporter nach Ischämie-Reperfusion über den EP4-Rezeptor einbezogen sind. Die Ergebnisse stimmen zudem überein mit denen der Regulation der Transporter auf transkriptioneller Ebene. Durch den humanen Ursprung der geklonten Promotorsequenzen und die Expressierung in einer humanen Zelllinie kann über eine Übertragbarkeit dieser Regulationsmechanismen auf den Menschen spekuliert werden. Des Weiteren könnten auch die im Tiermodell nachgewiesenen Effekte im menschlichen Organismus stattfinden. Dies bedarf jedoch weiterer Forschung, für die das Ischämie-Reperusions-Modell unter anderem geeignet wäre.

Abschließend kann man erneut herausstellen, dass Indometacin oder ein COX1-Hemmer in niedriger Dosierung einen positiven Effekt auf die Expression von OAT1 und OAT3 bei Ratten nach Ischämie-Reperfusion hat. Diese Tatsache könnte auch auf den menschlichen Organismus zutreffen und das Outcome nach stattgehabter Nierenschädigung sogar verbessern. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Herunterregulation von OAT1 und OAT3 bei Ratten in die Nierenschädigung nach Ischämie-Reperfusion beteiligt ist. Eventuell sind OAT-abhängige Mechanismen auch bei Menschen mit einer klinischen Relevanz behaftet. Wenn sich diese Hypothese beweisen ließe, würde sich ein neues mechanistisches Modell für die Induktion der ischämiebedingten Nierenschädigung ergeben.

## 7. Literaturverzeichnis

Abraham E, Anzueto A, Gutierrez G, Tessler S, San Pedro G, Wunderink R, Dal Nogare A, Nasraway S, Berman S, Cooney R, Levy H, Baughman R, Rumbak M, Light RB, Poole L, Allred R, Constant J, Pennington J, Porter S. (1998) Double-blind randomised controlled trial of monoclonal antibody to human tumour necrosis factor in treatment of septic shock. NORASEPT II Study Group. *Lancet* 351:929–933

Abramovitz M, Adam M, Boie Y, Grygorczyk R, Rushmore T, Nguyen T, Funk C, Bastien L, Sawyer N, Rochette C, Slipetz D, and Metters K (1995) Human prostanoid receptors: cloning and characterization. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 23:499–504

Antillon M, Cominelli F, Lo S, Moran M, Somberg K, Reynolds T, Zipser RD (1990) Effects of oral prostaglandins on indomethacin-induced renal failure in patients with cirrhosis and ascites. *J Rheumatol Suppl* 20:46–49

Arije A, Kadiri S, Akinkugbe OO (2000) The viability of hemodialysis as a treatment option for renal failure in a developing economy. *Afr J Med Med Sci* 29: 311–314

Arisz L, Donker AJ, Brentjens JR, van der Hem GK (1976) The effect of indomethacin on proteinuria and kidney function in the nephrotic syndrome. *Acta Med Scand* 199:121–125

Aslamkhan A, Han YH, Walden R, Sweet DH, Pritchard JB (2003) Stoichiometry of organic anion/dicarboxylate exchange in membrane vesicles from rat renal cortex and hOAT1-expressing cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 285(4):F775-783

Badr KF, Ichikawa I (1988) Prerenal failure: A deleterious shift from renal compensation to decompensation. *N Engl J Med* 319:623–629

Bahn A, Prawitt D, Buttler D, Reid G, Enklaar T, Wolff NA, Ebbinghaus C, Hillemann A, Schulten HJ, Gunawan B, Füzesi L, Zabel B, Burckhardt G (2000) Genomic structure and in vivo expression of the human organic anion transporter 1 (hOAT1) gene. *Biochem Biophys Res Commun* 275(2):623-630

Bahn A, Knabe M, Hagos Y, Rödiger M, Godehardt S, Graber-Neufeld DS, Evans KK, Burckhardt G, Wright SH (2002) Interaction of the metal chelator 2,3-dimercapto-1-propanesulfonate with the rabbit multispecific organic anion transporter 1 (rbOAT1). *Mol Pharmacol* 62(5):1128-1136

Bastien L, Sawyer N, Grygorczyk R, Metters K, and Adam M (1994) Cloning, functional expression, and characterization of the human prostaglandin E2 receptor EP2 subtype. *J Biol Chem* 269:11873–11877

Bischoff A, Bucher M, Gekle M, Sauvant C (2014) Differential effect of cox1 and cox2 inhibitors on renal outcomes following ischemic acute kidney injury. *Am J Nephrol* 40:1-11

