"Funktion des Rezeptors der sekretorischen Phospholipasen A₂ bei der Signaltransduktion in glomerulären Mesangiumzellen und entzündlichen Erkrankungen der Niere"

> Dissertation zur Erlangung des Grades "Doktor der Naturwissenschaften" am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

> > vorgelegt von Dipl.-Biol. Bettina Thorwart geb. am 21.09.1977 in Wiesbaden

> > > Mainz, September 2006

Dekan:

1.Berichterstatter:

2.Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:08. Dezember 2006

Meinen Eltern

Vorbemerkungen

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2003 bis März 2006 in der Arbeitsgruppe ,Phospholipasen und Eicosanoide in Entzündungsprozessen' des *pharmazentrums frankfurt* angefertigt.

Förderung des Projektes

Diese Arbeit wurde von der Wilhelm-Sander-Stiftung gefördert.

Englische Sprache

Englische Fachbegriffe wurden durch eine kursive Schreibweise gekennzeichnet und in Anführungszeichen gesetzt.

Abkürzungsverzeichnis

| Ø | Durchmesser |
|-----------------------------|--|
| % (w/v) | Gewichtsprozent |
| % (v/v) | Volumenprozent |
| °C | Grad Celsius |
| na | Mikrogramm |
| ul | Mikroliter |
| um | Mikrometer |
| uM | Mikromolar |
| AA | Arachidonsäure |
| Abb | Abbildung |
| Anti-Thy1 1-GN | Anti-Thy1 1-Glomerulonenhritis |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| | Angiotensin-II |
| Δ7-1 | Astra-zeneca-1 |
| | Astra-zeneca-1 |
| box | bovines Serum Albumin boziebungeweise |
| 02w. | siree |
| Ca^{2+} | CIICa Kalaium |
| | Kalziumehlerid |
| | |
| | |
| | " <i>copy</i> / komplementare DNA |
| CDR | "Carbonydrate Recognition -Domane |
| cm | Zentimeter |
| CGMP | zyklisches Guanosin-5 -ivionophosphat |
| cm ⁻ | Quadratzentimeter |
| | Koniendioxid |
| CPLA ₂ | zytosolischePhospholipase A ₂ |
| cpm | "counts per minute" |
| COX | Cyclooxygenase |
| CT-Wert | "threshold cycle"-Wert |
| d | Tag |
| dATP | 2'-Desoxyadenosin-5'- |
| | triphosphat |
| dCTP | 2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat |
| ddH ₂ O/ bidest. | doppelt deionisiertes Wasser |
| DEPC | Diethylpyrokarbonat |
| DETA-NONOat | (Z)-1-[2-(2-Aminoethyl)-N-(2- |
| | monioethyl)amino]diazen-1-uim-1,2-doilate] |
| dGTP | 2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat |
| d.h. | das heißt |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | "desoxynucleicacid" /Desoxynukleinsäure |
| dNTP | Didesoxyribonukleosid-triphosphat |
| DTT | DL-Dithiothreitol |
| dTTP | 2'-Desoxvthymidin-5'-triphosphat |
| ECL | "enhanced chemiluminescence" |
| E.coli | Escherichia coli |
| EDTA | Ethylendiamintetraessiosäure |
| EGTA | N.N.N'.N'-tetraessigsäure |
| EET | Epoxyeicosatriensäure |
| EIA | Enzym-Immuno-Assay |
| | |

| ELISA | "enzyme-linked immuno sorbent assay" |
|-------------------|--|
| | endotnellale NO-Synthase |
| ERK 1/2 | exilacellular regulated killase 1/2 |
| EL AL. | "et alteri / unu aliuere Earmaldabud/Aaatat/EDTA Duffar |
| fmol | Formal Econtempol |
| | Feinloinoi Eötalaa Kölbar Sarum |
| | Foldies Kalber-Seruiti |
| | Fidbooobloupiques (0.86 m/s ²) |
| g | Gromm |
| | Glycorinaldobyd 2 phoephat |
| GAPDH | Debudrogenees |
| CPa | Ciga Bagguard |
| GBQ CS Duffer | Giga-Decquerer Cono Soroon" Duffor |
| GS-Puffer | "Gene-Screen -Puller |
| n | |
| | Salzsaure |
| HEK-Zellen | "numan embryonai kidney"-Zellen |
| HEPES | N-2-nydroxyetnyipiperazin-N-2- |
| | ethansulfonsaure |
| HETE | Hydroxy-Eicosatetraensäure |
| H ₂ O | Wasser |
| H_2O_2 | Wasserstoffperoxid |
| HODE | Hydroxy-Octadecadiensäure |
| HRP | "horse radish peroxidase" |
| HSPG | Heparan-Sulfat-Proteoglykan |
| 1 | lod |
| IC ₅₀ | "inhibitory concentration 50%"; Maß der |
| | Rezeptor-Bindungsaffinität |
| lg | Imunglobulin |
| IL-1β | Interleukin-1β |
| IL-8 | Interleukin-8 |
| IFN γ | Interferon γ |
| iNOŚ | induzierbare NO-Synthase |
| iPLA ₂ | <i>"independent"</i> Phosholipase A ₂ |
| IPTG | Isopropylthiogalaktosid |
| ITS | Insulin-Transferrin-Natriumselenit |
| kb | Kilobase |
| KCI | Kaliumchlorid |
| kDa | kiloDalton |
| kg | Kilogramm |
| Ktr. | Kontrolle |
| КО | knockout |
| L | Liter |
| LB-Medium | Luria-Bertani-Medium |
| L-NMMA | NG- Monomethyl-L-Arginin-Monoacetat |
| LPC | Lysophosphatidylcholin |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| LT | Leukotriene |
| М | Molar= Gramm/mol |
| mA | Milliampere |
| MAPK | "mitogen-aktivated protein kinase" |
| MBa | Mega-Becquerel |
| MCP-1 | "moncyte chemoattractant protein-1" |
| Me-IDX | Methyl-Indoxam |
| | - |

| MEM | "modified Eagle's Medium" |
|-----------------|---|
| mg | Milligramm |
| min | Minute |
| Mio. | Millionen |
| MIP-1α | "Macrophage Inflammatory Protein 1 α " |
| MIP-2 | "Macrophage Inflammatory Protein-2" |
| ml | Milliliter |
| mM | Millimolar |
| MMP | Matrixmetalloproteasen |
| MOPS | 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure |
| mRNA | "messenger Ribonucleicacid" |
| MTR | M-Typ-Rezeptor |
| ng | Nanogramm |
| nm | Nanometer |
| nM | Nanomol |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NaOH | Natriumhydroxid |
| NE-Lösung | N-Naphthyethylendiamin-Dihydrochlorid- |
| 5 | Lösung |
| ΝϜκΒ | "nucleus factor κB" |
| nNOS | Neuronale NO-Synthase |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| NSAID | "non-steroidal anti-inflamatory drug" |
| NTP | Nukleotid-Triphosphat |
| OD | optische Dichte |
| OS₂ | Oxvuranus scutellatus 2 |
| ³² P | ³² Phosphat |
| pq | Pikogramm |
| pmol | Pikomol |
| PAF | Plättchen-aktivierender Faktor |
| PAF-AH | "platelet activating acetyl-hydrolases" |
| PAGE | Polvacrvlamid-Gelelektrophorese |
| PBS | Phosphat-gepufferte Salzlösung |
| PC | Phosphatidylcholin |
| PCR | polymerase chain reaction"/ |
| | Polymerase-Kettenreaktion |
| PE | Phosphatidylethanolamin |
| PG | Prostaglandin |
| PI3K | Phosphatidylinositol-3-Kinase |
| PKC | Proteinkinase C |
| PMSF | Phenvlmethylsulfonvlfluorid |
| pos. Ktr. | Positivkontrolle |
| PPAR | "peroxisome-proliferator-activated receptor" |
| | Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor |
| PS | Phosphatidylserin |
| PVDF | Polyvinyldifluorid |
| PYR-1 | Pyrrolidin-1 |
| ROS | "reactive oxvaen species"/ |
| | reaktive Sauerstoff-Spezies |
| RPMI-Medium | "Roswell Park Memorial Institute"-Medium |
| BT | Baumtemperatur |
| BT-PCB | reverse transkriptase"-PCR |
| SA-Lösung | Sulfamilamidlösung |
| C, C LOOUNG | Sanarmannalooding |

| SDS | "sodium dodecyl sulfate"/ |
|-------------------|---|
| | Natriumdodecylsulfat |
| sPLA ₂ | sekretorische Phopholipase A ₂ |
| sq-PCR | semiquantitative-PCR |
| Tab. | Tabelle |
| TAE-Puffer | Tris/Acetat/EDTA-Puffer |
| TCA | Tricloressigsäure |
| TE-Puffer | Tris/EDTA-Puffer |
| TEMED | N´-N´-Tetramethylethylendiamin |
| TGFβ | "transforming growth factor β " |
| TH-1/-2 | T-Helfer-Zellen Typ 1/2 |
| ΤΝFα | Tumor Nekrose Faktor α |
| ТРА | 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat |
| Tris | Tris-[hydroxymethyl]-aminoethan |
| Triton | Oktalphenol-ethoxylat |
| Tween | Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat |
| U | "Units" (Enzymaktivität) |
| u.a. | unter anderem |
| Upm | Umdrehung pro Minute |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volt |
| VEGF | "vascular endothelial growth factor" |
| vgl. | vergleiche |
| WT | Wildtyp |
| X-GAL | 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D- |
| | Galactopyranosid |
| z. B. | zum Beispiel |
| ZM | Zytokin-Mix |

Inhaltsverzeichnis

| Vorbemerkungen | II |
|-----------------------|----|
| Abkürzungsverzeichnis | V |
| Inhaltsverzeichnis | IX |

| 1 | Einleitung | 1 |
|---|--|-----|
| | 1.1 Die Säugetier-Niere | 1 |
| | 1.1.1 Anatomie der Säuger-Niere | 1 |
| | 1.1.2 Funktion der Niere | 3 |
| | 1.1.3 Glomeruläre Mesangiumzellen | 4 |
| | 1.1.4 Nierenerkrankungen | 5 |
| | 1.1.4.1 Glomerulopathien | 5 |
| | 1.2 Stickstoffmonoxid (NO) | 8 |
| | 1.3 "Macrophage inflammatory protein-2" (MIP-2) | 9 |
| | 1.4 Eicosanoide | 9 |
| | 1.4.1 Biosynthese und Funktionen von Prostanoiden | .10 |
| | 1.4.2 Cyclooxygenasen | .11 |
| | 1.5 Die Familie der Phospholipasen A ₂ | 12 |
| | 1.5.1 Die zytosolischen Phospholipasen A ₂ | .13 |
| | 1.5.2 Die sekretorischen Phospholipasen A ₂ | .14 |
| | 1.5.2.1 Allgemeine Eigenschaften | .14 |
| | 1.5.2.2 Vorkommen und Regulation | .15 |
| | 1.5.2.3 Funktionen der sPLA ₂ -Enzyme | .19 |
| | 1.5.2.3.1 Freisetzung von Arachidonsäure | 19 |
| | 1.5.2.3.2 Weitere physiologische und pathophysiologische Funktioner | า |
| | der sPLA ₂ s | 22 |
| | <i>1.5.2.3.3</i> Die Rolle der sPLA ₂ s in der Säuger-Niere | .22 |
| | 1.6 Der sPLA ₂ M-Typ-Rezeptor | .23 |
| | 1.7 Zielsetzung der Arbeit | .25 |
| | | |
| 2 | Material | 27 |
| | 2.1 Chemikalien | 27 |
| | 2.2 Molekularbiologische Reagenzien und Kits | .28 |
| | 2.3 Oligonukleotide | 29 |
| | 2.3.1 Primer für die Realtime-PCR | .29 |
| | 2.3.2 Primer für die Reverse Transkriptase (RT)-PCR | 30 |
| | 2.4 Radiochemikalien | 31 |
| | 2.5 Immunologische Reagenzien und Kits | .31 |
| | 2.6 Antikörper | .31 |
| | 2.6.1 Erst-Antikörper | .31 |
| | 262 Zweit-Antikörner | 32 |
| | | .02 |
| | 2.6.2.1 Zweit-Antikörper für Western-Blot Analyse | .32 |

| 2.7 | Medi | en und Substanzen für die Zellkultur | .33 |
|--|--|--|--|
| 2. | .7.1 | Medien und Medienzusätze | .33 |
| 2. | .7.2 | Substanzen | 33 |
| 2.8 | Zellli | nien | .34 |
| 2.9 | Niere | enschnitte | .34 |
| 2.10 |) Reag | Jenzien zur Stimulation von Zellen | .34 |
| 2.11 | Sons | stige Verbrauchsmaterialien | .35 |
| 2.12 | 2 Bakt | erienmedien | .36 |
| 2.13 | 3 Zellk | ulturmedien | .36 |
| 2.14 | i Reag | jenzien zur DNA-Analyse | .37 |
| 2.15 | | jenzien zur RNA-Analyse | .37 |
| 2.10 | | C-Benandlung von doppelt destilliertem H ₂ O (ddH ₂ O) | .38 |
| 2.17 | Reag | jenzien zur Protein-Analyse | .39 |
| 2.10 | o Reag | jenzien iur immuniuoreszenz/ immuncytochemie | .39 |
| 2.1 | | nal für innunnuoreszenz/ innuncytochemie | .39 20 |
| 2.20 | Dobu | jenzien in SFLA2 Aklivildisiesi | |
| 2.2 | D Woet | acry annu-deletekn opnorese | .40 /1 |
| 2.24 | | ienzien für Bindungsstudien | .41 //1 |
| 2.2 | 1 Vere | uchstiere | <u>41</u> |
| 2 25 | 5 Gerä | te | <u>41</u> |
| 2.26 | 6 Com | puter Software | 42 |
| | | | • • – |
| 3 | Met | hoden | 44 |
| • | | | |
| 3.1 | Gene | erieren von genetisch veränderten Mäusen | .44 |
| 3.1 3.2 | Gene Indu | erieren von genetisch veränderten Mäusen ktion einer Anti-Thv1.1-Glomerulonephritis in Ratten | .44 .45 |
| 3.1 3.2 3.3 | Gene Indu Zellb | erieren von genetisch veränderten Mäusen ktion einer Anti-Thy1.1-Glomerulonephritis in Ratten iologische Methoden | .44 .45 .45 |
| 3.1 3.2 3.3 | Gene Indu Zellb .3.1 | erieren von genetisch veränderten Mäusen ktion einer Anti-Thy1.1-Glomerulonephritis in Ratten iologische Methoden Isolierung und Kultivierung von Zellen | .44 .45 .45 .45 |
| 3.1 3.2 3.3 3. | Gene Indu Zellb .3.1 3.3.1. ² | erieren von genetisch veränderten Mäusen ktion einer Anti-Thy1.1-Glomerulonephritis in Ratten iologische Methoden Isolierung und Kultivierung von Zellen Isolierung von Mesangiumzellen | .44 .45 .45 45 45 |
| 3.1 3.2 3.3 3. | Gene Indu Zellb .3.1 3.3.1.1 3.3.1.2 | erieren von genetisch veränderten Mäusen ktion einer Anti-Thy1.1-Glomerulonephritis in Ratten iologische Methoden Isolierung und Kultivierung von Zellen Isolierung von Mesangiumzellen Kultivierung von Mesangiumzellen | .44 .45 .45 45 45 45 |
| 3.1 3.2 3.3 3 | Gene Indu Zellb .3.1 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 | Berieren von genetisch veränderten Mäusen ktion einer Anti-Thy1.1-Glomerulonephritis in Ratten iologische Methoden Isolierung und Kultivierung von Zellen Isolierung von Mesangiumzellen 2 Kultivierung von Mesangiumzellen 3 Isolierung und Kultivierung von Endothelzellen | .44 .45 .45 45 45 46 46 |
| 3.1 3.2 3.3 3.3 | Gene Indu Zellb .3.1 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.3 .3.2 | Prieren von genetisch veränderten Mäusen | .44 .45 .45 .45 .45 .46 .46 .46 |
| 3.1 3.2 3.3 3.3 3.4 | Gene Indu Zellb 3.3.1 3.3.1.7 3.3.1.2 3.3.1.3 3.3.1.3 3.2 Mole | Berieren von genetisch veränderten Mäusen | .44 .45 .45 .45 .45 .46 .46 .46 .46 |
| 3.1 3.2 3.3 3. 3. 3. 3.4 3. | Gene Indu Zellb .3.1 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.3 3.3.1.3 3.3.2 Mole .4.1 | erieren von genetisch veränderten Mäusen | .44 .45 .45 .45 .46 .46 .46 .46 .47 .47 |
| 3.1 3.2 3.3 3. 3. 3. 3. 4 3. 3. 3. 3. | Gene Indu Zellb .3.1 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.3 .3.2 Mole .4.1 .4.2 | erieren von genetisch veränderten Mäusen | .44 .45 .45 .45 .45 .46 .46 .46 .47 .47 |
| 3.1 3.2 3.3 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. | Gene Indu Zellb .3.1 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 4.1 .4.2 .4.1 .4.2 .4.3 | Erieren von genetisch veränderten Mäusen.ktion einer Anti-Thy1.1-Glomerulonephritis in Ratten.iologische Methoden.Isolierung und Kultivierung von Zellen.Isolierung von Mesangiumzellen | .44 .45 .45 .45 .45 .46 .46 .46 .47 .47 .48 |
| 3.1 3.2 3.3 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. | Gene Indu Zellb .3.1 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.3 .3.2 Mole .4.1 .4.2 .4.3 | erieren von genetisch veränderten Mäusen.ktion einer Anti-Thy1.1-Glomerulonephritis in Ratten.iologische Methoden.Isolierung und Kultivierung von Zellen.Isolierung von MesangiumzellenKultivierung von MesangiumzellenIsolierung und Kultivierung von EndothelzellenBehandlung von glomerulären Mesangiumzellen.Kularbiologische Methoden.RNA-Isolierung aus kultivierten Zellen.Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.Agarosegelelektrophorese von DNA unter nicht-denaturierendenBedingungen. | .44 .45 .45 .45 .46 .46 .46 .46 .47 .47 .47 .48 |
| 3.1 3.2 3.3 3. 3. 3. 3. 4 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. | Gene Indu Zellb .3.1 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.3 .3.2 Mole .4.1 .4.2 .4.3 | erieren von genetisch veränderten Mäusen | .44 .45 .45 .45 .46 .46 .46 .46 .47 .47 .48 |
| 3.1 3.2 3.3 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. | Gene Indu Zellb .3.1 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 4.1 .4.2 .4.1 .4.2 .4.3 | erieren von genetisch veränderten Mäusen | .44 .45 .45 .45 .45 .46 .46 .46 .46 .46 .47 .47 .48 .48 .48 |
| 3.1 3.2 3.3 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. | Gene Indu Zellb 3.3.1 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 4.1 4.2 4.1 4.2 4.3 4.2 4.3 | erieren von genetisch veränderten Mäusen. ktion einer Anti-Thy1.1-Glomerulonephritis in Ratten. iologische Methoden. Isolierung und Kultivierung von Zellen. Isolierung von Mesangiumzellen 2 Kultivierung von Mesangiumzellen 3 Isolierung und Kultivierung von Endothelzellen Behandlung von glomerulären Mesangiumzellen. kularbiologische Methoden. RNA-Isolierung aus kultivierten Zellen. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren. Agarosegelelektrophorese von DNA unter nicht-denaturierenden Bedingungen. Isolierung von DNA aus Agarosegelen. | .44 .45 .45 .45 .45 .46 .46 .46 .46 .47 .47 .48 .48 .49 .49 |
| 3.1 3.2 3.3 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. | Gene Indu Zellb .3.1 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.3 .3.2 Mole .4.1 .4.2 .4.3 .4.4 .4.5 .4.6 | erieren von genetisch veränderten Mäusen. ktion einer Anti-Thy1.1-Glomerulonephritis in Ratten | .44 .45 .45 .45 .46 .46 .46 .46 .46 .47 .47 .48 .49 .49 .50 |
| 3.1 3.2 3.3 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. | Gene Indu Zellb .3.1 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 4.1 .4.2 .4.1 .4.2 .4.3 .4.4 .4.5 .4.6 .4.7 | erieren von genetisch veränderten Mäusen | .44 .45 .45 .45 .46 .46 .46 .46 .47 .48 .48 .49 .49 .50 |
| 3.1 3.2 3.3 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. | Gene Indu Zellb .3.1 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 4.1 .4.2 .4.1 .4.2 .4.3 .4.4 .4.5 .4.6 .4.7 .4.8 | erieren von genetisch veränderten Mäusen | .44 .45 .45 .45 .46 .46 .46 .47 .48 .49 .49 .50 .50 |
| 3.1 3.2 3.3 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. | Gene Indu Zellb .3.1 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 4.1 4.2 4.1 4.2 4.3 .4.4 .4.5 .4.6 .4.7 .4.8 .4.9 | erieren von genetisch veränderten Mäusen | .44 .45 .45 .45 .45 .46 .46 .46 .46 .46 .47 .47 .48 .49 .50 .53 .54 |
| 3.1 3.2 3.3 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. | Gene Indu Zellb .3.1 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 4.1 4.2 4.3 4.1 4.2 4.3 4.4 4.5 4.6 4.7 4.8 4.7 4.8 4.9 4.10 | erieren von genetisch veränderten Mäusen | .44 .45 .45 .45 .46 .46 .46 .46 .47 .47 .48 .49 .49 .50 .53 .54 .55 .55 |
| 3.1 3.2 3.3 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. | Gene Indu Zellb .3.1 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 4.1 4.2 4.1 4.2 4.3 4.4 4.5 4.4 4.5 4.6 4.7 4.8 4.9 4.10 4.11 | erieren von genetisch veränderten Mäusen | .44 .45 .45 .45 .46 .46 .47 .48 .49 .50 .53 .55 .56 |
| 3.1 3.2 3.3 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. | Gene Indu Zellb .3.1 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 4.1 4.2 4.1 4.2 4.3 4.4 4.5 4.6 4.7 4.8 4.9 4.10 4.11 4.12 | erieren von genetisch veränderten Mäusen. ktion einer Anti-Thy1.1-Glomerulonephritis in Ratten. iologische Methoden. Isolierung und Kultivierung von Zellen. Isolierung von Mesangiumzellen. Kultivierung von Mesangiumzellen. Behandlung von glomerulären Mesangiumzellen. kularbiologische Methoden. RNA-Isolierung aus kultivierten Zellen. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren. Agarosegelelektrophorese von DNA unter nicht-denaturierenden Bedingungen. Agarosegelelektrophorese von RNA unter denaturierende Bedingungen. Isolierung von DNA aus Agarosegelen. Reverse-Transkriptase-Reaktion (RT). Semiquantitative Polymerase-Ketten-Reaktion (sq-PCR). Real- Time PCR. Klonierung von PLR-Produkten mittels TOPO [™] TA-Cloning Kit Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien. DNA-Sequenzierung. Northern-Blot. | .44 .45 .45 .45 .46 .46 .47 .48 .49 .50 .53 .54 .55 .56 .56 |
| 3.1 3.2 3.3 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. 3. | Gene Indu Zellb 3.1 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 3.3.1.2 4.1 4.2 4.1 4.2 4.3 4.4 4.5 4.4 4.5 4.6 4.7 4.8 4.9 4.10 4.11 4.12 4.13 | erieren von genetisch veränderten Mäusen | .44 .45 .45 .45 .46 .47 .46 .47 .48 .49 .50 .53 .56 .57 |

