

Bedeutung der Cyclooxygenase-2 und deren selektiver Inhibition bei experimenteller Glomerulonephritis

Inaugural – Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Christoph Waldner
aus Bottrop

Düsseldorf

2002

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Peter Heering
Korreferenten: Prof. Dr. Karsten Schrör
Prof. Dr. Cornelius Hollenberg

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Januar 2003

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGEN.....	5
1 EINLEITUNG	6
1.1 Eikosanoide	6
1.2 Die Cyclooxygenasen.....	7
1.2.1 Die Cyclooxygenase 1.....	8
1.2.2 Die Cyclooxygenase 2.....	10
1.2.3 Selektive Hemmung der Cyclooxygenase 2	12
1.2.4 Weitere Isoformen der Cyclooxygenasen.....	14
1.3 Funktionen der Prostaglandine in der Niere.....	14
1.4 Prostaglandinrezeptoren in der Niere	17
1.5 Integrine	20
1.5.1 Adhäsionsmoleküle in der Niere.....	21
1.5.2 Wirkungen von Prostaglandinen auf Integrine in der Niere	23
1.6 Fragestellung	24
2 MATERIAL UND METHODEN	25
2.1 Puffer und Lösungen.....	25
2.2 Passive Heymann Nephritis (PHN).....	27
2.2.1 Studienprotokoll.....	27
2.2.2 Tiere.....	28
2.2.3 Induktion der PHN.....	29
2.2.4 Medikamentengabe.....	29
2.2.5 Uringewinnung	29
2.2.6 Nierengewinnung und Isolierung der Glomeruli	30
2.3 Zellkultur	30
2.4 Präparation und Analyse von Proteinen.....	30
2.4.1 Isolierung von Proteinen aus Gewebe	30
2.4.2 Analyse von Proteinen durch Western Blot	31
2.5 Präparation und Analyse von RNA	33

2.5.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus Nierengewebe.....	33
2.5.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugetierzellen.....	33
2.5.3	Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) zum Nachweis von mRNA.....	33
2.5.4	Auftrennung von DNA in nativen Agarose-Gelen.....	37
2.5.5	Sequenzierung der erhaltenen RT-PCR Fragmente.....	37
2.6	Densitometrische Auswertung.....	40
2.7	Bestimmung von Prostaglandinen durch Radio-Immuno-Assay.....	40
2.8	Statistik.....	40
3	ERGEBNISSE	41
3.1	COX-2 Expression in der Niere und deren Beeinflussung durch Celecoxib.....	41
3.1.1	COX-2 Expression bei Ratten mit PHN im Vergleich zu gesunden Ratten.....	41
3.1.2	Vergleich der Prostaglandinausscheidung zwischen gesunden und nephritischen Ratten	42
3.1.3	Einfluß von Celecoxib auf die pathologische COX-2 Expression.....	43
3.1.4	Einfluß von Celecoxib auf die Prostaglandinausscheidung bei nephritischen Ratten.....	45
3.1.5	Einfluß von Celecoxib auf die physiologische COX-2 Expression.....	46
3.1.6	Einfluß von Celecoxib auf die Prostaglandinausscheidung bei gesunden Ratten.....	48
3.2	Regulation der COX-2 Expression in kultivierten Zellen des Mesangiums	50
3.3	Expression von Prostaglandinrezeptoren in der Niere und deren Beeinflussung durch Celecoxib	53
3.3.1	Expression von Prostaglandinrezeptoren in der Niere nephritischer Ratten.....	53
3.3.2	Einfluß von Celecoxib auf die Expression von Prostaglandinrezeptoren bei Ratten mit PHN.....	56
3.3.3	Einfluß von Celecoxib auf die Expression von Prostaglandinrezeptoren bei gesunden Ratten.....	60
3.3.4	Zusammenfassung: Expression von Prostaglandinrezeptoren bei Ratten.....	63
3.4	Regulation der Expression des EP ₃ Rezeptors in kultivierten Zellen des Mesangiums	65
3.5	Expression von α_v Integrinen in der Niere und deren Beeinflussung durch Celecoxib.....	68
3.6	Regulation der Expression von α_v Integrinen in kultivierten Zellen des Mesangiums	72
4	DISKUSSION.....	80
4.1	Experimentelle Vorgehensweise	80
4.2	COX-2 Expression.....	80
4.3	Expression von Prostaglandinrezeptoren.....	82

4.4	Expression von α_v Integrinen.....	84
4.5	Rolle der COX-2 und deren selektiver Hemmung bei renaler Inflammation	88
5	ZUSAMMENFASSUNG	94
6	LITERATUR	95
7	VERÖFFENTLICHUNGEN IM RAHMEN DIESER ARBEIT	108
8	DANKSAGUNGEN	110
9	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	111
10	LEBENS LAUF	112

ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
bp	Basenpaar
cAMP	zyklisches Adenosin-3', 5'- monophosphat
COX-1	Cyclooxygenase 1
COX-2	Cyclooxygenase 2
DTT	Dithiothreitol
Da	Dalton
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EP ₁₋₄	E-Prostanoid Rezeptor (Subtyp 1-4)
FCS	Fetales Kälberserum
IP	Prostacyclinrezeptor
LPS	Lipopolysaccharid
MB28767	(+/-)-15alpha-hydroxy-9-oxo-16-phenoxy-17,18,19,20 tetranorprost-13-trans-en-säure
mRNA	messenger (Boten) Ribonukleinsäure
n. s.	nicht signifikant
NSAID	Nicht steroidale Antiphlogistika
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGI ₂	Prostacyclin
PHN	passive Heymann Nephritis
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
RIA	Radioimmunoassay
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerase Ketten Reaktion
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
TxA ₂	Thromboxan A ₂
TP	Thromboxanrezeptor

1 Einleitung

1.1 Eikosanoide

Der Begriff Eikosanoide (eikosi = zwanzig) umfaßt eine große Zahl von biologisch aktiven Verbindungen, die aus ungesättigten C₂₀ Fettsäuren gebildet werden. Eine wichtige Rolle unter den Vorläufern der Eikosanoide spielt die essentielle Fettsäure Arachidonsäure, deren Freisetzung aus Membranlipiden den ersten geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Metabolismus darstellt. Es wird angenommen, daß die zytosolische Phospholipase A₂ für die Abspaltung dieser ungesättigten Fettsäure an der sn2 Position von Glycerophospholipiden verantwortlich ist. Neben dieser Möglichkeit wird eine Freisetzung über Phospholipase C, Monoacylglycerol- und Diacylglycerol-Lipasen diskutiert (Mitchell et al., 1993). Für den weiteren Syntheseweg der Eikosanoide existieren drei Alternativen, die zu unterschiedlichen Eikosanoiden führen (Abb. 1).

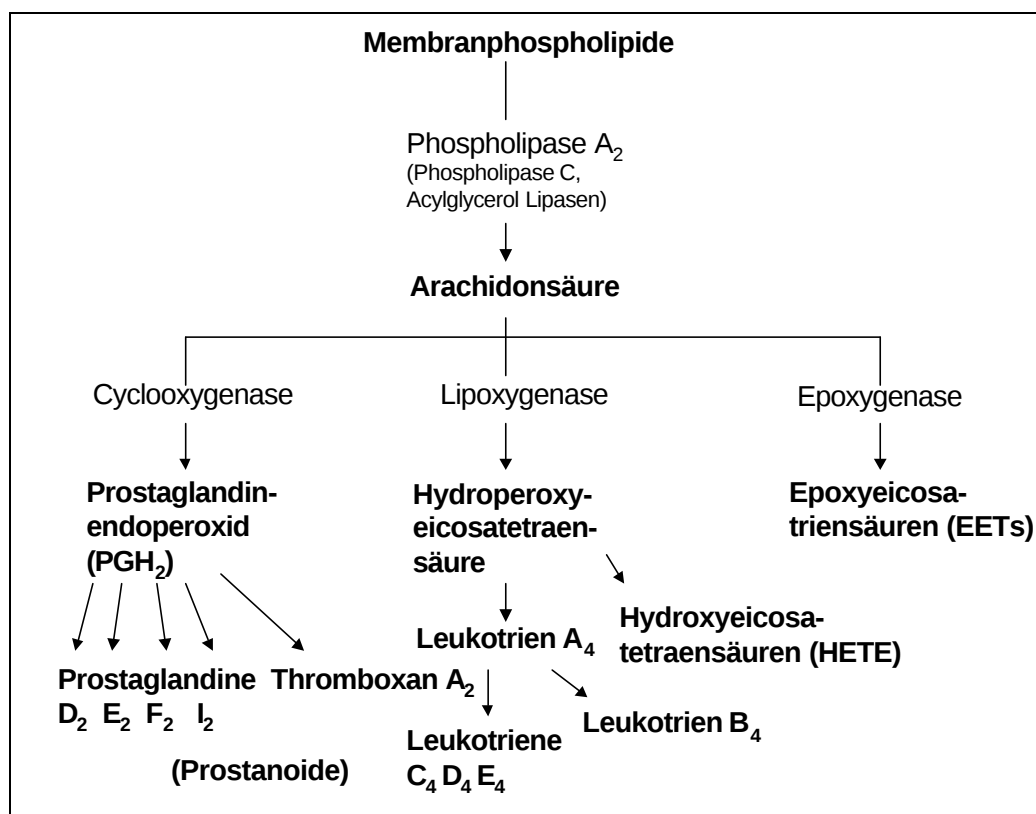


Abb.1: Synthesewege der Eikosanoide

Bei Epoxyden handelt es sich um Stoffwechselprodukte der Cytochrom P-450 Epoxygenasen. Dabei entstehen durch Oxygenierung aus Arachidonsäure Epoxyeicosatriensäuren (EET), die in Niere und Leber bedeutsam sind (Breyer und

Brady 1996). Ein zweiter Metabolisierungsweg erfolgt über den Einbau von Hydroperoxidgruppen durch Lipoxygenasen. Die entstehende Hydroperoxyeikosatetraensäure (5-HPETE) wird über das Leukotrien A_4 weiter zu den Leukotrienen B_4 , C_4 , D_4 und E_4 umgesetzt. Alternativ können aus HPETEs auch Mono-, Di- oder Trihydroxy-Fettsäuren wie z. B. die Hydroxyeikosatetraensäuren (HETEs) oder Lipoxine entstehen (Breyer und Badr, 1996). Die dritte Möglichkeit der Verstoffwechselung von Arachidonsäure besteht über das Enzym Cyclooxygenase zu den Prostanoiden. Dieser Syntheseweg bestimmt den Hauptanteil des Arachidonsäuremetabolismus in der Niere und steht deshalb in dieser Arbeit im Vordergrund.

1.2 Die Cyclooxygenasen

An der Prostaglandinbiosynthese ist die Cyclooxygenase (COX) als limitierendes Enzym beteiligt. Sie katalysiert die Umsetzung von Arachidonsäure durch eine Cyclooxygenase- und Peroxidaseaktivität zu PGH_2 , welches mit Hilfe von gewebspezifischen Synthasen zu den jeweiligen Endmetaboliten umgesetzt wird. Cyclooxygenase-Inhibitoren werden therapeutisch eingesetzt, um die Prostaglandinbildung zu unterdrücken. Seit der Entdeckung einer zweiten Isoform der COX unterscheidet man die Cyclooxygenasen 1 und 2 (COX-1 und -2) (Kujubu et al., 1991; O'Banion et al., 1991; Xie et al., 1991). Seit einiger Zeit wird die Existenz einer dritten Isoform (COX-3), die eine Bedeutung bei chronischer Inflammation besitzen soll, vermutet (Willoughby et al., 2000).

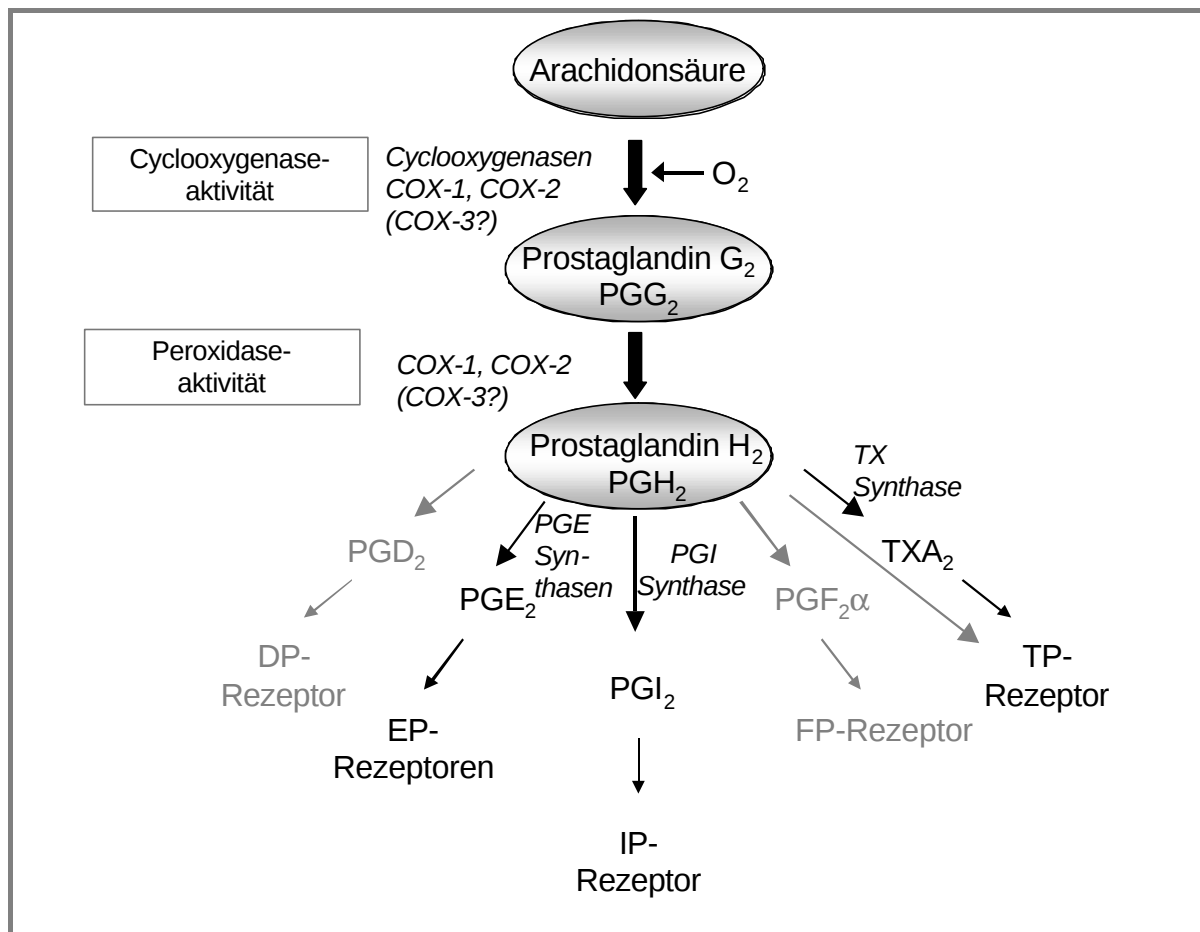


Abb. 2: Biosynthese von Prostaglandinen aus Arachidonsäure. Die Synthesewege von PGE₂, PGI₂ und TxA₂, auf die in dieser Arbeit fokussiert wird, sind hervorgehoben.

1.2.1 Die Cyclooxygenase 1

Bezüglich der Funktion dieser Isoform besteht weitgehend die Auffassung, daß sie aufgrund ihrer konstitutiven Expression in vielen Gewebearten für die „housekeeping functions“ der Prostaglandine verantwortlich sei (Otto und Smith, 1995; Vane et al., 1998). Entsprechend fehlen dem COX-1 Promoter die für inflammatorische Mediatoren typischen Bindungsstellen für das zyklische Adenosinmonophosphat responsive Element (CRE) und dem nukleären Faktor κ B (NF κ B)(s. Abb. 3).

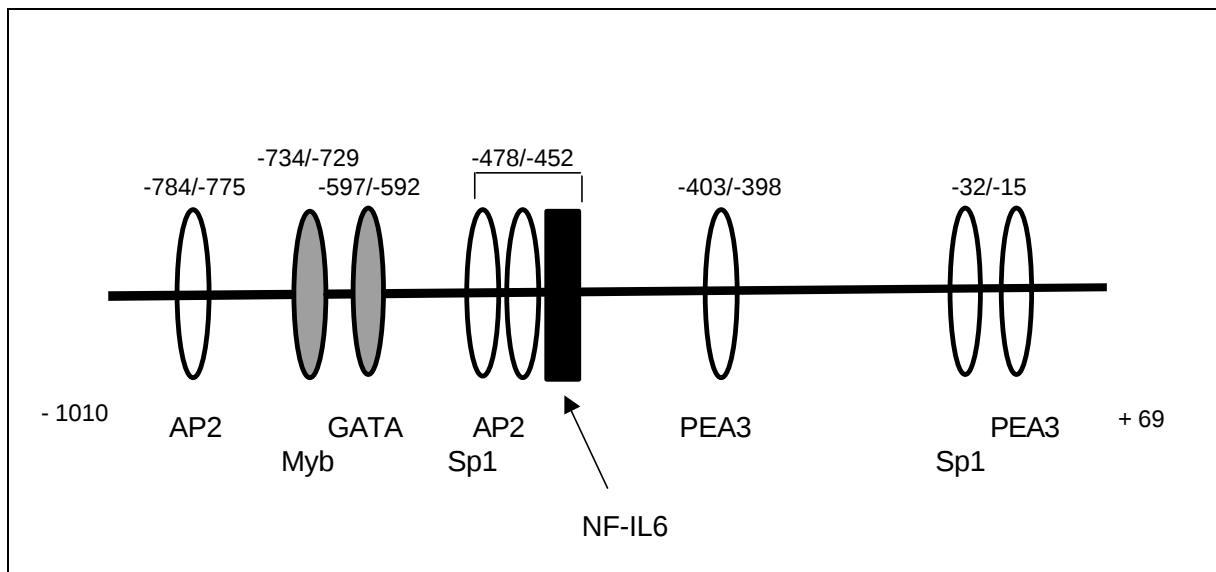


Abb. 3: Die 5'-flankierende Promotorregion des humanen COX-1-Gens (Inoue et al., 1995). Eingezeichnet sind potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren basierend auf Sequenzvergleichen. Die Zahlenangaben beziehen sich auf Basenpaare vor dem Transkriptionsstart.

Durch Entzündungsmediatoren wie z.B. Kinine lässt sich die COX-1 Expression nicht stimulieren. Einen regulatorischen Einfluß besitzen jedoch neben den Sexualhormonen „human chorionic Gonadotropin“ (hcG) (Toth et al., 1996) und Östradiol-17 β (Jun et al., 1998) „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) (Bryant et al., 1998) und „nerve growth factor“ (NGF) (Kaplan et al., 1997). „Transforming growth factor β “ (TGF- β) erhöht vermutlich über eine Stärkung der COX-1-mRNA Stabilität deren Expression (Diaz et al., 1998).

Vereinzelt gibt es auch Berichte über eine Regulation der COX-1 Expression bei inflammatorischen Vorgängen. So steigt die COX-1 Expression in den Glomeruli von Rattennieren im Modell der anti-Th1-Nephritis an (Hirose et al., 1998) und fällt in der Lunge und im Herzen von Ratten nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) bei gleichzeitiger Hochregulierung der COX-2 ab (Liu et al., 1996). Eine ähnliche gegensätzliche Regulation der beiden COX-Isoformen findet sich in der Niere abhängig von der diätetischen Na⁺-Aufnahme (Jensen et al., 1999). Es besteht ebenfalls ein Zusammenhang zum Renin-Angiotensin-System der Niere. So könnte beispielsweise Angiotensin II über Stimulation des vascular endothelial growth factors (VEGF) Einfluß auf die COX-1 Expression (Chua et al., 1998) nehmen, während es selbst negativ auf die COX-2 Expression wirkt (Cheng et al., 1999). Auf der anderen Seite wirkt COX Inhibition negativ auf die Reninexpression (Greenberg et al., 1993; Harding et al., 1997).

1.2.2 Die Cyclooxygenase 2

Nach der Entdeckung der zweiten Isoform der COX ging man zunächst von einer ausschließlichen pathophysiologischen Rolle dieser Isoform aus. Diese Theorie wurde zunächst durch zahlreiche Untersuchungen an entzündlichen Geweben bestätigt. So kommt es bei verschiedenen Nephritiden zu einer Hochregulation der COX-2 in der Niere (Feng et al., 1993; Tomasoni et al., 1998).

Die COX-2 Expression lässt sich durch Cytokine und Mitogene stimulieren (Hinz et al., 1999), was ihre inflammatorisch bedingte Hochregulierung erklärt. Entsprechend finden sich im COX-2 Promotor im Gegensatz zum COX-1 Promotor Bindungsstellen für CRE und NFκB sowie die für induzierbare Gene typische TATA-Box (Kosaka et al., 1994).

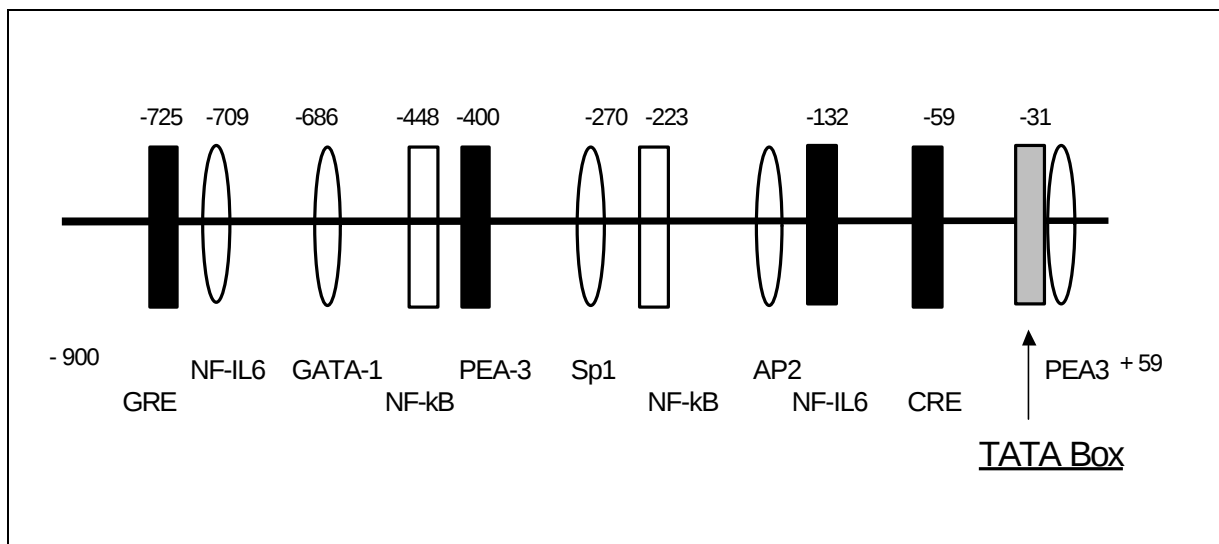


Abb. 4: Die 5'-flankierende Promotorregion des humanen COX-2-Gens (Inoue et al., 1995; Kosaka et al., 1994). Eingezeichnet sind potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren basierend auf Sequenzvergleichen. Die Zahlenangaben beziehen sich auf Basenpaare vor dem Transkriptionsstart.

Einen positiven Effekt auf die COX-2 Expression üben z. B. die Cytokine Interleukin (IL) 1 β (Yucel et al., 1999) und „tumor necrosis factor α “ (TNF α) (Jobin et al., 1998), die Wachstumsfaktoren „basic fibroblast growth factor“ (bFGF) (Sasaki et al., 1998), der „platelet derived growth factor“ (PDGF) (Xie et al., 1996) und Angiotensin II im glatten Gefäßmuskel (Ohnaka et al., 2000) aus. Stickstoffmonoxid (NO) wirkt offensichtlich abhängig von der Dauer der COX-2 Expression (Diaz et al., 1999). Negativ auf die COX-2 Expression wirken dagegen die antiinflammatorischen

Cytokine IL 4, 10 und 13 (Hinz et al., 1999; Niro et al. 1995; Noguchi et al., 1999), Angiotensin II in der Niere (Cheng et al., 1999) und Prostaglandin E₂ (Akarasereenont et al., 1999; Karim et al., 1997).

Neben der von Karim et al. (1997) postulierten direkten Wirkung von PGE₂ auf die COX-2 Expression sind aufgrund der Wirkungen der Prostaglandine auf andere Mediatoren verschiedene indirekte Rückkopplungsmechanismen denkbar. So stimuliert PGE₂ z. B. die Expression der induzierbaren Isoform der NO-Synthase (iNOS) (Milano et al., 1995; Tetsuka et al., 1994), welche über das NO auf die COX-2-Expression wirkt. Andere Möglichkeiten ergeben sich über die Beeinflussung von TNF α (Gong et al., 1990; Zhong et al., 1999) oder über das Renin-Angiotensin-System.

Die Wirkungsweisen der meisten dieser Mediatoren wurden bislang nur in Zellkultur untersucht, dabei ergaben sich je nach verwendetem Modellsystem unterschiedliche bis widersprüchliche Ergebnisse. So kann Interferon- γ sowohl eine Steigerung (Rocca et al., 1999) als auch eine Suppression (Barrios et al., 1998) der COX-2-Expression bewirken (Noguchi et al., 1999). IL-13 kann unter bestimmten Umständen auch die COX-2 induzieren (Yu et al., 1996). Zur Regulation der COX-2 Expression besteht also ein komplexes Geflecht von unterschiedlichen Mediatoren, welche sich teilweise gegenseitig (Cytokine) beeinflussen oder PG-abhängig reguliert werden. Seit einiger Zeit wird zunehmend auch eine physiologische Rolle der COX-2 postuliert. Zu dieser These gelangte man durch Untersuchung von gesundem Nierengewebe (Guan et al., 1997; Harris et al., 1994; Kömhoff et al., 1997) und von COX-2 knockout-Mäusen. Diese Tiere zeigten eine hohe Letalität und entwickelten einen terminalen Nierenschaden, der durch eine Unterentwicklung dieses Organs verursacht wurde. Gewebeabnormalitäten zeigten sich auch im Herzen und den Ovarien. Weibliche COX-2 knockout-Tiere waren unfruchtbar (Dinchuk et al., 1995). Über die Funktion der konstitutiv exprimierten COX-2 für die Niere besteht jedoch weiterhin Unklarheit. Sie scheint jedoch wichtig für die Entwicklung der Niere zu sein (Dinchuk et al., 1995; Kömhoff et al., 1997; Morham et al., 1995) bzw. einen Einfluß auf den Na⁺-Stoffwechsel zu haben (Harris et al., 1994). Hierbei spielt der Zusammenhang zwischen COX-2 und dem Renin-Angiotensin-System möglicherweise eine Rolle.

1.2.3 Selektive Hemmung der Cyclooxygenase 2

Die pharmakologische Wirkung der meisten nicht steroidal Antiphlogistika (NSAID) beruht auf der Hemmung der Cyclooxygenaseaktivität und der daraus folgenden verminderten Bildung von Prostaglandinen. In vitro Untersuchungen zeigten Unterschiede der gebräuchlichen NSAIDs bezüglich ihrer COX Isoenzym-Selektivität (s. Tab. 1). Zur Feststellung der Selektivität hat sich der sogenannte "Vollblut-Assay" durchgesetzt. Dabei wird die TxA_2 Produktion aus Plättchen als Parameter für die COX-1 Aktivität und die PGE_2 Freisetzung aus LPS-stimulierten Monozyten als Parameter für die COX-2 Aktivität gemessen. Andere Testsysteme, z. B. an rekombinanten Enzymen, liefern teilweise extreme Unterschiede in der Bestimmung der Selektivität einzelner Substanzen. Sogar bei Verwendung des gleichen Testsystems gelangen verschiedene Arbeitsgruppen zu unterschiedlichen Ergebnissen. So erhält man für Celecoxib an isolierten Enzymen eine COX-1/COX-2- IC_{50} -Ratio von 375 (Penning et al., 1997), im Vollblutassay eine Ratio von 30 (Patrono et al., 2001) bzw. von 1.5 (Warner et al., 1999). Die Rangfolge der untersuchten Substanzen bezüglich ihrer COX-2 Selektivität bleibt jedoch meistens erhalten.

Inhibitor	COX-1/COX-2 IC_{50} Ratio
Ibuprofen	0.5
Naproxen	0.7
6-methoxy-2-naphthyl-Essigsäure	1.5
Acetaminophen	1.6
Indomethazin	1.9
Meloxicam	18
Nimesulide	19
Diclofenac	29
Celecoxib	30
Rofecoxib	267

Tab.1: Inhibitoren der Cyclooxygenase und deren Isoenzymselektivität. Bestimmt wurden im Vollblutassay die IC_{50} Werte der Substanzen für die Hemmung der COX-1 bzw. COX-2. Angelehnt an Patrono et al. (2001).

Da durch Untersuchungen der COX-2 Expression bekannt war, daß hauptsächlich diese Isoform für die Produktion von Prostaglandinen während der Inflammation verantwortlich ist, wurden gezielt Hemmstoffe mit einer stärkeren COX-2 Selektivität entwickelt. In Deutschland sind momentan als selektive COX-2 Inhibitoren Celecoxib (Celebrex[®], Searle, Nürnberg) und Rofecoxib (Vioxx[®], MSD, Haar bei München) zugelassen (Abb. 5). Man versprach sich von diesen Substanzen eine effektive antiphlogistische Wirkung bei minimalen Nebenwirkungen, die bei klassischen NSAIDs hauptsächlich die Niere und den Gastrointestinaltrakt betreffen. In der Tat zeigten die VIGOR- (Bombardier et al., 2000) und die CLASS-Studie (Silverstein et al., 2001) für die selektiven COX-2 Inhibitoren Rofecoxib und Celecoxib eine geringere Zahl gastrointestinale Blutungen bei Patienten mit Osteoarthritis und rheumatoider Arthritis. Allerdings machen neuere Analysen, insbesondere der CLASS-Studie, eine solche Selektivität nach einem Behandlungszeitraum von 12 Monaten wenig wahrscheinlich. Inzwischen wurden auch Fälle schwerer gastrointestinaler Nebenwirkungen mit Todesfolge durch Einnahme von Celecoxib bekannt (Weaver et al., 2001).

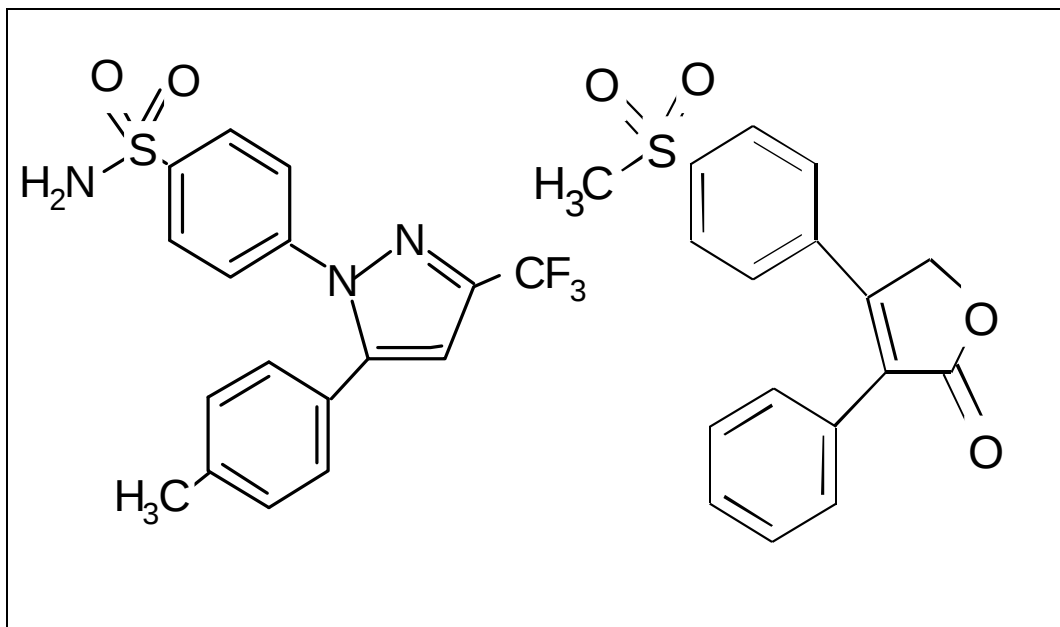


Abb. 5: Strukturformeln der beiden in Deutschland zugelassenen selektiven COX-2 Inhibitoren Celecoxib (4-[5-(4-Methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzensulfonamid, links) und Rofecoxib (4-(4'-Methylsulfonylphenyl)-3-phenyl-2(5H)-furanon, rechts) (aus (Penning et al., 1997)).

Zudem häufen sich Berichte über schwere renale Nebenwirkungen von Rofecoxib und Celecoxib (Wolf et al., 2000; Graham et al., 2001; Perazella et al., 2000; Rocha

et al., 2001; Samer et al., 2002; Wahba et al., 2001), die hauptsächlich bei älteren Menschen beobachtet werden. Diese Tatsache könnte im Zusammenhang mit einer verstärkten COX-2 Expression bei älteren Personen stehen (Nantel et al., 1999). Man vermutet mittlerweile, daß selektive COX-2 Hemmstoffe mindestens die gleiche Nephrotoxizität aufweisen wie unselektive Substanzen (Eras et al., 2001), obwohl entsprechende prospektive klinische Studien noch fehlen.

1.2.4 Weitere Isoformen der Cyclooxygenasen

Bei Untersuchungen am Carrageenan-Modell, einem Modell der Entzündung bei der Ratte, beobachteten Willoughby et al. (2000) in der Auflösungsphase der inflammatorischen Antwort ein Wiederauftreten von COX-2 Protein, das zwar zu Beginn der Inflammation vorhanden war, dann jedoch zunächst verschwand. Dieses Wiederauftreten der COX-2 war verbunden mit einem veränderten Prostaglandinmuster. Anstatt des eher pro-inflammatorischen PGE_2 wurden nun die anti-inflammatorischen Prostaglandine PGD_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ und $15\text{desoxy}\Delta^{12-14}\text{PGJ}_2$ gebildet. Da die Behandlung mit selektiven COX-2 Inhibitoren zu diesem Zeitpunkt wirkungslos war, postulierte diese Gruppe, daß es sich hier um eine weitere Isoform der Cyclooxygenase, eine COX-3; handelte, die von dem Antikörper im Western Blot fälschlicherweise als COX-2 erkannt wurde.

1.3 Funktionen der Prostaglandine in der Niere

Unter den Prostanoid-synthetisierenden Geweben ist die Niere eines der aktivsten, und da diese Mediatoren hauptsächlich an ihrem Bildungsort wirken, stellt die Niere gleichzeitig für die Prostaglandine eine wichtige biologische Zielscheibe dar. Die Reaktion des Gewebes auf natürlich gebildete oder künstlich zugeführte Prostaglandine ist unterschiedlich. PGE_2 wirkt beispielsweise in einigen Gefäßen als Vasodilatator und in anderen als Vasokonstriktor (Coleman et al., 1990; Lawrence et al., 1992). Die verschiedenen Effekte von PGE_2 sind wahrscheinlich auf eine unterschiedliche Verteilung der einzelnen Rezeptorsubtypen für PGE_2 zurückzuführen (Breyer und Breyer, 2001) (s. Kap. 1.4). In verschiedenen Funktionseinheiten der Niere, wie Glomerulus, Tubulus, Sammelrohr oder interstitiellen Zellen wurde die Prostaglandinsynthese und die Rezeptorverteilung untersucht. In Endothelzellen der Nierenarterien und -arteriolen konnte

Cyclooxygenaseaktivität nachgewiesen werden. Eine Vielzahl von Studien zeigte, daß PGE_2 und PGI_2 die glatte Gefäßmuskulatur dilatieren, während TXA_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ und manchmal auch PGE_2 zur Vasokonstriktion führen (Breyer und Badr, 1996). In der Niere überwiegen mengenmäßig PGE_2 und PGI_2 . Sie beeinflussen die renale Hämodynamik, die glomeruläre Filtration sowie die Na^+ -Homöostase (Schrör, 1984). Diese Wirkungen beruhen neben der vasodilatorischen bzw. -konstriktorischen Wirkung dieser Metabolite auf der Beeinflussung anderer Mediatoren, wie z. B. dem Renin-Angiotensin-System (RAAS) (Schrör, 1993). Ihre direkten regulatorischen Wirkungen im physiologischen Zustand sind eher von geringer Bedeutung. Bei gesunden Probanden kommt es beispielsweise nach Hemmung der Prostaglandinsynthese durch Cyclooxygenaseinhibitoren zu keiner Änderung der renalen Durchblutung. Bei Nierenfunktionsstörungen mit Minderperfusion, drohender Ischämie oder Belastungssituationen (z. B. Na^+ -Mangel) sind die Prostaglandine jedoch für die Aufrechterhaltung der renalen Blutversorgung und der Elektrolythomöostase unverzichtbar. Diese Eigenschaften der Prostaglandine sprechen dafür, daß es sich bei der Aktivierung des Prostaglandinsystems in der Niere in erster Linie um einen „Notfallmechanismus“ handelt, der die Niere vor den durch sie selbst erzeugten Pressorhormonen schützt (Brater et al., 2001; Imig, 2000; Schrör, 1984; Stahl, 1986; Storck und Dunn, 1985). Prostaglandine werden ausgehend von Arachidonsäure, welche durch die Phospholipase A_2 aus Membranlipiden abgespalten wird, in einem mehrstufigen Prozeß unter Beteiligung von Cyclooxygenasen und Prostaglandinsynthasen gebildet. Durch Steigerung der Aktivität dieser Enzyme können bei Bedarf mehr Prostaglandine gebildet werden. Am effektivsten ist dabei die Steigerung der Cyclooxygenaseaktivität, die sich unter anderem durch eine geänderte Genexpression erreichen läßt. Durch inflammatorische Mediatoren leicht induzieren läßt sich die Cyclooxygenase 2 (COX-2). Diese Isoform wird bei Inflammation häufig verstärkt exprimiert und ist für eine Steigerung der Prostaglandinbildung verantwortlich (McAdam et al., 2000; James et al., 2001; Katori et al., 2000; Otto und Smith, 1995; Vane et al., 1998).

Durch unselektive Inhibition der Cyclooxygenasen, beispielsweise mit Ibuprofen, Diclofenac oder Indomethacin, und der damit verbundenen verminderten Prostaglandinbildung ließ sich bei Glomerulonephritis die gesteigerte Ausscheidung von Proteinen mit dem Urin (Proteinurie) verringern (Laguerre und Hirbec, 1979; Pasero et al., 1973; Renner und Held, 1971). Da die Proteinurie eine wichtige

Komplikation bei Nephritis darstellt, wurden diese Inhibitoren früher häufig eingesetzt, bis sich zeigte, daß die Verminderung der Proteinurie lediglich auf eine verschlechterte renale Durchblutung zurückzuführen war. Durch COX-Inhibition wurde somit der Prostaglandin-gesteuerte Schutzmechanismus zur Aufrechterhaltung der Durchblutung und damit der Nierenfunktion unterbrochen. Vor diesem Hintergrund ist es verständlich, daß Inhibitoren der Cyclooxygenase, die als nicht steroidale Antiphlogistika (NSAID) z. B. bei Rheumatoider Arthritis eingesetzt werden, insbesondere bei Patienten mit vorgeschädigten Nieren renale Nebenwirkungen zeigen können. Daß selektive COX-2 Inhibitoren gerade bei älteren Menschen schwere Nierenschädigungen hervorrufen können (Graham, 2001; Perazella und Eras, 2000; Rocha und Fernandez-Alonso, 2001; Samer et al., 2002; Wahba und Soper, 2001; Wolf et al., 2000), könnte durch eine verstärkte COX-2 Expression in der Macula Densa älterer Menschen (Nantel et al., 1999) erklärt werden.