- Bhatnagar V, Xu G, Hamilton BA, Truong DM, Eraly SA, Wu W, Nigam SK (2006) Analyses of 5' regulatory region polymorphisms in human *slc22a6* (*oat1*) and *slc22a8* (*oat3*). *J Hum Genet* 51:575-580
- Boie Y, Stocco R, Sawyer N, Slipetz DM, Ungrin MD, Neuschafer-Rube F, Puschel GP, Metters KM, and Abramovitz M (1997) Molecular cloning and characterization of the four rat prostaglandin E2 prostanoid receptor subtypes. *Eur J Pharmacol* 340: 227–241
- Bonventre JV (2003) Dedifferentiation and proliferation of surviving epithelial cells in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 14 Suppl 1:S55-61
- Bonventre JV (2007) Pathophysiology of acute kidney injury: roles of potential inhibitors of inflammation. *Contrib Nephrol* 156:39-46
- Breljak D, Brzica H, Sweet DH, Anzai N, Sabolic I (2013) Sex-dependent expression of *oat3* (*slc22a8*) and *oat1* (*slc22a6*) proteins in murine kidneys. *Am J Physiol Renal Physiol* 304:F1114-1126
- Breyer RM, Emeson RB, Breyer MD, Abromson RM, Davis LS, and Ferrenbach SM (1994) Alternative splicing generates multiple isoforms of a rabbit prostaglandin E2 receptor. *J Biol Chem* 298:6163–6169
- Breyer MD, Breyer RM (2000a) Prostaglandin receptors: their role in regulating renal function. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 9:23–29
- Breyer MD, Breyer RM (2000b) Prostaglandin E receptors and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 279:F12-23
- Breyer MD, Breyer RM (2001) G protein coupled prostanoid receptors and the kidney. *Annu Rev Physiol* 63:579-605
- Breyer MD, Hao C, Qi Z (2001) Cyclooxygenase-2 selective inhibitors and the kidney. *Curr Opin Crit Care* 7:393–400
- Brezis M, Rosen S (1995) Hypoxia of the renal medulla – its implications for disease. *N Engl J Med* 332:647–655
- Bührer C (2001) Gesellschaft für Neonatologie und pädiatrische Intensivmedizin e.V. (GNPI). Leitlinie: Symptomatischer Ductus arteriosus des Frühgeborenen - Diagnostik und Therapie. 01.08.2011. URL: [http://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/024-015l\\_S2k\\_Ductus\\_arteriosus\\_Fruehgeborene\\_2011-abgelaufen.pdf](http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/024-015l_S2k_Ductus_arteriosus_Fruehgeborene_2011-abgelaufen.pdf)
- Burckhardt BC, Burckhardt G (2003) Transport of organic anions across the basolateral membrane of proximal tubule cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 146:95-158
- Campean V, Theilig F, Paliege A, Breyer M, Bachmann S (2003) Key enzymes for renal prostaglandin synthesis: site-specific expression in rodent kidney (rat, mouse). *Am J Physiol Renal Physiol* 285:F19–32

Cantarovich F, Rangoonwala B, Lorenz H, Verho M, Esnault VL (2004) High-dose furosemide for established ARF: a prospective randomized, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. *Am J Kidney Dis* 44:402-409

Castrop H, Schweda F, Schumacher K, Wolf K, Kurtz A (2001) Role of renocortical cyclooxygenase-2 for renal vascular resistance and maculadensa control of renin secretion. *J Am Soc Nephrol* 12:867–874

Cha SH, Sekine T, Fukushima JI, Kanai Y, Kobayashi Y, Goya T, Endou H (2001) Identification and characterization of human organic anion transporter 3 expressing predominantly in the kidney. *Mol Pharmacol* 59(5):1277-1286

Cheng HF, Wang JL, Zhang MZ, Wang SW, McKanna JA, Harris RC (2001) Genetic deletion of COX-2 prevents increased renin expression in response to ACE inhibition. *Am J Physiol Renal Physiol* 280:F449–456

Chugh KS (1998) Renal disease in India. *Am J Kidney Dis* 31: Ivii–lix

Coleman RA, Kennedy I, Humphrey PPA, Bunce K, and Lumley P (1990) Prostanoids and their receptors. In: *Comprehensive Medicinal Chemistry*, Emmet JC. Oxford, UK: Pergamon Press 3:643–714

Coleman RA, Smith WL, and Narumiya S. (1994) VIII International union of pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev* 46:205–229

Conger JD, Robinette JB, Schrier RW (1988) Smooth muscle calcium and endothelium-derived relaxing factor in the abnormal vascular responses of acute renal failure. *J Clin Invest* 82:532-537

Corrigan G, Ramaswamy D, Kwon O, Sommer FG, Alfrey EJ, Dafoe DC, Olshen RA, Scandling JD, Myers BD (1999) PAH extraction and estimation of plasma flow in human postischemic acute renal failure. *Am J Physiol* 277:F312-318

Coskun T, O'Farrell LS, Syed SK, Briere DA, Beavers LS, Dubois SL, Michael MD, Franciskovich JB, Barrett DG, Efanov AM (2013) Activation of prostaglandin e receptor 4 triggers secretion of gut hormone peptides gip-1, gip2, and ppy. *Endocrinology* 154:45-53

Dantzler WH (2002) Renal organic anion transport: a comparative and cellular perspective. *Biochim Biophys Acta* 1566(1-2):169-181

Dantzler WH, Wright SH (2003) The molecular and cellular physiology of basolateral organic anion transport in mammalian renal tubules. *Biochim Biophys Acta* 1618:185-193

DiBona GF (1986) Prostaglandins and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Effects on renal hemodynamics. *Am J Med* 80:12–21

