

Aus dem Medizinischen Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. R. F. Maier

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,

Standort Marburg

AG Molekulare und Experimentelle Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. R. M. Nüsing

# **Einfluss der Elektrolyte auf primär kultivierte Nierenepithelzellen**

## **Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Andrea Koch**

aus Frankfurt a.M.

Marburg, 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 23.02.2009

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. R. M. Nüsing

1. Koreferent: PD Dr. U. Kuhlmann

---

## Zusammenfassung

Das Hyperprostaglandin-E<sub>2</sub>-Syndrom gehört zu den hereditären Salzverlusttubulopathien mit hypokaliämischer Alkalose. Bei dieser angeborenen Nierenerkrankung kommt es zu starken Salz- und Wasserverlusten mit schwerwiegenden Komplikationen. Gleichzeitig findet sich bei der Erkrankung ein Anstieg von Prostaglandin E<sub>2</sub>.

Dem Zusammenhang zwischen salzverändertem Milieu in der Nierenzelle und Produktion von Prostaglandinen widmen sich zahlreiche medizinisch-molekularbiologische Studien. In der vorliegenden Arbeit beschäftige ich mich mit dem noch nicht abschließend aufgeklärten Prostaglandinsyntheseweg. Im Mittelpunkt meiner Arbeit steht dabei die Untersuchung des spezifischen Auslösers für die Prostaglandinbildung, sowie der Beteiligung verschiedener Enzyme, wie der Cyclooxygenasen, der MAP Kinasen und der Proteinkinase C. Dabei arbeitete ich mit einem experimentellen Zellmodell mit primär kultivierten Schweinenierenepithelzellen. Durch Stimulation der Zellen mit unterschiedlichen Salzmedien und unter Zugabe von spezifischen Enzyminhibitoren untersuchte ich die Expression der Cyclooxygenasen auf RNA Ebene und per ELISA Test die Prostaglandin-E<sub>2</sub>-Synthese.

Nierenepithelzellen produzieren in nativem Zustand nur geringe Mengen an Prostaglandinen. Bei Inkubation der Zellen in hypoosmolarem Milieu wurde ein deutlicher Anstieg von PGE<sub>2</sub> um das rund 70-fache beobachtet. Für eine zentrale Rolle des Chlorids als Reiz zur PGE<sub>2</sub>-Synthese konnte kein Anhaltspunkt gefunden werden. Die Frage, welche Cyclooxygenase den stärkeren Einfluss auf die Produktion von PGE<sub>2</sub> ausübt, ließ sich in den Untersuchungen nicht abschließend klären. Zwar zeigten die mRNA Ergebnisse v.a. eine gesteigerte COX-2 Expression, bei der Auswertung der PGE<sub>2</sub>-Werte per ELISA Test jedoch konnte keine ausschließliche Beteiligung der COX-2 ermittelt werden. Die Versuche mit den Enzymhemmern der MAP Kinasen und der Proteinkinase C ließen vermuten, dass beide Enzymgruppen an der Expression von COX-2 und auch der PGE<sub>2</sub>-Synthese beteiligt sind. Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich, dass das hier verwendete Zellmodell gut zur Aufklärung der Fragestellung geeignet ist.

## Summary

The antenatal Bartter's syndrome belongs to inherited salt-losing tubulopathies with hypokalemic alkalosis. This congenital kidney disease leads to severe fluid and electrolyte disturbances in the neonate with fatal complications. The elevated level of prostaglandins is characteristic for this disease.

Many medical and biomolecular trials address to the correlation between the salt-modified setting in the kidney cells and the production of prostaglandins. In the present work I am concerned with the not final resolved way of prostaglandin synthesis. The analysis of the specific cause for the rise of prostaglandins, as well as the involvement of different enzymes, like the cyclooxygenases, the MAP kinases and proteinkinase C is in the focus of my work. Thereby, I worked with an experimental cell model of primary cultivated kidney epithelial cells. By stimulating the cells with different types of salt medias and by adding specific enzyme inhibitors I analysed the expression of cyclooxygenases on the RNA level as well as the prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis by ELISA test.

Kidney epithelial cells in native state produce only a rare amount of prostaglandins. By incubating the cells in a hypoosmolaric medium an 70-fold rise of PGE<sub>2</sub> was demonstrated. The central role of chloride as an adequate stimulus for the PGE<sub>2</sub> synthesis could not be proved. The question, which cyclooxygenase has more influence on the production of PGE<sub>2</sub>, could not be clarified finally in the present examination. Though the mRNA results demonstrated an increased expression of COX-2, it was not possible to detect an exclusive involvement of COX-2 by analysing the PGE<sub>2</sub> values by ELISA test. The examinations with the enzyme inhibitors of MAP kinases and proteinkinase C foreshadow an involvement of both enzyme groups in the expression of COX-2 and the PGE<sub>2</sub> synthesis. In the course of this work the suitability of the present used cell model for the clarification of the outlined questions was revealed.

# I. Inhaltsverzeichnis

|      |   |    |
|------|---|----|
| I.   | Inhaltsverzeichnis .....  | 5  |
| II.  | Abkürzungsverzeichnis .....   | 7  |
| III. | Einleitung .....  | 9  |
| A.   | Hereditäre Salzverlusttubulopathien mit hypokaliämischer Alkalose ..... | 11 |
| 1.   | Beschreibung der Krankheitsbilder .....                                 | 11 |
| 2.   | Molekularbiologische Grundlagen .....                                   | 12 |
| 3.   | Therapie und Prognose .....   | 16 |
| B.   | Prostaglandine .....  | 17 |
| 1.   | Physiologische Effekte der Prostaglandine .....                         | 17 |
| 2.   | Prostaglandinsynthese .....   | 21 |
| 3.   | Pharmakologische Beeinflussung der Prostaglandinsynthese .....          | 22 |
| C.   | Bedeutung der Cyclooxygenasen-1 und -2 in der Niere .....               | 24 |
| 1.   | Allgemeines .....   | 24 |
| 2.   | COX-2 Expression in der Niere .....                                     | 25 |
| IV.  | Zielsetzung .....   | 28 |
| V.   | Material und Methoden .....   | 29 |
| A.   | Material .....  | 29 |
| 1.   | (Bio-) Chemikalien .....  | 29 |
| 2.   | Zellen .....  | 31 |
| 3.   | Enzyme und Nucleinsäuren .....  | 31 |
| 4.   | Instrumente und Apparaturen .....                                       | 31 |
| 5.   | Software .....  | 33 |
| B.   | Methoden .....  | 34 |
| 1.   | Isolation von mTAL-Zellen aus Schweinenieren .....                      | 35 |
| 2.   | Zellkultur .....  | 35 |
| 3.   | Isolierung und Quantifizierung von RNA .....                            | 37 |
| 4.   | DNase Verdau .....  | 39 |
| 5.   | Reverse Transkription .....   | 39 |
| 6.   | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....                                   | 40 |
| 7.   | Kontrolle .....   | 42 |
| 8.   | Gelelektrophorese und Geldokumentation .....                            | 42 |

---

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 9.    | Prostaglandin-E <sub>2</sub> -ELISA .....                                 | 43 |
| 10.   | Statistik.....  | 44 |
| VI.   | Ergebnisse .....  | 46 |
| A.    | PGE <sub>2</sub> -Bildung in 6 verschiedenen Stimulationsmedien.....      | 46 |
| 1.    | PGE <sub>2</sub> -Bildung.....  | 46 |
| 2.    | Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die PGE <sub>2</sub> -Bildung..... | 50 |
| B.    | mRNA-Expression in 6 verschiedenen Stimulationsmedien .....               | 60 |
| 1.    | mRNA-Expression .....   | 60 |
| 2.    | mRNA-Expression unter Zusatz von Inhibitoren.....                         | 67 |
| VII.  | Diskussion .....  | 74 |
| VIII. | Ausblick .....  | 78 |
| IX.   | Anhang .....  | 79 |
| A.    | Literaturverzeichnis.....   | 79 |
| B.    | Lebenslauf.....   | 84 |
| C.    | Verzeichnis der akademischen Lehrer .....                                 | 86 |
| D.    | Danksagung.....   | 87 |
| E.    | Ehrenwörtliche Erklärung .....  | 88 |

## II. Abkürzungsverzeichnis

|                     |   |
|---------------------|---|
| ACE                 | Angiotensin converting enzyme   |
| ADH                 | Antidiuretisches Hormon   |
| ADP(ATP)            | Adenosindi-(tri-)phosphat   |
| <b>BARTTIN</b>      | Untereinheit des basolateralen Chloridkanals  |
| Bp                  | Basenpaare  |
| BS                  | Bartter Syndrom   |
| BSA                 | Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)   |
| BSLT                | Bartter like SLT  |
| CaSR                | Calcium sensing receptor  |
| cDNA                | complementary Desoxyribonucleinsäure (deoxyribonucleinacid)   |
| CIC-Kb              | basolateraler Chloridkanal  |
| COX                 | Cyclooxygenase  |
| cTAL(mTAL)          | kortikaler/medullärer dicker aufsteigender Ast der Henle Schleife (cortical/medullar thick ascending limb of Henle) |
| <b>DEPC</b>         | Diethylpyrocarbonat   |
| DMEM                | Dulbecco`s modifiziertes Eagle`s Medium   |
| DMSO                | Dimethylsulfoxid  |
| dNTP                | Desoxyribonucleosidtriphosphat  |
| DTT                 | Dithiothreitol  |
| <b>EDTA</b>         | Ethylendiamintetraacetat  |
| ELISA               | enzyme linked immuno sorbent assay  |
| ERK                 | extracellular signal-regulated kinase   |
| FSLT                | Furosemid like SLT  |
| <b>GFR</b>          | Glomeruläre Filtrationsrate   |
| GM                  | Grundmedium   |
| GTP                 | Guanosintriphosphat   |
| <b>HM</b>           | Hypoosmolares Medium  |
| HCl                 | Salzsäure   |
| H <sub>2</sub> O-MQ | Zweifach destilliertes Wasser mit einem Widerstand von 18,2 mΩ  |
| <b>IL</b>           | Interleukin   |
| <b>JNK</b>          | c-jun-N-terminal-kinase   |

---

|                         |  |
|-------------------------|--|
| <b>KCl</b>              | Kaliumchlorid  |
| <b>LT</b>               | Leukotriene  |
| <b>MAPK</b>             | mitogen activated protein kinase                           |
| <b>MgCl<sub>2</sub></b> | Magnesiumchlorid   |
| <b>mRNA</b>             | messenger Ribonucleinsäure (ribonucleic acid)              |
| <b>NaCl</b>             | Natriumchlorid   |
| <b>NCCT</b>             | Natriumchlorid Kotransporter                               |
| <b>NKCC2</b>            | Natrium-Kalium-2-Chlorid-Kanal                             |
| <b>NSAR</b>             | Nichtsteroidale Antirheumatika                             |
| <b>PBS</b>              | Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline) |
| <b>PCR</b>              | Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)      |
| <b>PG</b>               | Prostaglandin  |
| <b>PGE-S</b>            | PGE-Synthase   |
| <b>PKC</b>              | Proteinkinase C  |
| <b>PLC</b>              | Phospholipase C  |
| <b>RAA</b>              | Renin-Angiotensin-Aldosteron System                        |
| <b>RBF</b>              | Renaler Blutfluss  |
| <b>Rpm</b>              | Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)            |
| <b>ROMK</b>             | luminaler Kaliumkanal                                      |
| <b>RT</b>               | Reverse Transkription                                      |
| <b>SLT</b>              | salt losing tubulopathy                                    |
| <b>Std</b>              | Standard   |
| <b>TAE</b>              | Puffer aus Trisbase, Eisessig und EDTA                     |
| <b>TGF</b>              | Tubuloglomerulärer feedback                                |
| <b>TNF</b>              | Tumornekrosefaktor   |
| <b>TRIS</b>             | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan                            |
| <b>TSLT</b>             | Thiazid like SLT   |
| <b>TXA<sub>2</sub></b>  | Thromboxan A <sub>2</sub>                                  |



### III. Einleitung

*Die amerikanischen Pädiater Rosenbaum und Hughes berichteten 1957 erstmals von einem 2 Monate alten Patienten mit Diarrhoe, anhaltender hypokaliämischer Alkalose, Hyposthenurie, Dehydratation und therapieresistenter Gedeihstörung. Der Junge verstarb in extremer Dystrophie mit 7 ½ Monaten [Rosenbaum et al. 1957]. Bartter et al. beschrieben Anfang der 60er Jahre ähnliche Fälle mit hypokaliämischem Salzverlust und prägten damit den Begriff des „Bartter-Syndroms“ [Bartter et al. 1962].*

Auch heute ist die genaue Aufklärung der pathophysiologischen und molekulargenetischen Zusammenhänge dieses 1957 erstmals beschriebenen Krankheitsbildes ein aktives Feld der medizinischen Forschung. Mittlerweile ist bekannt, dass es sich dabei um eine Gruppe von genetisch bedingten Erkrankungen handelt, bei denen dem Körper aufgrund unterschiedlicher Defekte in der Niere Salz entzogen wird [Seyberth et al. 2001]. Spezielle Ionenkanäle im Kanalsystem (Tubulussystem) der Niere verlieren die Fähigkeit, wichtige Salze vor dem Ausscheiden wieder zurück zu resorbieren. Dieser Verlust von Salzen ist der Auslöser einer Kette von Fehlfunktionen, die die oben beschriebenen lebensbedrohlichen Symptome hervorrufen.

Ein Subtyp dieser angeborenen Salzverlusterkrankungen (oder -tubulopathien) ist das **antenatale Bartter-Syndrom** oder auch **Hyperprostaglandin-E<sub>2</sub>-Syndrom** genannt. Dabei wird neben dem Salzverlust in der Niere ein auffällig erhöhter Prostaglandinspiegel (PGE<sub>2</sub>) beobachtet [Seyberth et al. 1985, 1987, 1998]. Die angestiegene Prostaglandinkonzentration wiederum trägt wesentlich zu den gravierenden Auswirkungen der Erkrankung bei. Deshalb ist die Aufklärung des genauen Mechanismus, der zu der vermehrten Prostaglandin-E<sub>2</sub>- (PGE<sub>2</sub>-) Bildung führt, von großer Bedeutung.

Die folgende Arbeit beschäftigt sich mit genau diesem Zusammenhang zwischen Salzverlust und der Synthese von PGE<sub>2</sub>. Es wird angenommen, dass die veränderte Elektrolytzusammensetzung in der Nierenzelle beim antenatalen Bartter-Syndrom den Anstoß zur PGE<sub>2</sub>-Bildung gibt [Kömhoff et al. 2000, Yang et al. 2000]. Anhand eines Zellmodells simulierte ich die Krankheit durch künstliches Einstellen eines salzreduzierten Milieus in Schweinenierenepithelzellen. In experimentellen Untersuchungen ging ich dann der Frage nach, ob tatsächlich die Elektrolytveränderung Auslöser für die angestiegene PGE<sub>2</sub>-Bildung ist und welche Art dabei die größere Rolle spielt, ob die Hypoosmolarität an sich, das Fehlen von

Natriumchlorid oder nur der spezielle Entzug von Natrium, bzw. Chlorid. Darüber hinaus steht v.a. die Analyse der einzelnen Zwischenschritte der PGE<sub>2</sub>-Synthese im Mittelpunkt dieser Arbeit. Als wichtige Faktoren in dieser Synthesekette angesehen und im weiteren untersucht werden verschiedene Enzyme, wie Cyclooxygenase 1 und 2 [Harris u. Breyer 2001], MAP-Kinasen [Yang et al. 2000, Cheng et al. 2000, Tian et al. 2000] und die Proteinkinase C [Veza et al. 1996].

In der Einleitung wird nun zuerst der Ausgangspunkt dieser Arbeit, die hereditären Salzverlusttubulopathien mit hypokaliämischer Alkalose, bzw. genauer: das **Hyperprostaglandin-E<sub>2</sub>-Syndrom** vorgestellt. Anschließend werden die Bedeutung der Prostaglandine im menschlichen Organismus, sowie speziell in der Niere, ihr Wirkmechanismus, ihre Bildung, sowie Möglichkeiten der Synthesehemmung aufgezeigt. Am Ende der Einleitung wird dann der Schwerpunkt dieser Arbeit erläutert, nämlich die Bedeutung der Cyclooxygenasen, sowie beteiligter Faktoren (MAP-Kinasen, Proteinkinase C) bei Salzverlust-induzierter Prostaglandinbildung.

---

## **A. Hereditäre Salzverlusttubulopathien mit hypokaliämischer Alkalose**

### **1. Beschreibung der Krankheitsbilder**

Bei den hereditären Salzverlusttubulopathien handelt es sich um eine Gruppe autosomal-rezessiv vererbbarer Erkrankungen der Niere, die alle mit starkem Salzverlust, aktiviertem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System mit entsprechender Entwicklung einer hypokaliämischen Alkalose bei normalem Blutdruck einhergehen. Unterscheiden lassen sich dabei 3 Varianten hinsichtlich: Manifestationsalter, Urinosmolalität, renaler Kalziumexkretion, Serummagnesiumspiegel und damit verbundener spezifischer Symptomatik [Seyberth et al. 2001].

Während es sich beim **Gitelman-Syndrom** (Variante 1) und dem **klassischen Bartter-Syndrom** (Variante 2) um noch relativ milde Krankheitsverläufe handelt, die sich meist auch erst ab dem Schulkindalter entwickeln, stellt das **antenatale Bartter-Syndrom** oder auch **Hyperprostaglandin-E<sub>2</sub>-Syndrom** (Variante 3) schon vor der Geburt eine akute Lebensbedrohung dar [Klaus et al. 2004].

#### **Hyperprostaglandin-E<sub>2</sub>-Syndrom**

Bei dem Hyperprostaglandin-E<sub>2</sub>-Syndrom handelt es sich um ein schweres Krankheitsbild, das sich schon während der Schwangerschaft manifestiert [Seyberth et al. 1998, 2001, Peters et al. 2002]. Die fetale Polyurie führt gegen Ende des 2. Trimenons zur Ausbildung eines Polyhydramnions und damit zur Gefahr der Frühgeburtlichkeit. Postnatal bleibt die massive, lebensgefährliche Polyurie und Salurese mit Iso- und Hyposthenurie bestehen. Im weiteren Verlauf entwickelt sich dann eine hypokaliämische Alkalose und Hyperkalzurie, welche meist schon in den ersten Lebenswochen zu einer Nephrokalzinose führt [McCrediee et al. 1971, 1974, Fanconi et al. 1971]. Typisch ist der gleichzeitige Anstieg von PGE<sub>2</sub> und dessen Hauptmetaboliten PGE-M [Seyberth et al. 1987]. Somit treten PGE<sub>2</sub>-bedingt systemische Symptome, wie Fieber, Erbrechen, sekretorische Diarrhoe und Osteopenie auf [Seyberth et al. 1998]. Bei nicht adäquater Behandlung wird in der Folge eine ausgeprägte Dystrophie und Wachstumsretardierung beobachtet [Seidel et al. 1995].

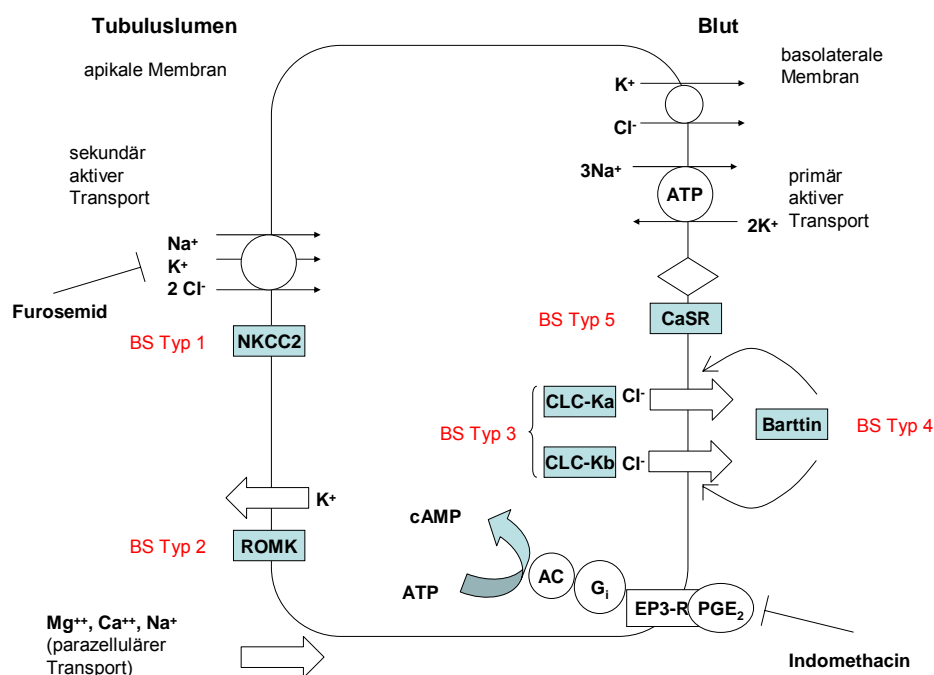
## 2. Molekularbiologische Grundlagen

Durch sorgfältige klinische Beobachtung und pharmakologische Untersuchungen bemerkte man Ende der 80er Jahre, dass die Symptomatik, sowie biochemische und pharmakologische Merkmale der verschiedenen Salzverlusttubulopathien dem Bild einer Langzeitbehandlung mit Thiaziden oder Schleifendiuretika (Medikamente zur Entwässerung) glichen [Puschett et al. 1988, Sutton et al. 1992, Köckerling et al. 1996]. Durch neue molekulargenetische und pharmakologische Studien konnte man in den letzten 10 Jahren nachweisen, dass es sich um mehrere pathophysiologisch eigenständige Erkrankungen des tubulären Ionentransports in der Niere handelt [Hebert 2003]. So hat man die krankheitsrelevanten Kanäle im Tubulussystem der Niere und die entsprechenden Gendefekte identifizieren können. In **Tabelle 1** wird ein Überblick über die verschiedenen Varianten der hereditären Salzverlusttubulopathien (salt losing tubulopathies, SLT) gegeben [Köckerling et al. 1998, Hebert 2003].

| Klassifikation          | Synonym  | Transportdefekt  | Mutiertes Gen                 |
|-------------------------|--|--|-------------------------------|
| Thiazid-SLT<br>(TSLT)   | <b>Gitelman-Syndrom</b>  | <i>NCCT</i>  | SLC12A3                       |
| Bartter-SLT<br>(BSLT)   | <b>Klassisches Bartter-Syndrom</b>                               | <i>CLC-Kb</i> (BS Typ 3)   | CLCNKB                        |
| Furosemid-SLT<br>(FSLT) | <b>Hyperprostaglandin-E-Syndrom/ antenatales Bartter Syndrom</b> | <i>NKCC2</i> (BS Typ 1)<br><i>ROMK</i> (BS Typ 2)<br><i>BARTTIN</i> (BS Typ 4)<br><i>CaSR</i> (BS Typ 5) | SLC12A1<br>KCNJ1<br>BSND<br>? |

**Tabelle 1** Klassifikation der hereditären Salzverlusttubulopathien (SLT) mit hypokaliämischer Alkalose. SLT Salt losing tubulopathy, BS Bartter Syndrom.

Die krankheitsrelevanten Ionenkanäle der Salzverlusttubulopathien (SLT) befinden sich in verschiedenen Abschnitten des Tubulussystems der Niere. Bei der FSLT und BSLT liegen die Kanalmutationen im dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife (**Abbildung 1**). Hingegen findet man die defekten Kanäle bei der TSLT im distalen Tubulusabschnitt. Im Folgenden wird nun der Weg der Elektrolyte zwischen Nierentubulus und der Blutbahn über die Nierenepithelzelle beschrieben, der für die FSLT relevant ist.



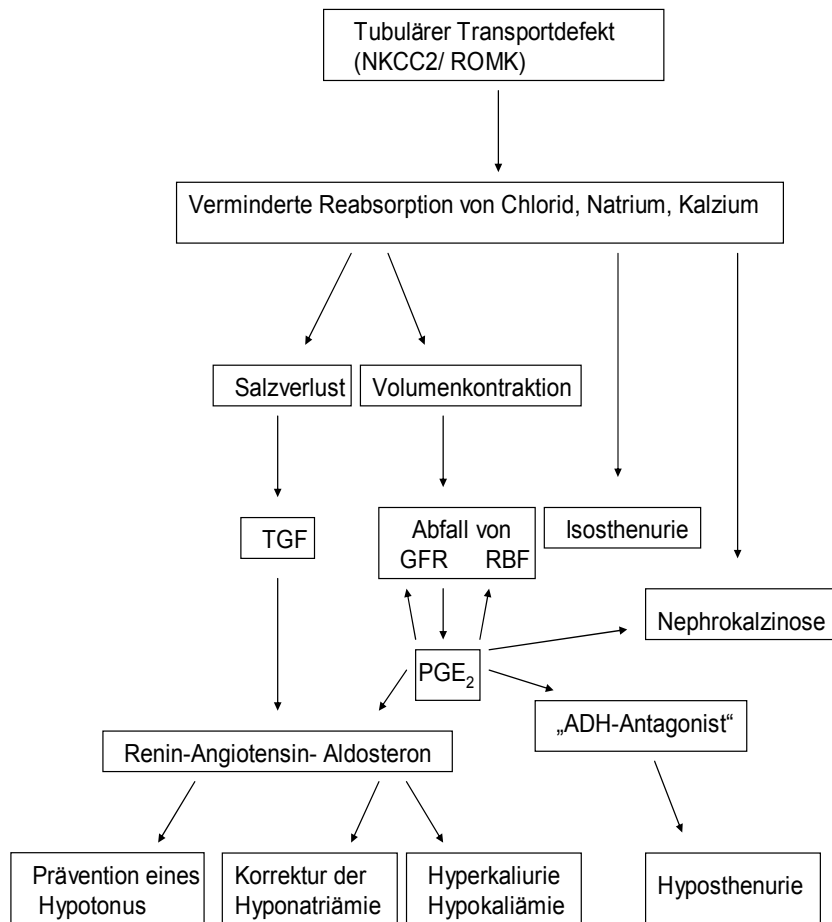
**Abbildung 1** Schematische Darstellung einer Nierenepithelzelle im dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife und ihrer Ionenkanäle, die bei Furosemid- oder Bartter-ähnlicher Salzverlusttubulopathie betroffen sind [Hebert 2003].