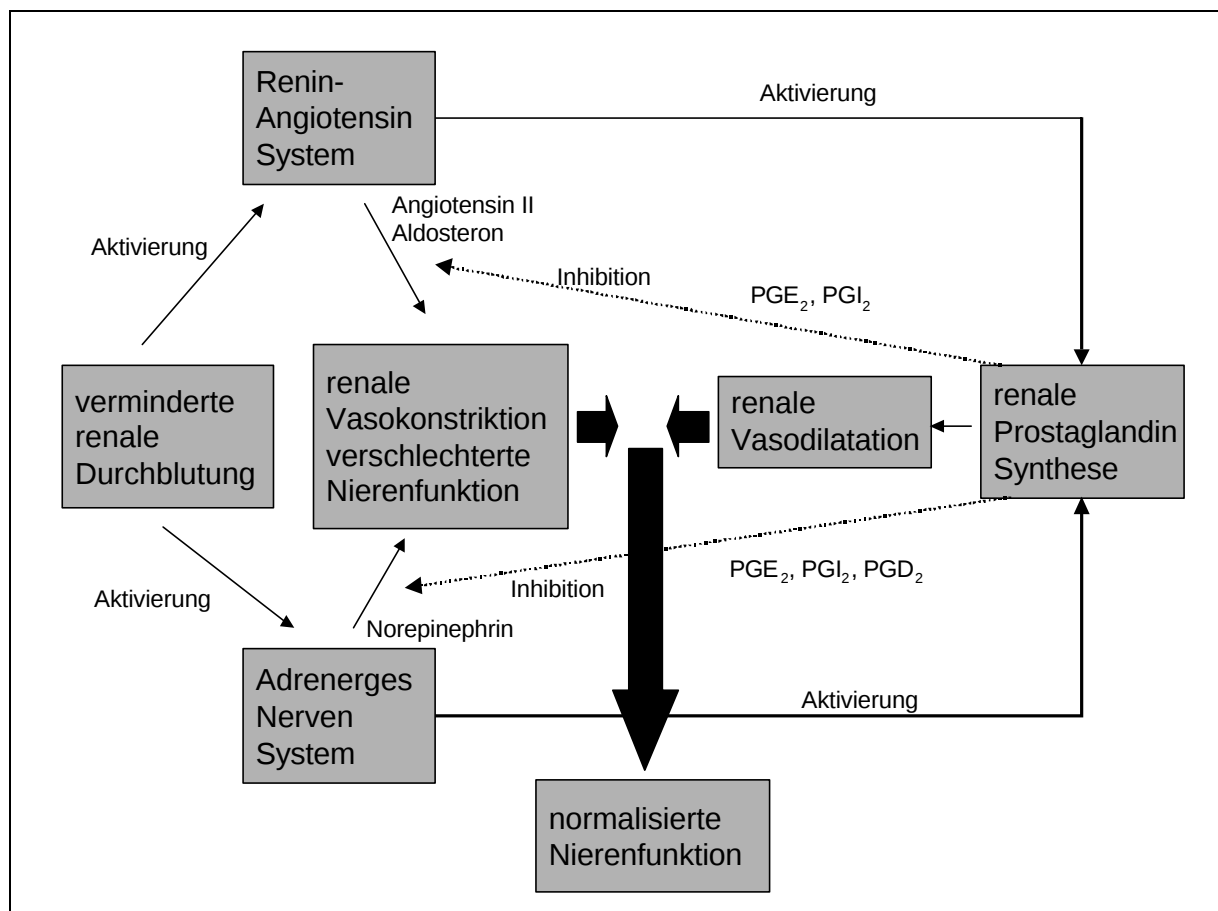


Abb. 6: Direkte und indirekte Wirkungen von Prostaglandinen in der Niere bei verminderter renaler Durchblutung (nach Brater et al. (2001)).

1.4 Prostaglandinrezeptoren in der Niere

Prostaglandine entfalten ihre Wirkungen über membranständige G-Proteingekoppelte Rezeptoren. Die Primärstruktur dieser Rezeptoren besteht aus sieben hydrophoben Bereichen, welche analog zur Struktur von Bacteriorhodopsin (Henderson et al., 1990) und Rhodopsin (Schertler et al., 1993) wahrscheinlich transmembranäre α -Helices bilden. G-Protein gekoppelte Rezeptoren binden ihren Liganden an diese transmembranären Domänen und stehen mit dem G-Protein über ihren intrazellulären Teil, besonders der dritten intrazellulären Schleife und dem proximalen Abschnitt des C-terminalen Endes, in Verbindung (O'Dowd et al., 1989). Das in der Niere vorherrschende Prostaglandin E_2 (PGE_2) interagiert mit vier verschiedenen EP-Rezeptor-Subtypen (EP_1 , EP_2 , EP_3 und EP_4), wobei der EP_3 Rezeptor 8 verschiedene Splicevarianten des C-terminalen, intrazellulären Teils besitzt. Dagegen besitzen PGI_2 und TxA_2 jeweils nur einen spezifischen Rezeptor, den IP und den in zwei Splicevarianten vorkommenden TP Rezeptor (Abb. 7).

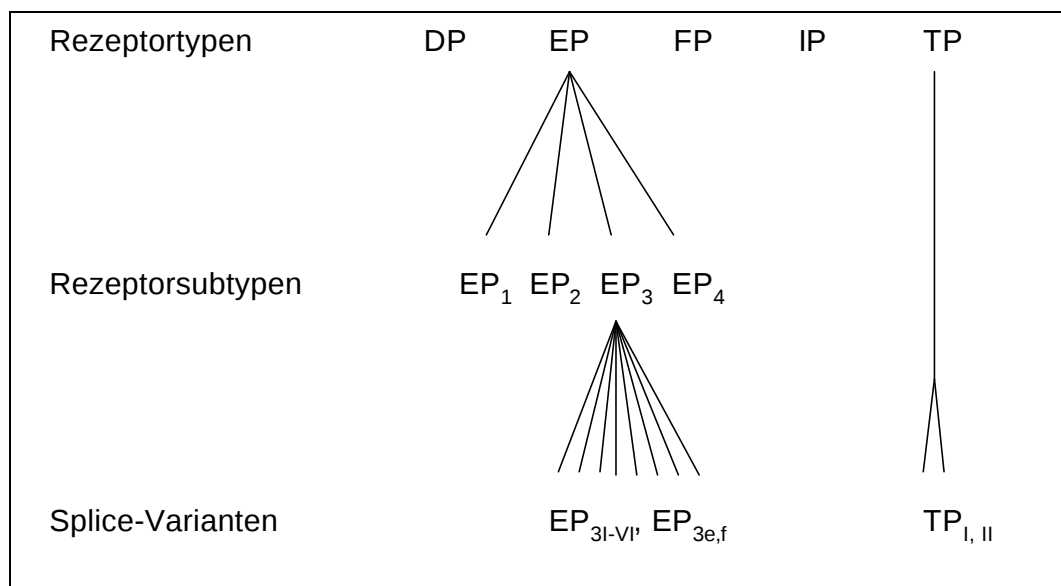


Abb. 7: Prostanoid Rezeptoren (Adam et al., 1994; Kotani et al., 1995; Kunapuli et al., 1994; Raychowdhury et al., 1994; Schmid et al., 1995). Dargestellt sind die Rezeptoren für die einzelnen Prostanoiden und deren Aufgliederung in Subtypen und Splicevarianten.

Da die Wirkungen von Prostaglandinen, die teilweise sogar gegensätzlich sein können, stark von der Expression ihrer Rezeptoren an der Oberfläche der einzelnen Zelle abhängen, findet sich in den verschiedenen Abschnitten des Nephrons je nach

Funktion ein angepaßtes Expressionsprofil dieser Rezeptoren. Einen Überblick über die Verteilung der Rezeptoren für PGE_2 , PGI_2 und TxA_2 im Nephron gibt Abb. 8.

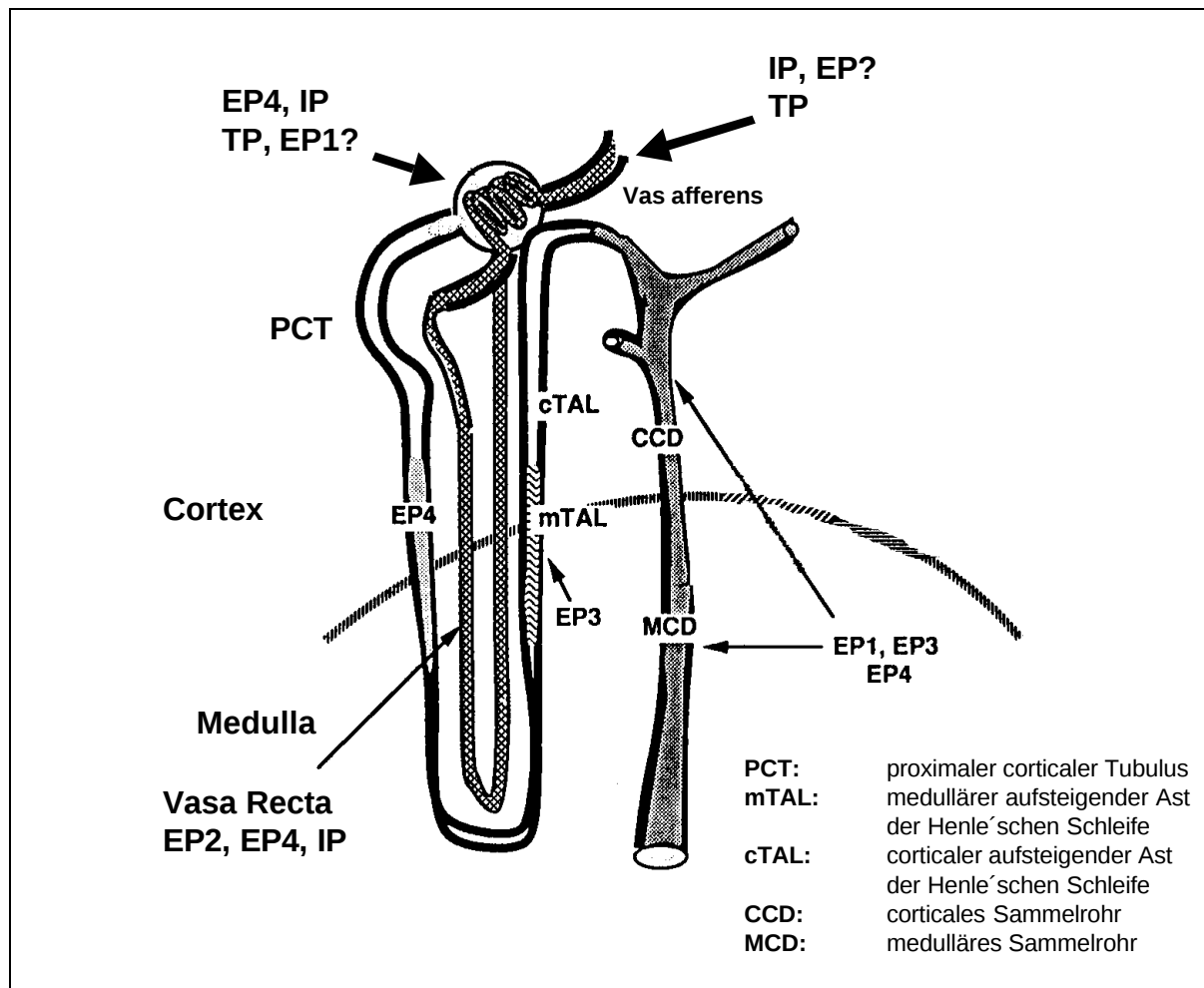


Abb. 8: Verteilung und Funktion von Prostaglandinrezeptoren entlang des Nephrons (nach Breyer (1998))

Die einzelnen Prostaglandinrezeptoren aktivieren über Kopplung an verschiedene G-Proteine unterschiedliche intrazelluläre Signalwege: Der EP_1 Rezeptor aktiviert die Hydrolyse von Phosphatidylinositoldiphosphat zu Inositoltriphosphat über Kopplung an G_q , während die anderen PGE_2 Rezeptoren die Bildung von cAMP über G_i inhibieren (EP_3) oder über G_s fördern (EP_2 , EP_4).

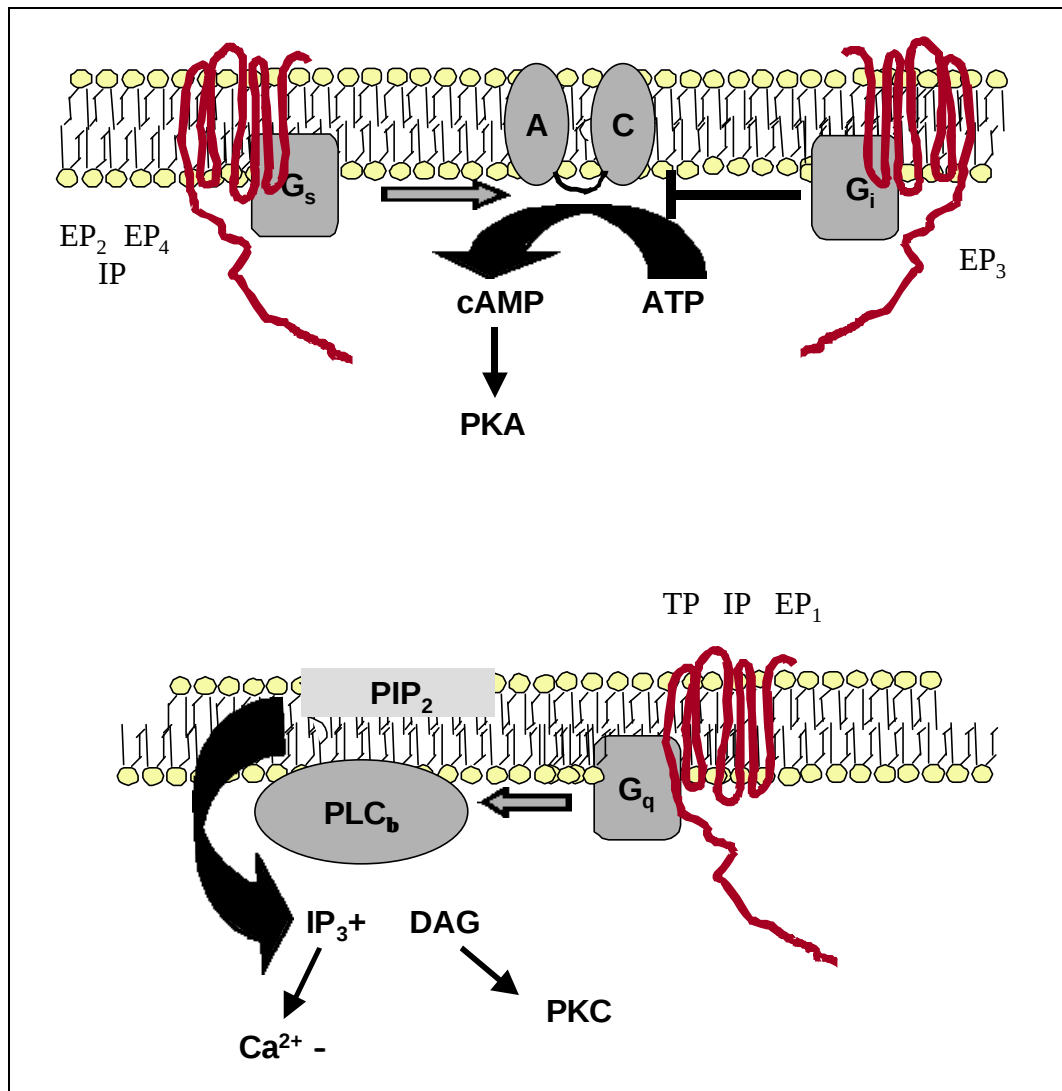


Abb. 9: G-Protein-Kopplung von Prostaglandinrezeptoren. AC: Adenylatcyclase; PKA: Proteinkinase A; PIP₂: Phosphatidylinositoldiphosphat; PLC: Phospholipase C; IP₃: Inositoltriphosphat; DAG: Diacylglycerol; PKC: Proteinkinase C.

Thromboxan und Prostacyclin (PGI₂) besitzen jeweils nur einen Rezeptorsubtyp. Der Thromboxanrezeptor (TP) wirkt über G_q auf den Inositoltriphosphat-Weg; der Prostacyclinrezeptor (IP) wirkt über G_s cAMP erhöhend (Breyer, 1998). Über eine Kopplung von IP an G_q bei höheren Konzentrationen des Agonisten ist ebenfalls berichtet worden (Oka et al., 1993) (s. Abb. 9).

Untersuchungen zur Funktion der einzelnen Prostaglandinrezeptoren in der Niere existieren hauptsächlich im Zusammenhang mit der Steuerung des Salz- und Wasserhaushaltes und des Blutdrucks (Audoly et al., 2001; Jensen et al., 1999; Sakairi et al., 1995; Tilley et al., 1999). Nur wenige Informationen existieren zur Bedeutung von Prostaglandinrezeptoren bei inflammatorischen Zuständen in der Niere. Es ist jedoch bekannt, daß bei der anti-Thy 1.1 Nephritis der Ratte der EP₂ Rezeptor verstärkt exprimiert wird (Hartner et al., 2000).

1.5 Integrine

Neben Immunglobulinen, Cadherinen und Selectinen bilden die Integrine eine eigene Klasse innerhalb der Adhäsionsrezeptoren. Diese Glykoproteine sind Heterodimere und bestehen aus je einer α - und β -Untereinheit. Bislang kennt man 16 α - und 9 β -Untereinheiten, aber nur 22 Integrine, die aus deren Kombination entstehen. Die Einteilung in Integrinklassen erfolgt zumeist aufgrund gleicher β -Untereinheiten. Eine Ausnahme bilden dabei α_V -Integrine: Die α_V -Untereinheit kann im Gegensatz zu den meisten anderen α -Untereinheiten an mehrere verschiedene β -Ketten binden. Fünf α_V -Integrine sind bisher bekannt: $\alpha_V\beta_1$, $\alpha_V\beta_3$, $\alpha_V\beta_5$, $\alpha_V\beta_6$ und $\alpha_V\beta_8$. Das $\alpha_V\beta_3$ -Integrin ist ubiquitär im Organismus verbreitet, dominiert jedoch im Endothel.

Neben der Regulation der Gen-Expression und nachfolgend der Masse an Rezeptorprotein kann die Aktivität von Integrinen innerhalb kürzester Zeit gesteuert werden (s. Abb. 10), um die für Immunreaktionen, Entzündungen und Hämostase notwendigen raschen Veränderungen in Zelladhäsion und –migration zu bewirken.

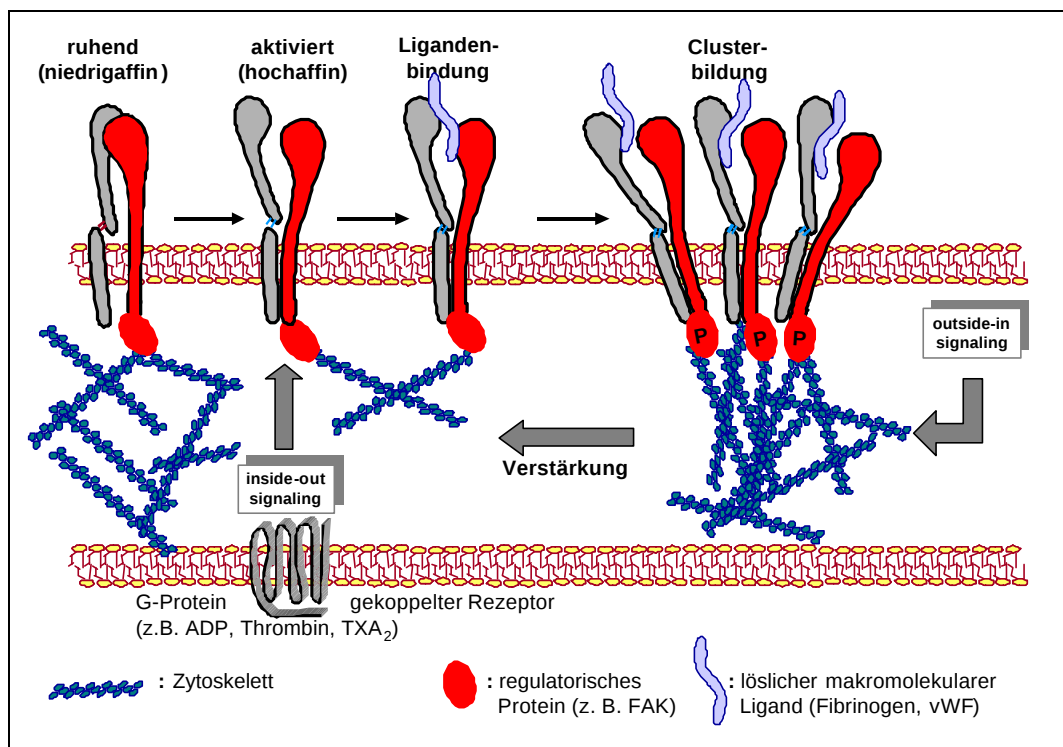


Abb. 10: Regulation der Aktivität von Integrinen durch outside-in und inside-out signaling am Beispiel des $\alpha_{IIb}\beta_3$ Integrins (modifiziert nach Topol et al., 1999). ADP: Adenosin-monophosphat; FAK: Fokale Adhäsionskinase; vWF: von Willebrandt Faktor.

Die Ligandenaffinität von Integrinen kann zum Beispiel durch Wachstumsfaktoren oder immunologische Stimuli über entsprechende Rezeptoren mit nachfolgender Aktivierung des Zytoskeletts und Übergang der extrazellulären Bindungsstelle des Integrins vom niedrigen in den hochaffinen Zustand reguliert werden (inside-out signaling) (Schrör, 2000; Topol et al., 1999) (s. Abb. 10). Nach Bindung des Liganden kommt es zur Bildung von Rezeptoroligomeren an der Membranoberfläche. Dies verursacht die Aktivierung intrazellulärer Signalmoleküle wie der fokalen Adhäsionskinase (FAK) und eine Kontraktion des Actinzytoskeletts (outside-in signaling), wodurch im Sinne eines positiven Rückkopplungsmechanismus die Ligandenaffinität von Integrinen gesteigert wird (Gahmberg et al., 1998; Schrör, 2000) (s. Abb. 10).

1.5.1 Adhäsionsmoleküle in der Niere

Im Bereich des Glomerulus kommen nach derzeitigem Kenntnisstand ausschließlich β_1 und α_v -Integrine vor. Im Endothel und in den Podozyten sind sie verantwortlich für die Interaktion zwischen Podozyten, Endothel und extrazellulärer Matrix und somit auch für die Funktion der glomerulären Basalmembran.

Integrine und ihre Liganden, z. B. des interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) und das vaskuläre Zell-Adhäsionsmolekül-1 (VCAM-1) werden bei pathologischen Prozessen im Glomerulus verstärkt exprimiert und tragen dort vermutlich durch die folgende Anlagerung von extrazellulärer Matrix und Leukozyten zur Schädigung der Basalmembran bei (Muller et al., 1996).

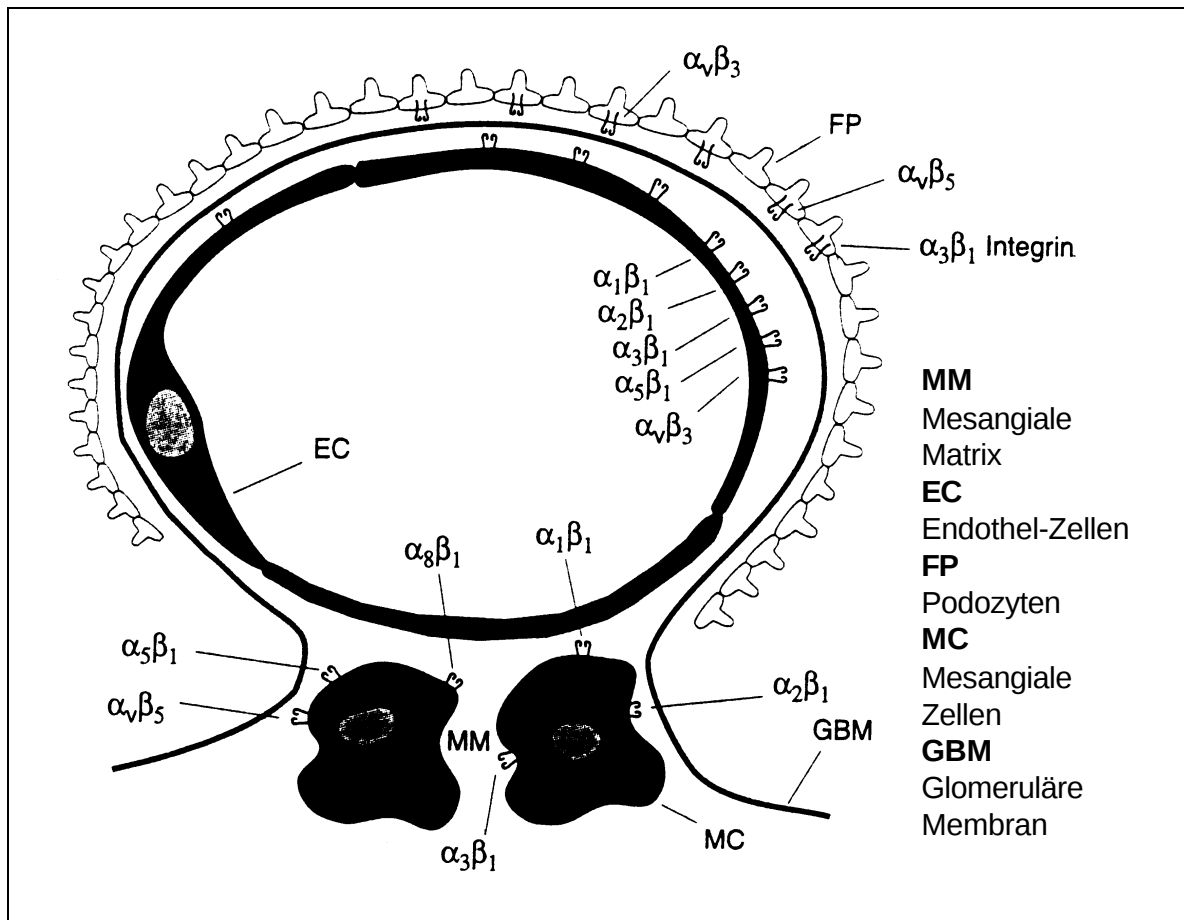


Abb. 11: Verteilung von Integrinen im Glomerulus (nach Adler und Brady (1999)).

Eine verstärkte Expression der Integrinuntereinheiten α_1 , α_5 , α_8 und β_1 konnte bei der anti-Thy-1 Nephritis, einem Rattenmodell für eine ausheilende mesangiale Glomerulonephritis, in den ersten Tagen der Krankheit beobachtet werden (Hartner et al., 1999; Kagami et al., 1993). Bei zunehmender Genesung verringerte sich die Expression der α_8 -Integrine wieder (Hartner et al., 1999). Bei Menschen wurde eine verstärkte Expression der α_1 , α_2 , α_3 , α_5 , α_6 , α_v sowie der β_1 und β_3 Untereinheiten in Biopsieproben nephritischer Nieren nachgewiesen (Patey et al., 1996; Roy et al., 1997).

Über die genauen Wirkungen von Integrinen in der Niere, insbesondere in pathologischen Zuständen, ist erst wenig bekannt. Beispielsweise zeigt die $\alpha_3\beta_1$ knockout Maus atypisch ausgebildete Glomeruli sowie ein nur schwach verzweigtes Sammelrohr (Kreidberg et al., 1996). Vermutlich ist dieses Integrin wie auch andere β_1 Integrine für die Organogenese mitverantwortlich. Ebenfalls für die Entwicklung der Niere scheint das $\alpha_8\beta_1$ Integrin wichtig zu sein. Knockout Mäuse zeigen kleine und unterentwickelte Nieren (Muller et al., 1997).

Die $\alpha_v\beta_3$ knockout Maus zeigt zwar keine Veränderungen im Phänotyp, durch in vitro-Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, daß über die Aktivierung von $\alpha_v\beta_3$ durch Osteopontin, einem seiner Liganden, die Nephrogenese gesteuert werden kann (Rogers et al., 1997). Möglicherweise wird bei der knockout-Maus das Fehlen des $\alpha_v\beta_3$ Integrins durch Überexpression bzw. gesteigerte Aktivität anderer Integrine kompensiert, da sich Integrine durch „crosstalk“ gegenseitig in ihrer Funktion beeinflussen können (Porter et al., 1998). Beispielsweise reguliert $\alpha_v\beta_3$ die Funktion des $\alpha_5\beta_1$ Integrins (Simon et al., 1997).

Daß eine Verstärkung der Zelladhäsion ein wichtiger Faktor in der Pathogenese der Glomerulonephritis ist und zur Proteinurie führt, haben Oda et al. (Oda et al., 1998) bereits 1998 gezeigt. Hierbei untersuchten sie die Interaktion von ICAM-1 und dem Lymphozyten-Funktions-assoziiertem Antigen-1 (LFA-1). Zudem kann bei einer Proteinurie das in den Tubulus gelangte Albumin dort die Expression des $\alpha_v\beta_5$ Integrins steigern (Peruzzi et al., 1996).

1.5.2 Wirkungen von Prostaglandinen auf Integrine in der Niere

Eine systematische Untersuchung des Einflusses von Prostaglandinen auf die Expression von Integrinen oder anderen Adhäsionsmolekülen in der Niere ist bislang nicht erfolgt. Es ist lediglich bekannt, daß das PGI_2 -Analogon ONO-1301 über Inhibierung der Expression des Adhäsionsmoleküls VCAM-1 die Akkumulation von Leukocyten verhindert (Hayashi et al., 1997). Untersuchungen an anderen Geweben bzw. an Zellen lassen jedoch einen solchen Einfluß der Prostaglandine vermuten. So verstärkt beispielsweise Indomethacin in humanen Osteosarkom Zellen den IL-1 β medierten Anstieg von α_2 , α_5 und α_v Integrin-Untereinheiten (Milam et al., 1991). In der Rattenmucosa bewirkt Behandlung mit Indomethacin oder Acetylsalicylsäure einen Anstieg der Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 (Andrews et al., 1994). Ein negativer Einfluß von COX-2 abhängig gebildetem Prostaglandin E_2 auf die Expression von ICAM-1 wurde für Fibroblasten (Noguchi et al., 2000) und glatte Gefäßmuskelzellen (Bishop-Baily et al., 1998) gezeigt. Dadurch läßt sich erklären, daß die Adhäsion von Leukozyten an das Endothel bei Ratten durch den selektiven COX-2 Inhibitor Celecoxib in vivo gesteigert werden konnte (Muscara et al., 2000). Es ist somit anzunehmen, daß Prostaglandine, möglicherweise über eine veränderte Expression von Cyclooxygenasen (COX), auch für die Zelladhäsion von Leukocyten

bei inflammatorischen Prozessen der Niere eine Rolle spielen (Maslinska et al., 1998).

1.6 Fragestellung

In der Niere findet sich eine deutliche physiologische Expression der COX-2, welche bei vielen inflammatorischen Prozessen ansteigt. Es stellt sich die Frage, ob die dadurch vermehrt gebildeten Prostaglandine in ihren protektiven Eigenschaften, wie verbesserter renaler Durchblutung, oder in ihrer inflammatorischen Bedeutung, wie der Übermittlung von Schmerzen oder Fieber, überwiegen und somit, ob eine selektive Inhibition der COX-2 ein Therapieansatz bei renaler Inflammation wäre. Um zunächst die Bedeutung des Prostaglandinsystems und dessen Beeinflussung durch COX-2 Inhibition in inflammatorischen Prozessen in der Niere herauszufinden, wurde der selektive COX-2 Inhibitor Celecoxib in einem Rattenmodell für eine membranöse Glomerulonephritis eingesetzt und die Expression der COX-2, die Prostaglandinbildung und die Expression von Prostaglandinrezeptoren untersucht.

Eine besondere protektive Eigenschaft COX-2 abhängiger Prostaglandine bei Glomerulonephritis bestünde in der Suppression von Matrixadhäsion im Bereich des Glomerulus. Dies wäre z. B. über eine negative Wirkung auf die Genexpression der im Endothel bedeutsamen α_v Integrine, welche bei pathologischen Vorgängen in der Niere oft gesteigert ist, möglich. Die Untersuchungen hierzu wurden ebenfalls in vivo vorgenommen, indem der Einfluß von Celecoxib auf die Expression von α_v Integrinen bei gesunden und kranken Tieren bestimmt wurde.

Es schloß sich die Untersuchung des für die Wirkungen von Celecoxib verantwortlichen Signalweges, d. h. welche Prostaglandine und welche Prostaglandinrezeptoren daran beteiligt sind, an. Dies geschah durch Inkubation von kultivierten Zellen des Mesangiums mit Prostaglandinen bzw. spezifischen Rezeptoragonisten und anschließender Bestimmung der Genexpression.

2 Material und Methoden

2.1 Puffer und Lösungen

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden in bester verfügbarer Qualität und Reinheitsgrad von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

Blot-Puffer:

1 x Laufpuffer ohne SDS

20 % Methanol

Krebs-Henseleit-Puffer (KHP)Stammlösungen:I) KH_2PO_4 32 g/lII) KCl 70 g/lIII) $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ 58 g/lIV) $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ 73,5 g/lPuffer: NaCl 3,45 g NaHCO_3 1,05 g

Glucose 0,5 g

Stammlösungen I-IV je 2,5 ml

ad 500 ml a. d.

pH 7,4

4 x Laemmli-Puffer:

250 mM Na-Phosphat-Puffer pH 7.0

8 % SDS

40 % Glycerin

20 % 2-Mercaptoethanol

0.001 % Bromphenolblau

100 mM Dithiothreitol (DTT)

10 x Laufpuffer:

250 mM Tris

1.9 mM Glycin

0.1 % SDS

P1-Puffer:

50 mM Tris / HCl

10 mM EDTA

100 μg / ml RNase A

pH 8.0

P2-Puffer:

0.2 M NaOH

1 % SDS

P3-Puffer:

3 M KAc-Lösung
pH 5.5

PBS:

137 mM NaCl
2.7 mM KCl
1.5 mM KH_2PO_4
8.3 mM Na_2HPO_4
pH 7.4

4 x Sammelgelpuffer:

0.5 mM Tris / HCl
0.4 % SDS
pH 8.8

10 x TAE-Puffer:

40 mM Tris
20 mM Na-Acetat
2 mM EDTA
pH 7.8

10 x TBE-Puffer:

1 mM Tris
83 mM Borsäure
10 mM EDTA
pH 7.4

10 x TBS:

100 mM Tris/HCl
1.5 mM NaCl
pH 7.4

TBST:

1 x TBS mit:
0.1 % Tween 20

TBSTM:

1 x TBS mit:
0.1 % Tween 20
5 % Magermilchpulver

TE-Puffer:

10 mM Tris / HCl
1 mM EDTA
pH 8.0

4 x Trenngelpuffer:

1.5 mM Tris / HCl
0.4 % SDS
pH 8.8

2.2 Passive Heymann Nephritis (PHN)

Die membranöse Glomerulonephritis der menschlichen Niere ist eine Immunkomplexnephritis und zählt als solche zu den Autoimmunerkrankungen. Tierexperimentell lässt sich eine Immunkomplexnephritis mit Hilfe der passiven Heymann Nephritis (PHN) der Ratte simulieren. Dabei zeigen sich identische pathomorphologischen Veränderungen in der Niere: subepitheliale Ablagerungen von Immunkomplexen und Komplement in der Lamina rara externa der glomerulären Basalmembran, die schwere Schäden der Membran zur Folge haben (Eddy et al. 1992, Kerjaschki et al. 1992). Induziert wird die PHN durch Injektion eines gegen das FX1A Antigen des tubulären Epithels gerichteten Antiserums. Diese Antikörper lagern sich zum einen an der Kapillarwand des Glomerulus an, zum anderen bilden sich diskontinuierliche subepitheliale Ablagerungen von Immunglobulinen und Komplement (heterologe Phase). Zudem kommt es in der autologen Phase zusätzlich zu Ablagerungen von Antikörpern gegen das injizierte anti-FX1A Antiserum. All dies führt zur Ausbildung einer signifikanten Nierenschädigung, erkennbar an einer Proteinurie, nach ca. acht Tagen (Couser et al. 1978, Sekse et al., 1990).

2.2.1 Studienprotokoll

Um die Wirkungen von Prostaglandinen in vivo zu untersuchen, wurden gesunde Tiere sowie Tiere, bei denen zuvor die PHN induziert worden war, mit dem selektiven COX-2 Inhibitor Celecoxib behandelt. Als Kontrollgruppen dienten gesunde Tiere und Tiere mit PHN, die jeweils mit einem Placebo behandelt wurden. Der Versuch wurde mit 12 Tieren pro Gruppe durchgeführt. Von allen Tieren wurde der 24 h Urin gesammelt. Da einige Tiere vorzeitig verstarben, ergab sich dabei n=10-12. Von 8-10 Tieren pro Gruppe wurden aus einer Niere die Glomeruli zur Western Blot Analyse isoliert. Von 6-8 Tieren pro Gruppe wurde aus dem Cortex einer Niere die mRNA zur Untersuchung durch Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) gewonnen.

Es wurden folgende Versuchstiergruppen verwendet:

Gruppe 1: gesunde Tiere

Gruppe 2: gesunde Tiere mit Celecoxibbehandlung

Gruppe 3: Tiere mit induzierter PHN

Gruppe 4: Tiere mit induzierter PHN und Celecoxibbehandlung

Celecoxib wurde von Tag 8 bis Tag 14 zweimal täglich mit 5 mg/kg Körpergewicht und von Tag 15 bis Tag 28 einmal täglich mit 5 mg/kg Körpergewicht verabreicht. Gesunde Tiere und Tiere mit induzierter PHN ohne Celecoxib-Behandlung erhielten einmal täglich einen Placebo. 24 h Sammelurin wurde an Tag 14 gewonnen. Tötung der Tiere und Nierenentnahme erfolgte an Tag 29. Dieser Tierversuch wurde von der zuständigen Behörde genehmigt.

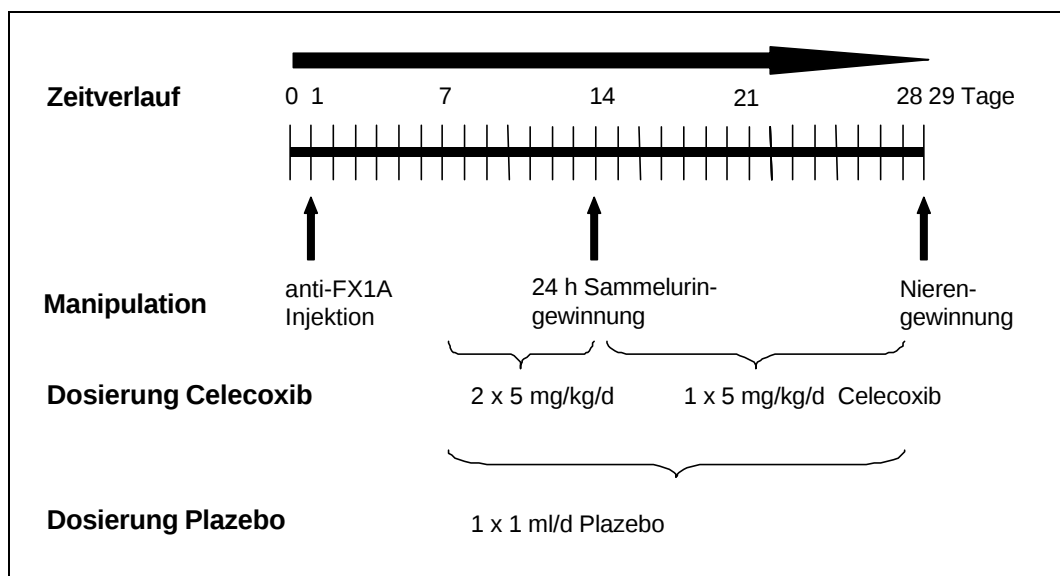


Abb. 12: Schematischer Ablauf des Tierversuchs.

2.2.2 Tiere

Verwendet wurden weibliche Wistarratten zwischen 200 g und 230 g, die aus Züchtung der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf stammten. Innerhalb der spezifisch pathogenfreien (SPE) Tierhaltung wurden sie bei 22 °C und einem Tages/Nacht Rhythmus von 12 h/12 h mit freiem Zugang zu Nahrung und angesäuertem, entkeimtem Trinkwasser gehalten.