| 3.5 Bio | chemische Methoden | 58 |
|--|--|--|
| 3.5.1 | Präparation von Zelllysaten | 58 |
| 3.5.2 | Präparation von Zellmembranen | 59 |
| 3.5.3 | Bestimmung des Proteingehaltes | 59 |
| 3.5.4 | Proteinpräzipitation mit Trichloressigsäure (TCA) | 59 |
| 3.5.5 | Aktivitätsbestimmung der sekretorischen Phospholipasen | |
| | (sPLA ₂ s) in Zellkulturüberständen | 60 |
| 3.5.6 | Messung von Prostaglandinen, Prostacyclinen oder Chemokine | n in |
| | Zellkulturüberständen mittels ELISA | 60 |
| 3.5.6 | .1 Messung Prostaglandin E ₂ | 60 |
| 3.5.6 | .2 Messung von Prostacyclin (PGI ₂) | 61 |
| 3.5.6 | .3 Messung von "Macrophage Inflammatory Protein 2" (MIP-2) | 62 |
| 3.5.7 | Bestimmung der Nitrit-Konzentration in Zellkulturüberständen | |
| | (Griess-Reaktion) | 62 |
| 3.5.8 | Western-Blot | 63 |
| 3.5.8 | .1 SDS-Polyacrylamid-Gelelktrophorese | 63 |
| 3.5.8 | .2 Transfer auf eine PVDF-Membran | 64 |
| 3.5.8 | .3 Immundetektion | 65 |
| 3.5.9 | Immunfluoreszenz | 66 |
| 3.5.9 | .1 Färbung von Paraffinschnitten aus Rattennieren | 67 |
| 3.5.9 | 0.2 Imuncytologische Färbung von murinen Mesangiumzellen | 67 |
| 3.5.10 | sPLA ₂ M-Typ-Rezeptor Bindungsstudien | 69 |
| 3.5.11 | Statistik | 70 |
| _ | | |
| A F | | |
| 4 Erg | jebnisse | 71 |
| 4 Erg 4.1 Exp | Jebnisse ression des spezifischen sPLA ₂ M-Typ-Rezeptors und seines | 71 5 |
| 4 Erg 4.1 Exp Liga | Jebnisse ression des spezifischen sPLA ₂ M-Typ-Rezeptors und seines anden sPLA ₂ -IB in der Rattenniere | 71 ; 71 |
| 4 Erç 4.1 Exp Liga 4.1.1 | Jebnisse ression des spezifischen sPLA ₂ M-Typ-Rezeptors und seines anden sPLA ₂ -IB in der Rattenniere Expression der sPLA ₂ -IB im | 71 ; 71 |
| 4 Erg 4.1 Exp Liga 4.1.1 | Jebnisse ression des spezifischen sPLA ₂ M-Typ-Rezeptors und seines anden sPLA ₂ -IB in der Rattenniere Expression der sPLA ₂ -IB im Anti-Thy-1.1-Glomerulonephritis-Model | 71 71 71 |
| 4 Erg 4.1 Exp Liga 4.1.1 4.1.2 | Jebnisse ression des spezifischen sPLA ₂ M-Typ-Rezeptors und seines anden sPLA ₂ -IB in der Rattenniere Expression der sPLA ₂ -IB im Anti-Thy-1.1-Glomerulonephritis-Model Expression der sPLA ₂ -IB in glomerulären Mesangiumzellen und | 71 71 71 |
| 4 Erç 4.1 Exp Liga 4.1.1 4.1.2 | Jebnisse ression des spezifischen sPLA ₂ M-Typ-Rezeptors und seines anden sPLA ₂ -IB in der Rattenniere Expression der sPLA ₂ -IB im Anti-Thy-1.1-Glomerulonephritis-Model Expression der sPLA ₂ -IB in glomerulären Mesangiumzellen und Endothelzellen der Ratte. | 71 5 71 71 |
| 4 Erç 4.1 Exp Liga 4.1.1 4.1.2 4.1.3 | Jebnisse Tression des spezifischen sPLA ₂ M-Typ-Rezeptors und seines anden sPLA ₂ -IB in der Rattenniere Expression der sPLA ₂ -IB im Anti-Thy-1.1-Glomerulonephritis-Model. Expression der sPLA ₂ -IB in glomerulären Mesangiumzellen und Endothelzellen der Ratte. Detektion der sPLA ₂ -IB in infiltrierenden Immunzellen in der | 71 71 71 71 |
| 4 Erg 4.1 Exp Liga 4.1.1 4.1.2 4.1.3 | Jebnisse Tression des spezifischen sPLA ₂ M-Typ-Rezeptors und seines anden sPLA ₂ -IB in der Rattenniere. Expression der sPLA ₂ -IB im Anti-Thy-1.1-Glomerulonephritis-Model. Expression der sPLA ₂ -IB in glomerulären Mesangiumzellen und Endothelzellen der Ratte. Detektion der sPLA ₂ -IB in infiltrierenden Immunzellen in der Rattenniere. | 71 71 71 71 72 74 |
| 4 Erg 4.1 Exp Liga 4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.1.4 | Jebnisse Jebnisse Jession des spezifischen sPLA ₂ M-Typ-Rezeptors und seines anden sPLA ₂ -IB in der Rattenniere Expression der sPLA ₂ -IB im Anti-Thy-1.1-Glomerulonephritis-Model Expression der sPLA ₂ -IB in glomerulären Mesangiumzellen und Endothelzellen der Ratte. Detektion der sPLA ₂ -IB in infiltrierenden Immunzellen in der Rattenniere Expression des sPLA ₂ -M-Typ-Rezeptors unter entzündlichen | 71 71 71 72 74 |
| 4 Erg 4.1 Exp Liga 4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.1.4 | Jebnisse ression des spezifischen sPLA ₂ M-Typ-Rezeptors und seines anden sPLA ₂ -IB in der Rattenniere. Expression der sPLA ₂ -IB im Anti-Thy-1.1-Glomerulonephritis-Model. Expression der sPLA ₂ -IB in glomerulären Mesangiumzellen und Endothelzellen der Ratte. Detektion der sPLA ₂ -IB in infiltrierenden Immunzellen in der Rattenniere. Expression des sPLA ₂ -M-Typ-Rezeptors unter entzündlichen Bedingungen in der Rattenniere. | 71 71 72 74 75 |
| 4 Erç 4.1 Exp Liga 4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.1.4 4.1.4 | Jebnisse Jebnisse Jebnisse Jestical Sector Jestical Sector Jestic Sector Jestic Sector Jestic Sector Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes Jestimes | 71 71 72 72 74 75 76 |
| 4 Erg 4.1 Exp Liga 4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.1.4 4.1.4 4.1.4 | Jebnisse Jebnisse Jebnisse Jebnisse Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicular Jesnicula | 71 71 71 72 74 75 76 |
| 4 Erg 4.1 Exp Liga 4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 | Jebnisse | 71 71 72 72 74 75 76 76 |
| 4 Erç 4.1 Exp Liga 4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 | Jebnisse | 71 71 72 72 74 75 76 76 |
| 4 Erg 4.1 Exp Liga 4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 | Jebnisse | 71 71 71 72 74 75 76 76 |
| 4 Erg 4.1 Exp Liga 4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 | Jebnisse | 71 71 72 74 75 76 76 76 |
| 4 Erg 4.1 Exp Liga 4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.1.4 | Jebnisse | 71 71 72 72 74 75 76 76 76 77 78 |
| 4 Erg 4.1 Exp Liga 4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.1 4.2.1 4.2.1 4.2.1 4.2.1 4.2.1 4.2.1 | Jebnisse | 71 71 72 72 74 76 76 76 78 78 78 |
| 4 Erç 4.1 Exp Liga 4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.2.1 4.2.1 4.2.1 4.2.2 | Jebnisse | 71 71 72 74 76 76 76 76 78 78 78 79 |
| 4 Erg 4.1 Exp Liga 4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.1.4 4.2.1 4.2.1 4.2.1 4.2.1 4.2.1 4.2.1 4.2.1 4.2.1 4.2.1 4.2.1 4.2.1 4.2.1 4.2.1 4.2.1 4.2.1 | Jebnisse. Jebnisse. Jeression des spezifischen sPLA ₂ M-Typ-Rezeptors und seines anden sPLA ₂ -IB in der Rattenniere. Expression der sPLA ₂ -IB im Anti-Thy-1.1-Glomerulonephritis-Model. Expression der sPLA ₂ -IB in glomerulären Mesangiumzellen und Endothelzellen der Ratte. Detektion der sPLA ₂ -IB in infiltrierenden Immunzellen in der Rattenniere. Expression des sPLA ₂ -IB in infiltrierenden Immunzellen in der Rattenniere. Expression des sPLA ₂ -M-Typ-Rezeptors unter entzündlichen Bedingungen in der Rattenniere. 4.1 <i>In-vivo</i> Expression des MTR in Rattennieren. 4.2 <i>In-vitro</i> Expression des MTR in glomerulären Zellen der Rattenniere. Ersuchungen zur Expression und Regulation der murinen A ₂ s und des M-Typ-Rezeptors (MTR) in MTR-knockout- Isen. Charakterisierung von Wildtyp-Maus-Mesangiumzellen. 1 Überprüfung der Reinheit der Mesangiumzellen in Kultur. 2 Proliferation von murinen Mesangiumzellen in Kultur. Wildtyp. und MTR knockout Mäusen gewing in ingligiterten Merine | 71 71 72 74 76 76 76 76 78 78 78 79 |
| 4 Erg 4.1 Exp Liga 4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.1 4.1.4 4.1.1 4.1.1 4.1.2 | Jebnisse. Jebnisse. Jeression des spezifischen sPLA ₂ M-Typ-Rezeptors und seines Anden sPLA ₂ -IB in der Rattenniere. Expression der sPLA ₂ -IB im Anti-Thy-1.1-Glomerulonephritis-Model. Expression der sPLA ₂ -IB in glomerulären Mesangiumzellen und Endothelzellen der Ratte. Detektion der sPLA ₂ -IB in infiltrierenden Immunzellen in der Rattenniere. Expression des sPLA ₂ -IB in infiltrierenden Immunzellen in der Rattenniere. Expression des sPLA ₂ -M-Typ-Rezeptors unter entzündlichen Bedingungen in der Rattenniere. 4.1 <i>In-vivo</i> Expression des MTR in Rattennieren. 4.2 <i>In-vitro</i> Expression des MTR in glomerulären Zellen der Rattenniere. ersuchungen zur Expression und Regulation der murinen A ₂ s und des M-Typ-Rezeptors (MTR) in MTR-knockout- Isen. Charakterisierung von Wildtyp-Maus-Mesangiumzellen. 1 Überprüfung der Reinheit der Mesangiumzellen in Kultur. Untersuchungen zur mRNA-Expression des MTR in Nieren von Wildtyp- und MTR-knockout-Mäusen sowie in isolierten Maus- | 71 71 72 72 74 75 76 76 76 78 78 79 |
| 4 Erç 4.1 Exp Liga 4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.4 4.1.1 4.1.1 4.2.1 4.2.1 4.2.2 | Jebnisse | 71 71 72 72 74 76 76 76 76 78 78 79 |

| | 2 | 1.2.3.1 | Nachweis des MTRs mittels Western-Blot-Analyse | 81 |
|---|----------|----------|---|------|
| | 2 | 1.2.3.2 | 2 Nachweis des MTR mittels Rezeptor-Bindungsstudien | 82 |
| | 4.3 | Char | akterisierung der Phospholipasen A ₂ in | |
| | | Maus | s-Mesangiumzellen | 83 |
| | 4.4 | Die F | Regulation von Phospholipasen A2 in Maus- Mesangiumzellen | 1 |
| | | unte | r entzündlichen Bedingungen | 85 |
| | 4.4 | .1 | Nachweis der mRNA- und Protein-Expression der sPLA ₂ s | 85 |
| | 4.4 | .2 | Untersuchung der sPLA ₂ -Aktivität in den Zellkulturüberständen vo | on |
| | | | Maus-Mesangiumzellen | 89 |
| | 4.4 | 4.3 | Auswirkungen von sPLA ₂ - und cPLA ₂ -Inhibitoren auf die | |
| | | | Genexpression der Phospholipasen | 89 |
| | 4.5 | Die F | Regulation von Entzündungsmediatoren in Maus- | |
| | | Mesa | angiumzellen unter entzündlichen Bedingungen | 92 |
| | 4.5 | .1 | Die Prostaglandinproduktion in Maus-Mesangiumzellen nach | |
| | | | Stimulation mit entzündlichen Zytokinen | 92 |
| | 4.5 | .2 | Die Expression der Cyclooxygenasen nach Stimulation mit | |
| | | | proinflammatorischen Zytokinen in Maus-Mesangiumzellen | 93 |
| | 4.5 | .3 | Regulation der Prostaglandin-Biosynthese nach Gabe spezifische | ər |
| | | | sPLA ₂ -und cPLA ₂ -Inhibitoren | 95 |
| | 4.6 | Effek | te von exogenen sekretorischen Phospholipasen A ₂ auf die | |
| | | Entz | undungsmediatoren in Maus-Mesangiumzellen | 96 |
| | 4.6 | .1 | Einfluss von exogenen sPLA ₂ s auf die Genexpression der | ~ ~ |
| | | • | zellularen sPLA ₂ | 96 |
| | 4.6 | .2 | Einfluss von exogenen $SPLA_2s$ auf die Prostaglandin-Produktion. | 97 |
| | 4.6 | .3 | Die Effekte von Cyclooxygenase- (COX)-Innibitoren auf die | 101 |
| | 4.0 | | Prostagiandinbildung in Maus-Mesangiumzeilen | .101 |
| | 4.0 | .4 | Expression der Induzierbaren NO-Synthase (INOS) und Bildung | |
| | | | von Stickstonmonoxid (NO) hach Stimulation mit | 105 |
| | 16 | E | Dio Expression des Chemekine MID 2 in Maus-Mesangiumzellen | .105 |
| | 4.0 | .5 | unter entzündlichen Redingungen | 100 |
| | 16 | 6 | Effekte evegener ePLAss auf die NO und MIP 2 Aussehüttung | 1109 |
| | 4.0 | .0 | Bogulation der MIP-2-Expression durch Stickstoffmonoxid (NO) | 112 |
| | 4.0 | .7 8 | Effekte des iNOS-Inhibitors I -NMMA auf die MIP-2-Expression | 11/ |
| | 4.0 | .0 .0 | Effekte des NO-Donors DETA-NONOat auf die | 114 |
| | 7.0 | .0 | MIP-2-Evoression | 116 |
| | | | | |
| 5 | | Diek | ruesion | 110 |
| J | 51 | Ever | assian das spazifisaban M-Tun-Pazantars und sainam | 110 |
| | 5.1 | | ession des spezinschen im Typ-nezeptors und semen | 110 |
| | 52 | Liyai | reuchungen zur Expression und Regulation des M-Typ- | 121 |
| | J.2 | Rozo | ntors (MTR) in MTR-knockout Mäusen | 121 |
| | 53 | Char | akterisierung der Phospholingeon Λ_{a} in | |
| | 0.0 | Maue | s-Mesangiumzellen | 124 |
| | 5.4 | Die F | Regulation der Phospholinasen Δ_{α} in Maus-Mesandiumzellen | |
| | . | Unter | r entzündlichen Bedingungen | 125 |
| | 5.5 | Die | Bedeutung der Phospholipasen Δ. hei der Riosvnthese | .120 |
| | 0.0 | von | inidmediatoren in Maus-Mesangiumzellen | 129 |
| | | 1011 | | |

| 5.6 | Die Regulation der Entzündungsmediatoren NO und MIP-2 in | _ |
|------------|---|----|
| | Maus-Mesangiumzellen13 | 3 |
| 5.7 | Effekte von exogenen sekretorischen Phospholipasen A ₂ | |
| | auf die Entzündungsmediatoren in Maus-Mesangiumzellen13 | 6 |
| 5.8 | Regulation von Entzündungsmediatoren durch | |
| 010 | Stickstoffmonovid (NO) | a |
| | | 3 |
| 6 | 7usammenfassung 14 | 11 |
| Ŭ | Lucumonaccung | |
| 7 | Literaturverzeichnis | 14 |
| • | | |
| 8 | Anhang 16 | 34 |
| 0 1 | Publikationon und Präsontationon 16 | 21 |
| 8.2 | | •4 |
| | SelbstständigkeitserklärungFe |) |
| | hler! Textmarke nicht definiert. | |