In **Abbildung 1** sind anhand einer schematisch dargestellten Nierenepithelzelle des aufsteigenden Astes der Henle-Schleife die einzelnen betroffenen Ionenkanäle bei der FSLT dargestellt [Hebert 2003]. Im Tubulussystem der Niere folgt die Kochsalz ( $\text{NaCl}$ )-Resorption dem durch die basolaterale  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -Pumpe geschaffenen elektrochemischen Gradienten.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$  werden durch den *NKCC2* aufgenommen. Die Funktion dieses Transporters ist eng an das Kalium-Recycling zurück ins Lumen durch den *ROMK* und die Chloridresorption ins Interstitium (Gewebe) via *CLC-Kb* gebunden. Diese durch den solitären Kaliumrücktransport und Chloridreflux entstandene Potentialdifferenz über der Membran ist dabei die Triebkraft für die parazelluläre Absorption von Kalzium und Magnesium.

Ist nun eine der Transportkomponenten defekt, kommt es zum Erliegen der Kochsalzresorption und damit zum typischen Bild der **Furosemid-ähnlichen Salzverlusttubulopathie** (FSLT). Damit führen Defekte in unterschiedlichen Genen zur gleichen Erkrankung: Dies betrifft das Gen für den apikalen Na-K-Cl-Kotransporter *NKCC2*, den luminalen Kaliumkanal *ROMK*, eine funktionelle Untereinheit des basolateralen Chloridkanals *CLC-Kb* (*BARTTIN*), bzw. die Gene von *CLC-Ka* und *CLC-Kb*, sowie für den Calcium-sensing-Rezeptor *CaSR*.

Für den Krankheitsverlauf spielt darüber hinaus bei der FSLT der beobachtete deutlich erhöhte Prostaglandin  $E_2$ -Spiegel eine zentrale Rolle (**Abbildung 2**). Aufgrund des Salzverlustes und der damit verbundenen Reduktion des Flüssigkeitsvolumens im Körper sinkt ebenfalls die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) in der Niere, also der Anteil des Blutvolumens, der pro Zeiteinheit durch die Glomerula filtriert wird, sowie der renale Blutfluss (RBF). Zur Aufrechterhaltung der Nierendurchblutung wird reflektorisch  $PGE_2$  freigesetzt. Dieses bewirkt eine Aktivierung des RAA (Renin-Angiotensin-Aldosteron)-Systems, welches einem Hypotonus entgegenarbeitet. Dadurch tritt allerdings ein weiterer Kaliumverlust auf. Zusätzlich hemmt  $PGE_2$  vermutlich  $EP_3$ -vermittelt den Chloridkanal *CLC-Kb* (**Abbildung 1**) und es entsteht ein Circulus vitiosus, infolge welchem dem Körper zunehmend Salz und Wasser entzogen wird. Am Sammelrohr antagonisiert  $PGE_2$  darüber hinaus die ADH (antidiuretisches Hormon)-abhängige Wasserresorption und den Natriumtransport, was zu einer Hyposthenurie führt. Somit aggraviert Prostaglandin  $E_2$  ganz wesentlich den tubulären Wasser- und Elektrolytverlust.

Aufgrund der vielfältigen Auswirkungen von Prostaglandin  $E_2$  sind die genauen Mechanismen, die zur vermehrten Synthese von  $PGE_2$  führen, von großem Interesse. Die Grundzüge dieser Mechanismen stellen den Schwerpunkt dieser Arbeit dar und werden in den folgenden Kapiteln **III.B** und **III.C** näher erläutert.



**Abbildung 2** Vermuteter Einfluss von PGE<sub>2</sub> auf die Furosemid-ähnliche Salzverlusttubulopathie [Köckerling et al. 1998]. TGF Tubuloglomerulärer Feedback, RBF Renaler Blutfluss, GFR Glomeruläre Filtrationsrate, ADH Antidiuretisches Hormon.

---

### 3. Therapie und Prognose

Aufgrund der genetischen Ursache der Erkrankungen ist eine Heilung im eigentlichen Sinne noch nicht möglich. Dennoch lassen sich die Salzverlusttubulopathien symptomatisch behandeln. Essentiell ist natürlich die bestmögliche Einstellung des Wasser- und Elektrolythaushaltes durch Substitution der verlorenen Mineralstoffe, bzw. Einschränkung weiterer Verluste durch kaliumsparende Diuretika, sowie ganz wesentlich die Suppression der PGE<sub>2</sub>-Synthese durch sogenannte Cyclooxygenase (COX)-Inhibitoren, auf die in den nächsten beiden Kapiteln eingegangen wird (siehe **Kapitel III.B** und **III.C**). Weiterhin konzentriert man sich auf die Linderung der Symptome, wie Schmerzen, Fieber, Krämpfe etc.

Aufgrund der engen therapeutischen Breite der COX-Hemmer, wie Indomethacin, besteht allerdings die Gefahr des Nierenversagens. Außerdem muss erwähnt werden, dass COX-Hemmstoffe als Antipyretika das Auftreten von Infektionskrankheiten verschleiern können. Auch eine Analgetika-Nephropathie lässt sich nach jahrelanger Therapie nicht ausschließen.

Die Prognose ist einerseits abhängig vom Grad der Frühgeburtlichkeit (bei der FSLT), andererseits von der postpartalen Einstellung des Wasser- und Elektrolythaushaltes. So kann es durch damit verbundene Probleme bei einigen FSLT-Patienten zur psychomotorischen Retardierung kommen. Darüber hinaus wurde bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen vereinzelt über chronisch progredientes Nierenversagen berichtet, wobei man aber nicht sicher ist, ob die Ursache in der Erkrankung selbst oder in ihrer Behandlung liegt [Klaus et al. 2004].



## **B. Prostaglandine**

Um den Zusammenhang zwischen Elektrolytveränderungen in der Nierenzelle und Prostaglandinen zu erkennen, gibt das folgende Kapitel zuerst einen Überblick über die Entstehung und Bedeutung der Prostaglandine im menschlichen Körper.

Prostaglandine (PG) wurden erstmals um 1930 durch Ulf von Euler in der menschlichen Samenflüssigkeit entdeckt und als vermutetes Sekret der Prostata nach ihr benannt [Von Euler et al. 1934]. Erst allmählich erkannte man, dass es sich bei diesen Substanzen um ubiquitär vorkommende Gewebshormone handelt, die aufgrund ihrer Kurzlebigkeit nur lokal wirksam sind. Nach ihrer Strukturaufklärung 1962 rückten die Prostaglandine und verwandte Produkte immer mehr ins Zentrum physiologischer und pharmakologischer Forschung [Bergström et al. 1963, Bergström 1983]. So entschlüsselte man in den letzten 30 Jahren fortwährend ihr breites Wirkungsspektrum. Prostaglandine stimulieren Entzündungsprozesse, regulieren den Blutfluss zu bestimmten Organen, kontrollieren den Ionentransport durch Membranen, modulieren die synaptische Übertragung und lösen den Schlaf aus [Streyer 2000].

### **1. Physiologische Effekte der Prostaglandine**

Fast alle Gewebe des menschlichen Körpers sind zur PG-Biosynthese befähigt. Man unterscheidet aufgrund ihrer chemischen Struktur die Prostaglandine  $E_2$ ,  $D_2$ ,  $F_{2\alpha}$ , das Prostacyclin ( $PGI_2$ ) und Thromboxan ( $TXA_2$ ). Prostaglandine wirken para- und autokrin. Ihr Wirkprofil ist abhängig von der Art der PG-Rezeptoren in der Nachbarschaft. Man unterscheidet je nach Affinität zu den verschiedenen PG die 5 Rezeptorhaupttypen: DP, FP, IP, TP und EP. Die EP-Rezeptoren lassen sich nochmal in 4 Subtypen  $EP_1$ - $EP_4$  untergliedern. Die genannten Rezeptoren sind an G-Proteine gekoppelt, die entweder die Adenylatcyclase stimulieren, bzw. hemmen oder die Phospholipase C aktivieren. Das Wirkspektrum der PG erstreckt sich, wie im Folgenden erläutert wird, auf unterschiedlichste Organsysteme.

#### **a) Allgemeine Wirkung der Prostaglandine**

Eine der wichtigsten Funktionen der Prostaglandine, die sie schon früh ins Interesse der medizinischen Forschung gerückt hat, ist die Vermittlung von Fieber, Schmerz und Entzündung

[Peskar 2001]. PGE<sub>2</sub> wirkt dabei vasodilatativ und ödemsteigernd, sowie pyrogen. Gemeinsam mit PGE<sub>1</sub> und PGI<sub>2</sub> sensibilisiert es Schmerzafferenzen und bewirkt dadurch den Zustand der Hyperalgesie.

Beim Einsatz von antiphlogistischen Medikamenten, die die Bildung von Prostaglandinen unterbanden, wurden jedoch bald ganz andere Wirkungsbereiche deutlich. In Bezug auf die Magen- und Darmschleimhäute besitzen sie z.B. einen protektorischen Effekt. PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub> und PGI<sub>2</sub> hemmen die Magensaftsekretion, steigern aber die Schleim- und Bicarbonatsekretion. Sie wirken somit als Gegenspieler zum Histamin oder Gastrin. Folge ist die Verminderung der Säure- und Pepsinsekretion.

Auch in den Thrombozyten erfüllen die unterschiedlichen Prostaglandine wichtige physiologische Funktionen. TXA<sub>2</sub> (Thromboxan), eine den PG verwandte Substanz, fördert die Thrombozytenaggregation und führt zur Freisetzung vasoaktiver Substanzen, wie ADP und Serotonin. Auch andere Induktoren der Plättchenaggregation, wie Kollagen, sind von einer intakten TXA<sub>2</sub>-Synthese abhängig. Prostaglandine, wie PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>1</sub> und PGD<sub>2</sub>, kann man als Gegenspieler vom TXA<sub>2</sub> bezeichnen, da sie die Verklumpung der Blutplättchen auf unterschiedliche Weise hemmen, wobei PGI<sub>2</sub> der stärkste Antagonist ist.

Neben ihrer Rolle in der Entzündungsreaktion, ihren gastroprotektiven und proaggregatorischen Effekten besitzen Prostaglandine eine ausgeprägte Wirkung auf die glatte Muskulatur von Blutgefäßen, Darm, Bronchien, Trachea, sowie dem Uterus. Dabei besitzen die unterschiedlichen Prostaglandine gegensätzliche Wirkungen. Während PGE<sub>2</sub>, PGE<sub>1</sub> und PGI<sub>2</sub> eher eine dilatative Wirkung besitzen, wirken PGF<sub>2α</sub>, PGG<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub> und Thromboxan konstriktorisch auf die glatte Muskulatur [Peskar 2001].

## **b) Spezielle Wirkung der Prostaglandine auf die Niere**

In der Niere spielen Prostaglandine eine entscheidende Rolle, siehe **Tabelle 2**. PG regulieren den renalen Blutfluss, die glomeruläre Filtration, die Salz- und Wasserexkretion, sowie die Reninfreisetzung und damit verbunden den systemischen Blutdruck [Peskar 2001].

Die Bedeutung der Prostaglandine für die Niere wird beim Einsatz von nicht-steroidalen Antiphlogistika deutlich. Nebenwirkungen dieser Schmerzmittel, die die Bildung der PG hemmen, sind u.a. Hypertension, Natriumretention und Ödeme. Es werden also entscheidende Funktionen der Niere, wie die Blutdruckregulierung, sowie die Einstellung des Salz- und Wasserhaushaltes durch das Ausschalten der PG aus dem Gleichgewicht gebracht.

| Lokalisation                                | Eicosanoide   | Wirkung   |
|---|---|---|
| Arteriolen                                  | PGI <sub>2</sub> , PGE <sub>2</sub>                     | Vasodilatation  |
| Glomerula                                   | PGI <sub>2</sub> > PGE <sub>2</sub><br>TXA <sub>2</sub> | Erhalt der glomerulären Filtration<br>Vasokonstriktion              |
| Tubuli                                      | PGE <sub>2</sub> , PGF <sub>2α</sub>                    | Wasser- und Salzausscheidung  |
| Interstitielle Zellen                       | PGE <sub>2</sub>  | Wasser- und Salzausscheidung<br>Steuerung der renalen Durchströmung |
| Juxtaglomerulärer Apparat<br>(Macula densa) | PGE <sub>2</sub> , PGI <sub>2</sub>                     | Stimulation der Renin-Sekretion                                     |

**Tabelle 2** Funktion der Prostaglandine der Niere.

Die 5 wichtigsten Prostaglandine und ihnen verwandte Substanzen, die in der Niere produziert werden, sind: PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> und TxA<sub>2</sub>.

- **PGI<sub>2</sub>** steuert als Vasodilatator hauptsächlich den Gefäßtonus, die glomeruläre Filtration, sowie die Reninfreisetzung.
- **TxA<sub>2</sub>** entfaltet seine Wirkung ebenfalls am Glomerulus und den afferenten Arteriolen, wo es jedoch konstriktorisch wirkt.
- **PGF<sub>2α</sub>** ist an der Salzregulation im Sammelrohr beteiligt.
- **PGE<sub>2</sub>** stellt das Hauptprodukt des renalen, COX-abhängigen Arachidonsäuremetabolismus (PG-Synthese siehe **Kapitel III.B.2**) dar und ist, abhängig von seinen 4 Rezeptoren EP<sub>1-4</sub>, an den meisten physiologischen Funktionen der Niere mitbeteiligt.

Auch hier ist die Verteilung der Rezeptoren in den Nephronen ausschlaggebend für die unterschiedliche Funktionsweise der Prostaglandine [Breyer et al. 2000].

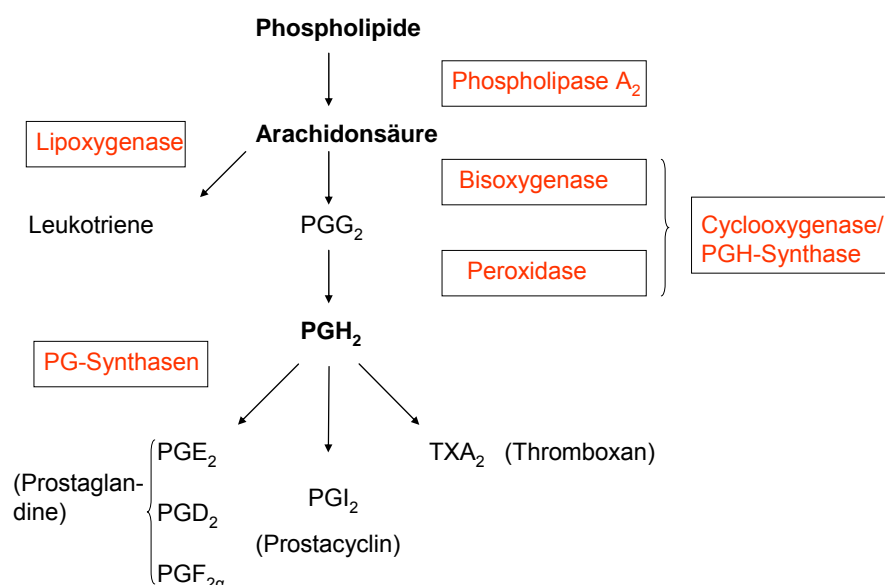
- Die **EP<sub>1</sub>**-Expression findet hauptsächlich im Sammelrohr statt, wo sie Einfluss auf die Salzausscheidung nimmt und zu Natriuresis führt.
- Der **EP<sub>2</sub>**-Rezeptor wird v.a. in den Gefäßen exprimiert, wo er den Tonus reguliert und einem Hypertonus entgegenwirkt.
- Auch der **EP<sub>3</sub>**-Rezeptor wird in den Gefäßen, sowie im Tal-Bereich und im Sammelrohr exprimiert, wo er den ADH-abhängigen Salz- und Wassertransport antagonisiert.
- Den **EP<sub>4</sub>**-Rezeptor findet man v.a. im Glomerulus, wo er auf den Tonus, wie auch die Reninfreisetzung einwirkt und im Sammelrohr.

Gerade die Fähigkeit von PGE<sub>2</sub>, den Gefäßtonus, sowie den Salz- und Wasserhaushalt aufgrund unterschiedlicher Rezeptoren in gegensätzliche Richtungen lenken zu können, erlaubt PGE<sub>2</sub>, bei physiologischen Störungen als ein Puffer zu fungieren.

## 2. Prostaglandinsynthese

Bei den Prostaglandinen handelt es sich um Substrate des Arachidonsäurestoffwechsels. Arachidonsäure, die wichtigste Vorstufe mehrerer Gruppen von Signalmolekülen, ist eine mehrfach ungesättigte Fettsäure, bestehend aus 20 Kohlenstoff (C)-Atomen. Die aus diesen C<sub>20</sub>-Fettsäuren entstehenden Metaboliten werden auch als Eicosanoide (griechisch: εικοσ = 20) bezeichnet. Neben den Prostaglandinen zählen auch die Prostacycline (PGI), die Thromboxane (TX) und die Leukotriene (LT) zu den Eicosanoiden. Prostaglandine sind durch einen Cyclopentanring, sowie eine Carboxyl- und eine Alkylseitenkette charakterisiert.

Die Substrate der Eicosanoid-Biosynthese liegen hauptsächlich in veresterter Form in Membranphospholipiden vor, so dass ihre freie Konzentration äußerst gering ist. Auf bestimmte chemische, physiologische, pathophysiologische und pharmakologische Stimuli hin kann deren Synthese aktiviert werden. Dabei wird die membrangebundene Phospholipase A<sub>2</sub> aktiviert. Über unterschiedliche Synthesewege und zugehörige Enzymsysteme entstehen dann aus der freigesetzten Arachidonsäure die in **Abbildung 3** dargestellten Hauptmetaboliten. Die Prostaglandin-, Prostacyclin- und Thromboxansynthese (Prostanoidsynthese) ist cyclooxygenaseabhängig und die Synthese der Leukotriene lipoxygenaseabhängig [Peskar 2001]. Im Folgenden steht jedoch die COX-abhängige Prostaglandinbildung im Mittelpunkt.

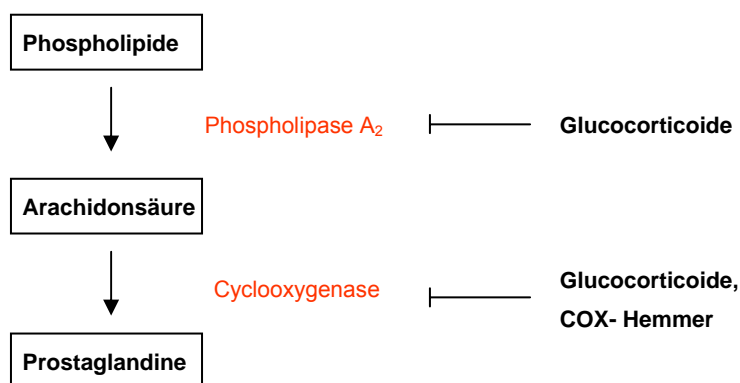


**Abbildung 3** Darstellung der Hauptmetaboliten, sowie zugehöriger Enzymsysteme der Eicosanoidbiosynthese.

### 3. Pharmakologische Beeinflussung der Prostaglandinsynthese

Eine gängige Therapie bei der Behandlung von Entzündungen und Schmerzen ist es, in den PG-Stoffwechsel einzugreifen und die Prostaglandinbildung zu unterbinden. Auch in anderen Bereichen, wie z.B. der Prophylaxe thromboembolischer Erkrankungen oder eben in der Behandlung des antenatalen Bartter-Syndroms kommen Substanzen zur Hemmung der Prostaglandinbildung zum Einsatz.

Um die PG-Bildung zu hemmen, gibt es in der medizinischen Forschung verschiedene Ansatzpunkte (**Abbildung 4**). Einmal kann man den 1.Syntheseschritt durch die Blockade der Phospholipase A<sub>2</sub> verhindern oder man greift in den 2.Syntheseschritt, die Wirkung der Cyclooxygenase, ein [Peskar 2001]. Die Blockade des Enzyms Phospholipase A<sub>2</sub> wird v.a durch den Einsatz von Cortison, also Glucocorticoiden erreicht. Die wichtigsten Hemmstoffe der Cyclooxygenase sind die nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR), wie ASS oder Indomethacin. Während ASS die Cyclooxygenase so verändert, dass das Substrat Arachidonsäure nicht gebunden werden kann, wirkt Indomethacin als kompetitiver Hemmstoff an der Arachidonsäure-Bindungsstelle [Meade et al. 1993]. Sicherlich stellen die Glucocorticoide immer noch die wirksamsten entzündungshemmenden Pharmaka der Gegenwart dar, die allerdings aufgrund ihrer großen systemischen Wirkung eine enorme Bandbreite an unerwünschten Nebenwirkungen hervorrufen.



**Abbildung 4** Pharmakologische Beeinflussung der Prostaglandinsynthesehemmung.

Mit Entdeckung von 2 Isoformen der Cyclooxygenasen, COX-1 und COX-2, bot sich Anfang der 90er Jahre ein selektiverer Weg der Schmerz- und Entzündungsbekämpfung [Vane 1994, Vane et al. 1998]. So nahm man an, dass COX-1 praktisch in allen Körpergeweben konstitutiv, COX-2 dagegen hauptsächlich in Entzündungszellen exprimiert wird. Es gelang

in den letzten Jahren, spezielle COX-2-Hemmer zu entwickeln, die antiphlogistisch und analgetisch wirksam sind, ohne zu lästigen Nebenwirkungen, wie Magenerosionen oder Blutungen zu führen. Beispiele für hochselektive COX-2-Inhibitoren sind Celecoxib (Celebrex®) und das 2004 vom Markt genommene Rofecoxib (Vioxx®). Erst in letzter Zeit entdeckte man, dass doch auch COX-2 in einigen Organen, wie Niere und Rückenmark, konstitutiv gebildet wird und somit dort wichtige physiologische Funktionen wahrnimmt [Scholz 2003, Cheng et al. 2002], die dann natürlich durch COX-2-Hemmer negativ beeinflusst würden.

In der folgenden Arbeit wird u.a. diesem Aspekt, welche der Isoformen für physiologische Funktionen in der Niere verantwortlich ist und wie sie aktiviert werden, nachgegangen.

## **C. Bedeutung der Cyclooxygenasen-1 und -2 in der Niere**

### **1. Allgemeines**

Im folgenden Kapitel wird nun genauer auf die beiden wichtigen Enzyme der PG-Synthese, COX-1 und -2, d.h. v.a. auf ihre Bedeutung für die Niere eingegangen. Wie in **Kapitel III.B.1.b)** erläutert, erfüllen die Prostaglandine viele relevante physiologische Aufgaben in der Niere. In den letzten Jahren verfolgte man dabei hauptsächlich die Fragestellung, welche Isoform der Cyclooxygenasen verantwortlich für die Bildung der PG in der Niere ist.

Wie im vorangehenden **Kapitel III.B.3** beschrieben, wurde seit der Entdeckung der Isoform COX-2 1991 [Kujubu et al. 1991] angenommen, dass COX-1 in allen Organen konstitutiv gebildet wird und damit zum Erhalt der Organfunktion beiträgt. COX-2 werde dagegen hauptsächlich in Entzündungszellen produziert und biete sich so als hervorragender Angriffspunkt zur antiphlogistischen Therapie an [Vane 1994, Vane et al. 1998, Garavito u. DeWitt 1999]. Jedoch wurde in neueren Studien deutlich, dass COX-2 gerade in der Niere eine wichtige physiologische Rolle spielt. COX-2 wurde wiederholt in größeren Mengen in der normalen Niere nachgewiesen, so dass der Begriff der Enzyminduktion durchaus neu zu bewerten wäre [Martin u. Desmeules 2001, Cheng et al. 2002]. In (tier-) experimentellen und klinischen Studien zeigte man, dass COX-2 das entscheidende Enzym für die Natriumexkretion, die Reninfreisetzung und den Antagonismus zum Antidiuretischen Hormon (ADH) ist [Stichtenoth u. Frölich 2000]. Außerdem wird angenommen, dass COX-2 eine entscheidende Rolle in der Nierenentwicklung spielt, da es bei Inaktivierung von COX-2 bei Mäusen zu Missbildungen kam [Martin u. Desmeules 2001, Stichtenoth u. Frölich 2000]. COX-1 dagegen spielt eher im Erhalt des renalen Plasmaflusses, sowie der glomerulären Filtration eine Rolle [Breyer u. Harris 2001, Martin u. Desmeules 2001].

Mit Hilfe von Mikrodissektion, RT-PCR und Immunoblotting ließen sich COX-1 und COX-2 in Kortex und Medulla der Niere nachweisen, wobei der Anteil beider Enzyme in der Medulla insgesamt größer war [Yang et al. 1999]. COX-1 lokalisierte man v.a. in mesangialen Zellen, im Endothel der Arteriolen, in den parietalen Epithelzellen der Bowmanschen Kapsel und im kortikalen, sowie medullären Sammelrohr. Die COX-2-Expression ließ sich dagegen hauptsächlich in den interstitiellen Zellen des Nierenmarks, in den Zellen der aufsteigenden Henle-Schleife, in den Gefäßen und Podozyten der Glomerula nachweisen [Breyer u. Harris 2001, Martin u. Desmeules 2001].



## 2. COX-2 Expression in der Niere

In der Niere ist die COX-2-Expression v.a. in Macula densa Zellen und cTAL Zellen nachgewiesen worden [Nantel et al. 1999, Kömhoff et al. 2000]. Macula densa Zellen sind am tubulo-glomerulären Feedback (Regulation des Gefäßtonus der afferenten Arteriolen) und der Regulation des Salzhaushaltes beteiligt, indem sie die luminale Salz-, bzw. Chloridkonzentration messen und bei einem Mangel vermehrt Renin ausschütten [Persson et al. 1991, 2004]. Genau dieser Mechanismus der Zelle, auf ein verändertes Salzmilieu mit Ausschüttung von Renin zu reagieren, wird im Folgenden näher analysiert.