2.2.3 Induktion der PHN

Zunächst wurde das zur Induktion der PHN benötigte anti-FX1A Antiserum hergestellt. Die Präparation des FX1A Antigens erfolgte nach einer von Edgington et al. (1968) beschriebenen Methode. Dazu wurden Rattennieren perfundiert und aus dem Eluat eine Fraktion von Tubulusmembranproteinen gewonnen. Diese Fraktion wurde zur Antiserumproduktion in Kanninchen injiziert. Die erhaltenen Antisera wurden durch indirekte Haemagglutination auf Antikörper gegen FX1A und die glomeruläre Basalmembran (GBM) getestet (Iversen et al., 1981). Es wurden ausschließlich Sera mit hohen Titern von Antikörpern gegen FX1A und nicht nachweisbaren Titern gegen GBM verwendet, um die Entstehung einer anti-GBM Nephritis zu vermeiden. Ein Milliliter des so hergestellten anti-FX1A Antiserums wurde in die Schwanzvene von Ratten injiziert und führte zur passiven Heymann Nephritis (Sekse et al., 1990).

2.2.4 Medikamentengabe

Celecoxib wurde in Form des Arzneimittels Celebrex[®] (Searle, Nürnberg) verwendet. Die Tabletten wurden gemörsert, in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung aufgeschlämmt und per Schlundsonde verabreicht. Es wurde von Tag 8 nach Injektion des anti-FX1A Antiserums bis Tag 14 zweimal täglich 5 mg/kg Körpergewicht und von Tag 15 bis Tag 28 einmal täglich 5 mg/kg Körpergewicht gegeben. Als Plazebo wurde einmal täglich 1 ml physiologische Kochsalzlösung gegeben.

2.2.5 Uringewinnung

Zur Gewinnung des Urins wurden die Ratten 24 h in Stoffwechselkäfigen gehalten. So können Stoffwechselprodukte getrennt aufgefangen werden. Diese Käfige besitzen als Boden ein Drahtnetz und darunter einen Auffangtrichter, der in eine Röhre mündet, die so gestaltet ist, daß Urin von Kot getrennt wird. Die Ratten hatten während dieser Zeit freien Zugang zu angesäuertem Trinkwasser, wurden aber nicht gefüttert.

2.2.6 Nierengewinnung und Isolierung der Glomeruli

Die Ratten wurden durch Äther narkotisiert und intracardial entblutet. Nach Eröffnung des Bauchraumes wurden die Nieren entnommen und sofort in eiskalten KHP gegeben. Die Isolierung der Glomeruli erfolgte nach einer modifizierten Sieb-Technik (Sekse et al., 1990). Nach Entnahme der Nieren wurden diese von der Fettkapsel befreit, anschließend der Cortex abgetrennt und grob zerkleinert. Die Cortex-Stücke wurden mit 10 ml eiskaltem KHP durch ein Stahlsieb mit 120 µm Maschenweite (neoLab, Heidelberg) gedrückt. Die erhaltene Suspension wurde 5 min zentrifugiert (700 rpm, 4 °C, Heraeus Minifuge GL) und anschließend zweimal mit je 2 ml KHP gewaschen und wie oben zentrifugiert, um Blutzellen zu entfernen (Blume et al., 1999; Heise et al., 1998). Das erhaltene Pellet wurde zur Proteinisolierung verwendet.

2.3 Zellkultur

In der vorliegenden Arbeit wurden von Ratten stammende Mesangialzellen verwendet. Ihre Kultivierung erfolgte in Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) mit GlutaMAX I™ mit 4.5 mg/ml Glukose. Dem Medium wurde weiterhin 100 U/ml Penicillin, 0.1 mg/ml Streptomycin und 10 % foetales Kälberserum (FCS) zugesetzt (alles Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe). Die Zellen wurden bei 5 % CO₂ und 37 °C kultiviert. Die Passagierung der Zellen erfolgte alle 4-6 Tage. Dazu wurden sie durch Waschen mit PBS vom Medium befreit und mittels Trypsin / EDTA (0.05 % / 0.5 mM) abgelöst. Die Zellen wurden subkonfluent passagiert. Für die Versuche wurden Zellen der Passagen 12-20 verwendet.

2.4 Präparation und Analyse von Proteinen

2.4.1 Isolierung von Proteinen aus Gewebe

Zu dem Pellet der Glomeruliisolierung wurde 1 ml Lysepuffer (50 mM Tris, 10 mM EDTA, 1 % Triton x-100, 1 mM PMSF, 1 mg/ml Benzamidin) gegeben und anschließend mit dem Ultra-Turrax (POLYTRON®, Kinematica, CH-Kriens/Luzern) homogenisiert. Nach 20 min. Zentrifugation (20.000 rpm, 4 °C, Beckmann L8-60M, Rotor 50.3 Ti) wurde ein Teil des erhaltenen Überstandes zur Proteinbestimmung

verwendet und der Rest 4:1 in 4x Laemmli-Puffer verdünnt und 10 min bei 95 °C denaturiert.

2.4.2 Analyse von Proteinen durch Western Blot

Auftrennung von Proteinen im Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine aus dem Zelllysat erfolgte nach dem Prinzip der diskontinuierlichen Gelelektrophorese (Laemmli, 1970; Neville, 1971). Dazu wurde ein Sammelgel (5 % Acrylamid) auf ein Trenngel (12 % Acrylamid; „Rotiphorese“, Roth, Karlsruhe) gegossen. Für die Untersuchung der Proteine wurden 10-20 µg Protein eingesetzt. Der Gellauf erfolgte bei 200 V in einer BioRad Elektrophoresekammer (BioRad, München) mit 1 x Laufpuffer + 0.1 % SDS. Als Molekulargewichtsmarker diente ein biotinylierter hochmolekularer Proteinstandard (Sigma-Aldrich, Taufkirchen).

Transfer von Proteinen

Die Proteine wurden mittels einer „Semi-Dry“-Blotting Apparatur (BioRad, München) auf eine Polyvinyliden Difluorid Membran (PVDF, Millipore, ImmobilonP, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) transferiert. Der Transfer erfolgte mit Blotpuffer bei insgesamt 12 V für 30 min.

Hybridisierung und Detektion von Proteinen

Zur Sättigung unspezifischer Bindungen wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in TBSTM prähybridisiert. Anschließend erfolgte die Hybridisierung mit Primärantikörper (1:1000, siehe Tabelle 2) in 10 ml TBSTM für 1-2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Nach 3 x 10 min Waschen in TBST erfolgte die Hybridisierung mit Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern (1:5000, Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg) in TBSTM für 1 h bei Raumtemperatur.

Bezeichnung	Hersteller
Monoklonaler Antikörper, COX-1	Cayman-Chemical, Vertrieb: Alexis, Grünberg
Monoklonaler Antikörper, COX-2	BD Transduction Laboratories, Heidelberg
Monoklonaler Antikörper, β -actin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Tab. 2: Im Western Blot verwendete Primärantikörper

Nach 3 x 10 min Waschen in TBST wurden die Proteine mittels eines Lumi-Light Western Blotting Substrats (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) nach Angaben des Herstellers detektiert. Bei dieser Methode werden mit der, bei der Oxidation von Luminol durch H_2O_2 entstehenden Lichtemission die Stellen mit Peroxidaseaktivität auf der Membran nachgewiesen. Die Chemilumineszenz wird durch Exposition der Membran auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm ECLTM, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) sichtbar gemacht.

Prüfung der gleichmäßigen Proteinbeladung

Nach der Detektion wurde die PVDF-Membran mit TBST gewaschen und 10 min in einer Amidoschwarz-Lösung (0.1 % in 25 % Isopropanol/10 % Essigsäure; Sigma-Aldrich, Taufkirchen) gefärbt. Nach 10-minütigem Abwaschen der überschüssigen Farbstoffmenge mit 25 % Isopropanol/10 % Essigsäure wurden die Proteinbanden sichtbar und die Gleichmäßigkeit der Proteinbeladung auf der Membran kontrolliert.

Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Bradford (1976) mit Hilfe eines „Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent“ (BioRad, München) bestimmt. Als Standard wurde eine Eichkurve mit Rinderserumalbumin hergestellt. Die photometrische Bestimmung der Proben erfolgte 20 min nach Zugabe des Bradfordreagens in einem ELISA-Reader Modell 550 (BioRad, München) bei einer Wellenlänge von 595 nm.

2.5 Präparation und Analyse von RNA

2.5.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Nierengewebe

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Geweben oder kultivierten Zellen erfolgte mit der Trizol[®]-Methode (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe). Die Gewebeprobe wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und durch Hammerschläge pulverisiert. Das erhaltene Pulver wurde mit 6 ml Trizol/g versetzt und mit Hilfe des Ultra-Turrax (POLYTRON[®], Kinematica, CH-Kriens/Luzern) homogenisiert. Der Überstand nach 10 min Zentrifugation (5500 rpm, 4 °C, Heraeus Minifuge GL) wurde mit 200 µl Chloroform/ml Trizol versetzt, ausgeschüttelt, 3 min bei Raumtemperatur inkubiert, wiederum 10 min zentrifugiert und anschließend wie unten beschrieben weiterbehandelt.

2.5.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugetierzellen

Zellen wurden direkt nach Abnahme des Mediums in der Kulturschale durch Zugabe von Trizol-Reagenz (1 ml/10 cm²) lysiert. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die RNA-Proben mit 200 µl Chloroform/ml Trizol versetzt, ausgeschüttelt, 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 10 min zentrifugiert (13.000 rpm, 4 °C, Heraeus Biofuge 13). Die Fällung der RNA aus dem Überstand erfolgte mit 500 µl Isopropanol/ml Trizol bei Raumtemperatur für 10 min und anschließender Zentrifugation für 30 min (13.000 rpm, 4 °C, Heraeus Biofuge 13). Das RNA-Pellet wurde in H₂O gelöst und durch Zugabe von 1/10 Volumen 5 M KAc und 2 Volumen Ethanol mit anschließender Zentrifugation (s. o.) umgefällt. Quantifizierung von RNA erfolgte durch Messung der Absorption bei 260 nm in einem Genequant II DNA/RNA Calculator (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg).

2.5.3 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) zum Nachweis von mRNA

Die RT-PCR wurde mit Ready-To-Go[™] RT-PCR-Pillen (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) bzw. dem One Step RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Als interner Standard wurde die Expression des Enzyms Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) im selben Ansatz gemessen. Für jede Methode wurde die eingesetzte RNA-Menge sowie die Anzahl der Zyklen so gewählt, daß die Stärke der erhaltenen DNA-Bande nach elektrophoretischer Auftrennung linear von diesen beiden Größen abhängt. Die verwendeten Primer wurden von Amersham Pharmacia

Biotech (Freiburg) oder MWG-Biotech AG (Ebersberg) bezogen. Sofern keine in der Literatur beschriebenen Primersequenzen verwendet wurden, erfolgte die Auswahl durch Sequenzvergleiche mit Hilfe der Computer-Software Gene Runner 3.05 (Hastings Software, Hudson, NY, USA).

Verwendete Primer

Gen	Primersequenzen	Frag- ment- größe	Lit.
COX-2	5'- ACT TGC TCA CTT TGT TGA GTC ATT – 3' 5'- TTT GAT TAG TAC TGT AGG GTT AAT G – 3'	582 bp	Feng et al., 1993
α_v subunit	5'- GGA GTT CCA AGA GCA GCA AGG AC – 3' 5'- AAG CCT GTT GAT CTT CCA TT GAA G – 3'	425 bp	--
EP ₂	5'- GGG TGT AGC GCC GGC AGC AGG AC – 3' 5'- CAG CCG AGC ACA GCC ACG ATG AGC – 3'	478 bp	Hartner et al., 2000
EP ₃	5'- GGG CCG CTA CAG CGT GCA GT – 3' 5'- GAT AAA CCC AGG GAT CCA AGA TCT – 3'	451 bp	--
EP ₄	5'- CAC CTG GTG CTT CAT CGA CTG GAC C – 3' 5'- GGT CCA GTC GAT GAA GCA CCA GGT G – 3'	484 bp	--
IP	5'- CAG TCA TCC CTA CCT GTA CGC C – 3' 5'- TGC GTG AAT CCT CTG ATC GTG – 3'	423 bp	--
TP	5'- TGG ACT GGC GTG CCA CTG AT – 3' 5'- AGC AAG GGC ATC CAA CAC ACC GTG – 3'	502 bp	Abe et al., 1995
GAPDH	5'- TGA TGA CAT CAA GAA GGT GGT GAA – 3' 5'- TCC TTG GAG GCC ATG TAG GCC AT – 3'	220 bp	--

Tab. 3: Primersequenzen zum Nachweis eines für das jeweilige Gen spezifischen Fragmentes der aus der mRNA durch reverse Transkription erhaltenen cDNA. Angegeben ist jeweils der sense (obere Zeile) und der antisense (untere Zeile) Primer sowie die Größe des erhaltenen Fragmentes und Literaturverweise (Lit.) soweit vorhanden.

RT-PCR Bedingungen für mRNA aus Gewebe und Zellkultur

Gen	Kit	RNA Menge	c (spez. Primer)	c (GAPDH Primer)	Zyklenzahl
COX-2	A	2000 ng	300 nM	200 μ M	50
	A	<i>250 ng</i>	<i>300 nM</i>	<i>200 μM</i>	35
α_v subunit	A	500 ng	50 nM	100 nM	30
	A	<i>250 ng</i>	<i>50 nM</i>	<i>200 nM</i>	40
EP ₂	B	500 ng	200 nM	200 nM	35
EP ₃	A	1000 ng	200 nM	100 nM	30
	B	<i>250 ng</i>	<i>200 nM</i>	<i>200 nM</i>	40
EP ₄	A	1000 ng	300 nM	100 nM	40
IP	B	500 ng	200 nM	200 nM	35
TP	B	500 ng	100 nM	200 nM	28

Tab. 4: Variablen der RT-PCR Methoden zum Nachweis der mRNA der entsprechenden Gene. Kit A: Ready-To-Go™ RT-PCR-Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg); Kit B: One Step RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden). *Kursiv*: Bedingungen für mRNA aus kultivierten Mesangialzellen; sonst: für mRNA aus Nierengewebe.

Die RT-PCR erfolgte bei beiden Kits nach dem "one-step"-Prinzip, d. h. nach der reversen Transkription erfolgt ohne Unterbrechung die PCR. Dabei wird durch einen zusätzlichen Denaturierungsschritt die reverse Transkriptase deaktiviert. Es wurde folgendes Programm für den Thermocycler (Biorad TRIO) verwendet, bei dem die Zyklenzahl gemäß obiger Tabelle angepaßt wurde. Ansonsten wurde gemäß der Anleitung des Herstellers für den jeweiligen Kit verfahren.

Reverse Transkription	Kit A: 15 min bei 42 °C Kit B: 15 min bei 50 °C	
Denaturierung	15 min bei 95 °C.	
PCR	Denaturierung: 95 °C, 1 min Annealing: 58 °C, 1 min Extension: 72 °C, 1.5 min	} x Zyklenzahl
	30 min zusätzliche Extension bei 72 °C	

Tab. 5: Allgemeines RT-PCR Programm für den Thermocycler.

Die erhaltene DNA wurde wie unten beschrieben isoliert und sequenziert. Durch anschließende Datenbankanalyse (BLAST[®], Basic Local Alignment Search Tool; Internetangebot des National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov) wurde die Übereinstimmung dieser Sequenz mit der des entsprechenden Gens überprüft.

2.5.4 Auftrennung von DNA in nativen Agarose-Gelen

Zur Analyse von DNA-Fragmenten wurden diese in 1-2 %igen Agarose-Gelen (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) aufgetrennt. Als Gelpuffer wurde 1 x TAE-, bzw. TBE-Puffer verwendet. Die Proben wurden vor Beladung des Gels mit 1/10 Volumen Blaumarker (Bromphenolblau 0.25 %, Saccharose 40 %) versetzt. Als Längenstandard dienten eine Basenpaar 100-Leiter oder der DNA-Molekular-Gewichtsmarker II (beides Roche Molecular Biochemicals, Mannheim). Durch Zugabe von 0.5 µg/ml Ethidiumbromid zum Agarosegel wurde die DNA nach der Auftrennung in TAE-, bzw. TBE-Puffer bei Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht.

2.5.5 Sequenzierung der erhaltenen RT-PCR Fragmente

Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten

Um bestimmte DNA-Fragmente zu isolieren, wurden diese in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Das gewünschte Fragment wurde unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und das Agarosestück mit der DNA in dreifachem Volumen 6 M Na-Iodid-Lösung bei 50 °C geschmolzen. Nach Zugabe von 5 µl „Glasmilk“, einer DNA-bindenden Silikat-Matrix, erfolgte eine Inkubation für 5 min bei 50 °C. Der „Glasmilk“ / DNA-Komplex wurde durch Zentrifugation (30 s, 13.000 rpm, Eppendorf Centrifuge 5415 C) sedimentiert und anschließend 3 x mit je 1 ml kalter Wasch-Lösung (50 mM NaCl, 10 mM Tris / HCl, 2.5 mM EDTA, 50 % Ethanol (v/v), pH 7.5) gewaschen. Die DNA wurde dann mit 20 µl 1 x TE-Puffer durch eine 5-minütige Inkubation bei 50 °C von der Matrix gelöst und durch Zentrifugation (30 s, 13.000 rpm, Eppendorf Centrifuge 5415 C) von dieser getrennt. Der Überstand mit der DNA wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

Ligation von DNA und Vermehrung in *Escherichia coli* (*E. coli*)

Für die Ligation wurde der TOPO-TA Ligation Kit (Invitrogen, NL-Groningen) verwendet. Anschließend wurden kompetente *E. coli* mit dem erhaltenen Plasmid transformiert, um es so zu vermehren. Transformationen von *E. coli* wurden nach der Rubidiumchlorid-Methode durchgeführt (Hanahan, 1985).

Genotyp des verwendeten *E.coli*-Stammes:

TOP10 F^- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *deoR*
araD139 Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG*

Anzucht des *E.coli*-Bakterienstammes:

Vollmedium (LB): 1 % Trypton (Pepton 140; Difco, USA), 0.5 % Hefeextrakt (Difco, USA), 0.5 % NaCl

Für die Herstellung von festem Nährboden wurden 1.2 % Agar (GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe) zugegeben. Um Bakterien, die ein Plasmid mit Antibiotikaresistenz enthalten, zu selektionieren, wurde dem Medium nach dem Autoklavieren Ampicillin in einer Konzentration von 50 µg/ml zugegeben. Die Bakterien wurden bei 37 °C angezogen. Zur Lagerung wurden sie bei 4 °C längstens zwei Monate aufbewahrt.

Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Alkalische Lyse („Mini-Präparation“):

Die Präparation wurde nach Birnboim und Doly (1979) durchgeführt, deren Methode nach Vorschrift der Firma Qiagen (Hilden) modifiziert wurde. 1.5 ml einer Übernachtskultur wurden durch Zentrifugation geerntet und in 300 µl P1-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl P2-Puffer und kurzem Vortexen wurden 300 µl P3-Puffer zugefügt. Die aufgeschlossenen Zellen wurden 15 min bei 12,500 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand, der sowohl die DNA als auch RNA enthielt, in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Anschließend erfolgte die Fällung der DNA durch Zugabe 2.5 Volumenteilen Ethanol (96 %). Das Pellet wurde in 50 µl TE-Puffer aufgenommen.

Qiagen („Midi-Präparation“):

Die Plasmid-DNA, die in größeren Mengen benötigt wurde, wurde mit dem „Plasmid Midi Kit“ der Firma Qiagen (Hilden) isoliert. Dies wurde nach Anweisung des Herstellers durchgeführt.

Restriktion von DNA

Durch Restriktionsanalyse wurde überprüft, ob das Plasmid das isolierte PCR Produkt enthielt. Dabei wurden die Schnittstellen so gewählt, daß bei Anwesenheit des Produktes im Plasmid spezifische Bruchstücke entstehen. Die DNA für diese Untersuchung wurde durch alkalische Lyse gewonnen. Die sequenzspezifische Spaltung von DNA erfolgte mit Restriktionsendonukleasen der Firmen Roche Molecular Biochemicals (Mannheim) und New England Biolabs (Frankfurt). Nach Herstellerangaben wurden Puffer und Reaktionstemperatur gewählt. Für 1 µg Plasmid-DNA wurden 1 U Enzym eingesetzt und die DNA für eine Stunde bei entsprechender Temperatur inkubiert.

Sequenzierung von DNA

DNA für die Sequenzierung wurde durch „Midi-Präparation“ gewonnen. Alle Materialien und Geräte zur Sequenzierung von DNA wurden von der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen. Die Sequenzierung von DNA erfolgte mit dem „Thermo Sequenase Cy5 Dye Terminator Sequencing Kit“ nach Protokoll des Herstellers. Diese Methode beruht auf einer Modifikation der Didesoxy-Methode nach Sanger et al. (1977). Als Primer wurde verwendet:

„Universal“: 5' CGA CGT TGT AAA ACG CGG CCA GT 3'

Sequenzgel: 8.8 ml Long-Ranger Acrylamid
 29 g Harnstoff
 12 ml 10 x TBE ad 60 ml Aqua dest.
 550 µl APS (10 %)
 55 µl TEMED

Elektrophoresebedingungen: 1500 V, 55 mA, 25 W, 53 °C, Laufpuffer: 0.5 x TBE

System: ALF-Express DNA-Sequenzierer

Programm: ALF-Manager 3.01

2.6 Densitometrische Auswertung

Die densitometrische Auswertung von RT-PCR Gelen erfolgte durch ein Komplettsystem der Firma Raytest (Straubenhardt; Software: Tina 2.09). Die Expression wurde auf die Expression des GAPDH Gens bezogen. Die densitometrische Auswertung von Western Blots erfolgte durch ein Komplettsystem der Firma Biometra (Göttingen; Software: ScanPack 2.0). Die Expression wurde relativ zur Expression von β -Aktin berechnet.

2.7 Bestimmung von Prostaglandinen durch Radio-Immuno-Assay

Da die interessierenden Prostaglandine E_2 , I_2 und TxA_2 sehr instabile Verbindungen sind, wurden in Aliquots der Sammelurinproben ihre stabilen Degradationsprodukte bzw. Indexmetabolite gemessen. Bestimmt wurden TxB_2 als Degradationsprodukt von TxA_2 , 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ als Degradationsprodukt von PGI $_2$ und bicyclo-PGE $_2$ als stabiler Indexmetabolit für PGE $_2$. Alle Metaboliten wurden durch Radio-Immuno-Assays unter Verwendung spezifischer Antikörper gemessen (Schrör und Seidel, 1988).

2.8 Statistik

Die Meßdaten wurden als Mittelwerte $\pm$ Standardfehler des Mittelwertes (SEM) der jeweiligen Anzahl (n) von Einzelexperimenten angegeben. Das Signifikanzniveau p für α wurde mit 0.05 festgelegt. Signifikanzunterschiede wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test überprüft. Die statistische Berechnung erfolgte mit dem Computerprogramm GraphPad Prism 3.0 der Firma GraphPad Software, San Diego, USA. Die Berechnung von Korrelationen erfolgte durch den Spearman's rank Test mit der Software SigmaPlot 5.0 der Firma SPSS, Chicago, USA.

3 Ergebnisse

3.1 COX-2 Expression in der Niere und deren Beeinflussung durch Celecoxib

3.1.1 COX-2 Expression bei Ratten mit PHN im Vergleich zu gesunden Ratten

Es wurde im Cortex der Niere gesunder Ratten untersucht, ob sich eine physiologische COX-2 Expression nachvollziehen ließ. Die Expression der COX-2 wurde in der Niere auf der mRNA- und Protein-Ebene bestimmt. Die Expression der mRNA wurde dabei durch RT-PCR bestimmt. Die Expression des COX-2 Proteins wurde durch Western Blot Analyse nachgewiesen. Anschließend wurden mRNA und Protein Expression im Cortex bei gesunden und kranken Ratten verglichen, um festzustellen, ob die COX-2 in dem verwendeten Tiermodell im inflammatorischen Zustand verändert exprimiert wird und somit am inflammatorischen Prozess beteiligt ist.

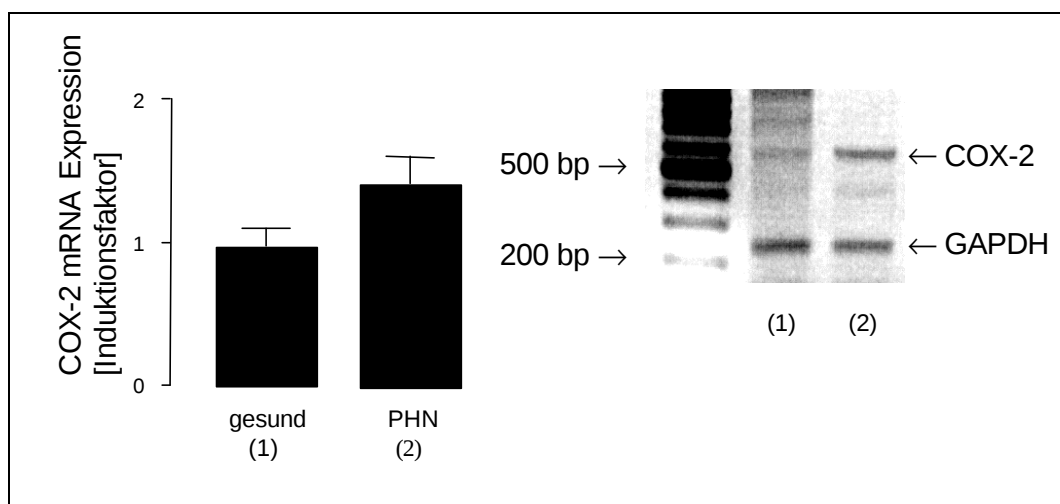


Abb. 13: mRNA Expression der COX-2 im renalen Cortex gesunder Ratten und Ratten mit PHN. Rechts: repräsentatives RT-PCR Gel. Links: Densitometrische Auswertung von n=8 Tieren dargestellt als Mittelwerte $\pm$ SEM (PHN gegen gesund ist nicht signifikant).

Gesunde Ratten zeigten eine schwache physiologische COX-2 mRNA Expression. Bei Ratten mit PHN fand sich im Vergleich zu gesunden Tieren kein signifikanter Anstieg in der corticalen mRNA Expression der COX-2 (Abb. 13). Ob sich dies auch in der physiologisch relevanteren Protein-Expression widerspiegelte, wurde durch eine Western Blot Analyse der aus gesunden und nephritischen Ratten isolierten Cortices untersucht.

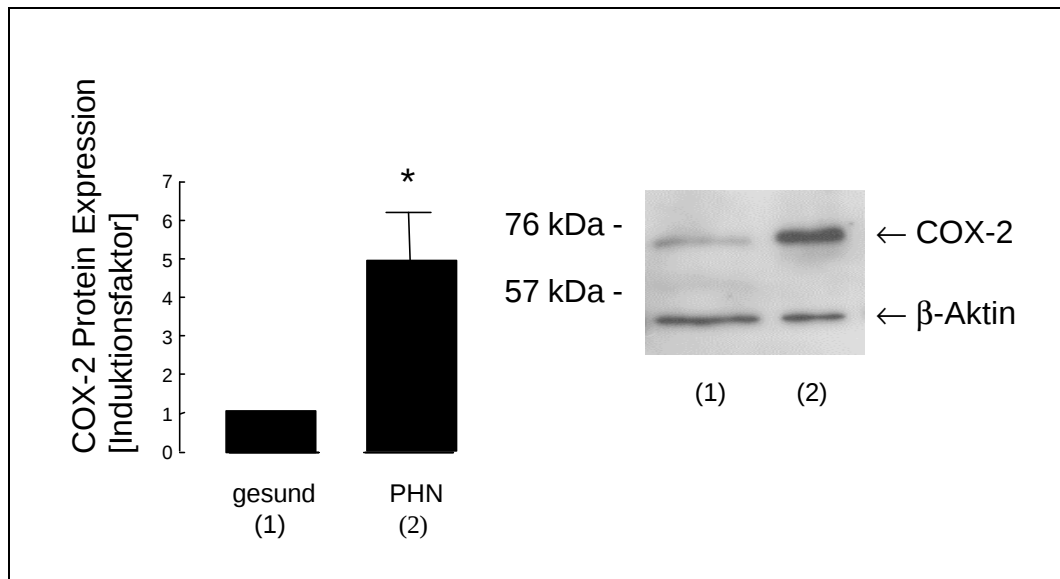


Abb. 14: Protein Expression der COX-2 im Cortex gesunder Ratten und Ratten mit PHN. Rechts: repräsentativer Western Blot. Links: Densitometrische Auswertung von $n=8$ Tieren dargestellt als Mittelwerte $\bar{x} \pm \text{SEM}$ (* $p < 0.05$).

Wie auch auf der mRNA Ebene zeigten gesunde Ratten eine physiologische COX-2 Expression (Abb. 14). Ratten mit PHN besaßen im Vergleich zu gesunden Tieren eine signifikant gesteigerte Expression des COX-2 Proteins (Abb. 10). Es fand sich somit bei kranken Tieren am Ort der Inflammation ein ca. 5-facher Anstieg des COX-2 Proteins. Diese Ergebnisse zeigten, daß bei Ratten eine physiologische corticale COX-2 Expression vorhanden ist, die bei Ratten mit PHN verstärkt wird.

3.1.2 Vergleich der Prostaglandinausscheidung zwischen gesunden und nephritischen Ratten

Die vorangegangenen Untersuchungen zeigten eine verstärkte corticale COX-2 Protein-Expression bei nephritischen Ratten. Im Folgenden wurde anhand von Messungen der gebildeten Prostaglandine im Urin geprüft, ob diese gesteigerte Cyclooxygenaseaktivität mit Veränderungen auf der Produktebene einherging. Durch Vergleich der Ausscheidung von Prostaglandinen bei Ratten mit PHN zu gesunden Ratten wurde untersucht, ob und welche Prostaglandine bei renaler Inflammation verstärkt gebildet werden. Im 24 h Urin von gesunden Ratten und Ratten mit PHN, die jeweils 27 Tage mit Plazebo behandelt wurden, wurden die stabilen Index-Metabolite von PGE_2 , PGI_2 und TxA_2 (bicyclo- PGE_2 , 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ und TxB_2) durch Radioimmunoassay bestimmt (Abb. 15).

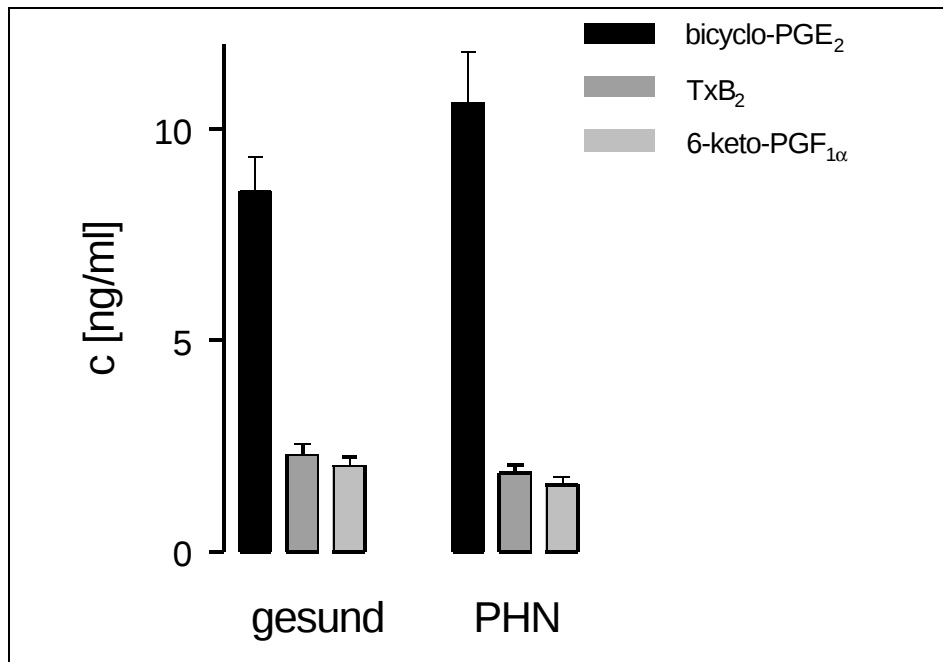


Abb. 15: Ausscheidung von stabilen Prostaglandinmetaboliten in gesunden Ratten und Ratten mit PHN. Bestimmt wurden bicyclo-PGE₂ (PGE₂ Index-Metabolit), TxB₂ (TxA₂ Index-Metabolit) und 6-keto-PGF_{1α} (PGI₂ Index-Metabolit) im 24 h Sammelurin am Tag 27 durch RIA. Daten sind Mittelwerte $\bar{x}$ von $n=12$ Tieren $\pm$ SEM (keine signifikanten Unterschiede zwischen PHN und gesund).

Es ergab sich bei kranken Tieren ein nur schwacher und nicht signifikanter Anstieg der bicyclo-PGE₂ Ausscheidung. Die Ausscheidung der übrigen Metabolite blieb ebenfalls unverändert. Somit führte der Anstieg der COX-2 Protein-Expression bei kranken Tieren nicht zu einer vermehrten Ausscheidung von Prostaglandinen mit dem Urin.

3.1.3 Einfluß von Celecoxib auf die pathologische COX-2 Expression

Um zu überprüfen, ob COX-2 abhängig gebildete Prostaglandine im inflammatorischen Zustand einen Einfluß auf die COX-2 Expression ausübten, wurden nephritische Ratten mit Celecoxib bzw. Plazebo behandelt und anschließend die renale COX-2 Expression bestimmt. Wie oben beschrieben, wurde auch hier die Expression auf der mRNA Ebene durch RT-PCR und auf der Proteinebene durch Western Blot untersucht. Die corticale Expression von COX-2 mRNA bei Ratten mit PHN wurde durch die Behandlung mit Celecoxib signifikant verringert (Abb. 16).

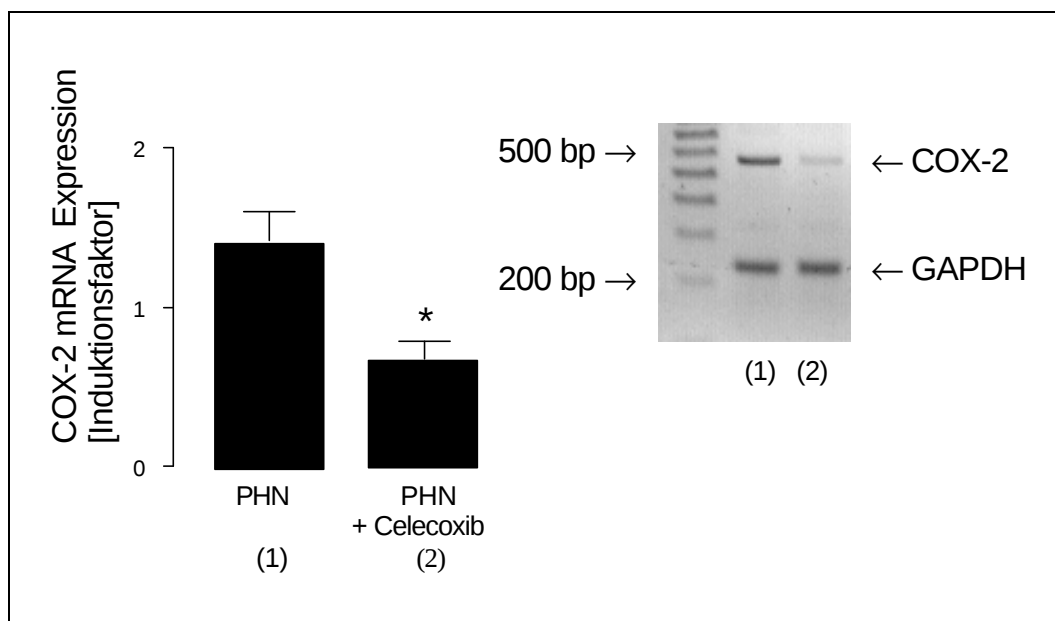


Abb. 16: mRNA Expression der COX-2 im renalen Cortex von Ratten mit PHN ohne und mit Behandlung von 5 mg/kg/d Celecoxib. Rechts: repräsentatives RT-PCR Gel. Links: Densitometrische Auswertung von n=8 Tieren dargestellt als Mittelwerte $\pm$ SEM (* p<0.05).

Die Behandlung mit Celecoxib führte bei den kranken Tieren gleichfalls zu einer signifikanten Verringerung der Expression des COX-2 Proteins (Abb. 17).

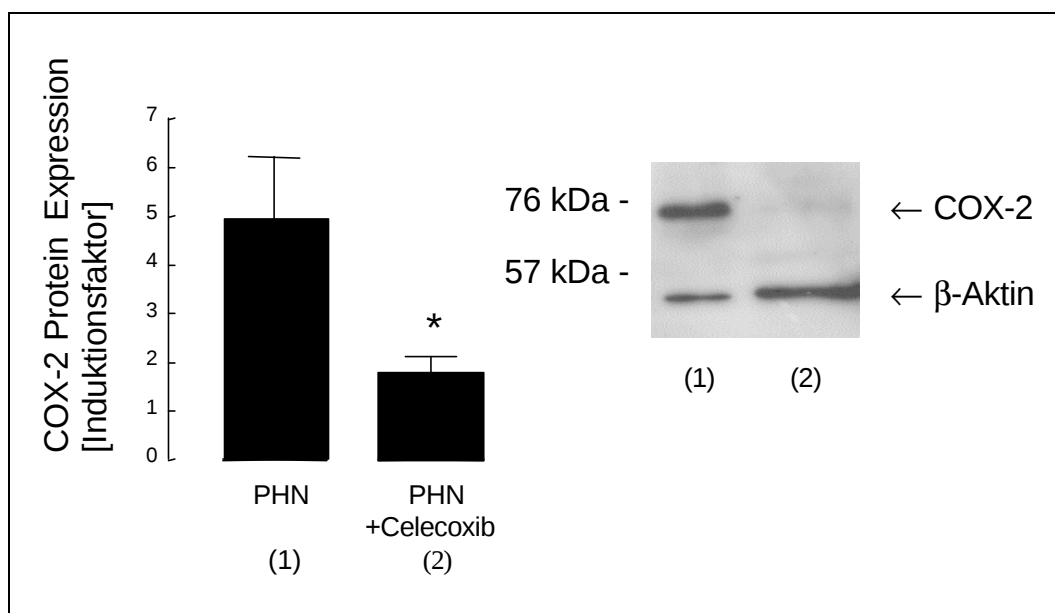


Abb. 17: Protein Expression der COX-2 in isolierten Glomeruli von Ratten mit PHN ohne und mit Behandlung von 5 mg/kg/d Celecoxib. Rechts: repräsentativer Western Blot. Links: Densitometrische Auswertung von n=8 Tieren dargestellt als Mittelwerte $\pm$ SEM (* p<0.05).

Sowohl die COX-2 mRNA- als auch die COX-2 Protein-Expression im Cortex wurde bei nephritischen Ratten durch die Gabe von Celecoxib gesenkt. Erklärbar wäre ein solcher Effekt, wenn Prostaglandine, die COX-2 abhängig gebildet werden, eine verstärkende Wirkung auf die COX-2 Expression besitzen. Bei einer Inhibition der COX-2 und der damit verbundenen verminderten Prostaglandinbildung würde es dann über einen Rückkopplungsmechanismus zu der beobachteten Verringerung der COX-2 Expression kommen. Zur näheren Untersuchung dieses Zusammenhanges wurde in später folgenden Versuchen an kultivierten Mesangialzellen die Wirkung von Prostaglandinen auf die COX-2 Expression untersucht (siehe Kap 3.2).

3.1.4 Einfluß von Celecoxib auf die Prostaglandinausscheidung bei nephritischen Ratten

Da Celecoxib die Aktivität der COX-2 inhibiert und zudem – wie oben beschrieben – bei nephritischen Ratten die COX-2 Expression senkte, wurde untersucht, ob sich dies auf der Ebene der gebildeten Produkte nachvollziehen ließ. Bei diesem Experiment wurde überprüft, ob bei Ratten mit PHN die Ausscheidung von stabilen Prostaglandinmetaboliten mit dem Urin als Indikator für die Cyclooxygenaseaktivität durch Behandlung mit dem selektiven COX-2 Inhibitor Celecoxib beeinflusst wurde (Abb. 18).