1 Einleitung

1.1 Die Säugetier-Niere

Die Nieren stellen das paarige Exkretionsorgan der Säugetiere dar. Sie liegen im Bereich der Lendengegend, jeweils neben der Wirbelsäule hinter dem Bauchfell (Retroperitoenal-Raum) im Schutz der unteren Rippen und haben eine bohnenförmige Gestalt. Die Nieren haben im Körper zahlreiche Funktionen. Zum Einen übernehmen sie die Ausscheidung von im Blut gelösten Stoffwechselprodukten durch glomeruläre Filtration oder durch aktive Sekretion in den Harn. Zum Anderen sorgen sie für die Regulierung des Wasser- und Elektrolythaushaltes und durch Ausscheiden von Protonen regulieren sie das Säure-Base-Gleichgewicht im Blut (Lüllmann *et al.*, 1996). Des Weiteren sind sie an der Produktion der Hormone Calcitriol und Erythropoietin beteiligt und tragen durch die Ausschüttung des Enzyms Renin maßgebend zur Produktion des Hormons Angiotensin bei (Koolman und Röhm, 1998).

1.1.1 Anatomie der Säuger-Niere

Die Niere lässt sich in unterschiedliche Teilbereiche einteilen, wie es im makroskopischen Längsschnitt in Abbildung 1.1 graphisch dargestellt ist. Das Nierenmark (Medulla) umgibt das gesamte Nierenbecken und entsendet Nierenpapillen in dieses hinein. Aus dem Nierenbecken wiederum führt der Ureter (Harnleiter) heraus, der sich in die Harnblase entleert (Eckert, 1993). Die Nierenrinde (Cortex), die funktionelle äußere Schicht, ist von einer derben Bindegewebskapsel (Nierenkapsel) umgeben. Die Nephrone, die einzelnen Funktionselemente der Niere, liegen in der Rinde und sind für Bildung des Harns verantwortlich (siehe Abb. 1.2).



Abbildung 1.1: Makroskopischer Längsschnitt einer Säugetierniere (nach www.niele.net).

Beim Nephron handelt es sich um ein langes Röhrensystem (Tubulusapparat), das an einem Ende geschlossen ist und sich am anderen über ein Sammelrohr in das Nierenbecken öffnet. Am geschlossenen Ende erweitert sich das Nephron zur Bowmanschen Kapsel, welche ein Kapillarnetz, den Glomerulus umschließt (Eckert *et al.*, 1993). Der Tubulusapparat lässt sich in den proximalen Tubulus, das Überleitungsstück, den distalen Tubulus und das Sammelrohr untergliedern.

Der gerade Teil des proximalen und distalen Tubulus sowie das Überleitungsstück werden unter dem Begriff Henlesche Schleife zusammengefasst (Mutschler, 1997).



Abbildung 1.2: Das Nephron- die funktionelle Einheit der Niere (nach www.niele.net).

1.1.2 Funktion der Niere

Die Nieren sind lebenswichtige Organe und ihre Hauptaufgabe besteht in der Bildung des Harns, wodurch wichtige Funktionen des Körpers reguliert werden. Durch die glomeruläre Filtration wird aus dem durchfließenden Blutplasma ein nahezu eiweißfreies Ultrafiltrat, der Primärharn abgepresst. Als Filter dient dabei die Basalmembran, deren Poren Wasser und niedermolekulare Plasmabestandteile frei durchtreten lassen, aber Blutzellen und die großen Plasmamoleküle zurückhalten. Bei der darauf folgenden Rückresoption im Tubulus unterscheidet man aktive und passive Prozesse. Die Sekretion von organischen Säuren und Basen ist ein aktiver Prozess und findet in den Tubuli und Sammelrohren statt. Im proximalen Tubulus werden Wasser, Elektrolyte, Glucose, Aminosäuren und die im Filtrat gering vorhandenen Proteine aktiv und nahezu vollständig rückresorbiert. Eine je nach Flüssigkeitsbilanz schwächere oder stärkere Harnkonzentrierung wird durch das Haarnadelgegenstromsystem im Nierenmark erreicht. Außerdem wird durch die Erhöhung oder Erniedrigung der Wasserpermeabilität der Zellen des distalen Tubulus und den Sammelrohren mittels des Hypophysenhinterlappenhormons die Adjuretin Wasserausscheidung reguliert. Bei Zunahme der osmotischen Konzentration im Blut oder im Extrazellularraum wird Adiuretin ausgeschüttet und dadurch eine verstärkte Wasserrückresorption (Antidiurese) bewirkt. Bei einer verminderten osmotischen Konzentration wird die Adiuretin-Freisetzung gehemmt.

Die Steuerung der Elektrolytausscheidung erfolgt durch hormonale Regelkreise, wobei Aldosteron für den Natriumhaushalt das wichtigste Hormon darstellt. Sowohl Angiotensin-II als auch Angiotensin-III bewirken die Freisetzung von Aldosteron aus dem Nebennierenmark. Das Gewebshormon Renin, welches bei einer Verringerung der Natruimionen-Konzentration und Blutdruckabfall freigesetzt wird. spaltet aus Angiotensinogen Angiotensin-I ab. Werden erneut zwei Aminosäuren abgespalten, entsteht Angiotensin-II; eine weitere AS-Abspaltung lässt Angiotensin-III entstehen. Angiotensin-II ist eine der wirksamsten körpereigenen gefäßverengenden Substanzen, so dass unter seinem Einfluss der periphere Gefäßwiderstand und somit der Blutdruck ansteigen (Koolman und Röhm, 1998).

Die Protonen, die durch Stoffwechselprozesse im Organismus anfallen, werden einerseits respiratorisch und andererseits renal ausgeschieden. Die Ausscheidung der Protonen erfolgt vorwiegend nach Reaktion mit Puffersubstanzen; die Ausscheidungsrate an freiem Wasserstoff ist gering. So trägt die Niere zur Regulierung des Säure-Base-Gleichgewichts im Körper bei.

3

Unabhängig von der Bildung des Harns übernimmt die Niere eine weitere Funktion durch die Bildung der Hormone Erythropoietin und Calcitriol. Erythropoietin ist ein Glykoproteinhormon, das die Bildung von Erythrocyten aus Vorgängerzellen im (Erythroporese) Bei Knochenmark steuert. Erwachsenen wird Erythropoietin hauptsächlich in der Niere gebildet und zwar in den Endothelzellen der peritubulären Kapillaren. Der Stimulus für die Produktion von Erythropoietin ist eine verminderte Sauerstoffsättigung in den Nierenaterien (www. Flexikon.doccheck.com). Calcitriol wird durch die Hydroxylierung von 25-Hydroxy-cholecalciferol zu 1,-Dihydroxy-cholecalciferol gebildet und beteiligt sich an der Kontrolle des Kalzium- und Phosphatstoffwechsels (Mutschler, 1997).

1.1.3 Glomeruläre Mesangiumzellen

Das Mesangium ist ein interstitielles Gewebe in der Bowmanschen Kapsel, bestehend aus Mesangiumzellen und einer Interzellulärmatrix.

Die Mesangiumzellen nehmen sowohl anatomisch als auch funktionell eine zentrale Position im Glomerulus ein (siehe Abb. 1.3). Bei ihnen handelt es sich um modifizierte glatte Muskelzellen, sie sind aber zudem in der Lage, eine Reihe weiterer Funktionen auszuüben. Mesangiumzellen bilden das Bindegewebe im Glomerulus und unterstützen so die Bildung von Kapillarschleifen. Außerdem tragen sie durch ihre zentrale Position, ihre Fähigkeit zur Kontraktion und ihre Verbindung zu den anderen Zellen des juxtaglomerulären Apparats zur glomerulären Filtration bei (Sterzel und Rupprecht, 1997). Diese wird durch das Gleichgewicht von vasoaktiven Substanzen kontrolliert, welche die Kontraktion oder Relaxtion der Mesangiumzellen hervorrufen (Mené *et al.*, 1989; Schlöndorff, 1987).

Außerdem weisen Mesangiumzellen ähnliche Eigenschaften auf wie Makrophagen, z.B. die Fähigkeit zur Phagozytose und die Produktion von Zytokinen (Mené *et al.*, 1989; Schreiner, 1992; Sterzel und Rupprecht, 1997). Dabei werden Mesangiumzellen selbst durch proinflammatorische Stoffe aktiviert und setzen daraufhin bioaktive Moleküle frei (Radeke und Resch, 1992; Schreiner, 1992; Sterzel *et al.*, 1993). Die meisten dieser Moleküle wie z.B. Prostaglandine (Sraer *et al.*, 1993), Stickstoffmonoxid (Beck *et al.*, 1995), Interleukine (Tipping *et al.*, 1991; Ruef *et al.*, 1990; Kusner *et al.*, 1991; Fouqueray *et al.*, 1995) und Chemokine (Wolf *et al.*, 1993; Largen *et al.*, 1995) wirken als Entzündungsmediatoren.

Durch ihre vielfältigen Funktionen spielen Mesangiumzellen eine wichtige Rolle bei der Entstehung und dem Fortschreiten von Nierenerkrankungen, insbesondere bei der Glomerulonephritis (siehe 1.4.1.1).



Abbildung 1.3: Querschnitt eines Glomerulus (nach www.unifr.ch/histologie).

1.1.4 Nierenerkrankungen

Erkrankungen der Nieren können dramatische Auswirkungen für den Organismus haben. Diese betreffen entweder das Nierengewebe (Ort der Filtration) oder das Sammellager (Nierenbecken, Kelche oder Harnleiter).

1.1.4.1 Glomerulopathien

Glomerulopathien sind durch strukturelle und funktionelle Schäden an den Nierenglomeruli gekennzeichnet, wobei der Ursprung hierfür entzündliche oder nicht entzündliche Prozesse sein können (Marti *et al.*, 2003). Die Glomerulonephritis ist eine entzündliche Veränderung der Glomeruli, wogegen es sich bei der diabetischen Nephropathie und der Amyloidose primär um nicht entzündliche Erkrankungen der Glomeruli handelt. Weltweit stellt die Glomerulonephritis wegen ihrer Vielzahl an Infektionserregern (z.B. Malariaplasmodien, β -hämolysierende Streptokokken, Hepatitis B- und C-Viren, HI-Viren oder Parvoviren) die häufigste Ursache für ein terminales Nierenversagen dar (Couser, 1999; Di Belgiojoso *et al.* 2002; Birkeland und Storm, 2003). Die Klassifizierung der Glomerulopathien erfolgt hauptsächlich aufgrund ihrer Morphologie

und Ätiologie. Außerdem werden sie aufgrund ihrer Entstehung, also primär als renale Störung oder sekundär im Rahmen von systemischen Erkrankungen, eingeteilt (siehe Tab.1-1). Als die häufigste Form einer primären Glomerulonephritis gilt die IgA-Nephropathie, bei welcher sich IgA im Glomerulus einlagert (Donadio und Grande, 2002).

| Krankhait | Proliferative | Keine proliferativen | | | |
|-----------|-----------------------------|------------------------------------|--|--|--|
| Ridikheit | Veränderungen | Veränderungen | | | |
| primär | Mesangioproliferative GN | Fokal-segmentale Glomerulosklerose | | | |
| | IgA-Nephropathie | Glomeruläre Minimalläsion | | | |
| | Membranoproliferative GN | Membranöse Nephropathie | | | |
| | Nekrotisierende GN und/oder | "thin basement membrane | | | |
| | GN mit Halbmondbildung | nephropathy" | | | |
| sekundär | Lupusbildung | Diabetische Nephropathie | | | |
| | Systemische Vaskulitis | Amyloidose | | | |
| | Postinfektiöse GN | Leichtketten-Nephropathie | | | |

| Tabelle [•] | 1-1: | Klassifikation | der | glomerulären | Erkrankungen | ı (nacł | n Hricik | et al., | 1998). |
|----------------------|------|----------------|-----|--------------|--------------|---------|----------|---------|--------|
|----------------------|------|----------------|-----|--------------|--------------|---------|----------|---------|--------|

GN = Glomerulonephritis

Pathogenese: Eine Glomerulonephritis kann vererbt oder erworben auftreten, oft ist aber eine genau definierte Ätiologie nicht bekannt. Eine Nephritis kann durch Bakterien wie βhämolysierenden Streptokokken (Typ A) ausgelöst werden. Aber auch eine Virusinfektion mit Hepatitis B und C oder HI-Viren kann die Ursache einer Nephritis sein (Di Belgiojoso *et al.*, 2002). Viele schädigende Einflüsse können humorale oder zelluläre Immunreaktionen hervorrufen, welche die Bildung und Ablagerung von Immunkomplexen in den Glomeruli oder zelluläre Immunreaktionen mit glomerulären Antigenen zur Folge haben (Couser 1999, Birkeland und Storm, 2003). Auch nicht-immunologische Schädigungen der Glomeruli können z.B. als Folge einer arteriellen Hypertonie oder Ischämie vorkommen. Abbildung 1.4 zeigt ein vereinfachtes Schema wichtiger pathogenetischer Mechanismen bei der Glomerulonephritis (Marti *et al.*, 2003).



Abbildung 1.4: Wichtige pathogenetische Mechanismen bei der Glomerulonephritis (nach Marti *et al.*, 2003).

Ein markantes Merkmal vieler Erkrankungen der Glomeruli ist die erhöhte Zahl an Mesangiumzellen (Gòmez-Guerrero *et al.*, 2005). Infolge immunologischer, toxischer, ischämischer oder mechanischer Verletzungen sezernieren Mesangiumzellen sowie auch andere Nierenzellen Adhäsionsmoleküle und Chemokine, die ihrerseits zu einer Einwanderung von Leukozyten, hauptsächlich Neutrophilen und Makrophagen, führen (Anders *et al.*, 2003). Die eingewanderten Zellen produzieren daraufhin entzündliche Mediatoren, die wiederum das Verhalten der renalen Mesangiumzellen beeinflussen. Diese Wechselwirkungen zwischen den eingewanderten Zellen und den bereits vorhandenen Mesangiumzellen führt zur Zellproliferation und Matrix-Ausdehnung, welche in einer Glomerulosklerose und tubulären Fibrose enden (Schlöndorff, 1995).

Unter den Entzündungsmediatoren spielen Stickstoffmonoxid (NO) und das *"macrophage inflammatory protein-2"* (MIP-2) eine wichtige Rolle in der Glomerulonephritis (Cattell, 2002; Feng *et al.*, 1995). Des Weiteren sind auch Angiotensin-II (AT-II) und der *"transforming growth factorβ"* (TGFβ) der *"vascular endothelial growth factor"* (VEGF) (Eremina *et al.*, 2003), Plasminogenaktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) (Rerolle *et al.*, 2000), Thrombin (Cunningham *et al.*, 2000) und die Matrixmetalloproteasen (MMP) (Steinmann-Nigli *et al.*, 1998; Daniel *et al.*, 2001) daran beteiligt. Außerdem werden eine Reihe von Eicosanoiden produziert, die neben ihrer physiologischen Funktion in der Niere nun zur Entstehung entzündlicher Prozesse in der Niere beitragen (Gomez-Guerrero *et al.*, 2005). Im Folgenden wird kurz auf die Entstehung und Funktionen der Entzündungsmediatoren NO, MIP-2 und Prostaglandine eingegangen, da sie u.a. Gegenstand der Untersuchungen dieser Arbeit waren.

1.2 Stickstoffmonoxid (NO)

Das gasförmige Molekül Stickstoffmonoxid (NO) ist das kleinste bekannte bioaktive Produkt von Säugerzellen und besitzt vielfältige physiologische und pathophysiologische Funktionen (Moncada *et al.*, 1991; Beck *et al.*, 1999). Die NO-Synthese wird von den NO-Synthasen (NOS) katalysiert, von denen bislang drei Isoenzyme identifiziert wurden: (1) die konstitutiv exprimierte endotheliale NOS (eNOS), (2) die konstitutiv exprimierte neuronale NOS (nNOS) und (3) die induzierbare NOS (iNOS). Die Expression der iNOS kann durch Endotoxine oder durch proinflammatorische Zytokine wie TNF α , IL-1 β oder IFN γ auf transkriptioneller Ebene induziert werden (Huwiler und Pfeilschifter, 2003).

Im Gegensatz zur eNOS und nNOS, welche zwar stetig aber nur im geringen Maße NO produzieren, kann die iNOS, einmal induziert, für Tage aktiv bleiben und somit die NO-Produktion der anderen beiden Isoformen um das 1000fache übertreffen (Nathan, 1992). In niedrigen Konzentrationen ist NO ein Signalmolekül und steuert fast ausschließlich physiologische Prozesse. Es stimuliert die Aktivität des Hämenzyms Guanylatzyklase und löst damit die Bildung von zyklischem Guanosin-5'-monophosphat (cGMP) aus, welches dann physiologische Funktionen wie vaskuläre Homöostase und Signaltransduktion im zentralen Nervensystem vermittelt. In hohen Konzentrationen dagegen kann NO mit Thiolgruppen der Proteine interagieren und dadurch die Proteinfunktion verändern oder die Expression von Genen initiieren (Pfeilschifter et al., 2001). Dies kann schließlich zur Schädigung von gesundem Gewebe führen (Nathan, 1992; Moncada und Higgs, 1993). Andererseits ist beschrieben, dass große Mengen an NO antibakteriell, antiviral, antiparasitisch und antitumoral wirken können (Bogdan, 2001; MacMicking et al., 1997). Bei *in-vitro*-Studien mit Ratten-Mesangiumzellen konnte gezeigt werden, dass diese nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen große Mengen an NO produzieren, welches von der iNOS stammt (Pfeilschifter, 2000). Des Weiteren kann Stickstoffmonoxid selbst die Expression von weiteren inflammatorischen Mediatoren wie dem CXC Chemokin MIP-2 (Walpen et al., 2001), IL-8, MIP-1α, MCP-1 (Pfeilschifter et al., 2001) oder die sPLA₂-IIA (Rupprecht et al., 1999) induzieren. Auch das Auftreten von Apoptose in Mesangiumzellen oder in anderen glomerulären Zelltypen kann durch NO eingeleitet werden (Nitsch et al., 1997; Brüne, 2002; Pautz et al., 2002). Somit handelt es sich bei NO um ein proinflammatorisches Molekül, welches auch in Nierenerkrankungen wie der Glomerulonephritis eine wichtige Rolle spielt (Cattell, 2002).