Beobachtet wurde, dass eine erhöhte COX-2-Expression besonders in „high renin states“ vorkommt, welche sich u.a. bei Verwendung von ACE-Inhibitoren, Diuretika oder bei renovaskulärer Hypertension [Harris u. Breyer 2001] einstellen. In experimentellen Studien entdeckte man, dass der Salzverlust der entscheidende Reiz für den COX-2-Anstieg sein müsste. Dabei ging man zell-, wie auch tierexperimentell vor. Cheng et al. inkubierten einerseits primär kultivierte Kaninchen-cTAL-Zellen in hypoosmolaren, sowie auch chloridreduzierten Medien und andererseits inhibierten sie den  $\text{NA/K/2Cl}$ -Kanal mit Bumetanid. In anderen Studien verabreichte Cheng et al. Ratten eine salz-, bzw. chloridarme Diät. In einer parallelen Studie inkubierten Yang et al. Mäuse macula densa Zellen ebenfalls in unterschiedlichen Salzmedien und blockten spezifisch die COX-2, sowie andere Enzyme. Alle genannten experimentellen Ansätze zeigten, dass ein Salz- bzw. Chloridmangel die Expression der COX-2 herbeiführt. Als zugrunde liegender Mechanismus wird vermutet, dass die Zelle durch den Salzverlust zur Phosphorylierung von sogenannten **MAP Kinasen** angeregt wird [Cheng et al. 2000, Tian et al. 2000, Yang et al. 2000]. Die Cyclooxygenase-2 produziert wiederum vermehrt  $\text{PGE}_2$  und  $\text{PGI}_2$  [Yang et al. 2000], welches dann für die Ausschüttung von Renin sorgt [Wang et al. 1999, Cheng et al. 2000].

Der Begriff **MAP Kinase** bedeutet **mitogen activated protein kinase**. Mitogene sind Substanzen, die Mitosen und damit die Proliferation von Zellen anregen, v.a. der T- und B-Lymphozyten. Gleichzeitig regen sie ihre Transformation aus Stammzellen an. MAP Kinasen sind eine Gruppe von Enzymen, die man in 3 Familien unterteilen kann [Tian et al. 2000] (**Abbildung 5**).

1. ERK1 (p44) und ERK2 (p42): Extracellular signal-regulated kinase

ERK werden hauptsächlich durch Mitogene aktiviert. Effektoren dieser Familie sind Transkriptionsfaktoren, Adapterproteine, Enzyme, Zelloberflächen- und Kernrezepto-

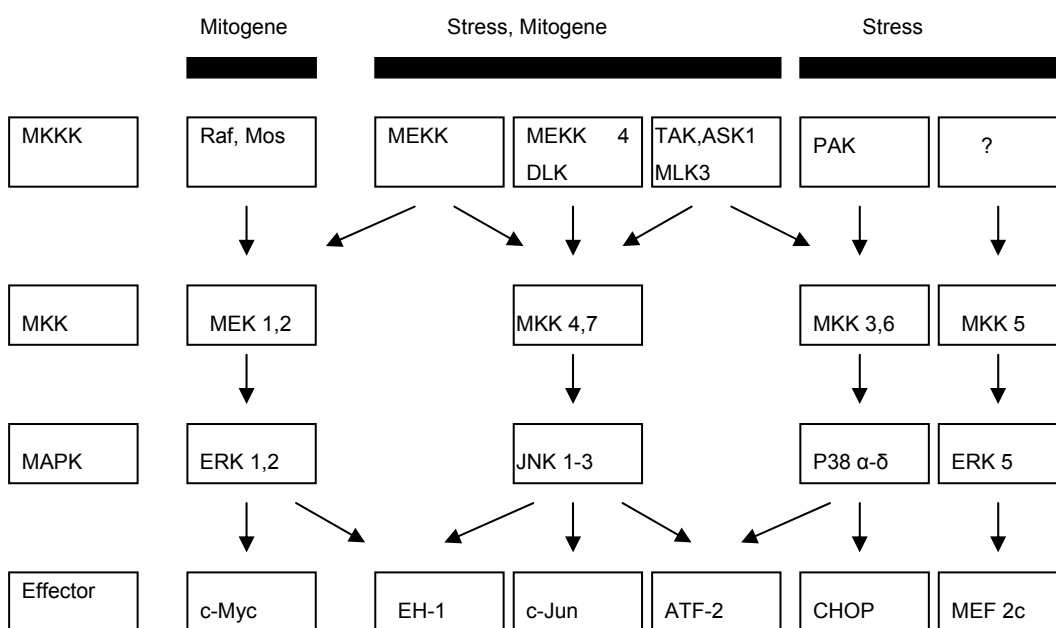
ren. Ihre Aktivierung sorgt also v.a. für Zellwachstum und -differenzierung. Inhibiert werden sie durch PD 98059, U 0126.

2. JNK1 (p46), JNK2 (p54) und JNK3 (p49): c-jun-N-terminal kinase

Zellulärer Stress, wie z.B. UV-Licht, Röntgenstrahlen, freie Radikale, Hitze, osmotischer Schock, Entzug von Wachstumsfaktoren, sowie inflammatorische Zytokine (TNF, Il-1 $\beta$ ), sorgt für die Aktivierung von JNK. Effektoren dieser Familie sind Transkriptionsfaktoren und Enzyme. Bei Aktivierung von JNK kommt es zur Entzündungsreaktion, Tumorgenese, wie auch Apoptose.

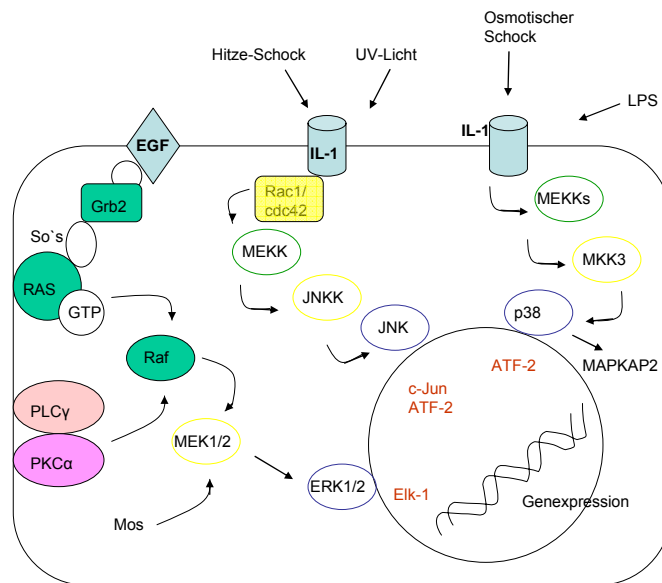
3. p38 gehört wie die JNK Familie zu der Stressantwort in der Zelle. Inhibiert werden kann es durch SB 203580.

Die oben genannten MAP Kinasen werden im folgenden Schema als Zwischenglied einer Kaskade dargestellt. Zu sehen sind die Aktivatoren, d.h. die verschiedenen MAPK Kinasekinasen (MKKK), sowie die MAPK Kinasen (MKK), die durch Mitogene und andere Stressfaktoren aktiviert werden. Die MAP Kinasen nehmen ihrerseits Einfluss auf die im Schema dargestellten Transkriptionsfaktoren (Effectors). Diese Effektoren werden als essentiell für die COX-2-Synthese in der Niere angesehen.



**Abbildung 5** Schematische Darstellung der Aktivatoren und Effektoren der MAPK Familien [Tian et al. 2000].

In **Abbildung 6** ist eine schematisch dargestellte Nierenzelle zu sehen und der Einfluss der MAP Kinasen, sowie ihrer Aktivatoren und Effektoren.



**Abbildung 6** Darstellung der MAPKinasen-Aktivierung und -Aktivität, sowie Beteiligung der PKC.

## IV. Zielsetzung

In den Nierenepithelzellen des aufsteigenden Tubulus entsteht bei der Furosemid-ähnlichen Salzverlusttubulopathie ein hypoosmolares Salzmilieu. Gleichzeitig findet eine vermehrte Ausschüttung von Prostaglandin  $E_2$  statt.

In mehreren Untersuchungen mit bestimmten Nierenzelllinien oder in tierexperimentellen Studien wurde ein direkter Zusammenhang zwischen Salzzug und Prostaglandinanstieg nachgewiesen. Das Ziel meiner Arbeit war es, diesen Zusammenhang in mTAL Zellen aufzuzeigen. Bisher existieren hauptsächlich Daten, die in Untersuchungen mit cTAL- oder Macula densa Zellen gewonnen wurden [Cheng et al. 2000]. Es wird jedoch in der Literatur auch mit mTAL-Zellen gearbeitet [Yang 2003]. Da in beiden Zelltypen die untersuchten Transportsysteme exprimiert werden, verwendete ich in diesem Modell auch aufgrund der höheren Zellausbeute und dem Fehlen der Macula densa Zellen mTAL-Zellen.

Des weiteren interessierte mich die aufgeworfene Frage, ob dabei das fehlende Natriumchlorid, bzw. Natrium oder Chlorid allein den spezifischen Reiz darstellt.

Darüber hinaus ist der genaue Mechanismus der zwischengeschalteten Faktoren noch immer nicht ausreichend aufgeklärt. Es wird bei der hypoosmolar bedingten  $PGE_2$ -Ausschüttung vornehmlich eine COX-2-, nicht jedoch COX-1-Mitwirkung postuliert. Außerdem wird über die Beteiligung von MAP Kinasen, wie auch der Proteinkinase C an der COX-2-Aktivierung diskutiert.

Die Hauptziele der Arbeit wurden daher wie folgt festgelegt:

- 1.) Überprüfung der Annahme, dass auch in mTAL-Zellen  $PGE_2$  aufgrund des entstandenen hypoosmolaren Milieus in der Zelle freigesetzt wird.
- 2.) Erkennen des spezifischen Reizes des  $PGE_2$ -Anstieges: Hypoosmolarität oder speziell der Natriumchlorid-, Natrium- oder Chloridentzug.
- 3.) Überprüfung der Annahme, dass COX-2 die relevante Cyclooxygenase bei der hypoosmolar bedingten  $PGE_2$ -Bildung darstellt.
- 4.) Erkennen der darüber hinaus beteiligten Faktoren im Rahmen dieses Mechanismus:
  - MAP Kinasen
  - Proteinkinase C

## V. Material und Methoden

### A. Material

#### 1. (Bio-) Chemikalien

##### a) Chemikalien zur Isolation von mTAL-Zellen aus Schweinenieren

|                                  |                          |
|----------------------------------|--------------------------|
| 2%-ige BSA-Lösung                | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| 10%-ige Collagenase B-Lösung     | Roche, Mannheim          |
| 10-fach PBS:                     | Herstellung im Labor     |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | Merck, Darmstadt         |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | Merck, Darmstadt         |
| KCl                              | Merck, Darmstadt         |

##### b) Chemikalien in der Zellkultur

|                                 |                                    |
|---------------------------------|------------------------------------|
| Collagen A (1mg/ml)             | Seromed Biochrom, Berlin           |
| H <sub>2</sub> O-MQ (18,2mΩ/ml) | Kobe, Marburg                      |
| DMEM/ HAM'S F 12                | PAA Laboratories, Linz, Österreich |
| NaCl 5,37 M                     | Sigma-Aldrich, Steinheim           |
| Na-Gluconat 1,79 M              | Sigma-Aldrich, Steinheim           |
| Cholinchlorid 5,37 M            | Sigma-Aldrich, Steinheim           |
| Mannitol 2M                     | Sigma-Aldrich, Steinheim           |

##### c) Chemikalien zur RNA-Isolierung

|                    |   |
|--------------------|---|
| peq GOLD RNA Pure™ | PEQLAB Biotechnologie GmbH,<br>Erlangen |
| Chloroform         | Merck KGaA, Darmstadt                   |

---

|                          |  |
|--------------------------|--|
| 2-Propanol (Isopropanol) | Merck KGaA, Darmstadt                      |
| Ethanol                  | Hausapotheke                               |
| TRIS-Base (1M, pH=8)     | Roth, Karlsruhe                            |
| EDTA (0,5M, pH=8)        | GIBCO BRL <sup>®</sup> , Gaithersburg, USA |

#### **d) Chemikalien für die reverse Transkription der RNA in cDNA**

|  |  |
|--|--|
| DEPC-H <sub>2</sub> O                            | Sigma, Steinheim                           |
| DNase I  | GIBCO BRL <sup>®</sup> , Gaithersburg, USA |
| dNTP-Mix   | GIBCO BRL <sup>®</sup> , Gaithersburg, USA |
| DTT (0,1M)                                       | GIBCO BRL <sup>®</sup> , Gaithersburg, USA |
| EDTA (20mM)                                      | GIBCO BRL <sup>®</sup> , Gaithersburg, USA |
| First Strand Buffer (5x)                         | GIBCO BRL <sup>®</sup> , Gaithersburg, USA |
| Nuclease Free Water (not DEPC treated)           | Ambion <sup>®</sup> GmbH, Kassel           |
| Oligo-dt-Primer                                  | GIBCO BRL <sup>®</sup> , Gaithersburg, USA |
| rRNasin <sup>®</sup> (RNase Inhibitor) (40 U/μl) | Promega, Madison Wi, USA                   |
| SUPERSCRIPT <sup>™</sup> II RT                   | GIBCO BRL <sup>®</sup> , Gaithersburg, USA |

#### **e) Chemikalien für die Polymerasekettenreaktion**

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| Primer                          | Invitrogen, Carlsbad, California, USA         |
| Expand High-Fidelity PCR System | Roche <sup>®</sup> Diagnostics GmbH, Mannheim |
| dNTP-Mix (2mM)                  | Peqlab, Erlangen                              |

#### **f) Chemikalien für die Gelelektrophorese**

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| Agarose SeaKem <sup>®</sup> LE | Cambrex Bio Science Rockland, Inc.,<br>Rockland, ME, USA. |
| 100 Base-Pair-Ladder           | Amersham Biosciences,<br>Buckinghamshire (GB)             |

---

|                        |                               |
|------------------------|-------------------------------|
| Bromophenol blue       | Roth, Karlsruhe               |
| EDTA (0,5M, pH=8)      | GIBCO BRL®, Gaithersburg, USA |
| 1%-iges Ethidiumbromid | Roth, Karlsruhe               |
| Eisessig               | Merck, Darmstadt              |
| Sucrose (w/v)          | Sigma, Steinheim              |
| TRIS-Base (2M)         | Roth, Karlsruhe               |
| Xylene cyanol ff       | Sigma, Steinheim              |

## 2. Zellen

Nierenepithelzellen:

mTAL-Zellen: medullar thick ascending limb of Henle-Zellen aus Schweinenieren

## 3. Enzyme und Nucleinsäuren

|               |          |                |                                  |
|---------------|----------|----------------|----------------------------------|
| β-Actin       |          |                | GIBCO BRL®, Gaithersburg, USA    |
| Inhibitoren:  |          |                |                                  |
| SC 560        | MW 352   | (IC50: 9 nM)   | GIBCO BRL®, Gaithersburg, USA    |
| SC 58125      | MW 384   | (IC50: 70 nM)  | GIBCO BRL®, Gaithersburg, USA    |
| Calphostin C  | MW 790,8 | (IC50: 50 nM)  | Calbiochem, Läufelingen, Schweiz |
| PD 168393     | MW 369   | (IC50: 1 nM)   | Calbiochem, Läufelingen, Schweiz |
| PD 98059      | MW 267   | (IC50: 2 µM)   | Calbiochem, Läufelingen, Schweiz |
| Staurosporin  | MW 466,5 | (IC50: 700 pM) | Calbiochem, Läufelingen, Schweiz |
| SB 203580     | MW 414   | (IC50: 100 nM) | Calbiochem, Läufelingen, Schweiz |
| Tyrphostin 46 | MW 204,2 |                | Biomol Res. Lab. Inc.            |

## 4. Instrumente und Apparaturen

### a) Geräte in der Zellkultur

|                                       |                            |
|---------------------------------------|----------------------------|
| Clean-Bench                           | Heraeus Instruments, Hanau |
| CO <sub>2</sub> -Begasungsbrutschrank | Heraeus Instruments, Hanau |

---

|   |  |
|---|--|
| Elektroaugpipette: pipetus <sup>®</sup> -akku | Hirschmann Laborgeräte                                 |
| Falcon <sup>®</sup> Tubes (14ml, sterile)     | Becton Dickinson Labware,<br>Le Pont de Claix (France) |
| Mikroskop                                     | Leica MPS 32, Leitz, Wetzlar                           |
| 6-well-Platten                                | Greiner, Frickenhausen                                 |
| Zellkulturflaschen                            | Greiner, Frickenhausen                                 |

### **b) Geräte zur RNA-Isolierung und RT-PCR**

|                                       |   |
|---------------------------------------|---|
| Heizblock: Digi-Block <sup>®</sup> JR | Laboratory Devices, Holliston MA<br>(USA)                             |
| Laborkühlzentrifuge: Biofuge fresco   | Heraeus Instruments, Hanau  |
| PCR-Automat: T-Gradient Thermoblock   | Biometra, Göttingen   |
| PCR Soft Tubes (0,2ml)                | Biozym scientific, Hess. Oldendorf                                    |
| Vortexer: VF2                         | Janke & Kunkel GmbH&Co.KG,<br>IKA <sup>®</sup> -Labortechnik, Staufen |
| Combi-Spin FVL-2400                   | Otto E. Kobe, Marburg   |
| Zentrifuge: Sigma 110                 | Sigma Laborzentrifugen,<br>Osterode am Harz                           |

### **c) Geräte zur photometrischen Messung**

|  |                             |
|--|-----------------------------|
| Spektralphotometer: Gene Quant II,<br>incl. Quarzküvette | Pharmacia Biotech, Freiburg |
|--|-----------------------------|

### **d) Geräte für die Gelelektrophorese**

|  |   |
|--|---|
| Gelkammer: Easy-Cast <sup>™</sup>      | Owl Separation Systems,<br>Portsmouth, U.S.A. |
| Electrophoresis System                 | Labortechnik Fröbel, Wasserburg               |
| Netzgerät                              | Consort nV, Turnhout (Belgien)                |
| Spannungsgerät: Consort E321 (250/100) |   |



### **e) Geräte zur Gelbetrachtung**

Drucker: Mitsubishi Video  
Gelbilddokumentationssystem

Labortechnik Fröbel, Wasserburg  
Vilber Lourmat, Marne la Vallée,  
Frankreich

## **5. Software**

### **a) Software zur Gelbetrachtung**

Bio Capt MW Version 11.01 for Windows

### **b) Software zur Bildbearbeitung**

ImageJ 1, 32j

Wayne Rasband,  
National Institutes of Health (USA)

## B. Methoden

Um den Einfluss der Hypoosmolarität, bzw. des Kochsalzmangels auf die Prostaglandin E<sub>2</sub>-Bildung zu untersuchen, kultivierte ich die isolierten mTAL-Zellen auf einer 6-well-Platte, d.h. in 6 verschiedenen Stimulationsmedien, in denen jeweils die Osmolarität, bzw. der Kochsalzgehalt variierte.

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| 1. Standardmedium             | physiologische Zellkultur                                 |
| 2. Hypoosmolares Medium       | unphysiolog. Zellkultur, osmotisch unausgeglichen         |
| 3. Standardmedium + Furosemid | medikamentös induzierte Hypoosmolarität                   |
| 4. NaCl-reduziertes Medium    | osmotisch ausgeglichenes Medium mit reinem Kochsalzentzug |
| 5. Na-reduziertes Medium      | osmotisch ausgeglichenes Medium mit reinem Natriumentzug  |
| 6. Cl-reduziertes Medium      | osmotisch ausgeglichenes Medium mit reinem Chloridentzug  |

Darüber hinaus gehendes Ziel war es, die beteiligten Faktoren in der PGE<sub>2</sub>-Synthesekette zu identifizieren, indem ich sie spezifisch blockte. Somit inkubierte ich die Zellkulturen 1-6 in weiteren Versuchsreihen mit den in **Tabelle 6** aufgeführten Inhibitoren.

In allen Versuchsreihen ging ich zweigleisig in der Ergebnisauswertung vor:

- Gemessen wurde einerseits im Überstand der Zellen das gebildete PGE<sub>2</sub> per ELISA.
- Außerdem interessierte mich die Expression der mRNA für COX-1 und -2, sowie der PGE-Synthase, die per RT-PCR und Gelelektrophorese bestimmt wurde.

Präparationsbedingt war nur eine geringe Zellzahl möglich, sodass ich pro Versuch 3-10 Messreihen durchführen konnte, mit dem Ziel, die Thesen dieser Arbeit exemplarisch aufzuzeigen. Die Interpretation der Daten ist daher kritisch zu betrachten und eine statistisch abgesicherte Datenanalyse nicht Teil dieser Arbeit. In den nächsten Abschnitten werden nun die experimentellen Voraussetzungen, sowie die einzelnen Arbeitsschritte erläutert.

---

## 1. Isolation von mTAL-Zellen aus Schweinenieren

Für die Versuchsreihen benutzte ich jeweils frische Nieren vom Schwein, aus denen vorerst die mTAL-Zellen isoliert werden mussten. Dazu wird die Niere längs geteilt und die Innenschicht herauspräpariert. Die anfallenden Gewebestücke zerkleinert man mit einer Rasierklinge. Dann werden 2 ml 10%-ige Collagenase B-Lösung, in PBS (siehe **Tabelle 3**) verdünnt, zum Gewebe dazugegeben und 10 min im Wasserbad bei 37°C begast. Daraufhin werden 2 ml 2%-ige BSA-Lösung hinzugegeben und weitere 10 min auf Eis gesetzt, bis sich ein Überstand gebildet hat. Dieser wird „abpipettiert“ und in einem Röhrchen gesammelt. Dieser Arbeitsschritt, Zugabe von CollagenaseB- und BSA-Lösung, auf Eis setzen und den Überstand trennen, wird dann noch 3 mal wiederholt. Anschließend zentrifugiert man den gesammelten Überstand und resuspendiert die Zellen in einem DMEM-Medium, in welchem sie kultiviert werden.

## 2. Zellkultur

Zur Kultivierung der Zellen verwendete ich 6-*well*-Platten, die mit 1%-iger Collagen-A-Lösung (in PBS verdünnt) beschichtet und über 2 Stunden im Brutschrank bei 37°C belassen wurden. Man füllt 2 ml DMEM-Medium jeweils in ein *well*, anschließend werden die Zellen im Brutschrank bei 37°C und 5%-iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bebrütet. Nach mehrtägiger Beobachtung und mehrmaligem Medienwechsel entwickeln die Zellen einen regelmäßigen Zellteilungszyklus. Nach etwa 10 Tagen wird eine ca. 80%-ige Konfluenz erreicht und es kann mit den Stimulationsversuchen begonnen werden. Bei allen Zellstimulationen wird zuerst das Wachstumsmedium abgesaugt und die Kultur mit 1-fach PBS gewaschen. Danach werden die unterschiedlichen Stimulationsmedien (siehe **Tabelle 5**), wieder jeweils 2 ml pro *well*, zugegeben und 24 h inkubiert. In einigen Versuchsreihen wurden den Stimulationsmedien zusätzlich jeweils ein Inhibitor aus **Tabelle 6** hinzugefügt. Nach Absaugen des Überstandes, welcher zur späteren Bestimmung des PGE<sub>2</sub> bei -80°C zwischengelagert wird, können die Zellen „geerntet“ werden.

|                                       |        |
|---------------------------------------|--------|
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 81mM | 11,5g  |
| NaCl 1,36M                            | 79,48g |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 14mM  | 1,9g   |
| KCl 26mM                              | 1,94g  |

**Tabelle 3** Zusammensetzung der PBS-Lösung. Ad 1 l Aqua dest. ergibt sich ein pH von 7,5. Bei Zugabe von 50 µl rauchender HCl zu 1l 1-fach PBS ergibt sich ein pH von 7,3.

| Zellkultur-Substanzen | Zusammensetzung                              |
|-----------------------|--|
| Medium                | DMEM/HAM'S F 12                              |
| Grundmedium (GM)      | 22,3 ml Medium + 27,7 ml MQ-H <sub>2</sub> O |
| NaCl 5,37 M           | 3,14g/ 10ml                                  |
| Na-Gluconat 1,79 M    | 3,9g/ 10ml                                   |
| Cholinchlorid 5,37 M  | 7,5g/ 10ml                                   |
| Mannitol 2 M          | 3,64g/ 10ml                                  |

**Tabelle 4** Zusammensetzung der verwendeten Elektrolytlösungen.

| Stimulationsmedien           | Zusammensetzung   | Osmolarität   |
|------------------------------|---|---------------|
| 1. Standardmedium            | 50 ml GM + 750 µl NaCl                                  | 292 mosmol/kg |
| 2. Hypoosmolares Medium (HM) | 50 ml GM + 250 µl NaCl                                  | 200 mosmol/kg |
| 3. Standardmedium+Furosemid  | 33,2 µl Furosemid+ 2 ml Standardmedium                  | 292 osmol/kg  |
| 4. NaCl-reduz. Medium        | 50 ml HM + 265 µl Mannitol                              | 292 mosmol/kg |
| 5. Na-reduz. Medium          | 50 ml HM + 135 µl Mannitol<br>+ 500 µl Cholinchlorid    | 292 mosmol/kg |
| 6. Cl-reduz. Medium          | 50 ml HM + 135 µl Mannitol<br>+ 1500 µl Natriumgluconat | 292 mosmol/kg |

**Tabelle 5** Stimulationsmedien 1-6 und darin verwendete Lösungen aus **Tabelle 4**, sowie entsprechende Osmolarität

| Inhibitoren              | End-[] (je 2 µl des Inhibitors und 2 ml Stimulationsmedium) |
|--------------------------|---|
| SC 560 1mM               | 1 µM  |
| SC 58125 1mM             | 1 µM  |
| Calphostin C 10µM        | 0,01 µM   |
| Staurosporin 1mM in DMSO | 1 µM  |
| PD 168393 5mM in DMSO    | 5 µM  |
| PD 98059 20mM in DMSO    | 0,02 mM   |
| SB 203580 10mM in DMSO   | 0,01µM  |
| Tyrphostin 46 10µM       | 0,01 µM   |

**Tabelle 6** Auflistung der verwendeten Inhibitoren für die Stimulationsmedien und deren Endkonzentrationen.

### 3. Isolierung und Quantifizierung von RNA

#### a) Isolierung der RNA

Die Isolierung der RNA aus den Nierenepithelzellen erfolgte mit dem RNAPure™ System der Firma peqLab in 5 Schritten:

##### 1. Homogenisierung

Die Zellen werden direkt in der 6-well-Platte durch Zugabe von 1 ml RNA-Pure pro well lysiert und durch mehrmaliges Auf-und Abpipettieren gelöst. Die Proben werden nun 5 min auf Eis gestellt, um die Dissoziation der Nukleotidkomplexe zu gewährleisten, und direkt aufgearbeitet oder bei -80°C in Eppendorfcups tiefgefroren.