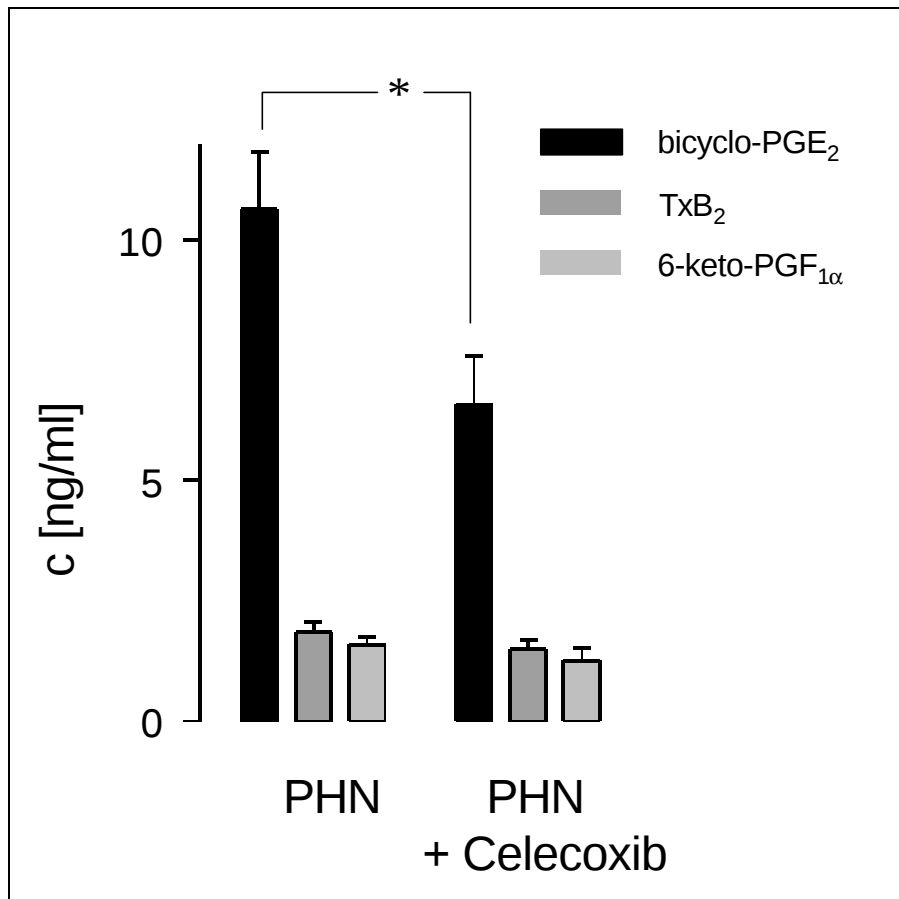


Abb. 18: Ausscheidung von stabilen Prostaglandinmetaboliten in Ratten mit PHN ohne und mit Behandlung von 5 mg/kg/d Celecoxib. Bestimmt wurden bicyclo-PGE₂ (PGE₂ Index-Metabolit), TxB₂ (TxA₂ Index-Metabolit) und 6-keto-PGF_{1α} (PGI₂ Index-Metabolit) im 24 h Sammelurin am Tag 27 durch RIA. Daten sind Mittelwerte $\pm$ SEM (* $p < 0.05$, n. s. für die Unterschiede der übrigen Metabolite).

Die Ausscheidung von bicyclo-PGE₂, dem stabilen PGE₂ Metaboliten, konnte durch Gabe von Celecoxib bei kranken Tieren auf eine Konzentration unterhalb des physiologischen Niveaus (vgl. Abb. 15) verringert werden. Keine Veränderungen zeigten sich in der Ausscheidung von 6-keto-PGF_{1α}. Daraus ergibt sich, daß der Großteil des PGE₂ bei kranken Tieren COX-2 abhängig gebildet wurde.

3.1.5 Einfluß von Celecoxib auf die physiologische COX-2 Expression

Um zu überprüfen, ob endogene, COX-2 abhängig gebildete Prostaglandine in vivo, im physiologischen Zustand, einen Einfluß auf die COX-2 Expression ausüben, wurden gesunde Ratten mit Celecoxib bzw. Plazebo behandelt und anschließend die renale COX-2 Expression auf der mRNA und auf der Proteinebene bestimmt. Selektive Inhibition der COX-2 durch Celecoxib beeinflusste die physiologische COX-2 mRNA Expression im renalen Cortex von Ratten nicht (Abb. 19).

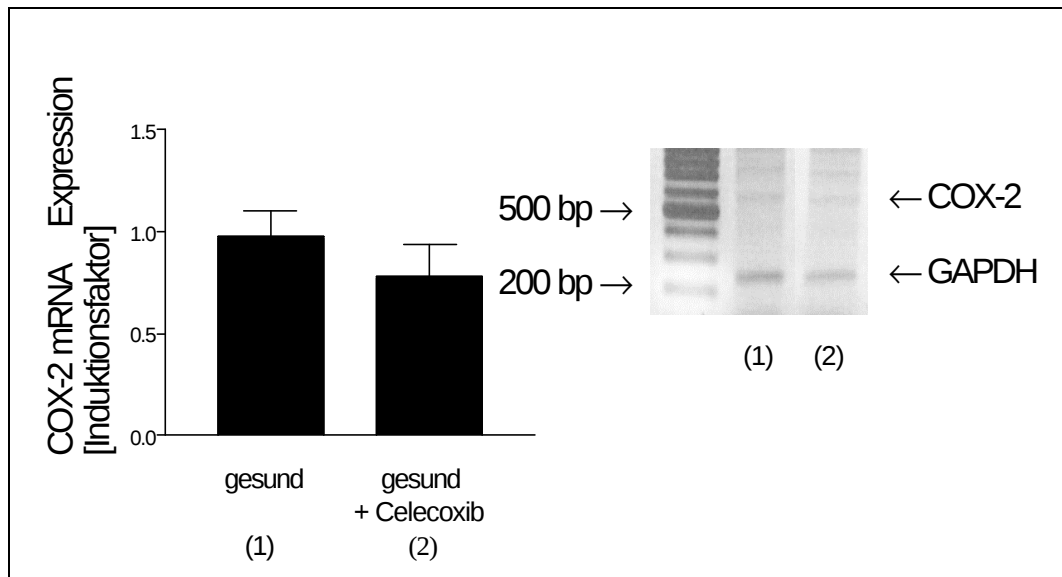


Abb. 19: mRNA Expression der COX-2 im renalen Cortex gesunder Ratten ohne und mit Behandlung vom 5 mg/kg/d Celecoxib. Rechts: repräsentatives RT-PCR Gel. Links: Densitometrische Auswertung von n=8 Tieren dargestellt als Mittelwerte $\pm$ SEM (n. s. für die Unterschiede gesund gegen gesund+Celecoxib).

Ebenso blieb auch die physiologische COX-2 Protein Expression in den isolierten Glomeruli durch selektive Inhibition der COX-2 mit Celecoxib unbeeinflusst. Es zeigte sich in der Tendenz ein Anstieg, dieser erreichte jedoch keine statistische Signifikanz (Abb. 20).

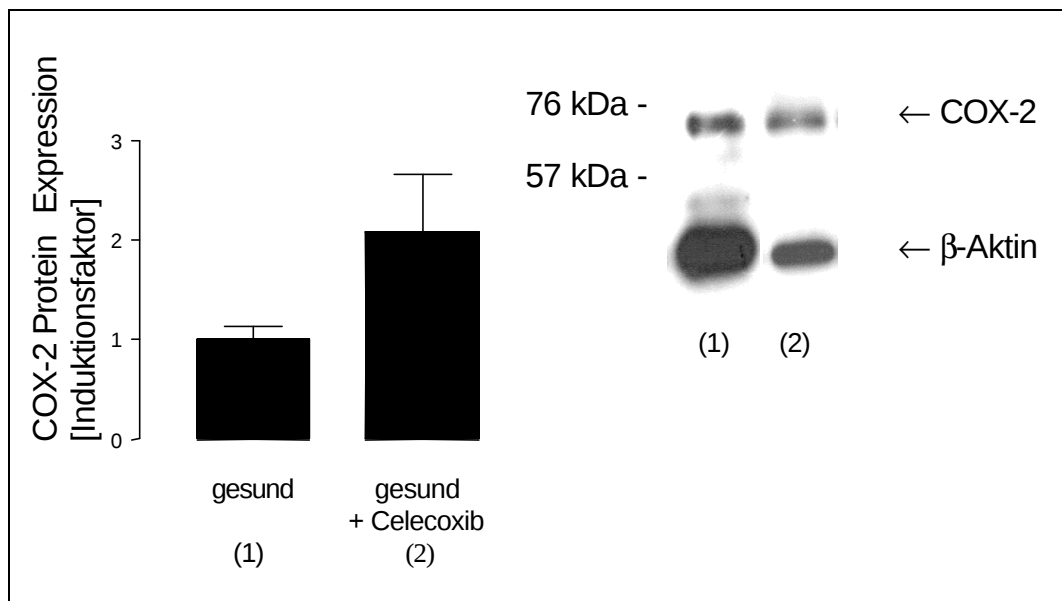


Abb. 20: Protein Expression der COX-2 in isolierten Glomeruli gesunder Ratten ohne und mit Behandlung vom 5 mg/kg/d Celecoxib. Rechts: repräsentativer Western Blot. Links: Densitometrische Auswertung von n=8 Tieren dargestellt als Mittelwerte $\pm$ SEM (n. s. für die Unterschiede gesund gegen gesund+Celecoxib).

Die Untersuchungen an der Niere gesunder Tiere zeigten eine physiologische COX-2 Expression, deren Aktivität durch die folgenden Prostaglandinmessungen im Urin untersucht wurde.

3.1.6 Einfluß von Celecoxib auf die Prostaglandinausscheidung bei gesunden Ratten

Um auch bei gesunden Ratten zu überprüfen, ob die Ergebnisse zur Expression COX-2 mit der Cyclooxygenaseaktivität korrelieren, wurden bei diesen Tieren Messungen der Prostaglandinausscheidung mit dem Urin vorgenommen.

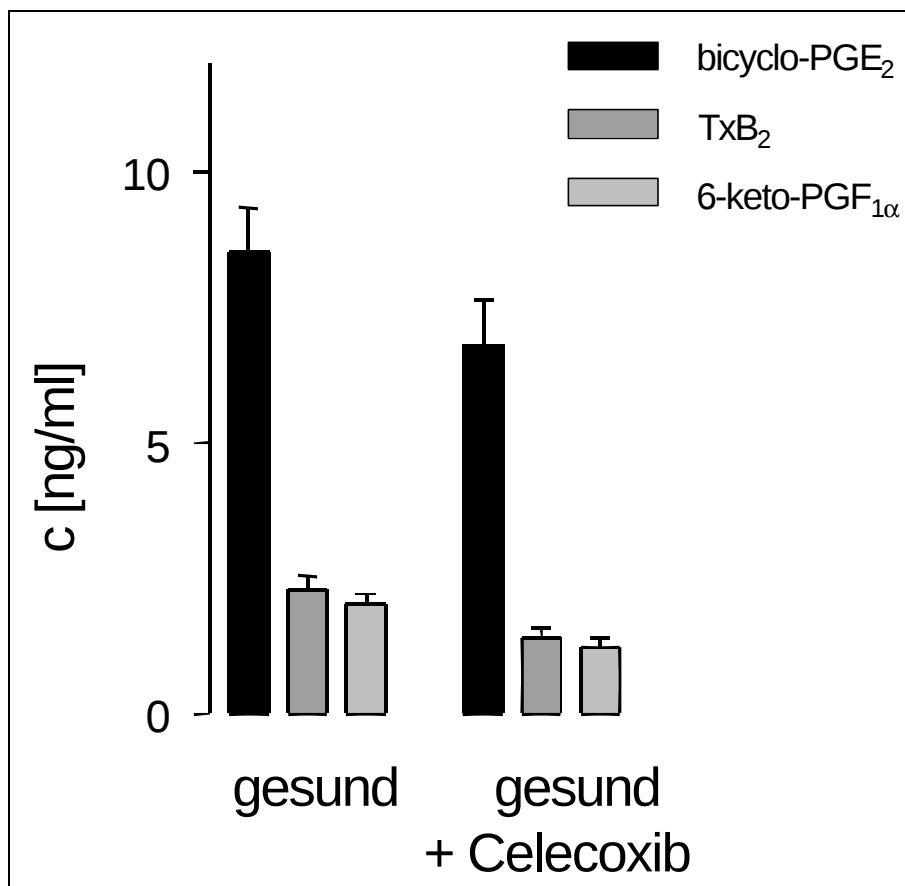


Abb. 21: Ausscheidung von stabilen Prostaglandinmetaboliten. Bestimmt wurden bicyclo-PGE₂ (PGE₂ Index-Metabolit), TxB₂ (TxA₂ Index-Metabolit) und 6-keto-PGF_{1α} (PGI₂ Index-Metabolit) im 24 h Sammelurin am Tag 27 durch RIA. Daten sind Mittelwerte $\bar{x}$ von $n=12$ Tieren $\pm$ SEM (n. s. für die jeweiligen Unterschiede gesund gegen gesund+Celecoxib).

Im 24 h Urin von Ratten, die 27 d mit 5 mg/kg/d Celecoxib oder Placebo behandelt wurden, wurden die stabilen Index-Metabolite von PGE₂, PGI₂ und TxA₂ (bicyclo-PGE₂, 6-keto-PGF_{1α} und TxB₂) durch Radioimmunoassay bestimmt (Abb. 21). Bicyclo-PGE₂ war der vorherrschende Metabolit im Urin, dessen Bildung durch

selektive Inhibition der COX-2 nicht signifikant verringert werden konnte. Für die Ausscheidung der stabilen Metabolite von TxA_2 und PGI_2 konnte kein Einfluß von Celecoxib festgestellt werden.

3.2 Regulation der COX-2 Expression in kultivierten Zellen des Mesangiums

Die im Tiermodell zur Bedeutung der COX-2 bei renaler Inflammation durchgeführten Untersuchungen wurden auf zellulärer Ebene vertiefend fortgeführt. Um zu überprüfen, ob sich kultivierte Mesangialzellen als Modell dazu eigneten, wurde untersucht, ob die COX-2 in diesem System exprimiert wurde und ob sich ihre Expression durch inflammatorische Stimuli steigern ließ.

Einfluß von LPS

Konfluent gewachsene Mesangialzellen wurden 24 h vor Versuchsbeginn unter Entzug von foetalem Kälberserum (FCS) gehalten ("gehungert") und anschließend durch Zugabe von Lipopolysaccharid (LPS) als inflammatorischer Reiz stimuliert. Danach wurde zu verschiedenen Zeitpunkten die COX-2 mRNA Expression durch RT-PCR bestimmt (Abb. 22).

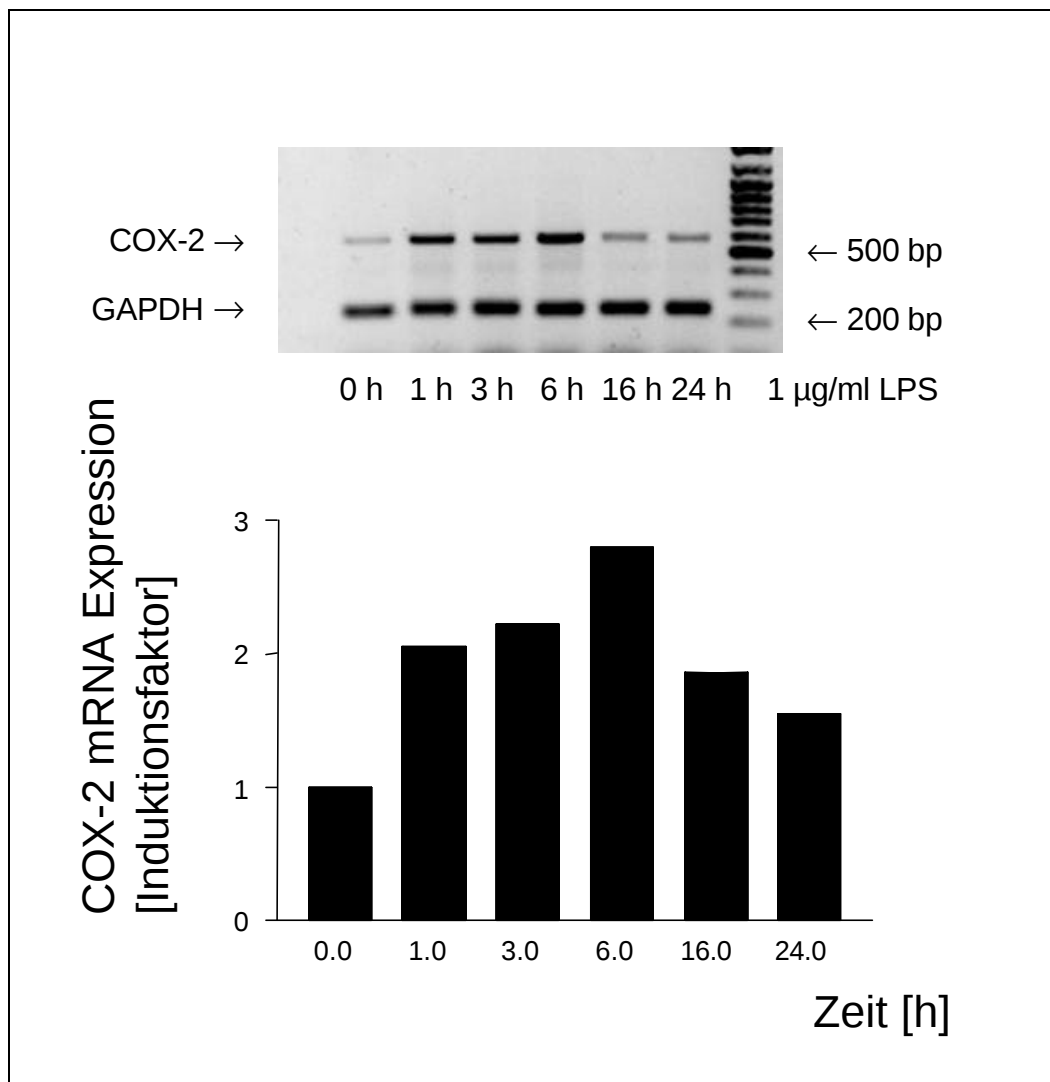


Abb. 22: mRNA Expression der COX-2 in konfluenten Mesangialzellen, 24 h gehungert. Dargestellt ist der Zeitverlauf der Stimulation durch 1 µg/ml LPS. Oben: repräsentatives RT-PCR Gel. Unten: Densitometrische Auswertung von n=3 Experimenten dargestellt als Mittelwerte x.

Durch Gabe von LPS ließ sich die COX-2 mRNA transient mit einem Maximum bei 6 h induzieren. Somit besitzen stimulierte Mesangialzellen wie Ratten mit PHN eine gesteigerte COX-2 Expression. Es wurden daher in diesem System Untersuchungen zur Funktion der COX-2 vorgenommen. Für den physiologischen Zustand – den gesunden Tieren entsprechend – wurden unstimulierte Zellen verwendet.

Einfluß von PGE₂

Die bei Ratten mit PHN beobachtete supprimierende Wirkung von Celecoxib auf die Expression der COX-2 beruhte möglicherweise auf einer verminderten Bildung von PGE₂, da eine gleichzeitige verringerte Ausscheidung von bicyclo-PGE₂ nachgewiesen werden konnte. Demnach müßte PGE₂ einen verstärkenden Effekt auf

die Expression der COX-2 ausüben. Zur Bestimmung des Einflusses von PGE_2 auf die mRNA Expression der COX-2 wurden Mesangialzellen mit PGE_2 stimuliert und anschließend die COX-2 mRNA Expression durch RT-PCR bestimmt (Abb. 23).

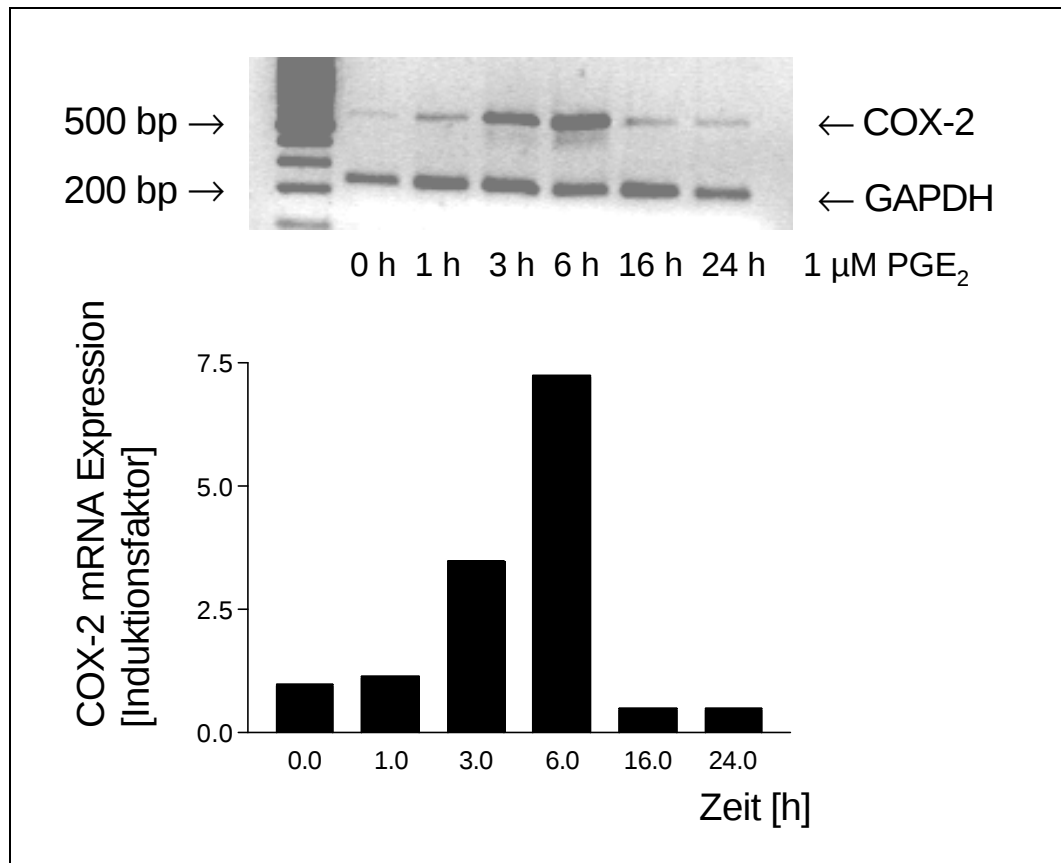


Abb. 23: mRNA Expression der COX-2 in konfluenten Mesangialzellen, 24 h gehungert. Dargestellt ist der Zeitverlauf der Stimulation durch $1 \mu\text{M}$ PGE_2 . Oben: repräsentatives RT-PCR Gel. Unten: Densitometrische Auswertung von $n=3$ Experimenten dargestellt als Mittelwerte $\pm$.

PGE_2 stimulierte die COX-2 mRNA Expression in kultivierten Zellen des Mesangiums mit einem Maximum bei 6 h (Abb. 23). Damit zeigte sich eine verstärkende Wirkung von PGE_2 auf die Expression der COX-2.

3.3 Expression von Prostaglandinrezeptoren in der Niere und deren Beeinflussung durch Celecoxib

Im Urin gesunder und nephritischer Ratten konnten die stabilen Metabolite von PGE_2 , PGI_2 und TxA_2 nachgewiesen werden. Durch weitergehende Untersuchungen an den Nieren gesunder Ratten wurde geprüft, ob die entsprechenden Rezeptoren dort exprimiert wurden und somit in diesem Modell die Prostaglandinwirkungen übermitteln konnten. Von den verschiedenen E-Prostanoid (EP) Rezeptoren für PGE_2 wurde exemplarisch die Expression der Subtypen EP_2 , EP_3 und EP_4 bestimmt. Die Expression des EP_1 Rezeptors wurde nicht untersucht, da aus der Literatur bekannt war, daß dieser hauptsächlich in den Sammelrohren exprimiert wird und damit bei Glomerulonephritis vermutlich keine Rolle spielt. Weiterhin wurde die Expression des für PGI_2 spezifischen I-Prostanoid (IP) Rezeptors und des für TxA_2 spezifischen T-Prostanoid (TP) Rezeptors untersucht. Dafür wurde aus dem Cortex von gesunden Ratten ohne und mit Celecoxibbehandlung sowie von Ratten mit PHN ohne und mit Celecoxibbehandlung die mRNA isoliert und mittels RT-PCR die Expression der einzelnen Rezeptoren bestimmt.

3.3.1 Expression von Prostaglandinrezeptoren in der Niere nephritischer Ratten

Neben einer meist gesteigerten Bildung von Prostaglandinen bei Inflammation kann ihre Wirkung auch über eine veränderte Expression der entsprechenden Rezeptoren moduliert werden. Im Folgenden wurde geprüft, ob und welche Rezeptoren bei kranken Ratten verändert exprimiert werden und so möglicherweise eine Rolle in der Übermittlung inflammatorischer Reize durch Prostaglandine in diesem Modell spielen.

Expression von verschiedenen Rezeptorsubtypen für PGE_2 bei Ratten mit PHN

Die hier untersuchten Rezeptoren für PGE_2 wurden sämtlich im renalen Cortex gesunder Ratten exprimiert. Es zeigte sich bei Ratten mit PHN keine Änderung in der mRNA Expression des EP_2 und des EP_4 Rezeptors gegenüber gesunden Tieren (Abb. 24). Im Vergleich dazu kam es bei nephritischen Ratten zu einem signifikanten Anstieg in der Expression der mRNA des EP_3 Rezeptors im renalen Cortex (Abb. 24). Dies spricht für einen verstärkten Einfluß der durch den EP_3 Rezeptor

induzierten Signalwege bei der Übermittlung von Wirkungen von PGE_2 bei Ratten mit PHN.

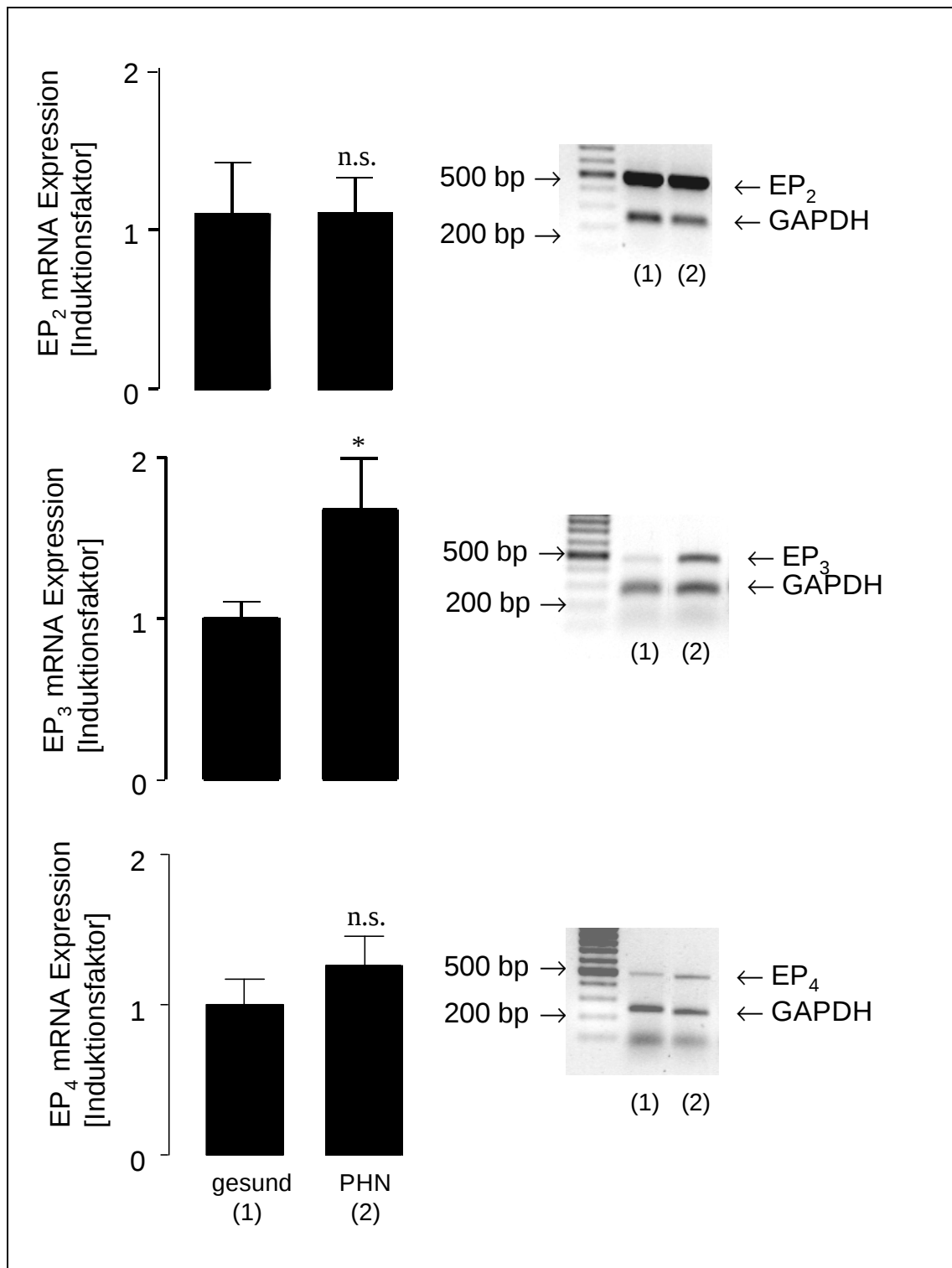


Abb. 24: mRNA Expression von EP Rezeptoren im renalen Cortex gesunder Ratten und Ratten mit PHN. Rechts: repräsentatives RT-PCR Gel. Links: Densitometrische Auswertung von $n=8$ Tieren dargestellt als Mittelwerte $\bar{x} \pm \text{SEM}$ (* $p < 0.05$ gegen gesunde Tiere; n.s. gegen gesunde Tiere).

Expression des IP Rezeptors bei Ratten mit PHN

Die Expression des für PGI_2 spezifischen IP Rezeptors wurde im renalen Cortex von gesunden Ratten und Ratten mit PHN auf der mRNA Ebene bestimmt. Dabei fanden sich keine Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen. Es zeigte sich in der Tendenz zwar ein leichter Anstieg, dieser erreichte jedoch keine statistische Signifikanz (Abb. 25).

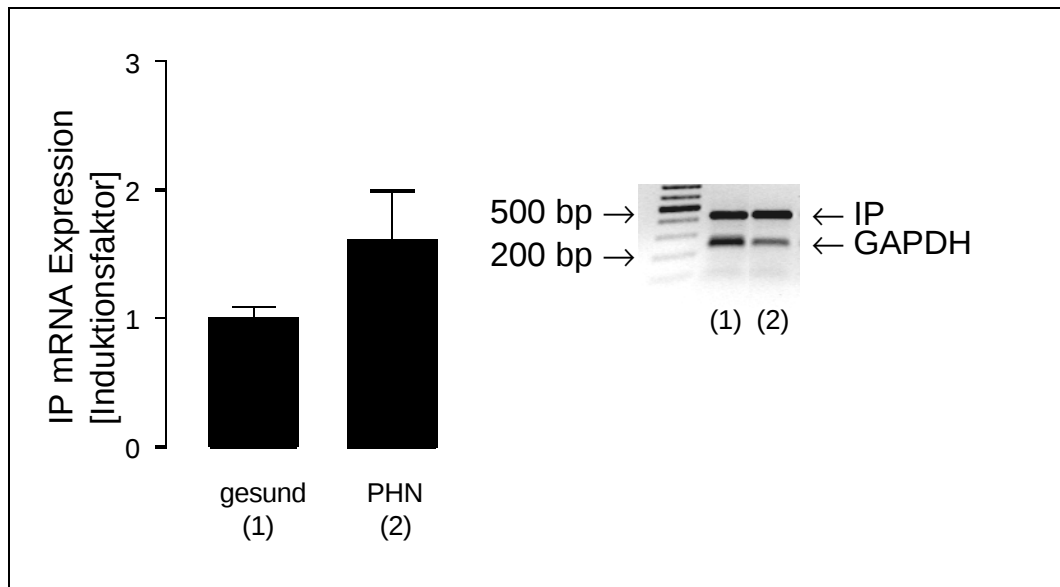


Abb. 25: mRNA Expression des IP Rezeptors im renalen Cortex gesunder Ratten und Ratten mit PHN. Rechts: repräsentatives RT-PCR Gel. Links: Densitometrische Auswertung von $n=8$ Tieren dargestellt als Mittelwerte $\bar{x} \pm \text{SEM}$ (n. s. für den Unterschied PHN gegen gesund).

Expression des TP Rezeptors bei Ratten mit PHN

Zur Bestimmung der Expression des für Thromboxan spezifischen TP Rezeptors wurde von gesunden und nephritischen Ratten die mRNA aus dem Cortex isoliert und durch RT-PCR untersucht. Ähnlich der Expression des IP Rezeptors zeigte sich auch bei der mRNA Expression des TP Rezeptors für TxA_2 im Cortex bei Ratten mit PHN keine signifikante Veränderung im Vergleich zu gesunden Tieren (Abb. 26). Somit ergaben sich von den untersuchten Rezeptoren lediglich bei der Expression des EP_3 Rezeptors Unterschiede zwischen gesunden und nephritischen Ratten.

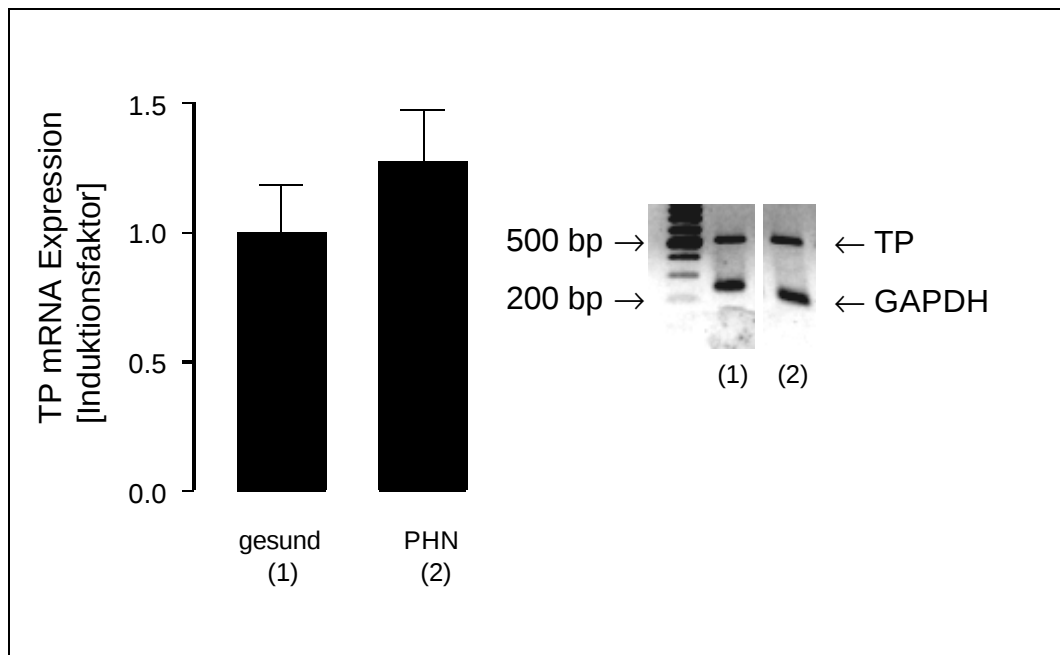


Abb. 26: mRNA Expression des TP Rezeptors im renalen Cortex gesunder Ratten und Ratten mit PHN. Rechts: repräsentatives RT-PCR Gel. Links: Densitometrische Auswertung von $n=8$ Tieren dargestellt als Mittelwerte $\bar{x} \pm \text{SEM}$ (n. s. für den Unterschied PHN gegen gesund).

3.3.2 Einfluß von Celecoxib auf die Expression von Prostaglandinrezeptoren bei Ratten mit PHN

Da Prostaglandine ihre Wirkungen über spezifische Rezeptoren vermitteln, übt eine veränderte Expression dieser Rezeptoren einen großen Einfluß auf die Stärke der Prostaglandinwirkungen aus. Im Folgenden wurde untersucht, ob Celecoxib die Expression von Prostaglandinrezeptoren, von denen die Expression des EP_3 Rezeptors bei kranken Tieren erhöht war, senkte, um so auch auf dieser Ebene die Aktivität des Prostaglandinsystems zu antagonisieren. Die vorangegangenen Untersuchungen zeigten eine supprimierende Wirkung von Celecoxib auf die Expression der COX-2 und damit auf der Ebene der an der Prostaglandinsynthese beteiligten Enzyme sowie auf die Prostaglandinausscheidung und damit auf der Ebene der gebildeten Produkte. Um den Einfluß von Celecoxib auch auf der Ebene der Prostaglandinrezeptoren zu untersuchen, wurden Ratten mit PHN mit Celecoxib behandelt und die corticale mRNA Expression der verschiedenen Prostaglandinrezeptoren mit der bei unbehandelten Ratten verglichen.

Einfluß von Celecoxib auf die pathologische Expression von EP Rezeptoren

Hierzu wurde die Wirkung von Celecoxib auf die Expression der PGE₂ Rezeptorsubtypen EP₂, EP₃ und EP₄ bei Tieren mit PHN untersucht. Es zeigte sich dabei eine signifikante Verringerung der corticalen mRNA Expression des EP₃ und des EP₄ Rezeptors durch Inhibition der COX-2 (Abb. 27). Die Regulation der mRNA Expression des EP₂ Rezeptors gab in der Tendenz ein ähnliches Bild, die Verringerung seiner Expression bei Tieren mit PHN durch Celecoxib erreichte jedoch nicht statistische Signifikanz (Abb. 27). Somit wirkte Celecoxib supprimierend auf die Expression der PGE₂ Rezeptoren EP₃ und EP₄ im Cortex von nephritischen Ratten.

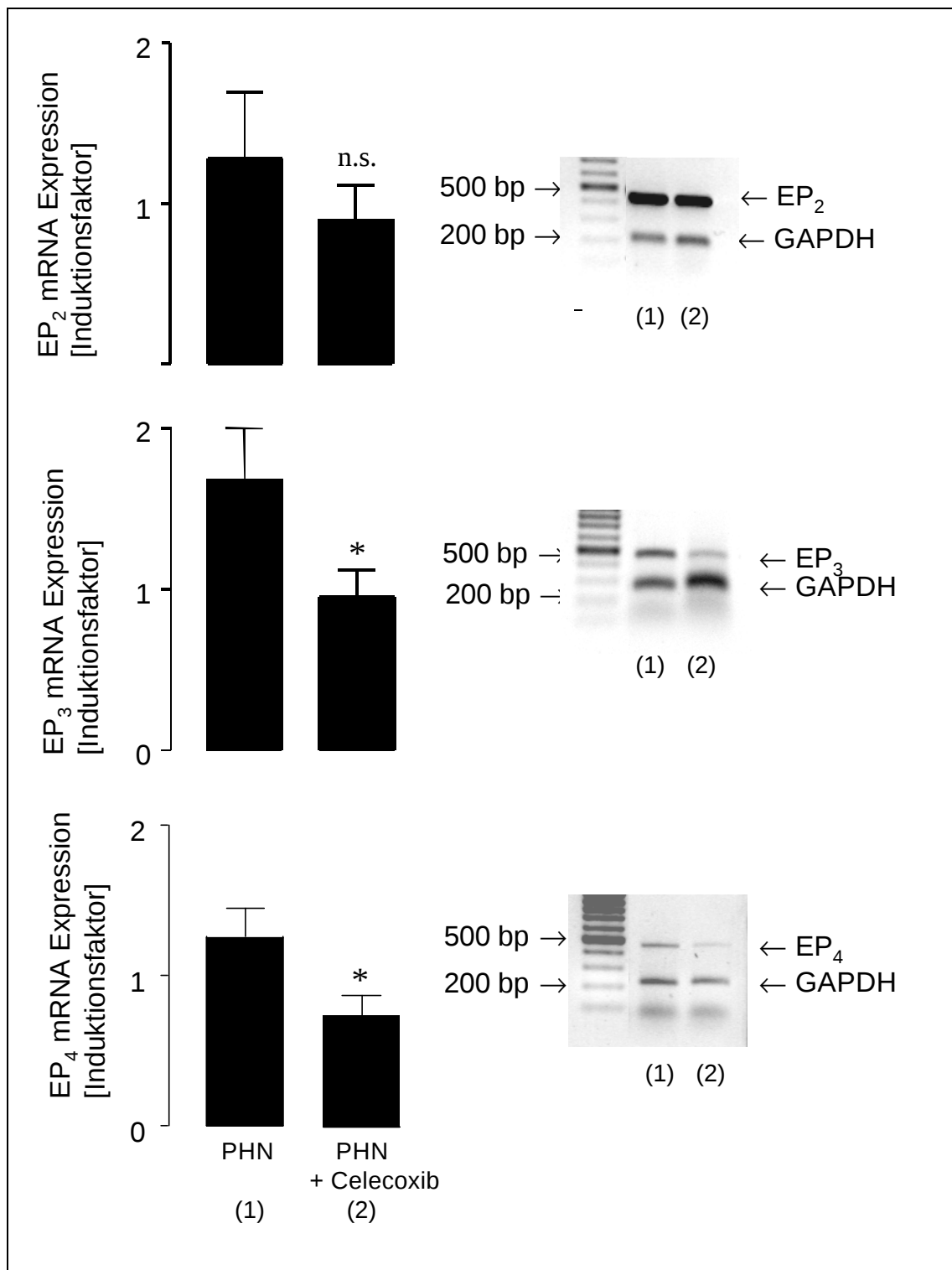


Abb. 27: mRNA Expression des EP₄ Rezeptors im renalen Cortex von Ratten mit PHN ohne und mit Behandlung von 5 mg/kg/d Celecoxib. Rechts: repräsentatives RT-PCR Gel. Links: Densitometrische Auswertung von n=8 Tieren dargestellt als Mittelwerte $\bar{x} \pm \text{SEM}$ (* $p < 0.05$, n. s. jeweils gegen gesunde Tiere).