1.3 "Macrophage inflammatory protein-2" (MIP-2)

Chemokine sind chemotaktische Zytokine, welche Leukozyten und Monozyten in entzündeten und verletzten Gewebe rekrutieren und aktivieren (Sozzani et al., 1996; Baggiolini, 1998). Sie bilden eine Superfamilie und können entsprechend der Position ihrer konservierten Cysteine in CXC, CC, C und CX₃C Chemokine unterteilt werden (Schall, 1994; Baggiolini et al., 1997). Chemokine üben ihre Funktion über spezielle G-Protein-gekoppelte Zelloberflächen-Rezeptoren aus, welche Mitglieder der Rhodopsin Superfamilie sind (Benbaruch et al., 1995). Erstmals wurde MIP-2 als ein ca. 6kDa großes Heparin-bindendes Protein beschrieben, welches von LPS-stimulierten Maus-Makrophagen sezerniert wird (Wolpe et al., 1988, 1989; Tekamp Olson et al., 1990). Ihm wird daher eine wichtige Rolle bei der durch LPS induzierten Entzündungsantwort zugeteilt (Kopydlowski et al., 1999). Als CXC Chemokin besitzt MIP-2 chemotaktische Aktivität für Neutrophile (Tessier et al. 1997, 1998; Ohtsuka et al., 2001), welche bei massiver Einwanderung zur Aufrechterhaltung einer Entzündung und als Folge zur Schädigung von Gewebe führen können (Matzer et al., 2004). Die Produktion von MIP-2 konnte in entzündlichen Krankheiten wie Arthritis, Sepsis und Glomerulonephritis beobachtet werden (Schrier et al., 1998; Skidgel et al., 2002; Feng et al., 1995).

1.4 Eicosanoide

Eicosanoide sind bioaktive Lipidmediatoren, die in vielen unterschiedlichen Geweben exprimiert werden. Sie spielen sowohl physiologisch als auch pathophysiologisch eine wichtige Rolle. Eicosanoide werden in die Familien der Prostanoide (Prostaglandine, Prostacyclin, Thomboxane), der Hydroxy-Eicosatetraensäuren (HETE), der Hydroxy-Oktadecadiensäuren (HODE), der Leukotriene (LT), der Lipoxine, der 15-Epi-lipoxine, der Hepoxine, der Trioxiline, der Epoxyeicosatriensäuren (EET), der Isoprostane und der Anandamide unterteilt (Marks und Fürstenberger, 1999).

1.4.1 Biosynthese und Funktionen von Prostanoiden

Der erste Schritt der Biosynthese von Prostanoiden ist die Freisetzung von Arachidonsäure (AA) aus der Phospholipidmembran durch Phospholipasen A₂. Die AA dient als Substrat für die Cyclooxygenasen-1 und -2, welche die Bildung des Zwischenprodukts Prostaglandin H₂ (PGH₂) katalysieren. Anschließend erfolgt die Umwandlung von PGH₂ zu den Prostaglandinen D, E und F, Prostaglandin I (Prostacyclin) und Thromboxan A durch die jeweiligen Prostaglandin-Synthasen (Nasrallah und Hébert, 2005; Funk, 2001; siehe Abb. 1.5).





Prostanoide werden durch Cyclooxygenasen und den nachgeschalteten Postaglandin-Synthasen aus Arachidonsäure synthetisiert (nach Marks und Fürstenberger, 1999).

In der Niere sind Prostaglandine für die Aufrechterhaltung der Homöostase, also für das Gleichgewicht zwischen vasodilatatorischen und vasokonstriktorischen Stoffwechselwegen und die Regulation von verschiedenen Nierenfunktionen wie Hämodynamik, Renin-Sekretion, tubuläre Transportprozesse, Proliferation und Apoptose verantwortlich (Nasrallah und Hébert, 2005).

Auf der anderen Seite sind sie an pathophysiologischen Prozessen beteiligt. So spielen sie in der Pathogenese der Hypertonie (Qi *et al.*, 2002), in Elektrolyt-Funktionsstörungen wie dem Bartter-Syndrom (Reinalter *et al.*, 2002) sowie bei entzündlichen Nierenerkrankungen eine wichtige Rolle (Hartner *et al.*, 2000). Bei entzündlichen Nierenerkrankungen werden vermehrt Prostaglandine von aktivierten Mesangiumzellen ausgeschüttet (Gomez-Guerrero *et al.*, 2005). Diese potenzieren dann die Effekte von

primären Entzündungsmediatoren wie Bradykinin oder Histamin und tragen so zur Aufrechterhaltung der Entzündung und die dadurch entstehende Schädigung des Gewebes bei (Moncada *et al.*, 1973).

Prostaglandine werden über einen Prostaglandintransporter aus der Zelle freigesetzt (Schuster *et al.*, 1998) und können sowohl autokrin als auch parakrin über spezifische Prostaglandin-Rezeptoren wirken. Es existieren mindestens neun Prostaglandin-Rezeptoren, welche zu der Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren gehören (Bhattacharya *et al.*, 1998). Das Prostacyclin besitzt nur eine Halbwertszeit von wenigen Minuten und wird schnell zu dem nahezu inaktiven 6-keto-PGF₁ metabolisiert. Daher übt dieses seine Funktionen unmittelbar an seinem Syntheseort aus.

1.4.2 Cyclooxygenasen

Die Cyclooxygenasen (COX) sind die für die initiale Metabolisierung von Arachidonsäure zum Zwischenprodukt PGH₂ verantwortlichen Enzyme. Bislang wurden drei Isoformen der COX identifiziert: COX-1, COX-2 und COX-3. Bei der COX-3 handelt es sich um eine Spleißvariante des COX-1-Gens (Chandrasekharan *et al.*, 2002; Davies *et al.*, 2004).

Die COX-1 und -2 haben ein ähnliches Molekulargewicht von 70 bzw. 71 kDa, unterscheiden sich aber deutlich in ihrer Aminosäuresequenz (Smith et al., 2000). Außerdem zeigen sie Unterschiede in ihrer Expression und Regulation. Die COX-1 wird konstitutiv in vielen Geweben exprimiert. Sie stellt Prostaglandine zur Verfügung die vorwiegend physiologische Funktionen übernehmen (DeWitt und Smith, 1988). Die COX-2 wird als induzierbare Form bezeichnet, da ihre Expression hauptsächlich durch proinflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren induziert wird. Somit ist sie vor allem für die erhöhte Prostaglandin-Produktion in entzündetem Gewebe verantwortlich (Crofford et al., 1997; Herschman et al., 1997). Aber auch die COX-2 kann konstitutiv exprimiert werden und ist somit auch für physiologische Prozesse verantwortlich, wie in der Ratten-Niere (Harris et al., 1994) oder der Maus-Niere gezeigt werden konnte (Ferguson et al., 1999). Interessanterweise unterscheidet sich die Lokalisation der COX-2 in der Niere von der der COX-1. Eine konstitutive Expression der COX-2 konnte in der Nierenrinde in den Zellen der Macula densa und dem dicken, aufsteigendem Ast der Henleschen Schleife nachgewiesen werden. Den dort freigesetzten Prostaglandinen wird eine Rolle bei der Renin-Ausschüttung zugeteilt (Harris und Breyer, 2001). Ebenfalls wird die COX-2 konstitutiv in den interstitiellen Zellen des Nierenmarks exprimiert. Dort sind die Prostaglandine in die Regulation der tubulären Salz- und Wasserresorption und die Regulation des Blutflusses miteinbezogen (Harris et al., 1994).

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die Eicosanoidbiosynthese ist die Freisetzung von Arachidonsäure. Die hierfür verantwortlichen Enzyme gehören zur Superfamilie der Phospholipasen A₂.

1.5 Die Familie der Phospholipasen A₂

Die Phospholipasen A₂ (PLA₂) stellen eine Superfamilie von Enzymen dar, welche die Hydrolyse der Esterbindung an der sn-2 Position von Phospholipiden katalysieren, wodurch freie Fettsäuren und Lysophospholipide entstehen, die zu wichtigen Lipidmediatoren umgewandelt werden (Balsinde *et al.*, 2002). Speziell die Freisetzung von Arachidonsäure ist der entscheidende Schritt, da diese als Vorläufermolekül der Eicosanoide dient. Zudem kann die Arachidonsäure selbst als *"second messenger"* pharmakologisch wirksam sein (Gijon *et al.*, 1999).

Zu den Eicosanoiden zählen die durch die COX-1 und -2 generierten Prostaglandine und Thromboxane, sowie die durch die Lipoxygenasen gebildeten Leukotriene und HETE. Wenn die nach Abspaltung der Arachidonsäure entstehenden Lysophospholipide eine Cholin-Gruppe und eine Alkyl-Verbindung besitzen, können sie ebenfalls als Vorläufermoleküle für die Biosynthese des Plättchen-aktivierender-Faktor (PAF) dienen. Eicosanoide und PAF sind wichtige Mediatoren pathophysiologischer Prozesse. Die Kontrolle der Aktivität der PLA₂s als initialem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Eicosanoid-Biosynthese ist damit entscheidend sowohl für die Homöostase von Organfunktionen als auch für die Entstehung von Schmerz und Entzündung (Kudo und Murakami, 2002).

Die Familie der Phospholipasen kann in vier Unterfamilien unterteilt werden, die sich wiederum aufgrund ihrer Kalziumabhängigkeit unterscheiden. Sowohl die Familie der zytosolischen Phospholipasen A₂ (cPLA₂, Gruppe VI-PLA₂) als auch die Familie der sekretorischen Phospholipasen A₂ (sPLA₂) zeigen eine kalziumabhängige Enzymaktivität. Die Aktivität der kalziumunabhängigen Phospholipasen A₂ (*"independent"* PLA₂: iPLA₂, Gruppe VI-PLA₂) und der Plättchen-aktivierender–Faktor-Acetylhydrolasen (*"platelet activating acetyl-hydrolases"*, PAF-AH) ist nicht kalziumabhängig.

Abbildung 1.6 zeigt einen schematischen Überblick der bislang identifizierten Subtypen der humanen und murinen Phospholipasen A_2 (Gelb *et al.*, 2003).



Abbildung 1.6: Die Familie der Phospholipasen A₂ (aus Cayman Currents, Sommer 2003, Ausgabe 14, Gelb *et al.*).

1.5.1 Die zytosolischen Phospholipasen A₂

Bis heute wurden drei Isoformen von der zytosolischen Phospholipase A₂ (cPLA₂; Gruppe IV) identifiziert: die cPLA₂ α (IVA), cPLA₂ β (IVB) und cPLA₂ γ (IVC) mit Molekulargewichten von 60 kDa und 110 kDa (Pickard *et al.*, 1999; Song *et al.*, 1999; Underwood *et al.*, 1998). Die cPLA₂ α wird konstitutiv in den meisten Geweben des Menschen exprimiert (Hirabayashi *et al.*, 2000) und ist, soweit bekannt, die einzige PLA₂, die eine deutliche Substratspezifität zeigt, da sie bevorzugt an der sn-2-Position von Phosphatidylcholin die Arachidonsäure abspaltet (Diez *et al.*, 1992; Hanel *et al.*, 1993). Durch die Anwesenheit von oxygenierten Phospholipiden wird die Freisetzung von Arachidonsäure durch die cPLA₂ α aus der Zellmembran beschleunigt, da die Zugänglichkeit des Enzyms an die Membran erhöht wird (Nigam *et al.*, 2000). Die Aktivierung der cPLA₂ α erfolgt über einen Anstieg des intrazellulären Kalzium-Spiegel (Gronich *et al.*, 1988; Gijon *et al.*), sowie durch Phosphorylierung des Enzyms durch Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (*"mitogenactivated protein kinases"*, MAPK) (Lin *et al.*, 1993). Generell wird die cPLA₂ α posttranslational reguliert, indem sie als Antwort auf intrazelluläre submikromolare Kalziumkonzentrationen vom Zytoplasma zur perinuklären Membran wandert. Dort kommt

es zur Anlagerung an die Membran und zur effizienten funktionellen Kopplung des Enzyms mit den ebenfalls dort lokalisierten Eicosanoid-synthetisierenden Enzymen wie den Cyclooxygenasen und Lipoxygenasen (Clark *et al.*, 1991; Bonventre *et al.*, 2004). Auch die Isoform cPLA₂ β wird im Menschen in fast allen Geweben exprimiert, und besonders im Pankreas, der Leber, im Herz und im Gehirn wurde eine hohe Expression beschrieben (Kudo und Murakami, 2002). Die cPLA₂ β zeigt eine hohe Homologie zur Isoform cPLA₂ α und scheint ebenso eine kalziumabhängige Aktivität zu besitzen (Pickard *et al.*, 1999; Song *et al.*, 1999). Die Isoform cPLA₂ γ zeigt weniger als 30% Homologie zur cPLA₂ α . Ihr fehlt die Ca²⁺- Bindungsdomäne, so dass sie kalziumunabhängig aktiv ist. Die Expression dieser Isoform ist besonders hoch im Herz und den Skelettmuskeln (Underwood *et al.*, 1998).

1.5.2 Die sekretorischen Phospholipasen A₂

1.5.2.1 Allgemeine Eigenschaften

Die ersten beschriebenen Formen der sPLA₂s wurden aus Giften von Nicht-Säugern isoliert. Man unterscheidet Subtyp IA aus Schlangengiften der Cobra und Krait und Subtyp III aus den Giften von Bienen, Echsen und Skorpionen (Davidson *et al.*, 1990).

Die bis heute in Säugern identifizierten 10 sPLA₂-Subtypen werden in die Gruppe IB (GIB), Gruppe IIA (GIIA), Gruppe IIC (GIIC), Gruppe IID (GIID), Gruppe IIE (GIIE), Gruppe IIF (GIIF), Gruppe V (GV), Gruppe X (GX), Gruppe III (GIII) und Gruppe XII (GXII) aufgegeteilt (Valentin und Lambeau, 2000; Murakami und Kudo, 2001). Da die Sequenzhomolgie der Enzyme nur zwischen 15-51% liegt, werden sie nicht als Isoenzyme verstanden, sondern als Subtypen bezeichntet (Gelb et al., 2003). Die Kollektion der Gruppen I/II/V/X weist eine relativ hohe strukturelle Ähnlichkeit auf. Sie besitzen alle ein Molekulargewicht zwischen 14-17 kDa und haben eine hochkonservierte Ca²⁺-Bindungsstelle und katalytische Domäne. Außerdem besitzen diese Subtypen sechs absolut konservierte und bis zu zwei Subtyp-spezifische Disulfidbrücken, welche zu dem sehr hohen Grad an Stabilität der Enzyme in extrazellulären Körperflüssigkeiten beitragen. Im Gegensatz zu der cPLA₂ α zeigen die sPLA₂s keine strikte Fettsäure-Selektivität, weisen allerdings eine gewisse Phospholipid-Präferenz auf. Die Gruppe II Enzyme zeigen eine deutliche Bevorzugung der Hydrolyse an anionischen Phospholipiden wie Phosphatidylglycerol, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin gegenüber dem ladungsneutralen Phosphatidylcholin (PC) (Murakami und Kudo, 2004). sPLA₂-IB *In-vitro-*Studien konnten zeigen, dass die und die sPLA₂-IIA Phosphatidylglycerin als Substrat präferieren (Singer *et al.*, 2002). Die sPLA₂-V und die sPLA₂-X können dagegen sowohl anionische Phospholipide als auch PC effizient hydrolysieren (Murakami und Kudo, 2004).

1.5.2.2 Vorkommen und Regulation

Die **sPLA₂-IB** ist der erste Subtyp der nicht in Giften, sondern in der Pankreasflüssigkeit von Tieren und auch dem Menschen nachgewiesen wurde. Deshalb wird sie auch als pankreatische sPLA₂ bezeichnet (Seilhammer *et al.*, 1986; Davidson und Dennis, 1990;). Die sPLA₂-IB wird als Zymogen in den pankreatischen Verdauungssaft sezerniert. Erst durch Abspaltung des N-terminalen Heptapeptids durch Trypsin entsteht die aktive Form des Enzyms (Murakami und Kudo, 2004). Auch wenn die Verdauung von Nahrungsphospholipiden scheinbar die physiologische Hauptfunktion der sPLA₂-IB ist, wurde dieser Subtyp auch in anderen Organen wie die Lunge, Niere und Milz nachgewiesen (Tojo *et al.*, 1988).

Die sPLA2-IIA wurde als zweiter sPLA2-Subtyp im Menschen identifiziert und charakterisiert. Unter physiologischen Bedingungen ist sie kaum nachweisbar, sie konnte aber in großen Mengen in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis nachgewiesen werden (Hara et al., 1989; Seilhammer et al., 1989). Außerdem belegen Studien, dass die Menge an sPLA2-IIA im menschlichen Serum mit dem Grad der entzündlichen Erkrankung ansteigt (Guidet et al., 1996). In unterschiedlichen Geweben und Zelltypen von verschiedenen Säugerspezies kann durch proinflammatorische Stimuli die Expression der Gruppe IIA-sPLA₂ auf mRNA- und Proteinebene induziert werden. Im Gegensatz dazu führen antiinflammatorische Zytokine und Glucocortikoide zur Reduktion ihrer mRNA- und Proteinexpression (Nakano et al., 1990; Oka und Arita, 1991; Crowl et al., 1991). Die sPLA2-IIA wird zudem konstitutiv in verschiedenen Organen und Geweben von Ratte und Mensch exprimiert, wie Milz, Thymus, Knochenmark und Immunzellen (Kramer et al., 1989; Seilhammer et al., 1989), im Darm (Harwig et al., 1995; Qu et al., 1996) und Leber (Inada et al., 1991; Hatch et al., 1993) Außerdem kommt sie in der Tränenflüssigkeit vor, wo sie eine wichtige Rolle in Abwehrmechanismen gegen Bakterien spielt (Qu und Lehrer, 1998).