##### 2. Phasentrennung

In die Proben werden je 150 µl Chloroform gegeben und 15 Sekunden kräftig vermischt. Nachdem die Proben erneut für 15 min auf Eis gestanden haben, werden sie für 20 min bei 13.000 rpm, sowie 4°C zentrifugiert. Dies führt zur Trennung der Probe in 3 Phasen: eine untere gelbe Phenol-Chloroformphase, eine obere farblose wässrige Phase und eine dazwischenliegende Interphase. Die RNA ist ausschließlich in der wässrigen Phase angereichert, während sich die DNA und die Proteine in der Inter- und Phenolphase befinden.

### 3. RNA-Präzipitation

Die wässrige Phase wird in ein neues Eppendorfcup überführt und das gleiche Volumen Isopropanol zugefügt. Nach erneutem Vermischen und Kühlen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  für 30 min werden die Proben nochmals 30 min zentrifugiert (13.000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Das RNA-Präzipitat ist von gelartiger Konsistenz und liegt an der unteren Seite des Cups.

### 4. Waschen der RNA

Der Isopropanolüberstand wird abgenommen und das RNA-Präzipitat mit 1 ml 70%igem Ethanol durch Vortexen und anschließendem Zentrifugieren (10 min, 13.000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ ) gewaschen. Dann wird der Waschschrift wiederholt.

### 5. Lösen der RNA

Der Überstand wird abgenommen und die Proben für 10 min an der Luft getrocknet. Zuletzt wird das Präzipitat in 50  $\mu\text{l}$  RNase freiem TE, pH=8 (siehe **Tabelle 7**), gelöst, die Probe 10 min bei  $70^{\circ}\text{C}$  erhitzt und anschließend wieder auf Eis gestellt.

#### TE-Puffer:

10mM Tris-Base (Stammlösung 1 M)      10 ml

1 mM EDTA (Stammlösung 0,5 M)      2 ml

Die Substanzen wurden in einem Volumen von 1 Liter mit MQ gelöst und der pH mit HCl auf 8 eingestellt.

**Tabelle 7** Zusammensetzung des TE-Puffers.

## **b) Quantifizierung der isolierten RNA**

Die Konzentration der RNA in den Proben wird mit Hilfe eines Spektralphotometers bestimmt. Dafür werden die Proben 1:100 mit DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  (siehe **Tabelle 8**) verdünnt und in eine Quarzküvette gefüllt. Das Gerät misst RNA-Proben in UV-Zellen gleichzeitig bei Wellenlängen von 230 nm, 260 nm und 280 nm. Die Absorption bei 260 nm ist das Maß für den Nukleinsäure-Gehalt, die bei 280 nm das Maß des Proteingehaltes. Die Absorption bei 230 nm dient zur Hintergrundkompensation. Eine Absorption von eins bei 260 nm entspricht 40  $\mu\text{g}$  RNA/ml, multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor. Der Quotient 260/280 nm stellt ein Maß für die Reinheit dar. Er sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen. Nur solche Proben wurden zur re-

versen Transkription weiterverwendet. Die RNA-Proben wurden auf 1 µg/7,5 µl eingestellt und bei -80°C gelagert.

#### DEPC-H<sub>2</sub>O :

Durch Zugabe von 1 ml DEPC zu 1 Liter H<sub>2</sub>O-MQ werden die RNasen im Wasser inaktiviert. Beim anschließendem Autoklavieren zerfällt DEPC in Ethanol und CO<sub>2</sub>.

**Tabelle 8** Definition des DEPC-H<sub>2</sub>O.

## 4. DNase Verdau

Der DNase Verdau wird vor der RT-PCR durchgeführt, um zu verhindern, dass eine Amplifikation von noch in der Probe vorhandenen genomischen Sequenzen, die das Ergebnis verfälschen würden, stattfindet.

Man verfährt nach folgendem Protokoll:

- 7,5 µl der RNA-Lösung (=1µg RNA) werden in ein 1,5 ml Eppi-Cup pipettiert.
- Zu jeder Probe werden nun 2,5 µl des DNase-Mastermixes (2 µl 5xPuffer + 0,5 µl DNase I) zugefügt und das Gemisch 15 Minuten bei 37°C inkubiert.
- Anschließend wird zu jeder Probe 1 µl EDTA (25 mM) gegeben. Dann werden die Proben kurz durchmischt und abzentrifugiert.
- Zuletzt werden die Proben 10 Minuten bei 65°C inkubiert, kurz auf Eis gestellt und erneut abzentrifugiert.

## 5. Reverse Transkription

Um die RNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Gelelektrophorese detektieren und quantifizieren zu können, muss die mRNA zuvor in cDNA umgeschrieben werden. Die Synthese der cDNA mittels einer reversen Transkriptase und oligo(dt) als Primer erfolgte unter folgenden Bedingungen:

- Zu den 11 µl (enthalten die RNA) aus dem oben beschriebenen DNase-Verdau wird jeweils 1 µl oligo(dt) hinzugegeben.

- 
- Nachdem die Proben 10 Minuten bei 70°C inkubiert worden sind, kommen sie für eine Minute auf Eis und werden anschließend abzentrifugiert.
  - Der während der Inkubation vorbereitete RT-Mastermix aus:
    - 2 µl 5xPuffer (250 mM TRIS-HCl, pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl<sub>2</sub>)
    - + 1 µl d NTP (10mM)
    - + 2 µl DTT (0,1M)
    - + 1 µl DEPC-H<sub>2</sub>O
    - + 1 µl SuperScript™ II
    - + 1 µl RNasin® (RNase Inhibitor) (40 U/µl)
  - wird kurz durchmischt und abzentrifugiert.
  - Danach werden 8 µl des Mastermixes zu den bestehenden 12 µl gegeben und die so entstandene Probe 10 Minuten bei Raumtemperatur stengelassen (Annealing).
  - Nun erfolgt eine Inkubation von 50 Minuten bei 42°C und eine weitere für 5 Minuten bei 95°C.
  - Dann kommt die Probe erneut auf Eis und wird noch mal abzentrifugiert.

Die so entstandene cDNA dient als Vorlage für die PCR und wird zwischenzeitlich bei –20°C gelagert. Zur Vermeidung von Kontamination der RNA-Proben mit Ribonukleasen wird stets auf Eis bzw. bei 4°C, mit Einmalhandschuhen und autoklavierten Plastikartikeln gearbeitet.

## 6. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR erlaubt es, gezielt DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen eingeraht werden, zu amplifizieren. Die Stränge der Ziel-DNA werden durch Erhitzen in Einzelstränge getrennt. Danach wird die Reaktion abgekühlt, um die Hybridisierung der Primer zu ermöglichen (auch „Annealing“ genannt). Von diesen ausgehend synthetisiert die DNA-Polymerase in Gegenwart von allen vier dNTPs neue komplementäre DNA-Stränge. Dieser Zyklus wird mit derselben Reaktionsmischung 20-40 mal wiederholt, so dass es zu einem exponentiellen Anstieg der Produkte kommt.



| <u>PCR-Ansatz:</u>       |          |
|--------------------------|----------|
| DEPC-H <sub>2</sub> O    | 11,85 µl |
| PufferII                 | 2 µl     |
| dNTP (2mM)               | 2 µl     |
| Vorwärts-Primer (10 µM)  | 1 µl     |
| Rückwärts-Primer (10 µM) | 1 µl     |
| cDNA (1 :20 verdünnt)    | 2 µl     |
| High-Fidelity-Polymerase | 0,15 µl  |

**Tabelle 9** Verwendeter PCR-Ansatz (High Fidelity, Roche).

| <u>PCR-Programm:</u>               |                                   |        |
|------------------------------------|-----------------------------------|--------|
| Schritt 1: Denaturierung           | 95°C                              | 5 min  |
| Beginn Schleife                    |                                   |        |
| Schritt 2: Denaturierung           | 95°C                              | 30 sec |
| Schritt 3: Anlagerung der Primer   | 56°C                              | 30 sec |
| Schritt 4: Verlängerung der Primer | 72°C                              | 2 min  |
| Ende Schleife                      | Wiederholung der Schleife: 34 Mal |        |

**Tabelle 10** Verwendetes PCR-Programm.

|         |           |                                    |        |
|---------|-----------|------------------------------------|--------|
| β-Actin | vorwärts  | 5'-CCC ATC TAC GAG GGG TAC G -3'   | 492 bp |
|         | rückwärts | 5'-TTG GCG TAG AGG TCC TTC C -3'   |        |
| COX-1   | vorwärts  | 5'-CTC ACA GTG CGT TCC AAC C -3'   | 400 bp |
|         | rückwärts | 5'-CCA TCC TTA AAG AGC CGT AGG -3' |        |
| COX-2   | vorwärts  | 5'-CAG AGC TCT TCC TCC TGT GC -3'  | 363 bp |
|         | rückwärts | 5'-TTG AGT GTC TTT GGC TGT CG -3'  |        |
| mPGES-1 | vorwärts  | 5'-GGA AGA AGG CTT TTG CCA A -3'   | 235 bp |
|         | rückwärts | 5'-CAG GTA GGC CAC GGT GTGTA -3'   |        |

**Tabelle 11** Verwendete Primer für die durchgeführten PCR's mit der entsprechenden Anzahl der Basenpaare (bp).

---

## 7. Kontrolle

Positivkontrolle:

- als Positivkontrolle wird RNA aus unter physiologischen Bedingungen stimulierten Zellen mitgeführt, um die Eignung der ausgewählten Primer zu bestätigen.
- die Integrität der RNA und die erfolgreiche Amplifikation wird durch die Amplifikation von  $\beta$ -Actin, einem sogenannten "Housekeeping Gen", das in jeder Zelle exprimiert wird, untersucht.

Negativkontrolle:

- um eine Kontamination der Lösungen auszuschließen, wird vor der PCR zum Zeitpunkt der DNase-Behandlung Wasser an Stelle von RNA als Negativkontrolle eingesetzt.

## 8. Gelelektrophorese und Geldokumentation

Die Produkte der PCR lassen sich elektrophoretisch je nach Größe der Fragmente auf einem Agarosegel auftrennen. Um so kleiner das Fragment (gemessen in Basenpaaren), desto weiter wandert es auf dem Gel. Die verschiedenen amplifizierten DNA-Fragmente werden zuerst mit einem Fluoreszenzfarbstoff versetzt, so dass sie unter UV-Licht sichtbar werden.

Dazu werden die PCR-Produkte mit 6x-Probenpuffer (4  $\mu$ l pro Ansatz), siehe **Tabelle 12**, versetzt. Je 10  $\mu$ l davon werden auf ein 1,3%-iges Agarosegel, siehe **Tabelle 14**, aufgetragen, dem 0,75  $\mu$ l Ethidiumbromid beigegeben worden sind und elektrophoretisch in 1xTAE-Puffer, siehe **Tabelle 13**, aufgetrennt (35 Minuten, 150 V, 100 mA, 30 Watt). Als Längenstandard dient eine 100-Basenpaare-Leiter. Die Banden können nun unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Die Dokumentation erfolgte mit einer Dokumentationseinrichtung der Firma Vilber Lourmat, sowie des Programms Bio Capt MW Version 11.01 for Windows. Mit dem Programm ImageJ konnten die verschiedenen Banden aufgrund ihrer Graustufen quantitativ verglichen werden.

| <u>6x Probenpuffer:</u> |       |                        |
|-------------------------|-------|------------------------|
| bromphenol blue         | 0,25% |                        |
| xylene cyanol ff        | 0,25% |                        |
| Sucrose (w/v)           | 40%   | in MQ-H <sub>2</sub> O |

**Tabelle 12** Zusammensetzung des 6x Probenpuffers.

| <u>1x TAE-Puffer:</u> |         |                                 |
|-----------------------|---------|---------------------------------|
| TRIS Base (2 M)       | 242 g   |                                 |
| Eisessig (100%)       | 57,1 ml |                                 |
| EDTA (0,5 M, pH 8)    | 100 ml  | auf 1 l mit MQ-H <sub>2</sub> O |

**Tabelle 13** Herstellung des 1x TAE-Puffers.

| <u>Agarosegel 1,3%-ig:</u> |  |  |
|----------------------------|--|--|
| 1,0 g Agarose              |  |  |
| 75 ml 1x TAE               |  |  |
| 0,75 µl Ethidiumbromid     |  |  |

**Tabelle 14** Zusammensetzung des 1,3%-igen Agarosegels.

## 9. Prostaglandin-E<sub>2</sub>-ELISA

Per ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) wurden die Überstände der Zellkulturen aufgearbeitet und das entstandene PGE<sub>2</sub> gemessen. Der ELISA Test nutzt bestimmte Antigen-eigenschaften des Prostaglandin E<sub>2</sub> aus, an welche enzymgekoppelte Antikörper binden. Um so mehr Antikörper binden, um so mehr Indikatorfarbstoff kann das gebundene Enzym umsetzen und so die Menge an Prostaglandin anzeigen. Man verfährt nach folgendem Protokoll:

### 1. Reagenzienvorbereitung:

- Probenpuffer: Pufferkonzentrat mit H<sub>2</sub>O-MQ auf ein Endvolumen von 500 ml auffüllen.
- Konjugat: Konjugat in 6 ml des Probenpuffers lösen; anschließend 2 ml Konjugat entnehmen und nochmals 4 ml Probenpuffer hinzufügen.

- 
- Antikörper: Antikörper in 6 ml des Probenpuffers lösen; anschließend 2 ml Antikörper entnehmen und nochmals 4 ml Probenpuffer hinzufügen.
  - Waschpuffer: Waschkonzentrat mit H<sub>2</sub>O-MQ auf ein Endkonzentrat von 500 ml auffüllen.
2. Vorbereitung der Standards:
- 3,9 ml Probenpuffer in ein Kunststoffröhrchen füllen.
  - 100 µl der Standardstammlösung hinzufügen und mischen = 320 pg/50 µl.
  - 500 µl Probenpuffer in jedes Eppendorfcup (Überstand) geben.
  - Verdünnungsreihe erstellen: 500 µl des 320 pg-Standards in das 160 pg-cup, mischen, dann 500 µl entnehmen und in das 80 pg-cup, etc.
  - Aus dem 2,5 pg-cup 500 µl verwerfen.
3. Testdurchführung
- Je 100 µl Probenpuffer in die wells B1 und B2 = nicht-spezifisch-bindende wells (NSB) geben.
  - Je 50 µl Probenpuffer werden in die 0-Standard-wells pipettiert.
  - Je 50 µl der entsprechenden Standards werden in die jeweiligen wells pipettiert.
  - Je 50 µl jeder zu bestimmenden Probe werden in die restlichen wells gefüllt.
  - Anschließend wird in jedes well außer in Blank und NSB je 50 µl des vorbereiteten Antikörpers gegeben und außer in Blank je 50 µl verdünnten Konjugates.
  - Danach wird die zugedeckte Platte 1 Std auf dem Schüttler inkubiert.
  - Nun werden die wells 4x mit Waschpuffer gewaschen und dann sofort mit je 150 µl Substratlösung gefüllt.
  - Die Platte wird wieder 30 min auf dem Schüttler inkubiert und als letztes die optische Dichte des entstandenen blauen Farbstoffes bei einer Wellenlänge von 630 nm abgelesen.

## 10. Statistik

Für die Prostaglandinkonzentrationen im Zellkulturmedium wurden jeweils der Mittelwert, die Standardabweichung, sowie der Standardfehler (Standardabweichung des Mittelwertes) berechnet. Die statistische Auswertung der Gruppenvergleiche erfolgte mittels ANOVA. Ein p-Wert < 0,05 wurde als signifikant definiert.

Wie schon oben erwähnt, war präparationsbedingt nur eine geringe Zellzahl möglich, sodass ich pro Versuch 3-10 Messreihen durchführen konnte, mit dem Ziel, die Thesen dieser Arbeit exemplarisch aufzuzeigen. Die Interpretation der Daten ist daher kritisch zu betrachten und eine statistisch abgesicherte Datenanalyse nicht Teil dieser Arbeit.

---

## VI. Ergebnisse

Den Einfluss der Elektrolyte, bzw. des zellulären Salzhaushaltes auf die Prostaglandinsynthese in Nierenepithelzellen zu analysieren, war ein wesentliches Ziel meiner Untersuchungen. Dazu kultivierte ich Schweinenierenzellen in unterschiedlichen Stimulationsmedien. Eine weitere Fragestellung bezog sich auf die Identifizierung beteiligter Faktoren in diesem Mechanismus. Dies untersuchte ich mit spezifischen Inhibitoren. Ein Maß ist dabei jeweils die per ELISA gemessene Prostaglandin-E<sub>2</sub>-Konzentration in den Überständen der Zellkulturen, wie in **Abschnitt A** dargestellt wird. Darüber hinaus stellte die in den Zellkulturen gebildete mRNA der Enzyme COX-1, COX-2 und PGE-S ein Maß für die aktive Proteinsynthese dar, wie in **Abschnitt B** präsentiert wird.

### ***A. PGE<sub>2</sub>-Bildung in 6 verschiedenen Stimulationsmedien***

#### **1. PGE<sub>2</sub>-Bildung**

Ziel der ersten Versuchsreihe ist, den Einfluss des veränderten Salzmilieus auf die Prostaglandinbildung in primär kultivierten mTAL-Zellen zu untersuchen. Gemessen wurde dabei die von den Nierenzellen gebildete Prostaglandinmenge in den 6 verschiedenen Stimulationsmedien, siehe auch **Kapitel V.B.2**.

1. Standardmedium (SM)
2. Hypoosmolares Medium (HM)
3. Standardmedium mit Furosemid
4. NaCl-reduziertes Medium
5. Na-reduziertes Medium
6. Cl-reduziertes Medium

Dabei repräsentiert das Standardmedium die Zelle unter physiologischen Bedingungen, sowie Medium 2 die Zelle unter hypoosmolaren Bedingungen. Bei Medium 3 wird Furosemid als NKCC2-Kanalblocker verwendet, um ebenfalls ein hypoosmolares Milieu in der Zelle zu erzeugen. Medium 4-6 stellen dagegen osmotisch ausgeglichene Zellmodelle dar, denen jedoch

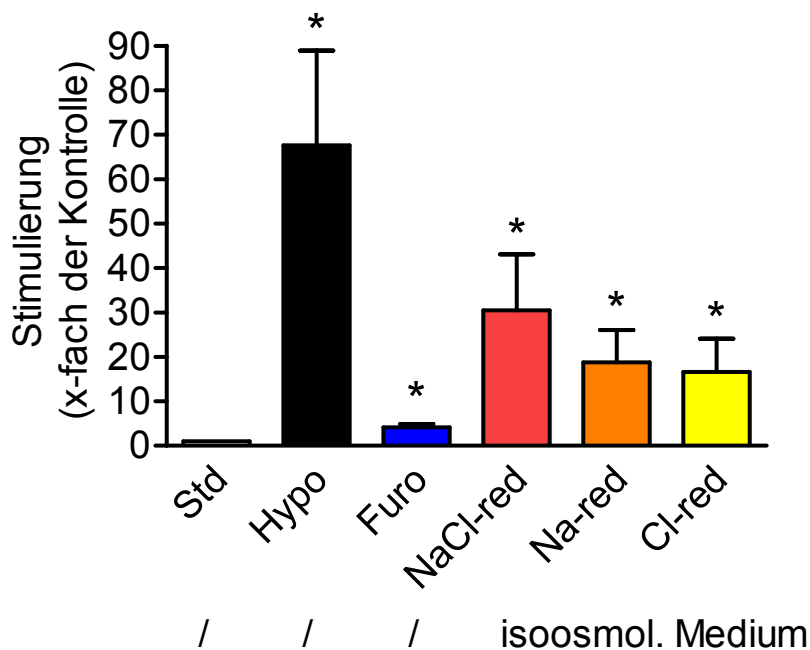
partiell Natriumchlorid (Medium 4), nur Natrium (Medium 5) oder nur Chlorid (Medium 6) fehlt.

Die folgende Tabelle gibt nun einen Überblick über die Bildung von Prostaglandin E<sub>2</sub> in den 6 oben genannten Stimulationsmedien. Dargestellt werden die relativen Anstiege der PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen in den verschiedenen Stimulationsmedien. Die Prostaglandinkonzentration (ng/ml) wurde auf den RNA-Gehalt (µg/ml) normiert.

|        | 1.Standard         |       | 2.Hypoosmolar      |               | 3.Furosemid        |             | 4.NaCl-red.        |              | 5.Na-red.          |              | 6.Cl-red.          |              |
|--------|--------------------|-------|--------------------|---------------|--------------------|-------------|--------------------|--------------|--------------------|--------------|--------------------|--------------|
|        | 1/10 <sup>-3</sup> | 1/Std | 1/10 <sup>-3</sup> | 1/Std         | 1/10 <sup>-3</sup> | 1/Std       | 1/10 <sup>-3</sup> | 1/Std        | 1/10 <sup>-3</sup> | 1/Std        | 1/10 <sup>-3</sup> | 1/Std        |
| #1     | <b>0,02</b>        | 1     | <b>0,19</b>        | <i>10,48</i>  | <b>0,04</b>        | <i>2,05</i> | <b>0,01</b>        | <i>0,67</i>  | <b>0,93</b>        | <i>50,29</i> | <b>0,13</b>        | <i>7,25</i>  |
| #2     | <b>0,01</b>        | 1     | <b>1,12</b>        | <i>136,17</i> | <b>0,03</b>        | <i>3,06</i> | *                  | *            | *                  | *            | <b>0,13</b>        | <i>16,10</i> |
| #3     | <b>0,10</b>        | 1     | <b>9,27</b>        | <i>94,72</i>  | *                  | *           | <b>1,08</b>        | <i>11,03</i> | <b>1,02</b>        | <i>10,42</i> | *                  | *            |
| #4     | <b>0,02</b>        | 1     | <b>1,44</b>        | <i>86,13</i>  | <b>0,08</b>        | <i>5,06</i> | <b>0,60</b>        | <i>36,06</i> | <b>0,27</b>        | <i>16,45</i> | <b>0,31</b>        | <i>18,40</i> |
| #5     | <b>0,01</b>        | 1     | <b>0,21</b>        | <i>21,23</i>  | <b>0,01</b>        | <i>1,12</i> | <b>0,45</b>        | <i>45,78</i> | <b>0,27</b>        | <i>27,58</i> | <b>0,50</b>        | <i>51,59</i> |
| #6     | <b>0,11</b>        | 1     | <b>1,45</b>        | <i>13,51</i>  | <b>0,11</b>        | <i>1,01</i> | <b>0,77</b>        | <i>7,13</i>  | <b>0,68</b>        | <i>6,30</i>  | <b>0,29</b>        | <i>2,68</i>  |
| #7     | <b>0,17</b>        | 1     | <b>2,91</b>        | <i>17,03</i>  | <b>0,46</b>        | <i>2,66</i> | <b>14,09</b>       | <i>82,38</i> | <b>0,32</b>        | <i>1,86</i>  | <b>0,64</b>        | <i>3,73</i>  |
| #8     | <b>0,01</b>        | 1     | <b>1,26</b>        | <i>161,39</i> | <b>0,02</b>        | <i>2,57</i> | *                  | *            | *                  | *            | *                  | *            |
| µ      | <b>0,05</b>        | 1     | <b>2,23</b>        | <i>67,58</i>  | <b>0,11</b>        | <i>2,50</i> | <b>2,83</b>        | <i>30,51</i> | <b>0,58</b>        | <i>18,82</i> | <b>0,29</b>        | <i>16,62</i> |
| σ/√n   | <b>0,02</b>        |       | <b>1,05</b>        | <i>21,32</i>  | <b>0,06</b>        | <i>0,52</i> | <b>2,26</b>        | <i>12,61</i> | <b>0,14</b>        | <i>7,27</i>  | <b>0,09</b>        | <i>7,47</i>  |
| p-Wert |                    |       | <b>0,06</b>        |               | <b>0,42</b>        |             | <b>0,19</b>        |              | <b>0,001</b>       |              | <b>0,003</b>       |              |

**Tabelle 15** PGE<sub>2</sub>-Werte aus 8 verschiedenen Stimulationen bezogen auf den RNA-Gehalt (**fett**) und die relativen Anstiege der PGE<sub>2</sub>-Werte durch Bezug auf den Wert des jeweiligen Standardmediums (*kursiv*). Mittelwert µ, S.E.M.= Standardabweichung σ/√n. p-Wert = Signifikanz-Wert des t-Tests beim Vergleich der Messreihen mit der Standardmessreihe. \*= Wert konnte im Experiment nicht ermittelt werden.

Die Ergebnisse sind zur Verdeutlichung nochmals in **Abbildung 7** graphisch dargestellt. Dargestellt werden die relativen Anstiege der PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen in den verschiedenen Stimulationsmedien.



**Abbildung 7** Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. des PGE<sub>2</sub>-Anstieges, jeweils bezogen auf den Wert des Standardmediums. Kontrolle=1 (0,05ng PGE<sub>2</sub>/ 24h/  $\mu$ g RNA), n=6-8. \* p< 0,05 im Vergleich zur Kontrolle (Standard). Standard: Kontrolle, Hypo: hypoosmaleres Medium, Furo: Standardmedium mit Furosemid, NaCl-red: NaCl-reduziertes Medium, Na-red: Na-reduziertes Medium, Cl-red: Cl-reduziertes Medium.

Die durchgeführten Zellstimulationen zeigen deutlich eine Beeinflussung der PGE<sub>2</sub>-Bildung bei Veränderung der physiologischen Bedingungen. Unter physiologischen Bedingungen produziert die Zelle im Durchschnitt 50pg PGE<sub>2</sub>/24h/ $\mu$ g RNA. Auf den Zustand der Hypoosmolarität, sowie den reinen Kochsalzentzug jedoch reagiert die Zelle mit stark vermehrter PGE<sub>2</sub>-Synthese.