- Di Giusto G, Anzai N, Endou H, Torres AM (2008) Elimination of organic anions in response to an early stage of renal ischemia-reperfusion in the rat: Role of basolateral plasma membrane transporters and cortical renal blood flow. *Pharmacology* 81:127-136
- Edwards RM (1985) Effects of prostaglandins on vasoconstrictor action in isolated renal arterioles. *Am J Physiol Renal Physiol* 248:F779-784
- Edwards RM, Stack E, Trizna W (1997) Alpha-Ketoglutarate transport in rat renal brush-border and basolateral membrane vesicles. *J Pharmacol Exp Ther* 281(3):1059-64
- El-Sheikh AA, Masereeuw R, Russel FG (2008) Mechanisms of renal anionic drug transport. *Eur J Pharmacol* 585:245-255
- Friis C (1991) Renal transport and metabolism of xenobiotics. *Actavetscand* 32(S87):33-43
- Gaudry S, Hajage D, Schortgen F, Martin-Lefevre L, Pons B, Boulet E, Boyer A, Chevrel G, Lerolle N, Carpentier D, de Prost N, Lautrette A, Bretagnol A, Mayaux J, Nseir S, Megarbane B, Thirion M, Forel JM, Maizel J, Yonis H, Markowicz P, Thiery G, Tubach F, Ricard JD, Dreyfuss D; AKIKI Study Group (2016) Initiation Strategies for Renal-Replacement Therapy in the Intensive Care Unit. *N Engl J Med* 375(2):122-33
- Gekle M, Mildenerger S, Sauvant C, Bednarczyk D, Wright SH, Dantzier WH (1999) Inhibition of initial transport rate of basolateral organic anion carrier in renal PT by BK and phenylephrine. *Am J Physiol* 277:F251-256
- George RL, Wu X, Huang W, Fei YJ, Leibach FH, Ganapathy V (1999) Molecular cloning and functional characterization of a polyspecific organic anion transporter from *Caenorhabditis elegans*. *J Pharmacol Exp Ther* 291(2):596-603
- Guan Y, Chang M, Cho W, Zhang Y, Redha R, Davis L, Chang S, DuBois RN, Hao CM, Breyer M (1997) Cloning, expression, and regulation of rabbit cyclooxygenase-2 in renal medullary interstitial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 273:F18-26
- Guan Y, Zhang Y, Breyer RM, Fowler B, Davis L, Hébert RL, Breyer MD (1998) Prostaglandin E2 inhibits renal collecting duct Na<sup>+</sup> absorption by activating the EP1 receptor. *J Clin Invest* 102:194-201
- Habu Y, Yano I, Okuda M, Fukatsu A, Inui KI (2005) Restored expression and activity of organic ion transporters roat1, roat3 and roct2 after hyperuricemia in the rat kidney. *Biochem Pharmacol* 69:993-999
- Hagos Y, Bahn A, Asif AR, Krick W, Sandler M, Burckhardt G (2002) Cloning of the pig renal organic anion transporter 1 (pOAT1). *Biochimie* 84(12):1221-1224
- Hagos Y, Braun IM, Krick W, Burckhardt G, Bahn A (2005) Functional expression of pig renal organic anion transporter 3 (pOAT3). *Biochimie* 87(5):421-424

Haller M, Schelling G (2000) Akutes Nierenversagen. Pathophysiologie - klinische Bedeutung – Therapie. *Anaesthesist* 49:349-352

Hao CM, Komhoff M, Guan Y, Redha R, Breyer MD (1999) Selective targeting of cyclooxygenase-2 reveals its role in renal medullary interstitial cell survival. *Am J Physiol Renal Physiol* 277:F352–359

Hao CM, Breyer MD (2008) Physiological regulation of prostaglandins in the kidney. *Annu Rev Physiol* 70:357-377

Hartner A, Pahl A, Brune K, Goppelt-Struebe M (2000) Upregulation of cyclooxygenase-1 and PGE2 receptor EP2 in rat and human mesangioproliferative glomerulonephritis. *Inflamm Res* 49(7):345-354

Hattar K, Grandel U, Bickenbach A, Schwarting A, Mayet WJ, Bux J, Jessen S, Fischer C, Seeger W, Grimminger F, Sibelius U (2002) Interaction of antibodies to proteinase 3 (classic anti-neutrophil cytoplasmatic antibody) with human renal tubular epithelial cells: impact on signaling events and inflammatory mediator generation. *J Immunol* 168(6):3057-3064

Harris RC, McKanna JA, Akai Y, Jacobson HR, Dubois RN, Breyer MD (1994) Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J Clin Invest* 94:2504–10

Hasper D (2008) Das akute Nierenversagen - Wann und wie behandeln? Therapiestrategien im Überblick. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 4:286-291

Hausenloy DJ, Candilio L, Evans R, Ariti C, Jenkins DP, Kolvekar S, Knight R, Kunst G, Laing C, Nicholas J, Pepper J, Robertson S, Xenou M, Clayton T, Yellon DM; ERICCA Trial Investigators (2015) Remote Ischemic Preconditioning and Outcomes of Cardiac Surgery. *N Engl J Med* 373(15):1408-17

Herold G und Mitarbeiter: Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung. Dr. med. Gerd Herold, Köln, 2010, S. 605-609.

Herschman HR (1996) Prostaglandin synthase 2. *Biochim Biophys Acta* 1299:125-140

Heyman SN, Lieberthal W, Rogiers P, Bonventre JV (2002) Animal models of acute tubular necrosis. *Curr Opin Crit Care* 8: 526–34

Heyman SN, Rosenberger C, Rosen S (2010) Experimental ischemia-reperfusion: biases and myths-the proximal vs. distal hypoxic tubular injury debate revisited. *Kidney Int* 77: 9–16

Hla T, Neilson K (1992) Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:7384–7388

Hla T, Bishop-Bailey D, Liu CH, Schaeffers HJ, Trifan OC (1999) Cyclooxygenase-1 and -2 isoenzymes. *Int J Biochem Cell Biol* 31:551–57

Ho KM, Sheridan DJ (2006) Meta-analysis of furosemide to prevent or treat acute renal failure. *BMJ* 333:420

Hosoyamada M, Sekine T, Kanai Y, Endou H (1999) Molecular cloning and functional expression of a multispecific organic anion transporter from human kidney. *Am J Physiol* 276:F122-128

Hoste EA, McCullough PA, Kashani K, Chawla LS, Joannidis M, Shaw AD, Feldkamp T, Uettwiller-Geiger DL, McCarthy P, Shi J, Walker MG, Kellum JA (2014) Derivation and validation of cutoffs for clinical use of cell cycle arrest biomarkers. *Nephrol Dial Transplant*. 2014 Nov;29(11):2054-61

Imig JD (2006) Eicosanoids and renal vascular function in diseases. *Clin Sci* 111:21–34

Ito S, Carretero OA, Abe K, Beierwaltes WH, Yoshinaga K (1989) Effect of prostanoids on renin release from rabbit afferent arterioles with and without macula densa. *Kidney Int* 35:1138–1144

Kadam RS, Ramamoorthy P, LaFlamme DJ, McKinsey TA, Kompella UB (2013) Hypoxia alters ocular drug transporter expression and activity in rat and calf models: Implications for drug delivery. *Mol Pharm* 10:2350-2361

Karow T, Lang-Roth R: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden. 18. Auflage, Pulheim, 2010, S. 573-594.