Untersuchungen an Mäusen haben gezeigt, dass es für die sPLA₂-IIA einen natürlichen knockout gibt. Dabei handelt es sich um den Mausstamm C57BL/6, bei dem durch eine Leserahmen-Mutation das sPLA₂-IIA-Gen zerstört ist. Diese Mutation führt dazu, dass in diesem Mausstamm dieser sPLA₂-Subtyp nicht als funktionell intaktes Protein exprimiert werden kann (MacPhee *et al.*, 1995).

In der Testis von Nagern konnte die Expression des Subtyps **sPLA₂-IIC** nachgewiesen werden, dort spielt dieser wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Spermatogenese. Im Menschen existiert dieser Subtyp nur als Pseudogen, worauf das Fehlen eines Teiles des Exons hindeutet. Als funktionelles Protein konnte es nicht nachgewiesen werden (Chen *et al.*, 1994).

Die Subtypen **sPLA₂-IID** und **sPLA₂-IIE** weisen eine strukturelle Ähnlichkeit mit der sPLA₂-IIA auf. Im Menschen und in der Maus wird die sPLA₂-IID konstitutiv in den Verdauungsorganen und in den Immunzellen von Milz und Thymus exprimiert (Ishizaki *et al.*, 1999). Die sPLA₂-IIE wird konstitutiv in der menschlichen Lunge exprimiert. Dagegen wurde sie bei der Maus in verschiedenen Organen wie Uterus, Gehirn, Herz, Leber und Testis nachgewiesen (Valentin *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 2000). Sowohl die mRNA-Expression der sPLA₂-IID als auch der sPLA₂-IIE kann durch Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) in verschiedenen Geweben erhöht werden (Ishizaki *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 2000).

Die **sPLA₂-IIF** enthält als einziger Subtyp eine C-terminale Verlängerung von 30 Aminosäuren, welche dazu beitragen könnte, Homo- und Heterodimere mit anderen Proteinen zu bilden (Valentin *et al.*, 1999; Valentin *et al.*, 2000a). Im Menschen wird die sPLA₂-IIF im Thymus, Herz, Niere, Leber und Prostata exprimiert (Valentin *et al.*, 2000). In der adulten Maus konnte die sPLA₂-IIF nur in der Testis nachgewiesen werden (Suzuki *et al.*, 2000), wogegen im Mausembryo ein hoher sPLA₂-IIF-Expressionsspiegel zu finden ist. Dies lässt vermuten, dass die Expression durch die Entwicklung reguliert wird (Valentin *et al.*, 1999).

Die **sPLA**₂-**V** gehört neben der sPLA₂-IIA, -IID, -IIE und -IIF zur Gruppe II-Unterfamilie, da sie eine größere Homologie mit diesen sPLA₂s aufweist als mit der sPLA₂-IB. Außerdem liegt ihr Gen zusammen mit den Genen der sPLA₂s vom Typ II in einem Gen-Cluster auf dem gleichen Chromosomen-Lokus (Tischfield, 1997; Valentin *et al.*, 2000a). Die sPLA₂-V wird in der Maus in einem hohen Grad in vielen verschiedenen Geweben, wie Lunge und Herz exprimiert (Sawada *et al.*, 1999). Auch in humanem Gewebe ist dieser Subtyp zu finden, wobei im Herz der höchste Expressionsspiegel nachgewiesen werden konnte (Chen *et al.*, 1994). Die Expression in Immunzellen wie Mastzellen, Makrophagen und T₂-Helferzellen wird als Antwort auf proinflammatorische und immunologische Stimuli erhöht (Ho *et al.*, 2001). In vivo spielt die sPLA₂-V sowohl eine Rolle bei Entzündungsreaktionen, als auch bei der Signaltransduktion (Murakami *et al.*, 1998 und 1999; Balboa *et al.*, 1996;

Balsinde *et al.*, 1999 und 2000). Außerdem konnte dieser Subtyp intrazellulär assoziiert mit der cPLA₂ und COX-2 nachgewiesen werden, was die Effizienz der Umwandlung von Arachidonsäure in Prostaglandine steigert (Bingham *et al.*, 1999).

Die **sPLA₂-X** besitzt sowohl Gruppe I- als auch Gruppe II-spezifische Merkmale, weswegen sie zusammen mit den Phospholipasen A₂ der Gruppe I, II und V als "I/II/V/X Kollektion" bezeichnet wird. Wie die sPLA₂-IB wird die sPLA₂-X als Zymogen synthetisiert, und erst das Entfernen des N-terminalen Propeptids führt zu einem aktiven Enzym (Hanasaki *et al.*, 1999). Die Expression dieses Subtyps konnte in Verdauungsorganen wie Dünndarm, Dickdarm und Magen, Testis, Thymus und Milz von Maus und Mensch nachgewiesen werden (Cupillard *et al.*, 1997). Im Gegensatz zu den Gruppe II Subtypen wird die sPLA₂-X in der Maus meist konstitutiv exprimiert, und es konnten keine oder nur geringe Änderungen im Expressionsmuster der mRNA nach LPS-Stimulation nachgewiesen werden (Kudo und Murakami, 2002).

Der Subtyp **sPLA₂-III** ist ein ungewöhnlich großes sPLA₂-Protein mit einem Molekulargewicht von 55 kDa. Nur in der Ca²⁺-Bindungsstelle und der katalytischen Domäne zeigt es Homologien zu der I/II/V/X-Kollektion der sPLA₂s. Im Menschen wird dieser Subtyp in Niere, Herz, Leber und Skelettmuskel exprimiert (Valentin *et al.*, 2000b).

Die **sPLA₂-XII** ist 19 kDa groß und wird im Menschen im Herz, Skelettmuskel, Niere und Pankreas exprimiert (Gelb *et al.*, 2000). In der Maus wurden zwei Spleiß-Varianten, die sPLA₂-XIIA und sPLA₂-XIIB identifiziert, welche unterschiedliche subzelluläre Lokalisation aufweisen (Ho *et al.*, 2001). Bis auf die katalytische Domäne zeigt dieser Subtyp kaum Homologie zu den anderen Enzymen (Gelb *et al.*, 2000; Ho *et al.*, 2001).

In der folgenden Tabelle 1-2 werden beispielhaft zur Demonstration der Vielfältigkeit der PLA₂-Enzyme die Eigenschaften und chromosomale Lokalisation der murinen sPLA₂- und cPLA₂-Enzyme dargestellt.

| Familie | Enzym | Haupt-Lokalisationsort | Größe (kDa) | Ca ²⁺ -Abhängigkeit | Chromosom |
|-------------------|-------|---|----------------|--------------------------------|-----------|
| sPLA ₂ | IB | Pankreas, Lunge, Magen | 14,1 | mM | 5 |
| | IIA | Lunge, Darm, Magen, Milz, Leber, entzündliches Gewebe, Tränenflüssigkeit | 13,9 | mM | 4 |
| | IIC | Testis | 14,6 | mM | 4 |
| | IID | Milz, Lunge, Pankreas, Thymus | 14,2 | mM | 4 |
| | IIE | Uterus, Testis, Haut, Niere | 14,4 | mM | 4 |
| | llF | Testis, Embryo | 16,8 | mM | 4 |
| | V | Darm, Lunge, Herz, Makrophagen, Niere | 13,8 | mM | - |
| | х | Milz, Testis, Leukozyten, Verdauungsorgane, Serum | 13,9 | mM | 16 |
| | XII | Herz, Niere, Skelettmuskel | 18,7 | μΜ | - |
| | | Niere, Herz, Leber | 55,3 | mM | - |
| cPLA ₂ | IVA | ubiquitär | 85 | <µM | |
| | IVB | ubiquitär | 114 | <µM | |
| | IVC | Herz- und Skelettmuskel | 61 | keine | |
| iPLA ₂ | VI | Skelettmuskel | 85 | keine | |

Tabelle 1-2: Eigenschaften und chromosomale Lokalisation der murinen sPLA₂- und cPLA₂-Enzyme (nach Touqui und Alaoui-El-Azher, 2001 und Eerola *et al.* 2006).

1.5.2.3 Funktionen der sPLA₂-Enzyme

1.5.2.3.1 Freisetzung von Arachidonsäure

Die Freisetzung von Arachidonsäure (AA) regulierte, initiale ist der und geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Eicosanoid-Biosynthese. Da die $cPLA_2\alpha$ hochselektiv Glycerophospholipiden angreift, welche AA an sn-2 Postion enthalten, spielt sie eine Hauptrolle in der Produktion von Lipid-Mediatoren, vor allem der AA (Leslie et al., 1987; Clark et al., 1991).

Es konnte aber gezeigt werden, dass auch die sPLA₂s die Fähigkeit besitzen, AA freizusetzen. Das Abspalten von Fettsäuren direkt aus Phospholipiden der intakten Plasmamembran ist für die meisten sPLA₂ Subtypen nicht möglich, da die bevorzugten anionischen Substrate wie Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylserin (PS) in der inneren Schicht der Plasmamembran liegen und daher für die Enzyme schlecht zugänglich sind. Die äußere Schicht ist reich an Phosphatidylcholin (PC), wofür die sPLA₂s der Gruppe II keine besonders hohe Affinität zeigen (Singer *et al.*, 2002). Die Subtypen sPLA₂-V und sPLA₂-X zeigen dagegen eine relativ hohe Affinität zu PC und sind in der Lage, Fettsäuren direkt aus der Plasmamembran intakter, unstimulierter Zellen abzuspalten (Murakami *et al.*, 1999 und 2001a; Hanasaki *et al.*, 1999).

Für die Freisetzung von Fettsäuren durch sPLA₂s wurden prinzipiell drei verschiedene Wege beschrieben: der Heparansulfat-Shuttling Weg, der externe Plasmamembran-Weg und der M-Typ-sPLA₂-Rezeptor Weg, welche in Abbildung 1.7 schematisch dargestellt sind.



Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der verschiedenen Wege zur Freisetzung von AAdurch sPLA₂s (nach Kudo und Murakami, 2002).

Der Heparansulfat-Shuttling Weg:

Die Subtypen sPLA₂-IIA, sPLA₂-IID und sPLA₂-IIE setzen Fettsäuren fast ausschließlich über den Heparansulfat-Shuttling Weg frei und auch die sPLA₂-V kann diesen Weg nutzen. Wegen der kationischen Natur dieser Enzyme können sie mit den negativ geladenen Heparansulfatketten der Proteoglycane in der Plasmamembran interagieren (Murakami *et al.*, 1998). Auf diese Weise binden die Enzyme an Glypican, ein Heparan-Proteoglykan. Anschließend werden sie in Calveolae sortiert und nach Zell-Aktivierung durch Endozytose zu perinukleären Membrankompartimenten transportiert (Murakami *et al.*, 1999, 1999a und 2001a). Die durch das Shuttling verursachte Umverteilung der sPLA₂s in intrazelluläre Membrankompartimente ermöglicht den Kontakt mit ihren bevorzugten Phospholipidsubstraten. Zusätzlich wird die Kolokalisation mit den nachfolgenden Enzymen der Eicosanoid-Biosynthese wie den Cyclooxygenasen oder Lipoxygenasen erleichtert. Dies wiederum führt zu einer gesteigerten Eicosanoid-Produktion (Murakami und Kudo, 2004).

Aufgrund ihrer Ladung ist die sPLA₂-X nicht in der Lage, an Heparansulfat zu binden und kann somit über diesen Weg keine Fettsäuren freisetzen (Hanasaki *et al.,* 1999).

Der externe Plasmamembran-Weg:

Wie oben erwähnt können die Subtypen sPLA₂-V und sPLA₂-X unabhängig von Heparansulfat Arachidonsäure und Lysophosphatidylcholin (LPC) von der PC-reichen Plasmamembran abspalten. Die sPLA₂-X zeigt die höchste Affinität zu PC und erreicht somit auch die höchste Freisetzung von Arachidonsäure (AA) direkt aus der Plasmamembran (Hanasaki *et al.*, 1999; Murakami *et al.*, 1999).

Die sPLA₂-V kann über den Heparansulfat-Shuttling-Weg oder auch über den externen Plasmamembran-Weg AA freisetzen, da er sowohl Affinität für Heparansulfat (Murakami *et al.*, 1999, 1999a und 2001a), als auch für Phosphatidylcholin aufweist (Han *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2001). Die sPLA₂-V kann nur die Membranen von nicht-adhärenten Zellen wie Neutrophilen angreifen (Han *et al.*, 1999), wogegen die sPLA₂-X auch Fettsäuren aus der Plasmamembran von adhärenten Säugerzellen freisetzt (Bezzine *et al.*, 2000).

Durch das direkte Angreifen an der Plasmamembran besitzt auch die sPLA₂-IIF die Fähigkeit, AA freizusetzen. Dieser Angriff ist allerdings nur an den "ungeordneten Membranmikrodomänen" (*"pertubed membrane microdomains"*) der Plasmamembran möglich (Murakami et al., 2002). Unter den ungeordneten Membranmikrodomänen versteht man Membranbereiche, die eine veränderte Phospholipid-Asymmetrie aufweisen, wodurch auch anionische Phospholipide in der äußeren Plasmamembran-Schicht auftreten. Diese Phospholipid-Asymmetrie wird z.B. durch die Aktivierung von Zellen aufgrund von entzündungsfördernden Stimuli hervorgerufen, so dass es zur Umstrukturierung der Phospholipid-Zusammensetzung und zur Auflockerung der Plasmamembran kommt. Dies wiederum ermöglicht der sPLA₂-IIF, die keine hohe Affinität zu Phosphatidylcholin besitzt, mit ihrer C-terminalen Verlängerung an die Plasmamembran zu binden, Phospholipide der inneren Schicht anzugreifen und aus diesen Fettsäuren abzuspalten (Kudo und Murakami, 2002).

Der sPLA₂ M-Typ -Rezeptor-Weg:

Die sPLA₂-IB kann weder über den Heparansulfat-Shuttling-Weg noch über den externen Plasmamembran-Weg Arachidonsäure (AA) freisetzen, da sie sowohl für Heparansulfat als auch für PC nur eine sehr geringe Affinität aufweist (Murakami *et al.*, 2001a). Trotzdem kann die sPLA₂-IB indirekt über die Bindung an den M-Typ sPLA₂-Rezeptor (MTR) die Freisetzung von AA initiieren (Ancian *et al.*, 1995; Lambeau und Lazdunski, 1999). Über einen Rezeptor-vermittelten Signalweg wird entweder die cPLA₂ α aktiviert (Huwiler *et al.*, 1997; Fonteh *et al.*, 2000) oder aber die Expression der sPLA₂-IIA induziert, welches die Freisetzung von AA zur Folge hat (Kishino *et al.*, 1994). Die Bindung der sPLA₂-IB an den MTR ist unabhängig von ihrer katalytischen Aktivität. Der Aufbau und die Funktion des MTR sowie die Bindungseigenschaften der verschiedenen sPLA₂-Subtypen an diesen Rezeptor werden in einem späteren Kapitel ausführlich besprochen.

1.5.2.3.2 Weitere physiologische und pathophysiologische Funktionen der sPLA₂s

Neben ihrer Aufgabe, Arachidonsäure als Substrat für die Eicosanoid-Biosynthese zu liefern, üben sPLA₂s aufgrund ihres variierenden Expressionsmusters in Geweben und Organen weitere vielfältige physiologische sowie pathophysiologische Funktionen aus.

Unter physiologischen Bedingungen scheint die Hauptaufgabe der sPLA₂-IB die Spaltung von Nahrungsphospholipiden in der Pankreasflüssigkeit zu sein. Aber auch eine Funktion bei der Zellmigration und Zellproliferation konnte diesem Subtyp zugeordnet werden (Kundu und Mukherjee, 1997; Arita *et al.*, 1991; Kishino *et al.*, 1994). Eine sehr wichtige physiologische Rolle der sPLA₂-IIA ist ihre antibakterielle Wirkung, wobei sie gegen Grampositive Bakterien am effektivsten wirkt. Wegen ihrer Präferenz zu Phosphatidylglycerin kann sie gut an der anionischen Bakterienmembran, die hauptsächlich aus diesem Phospholipid besteht, angreifen und sie zerstören (Foreman-Wykert *et al.*, 1999). Durch ihre Präsenz, z.B. in der Tränenflüssigkeit spielt sie eine wichtige Rolle in Abwehrmechanismen gegen Bakterien (Qu und Lehrer, 1998).

Auch pathophysiologisch spielen sPLA₂s eine wichtige Rolle. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit entzündlichen Krankheiten der sPLA₂-Spiegel in den Extrazellulärflüssigkeiten dramatisch erhöht ist. Es wurden hohe Konzentrationen der sPLA₂-IIA im Serum von Patienten mit septischen Schock (Vadas und Pruzanski, 1993) oder in der Synovialflüssigkeit bei Patienten mit rheumathoider Athritis nachgewiesen (Seilhammer et al., 1989). Dagegen wurde bei akuter Pankreatitis ein erhöhter Spiegel der sPLA₂-IB detektiert (Nevalainen *et al.*, 1985). Aber auch bei anderen Krankheitsbildern wie Morbus Crohn, bronchiales Asthma, Atherosklerose, Krebs oder Psoriasis konnte den sPLA₂s eine entscheidenede Rolle zugewiesen werden (Haapamaki *et al.*, 1998; Bowton *et al.*, 1997; Sartipy *et al.*, 2000; Morioka *et al.*, 2000; Haas *et al.*, 2005)

1.5.2.3.3 Die Rolle der sPLA₂s in der Säuger-Niere

In der Niere, speziell in den glomerulären Mesangiumzellen wurde hinsichtlich ihrer Regulation und Funktion bisher vorwiegend die sPLA₂-IIA untersucht. Nach Stimulation der Zellen mit proinflammatorischen Zytokinen, wie z.B. Interleukin-1 wird sie auf transkriptioneller Ebene induziert und als Protein aus sekretorischen Vesikeln in der Extrazellularraum freigesetzt (Pfeilschifter, 1995). Während einer Pankreatitis konnten erhöhte Spiegel der sPLA₂-IIA in der Niere nachgewiesen werden, was weiterführend zu einem multiplen Organversagen führen kann (Nevalainen *et al.*, 1999; Patrick *et al.*, 2001). In Mesangiumzellen der Ratte konnte gezeigt werden, dass exogen zugeführte sPLA₂-IIA die MAPK-Kaskade stimuliert und dies zu einer frühen Aktivierung der cPLA₂ α und damit zur Eicosanoid-Biosynthese führt (Suguira *et al.*, 1995; Huwiler *et al.*, 1997). Dies wird als *"cross-talk"* zwischen sPLA₂ und cPLA₂ bezeichnet.

Auch die sPLA₂-IB konnte in der Niere bei Pankreatitis-Erkrankten nachgewiesen werden (Nevalainen *et al.*, 1999; Uhl *et al.*, 1997). Des Weiteren liegt im Plasma von Patienten mit chronischem Nierenversagen eine 10fach erhöhte Menge dieses Subtyps vor (Peuravuori *et al.*, 1993). Dies deutet darauf hin, dass auch die sPLA₂-IB an pathophysiologischen Prozessen beteiligt ist. Ebenso wie die exogene Stimulation mit der sPLA₂-IIA kann auch die Behandlung von Ratten-Mesangiumzellen mit exogener sPLA₂-IB zu einer Stimulation der MAPK-Kaskade und zur Aktivierung der cPLA₂ α führen (Huwiler *et al.*, 1997), wobei dies unabhängig von ihrer katalytischen Aktivität vermittelt wird (Kishino *et al.*, 1995). Des Weiteren wurde gezeigt, dass durch die exogen sPLA₂-IIA in diesen Mesangiumzellen über die Aktivierung des Peroxisom-Proliferatoraktivierte Rezeptors α (PPAR α) potenziert werden kann. Dieser Effekt scheint durch die Bindung der sPLA₂-IB an den M-Typ-Rezeptor vermittelt zu werden (Beck *et al.*, 2003).