Der größte PGE<sub>2</sub>-Anstieg wird im hypoosmolaren Medium beobachtet. Dabei konnte in den Messungen ein durchschnittlicher Anstieg um das rund 70-fache festgestellt werden. Auch im NaCl-reduzierten Medium, dem partiell das Kochsalz entzogen wurde, die Osmolarität aber ausgeglichen ist, steigen die PGE<sub>2</sub>-Werte noch um das 30-fache an. Im Na-reduzierten Medium und im Cl-reduzierten Medium, in welchem jeweils entweder nur das Natrium oder das Chlorid teilweise ersetzt wurde, findet man einen Anstieg des PGE<sub>2</sub> um das rund 17-fache.

Auch unter osmotisch ausgeglichenen Bedingungen bewirkt also der reine Verlust von Kochsalz eine Steigerung der PGE<sub>2</sub>-Bildung. Somit scheint der adäquate Reiz zur PGE<sub>2</sub>-Synthese nicht einfach von der Osmolarität, sondern direkt von der Natriumchloridkonzentration in der Nierenzelle auszugehen. Ein signifikanter Unterschied in der Beeinflussung der



PGE<sub>2</sub>-Synthese zwischen dem reinen Natrium- oder Chloridverlust konnte jedoch nicht beobachtet werden.

Unter Blockade des NKCC2 mittels Furosemid lässt sich lediglich ein Anstieg des PGE<sub>2</sub> um das 3-fache, wobei es sich jedoch um keinen statistisch signifikanten Anstieg handelt.

## 2. Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die PGE<sub>2</sub>-Bildung

Die gleichen 6 Stimulationsmedien wurden in der 2. Versuchsreihe unter Zusatz von jeweils einem der unten genannten Inhibitoren kultiviert. Angriffspunkte der Inhibitoren sind einmal die beiden Cyclooxygenasen COX-1 und -2, sowie die vorgeschalteten MAP Kinasen (u.a. ERK und p38), wie auch die Proteinkinase C. Untersucht wurde der Einfluss dieser Hemmung auf die PGE<sub>2</sub>-Bildung. Die Ergebnisse dieser Stimulationen werden nun im folgenden dargestellt.

Die eingesetzten Inhibitoren (und ihre verwendeten Konzentrationen) sind:

|                 |                                 |              |
|-----------------|---------------------------------|--------------|
| 1. SC 560       | COX1-Inhibitor                  | End-[]: 1µM  |
| 2. SC 58125     | COX2-Inhibitor                  | End-[]: 1µM  |
| 3. Calphostin C | ProteinkinaseC-Inhibitor        | End-[]: 10nM |
| 4. Staurosporin | Proteinkinase A, C, G-Inhibitor | End-[]: 1µM  |
| 5. PD 168393    | MAPK-Inhibitor                  | End-[]: 5µM  |
| 6. PD 98059     | MAPK/ERK-Inhibitor              | End-[]: 20µM |
| 7. Tyrphostin   | MAPK-Inhibitor                  | End-[]: 10nM |
| 8. SB 203580    | MAPK/p38-Inhibitor              | End-[]: 10µM |

Die folgende Tabelle gibt nun einen Überblick über die verwendeten Inhibitoren und ihren Einfluss auf die PGE<sub>2</sub>-Bildung in den verschiedenen Stimulationsmedien.

| Inhibitoren                          | Standard    | Hypoosmolar  | Furosemid   | NaCl-red.    | Na-red.      | Cl-red.     |
|--------------------------------------|-------------|--------------|-------------|--------------|--------------|-------------|
| SC 560<br>1/10 <sup>-3</sup>         | 0,05        | 0,06         | 0,05        | 0,03         | 0,01         | 0,02        |
|                                      | 0,01        | 0,27         | 0,01        | 0,07         | 0,19         |             |
| Mittelwert (μ)<br>1/10 <sup>-3</sup> | <i>0,03</i> | <i>0,01</i>  |             | <i>0,01</i>  | <i>0,01</i>  | <i>0,01</i> |
| μ/Std                                | <b>1</b>    | <b>3,80</b>  | <b>0,93</b> | <b>1,14</b>  | <b>2,36</b>  | <b>0,59</b> |
| SC 58125<br>1/10 <sup>-3</sup>       |             | 0,03         | 0,09        | 0,13         | 0,06         | 0,17        |
|                                      | 0,04        | 0,46         | 0,03        | 0,02         | 0,20         | 0,04        |
|                                      | 0,05        | 0,04         | 0,04        | 0,02         | 0,19         | 0,02        |
| Mittelwert (μ)<br>1/10 <sup>-3</sup> | <i>0,04</i> | <i>0,18</i>  | <i>0,06</i> | <i>0,06</i>  | <i>0,15</i>  | <i>0,07</i> |
| μ/Std                                | <b>1</b>    | <b>4,23</b>  | <b>1,33</b> | <b>1,42</b>  | <b>3,54</b>  | <b>1,76</b> |
| Calphostin C<br>1/10 <sup>-3</sup>   | 0,05        | 0,18         | 0,05        | 1,06         | 0,06         | 0,01        |
|                                      | 0,02        | 0,05         | 0,10        | 0,11         | 0,04         | 0,03        |
| Mittelwert (μ)<br>1/10 <sup>-3</sup> | <i>0,03</i> | <i>0,11</i>  | <i>0,07</i> | <i>0,59</i>  | <i>0,05</i>  | <i>0,02</i> |
| μ/Std                                | <b>1</b>    | <b>3,67</b>  | <b>2,33</b> | <b>19,53</b> | <b>1,67</b>  | <b>0,67</b> |
| Staurosporin<br>1/10 <sup>-3</sup>   | 0,18        | 0,03         | 0,21        | 0,07         | 0,11         | 0,12        |
|                                      | 0,12        | 0,13         | 0,07        | 0,09         | 0,28         | 0,11        |
| Mittelwert (μ)<br>1/10 <sup>-3</sup> | <i>0,15</i> | <i>0,08</i>  | <i>0,14</i> | <i>0,08</i>  | <i>0,19</i>  | <i>0,11</i> |
| μ/Std                                | <b>1</b>    | <b>0,53</b>  | <b>0,93</b> | <b>0,53</b>  | <b>1,27</b>  | <b>0,73</b> |
| PD 168393<br>1/10 <sup>-3</sup>      | 0,02        | 0,04         |             | 0,02         | 0,01         | 0,04        |
|                                      | 0,02        | 0,03         | 0,01        | 0,03         | 0,04         | 0,03        |
| Mittelwert (μ)<br>1/10 <sup>-3</sup> | <i>0,02</i> | <i>0,03</i>  | <i>0,01</i> | <i>0,02</i>  | <i>0,02</i>  | <i>0,03</i> |
| μ/Std                                | <b>1</b>    | <b>1,48</b>  | <b>0,45</b> | <b>0,91</b>  | <b>0,91</b>  | <b>1,36</b> |
| PD 98059<br>1/Std                    | 0,3*        | 3,62*        | 0,21*       | 3,25*        | 5,42*        | 3,36*       |
|                                      | <b>1</b>    | <b>12,07</b> | <b>0,7</b>  | <b>10,83</b> | <b>18,07</b> | <b>11,2</b> |
| Tyrphostin<br>1/Std                  | 30*         | 28,29*       | 67,64*      | 120,6*       | 28,24*       | 31,1*       |
|                                      | <b>1</b>    | <b>0,94</b>  | <b>2,25</b> | <b>4,02</b>  | <b>0,95</b>  | <b>1,04</b> |
| SB 203580<br>1/Std                   | 0,35*       | 0,23*        | 0,91*       | 1,98*        |              |             |
|                                      | <b>1</b>    | <b>0,66</b>  | <b>2,6</b>  | <b>5,66</b>  |              |             |

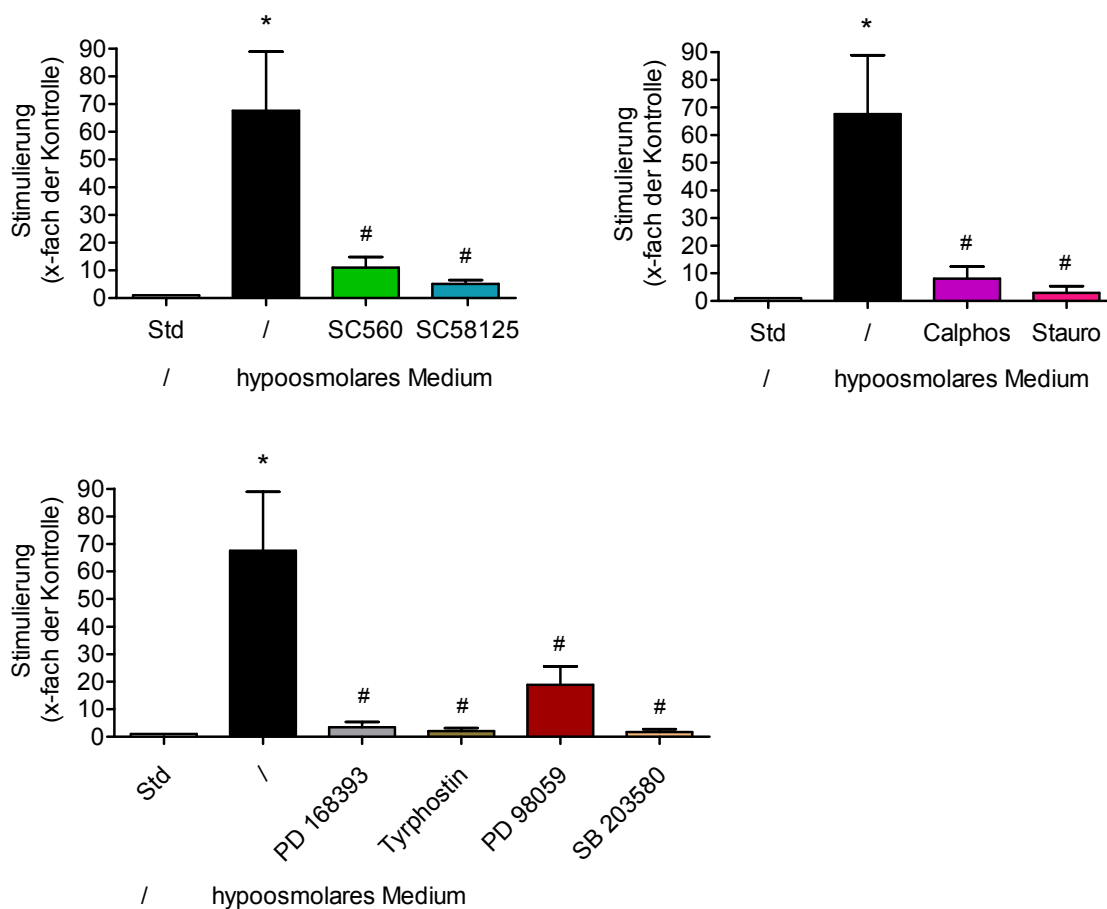
**Tabelle 16** PGE<sub>2</sub>-Werte (bezogen auf den RNA-Gehalt) aus unterschiedlichen Zellstimulationen mit den o.g. Inhibitoren. Mittelwert μ (**fett**), Mittelwerte bezogen auf den Standard (*kursiv*). \* PGE<sub>2</sub>-Werte ohne Bezug auf RNA-Gehalt.

In den folgenden Abbildungen werden die Inhibitoren in ihrem Einfluss auf die PGE<sub>2</sub>-Bildung innerhalb eines Stimulationsmediums graphisch miteinander verglichen.

### (1) Inhibitoren in hypoosmolarem Medium

Betrachtet wird im folgenden der relative PGE<sub>2</sub>-Anstieg im hypoosmolaren Medium unter Zusatz von:

- A) COX-1/-2-Inhibitoren
- B) PKC-Inhibitoren
- C) MAPK-Inhibitoren



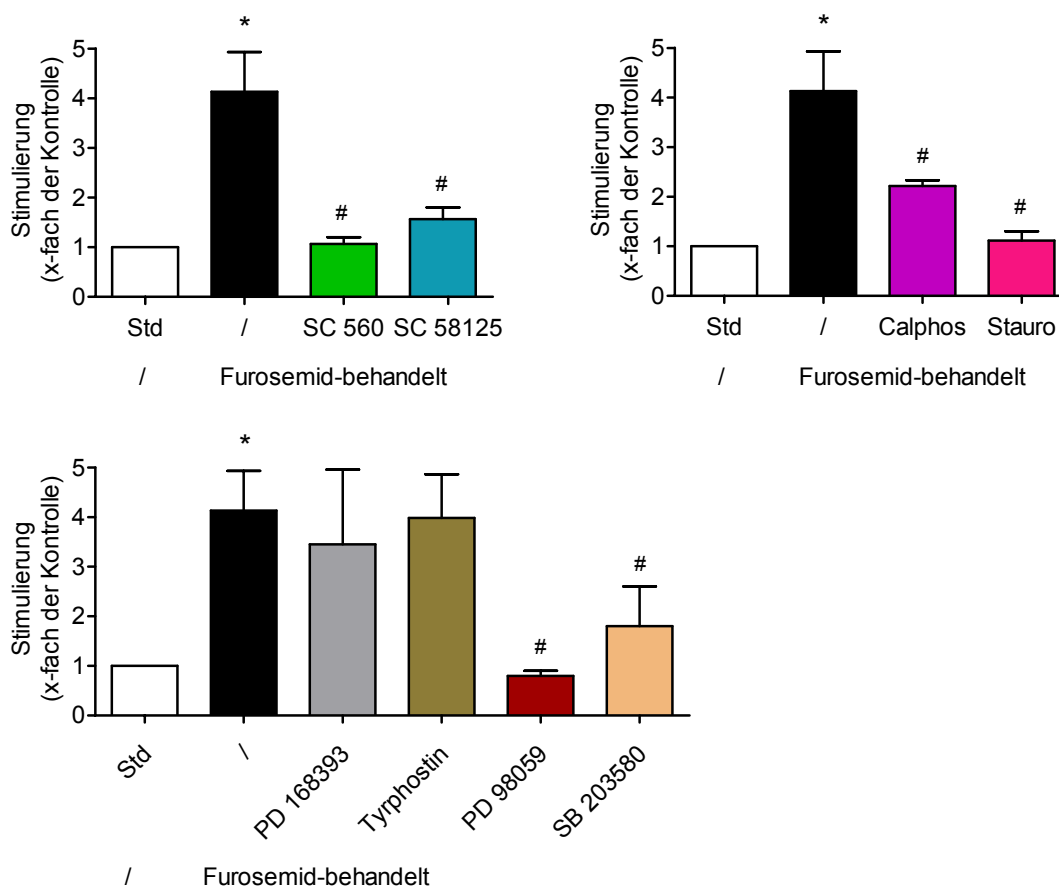
**Abbildung 8** Mittelwerte +/- S.E.M. des PGE<sub>2</sub>-Anstieges in hypoosmolarem Medium, jeweils bezogen auf den Wert des entsprechenden Standardmediums. Kontrolle=1 (0,05ng PGE<sub>2</sub>/ 24h/ μg RNA), n=3. \* p < 0,05 im Vergleich zur Kontrolle (Standard). # Signifikanz gegenüber der stimulierten Probe. SC 560: COX-1-Inhibitor, SC 58125: COX-2-Inhibitor. CalphostinC: PKC-Inhibitor, Staurosporin: PKA/C/G-Inhibitor. PD168393, Tyrphostin, PD 98059, SB 203580: MAPK-Inhibitoren.

Wie in **Abbildung 8** zu sehen, steigt die PGE<sub>2</sub>-Bildung in hypoosmolarem Medium um das knapp 70-fache der Norm an. Bei Zusatz der einzelnen Inhibitoren wird dieser massive Anstieg deutlich verhindert. Die Hemmung der Cyclooxygenasen-1 und -2 durch SC 560 und SC 58125, der MAP Kinasen durch PD 168393, PD 98059, Tyrphostin und SB 203580, sowie der ProteinkinaseC durch CalphostinC und Staurosporin bewirken jeweils eine Supprimierung der PGE<sub>2</sub>-Synthese in mTAL-Zellen. Dabei scheint sich die Wirkung der einzelnen Inhibitoren auf die PGE<sub>2</sub>-Synthese nicht deutlich zu unterscheiden.

## (2) Inhibitoren in Furosemidmedium

Im weiteren dargestellt wird der relative PGE<sub>2</sub>-Anstieg in Furosemidmedium unter Zusatz von:

- A) COX- 1/ -2-Inhibitoren
- B) PKC-Inhibitoren
- C) MAPK-Inhibitoren



**Abbildung 9** Mittelwerte +/- S.E.M. des PGE<sub>2</sub>-Anstieges in Furosemidmedium, jeweils bezogen auf den Wert des entsprechenden Standardmediums. Kontrolle=1 (0,05ng PGE<sub>2</sub>/ 24h/ µg RNA), n=3. \* p< 0,05 im Vergleich zur Kontrolle (Standard). # Signifikanz gegenüber der stimulierten Probe. SC 560: COX-1-Inhibitor, SC 58125: COX-2-Inhibitor. CalphostinC: PKC-Inhibitor, Staurosporin: PKA/C/G-Inhibitor. PD168393, Tyrphostin, PD 98059, SB 203580: MAPK-Inhibitoren.

Auch wenn sich im Furosemidmedium kein signifikant erhöhter PGE<sub>2</sub>-Anstieg ermitteln lässt, so zeichnet sich doch unter der Zugabe von COX-1 und -2- Inhibitoren eine im Vergleich zum Medium ohne Inhibitor geblockte PGE<sub>2</sub>-Synthese ab, wie im 1.Graphen der **Abbildung 9** verdeutlicht. Der Unterschied zwischen den beiden Inhibitoren ist wie in hypoosmolarem Medium nicht relevant.

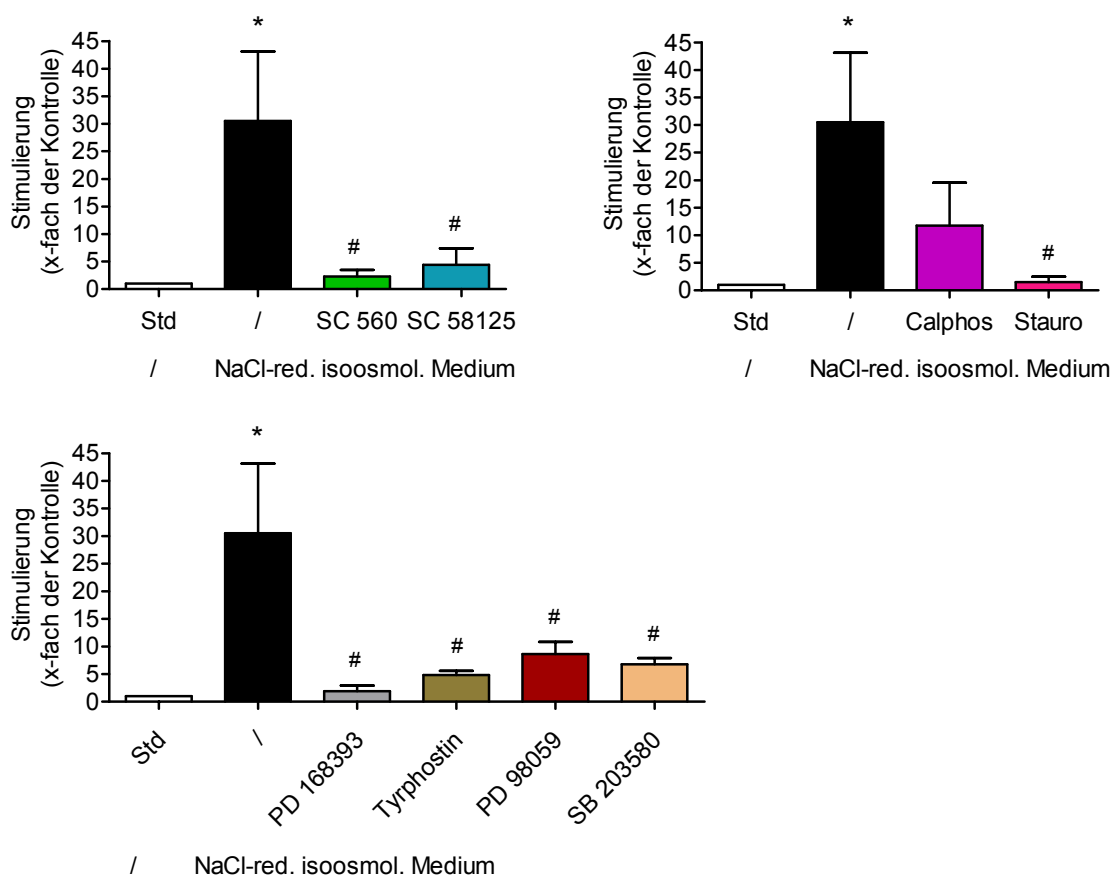
Bei Verwendung des PKC-Hemmstoffes CalphostinC ist die gehemmte PGE<sub>2</sub>-Synthese nicht so deutlich erkennbar wie bei der Zugabe von Staurosporin, einem Proteinkinase A, C, G- Inhibitor (siehe 2.Graph in **Abbildung 9**).

Im 3.Graphen der **Abbildung 9** werden die unterschiedlichen Wirkungen der einzelnen MAPK-Inhibitoren auf die PGE<sub>2</sub>-Synthese in mTAL-Zellen dargestellt. Während SB203580 und PD98059 zu einer Blockade der PGE<sub>2</sub>-Bildung führen, senken Tyrphostin und PD16393 kaum den PGE<sub>2</sub>-Anstieg.

### (3) Inhibitoren in NaCl-reduziertem Medium

Die folgenden Graphiken zeigen den relativen PGE<sub>2</sub>-Anstieg in NaCl-reduziertem Medium unter Zusatz von:

- A) COX-1/ -2-Inhibitoren
- B) PKC-Inhibitoren
- C) MAPK-Inhibitoren



**Abbildung 10** Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. des PGE<sub>2</sub>-Anstieges in NaCl-red. Medium, jeweils bezogen auf den Wert des entsprechenden Standardmediums. Kontrolle=1 (0,05ng PGE<sub>2</sub>/ 24h/  $\mu$ g RNA), n=3. \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle (Standard). # Signifikanz gegenüber der stimulierten Probe. SC 560: COX-1-Inhibitor, SC 58125: COX-2-Inhibitor. CalphostinC: PKC-Inhibitor, Staurosporin: PKA/C/G-Inhibitor. PD168393, Tyrphostin, PD 98059, SB 203580: MAPK-Inhibitoren.

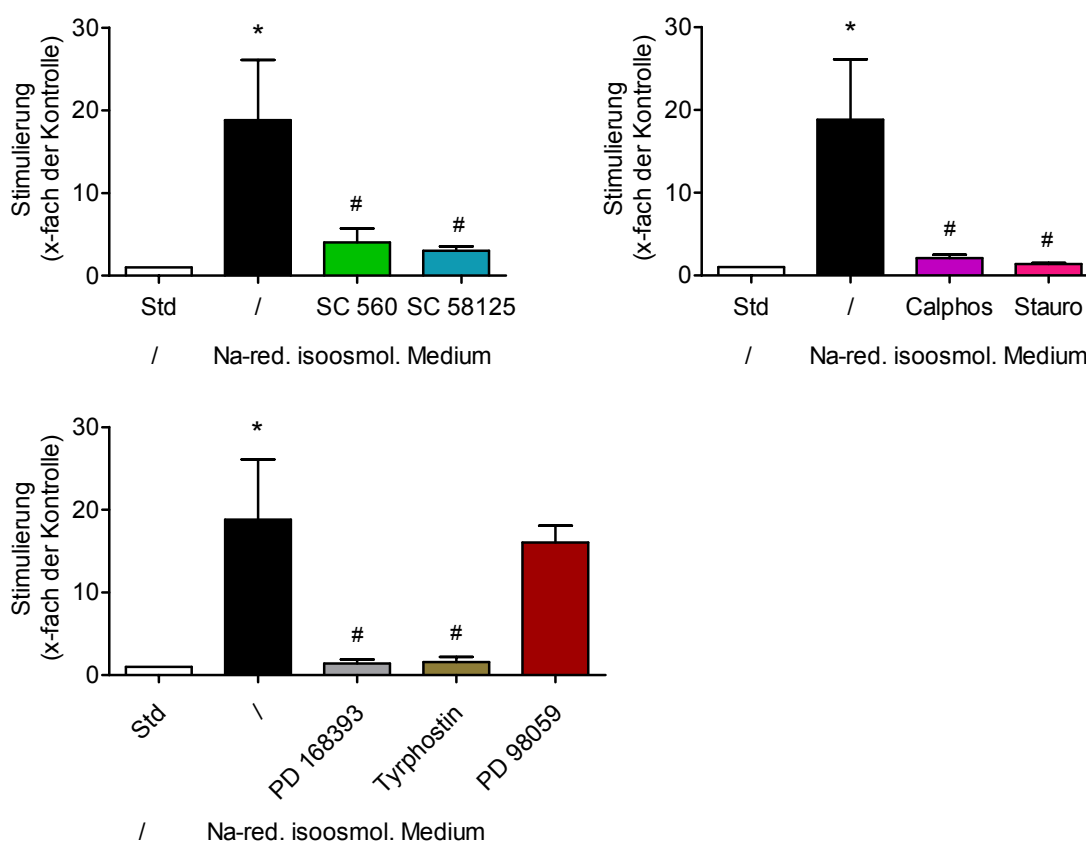


In **Abbildung 10** zeigt sich erneut die hemmende Wirkung der meisten zugesetzten Inhibitoren auf die Prostaglandinbildung in mTAL-Zellen. Die selektiven COX-Hemmer SC 560 (COX-1) und SC 58125 (COX-2) supprimieren vollständig die durch NaCl-Entzug bewirkte PGE<sub>2</sub>-Bildung in mTAL-Zellen. Auch die MAPK-Inhibitoren PD 98059, PD 168393, Tyrphostin und SB 203580 hemmen deutlich den PGE<sub>2</sub>-Anstieg. Bei den PKC-Inhibitoren hat v.a. Staurosporin diesen Effekt. Aber auch CalphostinC senkt den Anstieg von PGE<sub>2</sub> um rund 50%.