Katsuyama M, Nishigaki N, Sugimoto Y, Morimoto K, Negishi M, Narumiya S, and Ichikawa A (1995) The mouse prostaglandin E receptor EP2 subtype: cloning, expression, and northern blot analysis. *FEBS Lett* 372:151–156

KDIGO Acute Kidney Injury Work Group (2012) KDIGO clinical practice guideline for acute kidney injury. *Kidney Int Suppl* 2:1-138

Kellerman PS, Bogusky RT (1992) Microfilament disruption occurs very early in ischemic proximal tubule cell injury. *Kidney Int* 42:896–902

Kellum JA, Lameire N; KDIGO AKI Guideline Work Group (2013) Diagnosis, evaluation, and management of acute kidney injury: a KDIGO summary (Part 1). *Crit Care* 17:204

Kennedy CR, Xiong H, Rahal S, Vanderluit J, Slack RS, Zhang Y, Guan Y, Breyer MD, Hébert RL (2007) Urineconcentrating defect in prostaglandin EP1-deficient mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 292:F868–875

Kobayashi Y, Hirokawa N, Ohshiro N, Sekine T, Sasaki T, Tokuyama S, Endou H, Yamamoto T (2002) Differential gene expression of organic anion transporters in male and female rats. *Biochem Biophys Res Commun* 290(1):482-487

Kohan DE (1993) Endothelins in the kidney: Physiology and pathophysiology. *Am J Kidney Dis* 22:493–510

- Kohli HS, Bhat A, Jairam A, Aravindan AN, Sud K, Jha V, Gupta KL, Sakhuja V (2007) Predictors of mortality in acute renal failure in a developing country: A prospective study. *Ren Fail* 29:463–469
- Kojima R, Sekine T, Kawachi M, Cha SH, Suzuki Y, Endou H (2002) Immunolocalization of multispecific organic anion transporters, OAT1, OAT2, and OAT3, in rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 13(4):848-857
- Komhoff M, Jeck ND, Seyberth HW, Grone HJ, Nusing RM, Breyer MD (2000) Cyclooxygenase-2 expression is associated with the renal macula densa of patients with Bartter-like syndrome. *Kidney Int* 58:2420–2422
- Kroshian VM, Sheridan A, Lieberthal W (1994) Functional and cytoskeletal changes induced by sublethal injury in proximal tubular epithelial cells. *Am J Physiol* 266:F21–F30
- Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW, Herschman HR (1991) TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem* 266:12866–12872
- Kusuhara H, Sekine T, Utsunomiya-Tate N, Tsuda M, Kojima R, Cha SH, Sugiyama Y, Kanai Y, Endou H (1999) Molecular cloning and characterization of a new multispecific organic anion transporter from rat brain. *J Biol Chem* 274(19):13675-13680
- Lameire N, Van Biesen W, Vanholder R (2006) The changing epidemiology of acute renal failure. *Nat Clin Pract Nephrol.* 2(7):364-377
- Liangos O, Wald R, O’Bell JW, Price L, Pereira BJ, Jaber BL (2006) Epidemiology and outcomes of acute renal failure in hospitalized patients: a national survey. *Clin J Am Soc Nephrol* 1:43–51
- Lieberthal W (1997) Biology of acute renal failure: Therapeutic implications. *Kidney Int* 52:1102–1115
- Lieberthal W<sup>1</sup>, Nigam SK. (1998) Acute renal failure. I. Relative importance of proximal vs. distal tubular injury. *Am J Physiol* 275:F623-631
- Linas SL, Shanley PF, Whittenburg D, Berger E, Repine JE (1988) Neutrophils accentuate ischemiareperfusion injury in isolated perfused rat kidneys. *Am J Physiol* 255:F728–F735
- Ljubojevic M, Herak-Kramberger CM, Hagos Y, Bahn A, Endou H, Burckhardt G, Sabolic I (2004) Rat renal cortical oat1 and oat3 exhibit gender differences determined by both androgen stimulation and estrogen inhibition. *Am J Physiol Renal Physiol* 287:F124-138
- Lopez-Nieto CE, You G, Bush KT, Barros EJ, Beier DR, Nigam SK (1997) Molecular cloning and characterization of NKT, a gene product related to the organic cation transporter family that is almost exclusively expressed in the kidney. *J Biol Chem* 272(10):6471-8