Zur Funktion der anderen sPLA₂-Enzyme in der Niere ist weit weniger bekannt. Der Grund hierfür ist, dass bis vor kurzem keine spezifischen Antikörper und Inhibitoren zur Verfügung standen, um Studien zur Aufklärung der Rolle der verschiedenen neuen sPLA₂s in physiologischen und pathophysiologischen Prozessen insbesondere in der Niere durchzuführen.

1.6 Der sPLA₂ M-Typ-Rezeptor

Bisher wurden zwei Typen von sPLA₂ Rezeptoren näher beschrieben: der N-(neuronal)-Typ-Rezeptor und der schon erwähnte M-(*"muscle"*)-Typ-Rezeptor (MTR).

Zur Charakterisierung des N-Typ-Rezeptors wurde *Oxyuranus scutellatus 2* (OS₂), eine neurotoxische sPLA₂, isoliert aus dem Gift der Taipanschlange, als hoch affiner Ligand verwendet. Der Rezeptor wird vorwiegend in neuronalem Gewebe exprimiert und spielt wahrscheinlich eine entscheidende Rolle bei den von sPLA₂s vermittelten neurotoxischen
Effekten (Lambeau *et al.*, 1989). Die Subtypen sPLA₂-IB und –IIA binden nur mit sehr geringer Affinität an diesen Rezeptortyp und spielen daher als endogene Liganden keine physiologische Rolle (Lambeau und Lazdundski, 1999).

Der M-Typ-Rezeptor (MTR) wurde zuerst in Skelettmuskeln identifiziert, wird aber auch in vielen anderen Geweben exprimiert (Hanasaki und Arita, 1999a). Er weist eine signifikante Homologie zum Mannoserezeptor von Makrophagen auf, welcher an der Endozytose von Glykoproteinen beteiligt ist (Taylor *et al.*, 1990). Der MTR ist ein Typ-1 transmembranes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 180 kDa. Der größte Teil des Proteins, welcher das cysteinreiche N-terminale Ende, eine Fibronectin TypII Domäne und acht *"Carbohydrate Recognition"*-Domänen (CDR) enthält, liegt extrazellulär. Ausschließlich das kurze C-terminale Ende liegt intrazellulär vor (Hanasaki und Arita, 2002; siehe Abb.1.8).



Abbildung 1.8: Schematische strukturelle Darstellung des M-Typ-Rezeptors (nach Valentin und Lambeau, 2000).

Die Bindungseigenschaften der verschiedenen sPLA₂-Subtypen an den MTR sind sehr spezies-spezifisch. In der Maus und der Ratte wurde die sPLA₂-IB als endogener Ligand identifiziert, welcher mit hoher Affinität an den Rezeptor bindet. Dagegen weist dieser Subtyp im humanen System nur eine sehr niedrige Affinität zum MTR auf. Auch die sPLA₂-IIA ist in der Maus ein affiner Ligand, besitzt aber eine 10fach niedrigere Affinität zum Rezeptor als die sPLA₂-IB (Cupillard *et al.*, 1999). Ebenfalls als hoch-affiner Ligand wurde die murine sPLA₂-X identifiziert (Yokota *et al.*, 2000). Dabei zeigt sich aber, dass das Proenzym eine schwächere Bindung aufweist als die reife Form. So ist das Abspalten des Propeptids für das hoch-affine Bindungsverhalten notwendig. Dies wurde ebenfalls für die sPLA₂-IB nachgewiesen (Kennedy *et al.*, 1995). Die sPLA₂-IID kann trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit zur sPLA₂-IIA nicht an den MTR binden (Valentin *et al.*, 1999).

In verschiedenen Zellsystemen konnten Rezeptor-vermittelte Effekte der sPLA2-IB unabhängig von ihrer katalytischen Aktivität beobachtet werden, wie z.B. Zellproliferation, Zellmigration, Hormon-Ausschüttung und Eicosanoid-Produktion (Hanasaki und Arita, 2002). M-Typ-Rezeptor-knockout-Mäuse zeigten bei einem LPS-induzierten endotoxischen Schock eine signifikant höhere Überlebensrate. Auch die Plasmaspiegel von TNF α und IL-1 β sind nach LPS-Gabe in den Rezeptor-defizienten Mäusen wesentlich niedriger im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. Dies deutet an, dass der MTR eine Rolle bei der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen während des endotoxischen Schocks spielt (Hanasaki et al., 1997). Außerdem besitzt der MTR auch endozytotische Fähigkeiten und kann sPLA₂-Liganden internalisieren und degradieren. Durch das "Wegfangen" der sPLA₂s aus der Extrazellularflüssigkeit wird ihre enzymatische Aktivität unterbunden (Yokota et al., 2001). Neben dem membrangebundenem Rezeptor wurde außerdem ein löslicher, zirkulierender Rezeptor nachgewiesen. Dieser besitzt alle sPLA2-Bindungseigenschaften und kann durch das Wegfangen zirkulierender sPLA₂-IB und -X deren pathophysiologische Funktionen blockieren (Higashino *et al.*, 2002).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Sekretorische Phospholipasen A2 können aufgrund ihrer Fähigkeit, Fettsäuren aus Phospholipiden freizusetzen, Lipidmetabolite produzieren oder Signaltransduktionswege über den spezifischen sPLA₂ M-Typ-Rezeptor aktivieren. Insbesondere die Freisetzung von Arachidonsäure durch die sPLA₂s stellt ein wichtiges Ereignis dar, da diese als Substrat für eine langanhaltende. erhöhte Prostaglandin-Biosynthese dient. Prostaglandine haben in der Niere nicht nur eine wichtige physiologische Funktion sondern spielen bei der Entstehung und Progression entzündlicher Nierenerkrankungen wie der Glomerulonephritis eine wichtige Rolle. Da eine erhöhte Genexpression und Sekretion von sPLA₂s ein frühes Ereignis in entzündlichen Erkrankungen der Niere darstellt, sollen die Untersuchungen dieser Arbeit dazu beitragen, die Funktion der sPLA₂s als proinflammatorische Enzyme aufzuklären.

Die Untersuchungen wurden an glomerulären Mesangiumzellen aus der Maus durchgeführt, da dieser Zelltyp bei entzündlichen Nierenerkrankungen wie der Glomerulonephritis eine zentrale Rolle spielt. Da bei Beginn dieser Arbeit noch keine Daten zum Expressionmuster der verschiedenen sPLA₂ Subtypen in Maus-Mesangiumzellen vorlagen, sollte dies durch umfassende Analysen erstellt werden. Da für nahezu alle Antikörper der verschiedenen murinen sPLA₂-Subtypen zur Verfügung

25

standen, konnten diese Untersuchen sowohl auf mRNA-Ebene mittels semiquantitativer und quantitativer PCR, als auch auf Proteinebene mittels Western-Blot-Analyse durchgeführt werden. Um Unterschiede in der Expression der vorhandenen Subtypen unter entzündlichen Bedingungen auszumachen, wurden die Mausmesangiumzellen mit einer Kombination aus proinflammatorischen Zytokinen (Interleukin-1 β , Tumornekrosefaktor α und Interferon γ) behandelt, um *in-vitro* eine Entzündungsreaktion zu simulieren. Außerdem sollte untersucht werden, ob extrazelluläre sPLA₂s potentiell an der Produktion von Zytokinen und an der Zytokin-induzierten Signaltransduktion beteiligt sein könnten.

Dass auch der MTR eine Rolle bei der Entzündungsreaktion spielt, zeigten Studien von Hanasaki *et al.* (1997), bei denen MTR-knockout-Mäuse nach Behandlung mit Lipopolysaccharid (LPS) eine verringerte Mortalität sowie erheblich reduzierte Plasmaspiegel an IL-1 β und TNF α aufwiesen. Um die Rolle des MTR in zellulären Entzündungsreaktionen untersuchen zu können, wurden Mesangiumzellen aus MTRknockout-Mäusen als Modellsystem verwendet. Durch die Behandlung dieser Zellen mit exogen zugesetzten rekombinanten sPLA₂s sollte untersucht werden, ob intrazelluläre Effekte der sPLA₂s in Abwesenheit des Rezeptors auftraten. Zum Vergleich wurden aus den Wildtyp-Mäusen isolierte Mesangiumzellen entsprechend behandelt.

Die Untersuchungen dieser Arbeit sollen dazu beitragen, die Wirkungsweise der sPLA₂s als proinflammatorische Enzyme sowie die Funktion des MTR besser zu verstehen, um spezifische Inhibitoren oder sPLA₂-Rezeptor-Antagonisten als therapeutisch relevante Substanzen in Entzündungsprozessen etablieren zu können.

2 Material

2.1 Chemikalien

Aceton Acrylamid/biacrylamid Lösung Ammoniumpersulfat (APS) Ampicillin Bacto-Trypton Bacto-Hefe Extrakt Bacto-Agar Bromphenolblau Calciumchlorid (CaCl₂) Chlorophorm Coomassie Brilliant Blau R250 Dextransulfat Natriumsalz Diethylpyrokarbonat (DEPC) Dimethylsulfoxid (DMSO) **DL-Dithiothreitol (DTT)** Ethanol Ethidiumbromid Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Ethylen-glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA) Ficoll Formaldehyd Formamid Gelatine Glycerin Glycin HEPES (pH 7,9) **IGEPAL Ca630** Isopropanol Isopropylthiogalaktosid (IPTG) Kaliumchlorid (KCI)

Merck, Darmstadt Roth, Karlsruhe Sigma Aldrich, Deisenhofen Sigma Aldrich, Deisenhofen Gibco Life Technologies, Karlsruhe Gibco Life Technologies, Karlsruhe Gibco Life Technologies, Karlsruhe Sigma Aldrich, Deisenhofen Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Applichem, Darmstadt Roth, Karlsruhe Sigma Aldrich, Deisenhofen Sigma Aldrich, Deisenhofen Sigma Aldrich, Deisenhofen Merck, Darmstadt Sigma Aldrich, Deisenhofen Applichem, Darmstadt Applichem, Darmstadt Sigma Aldrich, Deisenhofen Fluka, Seelze

Sigma Aldrich, Deisenhofen Fluka, Seelze Merck, Darmstadt Bio-Rad, München Roth, Karlsruhe Merck, Darmstadt Roth, Karlsruhe Sigma Aldrich, Deisenhofen Fluka, Seelze Roth, Karlsruhe Merck, Darmstadt

| Leupeptin |
|---|
| β-Mercaptoethanol |
| Methanol |
| MOPS |
| Natriumacetat |
| Natriumchlorid (NaCl) |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) |
| di-Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat |
| (Na ₂ HPO4xH ₂ O) |
| Natriumhydroxid (NaOH) |
| N-Naphtyethylendiamin-Dihydrochlorid |
| N´-N´-Tetramethylethylendiamin (TEMED) |
| Paraformaldehyd |
| Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) |
| Polyvinylpyrolidon |
| Sulfamilamid |
| Trichloressigsäure (TCA) |
| Tris |
| Triton-X 100 |
| Tween 20 |
| 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β- |
| D-Galactopyranosid (X-Gal) |
| Xylol |

Sigma Aldrich, Deisenhofen Sigma Aldrich, Deisenhofen Fluka, Seelze Roth, Karlsruhe Fluka, Seelze Merck, Darmstadt Sigma Aldrich, Deisenhofen

Sigma Aldrich, Deisenhofen Roth, Karlsruhe Sigma Aldrich, Deisenhofen Sigma Aldrich, Deisenhofen Applichem, Darmstadt Roche Biochemicals, Mannheim Sigma Aldrich, Deisenhofen Sigma Aldrich, Deisenhofen Merck, Darmstadt Roth, Karlsruhe Sigma Aldrich, Deisenhofen Sigma Aldrich, Deisenhofen

Roth, Karlsruhe Applichem, Darmstadt

2.2 Molekularbiologische Reagenzien und Kits

| ABI-PrismTM Dye Terminator Cycle | Applied Biosystems, |
|----------------------------------|----------------------|
| Sequenzing Kit | Warrington, UK |
| Agarose | Eurogentec, Köln |
| DNA aus Heringssperma | Roche, Mannheim |
| DNA Molekulargewichtsmarker | |
| (100 bp Marker) | Sigma Aldrich, Deise |
| DNase I | Roche Biochemicals |
| Nukleotid-Triphosphate (dNTP) | Sigma Aldrich, Deise |
| Oligonucleotide-(dT)15 Primer | Promega, Mannhein |

enhofen s, Mannheim enhofen n

Qiaquick Qiagen Gel Extraction Kit Qiagen Plasmid Mini Kit Rediprime TM II Red Taq DNA Polymerase Restriktionsenzym Eco RI Superscript II RNase H-RT TOPOTM TA-Cloning Kit Trizol® Reagenz Kit SYBR Green Qiagen, Hilden Qiagen, Hilden Amersham, Freiburg Sigma, Deisenhofen Roche, Mannheim Gibco, Karlsruhe Invitrogen, Groningen (NL) Sigma Aldrich, Deisenhofen Qiagen, Hilden

2.3 Oligonukleotide

2.3.1 Primer für die Realtime-PCR

Tabelle 2-1: Primer der Realtime-PCR für die Maus

| Maus | Primer 1 (sense) 5´-3´-Richtung | Primer 2 (antisense) 3´-5´-Richtung | Länge des Amplikons |
|-------------------------|------------------------------------|--|------------------------|
| sPLA ₂ -IB | CCCCAGTGGACGACTTAGACA | TCCAGCTTCTTGGCCTGACT | 69bp |
| sPLA ₂ -IIC | TTGCCATCTTCCTTGTCTTCATC | CATCCTCTGGAACTGCCAGAA | 73bp |
| sPLA ₂ -IID | ATCTCCCAGGGCACTATCCA | CCTCCTTGTCACAAGCACACA | 75bp |
| sPLA ₂ -IIE | CCCAAGCTGGAAAAGTACCTCTT | CGCTGGCAAGCCGTTCT | 73bp |
| sPLA ₂ -IIF | TCAGGGCCTCTCCCTCTAAAA | GGACTGCGATGGCAAAGAAT | 68bp |
| sPLA ₂ -III | TGGCCCAAAACATCAAAGTG | GGCTTGATCTGGTGCTCACA | 77bp |
| sPLA ₂ -V | CCCCAAGGATGGCACTGAT | GCACAGTCTTTTTCCTCCAGTTG | 74bp |
| sPLA ₂ -X | GGCTGTTATTGTGGCCTTGGT | TCCTGAGCCCGAGAGTAGCA | 94bp |
| sPLA ₂ -XIIA | CGCTCGGACTATCTCAGAACGT | AAATGGATGACGCTGTCAAAGA | 72bp |
| sPLA ₂ -XIIB | CTGGGCTTTGTCTCCAACGT | GGTCCACACGGTGTTGAACA | 71bp |
| M-Typ Rezeptor | AGGGCATCGCCCAAGATT | CGCTCTGGATAATGAAAATTCCTT | 80bp |
| cPLA ₂ | CAGCTCTCAGGATTCCTTCGA | TCATATATTCGTTCAAATTCATCTGGAT | 110bp |
| iPLA ₂ | TCCATGAGTACAATCAGGACATGA | AGAAACGACTATGGAGAGTTTCTTCAC | 73bp |
| MIP-2 | CACTGCGCCCAGACAGAAG | AACTTTTTGACCGCCCTTGAG | 50bp |
| COX-1 | CAGACCACTCGCCTCATCCT | GCACATACTCCTCAATGACAATTTTG | 60bp |
| COX-2 | CCCTGAAGCCGTACACATCA | TGTCACTGTAGAGGGCTTTCAATT | 80bp |
| GAPDH | TGGCATTGTGGAAGAACTCA | CGAGTACCAGGGAGATTTT | 77bp |

Alle verwendeten Oligonucleotid-Primer für die Real-Time PCR stammen von der Firma Proligo France SAS, Paris, Frankreich. Die Stocklösungen (100μM) wurden vor Gebrauch 1:100 mit H₂O verdünnt (Arbeitslösung 1μM). Beide Lösungen wurden bei -20 °C gelagert.

2.3.2 Primer für die Reverse Transkriptase (RT)-PCR

| Maus | Primer 1 (sense) 5´-3´-Richtung | Primer 2 (antisense) 3´-5´-Richtung | Länge des Amplikons |
|-------------------------|------------------------------------|--|------------------------|
| sPLA ₂ -IB | ACCCCAGTGGAGGACTTAGA | TCACGGTCACAGTTGCAGAT | 197bp |
| sPLA ₂ -IIC | CCGGGATCCTAGAAAACACA | TGTCCCGAACATCCTCCTTC | 200bp |
| sPLA ₂ -IID | GAACCACCGGCCTAATTACA | GATGAAGGTAGGCTGGGTCA | 200bp |
| sPLA ₂ -IIE | CCTGCGAGTGTGACAAGAGA | ATGAGTCTGCTGGGAGAGGA | 206bp |
| sPLA ₂ -IIF | AACACTCCACTGGACGGAAG | GTAGCCCACAAAGGACAGGA | 203bp |
| sPLA ₂ -III | CTGCAAGTAACCCAGGCAAT | CCTTGAGGTTCCTTCCATCA | 200bp |
| sPLA ₂ -V | CTCACACTGGCTTGGTTCCT | CATAACAACGGTGGTGCATC | 202bp |
| sPLA ₂ -X | GTGACGAGGAGCTGGCTTAC | CTTGGACTCCGGTGACTCTC | 199bp |
| sPLA ₂ -XIIA | GGGCAGGAACAGGACCAGACCA | GGTTTATATCCATAGCGTGGA | 179bp |
| sPLA ₂ -XIIB | CCACAGTGGTCCTGGGAAGTAA TGGG | GGTTTATATCCATAGCGTGGAA CAGG | 123bp |
| M-Typ Rezeptor | CTCTCTGTGCCCTCATGTCAAG | GAGCATTCAACCAAACCATCTG | 758bp |
| cPLA ₂ | GTTTGTTCATGCCCAGACCT | ATCCCCGACTCATACAGTGC | 239bp |
| iPLA ₂ | CCGTATGAAGGACGAGGTGT | CGGTGGCTTCAGGTTAATGT | 241bp |
| MIP-2 | AGTGAACTGCGCTGTCA | TCCAGGTCAGTTAGCCT | 216bp |
| COX-1 | ACAGTATCACCTGCGGCTCT | GAAGCCAGATCGTGGGAAG | 200bp |
| COX-2 | CCCCCACAGTCAAAGACACT | AGTTGCTCATCACCCCACTC | 196bp |
| GAPDH | ACCACAGTCCATGCCATCAC | TCCACCACCCTGTTGCTGTA | 452bp |

Tabelle 2-2: Primer der RT-PCR für die Maus

Tabelle 2-3: Primer der RT-PCR f Gr in Ratte

| Ratte | Primer 1 (sense) 5´-3´-Richtung | Primer 2 (antisense) 3´-5´-Richtung | Länge des Amplikons |
|-----------------------|------------------------------------|--|------------------------|
| sPLA ₂ -IB | CCTCGCCAAGATGAAACTCC | CGGTGCAGAAATAAGACAGC | 513bp |
| M-Typ- Rezeptor | TGCACCCTGGCTCTTCTATCA | CGCATCGCTTTCTCTGGCTAT | 304bp |
| GAPDH | ACCACAGTCCATGCCATCAC | TCCACCACCCTGTTGCTGTA | 452bp |

Alle verwendeten Oligonucleotid-Primer für die RT PCR stammen von der Firma Invitrogen, Groningen (NL). Die Stocklösungen (1µg/µl) wurden vor Gebrauch 1:20 mit TE-Puffer verdünnt (Arbeitslösung 50 ng/µl). Beide Lösungen wurden bei -20 ℃ gelagert.