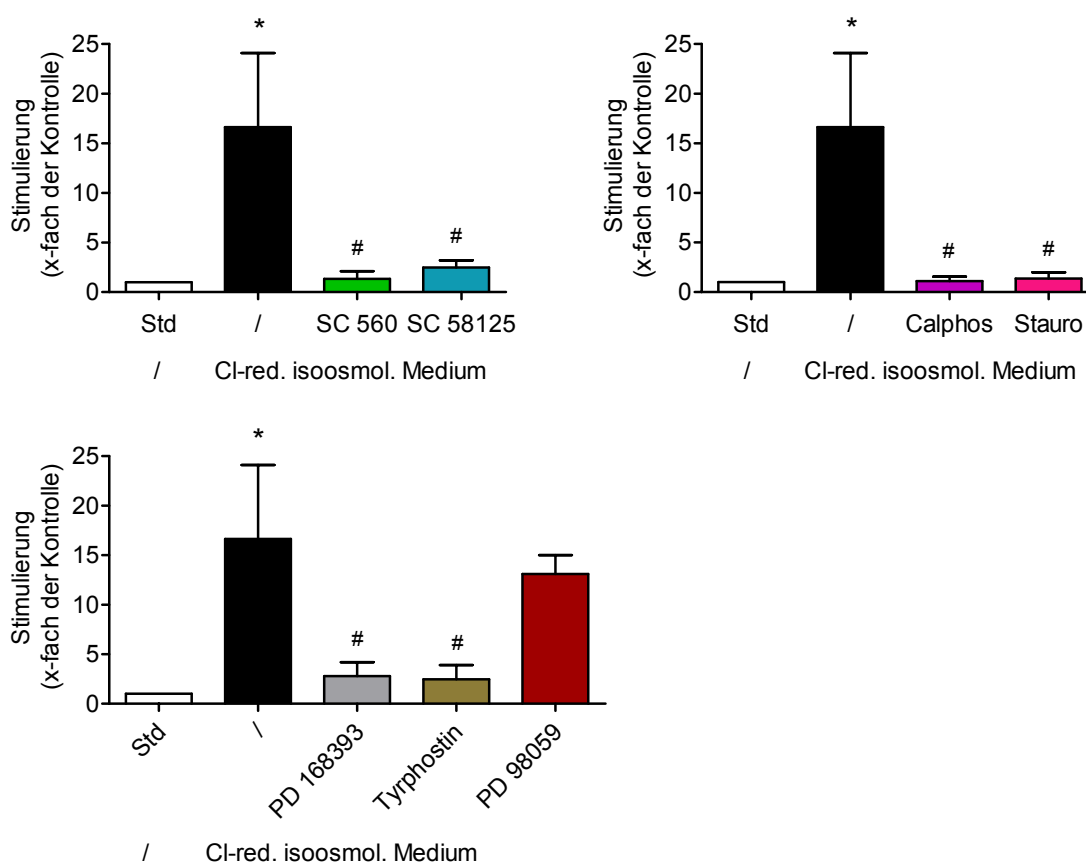
#### (4) Inhibitoren in Na-, bzw. Cl-reduziertem Medium

Die folgenden Graphiken zeigen den relativen PGE<sub>2</sub>-Anstieg in Na-, bzw. Cl-reduziertem Medium unter Zusatz von:

- A) COX-1/ -2-Inhibitoren
- B) PKC-Inhibitoren
- C) MAPK-Inhibitoren



**Abbildung 11** Mittelwerte +/- S.E.M. des PGE<sub>2</sub>-Anstieges in Na-red. Medium, jeweils bezogen auf den Wert des entsprechenden Standardmediums. Kontrolle=1 (0,05ng PGE<sub>2</sub>/ 24h/ µg RNA), n=3. \* p< 0,05 im Vergleich zur Kontrolle (Standard). # Signifikanz gegenüber der stimulierten Probe. SC 560: COX-1-Inhibitor, SC 58125: COX-2-Inhibitor. CalphostinC: PKC-Inhibitor, Staurosporin: PKA/C/G-Inhibitor. PD168393, Tyrphostin, PD 98059: MAPK-Inhibitoren.



**Abbildung 12** Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. des PGE<sub>2</sub>-Anstieges in CI-red. Medium, jeweils bezogen auf den Wert des entsprechenden Standardmediums. Kontrolle=1 (0,05ng PGE<sub>2</sub>/ 24h/  $\mu$ g RNA), n=3. \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle (Standard). # Signifikanz gegenüber der stimulierten Probe. SC 560: COX-1-Inhibitor, SC 58125: COX-2-Inhibitor. CalphostinC: PKC-Inhibitor, Staurosporin: PKA/C/G-Inhibitor. PD168393, Tyrphostin, PD 98059: MAPK-Inhibitoren.

In **Abbildung 11** und **Abbildung 12** erkennt man wieder, dass der knapp 19-, bzw. 17-fache Anstieg von PGE<sub>2</sub> im Na-, bzw. CI-reduziertem Medium von allen Inhibitoren recht einheitlich unterdrückt wird. Somit verursachen die selektiven COX-Inhibitoren eine gleichsame Supprimierung der PGE<sub>2</sub>-Synthese in mTAL-Zellen. Auch die PKC-Hemmstoffe haben den erwarteten Effekt. Bei den MAPK-Inhibitoren zeigt allein PD 98059, ein MAPK-/ ERK-Inhibitor keine deutliche Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Synthese.

---

## **B. mRNA-Expression in 6 verschiedenen Stimulationsmedien**

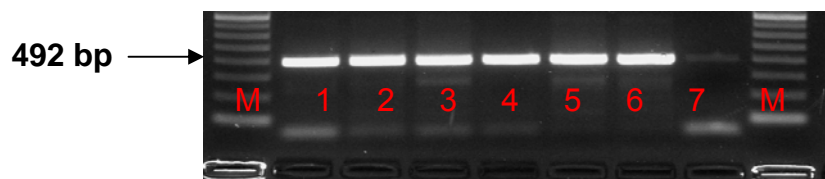
Ein weiterer Schritt zur Stützung meiner Thesen war neben der Messung des Endproduktes PGE<sub>2</sub> auch die Überprüfung, ob in den Zellkulturen Induktionsprozesse stattgefunden haben. Es sollten also weitere Parameter gemessen werden, die der Frage nachgingen, über welche spezifische Mechanismen der Zellkern zur Synthese von Prostaglandin E<sub>2</sub> angeregt wurde.

Vorgehensweise war dabei, die mRNA-Expression einzelner Enzyme anhand von RT-PCR und Gelelektrophorese auszuwerten. Die mRNA der erwarteten Enzyme wurde also in cDNA umgeschrieben und der jeweilige Gehalt in den Zellkulturen konnte dann mit Hilfe der Gelelektrophorese densitometrisch bestimmt werden. Gemessen wurde die mRNA-Expression von COX-1 und -2, sowie der mPGES-1 in den gleichen Stimulationsmedien wie zuvor.

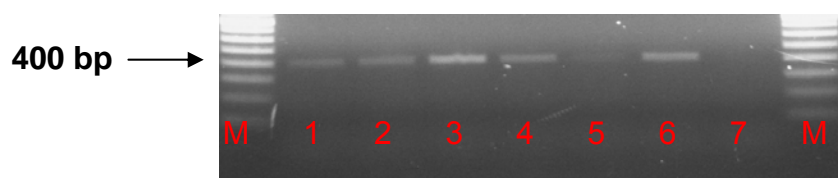
### **1. mRNA-Expression**

Zunächst wird nun ein Überblick über die Messungen der in cDNA umgeschriebenen mRNA von COX-1 und -2, sowie mPGES-1 in den bekannten 6 Stimulationsmedien ohne Zusatz von Inhibitoren gegeben. Demonstriert werden zuerst die gelelektrophoretischen Bilder und anschließend ihre densitometrische Auswertung.

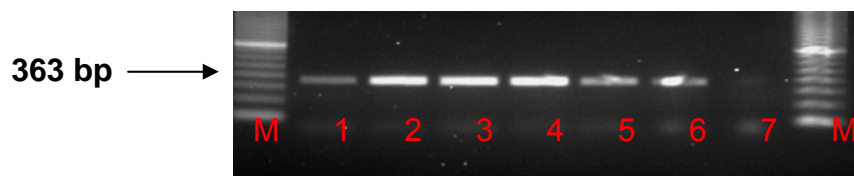
In jeder durchgeführten Zellstimulation verglich ich den Gehalt an mRNA, bzw. cDNA von  $\beta$ -Actin (als „housekeeping gene“), COX-1 und -2, sowie mPGES-1.  $\beta$ -Actin sollte in allen Stimulationsmedien konstant exprimiert werden. Von COX-1 und/oder -2, sowie mPGES-1 erwartete ich entsprechend den PGE<sub>2</sub>-Anstiegen (**Kapitel VI.A**) ebenfalls eine vermehrte Expression. Bei den folgenden Bildern handelt es sich exemplarisch um die Auswertung einer der durchgeführten Zellstimulationen (#6). In der Ergebnistabelle sind wiederum die densitometrischen Werte aller Stimulationen enthalten.

**1.  $\beta$ -Actin:**

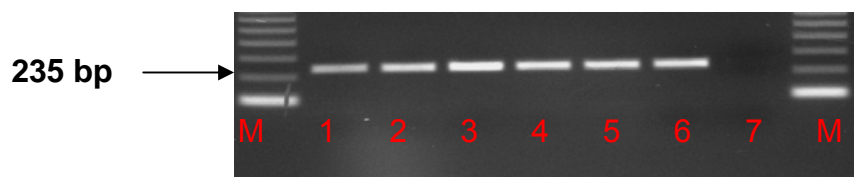
**Abbildung 13** Gelelektrophoresebild von  $\beta$ -Actin. Dargestellt ist eine repräsentative Aufnahme aus drei Versuchen. M Marker, 1 Standardmedium, 2 Hypoosmolares Medium, 3 Furosemidmedium, 4 NaCl-reduziertes Medium, 5 Na-reduziertes Medium, 6 Cl-reduziertes Medium, 7 Negativkontrolle.

**2. COX-1:**

**Abbildung 14** Gelelektrophoresebild von COX-1. Dargestellt ist eine repräsentative Aufnahme aus drei Versuchen. M Marker, 1 Standardmedium, 2 Hypoosmolares Medium, 3 Furosemidmedium, 4 NaCl-reduziertes Medium, 5 Na-reduziertes Medium, 6 Cl-reduziertes Medium, 7 Negativkontrolle.

**3. COX-2:**

**Abbildung 15** Gelelektrophoresebild von COX-2. Dargestellt ist eine repräsentative Aufnahme aus drei Versuchen. M Marker, 1 Standardmedium, 2 Hypoosmolares Medium, 3 Furosemidmedium, 4 NaCl-reduziertes Medium, 5 Na-reduziertes Medium, 6 Cl-reduziertes Medium, 7 Negativkontrolle.

**4. mPGES-1:**

**Abbildung 16** Gelelektrophoresebild von mPGES-1. Dargestellt ist eine repräsentative Aufnahme aus drei Versuchen. M Marker, 1 Standardmedium, 2 Hypoosmolares Medium, 3 Furosemidmedium, 4 NaCl-reduziertes Medium, 5 Na-reduziertes Medium, 6 Cl-reduziertes Medium, 7 Negativkontrolle.

|             | BA       | COX-1   | COX-2    | mPGES-1  |
|-------------|----------|---------|----------|----------|
| <b>#4</b>   |          |         |          |          |
| Std         | 9383,38  | 3719,98 | 7384,08  | 5028,86  |
| Hypoosmolar | 9396,08  | 5878,98 | 17726,93 | 14610,98 |
| Furosemid   | 9551,31  | 4586,10 | 413,58   | 5738,15  |
| NaCl-red.   | 10232,38 | 3236,10 | 10059,15 | 5409,69  |
| Na-red.     | 9488,50  | 2900,40 | 1421,74  | 2426,98  |
| Cl-red.     | 9947,72  | 4168,86 | 9250,38  | 8244,03  |
| <b>#6</b>   |          |         |          |          |
| Std         | 12506,38 | 949,79  | 3509,03  | 8816,74  |
| Hypoosmolar | 12885,62 | 1474,10 | 12218,28 | 11500,03 |
| Furosemid   | 12114,67 | 4091,86 | 12278,74 | 15620,98 |
| NaCl-red.   | 12529,33 | 1950,74 | 13275,03 | 13074,86 |
| Na-red.     | 12922,08 | 476,52  | 7239,15  | 13257,45 |
| Cl-red.     | 13371,38 | 2684,98 | 7595,03  | 13334,86 |
| <b>#7</b>   |          |         |          |          |
| Std         | 12355,62 | 1084,15 | 586,67   | 377,30   |
| Hypoosmolar | 13826,74 | 1376,91 | 8169,57  | 7768,40  |
| Furosemid   | 13460,15 | 6925,10 | 12615,98 | 15522,98 |
| NaCl-red.   | 13102,03 | 777,79  | 1635,45  | 4497,15  |
| Na-red.     | 13435,15 | 1852,28 | 10404,10 | 10235,57 |
| Cl-red.     | 13911,91 | 1234,20 | 6287,86  | 8438,86  |

**Tabelle 17** Densitometrische Auswertung der Zellstimulationen #4, #6, #7, siehe **Tabelle 15**. Gemessen wurde die Dichte der einzelnen Banden, die wiederum ein Maß für den Gehalt der jeweiligen mRNA, bzw cDNA von COX-1 und -2, sowie mPGES-1 darstellt.

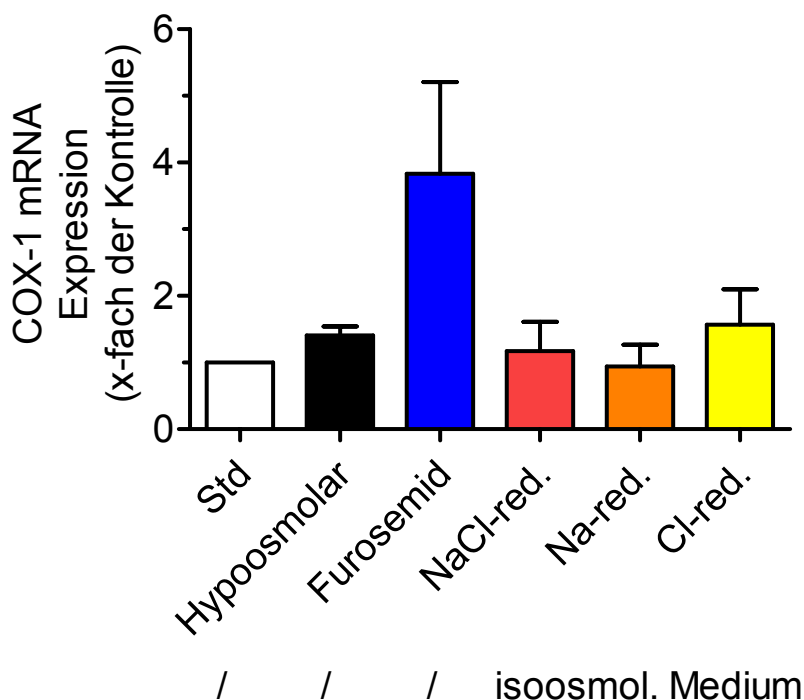
Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Konzentration der mRNA-Expression von COX-1 und -2, sowie mPGES-1. Darüber hinaus ermöglicht sie einen Vergleich zwischen den jeweiligen mRNA-Anstiegen der genannten Enzyme. Die Dichte der Bande, bzw. der jeweilige Gehalt an mRNA wurde dabei in Bezug zum „housekeeping gene“  $\beta$ -Actin (BA) gesetzt. In der 2.Spalte lässt sich dann durch Bezug auf den Standardwert ablesen, um welchen Faktor die Expression gestiegen ist.

|             | COX-1       |             | COX-2       |              | mPGES-1     |              |
|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|--------------|
|             | COX-1/BA    | 1/Std       | COX-2/BA    | 1/Std        | mPGES-1/BA  | 1/Std        |
| <b>#4</b>   |             |             |             |              |             |              |
| Std         | <b>0,40</b> | <i>1,00</i> | <b>0,79</b> | <i>1,00</i>  | <b>0,54</b> | <i>1,00</i>  |
| Hypoosmolar | <b>0,63</b> | <i>1,58</i> | <b>1,89</b> | <i>2,40</i>  | <b>1,56</b> | <i>2,90</i>  |
| Furosemid   | <b>0,48</b> | <i>1,21</i> | <b>0,04</b> | <i>0,06</i>  | <b>0,60</b> | <i>1,12</i>  |
| NaCl-red.   | <b>0,32</b> | <i>0,80</i> | <b>0,98</b> | <i>1,25</i>  | <b>0,53</b> | <i>0,99</i>  |
| Na-red.     | <b>0,31</b> | <i>0,77</i> | <b>0,15</b> | <i>0,19</i>  | <b>0,26</b> | <i>0,48</i>  |
| Cl-red.     | <b>0,42</b> | <i>1,06</i> | <b>0,93</b> | <i>1,18</i>  | <b>0,83</b> | <i>1,55</i>  |
| <b>#6</b>   |             |             |             |              |             |              |
| Std         | <b>0,08</b> | <i>1,00</i> | <b>0,28</b> | <i>1,00</i>  | <b>0,71</b> | <i>1,00</i>  |
| Hypoosmolar | <b>0,11</b> | <i>1,50</i> | <b>0,95</b> | <i>3,38</i>  | <b>0,89</b> | <i>1,27</i>  |
| Furosemid   | <b>0,34</b> | <i>4,45</i> | <b>1,01</b> | <i>3,61</i>  | <b>1,29</b> | <i>1,83</i>  |
| NaCl-red.   | <b>0,16</b> | <i>2,05</i> | <b>1,06</b> | <i>3,78</i>  | <b>1,04</b> | <i>1,48</i>  |
| Na-red.     | <b>0,04</b> | <i>0,49</i> | <b>0,56</b> | <i>2,00</i>  | <b>1,03</b> | <i>1,46</i>  |
| Cl-red.     | <b>0,20</b> | <i>2,63</i> | <b>0,57</b> | <i>2,02</i>  | <b>1,00</b> | <i>1,41</i>  |
| <b>#7</b>   |             |             |             |              |             |              |
| Std         | <b>0,09</b> | <i>1,00</i> | <b>0,05</b> | <i>1,00</i>  | <b>0,03</b> | <i>1,00</i>  |
| Hypoosmolar | <b>0,10</b> | <i>1,14</i> | <b>0,59</b> | <i>12,44</i> | <b>0,56</b> | <i>18,13</i> |
| Furosemid   | <b>0,51</b> | <i>5,84</i> | <b>0,94</b> | <i>19,74</i> | <b>1,15</b> | <i>37,19</i> |
| NaCl-red.   | <b>0,06</b> | <i>0,67</i> | <b>0,12</b> | <i>2,63</i>  | <b>0,34</b> | <i>11,06</i> |
| Na-red.     | <b>0,14</b> | <i>1,57</i> | <b>0,77</b> | <i>16,31</i> | <b>0,76</b> | <i>24,58</i> |
| Cl-red.     | <b>0,09</b> | <i>1,01</i> | <b>0,45</b> | <i>9,52</i>  | <b>0,61</b> | <i>19,58</i> |

**Tabelle 18** Vergleich der relativen mRNA, bzw cDNA-Anstiege bezogen auf  $\beta$ -Actin (**fett**) und jeweils auf den entsprechenden Standardwert (*kursiv*), siehe **Tabelle 15** : Stimulationen #4, #6 und #7.

Im folgenden werden die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung graphisch dargestellt. Dabei werden nacheinander die mRNA Expression von COX-1, COX-2 und mPGES-1 in den verschiedenen Stimulationsmedien betrachtet.

### a) mRNA Expression von COX-1 in 6 verschiedenen Medien



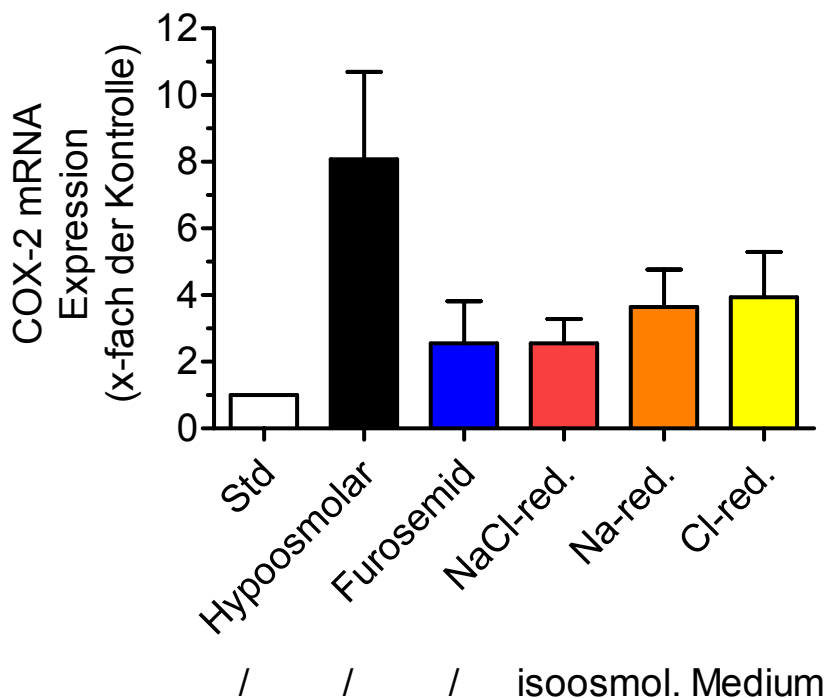
**Abbildung 17** Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. der mRNA-Konzentrationsanstiege von COX-1, jeweils bezogen auf die mRNA Konzentration des Standardmediums: Kontrolle=1 (0,19 $\mu$ g/ml RNA), n=3.

Wie in **Abbildung 17** zu sehen, lässt sich kein deutlicher Anstieg der mRNA Expression von COX-1 in den verschiedenen Stimulationsmedien beobachten. Nur in dem Furosemid-versetzten Medium finden wir eine knapp 4-fache Steigerung der mRNA-Expression.

Somit müsste man aufgrund des fehlenden Anstieges an mRNA eigentlich von einer fehlenden Induktion des Enzyms bei verändertem Salzhaushalt sprechen. Bei dem Einsatz des COX-1-Hemmers SC 560 zeigte sich aber wiederum ein klarer Abfall der PGE<sub>2</sub>-Synthese, siehe **Kapitel VI.A.2**. Die unterschiedlichen Ergebnisse widersprechen sich folglich und können hier nicht abschließend erklärt werden. Anhand unserer Datenlage können wir also keine eindeutige Aussage über die Beteiligung von COX-1 an der Prostaglandinsynthese vornehmen.



### b) mRNA Expression von COX-2 in 6 verschiedenen Medien



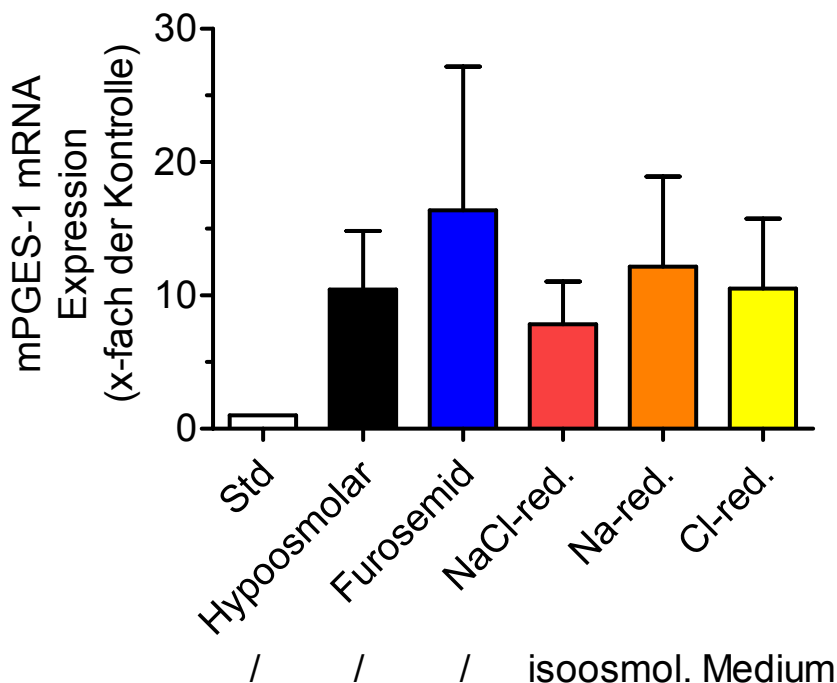
**Abbildung 18** Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. der mRNA-Konzentrationsanstiege von COX-2, jeweils bezogen auf die mRNA-Konzentration des Standardmediums: Kontrolle=1 (0,37 $\mu$ g/ml RNA), n=3.

Im Gegensatz zu den COX-1-mRNA-Daten findet man bei der Untersuchung der COX-2-Expression durchaus eine Konzentrationsänderung in den verschiedenen Medien.

In allen Zellstimulationen wird die COX-2 in hypoosmolarem Medium vermehrt exprimiert, dabei findet ein Anstieg um das 2- bis 12-fache statt. Dementsprechend lag die PGE<sub>2</sub>-Konzentration (siehe **Abbildung 7**) in hypoosmolarem Medium teilweise bei dem 10- bis 90-fachen der Norm. Diese Daten deuten auf eine Korrelation zwischen der PGE<sub>2</sub>-Synthese in hypoosmolaren Nierenepithelzellkulturen und der COX-2-Induktion hin. Auch in NaCl-reduziertem, sowie Na- oder Cl-reduziertem Medium kann man tendenziell von einer vermehrten Expression von COX-2 sprechen, welche im Zusammenhang mit einer gesteigerten Prostaglandin E<sub>2</sub>-Synthese in diesen Medien steht.

Auch bei der Expression von COX-2 in Furosemid-versetztem Medium findet man wie bei der COX-1-Expression einen deutlichen Anstieg. Dies widerspricht aber, wie oben angedeutet, den PGE<sub>2</sub>-Ergebnissen. Folglich lässt sich dazu keine klare Aussage treffen.