Einfluß von Celecoxib auf die pathologische Expression des IP Rezeptors

Um den Einfluß von Celecoxib auf die Expression des IP Rezeptors zu untersuchen, wurde dessen mRNA Expression im Cortex von Ratten mit PHN und Celecoxibbehandlung bestimmt und mit der von unbehandelten Ratten verglichen. Im Gegensatz zu seiner supprimierenden Wirkung auf die Expression verschiedener EP Rezeptoren zeigte Celecoxib keinen Einfluß auf die mRNA Expression des IP Rezeptors bei nephritischen Ratten (Abb. 28).

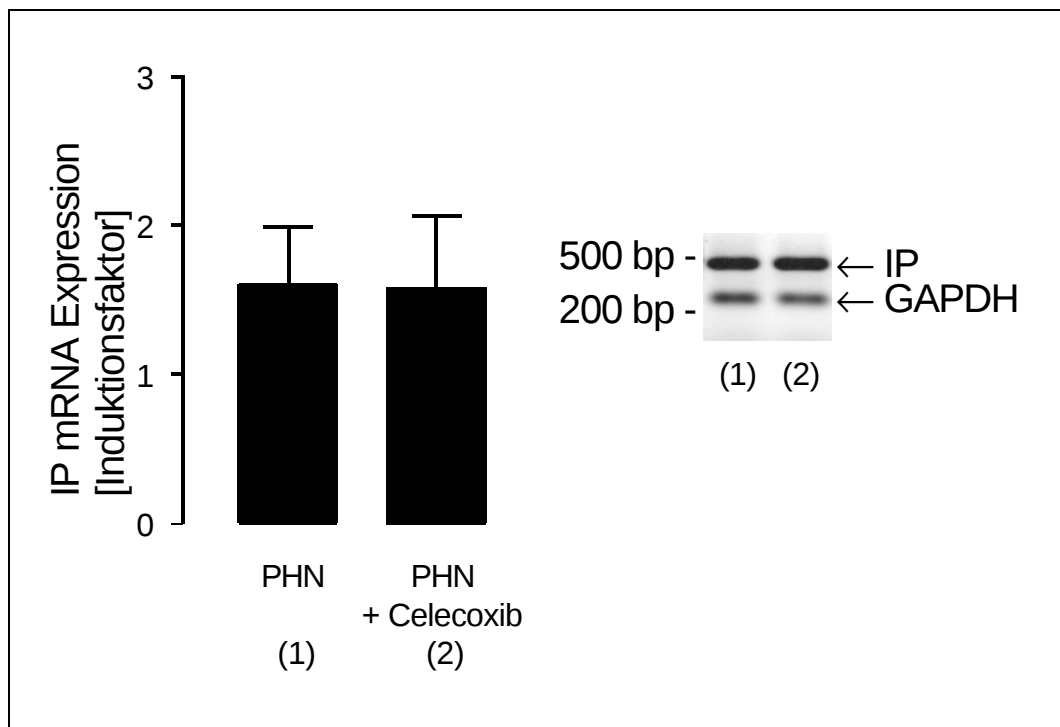


Abb. 28: mRNA Expression des IP Rezeptors im renalen Cortex von Ratten mit PHN ohne und mit Behandlung von 5 mg/kg/d Celecoxib. Rechts: repräsentatives RT-PCR Gel. Links: Densitometrische Auswertung von n=8 Tieren dargestellt als Mittelwerte $\pm$ SEM (n. s. für den Unterschied PHN+Celecoxib gegen PHN).

Einfluß von Celecoxib auf die pathologische Expression des TP Rezeptors

Zur Bestimmung des Einflusses von Celecoxib auf die Expression des TP Rezeptors bei Ratten mit PHN wurde analog vorgegangen. Ebenso wie die Expression des IP Rezeptors ließ sich die mRNA Expression des TP Rezeptors im Cortex von nephritischen Ratten durch Celecoxib nicht beeinflussen (Abb. 29). Somit blieb eine Inhibition der COX-2 ohne Wirkung auf die Expression des TP Rezeptors.

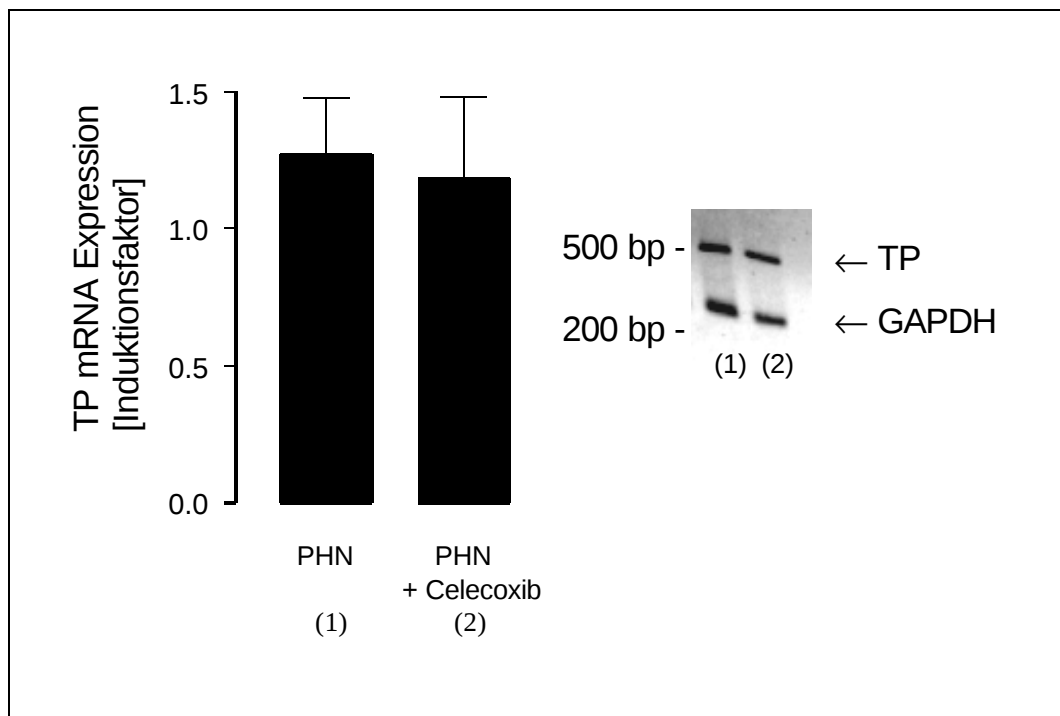


Abb. 29: mRNA Expression des TP Rezeptors im renalen Cortex von Ratten mit PHN ohne und mit Behandlung von 5 mg/kg/d Celecoxib. Rechts: repräsentatives RT-PCR Gel. Links: Densitometrische Auswertung von n=8 Tieren dargestellt als Mittelwerte $\pm$ SEM (n. s. für den Unterschied PHN+Celecoxib gegen PHN).

3.3.3 Einfluß von Celecoxib auf die Expression von Prostaglandinrezeptoren bei gesunden Ratten

Die bisherigen Untersuchungen zur Expression von Prostaglandinrezeptoren in der Rattenniere zeigten, daß durch Inhibition der COX-2 im inflammatorischen Zustand, d. h. bei einem aktivierten Prostaglandinsystem, die Expression von Prostaglandinrezeptoren verringert werden kann. Im Folgenden wurde untersucht, ob sich eine COX-2 Inhibition durch Celecoxib auch im physiologischen Zustand, bei einem geringeren Prostaglandinspiegel, auf die Expression von Prostaglandinrezeptoren auswirkt.

Einfluß von Celecoxib auf die physiologische Expression von EP Rezeptoren

Wie in den vorangegangenen Untersuchungen wurde die mRNA Expression des EP₂, des EP₃ und des EP₄ Rezeptors für PGE₂ im Cortex durch RT-PCR bestimmt. Es wurde die Expression bei gesunden Ratten mit der von gesunden Ratten, die mit Celecoxib behandelt wurden, verglichen. Dabei konnte für keinen dieser EP Rezeptoren ein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen festgestellt werden (Abb. 30).

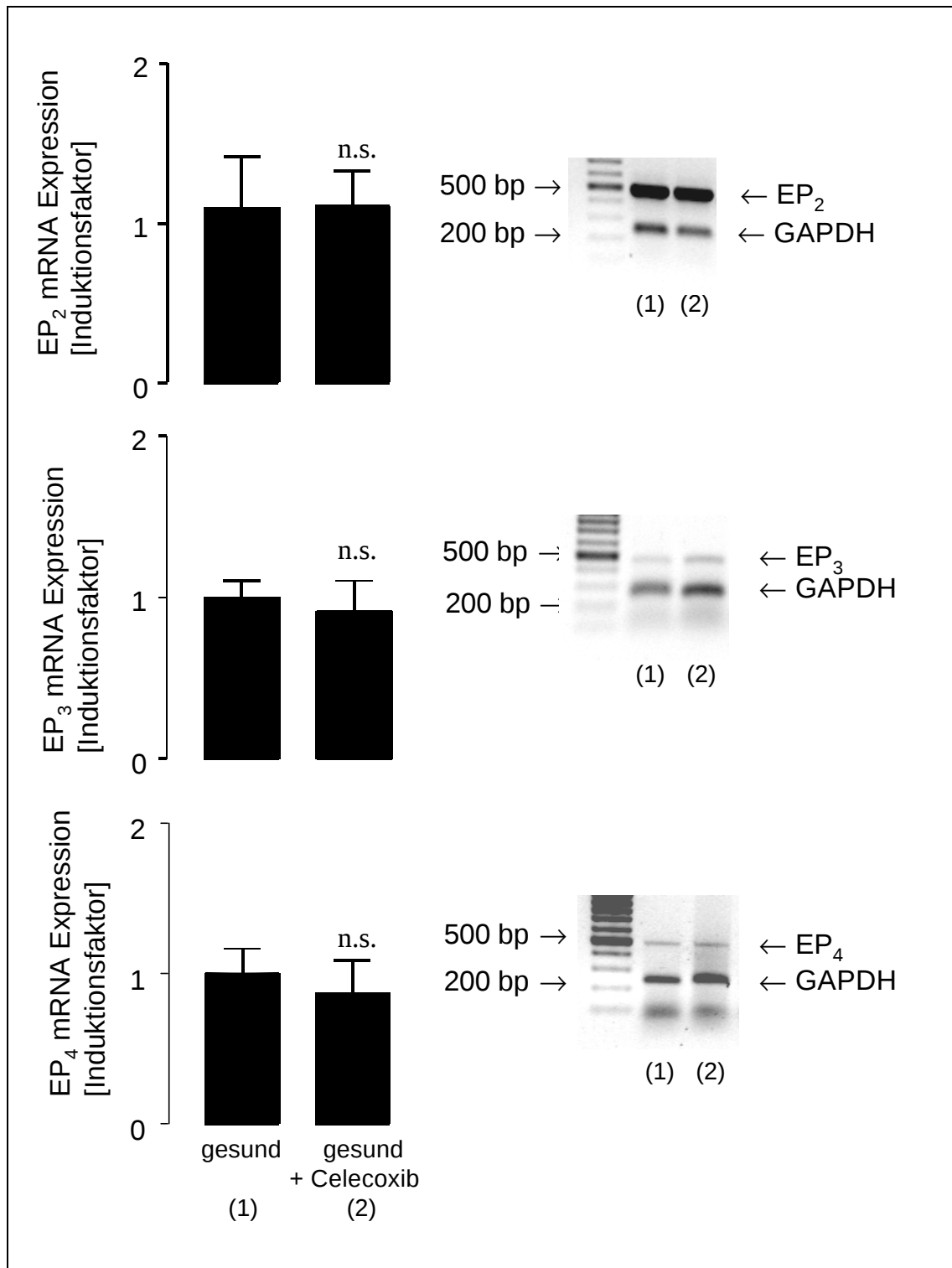


Abb. 30: mRNA Expression des EP₃ Rezeptors im renalen Cortex gesunder Ratten ohne und mit Behandlung vom 5 mg/kg/d Celecoxib. Rechts: repräsentatives RT-PCR Gel. Links: Densitometrische Auswertung von n=8 Tieren dargestellt als Mittelwerte $\bar{x} \pm \text{SEM}$ (n. s. jeweils gegen gesunde Tiere).

Einfluß von Celecoxib auf die physiologische Expression des IP Rezeptors

Entsprechend der für kranke Tiere beschriebenen Vorgehensweise wurde bei gesunden Tieren der Einfluß von Celecoxib auf die Expression des IP Rezeptors bestimmt. Wie auch bei Ratten mit PHN zeigte sich bei gesunden Tieren ebenfalls kein Einfluß einer COX-2 Inhibition durch Celecoxib auf die mRNA Expression des IP Rezeptors im Cortex (Abb. 31).

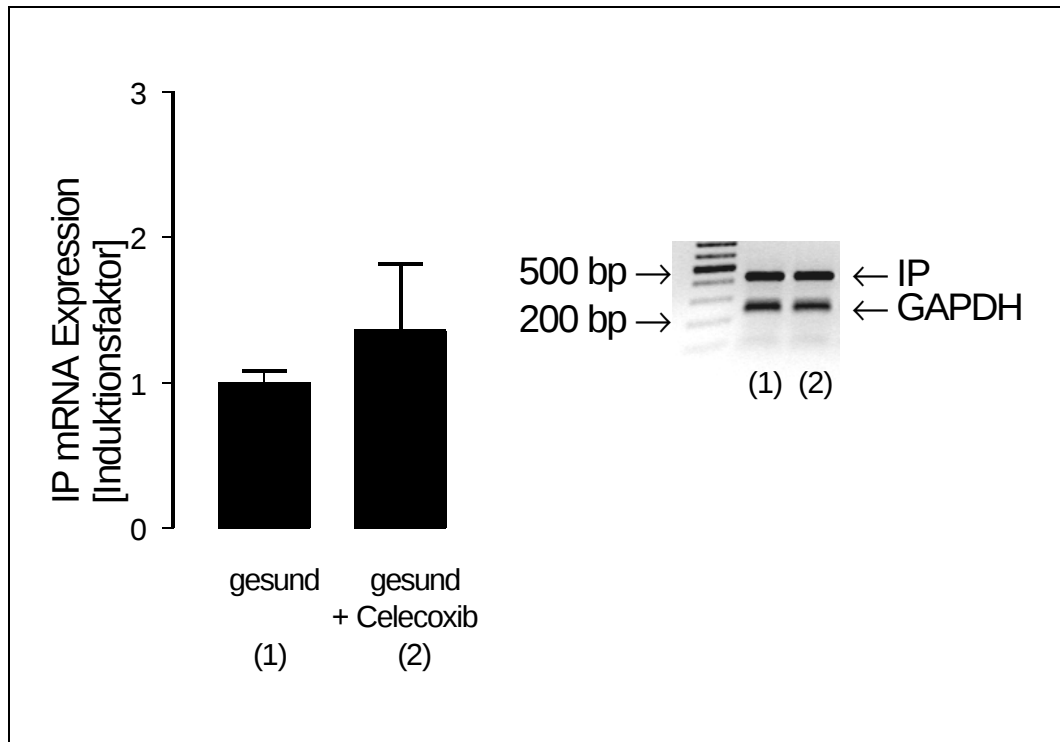


Abb. 31: mRNA Expression des IP Rezeptors im renalen Cortex gesunder Ratten ohne und mit Behandlung vom 5 mg/kg/d Celecoxib. Rechts: repräsentatives RT-PCR Gel. Links: Densitometrische Auswertung von n=8 Tieren dargestellt als Mittelwerte $\pm$ SEM (n. s. für den Unterschied gesund+Celecoxib gegen gesund).

Einfluß von Celecoxib auf die physiologische Expression des TP Rezeptors

Auch bei der Expression des TP Rezeptors ergaben sich keine Veränderungen zwischen gesunden Tieren und gesunden mit Celecoxib behandelten Tieren (Abb. 32).

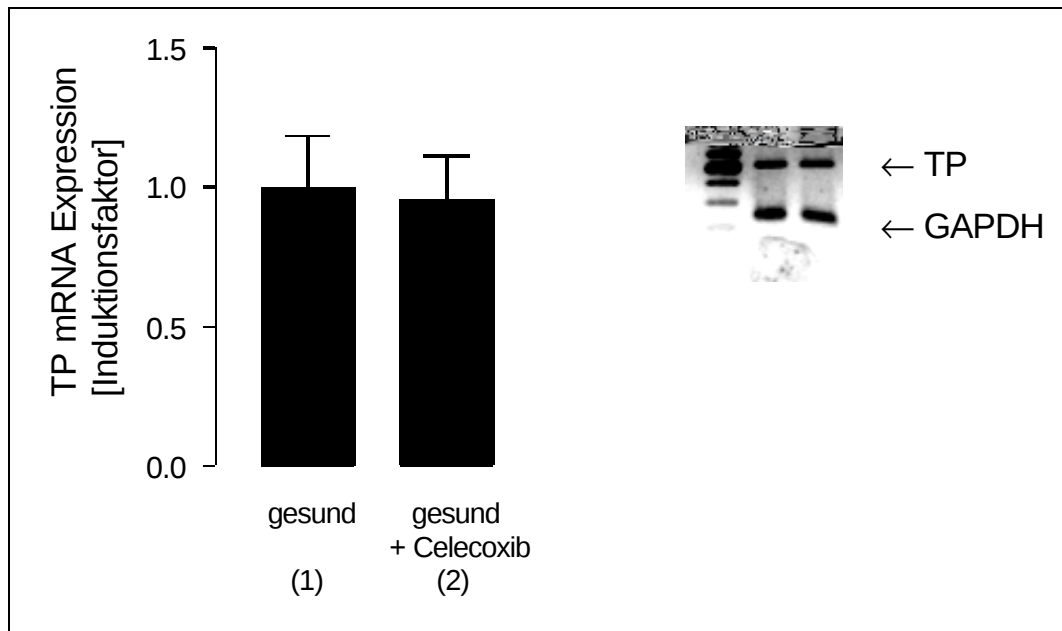


Abb. 32: mRNA Expression des TP Rezeptors im renalen Cortex gesunder Ratten ohne und mit Behandlung vom 5 mg/kg/d Celecoxib. Rechts: repräsentatives RT-PCR Gel. Links: Densitometrische Auswertung von n=8 Tieren dargestellt als Mittelwerte $\pm$ SEM (n. s. für den Unterschied gesund+Celecoxib gegen gesund).

3.3.4 Zusammenfassung: Expression von Prostaglandinrezeptoren bei Ratten

Um festzustellen, welche Prostaglandinrezeptoren bei renaler Inflammation möglicherweise eine dominierende Rolle spielen, wurde durch Vergleich ihrer Expression bei gesunden Ratten und bei Ratten mit PHN untersucht, ob renale Rezeptoren im inflammatorischen Zustand verstärkt exprimiert wurden. Untersucht wurde die Expression der EP₂, EP₃ und EP₄ Rezeptoren für PGE₂ sowie des IP Rezeptors für Prostazyklin und des TP Rezeptors für Thromboxan. Es kam einzig beim EP₃ Rezeptor zu einer verstärkten mRNA Expression im renalen Cortex nephritischer Ratten, was für eine besondere Rolle dieses Subtypes in der Übermittlung der Wirkungen von PGE₂ bei diesen Tieren spricht. Des weiteren wurde die Wirkung von Celecoxib auf die Expression dieser Rezeptoren sowohl bei gesunden als auch bei nephritischen Ratten untersucht, um zu klären, ob es neben der zuvor beobachteten Verminderung der PGE₂-Bildung und COX-2 Expression auch auf dieser Ebene zu einer Beeinflussung des Prostaglandinsystems kam. Es zeigte sich bei nephritischen Ratten eine Suppression der Expression des EP₃ und des EP₄ Rezeptors. Die Expression des IP und des TP Rezeptors blieben bei Ratten mit PHN unbeeinflusst. Bei gesunden Tieren kam es zu keiner Beeinflussung der Expression der untersuchten Prostaglandinrezeptoren durch Celecoxib.

Die Wirkung von Celecoxib auf die Expression des EP₃ und EP₄ Rezeptors ließ vermuten, daß durch Inhibition der COX-2 weniger Prostaglandine gebildet wurden, die verstärkend auf die Expression ihrer Rezeptoren wirken. Da durch Messungen der Prostaglandinausscheidung gezeigt wurde, daß hauptsächlich die Bildung von PGE₂ durch Celecoxib gehemmt wurde und es sich bei obigen Rezeptoren um Rezeptoren für PGE₂ handelt, lag die Vermutung nahe, daß PGE₂ die Genexpression seiner eigenen Rezeptoren verstärken könnte. Zur näheren Untersuchung dieses Zusammenhanges wurden Experimente an kultivierten Zellen des Mesangiums vorgenommen. Dabei wurde exemplarisch die Expression des EP₃ Rezeptors untersucht, da es sich bei diesem Subtyp, wie oben beschrieben, wahrscheinlich um den in diesem Modell im Zustand der Inflammation bedeutsamsten Prostaglandinrezeptor handelte.

3.4 Regulation der Expression des EP₃ Rezeptors in kultivierten Zellen des Mesangiums

Die Ergebnisse des Tierversuches zeigten eine vorrangige Bildung von PGE₂, dessen Wirkungen bei kranken Tieren vermutlich hauptsächlich über den EP₃ Rezeptor vermittelt wurden, da dieser Rezeptorsubtyp bei diesen Tieren hochreguliert war. Zur näheren Untersuchung der Funktion des EP₃ Rezeptors wurde das Modell der kultivierten Mesangialzellen verwendet, da hier leicht spezifische Rezeptoragonisten eingesetzt werden konnten. Zunächst wurde die Genregulation des EP₃ Rezeptors untersucht, um zu überprüfen, ob dieser in diesem Modell im inflammatorischen Zustand ebenfalls verstärkt exprimiert wurde.

Einfluß von LPS

Um zu überprüfen, ob der EP₃ Rezeptor in diesem System bei entzündlichen Vorgängen verändert exprimiert wird, wurden Mesangialzellen durch Zugabe von LPS als inflammatorischer Reiz stimuliert. Danach wurde zu verschiedenen Zeitpunkten die EP₃ mRNA Expression durch RT-PCR bestimmt (Abb. 33).

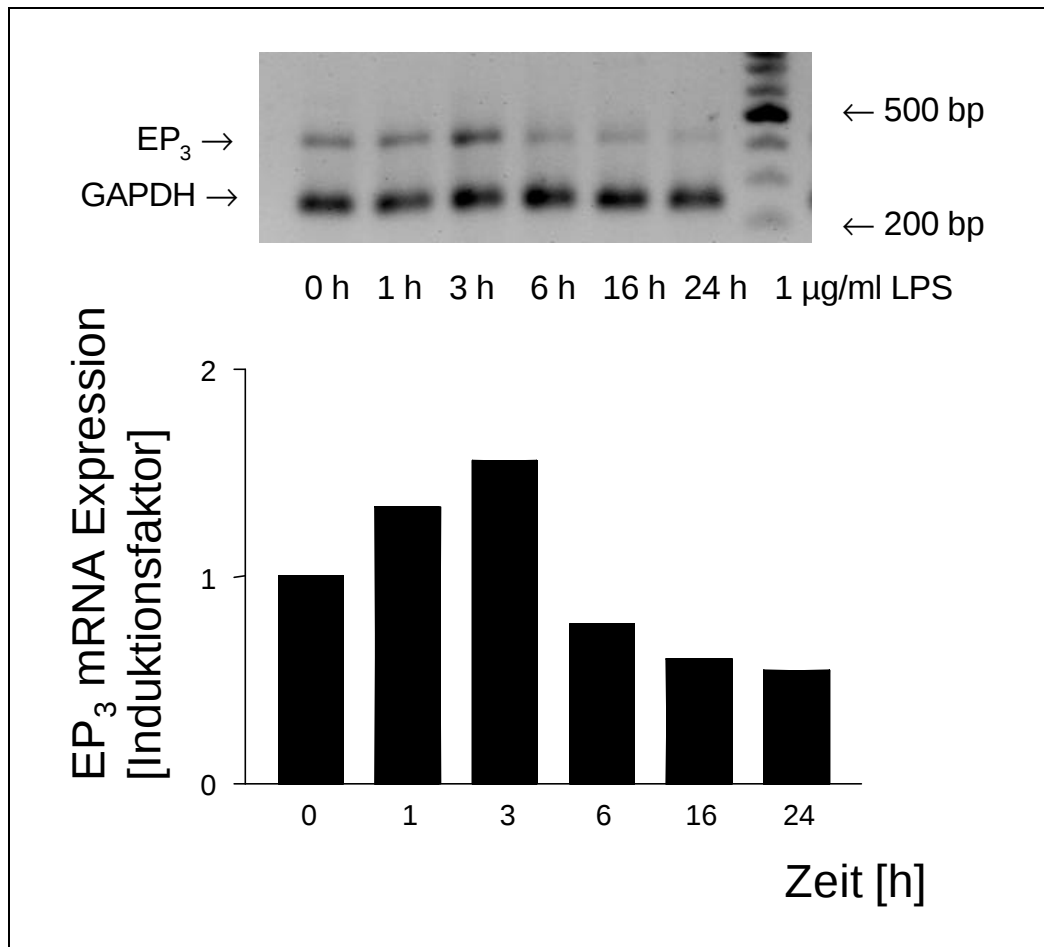


Abb. 33: mRNA Expression des EP₃ Rezeptors in konfluenten Mesangialzellen, 24 h gehungert. Dargestellt ist der Zeitverlauf der Stimulation durch 1 µg/ml LPS. Oben: repräsentatives RT-PCR Gel. Unten: Densitometrische Auswertung von n=3 Experimenten dargestellt als Mittelwerte x.

Durch Gabe von LPS ließ sich die EP₃ mRNA transient mit einem Maximum bei 3 h induzieren. Das bedeutet, daß in kultivierten Zellen des Mesangiums im inflammatorischen Zustand eine parallele Hochregulation der COX-2 (Kap. 3.2) und der EP₃-Rezeptor Expression stattfand.

Einfluß von PGE₂

Die bei Ratten mit PHN beobachtete supprimierende Wirkung von Celecoxib auf die Expression des EP₃ Rezeptors beruhte vermutlich auf einer verminderten Bildung von PGE₂, da eine gleichzeitige verringerte Ausscheidung von bicyclo-PGE₂ nachgewiesen werden konnte. Demnach müßte PGE₂ einen verstärkenden Effekt auf die Expression seines eigenen Rezeptors ausüben. Zur Bestimmung des Einflusses von PGE₂ auf die mRNA Expression des EP₃ Rezeptors wurden Mesangialzellen mit

PGE₂ stimuliert und anschließend die EP₃ mRNA Expression durch RT-PCR bestimmt (Abb. 34).

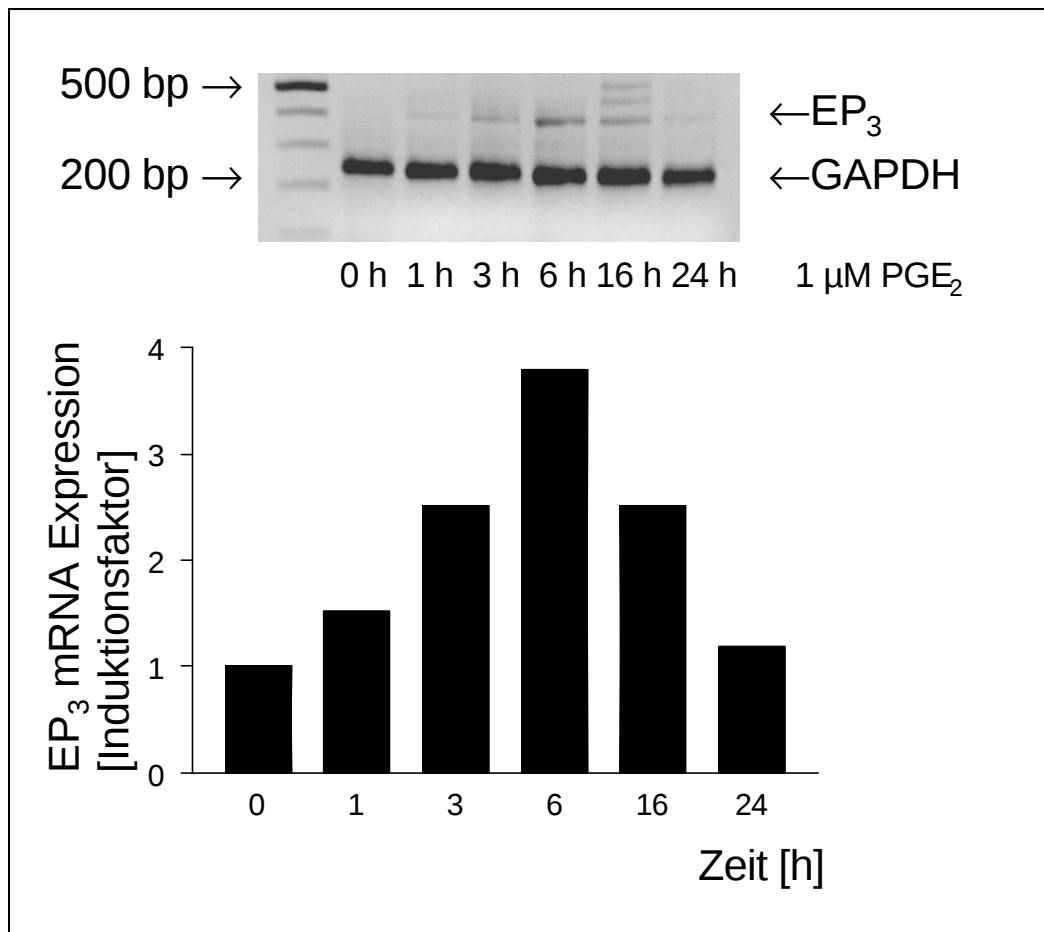


Abb. 34: mRNA Expression des EP₃ Rezeptors in konfluenten Mesangialzellen, 24 h gehungert. Dargestellt ist der Zeitverlauf der Stimulation durch 1 μM PGE₂. Oben: repräsentatives RT-PCR Gel. Unten: Densitometrische Auswertung von n=3 Experimenten dargestellt als Mittelwerte x.

Durch Gabe von PGE₂ ließ sich die EP₃ mRNA transient mit einem Maximum bei 6 h induzieren. Somit verstärkt PGE₂ sowohl die Expression der COX-2 (Kap. 3.2) und damit seine eigene Bildung, als auch die Expression seines Rezeptors und damit seine Wirkung in Mesangialzellen.

3.5 Expression von α_v Integrinen in der Niere und deren Beeinflussung durch Celecoxib

Über eine Hochregulation der Expression von Integrinen in verschiedenen inflammatorischen Modellen wurde, wie in der Einleitung erwähnt, berichtet. Ob α_v Integrine in diesem Tiermodell im inflammatorischen Zustand verstärkt exprimiert wurden, wurde untersucht, indem ihre mRNA Expression im Cortex bei gesunden und kranken Ratten verglichen wurde. Um zu überprüfen, ob sich ein Zusammenhang zwischen der Expression der COX-2 und der Expression von α_v Integrinen in der Niere herstellen lässt, wurden gesunde und nephritische Ratten mit dem COX-2 Inhibitor Celecoxib behandelt und anschließend die renale mRNA Expression von α_v Integrin Untereinheiten bestimmt.

Expression von α_v Integrinen bei Ratten mit PHN

Im Vergleich zu gesunden Ratten fand sich bei Ratten mit PHN ein signifikanter Anstieg der corticalen mRNA Expression von α_v Integrin Untereinheiten (Abb. 35). Deshalb konnte eine inflammatorische Bedeutung dieser Integrinen in dem verwendeten Modell angenommen werden.

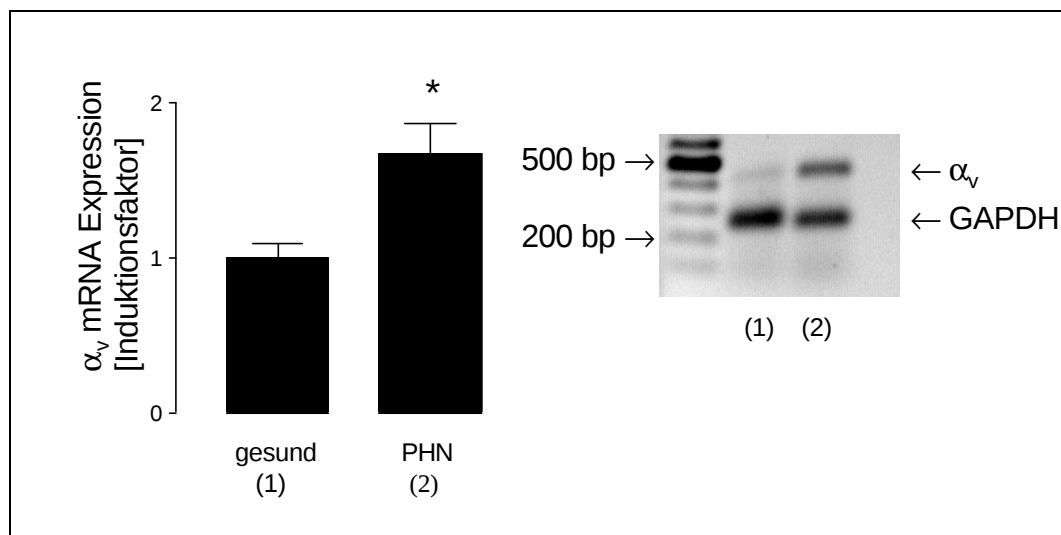


Abb. 35: mRNA Expression der α_v Integrin-Untereinheit im renalen Cortex gesunder Ratten und Ratten mit PHN. Rechts: repräsentatives RT-PCR Gel. Links: Densitometrische Auswertung von n=8 Tieren dargestellt als Mittelwerte $\pm$ SEM (* $p < 0.05$).

Einfluß von Celecoxib auf die pathophysiologische α_v Integrin Expression

Durch Behandlung mit dem selektiven COX-2 Inhibitor Celecoxib konnte bei Ratten mit PHN die mRNA Expression von α_v Integrin Untereinheiten im renalen Cortex signifikant gesteigert werden (Abb. 36).

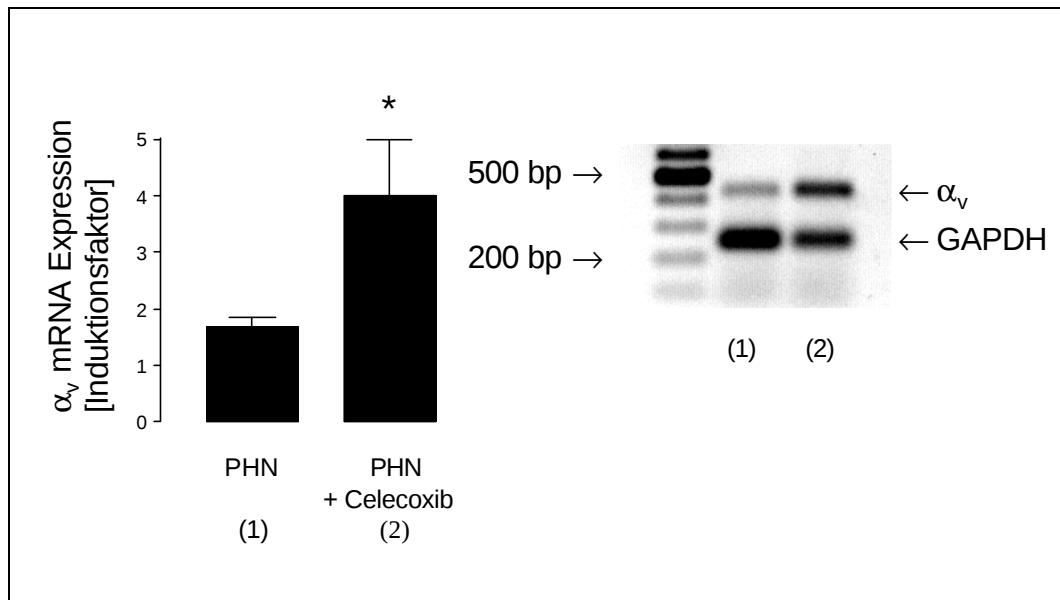


Abb. 36: mRNA Expression des α_v Integrin-Untereinheit im renalen Cortex von Ratten mit PHN ohne und mit Behandlung von 5mg/kg/d Celecoxib. Rechts: repräsentatives RT-PCR Gel. Links: Densitometrische Auswertung von n=8 Tieren dargestellt als Mittelwerte $\bar{x} \pm \text{SEM}$. (* $p < 0.05$).

In Nachfolgeversuchen an kultivierten Mesangialzellen (Kap. 3.6) wurde untersucht, ob dieser Effekt über die von der COX-2 gebildeten Prostaglandine, deren Synthese durch Celecoxib inhibiert wird, vermittelt wurde.

Einfluß von Celecoxib auf die physiologische Expression von α_v Integrinen

Um zu überprüfen, ob COX-2 abhängig gebildete Prostaglandine auch im physiologischem Zustand einen Einfluß auf die α_v Integrin-Expression ausüben, wurden gesunde Ratten mit Celecoxib bzw. Plazebo behandelt und anschließend die renale mRNA Expression von α_v Integrin Untereinheiten bestimmt. Durch Inhibition der COX-2 konnte bei gesunden Ratten die mRNA Expression von α_v Integrin Untereinheiten im renalen Cortex signifikant gesteigert werden (Abb. 37).

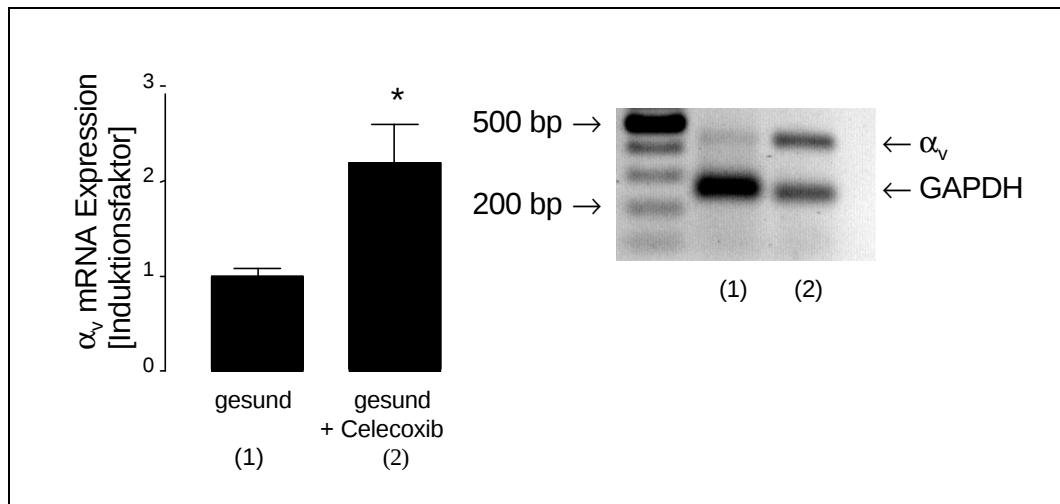


Abb. 37: mRNA Expression der α_v Integrin-Untereinheit im renalen Cortex gesunder Ratten ohne und mit Behandlung vom 5 mg/kg/d Celecoxib. Rechts: repräsentatives RT-PCR Gel. Links: Densitometrische Auswertung von n=8 Tieren dargestellt als Mittelwerte $\pm$ SEM (* $p < 0.05$).