2.4 Radiochemikalien

| 5΄[α- ³² Ρ]-dCTP, | |
|--|-------------------------------|
| spezifische Aktivität 37 MBq/mmol | Amersham, Braunschweig |
| [¹²⁵ -I] spezifische Aktvität 3.7 Gbq/ml | Perkin Elmer LS, Courtaboeuf, |
| | Frankreich |
| [1-C ¹⁴] -Ölsäure-markierte <i>E.coli</i> -Membranen | Biotrend, Köln |

2.5 Immunologische Reagenzien und Kits

| Bradford-Reagenz |
|--|
| CD-4-Isolierungs-Kit |
| ECL Reagenz System |
| Magermilchpulver |
| Maus MIP-2 Quantakine ELISA Kit |
| Full Range Rainbow Molekulargewichtsmarker |
| PGE2 Enzym-Immunoassay Kit |
| $PGF_{1\alpha}$ Enzym-Immunoassay Kit |
| Rinderserum-Albumin (BSA) |
| Ziegenserum |

Roth, Karlsruhe Miltony Biotec, Bergisch-Gladbach Amersham Pharmacia, Freiburg Fluka, Seelze R&D Systems, Wiesbaden Amersham Pharmacia, Freiburg Bio Trend, Köln Bio Trend, Köln Sigma Aldrich, Deisenhofen Santa Cruz, Heidelberg

2.6 Antikörper

2.6.1 Erst-Antikörper

| anti- β -Aktin (Maus, monoklonal) | ICN, Eschwege |
|--|-----------------------------------|
| anti-" <i>smooth-muscle"-</i> Aktin (Maus, monoklonal) | Sigma Aldrich, Deisenhofen |
| anti-Zytokeratin (Maus, mmonoklonal) | Sigma Aldrich, Deiesenhofen |
| anti-Maus sPLA ₂ (Kaninchen, polyklonal) | |
| sPLA ₂ -IB, sPLA ₂ -IID, sPLA ₂ -IIE, | |
| sPLA ₂ -V, sPLA ₂ -X | zur Verfügung gestellt von Dr. G. |

Lambeau, Sophia-Antipolis Valbonne, Frankreich

| sPLA ₂ -Prä-Immunserum (Kaninchen) | |
|--|--|
| sPLA ₂ -IB, sPLA ₂ -IID, sPLA ₂ -IIE, | |
| sPLA ₂ -V, sPLA ₂ -X | zur Verfügung gestellt von Dr. G. |
| | Lambeau, Sophia-Antipolis |
| | Valbonne, Frankreich |
| anti-Maus sPLA ₂ M-Typ-Rezeptor | |
| (Kaninchen, polyklonal) | zur Verfügung gestellt von Dr. G. |
| | Lambeau, Sophia-Antipolis |
| | Valbonne, Frankreich |
| anti-Ratte sPLA2-IB (Kaninchen, polyklonal) | zur Verfügung gestellt von Dr. T |
| | Nevalainen, Univerity of Turku, |
| | Finnland |
| anti-Ratte HIS-48 (Kaninchen, polyklonal) | zur Verfügung gestellt von Dr. P. |
| | Heeringa, Maastricht, Niederlande |
| anti-Ratte ED-1 (Kaninchen, polyklonal) | zur Verfügung gestellt von Dr. P. |
| | Heeringa, Maastricht, Niederlande |
| anti-Maus iNOS N-treminal | |
| (Kaninchen, polyklonal) | zur Verfügung gestellt von Prof. J. |
| | Pfeilschifter, Institut für Allgemeine |
| | Pharmakologie, Uniklinikum, |
| | Frankfurt |
| anti-Maus COX-1 (Kaninchen, polyklonal) | Santa Cruz, Heidelberg |
| anti-Maus COX-2 (Ziege, polyklonal) | Santa Cruz, Heidelberg |
| anti-Thy1.1 Klon OX-7 (monoklonal) | European Collection of Animal Cell |
| | Cultures, Salisbury, England |

2.6.2 Zweit-Antikörper

2.6.2.1 Zweit-Antikörper für Western-Blot Analyse

| Meerrettich-Peroxidase-gekoppeltes | |
|------------------------------------|------------------------------|
| Esel-anti-Kaninchen IgG | Amersham Pharmacia, Freiburg |
| Meerrettich-Peroxidase-gekoppeltes | |
| Schaf-anti-Maus IgG | Amersham Pharmacia, Freiburg |

Meerrettich-Peroxidase-gekoppeltes Esel-anti-Ziege IgG

Santa Cruz, Heidelberg

2.6.2.2 Zweit-Antikörper für Immunfluoreszenz

| Alexa 488-gekoppeltes Ziege- | |
|------------------------------|-----------------------------|
| anti-Kaninchen IgG | Molecular Probes, Göttingen |
| Alexa 488-gekoppeltes Ziege- | |
| anti-Maus IgG grün | Molecular Probes, Göttingen |

2.7 Medien und Substanzen für die Zellkultur

2.7.1 Medien und Medienzusätze

RPMI 1640 Medium + GlutaMAX I Nicht-essentielle Aminosäuren (100x) Penicillin-Streptomycin 10.000 U/ml HEPES 1M Fötales Kälberserum β-Mercaptethanol 10 mM Insulin-Transferrin-Natriumselenit (ITS) D-MEM + 4500 mg/l Glucose + GlutaMAX I - Pyruvat Rinder-Insulin

2.7.2 Substanzen

| Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) | |
|--------------------------------------|------------------------------------|
| ohne CaCl ₂ | Gibco Life Technologies, Karlsruhe |
| Trypsin/ EDTA | Gibco Life Technologies, Karlsruhe |

Gibco Life Technologies, Karlsruhe Gibco Life Technologies, Karlsruhe Gibco Life Technologies, Karlsruhe Gibco Life Technologies, Karlsruhe Biochrom, Berlin Sigma Aldrich, Deisenhofen Roche, Mannheim

Gibco Life Technologies, Karlsruhe Sigma Aldrich, Deisenhofen

2.8 Zelllinien

murine Mesangiumzellen aus Wildtyp (C57BL/6) und sPLA₂ M-Typ-Rezeptorknockout Mäusen

Primäre Ratten-Mesangiumzellen

Ratten-Endothelzellen

zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. A. Huwiler, Institut für Allgemeine Pharmakologie, Uniklinik, Frankfurt zur Verfügung gestellt von Prof. H. Radeke, Institut für Allgemeine Pharmakologie, Uniklinik Frankfurt zur Verfügung gestellt von Dr. Stahl, Hamburg

2.9 Nierenschnitte

Paraffinschnitte von Nieren aus Wildtyp (C57BL/6) bzw. sPLA₂ M-Typ-Rezeptorknockout Mäuse

Hergestellt von Dr. M. Wagenblast und R.Hanagarth, Zentrale Forschungs-Einrichtung,Uniklinik, Frankfurt am Main

Paraffinschnitte aus Kontrollnieren bzw. Anti-Thy1.1.-induzierter Glomerulonephritis aus der Ratte

zur Verfügung gestellt von Dr. T.Ostendorf, Universität Aachen

2.10 Reagenzien zur Stimulation von Zellen

Tumor Nekrose Faktor-α (TNF-α) Interleukin 1-β (IL-1β) Interferon-γ (IFN-γ) Methyl-Indoxam Knoll AG, Ludwigshafen Cell Concepts, Umkirch PeproTech, London, UK zur Verfügung gestellt von Dr. G. Lambeau, Sophia-Antipolis Valbonne, Frankreich

Pyrrolidin-1

DETA-NONOate NG- Monomethyl-L-Arginin-Monoacetat (L-NMMA) *Oxyuranus scutellatus* Toxin 2 (OS₂)

Indomethacin Rofecoxib

Rekombinante Proteine: sPLA₂-IB (Schwein) sPLA₂-IB (Rind) sPLA₂-IIA (Mensch) sPLA₂-V (Maus) sPLA₂-X (Mensch) zur Verfügung gestellt von Dr. G. Lambeau, Sophia-Antipolis Valbonne, Frankreich Alexis Biochemicals, Grünberg

Alexis Biochemicals, Grünberg

zur Verfügung gestellt von Dr. G. Lambeau, Sophia-Antipolis Valbonne, Frankreich Sigma Aldrich, Deisenhofen zur Verfügung gestellt von Dr. G. Lambeau, Sophia-Antipolis Valbonne, Frankreich

Sigma Aldrich, Deisenhofen Sigma Aldrich, Deisenhofen Roche Biochemicals, Mannheim

zur Verfügung gestellt von Dr. G Lambeau, Sophia-Antipolis, Frankreich

2.11 Sonstige Verbrauchsmaterialien

Polyvinyldifluorid (PVDF)-Membran Genescreen TM Membran Röntgenfilme (HyperfilmTMMP) Whatman 3 MM Papier Zellkulturflaschen / -schalen 6-Loch Platten, 96-Loch-Platte ELISA-Testplatten Zellkulturröhrchen (50 ml, 15 ml) Szintillationsgefäße

Millipore, Eschborn NEN, Köln Amersham Pharmacia, Freiburg Merck, Darmstadt Greiner, Frickenhausen Greiner, Frickenhausen Greiner, Frickenhausen Falcon, Oxnard, USA Becton Dickinson, Heidelberg

2.12 Bakterienmedien

| Luria-Bertani Medium (LB) | 1% Bacto-Trypton | | |
|---------------------------|-------------------------------|--|--|
| | 0,5% Bacto-Hefe Extrakt | | |
| | 1% NaCl | | |
| | 50 µg/ml Ampicillin (nach dem | | |
| | Autoklavieren zugeben) | | |
| | рН 7,4 | | |
| LB-Ampicillin-Agar | LB Medium (ohne Ampicillin) | | |
| | 1,5% Bacto-Agar | | |
| | 50 µl/ml Ampicillin (nach | | |

2.13 Zellkulturmedien

Wachstumsmedium: RPMI 1640 für Mesangiumzellen (500 ml)

+ 12,5 ml HEPES 1 M

dem Autoklavieren zugeben)

pH 7,4

- + 6 ml 100 x MEM nicht essentielle Aminosäuren
- + 6 ml Penicillin-Streptomycin 10.000 U/ml
- + 250µl ITS
- + 225 μ l β -Mercaptoethanol 10 mM
- + 50 ml fötales Kälberserum (10%)

D-MEM für Endothelzellen (500 ml)

- + 50 ml fötales Kälberserum (10%)
- + 6ml Penicillin-Streptomycin 10.000 U/ml
- + 500 μl Insulin (5 mg/ml in PBS/ 2% Essigsäure)

Hungermedium: D-MEM (500 ml)

- + 1ml BSA/PBS (1%)
- + 6 ml Penicillin-Streptomycin 10.000 U/ml
- + 500 μl Insulin (5 mg/ml in PBS/ 2% Essigsäure)

2.14 Reagenzien zur DNA-Analyse

Ethidiumbromid-Stammlösung10 mg/ml Ethidiumbromid in TE-
PufferTris/Acetat/EDTA-Puffer (TAE)2 M Tris(50x)250 mM Natriumacetat
50 mM EDTA (pH 8,0)Tris/EDTA-Puffer (TE)10 mM Tris/HCl
1 mM EDTA (pH 8,0)DNA-Ladepuffer0,2 M EDTA (pH 8,0)
0,2% Bromphenolblau (v/v)
0,2% Xylencyanol (v/v)

2.15 Reagenzien zur RNA-Analyse

| Formaldehyd/Acetat/EDTA-Puffer (FAE) | 400 mM MOPS |
|--------------------------------------|----------------------|
| (10x) | 100 mM Natriumacetat |
| | 10 mM EDTA (pH 8,0) |

FA Proben-Puffer

66% Formamid (v/v) 0,1 mg/ml Ethidiumbromid 8% Formaldehyd (v/v) 0,01% Bromphenolblau (v/v) in 10 x FAE Puffer

| SSC-Puller (20X) | 3 M NaCI |
|---|--|
| | |
| | рн 7,0 |
| FA I-Puffer | 50 mM NaOH |
| | 10 mM NaCl |
| | |
| GS-Puffer (10x) | 25 mM Na₂HPO4 |
| | рН 6,5 |
| Hybridisierungspuffer | 50% Formamid (v/v) |
| , ,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,, | 25% 20xSSC (v/v) |
| | 10% 50x Denhardts (v/v) |
| | 10% SDS (10%) (v/v) |
| | 3 g Dextransulfat Natriumsalz |
| | |
| Denhartds (50x) | |
| | 1% Polyvinylpyrolidon (w/v) |
| | 1% BSA (w/v) |
| Waschpuffer 1 | 5 ml SDS (20%) |
| | 100 ml SSC-Puffer (20x) |
| | ad 1L ddH ₂ O |
| Waaahauffar 9 | 50 ml SDS (20%) |
| waschpuller 2 | $\frac{1}{200} = \frac{1}{200} \left(\frac{20\%}{20\%} \right)$ |
| | |
| | ad 1L ddH2O |

2.16 DEPC-Behandlung von doppelt destilliertem H₂O (ddH₂O)

Zum Ansetzen von Lösungen, die für die Handhabung von RNA benötigt wurden, wurde ddH₂O mit 1 ml DEPC/L behandelt, um RNasen zu inaktivieren. Nach dem Rühren der Mischung über Nacht bei Raumtemperatur wurde das DEPC-H₂O autoklaviert.

2.17 Reagenzien zur Protein-Analyse

Homogenisierungspuffer

20 mM Tris/HCl pH 7,5 1 mM EDTA (pH 8,0) 1 mM EGTA (pH 8,0) 1 mM PMSF 10 μg/ml Leupeptin

2.18 Reagenzien für Immunfluoreszenz/ Immuncytochemie

| Citratpuffer (pH 6,0) | 10 mM Zitronensäure in ddH ₂ O |
|--------------------------|---|
| 10 x PBS | 1,5 M NaCl |
| (pH 7,3) | 30 mM KCl |
| | 60 mM Na₂HPO4 |
| | 15 mM KH₂PO4 |
| Fixierungspuffer | 3% Paraformaldehyd (v/v) in PBS |
| Permeabilisierungspuffer | 1% Triton X-100 (v/v) in PBS |
| Blockpuffer | 1% Ziegenserum (v/v) in PBS |

2.19 Material für Immunfluoreszenz/ Imuncytochemie

| Fluoreszenz-Eindeck-Medium | DAKO, Hamburg |
|----------------------------|----------------------|
| Deckgläser | Menzel, Braunschweig |
| Objektträger | Menzel, Braunschweig |

2.20 Reagenzien für sPLA₂ Aktivitätstest

Puffer I

100 mM Tris/ HCl 10 mM CaCl₂ 0,1% BSA (w/v) pH 8,0 Puffer II

0,1 M EDTA 0,5% BSA (w/v) pH 8,0

2.21 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

| Coomassie Blau | 0,1% Comassie Blau R250 (w/v) |
|---------------------------|-------------------------------------|
| | 50% Isopropanol (v/v) |
| | 10% Essigsäure (v/v) |
| Entfärber für Proteingele | 40% Methanol (v/v) |
| | 6% Essigsäure (v/v) |
| | 54% dd H ₂ O (v/v) |
| Laemmli-Puffer | 0,5 M Tris/HCl pH 6,8 |
| (2x) | 0,3% β -Mercaptoethanol (v/v) |
| | 25 mM DTT |
| | 10% Glycerin (w/v) |
| | 3% SDS (w/v) |
| | 0,01 % Bromphenolblau |
| 10 x PAGE | 25 mM Tris |
| (pH 8,5) | 192 mM Glycin |
| | 1% SDS |
| | ddH ₂ O |
| Sammelgel-Puffer | 0,5 M Tris/HCl pH 6,8 |
| (pH 6,8) | |
| Trenngel-Puffer | 1,5 M Tris/HCl pH 8,8 |
| (pH 8,8) | |

2.22 Western-Blot Analyse

| 1 x PBS |
|--------------------------|
| 0,05% Tween-20 (v/v) |
| 150 mM NaCl |
| 5 mM EDTA (pH 8,0) |
| 50 mM Tris/HCl pH 7,5 |
| 0,05% Triton X-100 (v/v) |
| 0,25% Gelatine (w/v) |
| 25 mM Tris |
| 192 mM Glycin |
| |

2.23 Reagenzien für Bindungsstudien

Bindungspuffer

140 mM NaCl 2 mM CaCl₂ 20 mM Tris/HCl pH7,4 0,1% BSA (w/v)

20% Methanol (v/v)

2.24 Versuchstiere

Wildtyp C57/BL6 MäuseCharles River, SulzfeldWildtyp Wistar-RattenCharles River, Sulzfeld

2.25 Geräte

ABI PrismTM 310 Genetic Analyser Applied Biosystems Applera, Weiterstadt Bakterien-Inkubator Heraeus, Hanau Begasungsbrutschrank BBD 6220 Heraeus, Hanau

| Biofuge fresco | Heraeus, Hanau |
|--|------------------------------|
| Detektionssystem BAS 1500 Fuji Film | Raytest, Straubenhardt |
| Elektrophoresekammer | Bio-Rad, München |
| Eppendorf Mastercycler 5330 | Eppendorf, Hamburg |
| Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 | Zeiss, Göttingen |
| GeneAmp PCR System Thermal Cycler (9700) | Applied Biosystems Applera, |
| | Weiterstadt |
| GeneAmp 5700 Sequence Detection System | Applied Biosystems Applera, |
| | Weiterstadt |
| Gene Quant Pro RNA/DNA Calculator | Amersham Pharmacia, Freiburg |
| Herasafe Sterilbank | Heraeus, Hanau |
| Hyperprocessor (Filmentwickler) | Amersham Pharmacia, Freiburg |
| Inkubator Heraeus BBD 6220 | Heraeus, Hanau |
| Konfokales Laser Scanning Mikroskop (LSM 510) | Zeiss, Göttingen |
| Lichtmikroskop Axiovert 25 | Zeiss, Göttingen |
| Megafuge 1.0 R | Heraeus, Hanau |
| Microplate Reader Benchmark | Bio-Rad, München |
| Packard TriCarb 2100 TR | |
| Liquid Scinillation Analyzer (β - und γ -conter) | GMI, Ramsey, USA |
| UV-Gel Kamera, GelDoc 1000 | Bio-Rad, München |
| UV-Crosslinker (Transilluminator) | Bio-Rad, München |
| Ultraschallbad Transsonic digital S | Bender & Hobein, Singen |
| Ultraturrax T 18 basic | IKA, Staufen |
| Ultrazentrifuge Avanti centrifuge J30I | Beckman, Krefeld |
| Western-Blot-Kammer | Bio-Rad, München |
| | |

2.26 Computer Software

| Bildverarbeitung | Zeiss LSM Image Browser, |
|-----------------------------|------------------------------------|
| | Adobe Photoshop, Corel Photo Paint |
| | 10.0 |
| DNA/Protein-Homologie Suche | BLAST Suche (Nationales Zentrum |
| | für Biotechnologie (NCBI), USA) |
| | URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov |
| Graphiken | Corel Draw 8.0/10.0 |

Präsentationen Primer Design

Statistische Analyse Tabellen Textverarbeitung Power Point 2003 Primer 3: www.genome.wi.mit.edu/cgi bin/primer/primer 3 Sigma Plot 8.0 (Students T-Test) Excel 2003 Word 2003

3 Methoden

3.1 Generieren von genetisch veränderten Mäusen

Die sPLA₂ M-Typ-Rezeptor-(MTR)-knockout-Mäuse wurden uns von Dr. Kohji Hanasaki, Shionogi Research Laboratries, Osaka, Japan zur Verfügung gestellt.