- Loutzenhiser R, Griffin K, Williamson G, Bidani A (2006) Renal autoregulation: new perspectives regarding the protective and regulatory roles of the underlying mechanisms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290:1153–1167
- Lu R, Chan BS, Schuster VL (1999) Cloning of the human kidney PAH transporter: narrow substrate specificity and regulation by protein kinase C. *Am J Physiol* 276:F295-303
- Lungkaphin A, Chatsudthipong V, Evans KK, Groves CE, Wright SH, Dantzler WH (2004) Interaction of the metal chelator DMPS with OAT1 and OAT3 in intact isolated rabbit renal proximal tubules. *Am J Physiol Renal Physiol* 286(1):F68-76
- Martensson J, Bellomo R (2014) The rise and fall of NGAL in acute kidney injury. *Blood Purif* 37:304-310
- Matsuzaki T, Watanabe H, Yoshitome K, Morisaki T, Hamada A, Nonoguchi H, Kohda Y, Tomita K, Inui K, Saito H (2007) Downregulation of organic anion transporters in rat kidney under ischemia/reperfusion-induced acute renal failure. *Kidney Int* 71(10):1079
- Meersch M, Schmidt C, Schmidt J, Zarbock A (2016) Timing of renal replacement therapy in critically ill patients with acute kidney injury. *Ann Transl Med.* 2016 Sep;4(18):360
- Meersch M, Zarbock A (2016) Akute Nierenschädigung - Ischämische Fernpräkonditionierung: ein Therapiekonzept für die Niere? *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 51(11-12):690-696
- Mehta RL, Pascual MT, Soroko S, Chertow GM; PICARD Study Group (2002) Diuretics, mortality, and nonrecovery of renal function in acute renal failure. *JAMA* 288:2547-53
- Meybohm P, Bein B, Brosteanu O, Cremer J, Gruenewald M, Stoppe C, Coburn M, Schaelte G, Böning A, Niemann B, Roesner J, Kletzin F, Strouhal U, Reyher C, Laufenberg-Feldmann R, Ferner M, Brandes IF, Bauer M, Stehr SN, Kortgen A, Wittmann M, Baumgarten G, Meyer-Treschan T, Kienbaum P, Heringlake M, Schön J, Sander M, Treskatsch S, Smul T, Wolwender E, Schilling T, Fuernau G, Hasenclever D, Zacharowski K; RIPHeart Study Collaborators (2015) A Multicenter Trial of Remote Ischemic Preconditioning for Heart Surgery. *N Engl J Med* 373(15):1397-1407
- Miller DS (1998) Protein kinase C regulation of organic anion transport in renal proximal tubule. *Am J Physiol* 274:F156-164
- Miyazaki H, Sekine T, Endou H (2004) The multispecific organic anion transporter family: properties and pharmacological significance. *Trends Pharmacol Sci* 25(12):654-62
- Molitoris BA, Geerdes A, McIntosh JR (1991) Dissociation and redistribution of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase from its surface membrane actin cytoskeletal complex during cellular ATP depletion. *J Clin Invest* 88: 462–469
- Molitoris BA (1993) Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase that redistributes to apical membrane during ATP depletion remains functional. *Am J Physiol* 265:F693–F697

Myers SI, Wang L, Liu F, Bartula LL (2005) Suprarenal aortic clamping and reperfusion decreases medullary and cortical blood flow by decreased endogenous renal nitric oxide and pge2 synthesis. *J Vasc Surg* 42:524-531

Mzail AH, Noble AR (1986) Haemorrhage-induced secretion of active and inactive renin in conscious and pentobarbitone-anaesthetized sheep. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 13:131-138

Narumiya S, FitzGerald GA (2001) Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. *J Clin Invest* 108:25-30

Nemoto K, Pilbeam CC, Bilak S, and Raisz L (1997) Molecular cloning and expression of the rat prostaglandin E2 receptor of the EP2 subtype. *Prostaglandins* 54:713-725

Nguyen M, Camenisch T, Snouwaert J, Hicks E, Coffman T, Anderson P, Malouf N, Koller B (1997) The prostaglandin receptor EP4 triggers remodelling of the cardiovascular system at birth. *Nature* 390:78-81

Oates JA (1982) The 1982 Nobel Prize in Physiology or Medicine. *Science* 218:765-68

Ogasawara K, Terada T, Asaka J, Katsura T, Inui K (2006) Human organic anion transporter 3 gene is regulated constitutively and inducibly via a camp-response element. *J Pharmacol Exp Ther* 319:317-322

Ogasawara K, Terada T, Asaka J, Katsura T, Inui K (2007) Hepatocyte nuclear factor-4{alpha} regulates the human organic anion transporter 1 gene in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 292:F1819-1826

Perri D, Ito S, Rowsell V, Shear NH (2003) The kidney-the body's playground for drugs: An overview of renal drug handling with selected klinical correlates. *Can J Clin Pharmacol JID* 10:17-23

Pinilla JM, Alberola A, Gonzalez JD, Quesada T, Salazar FJ (1993) Role of prostaglandins on the renal effects of angiotensin and interstitial pressure during volume expansion. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 265:R1469-1474

Preising C, Schneider R, Bucher M, Gekle M, Sauvant C (2015) Regulation of Expression of Renal Organic Anion Transporters OAT1 and OAT3 in a Model of Ischemia/Reperfusion Injury. *Cell Physiol Biochem.* 37(1):1-13

Pritchard JB (1995) Intracellular alpha-ketoglutarate controls the efficacy of renal organic anion transport. *J Pharmacol Exp Ther* 274(3):1278-1284

Pritchard JB, Miller DS (1996) Renal secretion of organic anions and cations. *Kidney Int* 49(6):1649-1654

Race JE, Grassl SM, Williams WJ, Holtzman EJ (1999) Molecular cloning and characterization of two novel human renal organic anion transporters (hOAT1 and hOAT3). *Biochem Biophys Res Commun* 255(2):508-514

Ramchandra R, Wan L, Hood SG, Frithiof R, Bellomo R, May CN (2009) Septic shock induces distinct changes in sympathetic nerve activity to the heart and kidney in conscious sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297: R1247–1253

Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis CS, Wenzel RP (1995) The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *JAMA* 273(2):117-123

Regan JW, Bailey TJ, Pepperl DJ, Pierce KL, Bogardus AM, Donello JE, Fairbairn CE, Kedzie KM, Woodward DF, and Gil DW (1994a) Cloning of a novel human prostaglandin receptor with characteristics of the pharmacologically defined EP2 subtype. *Mol Pharmacol* 46:213–220