Somit wirkte die physiologische COX-2 Expression in der Rattenniere supprimierend auf die mRNA Expression von α_v Integrin Untereinheiten. Ob dieser Effekt tatsächlich über die von der COX-2 gebildeten Prostaglandine vermittelt wird, wurde durch Versuche an kultivierten Mesangialzellen (Kap. 3.7) untersucht.

Zusammenhang der Expression von COX-2 und α_v Integrinen in der Niere von Ratten mit PHN

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Expression der COX-2 und der Expression von α_v Integrinen, der nach dem Effekt einer selektiven COX-2 Inhibition auf die Expression von α_v Integrinen angenommen werden kann, aufzuklären, wurden die Induktionsfaktoren der COX-2 und α_v Integrin Expression jeder PHN-Ratte gegeneinander aufgetragen. Es zeigte sich sowohl bei unbehandelten als auch bei mit Celecoxib behandelten Ratten eine signifikante reziproke Korrelation (Abb. 38), das heißt kranke Ratten mit einer starken Expression von COX-2 besaßen eine schwache Expression von α_v Integrinen und umgekehrt. Auffallend war, daß die Steigung dieser Korrelation bei der Celecoxibgruppe ($m = -6.66$) viel steiler war als bei der unbehandelten Gruppe ($m = -0.59$). Dies beruhte darauf, daß die Celecoxibbehandlung wie oben gezeigt zu einer Steigerung der α_v Integrin Expression bei gleichzeitiger Schwächung der COX-2 Expression führte.

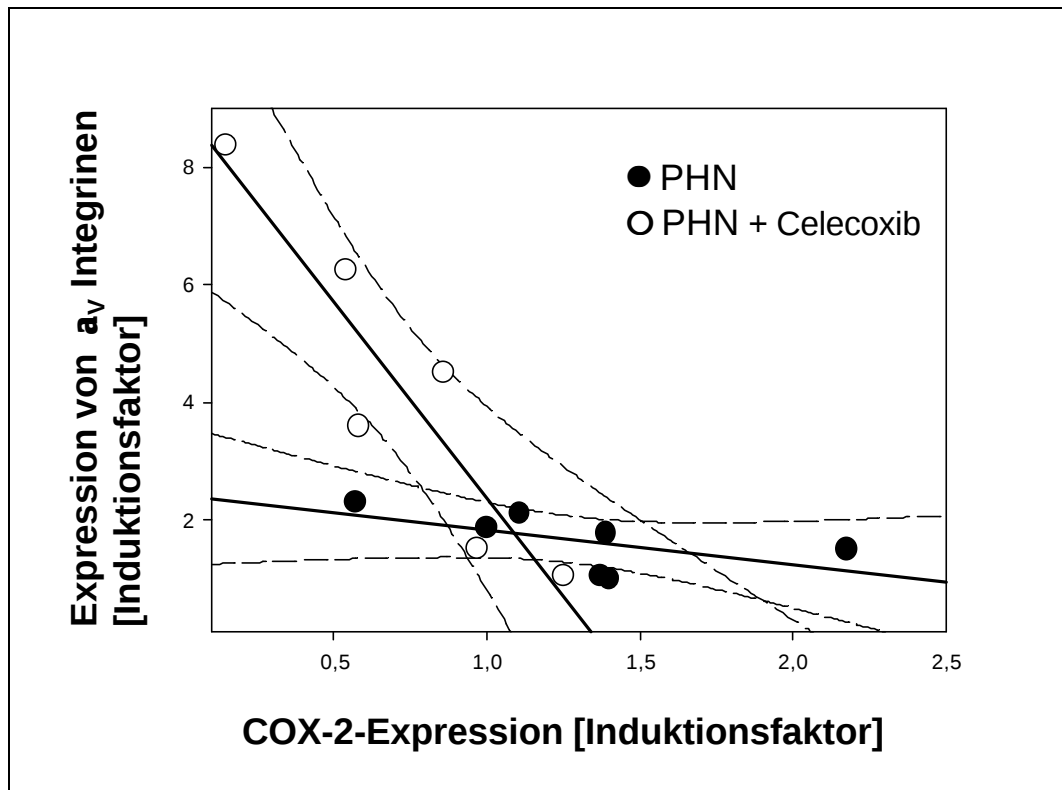


Abb. 38: mRNA Expression der COX-2 und von α_v Integrinen im Cortex jeder einzelnen PHN-Ratte ohne (●) und mit (○) Behandlung von 5 mg/kg/d Celecoxib. Die gestrichelte Linie zeigt das Vertrauensintervall bei 95 %. $p < 0.05$ für beide Korrelationen nach Spearman.

3.6 Regulation der Expression von α_v Integrinen in kultivierten Zellen des Mesangiums

Durch die bisherigen Untersuchungen an Mesangialzellen konnte gezeigt werden, daß es bei Stimulation mit einem inflammatorischen Reiz zu einer gesteigerten Expression der COX-2 und des PGE₂ Rezeptorsubtypes EP₃ kommt. Das – wie im Tierversuch gezeigt – bei Inflammation COX-2 abhängig gebildete PGE₂ war als exogener Reiz in Mesangialzellen in der Lage, die Expression dieser beiden Gene zu verstärken. Unterstützt durch die Beobachtung einer positiven Wirkung selektiver COX-2 Inhibition auf die Expression von α_v Integrinen bei gesunden und nephritischen Ratten, wurde die These untersucht, daß COX-2 abhängiges PGE₂ über eine Aktivierung des EP₃ Rezeptors supprimierend auf die Expression von α_v Integrinen wirkt. Dazu wurden Versuche an kultivierten Mesangialzellen vorgenommen, da diese leicht mit exogenem PGE₂ und einem spezifischen EP₃ Rezeptoragonisten behandelt werden konnten. Als Modell für den inflammatorischen Zustand wurde die Stimulation mit LPS verwendet.

Einfluß von LPS

Im Tiermodell zeigte sich ein Anstieg in der Expression von α_v Integrinen bei kranken Tieren. Um zu überprüfen, ob dieser Anstieg auch auf zellulärer Ebene in dem hier verwendeten System im inflammatorischen Zustand stattfand, wurden Mesangialzellen durch Zugabe von LPS als inflammatorischer Reiz stimuliert. Danach wurde zu verschiedene Zeitpunkten die mRNA Expression der α_v Integrin-Untereinheit durch RT-PCR bestimmt (Abb. 39). Durch Gabe von LPS ließ sich die α_v Integrin mRNA transient mit einem Maximum bei 6 h induzieren. Somit kam es in Mesangialzellen durch diesen starken inflammatorischen Reiz zu einer parallelen Hochregulation der COX-2, des EP₃ Rezeptors (s. Kap. 3.2/3.4) und von α_v Integrinen. Ob in diesen Zellen eine supprimierende Wirkung der COX-2 auf die Expression von α_v Integrinen stattfand, welche durch die Stärke des inflammatorischen Reizes überdeckt wurde, wurde durch die nachfolgenden Untersuchungen geklärt.

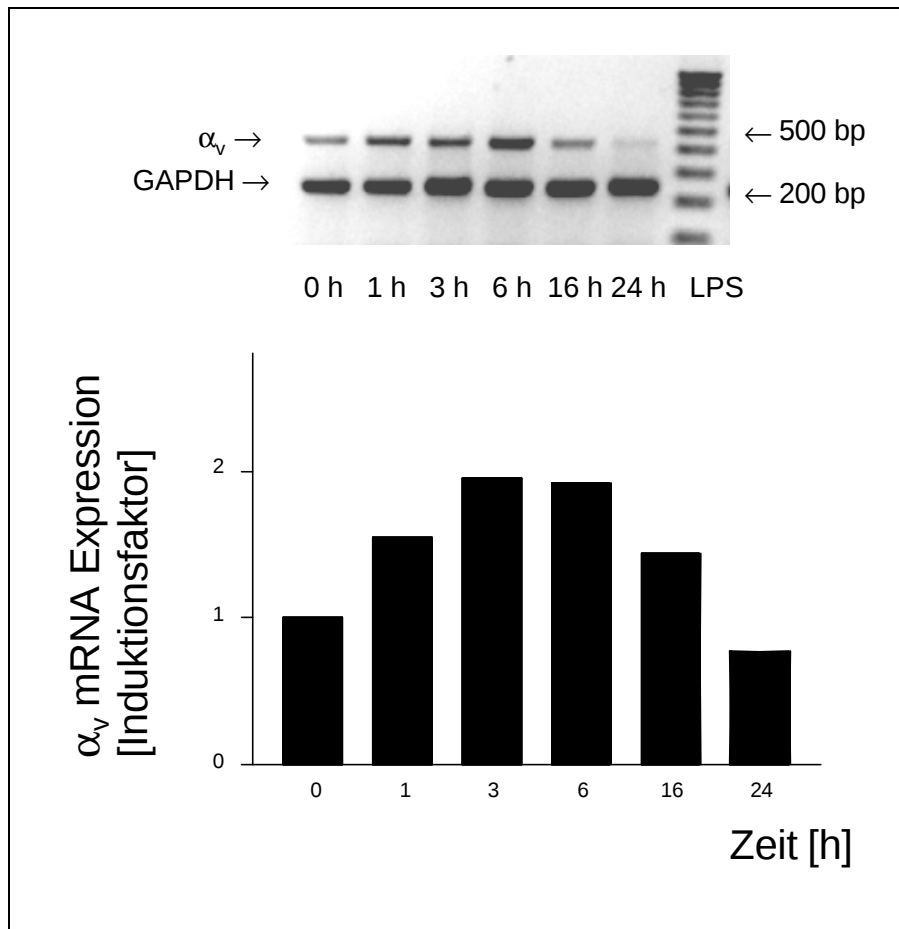


Abb. 39: mRNA Expression von α_v Untereinheiten in konfluenten Mesangialzellen, 24 h gehungert. Dargestellt ist der Zeitverlauf der Stimulation durch 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS. Oben: repräsentatives RT-PCR Gel. Unten: Densitometrische Auswertung von $n=3$ Experimenten dargestellt als Mittelwerte $\times$.

Einfluß von PGE_2

Die bei gesunden Ratten beobachtete verstärkende Wirkung von Celecoxib auf die Expression von α_v Integrinen wurde vermutlich durch eine verminderte Bildung von PGE_2 bedingt. Zur Bestimmung des Einflusses von PGE_2 auf die mRNA Expression der α_v Integrin-Untereinheit im physiologischen Zustand wurden Mesangialzellen mit PGE_2 stimuliert und anschließend die α_v Integrin mRNA Expression durch RT-PCR bestimmt (Abb. 40).

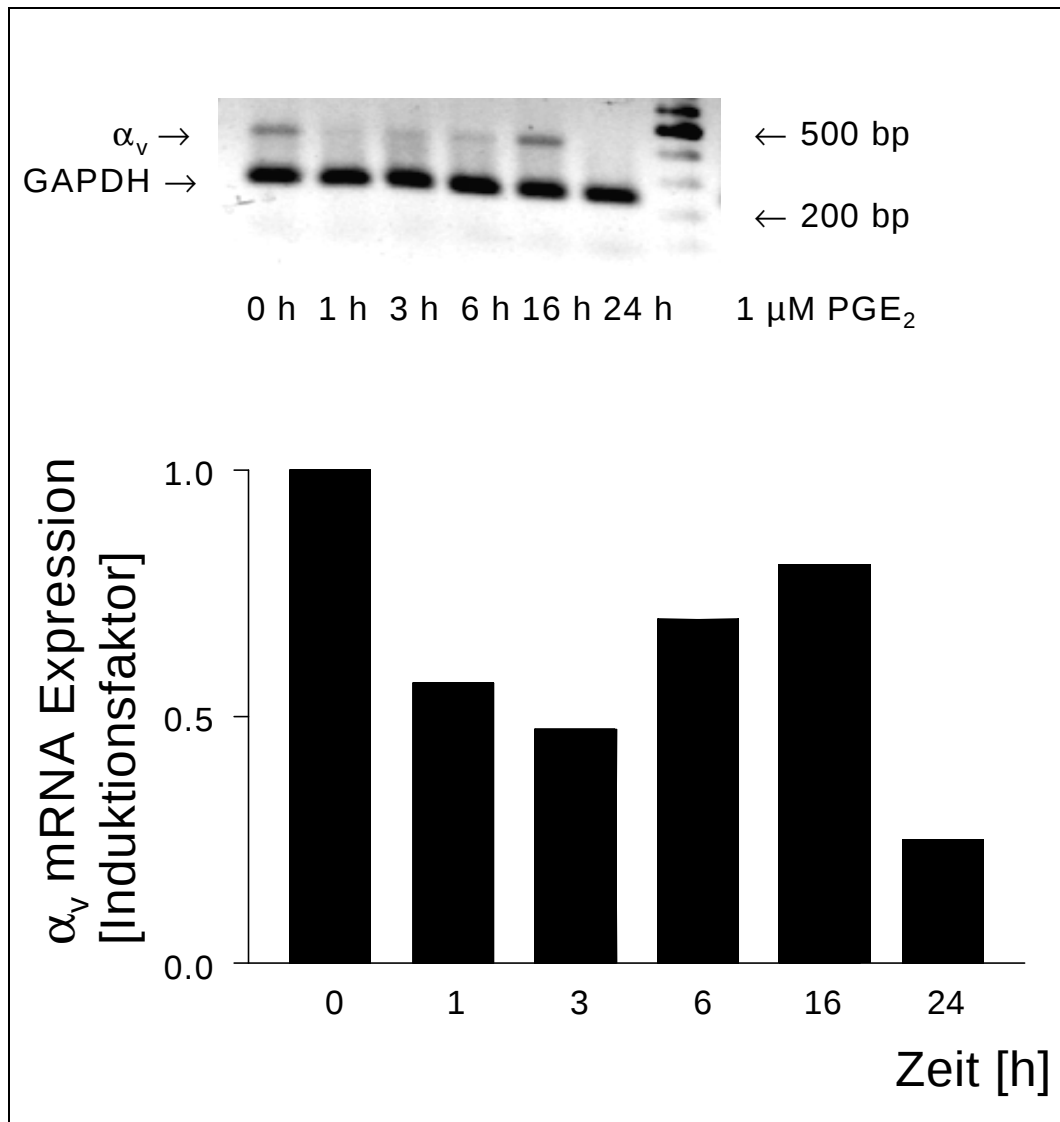


Abb. 40: mRNA Expression von α_v Untereinheiten in konfluenten Mesangialzellen, 24 h gehungert. Dargestellt ist der Zeitverlauf der Stimulation durch 1 μ M PGE₂. Oben: repräsentatives RT-PCR Gel. Unten: Densitometrische Auswertung von n=3 Experimenten dargestellt als Mittelwerte x.

Durch 1.0 μ M PGE₂ ließ sich die physiologische mRNA Expression von α_v Integrinen in Mesangialzellen mit einer maximalen Wirkung nach 3 h supprimieren.

Einfluß von MB 28767

Um die Beteiligung des EP₃ Rezeptors an der supprimierenden Wirkung von PGE₂ auf die Expression von α_v Integrinen zu untersuchen, wurden Mesangialzellen mit dem spezifischen EP₃ Rezeptoragonisten MB 28767 behandelt. Anschließend wurde zu verschiedenen Zeitpunkten die mRNA Expression der α_v Integrin-Untereinheit durch RT-PCR bestimmt (Abb. 41).

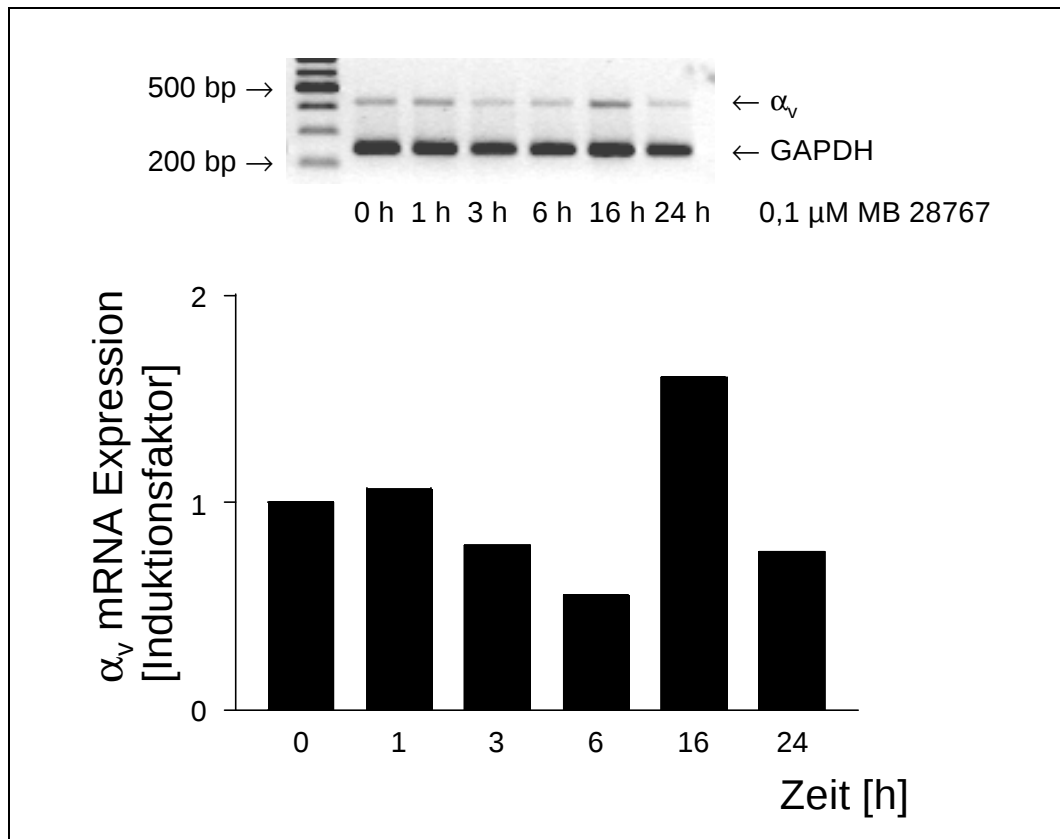


Abb. 41: mRNA Expression von α_v Untereinheiten in konfluenten Mesangialzellen, 24 h gehungert. Dargestellt ist der Zeitverlauf der Stimulation durch 0.1 μ M MB 28767. Oben: repräsentatives RT-PCR Gel. Unten: Densitometrische Auswertung von n=3 Experimenten dargestellt als Mittelwerte x.

Durch 0.1 μ M des spezifischen EP₃ Rezeptoragonisten MB 28767 ließ sich die physiologische mRNA Expression von α_v Integrinen nach 6 h in Mesangialzellen supprimieren. Somit beruht die oben gezeigte negative Wirkung von PGE₂ auf die Expression dieser Integrine im physiologischen Zustand auf einer Aktivierung des EP₃ Rezeptors.

Einfluß von Celecoxib

Aus den bisherigen Ergebnissen ergab sich, daß exogenes PGE₂ sowie spezifische EP₃-Rezeptor Stimulation durch MB 28767 einen supprimierenden Effekt auf die Expression von α_v Integrinen in kultivierten Zellen des Mesangiums ausübten. Um zu untersuchen, ob endogene, COX-2 abhängig gebildete Prostaglandine ebenfalls dazu in der Lage sind, wurden Mesangialzellen mit dem selektiven COX-2 Inhibitor Celecoxib inkubiert und dadurch die Bildung von Prostaglandinen vermindert. Anschließend wurde die mRNA Expression der α_v Integrin-Untereinheit durch RT-PCR bestimmt (Abb. 42).

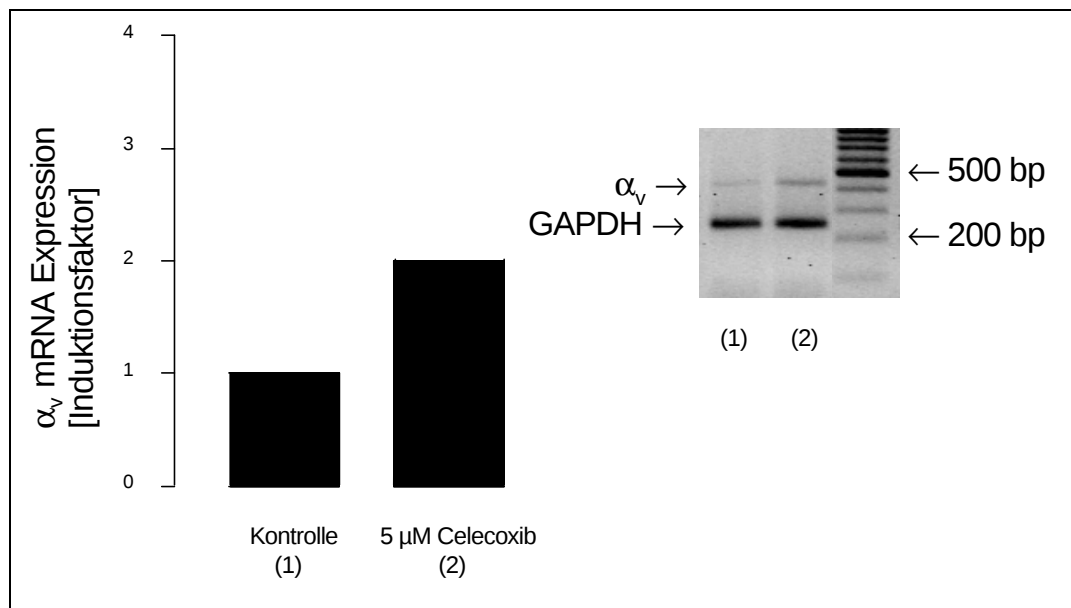


Abb. 42: mRNA Expression von α_v Untereinheiten in konfluenten Mesangialzellen, 24 h gehungert. Dargestellt sind unbehandelte Zellen im Vergleich zur Inkubation mit 5 μ M Celecoxib für 3 h. Rechts: repräsentatives RT-PCR Gel. Links: Densitometrische Auswertung von n=3 Experimenten dargestellt als Mittelwerte x.

Durch Inkubation mit Celecoxib konnte in Analogie zu den Befunden aus dem Tierversuch die mRNA Expression von α_v Integrinen gesteigert werden.

Einfluß von LPS bei Vorinkubation mit PGE₂

Zur Untersuchung des Einflusses von PGE₂ auf die Expression von α_v Integrinen im inflammatorischen Zustand wurden als Modell LPS-stimulierte Mesangialzellen verwendet. Den Zellen wurde eine halbe Stunde vor der Stimulation das PGE₂ zugesetzt und deren mRNA Expression von α_v Integrinen mit der Expression in LPS-stimulierten Zellen ohne PGE₂-Zugabe verglichen (Abb. 43).

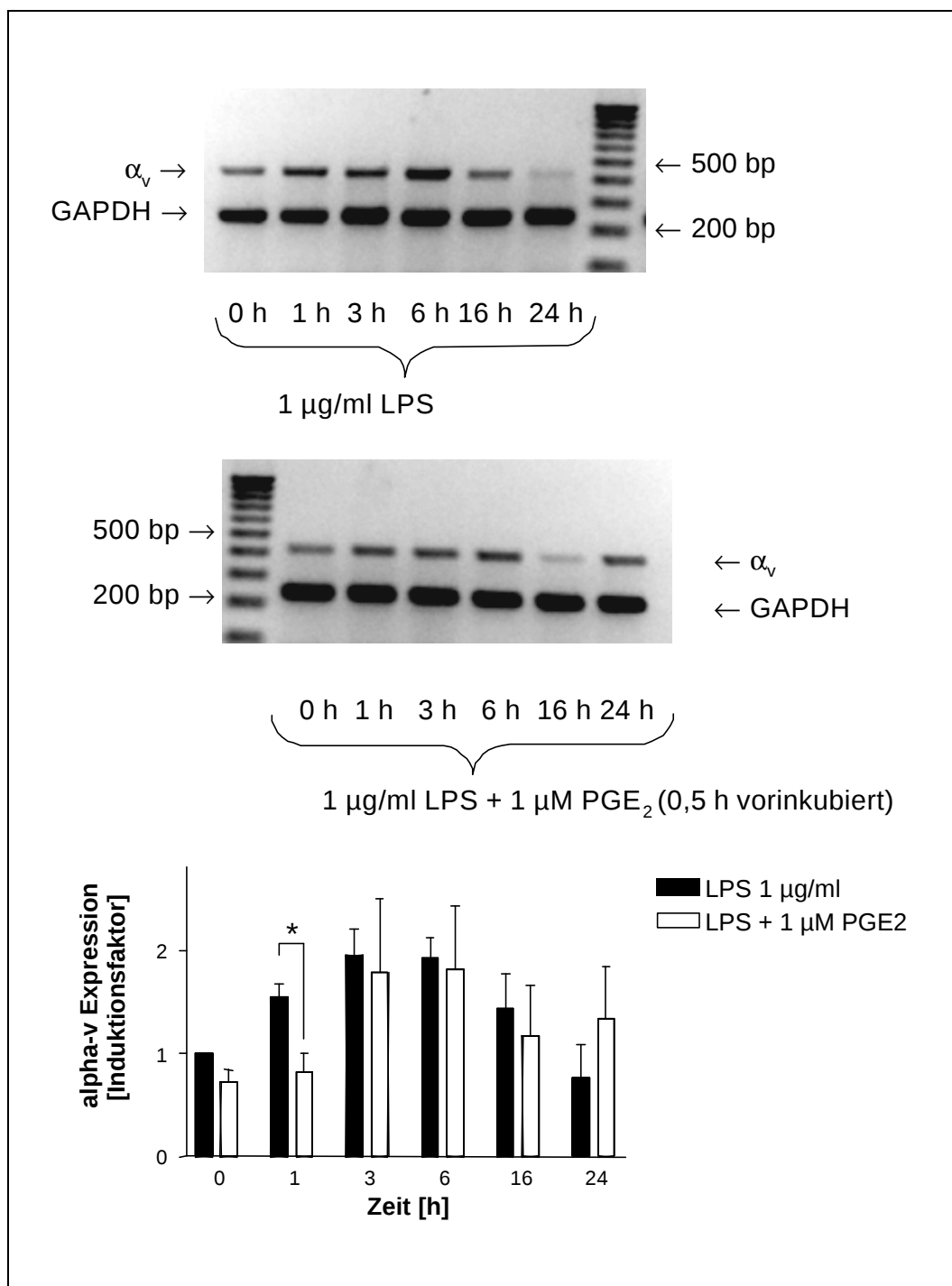


Abb. 43: RT-PCR Nachweis der mRNA Expression von α_v Integrinen in konfluenten Mesangialzellen, 24 h gehungert. Untersucht wurde der Zeitverlauf nach Stimulation mit 1 μ g/ml LPS und zusätzlicher Vorinkubation mit PGE₂. Der obere Teil der Abbildung zeigt repräsentative RT-PCR Gele. Unten ist die densitometrische Auswertung von n=4 unabhängigen Experimenten dargestellt als Mittelwerte $\pm$ SEM (* p<0.05, für nicht signifikante Unterschiede erfolgte keine gesonderte Kennzeichnung).

Bei den Werten für 1 h ergab sich ein signifikanter Unterschied, der bei den anderen Meßpunkten jedoch nicht nachweisbar war. Betrachtet man die Induktion von α_v

Integrinen durch LPS über die Zeit, so ließ sich kein Einfluß von PGE₂ feststellen. Damit wirkt PGE₂ in LPS-stimulierten Mesangialzellen im Gegensatz zum physiologischen Zustand nicht supprimierend auf die Expression von α_v Integrinen.

Einfluß von LPS bei Vorinkubation mit MB 28767

Die Wirkung des EP₃ Rezeptors auf die Expression von α_v Integrinen im inflammatorischen Zustand wurde modellhaft durch Vorinkubation LPS-stimulierter Mesangialzellen mit dem spezifischen EP₃ Rezeptoragonisten MB 28767 untersucht. Vergleicht man die mRNA Expression der α_v Integrin-Untereinheit in diesen beiden Versuchsansätzen, so ergibt sich, daß sie durch Vorinkubation mit MB 28767 zu den Zeitpunkten 1, 3 und 6 Stunden signifikant verringert werden konnte (Abb. 44). Wie in physiologischen Mesangialzellen wirkt spezifische Aktivierung des EP₃ Rezeptors hier supprimierend auf die Expression von α_v Integrinen.

Zusammenfassung: Expression von α_v Integrinen in Mesangialzellen

Durch Inkubation von kultivierten Mesangialzellen mit Lipopolysaccharid (LPS) wurde eine verstärkte Bildung von α_v Integrin-mRNA erreicht. Ebenso ließ sich die α_v Integrin-mRNA durch Inkubation mit dem selektiven COX-2 Inhibitor Celecoxib induzieren. Somit kam es analog zu den in vivo-Ergebnissen im inflammatorischen Zustand sowie durch Inhibition der COX-2 zu einem Anstieg in der mRNA Expression von α_v Integrinen.

Wurden die Zellen mit PGE₂ bzw. dem spezifischen EP₃ Agonisten MB 28767 inkubiert, so wurde die Expression der α_v Integrin-mRNA gesenkt. Bei gleichzeitiger Inkubation mit LPS zur Simulation des inflammatorischen Zustands senkte spezifische Stimulation des EP₃ Rezeptors die α_v Integrin-Expression. PGE₂ zeigte in diesem Fall keinen Einfluß auf die α_v Integrin-Expression.

Durch diese Ergebnisse wurde gezeigt, daß spezifische Aktivierung des EP₃ Rezeptors die mRNA-Expression von α_v Integrinen in Mesangialzellen im physiologischen und inflammatorischen Zustand verringerte.

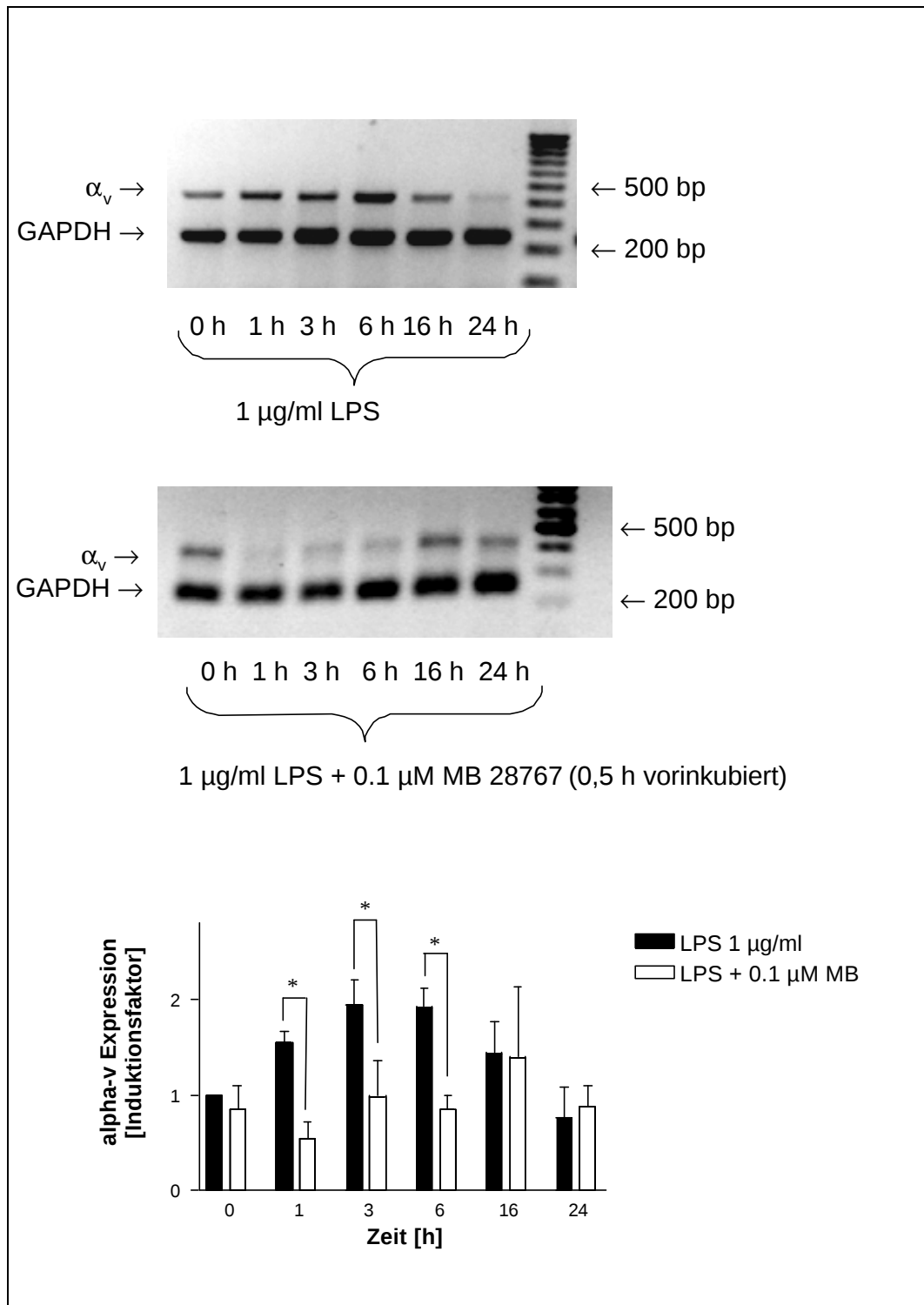


Abb. 44: RT-PCR Nachweis der mRNA Expression von α_v Integrinen in Mesangialzellen. Untersucht wurde der Zeitverlauf nach Stimulation mit 1 µg/ml LPS und zusätzlicher Vorinkubation mit MB 28767. Der obere Teil der Abbildung zeigt repräsentative RT-PCR Gele. Unten ist die densitometrische Auswertung von n=4 unabhängigen Experimenten dargestellt als Mittelwerte $\pm$ SEM (* $p < 0.05$, für nicht signifikante Unterschiede erfolgte keine gesonderte Kennzeichnung).

4 Diskussion

4.1 Experimentelle Vorgehensweise

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Bedeutung und Funktion der Cyclooxygenase (COX)-2 in der renalen Inflammation und die Wirkungen der selektiven Inhibition. Die Untersuchungen hierzu erfolgten in drei Abschnitten: 1. Untersuchungen zur Regulation der COX-2 Expression. 2. Untersuchungen zur Expression verschiedener Prostaglandinrezeptoren und 3. Untersuchungen zur Expression von α_v Integrinen. Dabei wurden die Unterschiede zwischen gesunden und nephritischen Ratten und der Einfluß selektiver Inhibition der COX-2 herausgestellt. Durch die sich anschließenden in vitro Experimente an kultivierten Mesangialzellen wurden dann weiterführende Untersuchungen zur Signalübertragung vorgenommen. Die ersten beiden Abschnitte der Untersuchungen, d. h. die Expression der COX-2 und von Prostaglandinrezeptoren, beschreiben Veränderungen auf verschiedenen Ebenen des Prostaglandinsystems bei entzündlichen Vorgängen in der Niere und die Auswirkungen selektiver COX-2 Inhibition auf dessen Aktivität durch Wirkung auf die Genexpression einzelner Komponenten. Der dritte Abschnitt widmet sich der Bedeutung der extrazellulären Matrix in glomerulären Erkrankungen, da hier die Expression von α_v Integrinen untersucht wird, die im Endothel bedeutsam sind und dort die Adhäsion extrazellulärer Matrix steuern. Zudem ist der Zusammenhang zwischen diesen Integrinen und der renalen COX-2 Expression untersucht worden. Letzteres sollte Aufschluß darüber geben, ob die renale COX-2 im Zustand der Inflammation auch protektive Eigenschaften besitzen kann.

4.2 COX-2 Expression

Durch die vorliegenden Untersuchungen konnte in der Niere von gesunden Ratten eine physiologische Expression der Cyclooxygenase (COX)-2 auf der mRNA- und der Proteinebene nachgewiesen werden. Dies deckt sich mit den Befunden anderer Arbeitsgruppen, die sowohl bei Ratten als auch bei Menschen eine physiologische renale COX-2 Expression fanden (Harris et al., 1994; Kömhoff et al., 1997; Nantel et al., 1999). Diese physiologische COX-2 Expression wurde bei Ratten mit passiver Heymann Nephritis (PHN) gesteigert. Hierbei fand sich auf der Proteinebene ein fast 5-facher Anstieg, während der Anstieg auf der mRNA Ebene im Cortex keine

Signifikanz erreichte. Der Unterschied zwischen der mRNA und der Proteinebene könnte sich dadurch erklären, daß die COX-2 Expression auch durch posttranskriptionelle Mechanismen gesteuert wird (Dixon et al., 2000). Deshalb wurde in dieser Arbeit die Expression des Proteins zur Beurteilung herangezogen. Eine verstärkte Genexpression der COX-2 bei entzündlichen Vorgängen in der Niere wurde bislang bei Ratten mit anti-Thy 1.1 Nephritis (Hirose et al., 1998) und Menschen mit Nephritis Lupus (Tomasoni et al., 1998) beschrieben. Die gesteigerte COX-2 Expression bei Ratten mit PHN stimmt mit der Beobachtung überein, daß sich die COX-2 Expression in glomerulären Epithelzellen durch das Komplement C5b-9 steigern ließ (Takano et al., 2001). C5b-9 konnte zuvor als ein entscheidender Faktor in der Entstehung der PHN identifiziert werden (Couser, 1993; Salant et al., 1989). Durch Untersuchung der renalen Prostaglandinausscheidung konnte die gesteigerte glomeruläre COX-2 Expression nicht mit einer gesteigerten Cyclooxygenaseaktivität in Verbindung gebracht werden. Hier zeigte sich nur ein schwacher und nicht signifikanter Anstieg in der PGE₂ Bildung. Bei der Bestimmung der stabilen Abbauprodukte der Prostaglandine im Urin handelt es sich jedoch um eine indirekte Methode zur Bestimmung der glomerulären Cyclooxygenaseaktivität. Es kann zwar davon ausgegangen werden, daß die gemessenen Prostaglandin-Metabolite aus der Niere stammen, es findet sich aber auch Cyclooxygenaseaktivität entlang des Nephrons und in den Sammelrohren (Kömhoff et al., 1997; Nantel et al., 1999). Somit besitzt eine Steigerung der COX-2 Expression im Glomerulus unter Umständen keinen großen Einfluß auf die gesamte renale Prostaglandinbildung. Andererseits wurde bei nephritischen Ratten, die mit Celecoxib behandelt wurden, ein signifikanter Rückgang in der PGE₂-Bildung beobachtet, so daß die Ausscheidung an bicyclo-PGE₂ unterhalb des physiologischen Niveaus lag. Dies spricht dafür, daß Celecoxib die Cyclooxygenaseaktivität bei kranken Tieren effektiv hemmte und zudem, daß der Großteil des PGE₂ bei kranken Tieren COX-2-abhängig gebildet wurde.

Durch weitere Untersuchungen zur COX-2 Expression wurde gezeigt, daß Celecoxib bei kranken Ratten nicht nur das COX-2-Enzym inhibierte, sondern auch inhibitorisch auf dessen mRNA- und Proteinexpression wirkte. Bei gesunden Ratten hingegen kam es zu keiner Wirkung auf die COX-2 Expression, lediglich zu einem tendenziellen, nicht signifikanten Anstieg des Proteins. Zur Wirkung von selektiven COX-2 Inhibitoren auf die Expression der COX-2 existieren in der Literatur

unterschiedliche Befunde. Zum Beispiel wirkte der COX-2 Inhibitor NS-398 unter physiologischen Bedingungen in Zellen des Sammelrohres stimulatorisch auf die COX-2-Proteinexpression (Ferguson et al., 1999), in Ratten mit adjuvanter Arthritis dagegen wirkte der COX-2 Inhibitor SC-58125 jedoch negativ auf die COX-2 mRNA Expression (Anderson et al., 1996). Durch weitere Untersuchungen der unterschiedlichen Wirkungen selektiver COX-2 Inhibitoren auf die COX-2 Expression im physiologischen und inflammatorischen Zustand (Paik et al., 2000) wurde die These aufgestellt, daß es im physiologischen Zustand über PGD_2 zu einer negativen und im inflammatorischen Zustand über PGE_2 zu einer positiven Feedback-Wirkung kommt (Inoue et al., 2000). Durch Untersuchungen an Mesangialzellen wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, daß PGE_2 die Expression der COX-2 mRNA Expression induzieren kann. Somit kann davon ausgegangen werden, daß PGE_2 bei kranken Ratten im Sinne eines positiven Rückkopplungsmechanismus verstärkend auf die COX-2-Expression wirkt. Eine positive Wirkung von PGE_2 auf die mRNA Expression der COX-2 wurde bisher vereinzelt in anderen Zellsystemen, wie z. B. Keratinozyten (Maldeve et al., 2000), RAW 264.7 Makrophagen (Hinz et al., 2000) oder synovialen Fibroblasten (Faour et al., 2001) beobachtet. Der schwache Anstieg in der COX-2-Proteinexpression bei gesunden Ratten mit Celecoxibbehandlung könnte durch den postulierten negativen Feedbackmechanismus im physiologischen Zustand (Inoue et al., 2000) erklärt werden.