### c) mRNA Expression von mPGES-1 in 6 verschiedenen Medien



**Abbildung 19** Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. der mRNA-Konzentrationsanstiege von mPGES-1, jeweils bezogen auf die mRNA Konzentration des Standardmediums: Kontrolle=1 ( $0,43\mu\text{g/ml}$  RNA),  $n=3$ .

Die mPGES-1-Expression zeigt ein ähnliches Muster wie die COX-2-Expression in den 6 verschiedenen Stimulationsmedien. Sie wird 1,3-18x mehr in hypoosmolarem als in physiologischem Stimulationsmedium vorgefunden. Auch in NaCl-, v.a. aber eher in Na-red.- und Cl-red. Medium findet eine vermehrte Expression statt. Somit lässt sich durchaus eine Beteiligung der mPGES-1 an der  $\text{PGE}_2$ -Bildung bei Veränderung des zellulären Salzhaushaltes vermuten. Auch hier finden wir wieder eine 2- bis 37-fache Steigerung der mRNA Expression von mPGES-1 in Furosemidversetztem Medium.

## 2. mRNA-Expression unter Zusatz von Inhibitoren

Im folgenden werden die Ergebnisse der mRNA Expression von COX-1/-2 und mPGES-1 bei Verwendung der Inhibitoren dargestellt. In den folgenden Tabellen und Graphiken werden erneut die densitometrischen Auswertungen der gelelektrophoretischen Bilder präsentiert.

In **Kapitel VI.A** wurde der Einfluss der unterschiedlichen Inhibitoren auf die PGE<sub>2</sub>-Bildung in den 6 Stimulationsmedien demonstriert. Bei Inhibition der MAP Kinasen und der PKC erwartete ich nun auch für die mRNA-Expression von COX-1 und -2, sowie mPGES-1 diesen Zusammenhang.

In **Abschnitt a) - c)** werden nacheinander die Ergebnisse bezüglich des Einflusses der Inhibitoren auf die mRNA Expression von COX-1, COX-2 und mPGES-1 erläutert.

In der folgenden Tabelle sind nun alle densitometrischen Auswertungen der RT-PCRs der Zellstimulationen unter Verwendung von Inhibitoren zusammengefasst.

|                    | BA       | COX-1    | COX-2    | mPGES-1  |
|--------------------|----------|----------|----------|----------|
| <b>SC 560</b>      |          |          |          |          |
| Std                | 14225,62 | 11142,23 | 3008,62  | 977,45   |
| Hypoosmolar        | 15191,03 | 5775,98  | 7022,40  | 15034,15 |
| Furosemid          | 14067,15 | 6390,81  | 1093,45  | 7497,69  |
| NaCl-red.          | 13301,62 | 6084,81  | 11470,81 | 2529,59  |
| Na-red.            | 12969,08 | 6433,69  | 11779,69 | 10076,98 |
| Cl-red.            | 13619,62 | 2822,69  | 596,25   | 1076,98  |
| <b>SC 58125</b>    |          |          |          |          |
| Std                | 7980,38  | 11712,15 | 2018,08  | 12085,15 |
| Hypoosmolar        | 10636,03 | 3847,86  | 12421,10 | 8806,86  |
| Furosemid          | 12358,15 | 4894,33  | 11506,33 | 5148,57  |
| NaCl-red.          | 11351,50 | 3533,45  | 11435,40 | 2532,15  |
| Na-red.            | 13622,79 | 13028,40 | 18796,81 | 14392,52 |
| Cl-red.            | 13156,79 | 12292,86 | 7084,28  | 5359,28  |
| <b>PD 168393</b>   |          |          |          |          |
| Std                | 15945,74 | 2137,03  | 3040,20  | 6401,28  |
| Hypoosmolar        | 16921,15 | 2211,98  | 6022,62  | 11575,98 |
| Furosemid          | 16205,62 | 13966,93 | 3256,15  | 12950,57 |
| NaCl-red.          | 9442,08  | 1279,52  | 1663,33  |          |
| Na-red.            | 14772,03 | 5416,10  | 6491,45  | 7337,40  |
| Cl-red.            | 11732,45 | 2031,38  | 5001,79  | 4729,62  |
| <b>CalphostinC</b> |          |          |          |          |
| Std                | 10767,33 | 4176,69  | 3143,98  | 10951,57 |
| Hypoosmolar        | 10599,86 | 2073,86  | 1087,50  | 10986,69 |
| Furosemid          | 9737,86  | 13679,05 | 3890,50  | 9276,15  |
| NaCl-red.          | 10170,86 | 1730,57  | 7270,98  | 9634,86  |
| Na-red.            | 10679,03 | 16445,93 | 5884,69  | 13053,10 |
| Cl-red.            | 8809,91  | 16443,86 | 4509,03  | 12025,28 |

**Tabelle 19** Densitometrische Auswertung der Zellstimulationen. Gemessen wurde die Dichte der einzelnen Banden, die wiederum ein Maß für den Gehalt der jeweiligen mRNA/cDNA von COX-1 und -2, sowie PGE-S darstellt.

Die folgende Tabelle dient der deutlicheren Hervorhebung der relativen mRNA/cDNA-Anstiege und erlaubt damit den Vergleich mit **Tabelle 18**, in welcher die mRNA Expression ohne Verwendung von Inhibitoren dargestellt wurde.

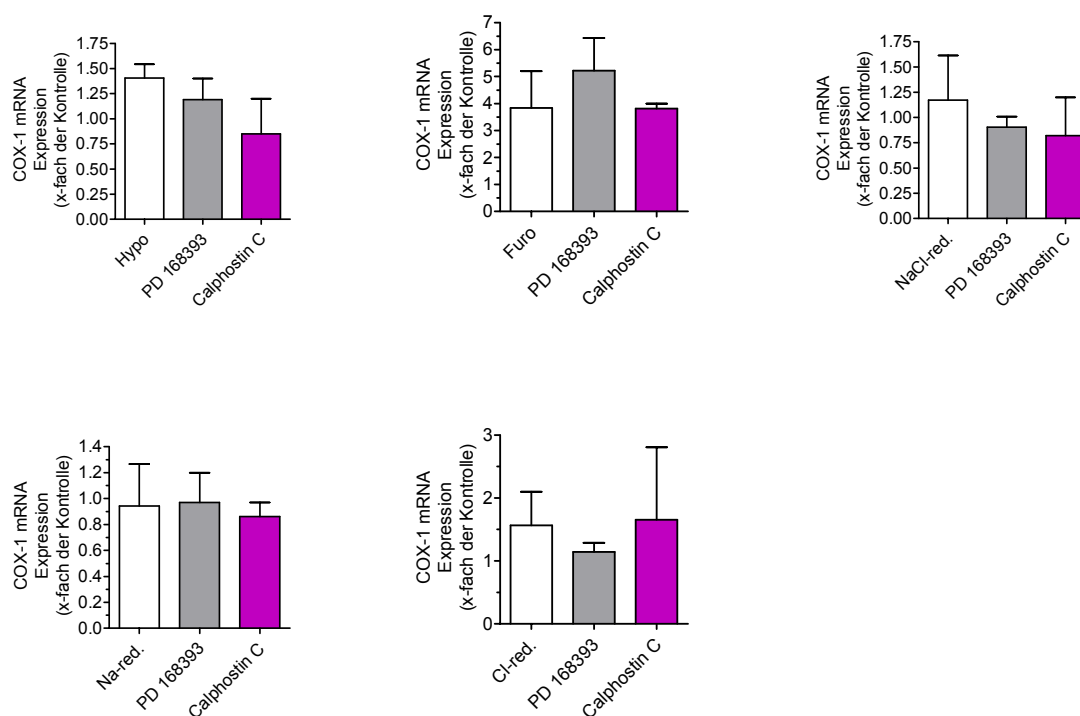
|             | COX-1       |             | COX-2       |             | mPGES-1     |              |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
|             | COX-1/BA    | 1/Std       | COX-2/BA    | 1/Std       | mPGES1/BA   | 1/Std        |
| SC 560      |             |             |             |             |             |              |
| Std         | <b>0,78</b> | <i>1,00</i> | <b>0,21</b> | <i>1,00</i> | <b>0,07</b> | <i>1,00</i>  |
| Hypoosmolar | <b>0,38</b> | <i>0,49</i> | <b>0,46</b> | <i>2,19</i> | <b>0,99</b> | <i>14,40</i> |
| Furosemid   | <b>0,45</b> | <i>0,58</i> | <b>0,08</b> | <i>0,37</i> | <b>0,53</b> | <i>7,76</i>  |
| NaCl-red.   | <b>0,46</b> | <i>0,58</i> | <b>0,86</b> | <i>4,08</i> | <b>0,19</b> | <i>2,77</i>  |
| Na-red.     | <b>0,50</b> | <i>0,63</i> | <b>0,91</b> | <i>4,29</i> | <b>0,78</b> | <i>11,31</i> |
| Cl-red.     | <b>0,21</b> | <i>0,26</i> | <b>0,04</b> | <i>0,21</i> | <b>0,08</b> | <i>1,15</i>  |
| SC 58125    |             |             |             |             |             |              |
| Std         | <b>1,47</b> | <i>1,00</i> | <b>0,25</b> | <i>1,00</i> | <b>1,51</b> | <i>1,00</i>  |
| Hypoosmolar | <b>0,36</b> | <i>0,25</i> | <b>1,17</b> | <i>4,62</i> | <b>0,83</b> | <i>0,55</i>  |
| Furosemid   | <b>0,40</b> | <i>0,27</i> | <b>0,93</b> | <i>3,68</i> | <b>0,42</b> | <i>0,28</i>  |
| NaCl-red.   | <b>0,31</b> | <i>0,21</i> | <b>1,01</b> | <i>3,98</i> | <b>0,22</b> | <i>0,15</i>  |
| Na-red.     | <b>0,96</b> | <i>0,65</i> | <b>1,38</b> | <i>5,46</i> | <b>1,06</b> | <i>0,70</i>  |
| Cl-red.     | <b>0,93</b> | <i>0,64</i> | <b>0,54</b> | <i>2,13</i> | <b>0,41</b> | <i>0,27</i>  |
| PD 168393   |             |             |             |             |             |              |
| Std         | <b>0,13</b> | <i>1,00</i> | <b>0,19</b> | <i>1,00</i> | <b>0,40</b> | <i>1,00</i>  |
| Hypoosmolar | <b>0,13</b> | <i>0,98</i> | <b>0,36</b> | <i>1,87</i> | <b>0,68</b> | <i>1,70</i>  |
| Furosemid   | <b>0,86</b> | <i>6,43</i> | <b>0,20</b> | <i>1,05</i> | <b>0,80</b> | <i>1,99</i>  |
| NaCl-red.   | <b>0,14</b> | <i>1,01</i> | <b>0,18</b> | <i>0,92</i> |             |              |
| Na-red.     | <b>0,37</b> | <i>2,74</i> | <b>0,44</b> | <i>2,30</i> | <b>0,50</b> | <i>1,24</i>  |
| Cl-red.     | <b>0,17</b> | <i>1,29</i> | <b>0,43</b> | <i>2,24</i> | <b>0,40</b> | <i>1,00</i>  |
| CalphostinC |             |             |             |             |             |              |
| Std         | <b>0,39</b> | <i>1,00</i> | <b>0,29</b> | <i>1,00</i> | <b>1,02</b> | <i>1,00</i>  |
| Hypoosmolar | <b>0,20</b> | <i>0,50</i> | <b>0,10</b> | <i>0,35</i> | <b>1,04</b> | <i>1,02</i>  |
| Furosemid   | <b>1,40</b> | <i>3,62</i> | <b>0,40</b> | <i>1,37</i> | <b>0,95</b> | <i>0,94</i>  |
| NaCl-red.   | <b>0,17</b> | <i>0,44</i> | <b>0,71</b> | <i>2,45</i> | <b>0,95</b> | <i>0,93</i>  |
| Na-red.     | <b>1,54</b> | <i>3,97</i> | <b>0,55</b> | <i>1,89</i> | <b>1,22</b> | <i>1,20</i>  |
| Cl-red.     | <b>1,87</b> | <i>4,81</i> | <b>0,51</b> | <i>1,75</i> | <b>1,36</b> | <i>1,34</i>  |

**Tabelle 20** mRNA Messungen aus den Zellstimulationen (**fett**), unter Einsatz von 4 verschiedenen Inhibitoren und jeweils bezogen auf den Standardwert (*kursiv*).

---

### a) Einfluss der Inhibitoren auf die Expression von COX-1

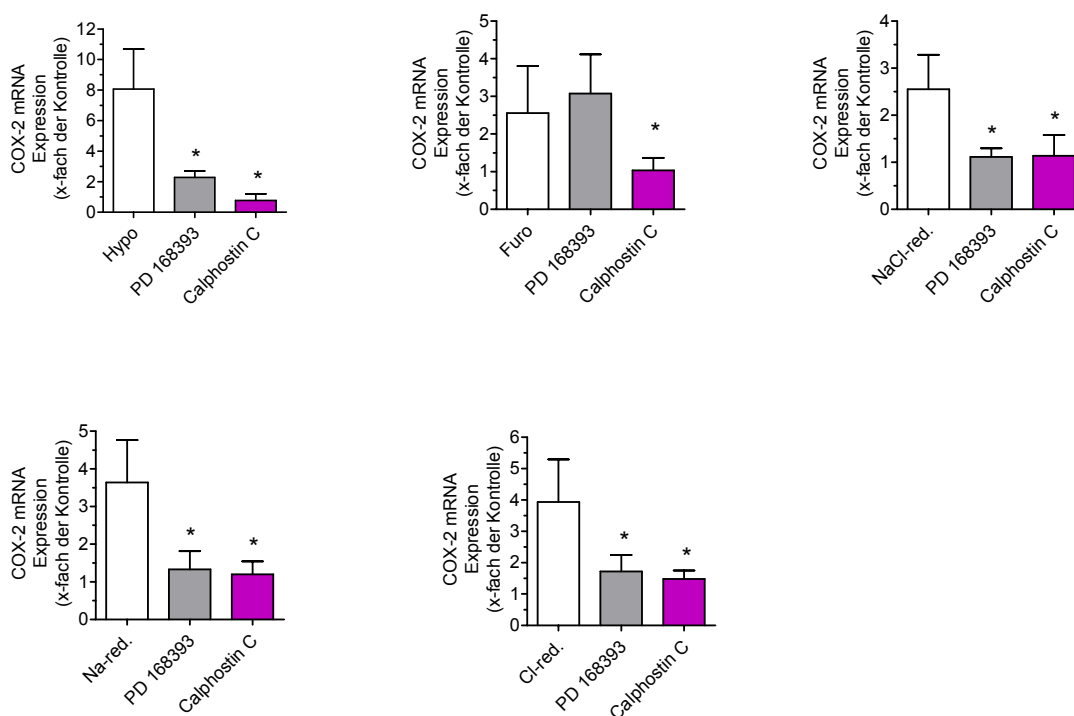
Die folgenden Graphiken geben einen Überblick über die Veränderung der mRNA-Konzentration von COX-1 in den verschiedenen Stimulationsmedien. Dabei sind jeweils 2 Inhibitoren nebeneinander aufgelistet, die als Hemmstoffe der MAP Kinasen (PD 168393) und der Proteinkinase C (CalphostinC) gelten. Als 1. Balken in den Graphiken ist jeweils die Expression der COX-1 ohne Zusatz von Inhibitoren dargestellt. Dabei fällt auf, dass es schon ohne Zusatz von Hemmstoffen zu keiner relevanten Induktion des Enzyms kam. Folglich sind die übrigen Ergebnisse schwierig zu interpretieren. In der 1. Graphik in **Abbildung 20** lässt sich dieser Aspekt verdeutlichen. Man meint, eine Hemmung der COX-1 durch beide aufgeführten Inhibitoren zu erkennen. Doch da es ohne Inhibitor gerade zu einem knapp 1,3-fachen Anstieg der COX-1 kam, kann man nun bei Zugabe der Hemmstoffe nicht direkt von einer Unterdrückung der Expression sprechen. Dies lässt sich auch in den restlichen 4 Graphiken nicht verdeutlichen. So kann mit diesen Ergebnissen nicht abschließend geklärt werden, ob die genannten Enzyme eine Rolle bei der COX-1 Expression spielen.



**Abbildung 20** Mittelwerte (+/- S.E.M.) des Anstieges der mRNA Expression von COX-1 in den verschiedenen Stimulationsmedien, jeweils bezogen auf die mRNA Konzentration des Standardmediums. Kontrolle=1 (in  $\mu\text{g/mlRNA}$ ),  $n=3$ . Hypo: hypoosmaleres Medium, Furo: Standardmedium mit Furosemid, NaCl-red: NaCl-reduziertes Medium, Na-red: Na-reduziertes Medium, Cl-red: Cl-reduziertes Medium.

## b) Einfluss der Inhibitoren auf die Expression von COX-2

Die Expression der COX-2 in hypoosmolarem Medium steigt ohne Zusatz von Hemmstoffen um das rund 8-fache an, siehe 1.Graphik in **Abbildung 21**. Bei Zugabe von PD 168393 (MAPK Hemmstoff) und CalphostinC (Hemmstoff der PKC) lässt sich von einer Unterdrückung der COX-2-Expression sprechen. Auch in den Graphiken 3-5 der **Abbildung 21** zeigen sich Hinweise für eine Hemmung der COX-2 in allen Zellkulturmedien durch PD 168393 und CalphostinC. So unterstützen meine Daten damit die These, dass MAP Kinasen und die Proteinkinase C bei der Aktivierung der COX-2 bei salzverlust-induzierter PGE<sub>2</sub>-Synthese eine Rolle spielen. Der Einfluss der Inhibitoren auf COX-2 in Furosemid-versetztem Medium bleibt allerdings undeutlich.

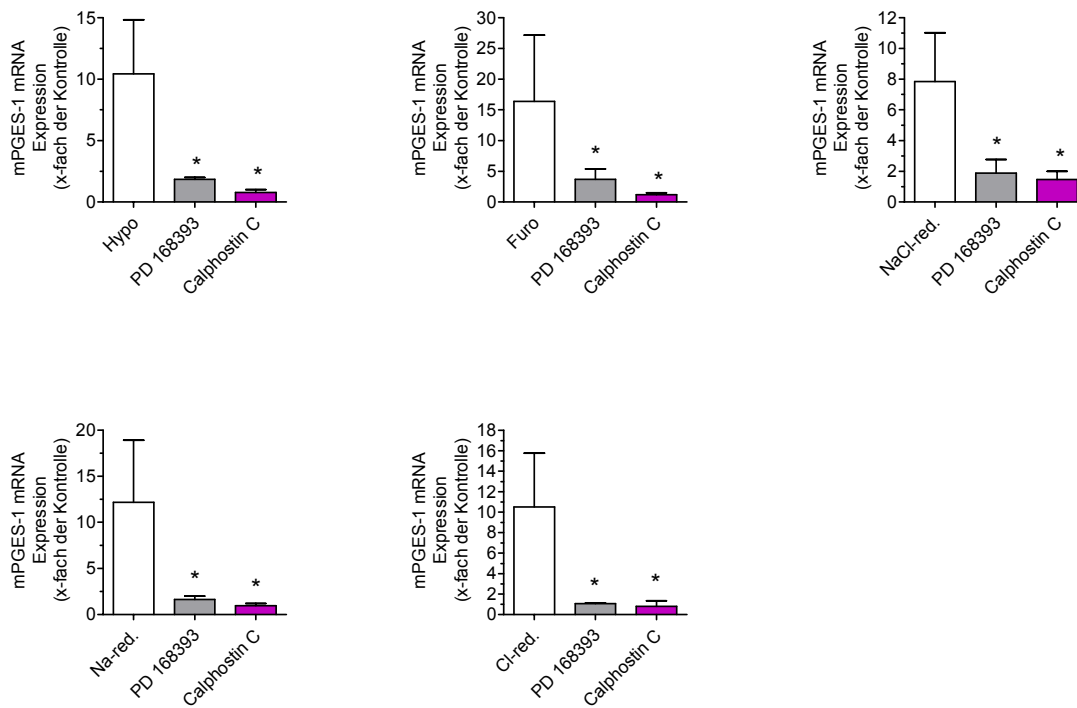


**Abbildung 21** Mittelwerte (+/- S.E.M.) des Anstieges der mRNA Expression von COX-2 in den verschiedenen Medien, jeweils bezogen auf die mRNA Konzentration des Standardmediums. Kontrolle=1 (in  $\mu\text{g/ml}$  RNA),  $n=3$ . \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle (Standard). Hypo: hypoosmaleres Medium, Furo: Standardmedium mit Furosemid, NaCl-red: NaCl-reduziertes Medium, Na-red: Na-reduziertes Medium, Cl-red: Cl-reduziertes Medium.

### c) Einfluss der Inhibitoren auf die Expression von mPGES-1

Vergleicht man nun die Einflussnahme der Inhibitoren auf die Expression von mPGES-1 in den verschiedenen Nährmedien, siehe **Abbildung 22**, kann man fast durchgehend von einer deutlichen Unterdrückung der mPGES-1 Expression durch genannte Hemmstoffe sprechen. Somit nehmen wir an, dass MAP Kinasen und die Proteinkinase C bei der salzverlustinduzierten  $\text{PGE}_2$ -Synthese über die Induktion von mPGES-1 Einfluss nehmen.





**Abbildung 22** Mittelwerte (+/- S.E.M.) des Anstieges der mRNA Expression von mPGES-1 in den verschiedenen Medien, jeweils bezogen auf die mRNA Konzentration des Standardmediums. Kontrolle=1 (in  $\mu\text{g}/\text{ml}$  RNA),  $n=3$ . \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle (Standard). Hypo: hypoosmaleres Medium, Furo: Standardmedium mit Furosemid, NaCl-red.: NaCl-reduziertes Medium, Na-red: Na-reduziertes Medium, Cl-red: Cl-reduziertes Medium.

## VII. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der Elektrolytveränderung auf die Prostaglandinbildung in Nierenepithelzellen zu untersuchen. Dabei ging ich zellexperimentell vor und verwendete mTAL Zellen aus frisch präparierten Schweinenieren. Den Anlass hat dabei das Hyperprostaglandin-E<sub>2</sub>-Syndrom gegeben, bei dem der genaue Pathomechanismus, sowie die molekularbiologischen Hintergründe der gesteigerten Prostaglandinsynthese noch immer Fragen aufwerfen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ich die eingangs beschriebene These, dass Prostaglandin E<sub>2</sub> aufgrund eines in der Zelle entstandenen hypoosmolaren Milieus vermehrt freigesetzt wird, experimentell nachvollziehen und damit bestätigen.

Dabei untersuchte ich diesen Mechanismus an dem noch nicht sehr verbreiteten mTAL-Zellmodell, indem ich die Furosemid-ähnliche Salzverlusttubulopathie durch Einstellen unterschiedlicher Elektrolytmedien simulierte. An anderen Zelllinien, sowie in tierexperimentellen Studien [Yang et al. 2000] ist der direkte Zusammenhang zwischen Hypoosmolarität und PGE<sub>2</sub>-Anstieg schon gezeigt worden. Der Vorteil bei der zellexperimentellen Verwendung von mTAL-Zellen ist präparationsbedingt eine höhere Ausbeute an Zellen bei der Isolation, sowie das Nicht-Vorhandensein von Macula densa Zellen in dem Bereich der Niere. Die hier untersuchten Transportsysteme werden sowohl in cTAL-, als auch in mTAL-Zellen exprimiert. In den durchgeführten Versuchen konnte ich den Zusammenhang zwischen Hypoosmolarität und PGE<sub>2</sub>-Anstieg auch in dem hier verwendeten mTAL Modell nachweisen. So wurde in hypoosmolarem Medium ein deutlicher PGE<sub>2</sub>-Anstieg, durchschnittlich um das rund 70-fache verzeichnet.

Weiterhin ging ich der Fragestellung nach, welche Substanz bei einer Veränderung der Elektrolytzusammensetzung den ausschlaggebenden Reiz für die vermehrte Prostaglandinbildung darstellt. Verglichen wurde also der PGE<sub>2</sub>-Anstieg in hypoosmolarem Milieu mit dem PGE<sub>2</sub>-Spiegel, der sich in osmotisch ausgeglichenen Zellmedien einstellte, denen partiell NaCl, Natrium oder Chlorid entzogen und durch andere osmotisch aktive Substanzen ersetzt wurde. Zur Herstellung der Isoosmolarität verwendete ich Mannitol, welches standardmäßig für Osmolaritätseinstellungen verwendet wird [Cheng et al. 2000]. Es ist als inerte Zucker gut geeignet, da es kaum metabolisiert wird. Im Rahmen dieser experimentellen Studie fand man bei reinem NaCl-Entzug unter ausgeglichenen osmotischen Bedingungen immer noch einen starken Anstieg der PGE<sub>2</sub>-Synthese um das 30-fache, was den Einfluss speziell von Natriumchlorid auf die PGE<sub>2</sub>-Synthese verdeutlicht. Bei alleinigem Natrium-, bzw. Chlorid-

entzug stieg die Prostaglandinbildung noch um das 19-, bzw. 17-fache. Jedoch zeigt diese Differenzierung in Natrium- oder Chloridentzug keine nennenswerten Unterschiede. Die Vermutung, dass bei der PGE<sub>2</sub>-Synthese das Chlorid eine zentrale Rolle spielt [Yang et al. 2000, Cheng et al. 2000], konnte ich mit den Messergebnissen also nicht nachvollziehen. Trotzdem lässt sich festhalten, dass die Zellen auf Schwankungen des Kochsalzhaushaltes mit Veränderung der Prostaglandinbildung reagieren.