Regan JW, Bailey TJ, Donello JE, Pierce KL, Pepperl DJ, Zhang D, Kedzie KM, Fairbairn CE, Bogardus AM, Woodward DF, and Gil DW (1994b) Molecular cloning and expression of F22 human EP3 receptors: evidence for three variants with different termini. *Br J Pharmacol* 112:6163–6169

Reid G, Wolff NA, Dautzenberg FM, Burckhardt G (1997) Cloning of a human renal p-aminohippurate transporter, hROAT1. *Kidney Blood Press Res* 21(2-4):233-237

Russ AL, Haberstroh KM, Rundell AE (2007) Experimental strategies to improve in vitro models of renal ischemia. *Exp Mol Pathol* 83(2):143-159

Sauvant C, Silbernagl S, Gekle M (1998) Exposure to ochratoxin a impairs organic anion transport in proximal tubule-derived opossum kidney cells. *J Pharmacol Exp Ther* 287:13-20

Sauvant C, Holzinger H, Gekle M (2001) Modulation of the basolateral and apical step of transepithelial organic anion secretion in proximal tubular opossum kidney cells. Acute effects of epidermal growth factor and mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 276(18):14695-14703

Sauvant C, Holzinger H, Gekle M (2002) Short-Term Regulation of Basolateral Organic Anion Uptake in Proximal Tubular OK cells: EGF Acts via MAPK, PLA<sub>2</sub> and COX-1. *J Am Soc Nephrol* 13:1981-1991

Sauvant C, Holzinger H, Gekle M (2003) Short-Term Regulation of Basolateral Organic Anion Uptake in Proximal Tubulus Opossum Kidney Cells: Prostaglandin E<sub>2</sub> Acts via Receptor-Mediated Activation of Protein Kinase A. *J Am Soc Nephrol* 14:3017-3026

Sauvant C, Holzinger H, Gekle M (2006) Prostaglandin E<sub>2</sub> inhibits its own renal transport by downregulation of organic anion transporters roat1 and roat3. *J Am Soc Nephrol* 17:46-53

Sauvant C, Schneider R., Betz B., Otremba M., Fischer H., Holzinger H., Wanner C., Galle J., Gekle M (2007) Oat1 and oat3 are down regulated after ischemic acute renal failure in rats. *Acta Physiologica* 2007;189:104

Sauvant C, Schneider R, Holzinger H, Renker S, Wanner C, Gekle M (2009) Implementation of an in vitro model system for investigation of reperfusion damage after renal ischemia. *Cell Physiol Biochem* 24:567-576

Sauvant C, Schneider R, Holzinger H, Renker S, Wanner C, Gekle M (2010) Indomethacin corrects alterations associated with ischemia/reperfusion in an in vitro proximal tubular model. *Am J Nephrol* 32:57-65

Schiff H, Lang SM, Fischer R (2002) Daily hemodialysis and the outcome of acute renal failure. *N Engl J Med* 346:305-310

Schlondorff D (1993) Renal complications of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Kidney Int* 44:643-653

Schneider R, Sauvant C, Betz B, Otremba M, Fischer D, Holzinger H, Wanner C, Galle J, Gekle M (2007) Downregulation of organic anion transporters oat1 and oat3 correlates with impaired secretion of paraaminohippurate after ischemic acute renal failure in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 292:F1599-1605

Schneider R, Meusel M, Renker S, Bauer C, Holzinger H, Roeder M, Wanner C, Gekle M, Sauvant C (2009) Low-dose indomethacin after ischemic acute kidney injury prevents down regulation of oat1/3 and improves renal outcome. *Am J Physiol Renal Physiol* 297:F1614-F1621

Schneider R, Meusel M, Betz B, Held C, Moller-Ehrlich K, Buttner-Herold M, Wanner C, Gekle M, Sauvant C (2015) Oat1/3 restoration protects against renal damage after ischemic aki. *Am J Physiol Renal Physiol* 308(3):F198-208

Schrier RW, Wang W (2004) Acute renal failure and sepsis. *N Engl J Med* 351:159-169

Schrier RW, Wang W, Poole B, Mitra A (2004) Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J Clin Invest* 114(1):5-14

Segi E, Sugimoto Y, Yamasaki A, Aze Y, Oida H, Nishimura T, Murata T, Matsuoka T, Ushikubi F, Hirose M, Tanaka T, Yoshida N, Narumiya S, Ichikawa A (1998) Patent ductus arteriosus and neonatal death in prostaglandin receptor EP4-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 246:7-12

Sekine T, Watanabe N, Hosoyamada M, Kanai Y, Endou H (1997) Expression cloning and characterization of a novel multispecific organic anion transporter. *J Biol Chem* 272(30):18526-18529

Sekine T, Miyazaki H, Endou H (2006) Molecular physiology of renal organic anion transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 290:F251-261.11

Shibayama Y, Ushinohama K, Ikeda R, Yoshikawa Y, Motoya T, Takeda Y, Yamada K (2006) Effect of methotrexate treatment on expression levels of multidrug resistance protein 2, breast cancer resistance protein and organic anion transporters oat1, oat2 and oat3 in rats. *Cancer Sci* 97:1260-1266

Shuprisha A, Lynch RM, Wright SH, Dantzer WH (2000) PKC regulation of organic anion secretion in perfused S2 segments of rabbit proximal tubules. *Am J Physiol Renal Physiol* 278(1):F104-109

Shuprisha A, Wright SH, Dantzer WH (2001) Method for measuring luminal efflux of fluorescent organic compounds in isolated, perfused renal tubules. *Am J Physiol Renal Physiol* 279(5):F960-964

Silbernagl S und Klinke R: *Lehrbuch der Physiologie*, 3. Auflage Thieme, Stuttgart, 2001, S.321.