Es kann somit davon ausgegangen werden, daß es im Glomerulus von nephritischen Ratten zu einer gesteigerten COX-2 Expression kommt, die durch das von ihr gebildete PGE_2 noch weiter verstärkt wird. Dieser Befund zeigt eine Relevanz der COX-2 und des von ihr gebildeten PGE_2 in der renalen Inflammation.

4.3 Expression von Prostaglandinrezeptoren

Im renalen Cortex gesunder Ratten wurden alle untersuchten Prostaglandinrezeptoren konstitutiv exprimiert und durch die Behandlung mit Celecoxib nicht beeinflusst. Bei Tieren mit PHN konnte eine transkriptionelle Hochregulation des EP_3 Rezeptors nachgewiesen werden. Die Expression der übrigen Rezeptoren blieb unverändert. Dies spricht für eine Bedeutung dieses Rezeptorsubtypes in diesem Modell und stimmt mit der vorrangigen Bildung von PGE_2 in der Niere nephritischer Ratten überein. Zudem ließ sich die Expression des EP_3 Rezeptors in kultivierten Mesangialzellen durch Stimulation mit

Lipopolysaccharid (LPS) steigern, was ein weiteres Indiz für eine Bedeutung dieses Rezeptor-Subtypes in der Inflammation ist. Eine Hochregulation der EP₃ Rezeptor mRNA ließe sich beispielsweise durch Bindungsstellen für proinflammatorische Transkriptionsfaktoren wie das Interferon- γ responsive Element (γ -IRE) und den nukleären Faktor κ B (NF κ B) sowie einer für induzierbare Gene typischen TATA-Box in der 5'-untranslatierten Region des humanen EP₃ Gens (Kotani et al., 1997) erklären. Im Vergleich dazu besitzt der EP₄ Rezeptor im Promoter-Bereich zwar eine Bindungsstelle für NF κ B, jedoch keine für γ -IRE und auch keine konventionelle TATA BOX (Foord et al., 1996). Der EP₂ Rezeptor besitzt genauso wie der IP Rezeptor keine Bindungsstellen für die genannten Faktoren (Ogawa et al., 1995; Smock et al., 1999). Beim TP Rezeptor findet sich von den erwähnten Transkriptionsfaktoren nur eine Bindungsstelle für NF κ B (Takahashi et al., 1998).

Die Beobachtung der verstärkten Expression des EP₃ Rezeptors im Stadium der Inflammation steht im Einklang mit in der Literatur beschriebenen Untersuchungen an EP₃-defizienten Mäusen, die eine besondere Bedeutung dieses Rezeptorsubtypes in der Übermittlung inflammatorischer Reize bestätigten (Ueno et al., 2001; Ushikubi et al., 1998). Zudem scheint der EP₃ Rezeptor in der Steuerung der murinen renalen Hämodynamik durch PGE₂ eine entscheidende Rolle zu spielen (Audoly et al., 2001). Im Gegensatz dazu fanden Hartner et al. (Hartner et al., 2000) bei Ratten mit anti-Thy 1.1 Nephritis, einem Modell für eine mesangioproliferative Glomerulonephritis, eine verstärkte Expression des EP₂ Rezeptors. Allerdings wurde in dieser Arbeit die Expression des EP₃ Rezeptors nicht untersucht.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß bei nephritischen Ratten die Expression des EP₃- und des EP₄-Rezeptors durch selektive Inhibition der COX-2 mit Celecoxib gesenkt wurde (Kap. 3.3.2). Die im Anschluß durchgeführten Untersuchungen an Mesangialzellen zur Expression des EP₃ Rezeptors zeigten, daß diese Wirkung von Celecoxib wahrscheinlich auf eine verminderte Bildung von PGE₂ zurückzuführen ist, da exogenes PGE₂ hier die Expression des EP₃ Rezeptors induzierte. Wahrscheinlich trifft dies auch für die Wirkung auf die Expression des EP₄ Rezeptors zu. Somit kann davon ausgegangen werden, daß im Zustand der Inflammation COX-2 abhängig gebildetes PGE₂ die Expression seiner eigenen Rezeptoren erhöht, um seine Wirkungen in der Niere zu verstärken. Meyer-Kirchrath et al. (1998) konnten zeigen, daß eine Stimulation des porcinen EP₃ Rezeptors durch PGE₁ eine NF κ B Translokation in den Nukleus bewirkt. Da der EP₃ Promotor eine Bindungsstelle für

NF κ B besitzt (Kotani et al., 1997), die möglicherweise auch für seine transkriptionelle Hochregulation bei nephritischen Ratten verantwortlich ist, wäre es möglich, daß eine Aktivierung des EP₃ Rezeptors durch PGE₂ in der Niere von Ratten eine Translokation von NF κ B in den Nukleus bewirkt, was unter anderem eine verstärkte Expression des EP₃ Rezeptors zur Folge hat. Da sich im Promotorbereich des EP₄ Rezeptors, dessen Expression in vivo durch Celecoxib gesenkt wurden, ebenfalls eine Bindungsstelle für NF κ B findet, läßt sich der Effekt von Celecoxib über eine verringerte Bildung von PGE₂ und nachfolgende verminderte NF κ B Translokation erklären.

Es konnten durch die vorliegenden Untersuchungen zwei Mechanismen aufgedeckt werden, durch die COX-2 abhängiges PGE₂ in der renalen Inflammation seine Wirkungen verstärken kann (Abb. 1):

1. durch positive Wirkung auf die Expression der COX-2
2. durch positive Wirkung auf die Expression des EP₃ Rezeptors.

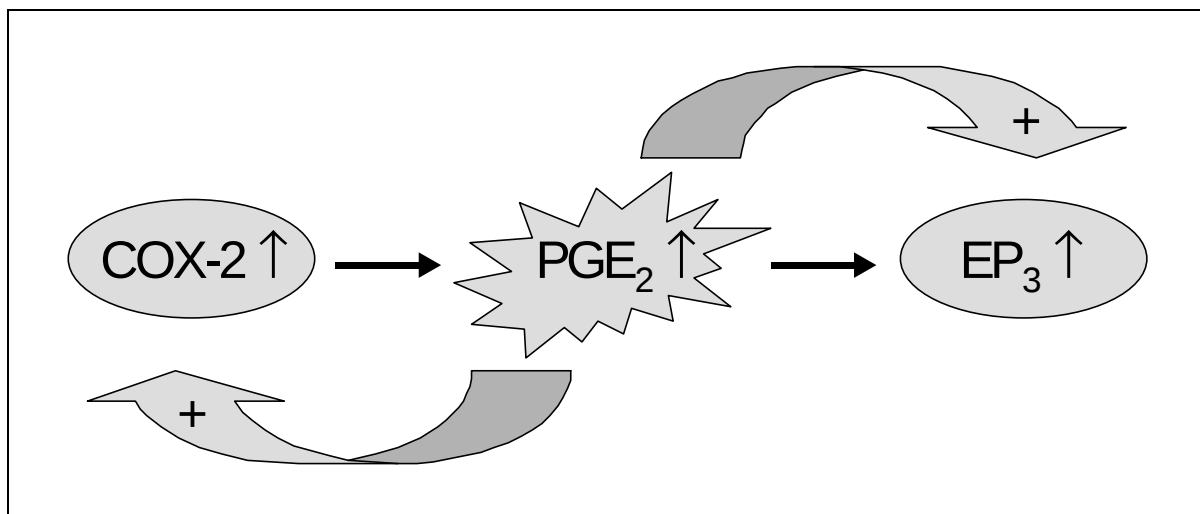


Abb. 45: Verstärkungsmechanismen von PGE₂ auf die COX-2 und den EP₃ Rezeptor in der Niere von nephritischen Ratten (graue Pfeile). Schwarze Pfeile: Eine gesteigerte COX-2 Expression führt zu einer vermehrten Bildung von PGE₂, welches hauptsächlich über den EP₃ Rezeptor wirkt, dessen Expression ebenfalls gesteigert ist.

4.4 Expression von α_v Integrinen

Durch Untersuchungen in Zellsystemen war bekannt, daß Prostaglandine durch Wirkung auf die Expression von unterschiedlichen Adhäsionsmolekülen, wie z. B. dem interzellulären Adhäsionsmolekül (ICAM)-1, die Anhaftung extrazellulärer Matrix und die Zell-Zell Interaktion vermindern können (Noguchi et al., 1999). Zudem

existieren mittlerweile Hinweise, daß solche Prostaglandine möglicherweise COX-2 abhängig gebildet werden (Bishop-Baily et al., 1998; Noguchi et al., 2000). In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß sich die Expression einer bestimmten Klasse von Adhäsionsmolekülen, der α_v Integrine, durch selektive COX-2 Hemmung beeinflussen ließ. Dabei wurde in der Niere sowohl von gesunden als auch von nephritischen Ratten eine Steigerung der mRNA Expression dieser Integrine durch Celecoxib beobachtet. Zudem war die Expression von α_v Integrinen bei Ratten mit PHN im Vergleich zu den gesunden Tieren ebenfalls gesteigert. Es wurde nicht näher untersucht, welche der fünf möglichen Heterodimere ($\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$ und $\alpha_v\beta_8$) der α_v Familie im einzelnen reguliert wurden. Hierzu wäre eine Untersuchung der Expression jeder einzelnen β -Untereinheit nötig. Es ist jedoch anzunehmen, daß es sich bei diesen α_v Integrinen hauptsächlich um $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ handelte, da diese vorwiegend im Glomerulus exprimiert werden (Adler und Brady, 1999). Eine verstärkte Expression von α_v Integrinen wurde auch bei Ratten mit anti-Thy 1.1 Nephritis, einem Modell für eine mesangioproliferative Nephritis beschrieben (Hartner et al., 1999). Bei diesem Modell kam es weiterhin zu einem Anstieg in der Expression von α_1 , α_5 und β_1 Integrin Untereinheiten, der begleitet wurde von einem gesteigerten mesangialen Gehalt an Laminin, Kollagen und Fibronectin, ihren extrazellulären Liganden. Interessanterweise nahm die Expression dieser Integrine mit zunehmenden Grad der Ausheilung wieder ab (Kagami et al., 1993), was den pathogenen Charakter der verstärkten Integrinexpression unterstreicht. Ähnliche Ergebnisse zur Expression von β_1 Integrinen wurden auch bei Glomerulonephritis des Menschen erhalten. Hierbei konnte eine direkte Verbindung zwischen aktivierten Mesangialzellen und einer gesteigerten Expression von β_1 Integrinen hergestellt werden (Kuhara et al., 1997). Die Autoren schlossen aus ihren Beobachtungen, daß Integrine die Anhäufung von Matrixproteinen bei entzündlichen Vorgängen in der Niere steuern. Eine verstärkte Expression endothelialer Integrine verstärkt vermutlich die Anhaftung von Leukozyten an die Basalmembran in der Bowman'schen Kapsel, was als wichtiger Mechanismus für die Entwicklung der membranösen Glomerulonephritis angesehen werden kann (Heinzelmann et al., 1999). Weiterhin beschrieben Oda et al., daß eine verstärkte Zelladhäsion zur Induktion einer Proteinurie bei Immunkomplex-Glomerulonephritis erforderlich ist (Oda et al., 1998). Aufgrund des Anstiegs der α_v Integrin Expression im inflammatorischen Zustand konnte von einer pathologischen Bedeutung dieses Integrins in dem verwendeten

Modell ausgegangen werden. Da bei Tieren, die mit dem selektiven COX-2 Inhibitor Celecoxib behandelt wurden, die Expression der α_v Integrine gesteigert war, war es wahrscheinlich, daß bei Ratten die endogene renale COX-2 supprimierend auf die Expression dieser Integrine wirkte. Um diesen Zusammenhang darzustellen, wurden die Expressionsfaktoren von COX-2 und α_v Integrinen jeden einzelnen kranken Tieres gegeneinander aufgetragen. Es zeigte sich sowohl bei unbehandelten als auch bei mit Celecoxib behandelten Ratten eine signifikante reziproke Korrelation. Das heißt, kranke Ratten mit einer starken Expression von COX-2 besaßen eine schwache Expression von α_v Integrinen und umgekehrt (Abb. 38). Bei gesunden Ratten zeigte sich keine solche Relation. Diese Tiere besaßen allerdings auch eine relativ schwache physiologische Expression beider Gene. Vermutlich konnte deshalb kein mathematischer Zusammenhang zwischen der Expression beider Gene hergestellt werden. Es konnte geschlossen werden, daß die endogene COX-2 Expression supprimierend auf die Expression dieser Integrine wirkte und es sich nicht etwa um einen COX-unabhängigen Effekt von von Celecoxib gehandelt hat. Prostaglandinunabhängige Effekte von Celecoxib wurden im Zusammenhang mit seiner apoptotischen Wirkung auf humane Prostatakrebszellen vermutet (Hsu et al., 2000). In der vorliegenden Untersuchung jedoch beruhte die Wirkung von Celecoxib auf die Expression der α_v Integrine auf einer Inhibition der COX-2 und einer dadurch bewirkten verminderten Bildung von Prostaglandinen. Ein Zusammenhang zwischen Inhibition der Cyclooxygenase und der Expression von Integrinen bei Glomerulonephritis war bislang noch nicht bekannt. Jedoch verstärkte der unselektive Cyclooxygenaseinhibitor Indometacin in humanen Osteosarcomazellen den Interleukin-1 β induzierten Anstieg der Expression von α_2 , α_5 und α_v Integrinen (Milam et al., 1991). Kürzlich beschrieben Dormond et al. (2001) eine Wirkung selektiver COX-2 Inhibition auf die $\alpha_v\beta_3$ Integrin abhängige Angiogenese. Dabei konnten sie keinen Einfluß auf die Proteinexpression des $\alpha_v\beta_3$ Integrins feststellen. Die Expression der mRNA untersuchten sie allerdings nicht.

Aus den bisherigen Ergebnissen ergab sich als Arbeitshypothese, daß COX-2-abhängig gebildete Prostaglandine die Expression von α_v Integrinen in vivo unterdrücken können. Da durch die Messung der Prostaglandinausscheidung bekannt war, daß PGE₂ quantitativ dominierte und zudem seine Bildung durch Celecoxib verringert wurde, wurde davon ausgegangen, daß dieses Prostaglandin dabei eine zentrale Rolle spielt. Deshalb wurde an kultivierten Zellen des

Mesangiums die Wirkung von PGE₂ auf die Expression von α_v Integrinen untersucht. Diese Untersuchungen wurden an unbehandelten und LPS-stimulierten Zellen, die den inflammatorischen Zustand bei Ratten vertreten sollten, vorgenommen. LPS-stimulierte Zellen zeigten in Analogie zu den kranken Tieren eine gesteigerte Expression an α_v Integrinen. Da die Stimulation mit LPS ebenso zu einer Induktion der COX-2 und EP₃ Rezeptor mRNA führte, konnte davon ausgegangen werden, daß dieses System geeignet war, die Verhältnisse der inflammatorischen Rattenniere modellhaft wiederzugeben. Diese drei Gene (COX-2, EP₃ und α_v Integrine) wurden dort ebenfalls verstärkt exprimiert. Zudem wirkte Celecoxib sowohl bei unbehandelten als auch bei LPS-stimulierten Mesangialzellen verstärkend auf die Expression von α_v Integrinen. Dies zeigte eine weitere Parallele dieses Modells zu den in vivo Ergebnissen und war Grundlage für die folgenden Untersuchungen. Bei unbehandelten Mesangialzellen, die als Beispiel für den physiologischen Zustand in der Rattenniere verwendet wurden, zeigte sich eine supprimierende Wirkung von PGE₂ auf die mRNA Expression der α_v Integrine mit einem Maximum bei 3 Stunden. Bei der Behandlung von LPS-stimulierten Zellen mit PGE₂ konnte kein supprimierender Effekt auf die Expression von α_v Integrinen festgestellt werden. LPS ist ein unspezifischer und starker inflammatorischen Reiz, der viele inflammatorische Mediatoren stimuliert. So wirkt es beispielsweise auf verschiedene Interleukine (Adams und Tepperman, 2001; Shimoya et al., 1999;165) und aktiviert das Komplementsystem (Sladowski et al., 2001; Yokochi, 1990). Vielleicht wurde deshalb eine supprimierende Wirkung von PGE₂ in diesem Fall durch die Aktivierung anderer Signalwege kompensiert. Möglicherweise wurde auch das instabile PGE₂ in aktivierten Mesangialzellen schneller abgebaut.

Da PGE₂ in unbehandelten Mesangialzellen die α_v Integrin Expression verringerte und zudem Celecoxib bei Ratten mit PHN die Bildung von PGE₂ hemmte, kann davon ausgegangen werden, daß die Wirkung von Celecoxib auf die Expression von α_v Integrinen in der Rattenniere über PGE₂ vermittelt wird. Durch Untersuchungen der Expression der Rezeptoren für PGE₂ (EP₂, EP₃ und EP₄) im renalen Cortex von Ratten ergab sich, daß bei Ratten mit PHN hauptsächlich der EP₃ Rezeptor von Bedeutung ist. Dies deutete darauf hin, daß die supprimierende Wirkung von PGE₂ auf die Expression der α_v Integrine durch Aktivierung des EP₃ Rezeptors erfolgen könnte. Die Experimente, bei denen Mesangialzellen mit dem spezifischen EP₃ Rezeptoragonisten MB 28767 behandelt wurden, zeigten eine Suppression der α_v

Integrin Expression. Diese Suppression war sowohl bei nativen Zellen, die den physiologischen Zustand vertraten, als auch bei LPS-Stimulierten Zellen, die den inflammatorischen Zustand simulierten, zu erkennen. Das Maximum der suppressiven Wirkung von MB 28767 lag hier allerdings bei 6 h und nicht bei 3 h, wie für PGE₂. Vermutlich lag die maximale Wirkung von PGE₂ und MB 28767 auf die Expression der α_v Integrine zwischen diesen beiden Zeitpunkten. Bei der suppressiven Wirkung von MB 28767 auf die LPS induzierte Genexpression der α_v Integrine lag der Maximaleffekt zwischen 1 h und 6 h und ließ sich nicht weiter eingrenzen. Auch hier zeigte sich wieder ein Anstieg in der α_v Integrin Expression bei 16 h, der allerdings schwächer ausfiel als bei den bisherigen Versuchen.

Zusammengefaßt ließ sich in kultivierten Zellen des Mesangiums durch spezifische Aktivierung des EP₃ Rezeptors sowohl im ruhenden als auch im inflammatorischen Zustand die mRNA Expression der α_v Integrine verringern. Somit kann davon ausgegangen werden, daß die supprimierende Wirkung von PGE₂ auf die Expression von α_v Integrinen über den EP₃ Rezeptor vermittelt wird.

4.5 Rolle der COX-2 und deren selektiver Hemmung bei renaler Inflammation

Das Komplement C5b-9, welches hauptsächlich für das Entstehen der passiven Heymann Nephritis verantwortlich ist (Couser, 1993; Salant et al., 1989), induziert parallel in glomerulären Epithelzellen die COX-2 (Takano et al., 2001). Eine verstärkte COX-2 Expression konnte bei Ratten mit passiver Heymann Nephritis in dieser Arbeit ebenfalls festgestellt werden. Verbindet man die Ergebnisse aus den Zellexperimenten mit denen aus dem Tierversuch, so ergibt sich folgendes Gesamtbild: Bei Ratten mit passiver Heymann Nephritis kommt es zu einer verstärkten Genexpression der COX-2 im Cortex. Dies führt zu einer vermehrten Bildung von PGE₂, welches über den EP₃ Rezeptor, dessen Expression im Cortex ebenfalls gesteigert ist, supprimierend auf die Expression von α_v Integrinen wirkt. Durch Analyse der Promotorregion der α_v Integrin Untereinheit stellte sich heraus, daß als einzig positiv regulierendes Element vermutlich ein Ets bindendes Motiv in Frage kommt (Donahue et al., 1994). An die Ets-Site kann unter anderem der Transkriptionsfaktor ERM binden, der wiederum durch die Protein Kinase A (PKA) aktiviert wird (Baert et al., 2002; Janknecht et al., 1996). Da der EP₃ Rezeptor an ein inhibitorisches G-Protein gekoppelt ist (Audoly et al., 1999; Nanba et al., 1993),

bewirkt dessen Aktivierung eine Verringerung der Bildung von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP), was eine verminderte Aktivierung der PKA zur Folge hat. Somit wäre es denkbar, daß PGE_2 über den EP_3 Rezeptor eine verminderte Aktivität von ERM bewirkt, was letztendlich zu einer Suppression der Transkription der α_v Untereinheit über das Ets Motiv führt. Andererseits fanden Donahue et al. (1994) auch ein schwach supprimierendes Promotor-Fragment, das Ets, SP1 und GATA Motive enthält. Allerdings schien der Einfluß dieses Fragments auf die Transkription ca. zehnfach schwächer zu sein, so daß eine supprimierende Wirkung von PGE_2 beispielsweise über eine Aktivierung von SP1 unwahrscheinlich erscheint. Zudem ist über eine PKA-abhängige Aktivierung von SP1 nichts bekannt.

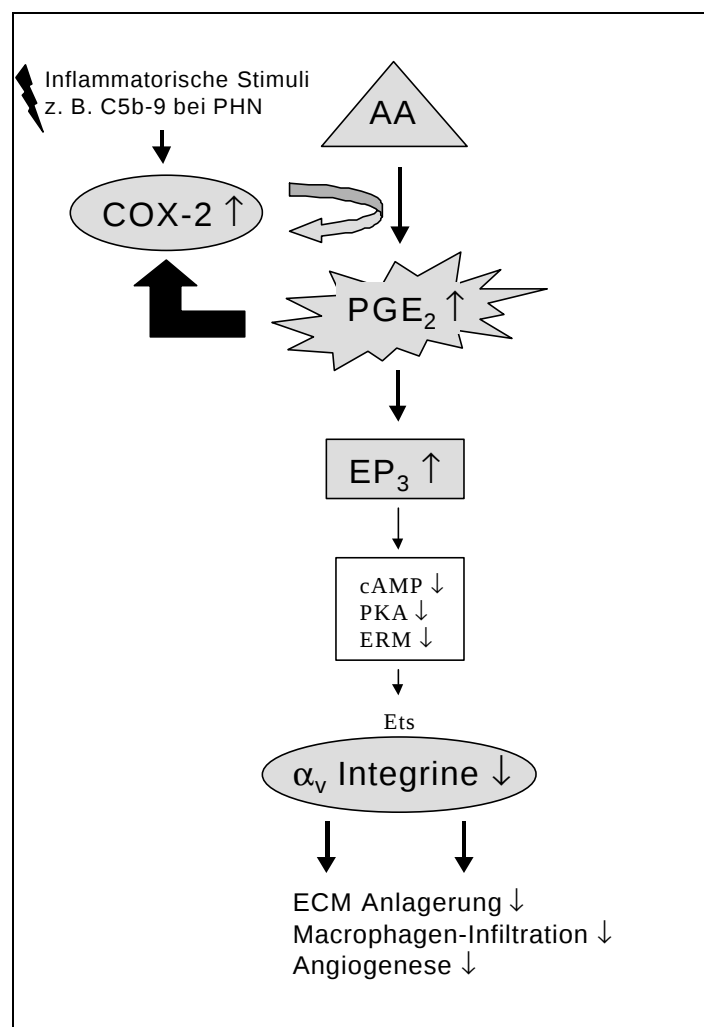


Abb. 46: Wirkungskette der renalen COX-2 Expression bei Ratten mit PHN. AA: Arachidonsäure. PKA: Protein Kinase A.

Eine Suppression der Integrinexpression bei renaler Inflammation ist nach momentanem Kenntnisstand als positiv anzusehen, da hierdurch die Anlagerung von

extrazellulärer Matrix im Bereich des Glomerulus verringert wird. So zeigten Oda et al. (Oda et al., 1998), daß Zell-Adhäsion, in diesem Fall über das interzelluläre Adhäsionsmolekül (ICAM)-1 und das Lymphozyten Funktion-assoziierte Antigen (LFA)-1, für die Induktion einer Proteinurie bei Glomerulonephritis entscheidend ist. Eine andere Studie brachte die tubuläre Expression von α_v und α_5 Integrinen mit einer verstärkten Macrophageninfiltration sowie mit dem Vorkommen von interstitieller Fibrose und tubulärer Atrophie in Verbindung (Roy et al., 1997). Andererseits kann wiederum bei Bestehen einer Proteinurie das Albumin im Bereich des Tubulus über das $\alpha_v\beta_5$ Integrin tubulointerstitielle Schäden hervorrufen (Peruzzi et al., 1996). Vor diesem Hintergrund läßt es sich erklären, daß Hyashi et al. die antinephritische Wirkung des PGI₂-Mimetikums ONO-1301 hauptsächlich auf eine Suppression der Expression des vaskulären Zell-Adhäsionsmoleküls (VCAM)-1 und eine dadurch verminderten Leukozytenakkumulation im Glomerulus zurückführten (Hayashi et al., 1997). Zudem wurde unter ONO-1301 eine Abschwächung der Adhäsion von der Kapillarwand an die Bowman'sche Kapsel beobachtet. Solche Wirkungen reihen sich in andere protektive Eigenschaften von Prostaglandinen ein. So wirkt PGE₂ z. B. vasodilatorisch und kann dadurch die renale Durchblutung verbessern (Imig, 2000). Zudem kann es hauptsächlich über den EP₂ und den EP₄ Rezeptor das Immunsystem supprimieren (Nataraj et al., 2001). Dies könnte bei Autoimmunerkrankungen, wie beispielsweise der Glomerulonephritis, von Bedeutung sein. Durch diese Arbeit wurde nicht nur gezeigt, daß PGE₂ in der Niere protektive Funktionen ausüben kann, sondern auch, daß für die Bildung dieses Prostaglandins im Stadium der Inflammation hauptsächlich die COX-2 verantwortlich ist und daß selektive Inhibition dieses Enzyms die Expression von Integrinen erhöht und damit dem protektiven Effekt von PGE₂ entgegenwirkt. Da sich gerade in der Niere eine deutliche physiologische Expression der COX-2 findet, läßt es sich erklären, daß selektive COX-2 Inhibitoren schwere renale Nebenwirkungen zeigen können. Zur Zeit häufen sich Berichte über akutes Nierenversagen (Graham, 2001; Perazella und eras, 2000; Samer et al., 2002; Wahba und Soper, 2001; Wolf et al., 2000) bzw. akute tubulointerstitielle Nephritis (Rocha und Fernandez-Alonso, 2001) nach Einnahme von Celecoxib bzw. Rofecoxib. Da hiervon meistens ältere Patienten betroffen waren, liegt die Vermutung nahe, daß dies mit einer gesteigerten COX-2 Expression bei Älteren (Nantel et al., 1999) zusammenhängen könnte. Möglicherweise übt eine

gesteigerte COX-2 Expression in der Niere protektive Effekte aus und würde damit den Verlauf der Erkrankung positiv beeinflussen.

Seit einiger Zeit wird diskutiert, daß COX-2-abhängig gebildete Prostaglandine nicht nur entzündungsverstärkend wirken, sondern möglicherweise auch zur Heilung beitragen. So wurde bereits 1998 durch Wallace et al. im Entzündungsmodell der Carrageenan-induzierten Pfotenanschwellung gezeigt, daß Wildtyp- und COX-2 Knockout-Mäuse mit einer vergleichbaren Schwellung und Prostaglandin-Synthese reagierten. Die Schwellung konnte bei beiden Typen durch Indometacin signifikant reduziert werden, nicht jedoch durch den selektiven COX-2 Inhibitor NS-398. Indometacin hemmte bei Wildtyp- und Knockout-Mäusen in gleicher Weise die Prostaglandinbildung, während NS-398 die PGE₂ Synthese nicht beeinflusste. Eine Woche nach der Carrageenan-Gabe war die Pfotenschwellung im Wildtyp wieder zurückgegangen, während die COX-2 Knockout-Maus nun eine doppelt so starke Schwellung zeigte. Damit wurde zum einen gezeigt, daß eine Inhibition der COX-1 zur Abschwächung der Inflammation notwendig ist, und zum anderen, daß die COX-2 möglicherweise die Entzündungsantwort verringert sowie die Ausheilung von Entzündungsschäden fördert. Dies scheint insbesondere Entzündungen im Gastrointestinaltrakt zu betreffen (Mizuno et al., 1997; Schassmann et al., 1998). In der Niere konnte gezeigt werden, daß selektive Inhibition der COX-2 die Ausheilung der anti-Thy 1.1 Nephritis der Ratte verzögert. Kitahara et al. (Kitahara et al., 2002) beobachteten in diesem Modell bei Behandlung mit Rofecoxib oder Celecoxib eine verstärkte Mesangiolyse sowie einen Anstieg in der Proteinausscheidung. Weiterhin kam es unter selektiver COX-2 Inhibition zu einer verschlechterten Heilung von Schäden der glomerulären Kapillargefäße, was mit einer bekannten hemmenden Wirkung auf die Angiogenese (Jones et al., 1999; Sawaoka et al., 1999) in Verbindung gebracht wurde. Auf der anderen Seite gibt es jedoch durchaus Entzündungsmodelle, in denen sich eine selektive COX-2 Inhibition positiv auf die Heilung auswirkte. Beispielsweise zeigten Anderson et al. (1996), daß der selektive COX-2 Inhibitor SC-58125 bei der Adjuvant-Arthritis der Ratte die Ödem-Bildung verringerte. Allerdings war dieser Effekt der Wirkung des ebenfalls eingesetzten Indometacins vergleichbar. Deshalb ist es möglich, daß die Unterschiede zwischen den Befunden von Wallace und Anderson auf einer unterschiedlichen COX-2 Selektivität von SC-58125 und NS-398 beruhen.

Durch die Ergebnisse dieser Arbeit wurde gezeigt, daß eine Inhibition der COX-2 nicht nur antiinflammatorisch wirkt, sondern proinflammatorischen Faktoren, wie z. B. Integrine, fördert. Somit besteht eine Funktion der COX-2 während der Inflammation in der Suppression der Integrinexpression. Diese Wirkung der COX-2 wurde über den inhibitorisch wirksamen und damit cAMP senkenden EP₃ Rezeptor vermittelt, dessen Expression bei nephritischen Ratten gesteigert war. Dieser Rezeptor zeigte in anderen Organen, wie z. B. dem Herzen (Hohlfeld et al., 1997; Hohfeld et al., 2000; Thiernemann et al., 2000), protektive Eigenschaften, so daß er möglicherweise in der Niere ebenfalls für protektive Effekte verantwortlich ist. Das COX-2-abhängig aus der Arachidonsäure gebildete PGE₂ kann in der Niere verschiedene protektive Funktionen ausüben, die den Verlauf der renalen Inflammation günstig beeinflussen: Es wirkt vasodilatierend (Imig, 2000) und sichert damit die Durchblutung, es supprimiert das Immunsystem (Nataraj et al., 2001) und unterdrückt damit die Bildung von membranschädigenden Antikörpern und Komplement, und es wirkt supprimierend auf die Expression von Adhäsionsmolekülen, was die Akkumulation von extrazellulärer Matrix im Bereich des Glomerulus unterdrückt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, daß durch selektive Inhibition der COX-2 sowohl die COX-2 Aktivität als auch die Expression der COX-2 und des EP₃ Rezeptors gesenkt wurde. Somit suppressierte Celecoxib die Expression zweier wahrscheinlich protektiver Faktoren, was einen Anstieg in der α_v Integrin Expression zur Folge hatte, der für den Verlauf der Glomerulonephritis als negativ zu werten ist. Der früher übliche Einsatz unselektiver Cyclooxygenase-Inhibitoren bei Glomerulonephritis wurde eingeschränkt, als sich zeigte, daß die dadurch erreichte Senkung der Proteinurie hauptsächlich auf eine verschlechterte renale Durchblutung zurückzuführen war. Dies wurde durch eine Verringerung der Bildung vasodilatatorischer und dadurch renoprotektiv wirkender Prostaglandine bedingt. Ausgehend von der Überlegung, daß die meist konstitutiv exprimierte COX-1 für die Synthese protektiver Prostaglandine und die induzierbare COX-2 für die Synthese inflammatorischer Prostaglandine verantwortlich sei, bestand die Möglichkeit, durch selektive Inhibition der COX-2 eine antiproteinurische Wirkung bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung der renalen Durchblutung zu erreichen. Vermutlich ist die in unterschiedlichen Nephritis-Modellen bei Ratten beobachtete Verringerung der Proteinurie durch selektive COX-2 Inhibitoren (Blume et al., 1999; Wang et al., 2000)

ebenfalls eher auf eine verminderte renale Durchblutung als auf einen antiinflammatorischen Effekt zurückzuführen. So zeigten neuere Untersuchungen eine Verschlechterung der Ausheilung der anti-Thy 1.1 Nephritis bei der Ratten unter selektiver COX-2 Hemmung, was sogar mit einem Anstieg der Proteinurie verbunden war (Kitahara et al., 2002). Dies würde bedeuten, daß selektive COX-2 Inhibitoren in Bezug auf die Niere keinen Vorteil gegenüber den unselektiven COX Inhibitoren besitzen und deshalb als Therapieoption bei Glomerulonephritis den gleichen Stellenwert besitzen wie konventionelle nicht steroidale Antiphlogistika.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, vor dem Hintergrund eines Einsatzes selektiver Cyclooxygenase(COX)-2 Inhibitoren als Therapieoption bei Glomerulonephritis mögliche Funktionen der COX-2 bei renaler Inflammation aufzuklären. Für den Großteil der Untersuchungen wurde als Modell für die membranöse Glomerulonephritis des Menschen die passive Heymann Nephritis der Ratte gewählt. Dabei konnte bei kranken Tieren eine verstärkte Expression der COX-2 und des EP₃ Rezeptors für Prostaglandin E₂ im renalen Cortex nachgewiesen werden. Somit kam es zu einer Aktivierung auf verschiedenen Ebenen des Prostaglandinsystemes im Zustand der Inflammation. Gleichzeitig kam es bei nephritischen Tieren zu einer verstärkten Expression einer Gruppe von Adhäsionsmolekülen, den α_v Integrinen. Diese Integrine können als pathogener Faktor angesehen werden, da sie zu einer verstärkten Anhäufung von extrazellulärer Matrix im Bereich der Basalmembran führen. Wurden die kranken Tiere mit dem COX-2 Inhibitor Celecoxib behandelt, so kam es zu einer weiteren Steigerung in der Expression von α_v Integrinen. Parallel dazu sank die Expression der COX-2 und des EP₃ Rezeptors bei diesen Tieren. Durch nachfolgende Experimente an kultivierten Zellen des Mesangiums konnte gezeigt werden, daß PGE₂, welches COX-2 abhängig gebildet wurde, über seinen EP₃ Rezeptor supprimierend auf die Expression von α_v Integrinen wirkte. Des weiteren zeigte sich eine verstärkende Wirkung von PGE₂ auf die Expression der COX-2 und des EP₃ Rezeptors. Dabei konnte PGE₂ seine Bildung und seine Wirkungen verstärken, indem es stimulierend auf die Expression der COX-2 und des EP₃ Rezeptors wirkte.

Beachtet man das pathogene Potential einer verstärkten Integrinexpression, so handelt es sich bei einer verstärkten COX-2 Expression bei Inflammation wahrscheinlich um eine Schutzfunktion, um mehr PGE₂ produzieren zu können. Dieses PGE₂ besitzt offenbar neben seiner bekannten und als positiv anzusehenden vasodilatierenden Wirkung in der Niere eine direkte supprimierende Wirkung auf die Expression proinflammatorischer Gene, wie den α_v Integrinen. Durch selektive Inhibition der COX-2 bei Glomerulonephritis würde demnach die Expression der protektiven Faktoren COX-2 und EP₃ geschwächt und die Expression der pathogenen α_v Integrine verstärkt. Unter diesem Aspekt der molekularen Wirkungen selektiver COX-2 Inhibition wäre ein Einsatz entsprechender Hemmstoffe bei Glomerulonephritis nicht vorteilhaft.