Ein anderer Ansatz war, das hypoosmolare Milieu in der Zelle durch Blockade des NKCC2-Kanals mit Hilfe von Furosemid herzustellen und auch dadurch den PGE<sub>2</sub>-Anstieg herbeizuführen. Dieses ist leider nicht deutlich gelungen. So wurde durchschnittlich keine relevant vermehrte PGE<sub>2</sub>-Synthese in den Zellüberständen verzeichnet. Dennoch kam es bei den mRNA Messungen in einigen Zellkulturen zu einer vermehrten Expression von COX-2 und der mPGES-1. Da jedoch die COX-2 mRNA komplexen posttranskriptionellen und posttranslationellen Regulationen unterliegt, ist es möglich, dass zwar COX-2 mRNA nachgewiesen wird, jedoch ohne entsprechendes Proteinprodukt. So käme es dann auch nicht zur PGE<sub>2</sub>-Synthese. Trotzdem stellt sich die Frage, warum die durch Furosemid hergestellte Elektrolytveränderung in den Nierenzellen nicht zum erwarteten PGE<sub>2</sub>-Anstieg geführt hat. Denn durch die Blockade des NKCC2-Kanals muss es in der Zelle zu der Bildung eines hypoosmolaren Milieu kommen, was wiederum die gleiche Ausgangsbasis wie in den anderen Experimenten darstellt. Es ist gut möglich, dass der Durchführung des Experiments ein systematischer Fehler zugrunde lag. Eine Möglichkeit ist, dass die für die Blockade des NKCC2-Kanals verwendete Dosis Lasix ® (Furosemid) nicht ausreichend hoch gewählt wurde. Leider ließ sich das Modell im Rahmen dieser Doktorarbeit, sowie aus Kostengründen in Bezug auf neue Schweinenierenbeschaffung und -präparation nicht wiederholen.

Darüber hinaus ging ich der Fragestellung nach, welche der beiden Cyclooxygenasen, COX-1 oder COX-2, die größere Relevanz bei der hypoosmolar bedingten PGE<sub>2</sub>-Bildung hat. So beobachtete man bei Zugabe von SC 560, einem COX-1-Hemmer, zu den unterschiedlichen Stimulationsmedien tatsächlich einen Rückgang der PGE<sub>2</sub>-Bildung. Die unter hypoosmolaren Bedingungen um das 70-fache angestiegene PGE<sub>2</sub>-Bildung stieg jetzt nur noch um das 4-fache an. Auch in den anderen Stimulationsmedien zeigte sich bei Zugabe von SC 560 dieser Rückgang. Anhand der PGE<sub>2</sub>-Werte lässt sich also eine Teilnahme von COX-1 bei der Prostaglandinbildung vermuten. Bei Betrachtung der mRNA Expressionsergebnisse dagegen fand sich kein Anhalt für eine Beteiligung von COX-1 in diesem Prozess. In keiner der Zellstimulationen ließ sich eine relevant vermehrte Expression von COX-1 beobachten. Somit ist

es nicht möglich, eine eindeutige Aussage über die Rolle von COX-1 in hypoosmolar bedingtem PGE<sub>2</sub>-Anstieg machen.

Bei der Zugabe des COX-2-Hemmers SC 58125 hingegen, konnte man den Einfluss von COX-2 auf die PGE<sub>2</sub>-Synthese, sowie auch ihre vermehrte mRNA Expression experimentell zeigen. So ließ sich der rund 70-fache Anstieg des PGE<sub>2</sub> in hypoosmolarem Medium hier durch Zugabe von SC 58125 ebenfalls auf nur noch einen 4-fachen Anstieg reduzieren. Auch in den anderen Stimulationsmedien mit verstärkter Prostaglandinbildung konnte man bei Zusatz von SC 58125 keine deutlichen Anstiege mehr verzeichnen. Bei Untersuchung der mRNA-Expression von COX-2 konnte ich darüber hinaus auch eine Zunahme in hypoosmolarem, Furosemid-versetztem, sowie kochsalzreduziertem Medium feststellen. Folglich kann man für COX-2 eine etwas eindeutigeren Aussage treffen, die sich auch mit den Ergebnissen anderer Studien deckt [Yang et al. 2000, Cheng et al. 2000]. So spielt nach meinen Messdaten COX-2 auch in mTAL Zellen eine relevante Rolle bei der hypoosmolar bedingten PGE<sub>2</sub>-Synthese.

In einem weiteren Untersuchungsgebiet beschäftigte ich mich mit der aufgeworfenen Frage, welche vorgeschalteten Faktoren genau in dem Mechanismus der hypoosmolar bedingten Prostaglandinsynthese eine Rolle spielen, bzw. welche Faktoren zu der Aktivierung der Cyclooxygenasen und der PGE-Synthase führen. So führte ich spezielle Stimulationsversuche mit Hemmsubstanzen der sogenannten MAP Kinasen, wie auch der Proteinkinase C durch. Dabei ließ sich dann im Vergleich zu Zellstimulationen in hypoosmolaren, bzw. salzreduzierten Medien auch wieder deutlich ein Rückgang in der Expression von COX-2 und mPGE-S beobachten. Entsprechend ließ sich auch bei Bestimmung der Prostaglandinkonzentration im Zellüberstand in hypoosmolaren Medien kein relevanter Anstieg mehr messen. Folglich kann ich die These der Beteiligung der MAP Kinasen und der Proteinkinase C an der hypoosmolar bedingten PGE<sub>2</sub>-Synthese durch das hier verwendete mTAL Zellmodell stützen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde deutlich, dass der hier verwendete Versuchsaufbau gut geeignet zu sein scheint, die aufgeworfenen Fragestellungen experimentell zu klären, da die Versuchsergebnisse größtenteils im Bereich meiner Erwartungen lagen und die Zellen in vorhergesagter Weise auf Elektrolytveränderungen reagiert haben. Somit war es mir möglich ein funktionierendes Zellmodell zu etablieren. In diesem neuen Modell unterliegen die Messwerte jedoch noch vielen Schwankungen. Eine Ursache dafür liegt in der Zellheterogenität begründet, da die Zellen aus den einzelnen Stimulationen verschiedenen Individuen entnommen wurden, so dass jeweils unterschiedliche Ausgangsbedingungen vorlagen. Darüber hinaus besteht die Durchführung der Experimente aus vielen einzelnen sensiblen und anfälligen

Arbeitsschritten. Dennoch konnte ich viele meiner Thesen bestätigen, wobei eine statistisch abgesicherte Überprüfung noch aussteht. Speziell bei der Auswertung der Genexpressionsergebnisse ließ sich nur exemplarisch zeigen, welche Faktoren bei der Prostaglandinbildung eine Rolle spielen.

## VIII. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten ich wesentliche Thesen über den Einfluss der Elektrolyte auf Nierenepithelzellen experimentell überprüfen und dabei ein Modell für die Furosemid-ähnliche Salzverlusttubulopathie etablieren. Mit diesem Modell ist es auch in Zukunft möglich, weitergehenden Fragestellungen nachzugehen. Der Einfluss der Hypoosmolarität auf die PGE<sub>2</sub>-Synthese ließ sich deutlich nachvollziehen, nicht jedoch die Unterscheidung, welche Art der Elektrolytveränderung dabei ausschlaggebend ist. Ob der Chloridentzug den wichtigsten Reiz bei der PGE<sub>2</sub>-Synthese darstellt, muss noch in erneuten Experimenten geklärt werden. Auch die Frage, welche der Cyclooxygenasen, COX-1, bzw. COX-2, die größere Relevanz in der hypoosmolar bedingten PGE<sub>2</sub>-Synthese besitzt, konnte ich nicht abschließend klären. Die COX-2-Beteiligung zeigte sich sowohl durch die mRNA-Expressionsergebnisse als auch durch die PGE<sub>2</sub>-Werte. Die Rolle von COX-1 zeigt ein nicht so klares Bild, das in weiteren Schritten noch aufzuklären ist. Darüber hinaus geben meine Ergebnisse Anlass, eine Beteiligung von MAP Kinasen, sowie der Proteinkinase C bei der COX-2-Aktivierung anzunehmen. Weitere experimentelle Überprüfungen mit dem Ziel der genaueren Aufklärung der beteiligten Faktoren und Wirkmechanismen durch Einsatz weiterer Inhibitoren scheinen mit dem verwendeten Modell vielversprechend.

Dieses Untersuchungsgebiet ist auch aktuell noch von großer Relevanz. Denn durch die Erforschung der molekularbiologischen Grundlagen der Prostaglandinsynthese lassen sich weitere Einblicke in die Furosemid-ähnliche Salzverlusttubulopathie gewinnen und möglicherweise neue Therapieansätze aus diesen Erkenntnissen ableiten. Darüber hinaus fehlen noch ganz grundsätzlich Erkenntnisse über das COX-1/COX-2-Gleichgewicht im menschlichen Körper. Aktuell musste u.a. Vioxx®, ein COX-2-Hemmer, der bisher erfolgreich bei der Behandlung des Hyper-PGE<sub>2</sub>-Syndroms, sowie vielen weiteren Erkrankungen verwendet wurde, wegen unerwarteter kardialer Nebenwirkungen 2004 wieder vom Markt genommen werden. An diesem Beispiel lässt sich veranschaulichen, wie groß der Bedarf an weiterführender Forschung auf dem Gebiet der COX-2-Hemmer, bzw. der Nicht-steroidalen Antirheumatika ist.

## IX. Anhang

### A. Literaturverzeichnis

**Bartter FC, Pronove P, Gill JR et al.** Hyperplasia of the juxtaglomerular complex with hyperaldosteronism and hypokalemic alkalosis - a new syndrom. *Am J Med.* **33**: 811-828, 1962.

**Bergström S, Ryhage R, Samuelsson B, Sjövall J.** Prostaglandines and Related Factors. *J Biol Chem.* **238**: 3555-3564, 1963.

**Bergström S.** Prostaglandine: Vom Labor zur Klinik (Nobel-Vortrag). *Angew. Chem.* **95**: 865-873, 1983.

**Breyer MD, Breyer RM.** Prostaglandin E receptors and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* **279**: F12-F23, 2000.

**Breyer MD, Breyer RM.** G Protein-Coupled Prostanoid Receptors And The Kidney. *Annu. Rev. Physiol.* **63**: 579-605, 2001.

**Breyer MD, Harris RC.** Cyclooxygenase-2 and the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* **10**: 89-98, 2001.

**Cheng HF, Harris RC.** Cyclooxygenase-2 Expression in Cultured Cortical Thick Ascending Limb of Henle Increases in Response to Decreased Extracellular Ionic Content by Both Transcriptional and Post-transcriptional Mechanisms. *JBC.* **47(277)**: 45638-45643, 2002.

**Cheng HF, Wang JI, Zhang MZ, McKanna JA, Breyer R, Harris RC.** Prostaglandins that increase renin production in response to ACE inhibition are not derived from cyclooxygenase-1. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **283**: R638-R646, 2002.

**Cheng HF, Wang JL, Zhang MZ, McKanna JA, Harris RC.** Role of p38 in the regulation of renal cortical cyclooxygenase-2 expression by extracellular chloride. *J.Clin.Invest.* **106**: 681-688, 2000.

**Di Rosa M, Ialenti A, Ianaro A, Sautebin L.** Interaction between nitric oxide and cyclooxygenase pathways. *Prostaglandins, Leukotriens and Essential Fatty Acids.* **54(4)**: 229-238, 1996.

**Fanconi A, Schachenmann G, Nüssli R, Prader A.** Chronic hypokalemia with growth retardation, normotensive hyperrenin-hyperaldosteronism ("Bartter`s syndrome") and hypercalciuria. *Helv Paediatr Acta* **2**: 144-163, 1971.

**FitzGerald GA.** COX-2 And Beyond: Approaches To Prostaglandin Inhibition In Human Disease. *Nature.* **2**: 879-890, 2003.

- 
- Flower RJ.** Studies on the mechanism of action of anti-inflammatory drugs. A paper in honor of John Vane. *Thrombosis Research*. **110**: 259-263, 2003.
- Garavito RM, DeWitt DL.** The cyclooxygenase isoforms: structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. *Biochim. Biophys. Acta*. **1441**: 278-287, 1999.
- Gitelman HJ, Graham JB, Welt LG.** A new familial disorder characterized by hypokalemia and hypomagnesemia. *Trans Assoc Am Physicians*. **79**: 221-223, 1966.
- Harris RC, Breyer MD.** Physiological regulation of cyclooxygenase-2 in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* **281**: F1-F11, 2001.
- 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.
- Hawkey CJ.** COX-2 Hemmer. *Lancet*. **9149(353)**: 307-314, 1999.
- Hebert SC.** Bartter syndrome. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. **12**: 527-532, 2003.
- Hildebrandt F, Brandis M.** Krankheiten des renalen Tubulussystems. In: *Pädiatrie, Grundlagen und Praxis*, Leutze/Schaub/Schulte/Spranger (eds), Springer-Verlag, Aufl. **2**: 1323-1330, 2002.
- Hla T, Bishop-Bailey D, Liu CH, Schaeffers HJ, Trifan OC.** Cyclooxygenase-1 and -2 isoenzymes. *IJBCB*. **31**: 551-557, 1999.
- 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.
- Kammerl MC, Nüsing RM, Richthammer W, Krämer BK, Kurtz A.** Inhibition of COX-2 counteracts the effects of diuretics in rats. *Kidney Int*. **60**: 1684-1691, 2001.
- Katori M, Majima M.** Cyclooxygenase-2: its rich diversity of roles and possible application of its selective inhibitors. *Inflamm. Res*. **49**: 367-392, 2000.
- Klaus G, Konrad M, Ehrlich JHH, Seyberth HJ.** Tubuläre Störungen. In: *Therapie der Krankheiten im Kindes- und Jugendalter*, Reinhardt (ed), Springer-Verlag, Aufl. **7**: 1197-1200, 2004.
- Köckerling A, Reinalter SC, Seyberth HW.** Impaired response to furosemide in hyperprostaglandin E syndrome: evidence for a tubular defect in the loop of Henle. *J Pediatr*. **129**: 519-528, 1996.
- Köckerling A, Konrad M, Seyberth HW.** Hereditäre Tubulopathien mit Diuretika-ähnlichem Salzverlust. *Dt Ärztebl*. **30(95)**: A-1841-1846, 1998.
- Kömhoff M, Jeck NDM, Seyberth HW, Gröne HJ, Nüsing RM, Breyer MD.** Cyclooxygenase-2 expression is associated with the renal macula densa of patients with Bartter-like



syndrome. *Kidney Int.* **58**: 2420-2425, 2000.

**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.

**Lundgren DW, Moore RM, Collins PL, Moore JJ.** Hypotonic Stress Increases Cyclooxygenase-2 Expression and Prostaglandin Release from Amnion-derived WISH Cells. *JBC.* **32(272)**: 20118-20124, 1997.

**Martin PY, Desmeules J.** Unterscheidet sich die Nierentoxizität der selektiven Cyclooxygenase-2-Hemmer von jener der klassischen nicht-steroidalen Antiphlogistika? *Schweiz Med Forum.* **35**: 868-874, 2001.

**McCredie DA, Blair-West JR, Scoggins BA, Shipman R, Chir B.** Potassium-losing nephropathy of childhood. *Med J Aust.* **1**: 129-135, 1971.

**McCredie DA, Rotenberg E, Williams AL.** Hypercalciuria in potassium-losing nephropathy: a variant of Bartter's syndrome. *Aust Paediatr J.* **10**: 286-295, 1974.

**Meade EA, Smith WL, DeWitt DL.** Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isoenzymes by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem.* **268**: 6610-6614, 1993.

**Nantel N, Meadows E, Denis D, Connolly B, Metters K, Giaid A.** Immunolocalization of cyclooxygenase-2 in the macula densa of human elderly. *FEBS Lett.* **457**: 475-477, 1999.

**Nüsing RM, Reinalter SC, Peters M et al.** Pathogenetic role of cyclooxygenase-2 in hyperprostaglandin E syndrome/antenatal bartter syndrome: therapeutic use of the cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulide. *Clin Pharmacol Ther.* **70**: 384-390, 2001.

**Persson AE, Ollerstam A, Liu R, Brown R.** Mechanisms for macula densa cell release of renin. *Acta Physiol Scand.* **181(4)**: 471-474, 2004.

**Persson AE, Salomonsson M, Westerlund P, Greger R, Schlatter E, Gonzalez E.** Macula densa function. *Kidney Int.* **32**: 39-44, 1991.

**Peskar BA.** Derivate des Arachidonsäurestoffwechsels. In: *Allg. und spez. Pharmakologie und Toxikologie*, Forth/Henschler/Rumml (eds), Urban-Fischer-Verlag, Aufl.8: 381-392, 2001.

**Peters M, Jeck N, Reinalter S et al.** Clinical representation of genetically defined patients with hypokalemic salt losing tubulopathies. *Am J Med.* **112**: 183-190, 2002.

**Peti-Peterdi J, Komlosi P, Fuson AL, Guan Y, Schneider A, Qi Z, Redha R, Rosivall L, Breyer MD, Bell PD.** Luminal NaCl delivery regulates basolateral PGE<sub>2</sub> release from macula densa cells. *J. Clin. Invest.* **112**: 76-82, 2003.

- 
- Pratt PF, Bokemeyer D, Foschi M, Sorokin A, Dunn MJ.** Alteration in subcellular localization of p38 MAPK Potentiates Endothelin-stimulated COX-2 Expression in Glomerular Mesangial Cells. *JBC*. **51(278)**: 51928-51936, 2003.
- Puschett JB, Greenberg A, Mitro R et al.** Variant of Bartter's syndrome with a distal tubular rather than loop of Henle defect. *Nephron*. **50**: 205-211, 1988.
- Roger F, Martin PY, Rousselot M, Favre H, Féraille E.** Cell Shrinkage Triggerst he Activation of Mitogen-activated Protein Kinases by Hypertonicity in the Rat Kidney Medullary Thick Ascending Limb of the Henle's Loop. *JBC*. **48(274)**: 34103-34110, 1999.
- Rosenbaum P, Hughes M.** Persistent, probably congenital, hypokalemic metabolic alkalosis with hyaline degeneration of renal tubules and normal urinary aldosteron. *Am J Dis Child* **94**:560, 1957.
- Schmidt H, Geisslinger G.** Pharmakologie der COX-2-Hemmer. *Bundesgesundheitsblatt*. **45**: 692-698, 2002.
- Scholz H.** Prostaglandins. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. **285**: R512-R514, 2003.
- Seidel C, Reinalter S, Seyberth HW, Schärer K.** Prepubertal growth in the hyperprostaglandin E syndrome. *Pediatr Nephrol*. **9**:723-728, 1995.
- Seyberth HW, Rascher W, Schweer H et al.** Congenital hypokalemia with hypercalciuria in preterm infants: a hyperprostaglandinuric tubular syndrome different from Bartter syndrome. *J Pediatr*. **107**: 694-701, 1985.
- Seyberth HW, Königer SJ, Rascher W et al.** Role of prostaglandins in hyperprostaglandin E syndrome and in selected tubular disorders. *Pediatr Nephrol*. **1**: 491-497, 1987.
- Seyberth HW, Soergel M, Köckerling A.** Hypokalemic tubular disorders: the hyperprostaglandin E syndrome and the Bartter-Gitelman syndrome. In: *Davison AM, Cameron JS, Grünfeld JP et al. (eds) Oxford textbook of clinical nephrology. Oxford Medical Publications, Oxford*: 1085-1094, 1998.
- Seyberth HW, Konrad M, Jeck N.** Molekulare Pathophysiologie der angeborenen Salzverlusttubulopathien mit Hypokaliämie. In: *Endokrinopathien, Ganten/Ruckpaul (eds), Springer-Verlag Berlin Heidelberg*: 259-277, 2001.
- Stichtenoth DO, Frölich JC.** COX-2 and the Kidneys. *Curr Pharma Design*. **6**: 1737-1753, 2000.
- Stryer L.** Der Fettstoffwechsel. In: *Biochemie, Stryer (ed), Spektrum-Fischer-Verlag, Aufl. 5*: 635-658, 2000.
- Sutton RAL, Mavichak V, Halabe A, Wilkins GE.** Bartter's syndrome: evidence suggesting a distal tubular defect in a hypocaliuric variant of the syndrome. *Miner Electrolyte Metab*.

---

18: 43-51, 1992.

**Tian W, Zhang Z, Cohen DM.** MAPK signaling and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* **279**: F593-F604, 2000.

**Tsuboi K, Sugimoto Y, Ichikawa A.** Prostanoid receptor subtypes. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*. **68-69**: 535-556, 2002.

**Vane JR.** Towards a better aspirine. *Nature*.**367**: 215-216, 1994.

**Vane JR, BakhleYS, Botting RM.** Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **38**: 97-120, 1998.

**Veza R, Habib A, Li H, Lawson JA, FitzGerald GA.** Regulation of Cyclooxygenases by Protein Kinase C. *JBC* **47(271)**: 30028-30033, 1996.

**Von Euler US et al.** Zur Kenntnis der pharmakologischen Wirkungen von Nativsekreten und Extrakten männlicher accessorischer Geschlechtsdrüsen. *Arch. exptl. Pathol. Pharmacol.* **175**: 78-84, 1934.

**Wang JL, Cheng HF, Harris RC.** Cyclooxygenase-2 inhibition decreases renin content and lowers blood pressure in a model of renovascular hypertension. *Hypertension*. **34**: 96-101, 1999.

**Yang T.** Regulation of cyclooxygenase-2 in renal medulla. *Acta Physiol Scand.* **177**: 417-421, 2003.

**Yang T, Huang Y, Heasley LE, Berl T, Schnermann JB, Briggs JP.** MAPK Mediation of Hypertonicity-stimulated Cyclooxygenase-2 Expression in Renal Medullary Collecting Duct Cells. *JBC*. **30(275)**: 23281-23286, 2000.

**Yang T, Schnermann J, Briggs JP.** Regulation of cyclooxygenase-2 expression in renal medulla by tonicity in vivo and in vitro. *Am J Physiol.* **277(46)**: F1-F9, 1999.

**Yang T, Park JM, Arend L, Huang Y, Topaloglu R, Pasumarthy A, Praetorius H, Spring K, Briggs JP, Schnermann J.** Low Chloride Stimulation of Prostaglandin E<sub>2</sub> Release and Cyclooxygenase-2 Expression in a Mouse Macula Densa Cell Line. *JBC* **48(275)**: 37922-37929, 2000

**Zhang MZ, Wang JL, Cheng HF, Harris RC, McKanna JA.** Cyclooxygenase-2 in rat nephron development. *Am J Physiol.* **273**: F994-1002, 1997.

---

## **B. Lebenslauf**

### **Persönliche Daten:**

Name: Andrea Koch  
Adresse: Scharnweberstr. 20  
10247 Berlin  
Tel: 030/868703608  
mobil: 0176/48273504  
Geburtsdatum/-ort: 09.01.1978, Frankfurt a. M.

### **Schulbildung:**

1984-1988 Grundschule, Gehrde  
1988-1990 Orientierungsstufe, Bersenbrück  
1990-1997 Gymnasium, Bersenbrück  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Note: 1,9)  
Leistungskurse: Mathematik, Englisch

### **Pflegepraktikum:**

06/1997-09/1997 Christliches Krankenhaus Quakenbrück (Innere und Chirurgie)

### **Hochschulbildung:**

10/1997- 12/2005 Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg,  
(Abschlussnote: gut)  
09/2000 Physikum (Note: 3,00)  
03/2002 Erstes Staatsexamen (Note: 3,00)  
04/2002 Beginn der Doktorarbeit („Einfluss der Elektrolyte auf primär kultivierte Nierenepithelzellen“) im Medizinischen Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin der Philipps-Universität Marburg,  
AG Molekulare und Experimentelle Pharmakologie,  
Betreuer: Prof. Dr. R. M. Nüsing  
02/2003-06/2003 Auslandsstudium an der Université Louis Pasteur in Strasbourg, Frankreich, dabei halbtags in folgenden Kliniken als Famulantin tätig: Dermatologie, Orthopädie, Radiologie und Neurologie

- 
- 04/2004                      Zweites Staatsexamen (Note: 2,33)
- 10/2004-09/2005            Praktisches Jahr an der Universitätsklinik Marburg  
(Innere Medizin, Unfallchirurgie, Wahlfach: Pädiatrie),  
sowie am Hôpital St. Eloi der Université Montpellier, Frankreich  
(Allgemeinchirurgie).
- 12/2005                      Drittes Staatsexamen (Note: 2,00)

**Famulaturen:**

- 02/2001-03/2001            Innere Medizin am Allgemeinen Krankenhaus Altona, Hamburg
- 09/2001-10/2001            Pädiatrie am Dr. von Haunerschen Kinderspital, München
- 08/2002-09/2002            Innere Medizin am Sappasittiprasong Hospital, Ubon Ratchathani,  
Thailand
- 09/2003-10/2003            Allgemeinarztpraxis, Gehrde

**Sonstiges:**

- 10/2002- 01/2003            Tutorin in der Abteilung für Psychosomatik

**Berufspraxis:**

- 03/2006- 02/2008            Assistenzärztin in der Abteilung für Innere Medizin,  
Vivantes Klinikum Hellersdorf, Berlin.
- Seit 06/2008                Assistenzärztin in der Abteilung für Hämatologie/ Onkologie,  
Vivantes Klinikum Am Urban, Berlin.

### ***C. Verzeichnis der akademischen Lehrer***

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren

Adamkiewicz, Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Berger, Bertalanffy, Bette, Bien, Cettin, Czubayko, Daut, Eilers, Engenhardt-Cabilic, Feuser, Gemsa, Geus, Gotzen, Grzeschik, Gudermann, Happle, Hasilik, Hörle, Hofmann, Hoyer, Jungclas, Kann, Kern, Klaus, Klenk, Klose, Koolman, Kretschmer, Krieg, Kroll, Lang, Lenz, Lill, Löffler, Lohoff, Lorenz, Maisch, Mennel, Moll, Moosdorf, Müller R., Mueller, Mutters, Neubauer, Oertel, Renschmidt, Renz, Richter, Röhm, Rothmund, Schachtschabel, Schäfer, Schäfer H., Schäfer M., Schmidt, Schüffel, Schwarz, Seitz, Seyberth, Steiniger, Sundermeyer, Suske, Vogelmaier, Voigt, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wirth, Wulf.

## ***D. Danksagung***

Als erstes möchte ich Herrn Prof. Dr. Rolf Nüsing für die hervorragende Betreuung und Anleitung während aller Phasen der Dissertation danken.

Darüber hinaus bedanke ich mich beim ganzen Team des Labors für molekulare und experimentelle Pharmakologie für die Einarbeitung und die freundliche Arbeitsatmosphäre.

### **E. Ehrenwörtliche Erklärung**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel *Einfluss der Elektrolyte auf primär kultivierte Nierenepithelzellen* im Medizinischen Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. H.W. Seyberth mit Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. R.M. Nüsing unter o.g. Leitung ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Berlin, August 2008

Andrea Koch