Simmons DL, Levy DB, Yannoni Y, Erikson RL (1989) Identification of a phorbol ester repressible v-src-inducible gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:1178–82

Smith WL (1992) Prostanoid biosynthesis and mechanism of action. *J Am Physiol Renal Physiol* 263:F181-F191

Smith WL, Langenbach R (2001) Why there are two cyclooxygenase isoenzymes. *J Clin Invest* 107:1491-1495

Stock JL, Shinjo K, Burkhardt J, Roach M, Taniguchi K, Ishikawa T, Kim HS, Flannery PJ, Coffman TM, McNeish JD, Audoly LP (2001) The prostaglandin E2 EP1 receptor mediates pain perception and regulates blood pressure. *J Clin Invest* 107:325-331

Sweet DH, Wolff NA, Pritchard JB (1997) Expression cloning and characterization of ROAT1. The basolateral organic anion transporter in rat kidney. *J Biol Chem* 272(48):30088-30095

Sweet DH, Miller DS, Pritchard JB, Fujiwara Y, Beier DR, Nigam SK (2002) Impaired organic anion transport in kidney and choroid plexus of organic anion transporter 3 (Oat3 (Slc22a8)) knockout mice. *J Biol Chem* 277(30):26934-26943

Sweet DH, Chan LM, Walden R, Yang XP, Miller DS, Pritchard JB (2003) Organic anion transporter 3 (slc22a8) is a dicarboxylate exchanger indirectly coupled to the na<sup>+</sup> gradient. *Am J Physiol Renal Physiol* 284:F763-F769

Tahara H, Shono M, Kusuhara H, Kinoshita H, Fuse E, Takadate A, Otagiri M, Sugiyama Y. (2005) Molecular cloning and functional analyses of OAT1 and OAT3 from cynomolgus monkey kidney. *Pharm Res* 22(4):647-660

Takano M, Nagai J, Yasuhara M, Inui K (1996) Regulation of p-aminohippurate transport by protein kinase C in OK kidney epithelial cells. *Am J Physiol* 271:F469-475

- Terlouw SA, Masereeuw R, Russel FG (2003) Modulatory effects of hormones, drugs, and toxic events on renal organic anion transport. *Biochem Pharmacol.* 65(9):1393-1405
- Thijs LG (2001) The kidney in shock. *Contrib Nephrol* 132:26-40
- Tilley SL, Audoly LP, Hicks EH, Kim HS, Flannery PJ, Coffman TM, and Koller BH (1999) Reproductive failure and reduced blood pressure in mice lacking the EP2 prostaglandin E2 receptor. *J Clin Invest* 103:1539–1545
- Tilley SL, Coffmann TM, Koller BH (2001) Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *J Clin Invest* 108(1):15-23
- Tokuyama H, Hayashi K, Matsuda H, Kubota E, Honda M, Okubo K, Ozawa Y, Saruta T (2002) Stenosis-dependent role of nitric oxide and prostaglandins in chronic renal ischemia 10.1152/ajprenal.00012.2001. *Am J Physiol Renal Physiol* 282:F859-865
- Tokuyama H, Hayashi K, Matsuda H, Kubota E, Honda M, Okubo K, Takamatsu I, Ozawa Y, Saruta T (2003) Role of nitric oxide and prostaglandin e2 in acute renal hypoperfusion. *Nephrology (Carlton)* 8:65-71
- Towndrow KM , Mertens JJ , Jeong JK , Thomas J. Weber TW , Terrence J. Monks TJ , and Serrine S. Lau SS (2000) Stress- and Growth-Related Gene Expression Are Independent of Chemical-Induced Prostaglandin E<sub>2</sub> Synthesis in Renal Epithelial Cells *Chem Res Toxicol* 13(2):111–117
- Traynor TR, Smart A, Briggs JP, Schnermann J (1999) Inhibition of macula densa-stimulated renin secretion by pharmacological blockade of cyclooxygenase-2. *Am J Physiol Renal Physiol* 277:F706–710
- Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, Doig GS, Morimatsu H, Morgera S, Schetz M, Tan I, Bouman C, Macedo E, Gibney N, Tolwani A, Ronco C (2005) Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *JAMA* 294(7):813-818
- Ullrich KJ (1997) Renal transporters for organic anions and organic cations. Structural requirements for substrates. *J Membr Biol* 158(2):95-107
- Ullrich KJ (1999) Affinity of drugs to the different renal transporters for organic anions and organic cations. *Pharm Biotechnol* 12:159-179
- van Montfoort JE, Hagenbuch B, Groothuis GMM, Koepsell H, Meier PJ, DK Meier (2003) Drug Uptake Systems in Liver and Kidney. *Curr Drug Metabol* 4(3): 185-211
- Vane JR (1971) Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin like drugs. *Nat New Biol* 231:232–235
- Villar SR, Brandoni A, Anzai N, Endou H, Torres AM (2005) Altered expression of rat renal cortical oat1 and oat3 in response to bilateral ureteral obstruction. *Kidney Int* 68:2704-2713