6 Literatur

- ABE T, TAKEUCHI K, TAKAHASHI N, TSUTSUMI E, TANIYAMA Y, ABE K: Rat kidney thromboxane receptor: molecular cloning, signal transduction, and intrarenal expression localization. *J Clin Invest* 96(2):657-664, 1995
- ADAM M, BOIE Y, RUSHMORE TH, MULLER G, BASTIEN L, MCKEE KT, METTERS KM, ABRAMOVITZ M: Cloning and expression of three isoforms of the human EP3 prostanoid receptor. *FEBS Lett* 338:170-174, 1994
- ADAMS JK, TEPPERMAN BL: Colonic production and expression of IL-4, IL-6, and IL-10 in neonatal suckling rats after LPS challenge. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280:G755-G762, 2001
- ADLER S, BRADY HR: Cell adhesion molecules and the glomerulopathies. *Am J Med* 107:371-386, 1999
- AKARASEREENONT P, TECHATRISAK K, CHOTEWUTTAKORN S, THAWORN A: The induction of cyclooxygenase-2 in IL-1 β -treated endothelial cells is inhibited by prostaglandin E2 through cAMP. *Mediators Inflamm* 8:287-294, 1999
- ANDERSON GD, HAUSER SD, MCGARITY KL, BREMER ME, ISAKSON PC, GREGORY SA: Selective inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 reverses inflammation and expression of COX-2 and interleukin 6 in rat adjuvant arthritis. *J Clin Invest* 97:2672-2679, 1996
- ANDREWS FJ, MALCONTENTI WC, O'BRIEN PE: Effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on LFA-1 and ICAM-1 expression in gastric mucosa. *Am J Physiol* 266:G657-G664, 1994
- AUDOLY LP, MA L, FEOKTISTOV I, DE-FOE SK, BREYER MD, BREYER RM: Prostaglandin E-prostanoid-3 receptor activation of cyclic AMP response element-mediated gene transcription. *J Pharmacol Exp Ther* 289:140-148, 1999
- AUDOLY LP, RUAN XP, WAGNER VA, GOULET JL, TILLEY SL, KOLLER BH, COFFMAN TM, ARENDSHORST WJ: Role of EP2 and EP3 PGE(2) receptors in control of murine renal hemodynamics. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280:H327-H333, 2001
- BAERT JL, BEAUDOIN C, COUTTE L, DE-LAUNOIT Y: ERM transactivation is up-regulated by the repression of DNA binding after the PKA phosphorylation of a consensus site at the edge of the ETS domain. *J Biol Chem* 277:1002-1012, 2002
- BARRIOS RM, CHADEE K: Novel regulation of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production by IFN- γ in human macrophages. *J Immunol* 161:2441-2448, 1998
- BIRNBOIM HC, DOLY J: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-1523, 1979
- BISHOP-BAILEY D, BURKE-GAFFNEY A, HELLEWELL PG, PEPPER JR, MITCHELL JA: Cyclo-oxygenase-2 regulates inducible ICAM-1 and VCAM-1 expression in

- human vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 249:44-47, 1998
- BLUME C, HEISE G, MUHLFELD A, BACH D, SCHRÖR K, GERHARDZ CD, GRABENSEE B, HEERING P: Effect of flosulide, a selective cyclooxygenase 2 inhibitor, on passive heymann nephritis in the rat. *Kidney Int* 56:1770-1778, 1999
- BOMBARDIER C, LAINE L, REICIN A, SHAPIRO D, BURGOS-VARGAS R, DAVIS B, DAY R, FERRAZ MB, HAWKEY CJ, HOCHBERG MC, KVIEN TK, SCHNITZER TJ: Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *N Engl J Med* 343:1520-1528, 2000
- BRADFORD MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254, 1976
- BRATER DC, HARRIS C, REDFERN JS, GERTZ BJ: Renal effects of COX-2-selective inhibitors. *Am J Nephrol* 21:1-15, 2001
- BREYER MD: Prostaglandin receptors in the kidney: a new route for intervention? *Exp Nephrol* 6:180-188, 1998
- BREYER MD, BADR KF: Arachidonic acid metabolites and the kidney, in *Brenner & Rector's the Kidney*, edited by BRENNER BM. Saunders. Philadelphia, 1996
- BREYER MD, BREYER RM: G protein-coupled prostanoid receptors and the kidney. *Annu Rev Physiol* 63:579-605, 2001
- BRYANT CE, APPLETON I, MITCHELL JA: Vascular endothelial growth factor upregulates constitutive cyclooxygenase 1 in primary bovine and human endothelial cells. *Life Sci* 62:2195-2201, 1998
- CHENG HF, WANG JL, ZHANG MZ, MIYAZAKI Y, ICHIKAWA I, MCKANNA JA, HARRIS RC: Angiotensin II attenuates renal cortical cyclooxygenase-2 expression. *J Clin Invest* 103:953-961, 1999
- CHUA CC, HAMDY RC, CHUA BH: Upregulation of vascular endothelial growth factor by angiotensin II in rat heart endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1401:187-194, 1998
- COLEMAN RA, KENNEDY I, HUMPHREY PA, BUNCE K, LUMLEY P: Prostanoids and their receptors, in *Comprehensive Medical Chemistry. The rational design, mechanistic study and therapeutic application of chemical compounds Vol. 3.*, edited by EMMET JC. Pergamon Press. New York, 1990, p. 643
- COUSER WG: Pathogenesis of glomerulonephritis. *Kidney Int* 42:S19-S26, 1993
- COUSER WG, STEINMULLER DR, STILMANT MM, SALANT DJ, LOWENSTEIN LM: Experimental glomerulonephritis in the isolated perfused kidney. *J Clin Invest* 62:1275-1287, 1978
- DIAZ A, CHEPENIK KP, KORN JH, REGINATO AM, JIMENEZ SA: Differential regulation of cyclooxygenases 1 and 2 by interleukin-1 beta, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta 1 in human lung fibroblasts. *Exp Cell Res* 241:222-229, 1998

- DIAZ CM, PEREZ SD, LAMAS S: Dual effect of nitric oxide donors on cyclooxygenase-2 expression in human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 10:943-952, 1999
- DINCHUK JE, CAR BD, FOCHT RJ, JOHNSTON JJ, JAFFEE BD, COVINGTON MB, CONTEL NR, ENG VM, COLLINS RJ, CZERNIAK PM, ET al: Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. *Nature* 378:406-409, 1995
- DIXON DA, KAPLAN CD, MCINTYRE TM, ZIMMERMAN GA, PRESCOTT SM: Post-transcriptional control of cyclooxygenase-2 gene expression - The role of the 3'-untranslated region. *J Biol Chem* 275:11750-11757, 2000
- DONAHUE JP, SUGG N, HAWIGER J: The integrin α_v gene: identification and characterization of the promoter region. *Biochim Biophys Acta* 1219:228-232, 1994
- DORMOND O, FOLETTI A, PAROZ C, RÜEGG C: NSAIDs inhibit $\alpha_v\beta_3$ integrin-mediated and Cdc42/Rac-dependent endothelial-cell spreading, migration and angiogenesis. *Nature Med* 7(9):1041-1047, 2001
- EDDY AA, HO GC, THORNER PS: The contribution of antibody-mediated cytotoxicity and immun-complex formation to tubulointerstitial disease in passive Heymann-nephritis. *Clin Immunol Immunopath* 62:42-55, 1992
- EDGINGTON TS, GLASSOCK RJ, DIXON FJ: Autologous immune complex nephritis induced with renal tubular antigen. I. Identification and isolation of the pathogenetic antigen. *J Exp Med* 127:555-572, 1968
- ERAS J, PERAZELLA MA: NSAIDs and the kidney revisited: are selective cyclooxygenase-2 inhibitors safe? *Am J Med Sci* 321:181-190, 2001
- FAOUR WH, HE Y, HE QW, DE-LADURANTAYE M, QUINTERO M, MANCINI A, DI-BATTISTA JA: Prostaglandin E(2) regulates the level and stability of cyclooxygenase-2 mRNA through activation of p38 mitogen-activated protein kinase in interleukin-1 beta-treated human synovial fibroblasts. *J Biol Chem* 276:31720-31731, 2001
- FENG L, SUN W, XIA Y, TANG WW, CHANMUGAM P, SOYOOLA E, WILSON CB, HWANG D: Cloning two isoforms of rat cyclooxygenase: differential regulation of their expression. *Arch Biochem Biophys* 307:361-368, 1993
- FERGUSON S, HEBERT RL, LANEUVILLE O: NS-398 upregulates constitutive cyclooxygenase-2 expression in the M-1 cortical collecting duct cell line. *J Am Soc Nephrol* 10:2261-2271, 1999
- FOORD SM, MARKS B, STOLZ M, BUFFLIER E, FRASER NJ, LEE MG: The structure of the prostaglandin EP4 receptor gene and related pseudogenes. *Genomics* 35:182-188, 1996
- GAHMBERG CG, VALMU L, FAGERHOLM S, KOTOVUORI P, IHANUS E, TIAN L, PESSA MT: Leukocyte integrins and inflammation. *Cell Mol Life Sci* 54:549-555, 1998
- GONG JH, RENZ H, SPRENGER H, NAIN M, GEMSA D: Enhancement of tumor necrosis factor- α gene expression by low doses of prostaglandin E2 and cyclic GMP. *Immunobiology* 182:44-55, 1990

- GRAHAM MG: Acute renal failure related to high-dose celecoxib. *Ann Intern Med* 135:69-70, 2001
- GREENBERG SG, LORENZ JN, HE XR, SCHNERMANN JB, BRIGGS JP: Effect of prostaglandin synthesis inhibition on macula densa-stimulated renin secretion. *Am J Physiol* 265:F578-F583, 1993
- GUAN Y, CHANG M, CHO W, ZHANG Y, REDHA R, DAVIS L, CHANG S, DUBOIS RN, HAO CM, BREYER M: Cloning, expression, and regulation of rabbit cyclooxygenase-2 in renal medullary interstitial cells. *Am J Physiol* 273:F18-F26, 1997
- HANAHAHAN D: *Techniques for transformation of E.coli. DNA cloning; A practical approach*. IRL Press. Washington D.C., 1985
- HARDING P, SIGMON DH, ALFIE ME, HUANG PL, FISHMAN MC, BEIERWALTES WH, CARRETERO OA: Cyclooxygenase-2 mediates increased renal renin content induced by low-sodium diet. *Hypertension* 29:297-302, 1997
- HARRIS RC, MCKANNA JA, AKAI Y, JACOBSON HR, DUBOIS RN, BREYER MD: Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J Clin Invest* 94:2504-2510, 1994
- HARTNER A, PAHL A, BRUNE K, GOPPELT SM: Upregulation of cyclooxygenase-1 and the PGE(2) receptor EP2 in rat and human mesangioproliferative glomerulonephritis. *Inflamm Res* 49:345-354, 2000
- HARTNER A, SCHOCKLMANN H, PROLS F, MULLER U, STERZEL RB: Alpha8 integrin in glomerular mesangial cells and in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 56:1468-1480, 1999
- HAYASHI K, NAGAMATSU T, OKA T, SUZUKI Y: Modulation of anti-glomerular basement membrane nephritis in rats by ONO-1301, a non-prostanoid prostaglandin I2 mimetic compound with inhibitory activity against thromboxane A2 synthase. *Jpn J Pharmacol* 73:73-82, 1997
- HEINZELMANN M, MERCER JM, PASSMORE JC: Neutrophils and renal failure. *Am J Kidney Dis*. 34:384-399, 1999
- HEISE G, GRABENSEE B, SCHROR K, HEERING P: Different actions of the cyclooxygenase 2 selective inhibitor flosulide in rats with passive Heymann nephritis. *Nephron* 80:220-226, 1998
- HENDERSON R, BALDWIN JM, CESKA TA, ZEMLIN F, BECKMANN E, DOWNING KH: Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J Mol Biol* 213:899-929, 1990
- HINZ B, BRUNE K: Specific COX-2 inhibitors: prospects of therapy with new analgesic and anti-inflammatory substances. *Wien Klin Wochenschr* 111:103-112, 1999
- HINZ B, BRUNE K, PAHL A: Prostaglandin E-2 upregulates cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 272:744-748, 2000
- HIROSE S, YAMAMOTO T, FENG L, YAOITA E, KAWASAKI K, GOTO S, FUJINAKA H, WILSON CB, ARAKAWA M, KIHARA I: Expression and localization of

- cyclooxygenase isoforms and cytosolic phospholipase A2 in anti-Thy-1 glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 9:408-416, 1998
- HOHLFELD T, MEYER-KIRCHRATH J, VOGEL YC, SCHRÖR K: Reduction of infarct size by selective stimulation of EP(3) receptors in the reperfused ischemic pig heart. *J Mol Cell Cardiol* 32(2):285-296, 2000
- HOHLFELD T, ZUCKER TP, MEYER J, SCHRÖR K: Expression, function, and regulation of E-type prostaglandin receptors (EP3) in the nonischemic and ischemic pig heart. *Circ Res* 81(5):765-773, 1997
- HSU AL, CHING TT, WANG DS, SONG XQ, RANGNEKAR VM, CHEN CS: The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib induces apoptosis by blocking Akt activation in human prostate cancer cells independently of Bcl-2. *J Biol Chem* 275:11397-11403, 2000
- IMIG JD: Eicosanoid regulation of the renal vasculature. *Am J Physiol Renal Physiol* 279:F965-F981, 2000
- INOUE H, TANABE T, UMESONO K: Feedback control of cyclooxygenase-2 expression through PPAR gamma. *J Biol Chem* 275:28028-28032, 2000
- INOUE H, YOKOYAMA C, HARA S, TONE Y, TANABE T: Transcriptional regulation of human prostaglandin-endoperoxide synthase-2 gene by lipopolysaccharide and phorbol ester in vascular endothelial cells. Involvement of both nuclear factor for interleukin-6 expression site and cAMP response element. *J Biol Chem* 270:24965-24971, 1995
- IVERSEN BM, MATRE R, TONDER O: Indirect haemagglutination for the demonstration of antibodies to renal antigens from rats. *Scand J Immunol* 13:19-23, 1981
- JAMES MJ, PENGLIS PS, CAUGHEY GE, DEMASI M, CLELAND LG: Eicosanoid production by human monocytes: does COX-2 contribute to a self-limiting inflammatory response? *Inflamm Res* 50:249-253, 2001
- JANKNECHT R, MONTE D, BAERT JL, DE-LAUNOIT Y: The ETS-related transcription factor ERM is a nuclear target of signaling cascades involving MAPK and PKA. *Oncogene* 13:1745-1754, 1996
- JENSEN BL, MANN B, SKOTT O, KURTZ A: Differential regulation of renal prostaglandin receptor mRNAs by dietary salt intake in the rat. *Kidney Int* 56:528-537, 1999
- JOBIN C, MORTEAU O, HAN DS, BALFOUR SR: Specific NF-kappaB blockade selectively inhibits tumour necrosis factor-alpha-induced COX-2 but not constitutive COX-1 gene expression in HT-29 cells. *Immunology* 95:537-543, 1998
- JONES MK, WANG H, PESKAR BM, LEVIN E, ITANI RM, SARFEH IJ, TARNAWSKI AS: Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. *Nat Med* 5:1418-1423, 1999
- JUN SS, CHEN Z, PACE MC, SHAUL PW: Estrogen upregulates cyclooxygenase-1 gene expression in ovine fetal pulmonary artery endothelium. *J Clin Invest* 102:176-183, 1998

- KAGAMI S, BORDER WA, RUOSLAHTI E, NOBLE NA: Coordinated expression of beta 1 integrins and transforming growth factor-beta-induced matrix proteins in glomerulonephritis. *Lab Invest* 69:68-76, 1993
- KAPLAN MD, OLSCHOWKA JA, O'BANION MK: Cyclooxygenase-1 behaves as a delayed response gene in PC12 cells differentiated by nerve growth factor. *J Biol Chem* 272:18534-18537, 1997
- KARIM S, BERROU E, LEVY TS, BRYCKAERT M, MACLOUF J: Regulatory role of prostaglandin E2 in induction of cyclo-oxygenase-2 by a thromboxane A2 analogue (U46619) and basic fibroblast growth factor in porcine aortic smooth-muscle cells. *Biochem J* 326:593-599, 1997
- KATORI M, MAJIMA M: Cyclooxygenase-2: its rich diversity of roles and possible application of its selective inhibitors. *Inflamm Res* 49:367-392, 2000
- KERJASCHKI D: Molecular pathogenesis of membranous nephropathy. *Kidney Int* 41:1090-1105, 1992
- KITAHARA M, EITNER F, OSTENDORF T, KUNTER U, JANSSEN U, WESTENFELD R, MATSUI K, KERJASCHKI D, FLOEGE J: Selective cyclooxygenase-2 inhibition impairs glomerular capillary healing in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 13:1261-1270, 2002
- KÖMHOFF M, GRONE HJ, KLEIN T, SEYBERTH HW, NUSING RM: Localization of cyclooxygenase-1 and -2 in adult and fetal human kidney: implication for renal function. *Am J Physiol* 272:F460-F468, 1997
- KOSAKA T, MIYATA A, IHARA H, HARA S, SUGIMOTO T, TAKEDA O, TAKAHASHI E, TANABE T: Characterization of the human gene (PTGS2) encoding prostaglandin-endoperoxide synthase 2. *Eur J Biochem* 221:889-897, 1994
- KOTANI M, TANAKA I, OGAWA Y, USUI T, MORI K, ICHIKAWA A, NARUMIYA S, YOSHIMI T, NAKAO K: Molecular cloning and expression of multiple isoforms of human prostaglandin E receptor EP3 subtype generated by alternative messenger RNA splicing: multiple second messenger systems and tissue-specific distributions. *Mol Pharmacol* 48:869-879, 1995
- KOTANI M, TANAKA I, OGAWA Y, USUI T, TAMURA N, MORI K, NARUMIYA S, YOSHIMI T, NAKAO K: Structural organization of the human prostaglandin EP3 receptor subtype gene (PTGER3). *Genomics* 40:425-434, 1997
- KREIDBERG JA, DONOVAN MJ, GOLDSTEIN SL, RENNKE H, SHEPHERD K, JONES RC, JAENISCH R: Alpha 3 beta 1 integrin has a crucial role in kidney and lung organogenesis. *Development* 122:3537-3547, 1996
- KUHARA T, KAGAMI S, KURODA Y: Expression of beta 1-integrins on activated mesangial cells in human glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 8:1679-1687, 1997
- KUJUBU DA, FLETCHER BS, VARNUM BC, LIM RW, HERSCHMAN HR: 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, 1991
- KUNAPULI SP, FEN-MAO G, BASTEPE M, LIU-CHEN LY, LI S, CHEUNG PP, DERIEL JK, ASHBY B: Cloning and expression of a prostaglandin E receptor EP3 subtype from human erythroleukaemia cells. *Biochem J* 298:263-267, 1994

- LAEMMLI UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685, 1970
- LAGRUE G, HIRBEC G: Action du diclofenac dans les glomerulonephrites primitives chroniques. *Sem Hop* 55:1601-1605, 1979
- LAWRENCE RA, JONES RL: Investigation of the prostaglandin E (EP-) receptor subtype mediating relaxation of the rabbit jugular vein. *Br J Pharmacol* 105:817-824, 1992
- LIU SF, NEWTON R, EVANS TW, BARNES PJ: Differential regulation of cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 gene expression by lipopolysaccharide treatment in vivo in the rat. *Clin Sci* 90:301-306, 1996
- MALDVE RE, KIM Y, MUGA SJ, FISCHER SM: Prostaglandin E-2 regulation of cyclooxygenase expression in keratinocytes is mediated via cyclic nucleotide-linked prostaglandin receptors. *J Lipid Res* 41:873-881, 2000
- MASLINSKA D, GAJEWSKI M: Some aspects of the inflammatory process. *Folia Neuropathol* 36:199-204, 1998
- MCADAM BF, MARDINI IA, HABIB A, BURKE A, LAWSON JA, KAPOOR S, FITZGERALD GA: Effect of regulated expression of human cyclooxygenase isoforms on eicosanoid and isoeicosanoid production in inflammation. *J Clin Invest* 105:1473-1482, 2000
- MEYER-KIRCHRATH J, KUGER P, HOHLFELD T, SCHRÖR K: Analysis of a porcine EP3-receptor: cloning, expression and signal transduction. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 358:160-167, 1998
- MILAM SB, MAGNUSON VL, STEFFENSEN B, CHEN D, KLEBE RJ: IL-1 beta and prostaglandins regulate integrin mRNA expression. *J Cell Physiol* 149:173-183, 1991
- MILANO S, ARCOLEO F, DIELI M, D'AGOSTINO R, D'AGOSTINO P, DE-NUCCI G, CILLARI E: Prostaglandin E2 regulates inducible nitric oxide synthase in the murine macrophage cell line J774. *Prostaglandins* 49:105-115, 1995
- MITCHELL MD, TRAUTMAN MS: Molecular mechanisms regulating prostaglandin action. *Mol Cell Endocrinol* 93:C7-10, 1993
- MIZUNO H, SAKAMOTO C, MATSUDA K, WADA K, UCHIDA T, NOGUCHI H, AKAMATSU T, KASUGA M: Induction of cyclooxygenase 2 in gastric mucosal lesions and its inhibition by the specific antagonist delays healing in mice. *Gastroenterology* 112:387-397, 1997
- MORHAM SG, LANGENBACH R, LOFTIN CD, TIANO HF, VOULOUMANOS N, JENNETTE JC, MAHLER JF, KLUCKMAN KD, LEDFORD A, LEE CA: Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. *Cell* 83:473-482, 1995
- MULLER GA, MULLER CA, MARKOVIC LJ: Adhesion molecules in renal diseases. *Ren Fail* 18:711-724, 1996
- MULLER U, WANG D, DENDA S, MENESES JJ, PEDERSEN RA, REICHARDT LF: Integrin alpha8beta1 is critically important for epithelial-mesenchymal interactions during kidney morphogenesis. *Cell* 88:603-613, 1997

- MUSCARA MN, VERGNOLLE N, LOVREN F, TRIGGLE CR, ELLIOTT SN, ASFAHA S, WALLACE JL: Selective cyclo-oxygenase-2 inhibition with celecoxib elevates blood pressure and promotes leukocyte adherence. *Br J Pharmacol* 129:1423-1430, 2000
- NAMBA T, SUGIMOTO Y, NEGISHI M, IRIE A, USHIKUBI F, KAKIZUKA A, ITO S, ICHIKAWA A, NARUMIYA S: Alternative splicing of C-terminal tail of prostaglandin E receptor subtype EP3 determines G-protein specificity. *Nature* 365:166-170, 1993
- NANTEL F, MEADOWS E, DENIS D, CONNOLLY B, METTERS KM, GIAID A: Immunolocalization of cyclooxygenase-2 in the macula densa of human elderly. *FEBS Lett* 457:475-477, 1999
- NATARAJ C, THOMAS DW, TILLEY SL, NGUYEN MT, MANNON R, KOLLER BH, COFFMAN TM: Receptors for prostaglandin E(2) that regulate cellular immune responses in the mouse. *J Clin Invest* 108:1229-1235, 2001
- NEVILLE DM: Molecular weight determination of protein-dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system. *J Biol Chem* 246:6328-6334, 1971
- NIIRO H, OTSUKA T, TANABE T, HARA S, KUGA S, NEMOTO Y, TANAKA Y, NAKASHIMA H, KITAJIMA S, ABE M, ET al: Inhibition by interleukin-10 of inducible cyclooxygenase expression in lipopolysaccharide-stimulated monocytes: its underlying mechanism in comparison with interleukin-4. *Blood* 85:3736-3745, 1995
- NOGUCHI K, IWASAKI K, SHITASHIGE M, ENDO H, KONDO H, ISHIKAWA I: Cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin E2 down-regulates intercellular adhesion molecule-1 expression via EP2/EP4 receptors in interleukin-1beta-stimulated human gingival fibroblasts. *J Dent Res* 79:1955-1961, 2000
- NOGUCHI K, IWASAKI K, SHITASHIGE M, MURATO S, ISHIKAWA I: Prostaglandin E2 downregulates interferon-gamma-induced intercellular adhesion molecule-1 expression via EP2 receptors in human gingival fibroblasts. *Inflammation* 23:481-493, 1999
- NOGUCHI K, SHITASHIGE M, WATANABE H, MUROTA S, ISHIKAWA I: Interleukin-4 and interferon-gamma inhibit prostaglandin production by interleukin-1beta-stimulated human periodontal ligament fibroblasts. *Inflammation* 23:1-13, 1999
- O'BANION MK, SADOWSKI HB, WINN V, YOUNG DA: A serum- and glucocorticoid-regulated 4-kilobase mRNA encodes a cyclooxygenase-related protein. *J Biol Chem* 266:23261-23267, 1991
- O'DOWD BF, LEFKOWITZ RJ, CARON MG: Structure of the adrenergic and related receptors. *Annu Rev Neurosci* 12:67-83, 1989
- ODA T, KIMURA M, HISHIDA A, YAMASHITA A, SUZUKI Y, MIYASAKA M: Cell-to-cell interaction is required to induce proteinuria in in situ immune complex glomerulonephritis. *J Lab Clin Med* 132:112-123, 1998
- OGAWA Y, TANAKA I, INOUE M, YOSHITAKE Y, ISSE N, NAKAGAWA O, USUI T, ITOH H, YOSHIMASA T, NARUMIYA S, ET al: Structural organization and

- chromosomal assignment of the human prostacyclin receptor gene. *Genomics* 27:142-148, 1995
- OKA M, NEGISHI M, NISHIGAKI N, ICHIKAWA A: Two types of prostacyclin receptor coupling to stimulation of adenylate cyclase and phosphatidylinositol hydrolysis in a cultured mast cell line, BNU-2cl3 cells. *Cell Signal* 5:643-650, 1993
- OHNAKA K, NUMAGUCHI K, YAMAKAWA T, INAGAMI T: Induction of cyclooxygenase-2 by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 35:68-75, 2000
- OTTO JC, SMITH WL: Prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2. *J Lipid Mediat Cell Signal* 12:139-156, 1995
- PAIK JH, JU JH, LEE JY, BOUDREAU MD, HWANG DH: Two opposing effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the expression of the inducible cyclooxygenase - Mediation through different signaling pathways. *J Biol Chem* 275:28173-28179, 2000
- PASERO G, PALLA R, ORCIUOLO B: L'ibuprofen come antiflogistico e antiproteinurico in soggetti con malattia ulcerosa. *Minerva Med* 64:2497-2502, 1973
- PATEY N, LESAVRE P, HALBWACHS ML, NOEL LH: Adhesion molecules in human crescentic glomerulonephritis. *J Pathol* 179:414-420, 1996
- PATRONO C, PATRIGNANI P, GARCIA-RODRIGUEZ LA: Cyclooxygenase-selective inhibition of prostanoid formation: transducing biochemical selectivity into clinical read-outs. *J Clin Invest* 108:7-13, 2001
- PENNING TD, TALLEY JJ, BERTENSHAW SR, CARTER JS, COLLINS PW, DOCTER S, GRANETO MJ, LEE LF, MALECHA JW, MIYASHIRO JM, ROGERS RS, ROGIER DJ, YU SS, ANDERSON GD, BURTON EG, COGBURN JN, GREGORY SA, KOBOLDT CM, PERKINS WE, SEIBERT K, VEENHUIZEN AW, ZHANG YY, ISAKSON PC: Synthesis and biological evaluation of the 1,5-diarylpyrazole class of cyclooxygenase-2 inhibitors: identification of 4[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide (SC-58635, celecoxib). *J Med Chem* 40:1347-1365, 1997
- PERAZELLA MA, ERAS J: Are selective COX-2 inhibitors nephrotoxic? *Am J Kidney Dis* 35:937-940, 2000
- PERUZZI L, TRUSOLINO L, AMORE A, GIANOGLIO B, CIRINA P, BASSO G, EMANCIPATOR SN, MARCHISIO PC, COPPO R: Tubulointerstitial responses in the progression of glomerular diseases: albuminuria modulates alpha v beta 5 integrin. *Kidney Int* 50:1310-1320, 1996
- PORTER JC, HOGG N: Integrins take partners: cross-talk between integrins and other membrane receptors. *Trends Cell Biol* 8:390-396, 1998
- RAYCHOWDHURY MK, YUKAWA M, COLLINS LJ, MCGRIL SH, KENT KC, WARE JA: Alternative splicing produces a divergent cytoplasmic tail in the human endothelial thromboxane A2 receptor. *J Biol Chem* 269:19256-19261, 1994
- RENNER E, HELD E: Indometacin in der Behandlung der Proteinurie bei Glomerulonephritis. *Arzneimittelforschung* 21:1849-1851, 1971

- ROCCA B, SPAIN LM, CIABATTONI G, PATRONO C, FITZGERALD GA: Differential expression and regulation of cyclooxygenase isozymes in thymic stromal cells. *J Immunol* 162:4589-4597, 1999
- ROCHA JL, FERNANDEZ-ALONSO J: Acute tubulointerstitial nephritis associated with the selective COX-2 enzyme inhibitor, rofecoxib. *Lancet* 357:1946-1947, 2001
- ROGERS SA, PADANILAM BJ, HRUSKA KA, GIACHELLI CM, HAMMERMAN MR: Metanephric osteopontin regulates nephrogenesis in vitro. *Am J Physiol* 272:F469-F476, 1997
- ROY CP, HILLIS G, MCDONALD S, SIMPSON JG, POWER DA: Importance of the tubulointerstitium in human glomerulonephritis. II. Distribution of integrin chains beta 1, alpha 1 to 6 and alpha V. *Kidney Int* 52:103-110, 1997
- SAKAIRI Y, JACOBSON HR, NOLAND TD, BREYER MD: Luminal prostaglandin E receptors regulate salt and water transport in rabbit cortical collecting duct. *Am J Physiol* 269:F257-F265, 1995
- SALANT DJ, QUIGG RJ, CYBULSKY AV: Heymann nephritis: mechanisms of renal injury. *Kidney Int* 35:976-984, 1989
- SAMER A, MENKEL RA, ALWARSHETTY M, IBRAHIMBACHA AM: Celecoxib-induced nonoliguric acute renal failure. *Ann Pharmacother* 36, 52-54, 2002
- SANGER F, NICKLEN S, COULSON AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-5467, 1977
- SASAKI E, PAI R, HALTER F, KOMURASAKI T, ARAKAWA T, KOBAYASHI K, KUROKI T, TARNAWSKI AS: Induction of cyclooxygenase-2 in a rat gastric epithelial cell line by epiregulin and basic fibroblast growth factor. *J Clin Gastroenterol* 27 Suppl 1:S21-S27, 1998
- SAWAOKA H, TSUJI S, TSUJII M, GUNAWAN ES, SASAKI Y, KAWANO S, HORI M: Cyclooxygenase inhibitors suppress angiogenesis and reduce tumor growth in vivo. *Lab Invest* 79:1469-1477, 1999
- SCHERTLER GF, VILLA C, HENDERSON R: Projection structure of rhodopsin. *Nature* 362:770-772, 1993
- SCHMASSMANN A, PESKAR BM, STETTLER C, NETZER P, STROFF T, FLOGERZI B, HALTER F: Effects of inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase-2 in chronic gastro-intestinal ulcer models in rats. *Br J Pharmacol* 123:795-804, 1998
- SCHMID A, THI ERAUCH KH, SCHLEUNING WD, DINTER H: Splice variants of the human EP3 receptor for prostaglandin E2. *Eur J Biochem* 228:23-30, 1995
- SCHRÖR K: Prostaglandin-mediated actions of the renin-angiotensin system. *Arzneimittelforschung* 43:236-241, 1993
- SCHRÖR K, SEIDEL H: Blood-vessel wall arachidonate metabolism and its pharmacological modification in a new in vitro assay system. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 337:177-182, 1988
- SCHRÖR K: *Abciximab*. Dr. Schrör Verlag. Frechen, 2000

- SCHRÖR K: *Prostaglandine*. Georg Thieme Verlag. Stuttgart New York, 1984
- SEKSE I, IVERSEN BM, MORKRID L, OFSTAD J: Renal blood flow and glomerular filtration rate during the heterologous phase in passive Heymann nephritis in rats. *Nephron* 56:194-200, 1990
- SHIMOYA K, MORIYAMA A, MATSUZAKI N, OGATA I, KOYAMA M, AZUMA C, SAJI F, MURATA Y: Human placental cells show enhanced production of interleukin (IL)-8 in response to lipopolysaccharide (LPS), IL-1 and tumour necrosis factor (TNF)-alpha, but not to IL-6. *Mol Hum Reprod* 5:885-1999
- SILVERSTEIN FE, FAICH G, GOLDSTEIN JL, SIMON LS, PINCUS T, WHELTON A, MAKUCH R, EISEN G, AGRAWAL NM, STENSON WF, BURR AM, ZHAO WW, KENT JD, LEFKOWITH JB, VERBURG KM, GEIS GS: Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: A randomized controlled trial. Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study. *JAMA* 284:1247-1255, 2000
- SIMON KO, NUTT EM, ABRAHAM DG, RODAN GA, DUONG LT: The alphavbeta3 integrin regulates alpha5beta1-mediated cell migration toward fibronectin. *J Biol Chem* 272:29380-29389, 1997
- SLADOWSKI D, KINSNER A, LANGEZAAL I, KAY S, COECKE S: Activation of the complement system as an indicator of pyrogenic reaction to lipopolysaccharide (LPS). *Toxicol In Vitro* 15:339-342, 2001
- SMOCK SL, PAN LC, CASTLEBERRY TA, LU B, MATHER RJ, OWEN TA: Cloning, structural characterization, and chromosomal localization of the gene encoding the human prostaglandin E(2) receptor EP2 subtype. *Gene* 237:393-402, 1999
- STAHL RA: Die Bedeutung von Eikosanoiden bei glomerulären Erkrankungen. *Klin Wochenschr* 64:813-823, 1986
- STORCK JE, DUNN MJ: Hemodynamic roles of thromboxane a2 and prostaglandin e2 in glomerulonephritis. *J Pharmacol Exp Ther* 233:672-678, 1985
- TAKAHASHI N, TAKEUCHI K, SUGAWARA A, TANIYAMA Y, KATO T, WILCOX CS, ABE K, ITO S: Structure and transcriptional function of the 5'-flanking region of rat thromboxane receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 244:489-493, 1998
- TAKANO T, CYBULSKY AV, YANG X, AOUDJIT L: Complement C5b-9 induces cyclooxygenase-2 gene transcription in glomerular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 281:F841-F850, 2001
- TETSUKA T, DAPHNA ID, MILLER BW, GUAN Z, BAIER LD, MORRISON AR: Nitric oxide amplifies interleukin 1-induced cyclooxygenase-2 expression in rat mesangial cells. *J Clin Invest* 97:2051-2056, 1996
- TETSUKA T, DAPHNA ID, SRIVASTAVA SK, BAIER LD, DUMAINE J, MORRISON AR: Cross-talk between cyclooxygenase and nitric oxide pathways: prostaglandin E2 negatively modulates induction of nitric oxide synthase by interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:12168-12172, 1994

- THIEMERMANN C, ZACHAROWSKI K: Selective activation of E-type prostanoid(3)-receptors reduces myocardial infarct size. A novel insight into the cardioprotective effects of prostaglandins. *Pharmacol Ther* 87:61-67, 2000
- TILLEY SL, AUDOLY LP, HICKS EH, KIM HS, FLANNERY PJ, COFFMAN TM, KOLLER BH: Reproductive failure and reduced blood pressure in mice lacking the EP2 prostaglandin E2 receptor. *J Clin Invest* 103:1539-1545, 1999
- TOMASONI S, NORIS M, ZAPPELLA S, GOTTI E, CASIRAGHI F, BONAZZOLA S, BENIGNI A, REMUZZI G: Upregulation of renal and systemic cyclooxygenase-2 in patients with active lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol* 9:1202-1212, 1998
- TOPOL EJ, BYZOVA TV, PLOW EF: Platelet GPIIb-IIIa blockers. *Lancet* 353:227-231, 1999
- TOTH P, LI X, LEI ZM, RAO CV: Expression of human chorionic gonadotropin (hCG)/luteinizing hormone receptors and regulation of the cyclooxygenase-1 gene by exogenous hCG in human fetal membranes. *J Clin Endocrinol Metab* 81:1283-1288, 1996
- UENO A, MATSUMOTO H, NARABA H, IKEDA Y, USHIKUBI F, MATSUOKA T, NARUMIYA S, SUGIMOTO Y, ICHIKAWA A, OH-ISHI S: Major roles of prostanoid receptors IP and EP(3) in endotoxin-induced enhancement of pain perception. *Biochem Pharmacol* 62:157-160, 2001
- USHIKUBI F, SEGI E, SUGIMOTO Y, MURATA T, MATSUOKA T, KOBAYASHI T, HIZAKI H, TUBOI K, KATSUYAMA M, ICHIKAWA A, TANAKA T, YOSHIDA N, NARUMIYA S: Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nature* 395:281-284, 1998
- VANE JR, BAKHLE YS, BOTTING RM: Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:97-120, 1998
- WAHBA AL, SOPER C: Acute, anuric renal failure associated with two doses of a cyclooxygenase-2 inhibitor. *Nephron* 89:239, 2001
- WALLACE JL, BAK A, MCKNIGHT W, ASFAHA S; SHARKEY KA, MACNAUGHTON WK: Cyclooxygenase 1 contributes to inflammatory responses in rats and mice: implications for gastrointestinal toxicity. *Gastroenterology* 115:101-109, 1988
- WANG JL, CHENG HF, SHAPPELL S, HARRIS RC: A selective cyclooxygenase-2 inhibitor decreases proteinuria and retards progressive renal injury in rats. *Kidney Int* 57:2334-2342, 2000
- WARNER TD, GIULIANO F, VOJNOVIC I, BUKASA A, MITCHELL JA, VANE JR: Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:7563-7568, 1999
- WEAVER J, BONNEL RA, KARWOSKI CB, BRINKER AD, BEITZ J: GI events leading to death in association with celecoxib and rofecoxib. *Am J Gastroenterol* 96:3449-3450, 2001
- WILLOUGHBY DA, MOORE AR, COLVILLE NP: COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. *Lancet* 355:646-648, 2000

- WOLF G, PORTH J, STAHL RA: Acute renal failure associated with rofecoxib. *Ann Intern Med* 133:394, 2000
- XIE W, HERSCHMAN HR: Transcriptional regulation of prostaglandin synthase 2 gene expression by platelet-derived growth factor and serum. *J Biol Chem* 271:31742-31748, 1996
- XIE WL, CHIPMAN JG, ROBERTSON DL, ERIKSON RL, SIMMONS DL: Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:2692-2696, 1991
- YANG J, XIA M, GOETZL EJ, AN S: Cloning and expression of the EP3-subtype of human receptors for prostaglandin E2. *Biochem Biophys Res Commun* 198:999-1006, 1994
- YOKOCHI T: Strong activation of complement system by lipopolysaccharides (LPS) possessing mannose homopolysaccharides. *Jpn J Med Sci Biol* 43:248-249, 1990
- YOSHIMOTO T, NAGAI N, OHKUSU K, UEDA H, OKAMURA H, NAKANISHI K: LPS-stimulated SJL macrophages produce IL-12 and IL-18 that inhibit IgE production in vitro by induction of IFN-gamma production from CD3intIL-2R beta+ T cells. *J Immunol* 161:1483-1492, 1998
- YU CL, HUANG MH, KUNG YY, TSAI CY, TSAI YY, TSAI ST, HUANG DF, SUN KH, HAN SH, YU HS: Interleukin-13 increases prostaglandin E2 (PGE2) production by normal human polymorphonuclear neutrophils by enhancing cyclooxygenase 2 (COX-2) gene expression. *Inflamm Res* 47:167-173, 1998
- YUCEL LT, NILSSON S, MODEER T: Signal transduction pathways involved in the synergistic stimulation of prostaglandin production by interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha in human gingival fibroblasts. *J Dent Res* 78:61-68, 1999
- ZHONG WW, BURKE PA, DROTAR ME, CHAVALI SR, FORSE RA: Effects of prostaglandin E2, cholera toxin and 8-bromo-cyclic AMP on lipopolysaccharide-induced gene expression of cytokines in human macrophages. *Immunology* 84:446-452, 1995

7 Veröffentlichungen im Rahmen dieser Arbeit

Veröffentlichungen in Fachzeitschriften

1. Waldner C, Heise G, Meyer-Kirchrath J, Schrör K, Grabensee B, Heering P: Selective cyclooxygenase-2 inhibition upregulates renal cortical α_v -integrin expression. *Exp Nephrol (im Druck)*
2. Waldner C, Heise G, Schrör K, Grabensee B, Heering P: Expression of renocortical prostaglandin receptors in passive Heymann nephritis – influence of selective COX-2 inhibition. *(in Vorbereitung)*

Kurzartikel (Abstracts)

1. Waldner C, Heise G, Schrör K, Grabensee B, Heering P: Selective inhibition of cyclooxygenase-2 influences the expression of renal α_v -integrins. *Kidney Blood Press Res* 23: 226, 2000
2. Heise G, Waldner C, Schrör K, Grabensee B, Heering P: The selective cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib influences COX-2 expression in rats with passive Heymann nephritis. *Kidney Blood Press Res* 23: 268, 2000
3. Waldner C, Heise G, Heering P, Schrör K: COX-2 derived prostaglandin E_2 regulates renal cortical EP_3 receptor expression. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 363 (Suppl. 4): R 114, 2001
4. Waldner C, Heise G, Schrör K, Grabensee B, Heering P: COX-2 inhibition in passive Heymann nephritis downregulates renal cortical EP_3 receptor expression. *Kidney Blood Press Res* 24: 347, 2001
5. Heise G, Waldner C, Schrör K, Heering P, Grabensee B: Impact of mycophenolate mofetil (MMF) on COX-2 expression in rats with passive Heymann nephritis (PHN). *Kidney Blood Press Res* 24: 347, 2001
6. Waldner C, Heise G, Schrör K, Grabensee B, Heering PJ: Inhibition of cyclooxygenase-2 affects the expression of renal cortical α_v -integrins. *J Am Soc Nephrol* 12: 579A, 2001
7. Heise G, Waldner C, Schrör K, Grabensee B, Heering PJ: COX-2 inhibition in passive Heymann nephritis downregulates renal cortical EP_3 receptor expression. *J Am Soc Nephrol* 12: 652A, 2001
8. Waldner C, Heise G, Schrör K, Grabensee B, Heering PJ: Expression of renocortical prostaglandin receptors in passive Heymann nephritis – influence of selective COX-2 inhibition. *J Am Soc Nephrol (im Druck)*
9. Waldner C, Heise G, Schrör K, Grabensee B, Heering P: COX-2 dependent PGE_2 downregulates α_v integrin expression via the EP_3 receptor in cultured mesangial cells. *Kidney Blood Press Res (im Druck)*

10. Heise G, Waldner C, Schrör K, Heering P, Grabensee B: The influence of celecoxib on differential expression patterns of prostaglandin receptors in the cortex of nephritic rats. *Kidney Blood Press Res* (im Druck)

8 Danksagungen

9 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, daß ich die vorliegende Doktorschrift selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt, den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe, und daß diese Doktorschrift an keiner anderen Fakultät eingereicht worden ist.

Düsseldorf, den

10 Lebenslauf

Christoph Waldner
Heinickestr. 75
45128 Essen

geb. 28. 2. 1973 in Bottrop

-
- | | |
|-------------------|--|
| seit 4/1999 | Wissenschaftlicher Angestellter der Klinik für Nephrologie und Rheumatologie, Universitätsklinikum Düsseldorf. |
| 2/1998 – 3/1999 | Berufspraktisches Jahr für Lebensmittelchemiker. |
| 2/98 – 4/98 | Firma alcum, Rietberg. |
| 5/98 – 6/98 | Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt,
Schwelm. |
| 7/98 – 3/99 | Chemisches Untersuchungsamt, Hagen. |
| | <i>Zweites Staatsexamen in Lebensmittelchemie.</i> |
| 10/1993 – 11/1997 | Studium der Lebensmittelchemie an der Universität Wuppertal. |
| | <i>Erstes Staatsexamen in Lebensmittelchemie.</i> |
| 8/1992 – 10/1993 | Zivildienst an der Traugott-Weise-Schule für Geistigbehinderte,
Essen. |
| 8/1983 – 7/1992 | Städtisches Ratsgymnasium, Gladbeck. |
| | <i>Abitur.</i> |

Düsseldorf, den