- Vukicevic S, Simic P, Borovecki F, Grgurevic L, Rogic D, (2006) Role of EP2 and EP4 receptor-selective agonists of prostaglandin E2 in acute and chronic kidney failure. *Kidney Int* 70:1099–1106
- Waikar SS, Curhan GC, Wald R, McCarthy EP, Chertow GM (2006) Declining mortality in patients with acute renal failure, 1988 to 2002. *J Am Soc Nephrol* 17:1143–1150
- Walshe JJ, Brentjens JR, Costa GG, Andres GA, Venuto RC (1984) Abdominal pain associated with IgA nephropathy. Possible mechanism. *Am J Med* 77:765–767
- Willinger CC, Schramek H, Pfaller K, Pfaller W (1992) Tissue distribution of neutrophils in postischemic acute renal failure. *Virchows Arch B* 62:237–243
- Wohlfarth V, Drumm K, Mildenerger S, Freudinger R, Gekle M (2003) Protein uptake disturbs collagen homeostasis in proximal tubule-derived cells. *Kidney Int Suppl JID* - 7508622 103-109
- Wolff NA, Werner A, Burkhardt S, Burckhardt G (1997) Expression cloning and characterization of a renal organic anion transporter from winter flounder. *FEBS Lett* 417(3):287-291
- Wright SH, Dantzer WH (2004) Molecular and cellular physiology of renal organic cation and anion transport. *Physiol Rev* 84(3):987-1049
- Xue JL, Daniels F, Star RA, Kimmel PL, Eggers PW, Molitoris BA, Himmelfarb J, Collins AJ (2006) Incidence and mortality of acute renal failure in Medicare beneficiaries, 1992 to 2001. *J Am Soc Nephrol* 17:1135–1142
- Yang T, Singh I, Pham H, Sun D, Smart A, et al. 1998. Regulation of cyclooxygenase expression in the kidney by dietary salt intake. *Am J Physiol Renal Physiol* 274:F481–489
- Yared A, Kon V, Ichikawa I (1985) Mechanism of preservation of glomerular perfusion and filtration during acute extracellular fluid volume depletion. Importance of intrarenal vasopressin-prostaglandin interaction for protecting kidneys from constrictor action of vasopressin. *J Clin Invest* 75:1477–1487
- You Y, Hirsch DJ, Morgunov NS (1992) Functional integrity of proximal tubule cells. Effects of hypoxia and ischemia. *J Am Soc Nephrol* 3:965–974
- Yu L, Gengaro PE, Niederberger M, Burke TJ, Schrier RW (1994) Nitric oxide: a mediator in rat tubular hypoxia/reoxygenation injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(5):1691-1695.
- Zarbock A, Schmidt C, Van Aken H, Wempe C, Martens S, Zahn PK, Wolf B, Goebel U, Schwer CI, Rosenberger P, Haeberle H, Görlich D, Kellum JA, Meersch M; RenalRIPC Investigators (2015) Effect of remote ischemic preconditioning on kidney injury among high-risk patients undergoing cardiac surgery: a randomized clinical trial. *JAMA* 313(21):2133-41

Zarbock A, Kellum JA, Schmidt C, Van Aken H, Wempe C, Pavenstädt H, Boanta A, Gerß J, Meersch M (2016) Effect of Early vs Delayed Initiation of Renal Replacement Therapy on Mortality in Critically Ill Patients With Acute Kidney Injury: The ELAIN Randomized Clinical Trial. JAMA 315(20):2190-2199

## **8. Thesen**

- (1)** COX1-Metaboliten sind in die transkriptionelle Regulation der renalen organischen Anionentransporter OAT1 und OAT3 nach Ischämie-Reperfusion involviert.
- (2)** Die bereits veröffentlichten Daten aus den bisherigen Experimenten sind im Einklang mit der transkriptionellen Regulation der humanen organischen Anionentransporter Typ 1 und 3.
- (3)** Die Signaltransduktion für diese transkriptionelle Regulierung von hOAT1 und hOAT3 findet über den EP4-Rezeptor statt.

## **Lebenslauf**

### Angaben zur Person

Name: Christina Braun, geb. Preising

Geburtstag: 20.01.1987

Geburtsort: Nordhausen (Thüringen)

### Schule und Ausbildung

1993 bis 1997: Besuch der Grundschule "Am Frauenberg" in Nordhausen

1997 bis 2005: Besuch des Johann-Gottfried-Herder-Gymnasiums Nordhausen

Juni 2005: Abitur am Johann-Gottfried-Herder-Gymnasium

2005 bis 2011: Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

seit April 2012: Tätigkeit als Assistenzärztin in der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

## **Selbstständigkeitserklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis wurden beachtet (Amtsblatt der MLU Nr. 5, 02.07.09).

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

---

Christina Braun

## **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Ich versichere, dass von mir, Christina Braun, keine früheren Promotionsversuche mit dieser oder einer anderen Dissertation erfolgt sind. Es wurde nur dieser Antrag auf Eröffnung eines Promotionsverfahrens eingereicht.

---

Christina Braun

## **Danksagung**

Zuletzt möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Durchführung der Versuche und dem Schreiben dieser Arbeit unterstützt haben.

Vielen Dank an die Mitarbeiter des Physiologie-Labors unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Michael Gekle in der Magdeburger-Straße, die mich freundlich aufgenommen und immer mit einem guten Ratschlag geholfen haben. Ein ganz besonderes Dankeschön geht an Sarah Reime, die mich geduldig und immer fröhlich in die Versuche eingearbeitet hat und mir auch nach der Experimentierphase sehr engagiert zur Seite stand.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn PD Dr. rer. nat. Christoph Sauvant und Herrn Prof. Dr. med. Michael Bucher für die Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit bedanken. Vielen Dank für die freundliche Hilfe und zahlreichen Gespräche, die mir immer als bereichernder und konstruktiver Austausch in Erinnerung bleiben werden.

Tief verbunden und dankbar bin ich meinem Ehemann Norman, der mir immer den Rücken freigehalten hat und mir stets die Kraft und den Mut gab, auch in weniger produktiven Zeiten die Arbeit zu vollenden.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Birgit und Uwe Preising, die meinen bisherigen Lebensweg ermöglicht haben und immer bereit sind, alles für mich und meinen Bruder zu geben. Für ihre bedingungslose Unterstützung und ihr Glaube an mich reicht kein Dankeswort aus. Ihnen möchte ich diese Arbeit widmen.