Als Modell wurde der Maus-Stamm C57BL/6 Mäuse verwandt, bei welchen das sPLA₂-IIA Gen natürlicherweise zerstört ist. Die Generierung der MTR-knockout-Maus erfolgte durch das Einfügen eines Neomycin-Resistenz-Gens zwischen ein 3.25 kb *Xbal-Nsi*l Fragment und ein 3.15 kb *Mlul-Eco*RI Fragment, wodurch das MTR-Gen unterbrochen wurde (Schematische Darstellung Abb. 3.1). Dieses Einfügen unterbricht die kodierende Sequenz in Exon I und damit auch das Translations-Start-Codon, was zur Folge hat, dass kein MTR-Protein mehr translatiert werden kann. Die Charakterisierung der MTR-knockout Mäuse erfolgte über Southern-Blot und Northern-Blot Analysen (Hanasaki *et al.*, 1997).





I= Teil der Restriktionskarte des Wildtyp Allels. II= Ziel- Konstrukt. III= Homologes rekombinantes Allel.

3.2 Induktion einer Anti-Thy1.1-Glomerulonephritis in Ratten

Die Tierversuche wurden von Dr. J. und Floege Dr T. Ostendorf, Abteilung Nephrologie und Immunologie, Universität Aachen durchgeführt. Die Anti-Thy1.1-Glomerulonephritis (Bagchus *et al.*, 1986) wurde in männliche Wistar-Ratten induziert. 1 mg Anti-Thy1.1 Antikörper (Klon OX7) pro kg Körpergewicht wurde injiziert und die Ratten nach den Zeitpunkten 0h, 2h, 6h, 24h, 7d oder 14d getötet und die Nieren zur RNA- bzw. Protein-Isolierung oder zur Herstellung von Paraffinschnitten entnommen.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Isolierung und Kultivierung von Zellen

3.3.1.1 Isolierung von Mesangiumzellen

Mesangiumzellen isoliert aus MTR-knockout-Mäusen wie auch aus C57BL/6 Wildtyp Mäusen wurden uns von Prof. A. Huwiler, Institut für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie, Uniklinik Frankfurt zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden nach einem Standardprotokoll (Pfeilschifter *et al.*, 1991) aus Mausnieren isoliert. Die primären Mesangiumzellen aus der Ratte wurden wie unter Radeke *et al.*, 1994 isoliert und kultiviert und uns von Prof. H. Radeke, Institut für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie, Uniklinik Frankfurt zur Verfügung gestellt.

Zusammengefasst, zur Herstellung der Mesangiumzellen wurden je drei Nieren mit Kapsel aus je drei Mäusen isoliert und in 1x PBS gelagert. Nach dem Entfernen des Kapselhäutchens, wurden die Nieren durch ein Stahlsieb (Porengröße 106 μ M, Firma Retsch, Haan) gedrückt und sind folgend durch ein weiteres Stahlsieb (Porengröße 180 μ M) gefallen. Auf dem unterstem Sieb (Porengröße 53 μ M) wurden die Glomerli aufgefangen und nach einmaligem spülen mit 1x PBS in Zellkulturflaschen (75 cm²) mit RPMI- Medium in einer Dichte von 50-60 Glomeruli / cm² ausgelegt. Nach einigen Tagen im Brutschrank (37 °C, 5% CO₂) wachsen Mesangiumzellen aus. Die Kultivierung findet wie unter 3.3.1.2 beschrieben statt.

3.3.1.2 Kultivierung von Mesangiumzellen

Die glomerulären Mesangiumzellen wurden in Wachstumsmedium bis zu einer Dichte von ca. 80% in Zellkulturflaschen (175 cm²) bei 37 °C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2 kultiviert.

Zur Konservierung der Zellen wurden diese einmal mit Phosphat-gepufferter Lösung (PBS) gewaschen und durch die Zugabe von Trypsin/EDTA-Lösung vom Kulturflaschen-Boden abgelöst. Nach einer Inkubationszeit von 5-10 Minuten wurde das Trypsin durch Zugabe von Wachstumsmedium inaktiviert und die Zellen bei 800 Upm für 10 Minuten zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0, Rotor: Heraeus 7570F). Das Pellet wurde in 2 ml FKS Zellen aufgenommen, in Kryoröhrchen überführt (1000 µl/ Gefäß) und für 15 Minuten auf Eis gestellt. Danach wurden tropfenweise 500 µl 20% (v/v) DMSO/FKS zugegeben, die Zellsuspension über Nacht bei -80 ℃ langsam heruntergekühlt und in Flüssigstickstoff bei -190 ℃ dauerhaft gelagert.

Zum Passagieren der Zellen wurden diese einmal mit 1xPBS gewaschen und anschließend mit 5 ml Trypsin/ EDTA-Lösung bei 37 °C für 5 Minuten inkubiert, bis sich die Zellen durch leichtes klopfen von der Fläche der Kulturflache ablösten. Die abgelösten Zellen wurden in 10 ml Wachstumsmedium resuspendiert und dann in einer Verdünnung von 1:8 in neue Zellkulturflaschen ausgesät.

3.3.1.3 Isolierung und Kultivierung von Endothelzellen

Glomeruläre Endothelzellen aus der Ratte wurden uns von Dr. R. Stahl, Hamburg zur Verfügung gestellt. Die Isolierung und Kultivierung erfolgte wie von Wolf *et al.* (1996) beschrieben statt.

3.3.2 Behandlung von glomerulären Mesangiumzellen

Für die Experimente wurden Mesangiumzellen in Zellkulturschalen ausgesät. In Schalen von 3,5 cm Durchmesser wurden 0,15 x 10⁶ Zellen mit 1 ml Wachstumsmedium oder in Schalen von 10 cm Durchmesser 0,5 x 10⁶ Zellen mit 4 ml Wachstumsmedium ausgesät und für 48 Stunden bis zur Subkonfluenz kultiviert. 24 Stunden vor Beginn des Experiments wird das Wachstumsmedium gegen serumfreies Hungermedium ersetzt. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit den in Tabelle 3-1 aufgeführten Substanzen behandelt. Um zu verhindern, dass sich die verwendeten Substanzen an die Zellkulturschale anheften, wurde als Verdünnungslösung 0,1% (w/v) fettsäurefreies BSA in 1x PBS verwendet.

| Substanz | Eigenschaft | Konzentration der Stocklösung | End- konzentration |
|--|-------------------------------|------------------------------------|-----------------------|
| Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) | TH-1-Zytokin | 10 µM in ddH₂O | 0,5nM |
| Interferon γ (IFNγ) | TH-1-Zytokin | 1 μg/10 μl in ddH ₂ O | 5 ng/ml |
| Interleukin 1β (IL-1β) | TH-2-Zytokin | 28,6 μ M in ddH ₂ O | 0,25 nM |
| rekombinante sPLA ₂ -IB (bovin) | | 10 μM in Kristallinlösung | 10-100 nM |
| rekombinante sPLA ₂ -IIA (human) | | 10 μ M in ddH ₂ O | 10-100 nM |
| rekombinante sPLA ₂ -V (murin) | | 10 μ M in ddH ₂ O | 10-100 nM |
| rekombinante sPLA ₂ -X (murin) | | 10 μ M in ddH ₂ O | 3-100 nM |
| Methyl-Indoxam (Me-IDX) | sPLA ₂ - Inhibitor | 10 mM in DMSO | 3 μM |
| Pyrrolidin-1 (PYR-1) | $cPLA_2\alpha$ -Inhibitor | 10 mM in DMSO | 3 μM |
| Astra zeneca-1 (AZ-1) | cPLA ₂ α-Inhibitor | 10 mM in DMSO | 5 µM |
| DETA-NONOate (DETA-NO) | NO-Donor | 50 mM in Medium | 25-250 μM |
| N ^G Monomethyl-L-Arginin Monoacetat (L-NMMA) | iNOS-Inhibitor | 300 mM in Medium | 0,5-3 mM |
| Indomethacin | COX-1-Inhibitor | 10 μM in ddH₂O | 10-100 nM |
| Rofecoxib | COX-2-Inhibitor | 10 μM in ddH₂O | 10-100 nM |

| Tabelle 3-1 | : Stimulatoren | und | Inhibitoren | für | die Zellkul | tur |
|-------------|----------------|-----|-------------|-----|-------------|-----|
| | - Oumulatoren | unu | | iui | | uu. |

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 RNA-Isolierung aus kultivierten Zellen

Die Gesamt-RNA aus murinen Mesangiumzellen wurde durch Nutzung der Trizol[®]-Methode (Sigma Aldrich, Deisenhofen) nach Vorgaben des Herstellers isoliert. Dafür wurden die Zellen nach dem Entfernen des Mediums zweimal mit 1x PBS gewaschen und durch Zugabe von 1 ml Trizol[®]-Reagenz/ 10 cm² Schale lysiert. Das Zelllysat wurde durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Zu dem Extrakt wurden 0,2 ml Chlorophorm/ 1 ml Trizol[®]-Reagenz zugefügt, dieses auf einem Vortexer gemischt und für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (Biofuge fresco, Rotor: F178818, 13.000 Upm, 15 Minuten, 4 °C), um die wässrige Phase von der Inter- und Phenol-Chloroform-Phase zu trennen, die jeweils die Proteine oder die DNA beinhalten. Die wässrige RNA-haltige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 0,5 ml Isopropanol/ 1 ml eingesetztem Trizol[®]- Reagenz hinzugefügt. Das Gemisch wurde über Kopf geschüttelt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur zur Fällung der RNA aufbewahrt.

Um die gefällte RNA zu pelletieren, wurden die Proben bei 13.000 Upm für 15 Minuten bei 4° C zentrifugiert. Das Präzipitat wurde mit 1 ml 75% Ethanol in H₂O/ DEPC/ 1 ml Trizol[®]-Reagenz gewaschen, die Proben gemischt und bei 10.600 Upm (Biofuge fresco, Rotor: F178818) 5 Minuten bei 4° C zentrifugiert. Das dabei entstandene Pellet wurde luftgetrocknet und in 30-50 µl H₂O/ DEPC aufgenommen. Bevor die Gesamtmenge der isolierten RNA bestimmt wurde, wurden die Proben zur Denaturierung für 5 Minuten bei 57° C inkubiert. Die Qualität der RNA wurde durch die Gelelektrophoretische Auftrennung von 2 µg isolierter RNA auf einem 1% Agarosegel überprüft.

3.4.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch ermittelt, indem die Proben bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen wurden (Gene Quant Pro RNA/DNA Calculator). Eine optische Dichte (OD) von 1 entspricht dabei 50 µg/ml doppelsträngiger DNA oder 40 µg/ml einzelsträngiger RNA (Sambrook *et al.* 1989). Der OD ₂₈₀-Wert ist ein Maß für die Proteinkontamination, wobei ein Verhältnis der Messwerte von OD₂₆₀ zu OD₂₈₀ zwischen 1,8 und 2,0 auf eine geringe Verunreinigung der Nukleinsäuren durch Proteine schließen lässt.

Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde mittels folgender Formel berechnet:

 $K [\mu g/ml] = OD_{260} \times V \times F$ V= Verdünnung; F= Faktor (40 für RNA, 50 für DNA)

3.4.3 Agarosegelelektrophorese von DNA unter nicht-denaturierenden Bedingungen

DNA-Fragmente werden zur Analyse nach ihrer Molekülgröße in 1% Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Da Nukleinsäuren aufgrund ihrer Phosphatreste bei allen pH-Werten negativ geladen sind, wandern sie in der neutralen Gelmatrix aus Agarose in Abhängigkeit ihrer Größe zur Anode.

Die Agarose wurde in 1x TAE Puffer durch Erhitzen aufgelöst und Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 μ g/ μ l hinzubegeben. Die Elektrophorese wurde in 1x TAE-Puffer mit einer Spannung von 10 V/cm² für 25 Minuten durchgeführt. Die DNA-

Fragmente wurden durch Interkalierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid unter UV-Licht (Wellenlänge 254 nm) sichtbar gemacht und mit Hilfe einer UV-Licht Kamera (GelDoc 1000, Bio-Rad) photographiert. Die Größe der DNA-Fragmente wurde durch das gleichzeitige Auftragen eines DNA Molekulargewichtsmarker ermittelt.

3.4.4 Agarosegelelektrophorese von RNA unter denaturierende Bedingungen

Für die Auftrennung von RNA wurde folgende Gel-Zusammensetzung verwendet:

1,4 g Agarose 72,5% (v/v) dd H₂O 10% (v/v) 10x FAE-Puffer 17,5% (v/v) Formaldehyd

Das Formaldehyd diente hierbei als denaturierendes Agent; als Elektrophoresepuffer wurde 1x FAE verwandt. Zur Northern-Blot Analyse wurden die RNA-Proben folgendermaßen vorbereitet:

10-20 µg gesamtzelluläre RNA, gelöst in ddH₂O, wurde mit dem dreifachen Volumen an FA Proben-Puffer, der bereits Ethidiumbromis enthält, gemischt und bei 65 °C für 15 Minuten denaturiert. Nach dem anschließenden Auftragen der Proben auf das Gel erfolgt die elektrophoretische Auftrennung der RNA bei 10 V/cm² für ca. 60 Minuten. Die RNA wird mit Hilfe von UV-Licht visualisiert und mit einer Kamera photographiert.

3.4.5 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

cDNAs, die für die Herstellung von Hybridisierungsproben verwendet werden sollten, wurden zunächst durch die Restriktionsendonuclease EcoRI aus dem TOPO Vektor herausgeschnitten. Die verdaute Plasmid-DNA wurde in einem nicht-denaturierenden DNA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Das DNA-Fragment wurde unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und mit Hilfe des *Qiaquick Gel Extraction Kit* von Qiagen nach Angaben des Herstellers heraus eluiert. Das System basiert auf einer Kieselgel-Membran, die sowohl einzel- als auch doppelsträngige DNA bindet.

3.4.6 Reverse-Transkriptase-Reaktion (RT)

Bei der Reversen-Transkriptase-Reaktion wird mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (Superscript II) mRNA in einzelsträngige *"copy"* oder *"complementary"* DNA (cDNA) umgeschrieben. Als Primer, die den Startpunkt der Synthese festlegen und komplementär zur RNA-Sequenz seinen müssen, wurden Oligo-dT-Primer verwendet. Reverse-Transkriptase-Reaktionsansatz:

x µl RNA (5 µg Gesamt-RNA)

1 µl Oligo-dT(15)-Primer (500 µg/ml)

ad 12 µl DEPC-H2O

Dieser erste Schritt der RT-Reaktion, der zur Anlagerung der Oligo-dT-Primer an die Template-RNA führt, wurde für 5 Minuten bei 65 °C in einem Eppendorf-Mastercycler 5330 durchgeführt und durch den Transfer der Proben auf Eis abgestoppt.

Danach wurde der Reaktion

1 μl dATP (10 mM) 1 μl dCTP (10 mM) 1 μl dGTP (10 mM) 1 μl dTTP (10 mM) 4 μl 5x First Strand Puffer 2 μl 0,1 M DTT

1µl Superscript II RNaseH-RT (200 U/µl)

zugegeben, vorsichtig gemischt und für 50 Minuten bei 42℃ inkubiert.

Die Prozedur wurde durch die Erwärmung der Proben für 15 Minuten bei 70 ℃ (finale Extension) und dem darauf folgenden Abkühlen auf 4 ℃ beendet. Die Aliquots der cDNAs wurden bis zur PCR bei -20 ℃ gelagert.

Die RT-Reaktion der Positiv-Kontroll-Poly(A)-RNA von menschlicher Lunge und Poly(A)-RNA von menschlicher Plazenta (Clontech, Heidelberg) wurde mit jeweils 5 µg RNA durchgeführt.

3.4.7 Semiquantitative Polymerase-Ketten-Reaktion (sq-PCR)

Die PCR ist eine in vitro Methode der DNA-Amplifikation, die auf einer enzymatischen Synthese spezifischer DNA-Sequenzen basiert. Diese Methode wurde 1985 erstmals von Saiki *et al.* (1985) beschrieben.

Zunächst erfolgt der Schritt der DNA-Denaturierung (Separierung des DNA-Doppelstranges in seine beiden Einzelstränge). Daraufhin lagern sich die Primer an die DNA-Einzelstränge an (Annealing). Bei den Primern handelt es sich um kurze, zur Zielsequenz komplementäre Einzelstrang-DNA-Moleküle (Oligonukleotide), die den zu amplifizierenden Abschnitt an beiden Seiten flankieren. In einem nächsten Schritt werden die DNA-Stränge verlängert (Elongation). Diese Reaktion wird von dem hitzestabilen Enzym Taq-Polymerase katalysiert. Aufgrund der Thermostabilität der Taq-Polymerase kann das Reaktionsgemisch auf 96 °C erhitzt werden, um den neu synthetisierten DNA-Abschnitt von der Matrize zu lösen. So wird eine neue DNA-Synthese-Runde eröffnet, und jeder weitere PCR-Schritt verdoppelt die Anzahl der DNA-Fragmente, wodurch die DNA-Menge exponentiell zunimmt. Nach etwa 25 bis 40 Zyklen werden die Amplifikationsprodukte (Aliquot von 10 µl) mit Hilfe der Gelelektrophorese aufgetrennt und analysiert.

In Kombination mit der RT-Reaktion (siehe 3.4.6) wurde die PCR zum semi-quantitativen Nachweis von mRNA verwendet. In einem Vorversuch wurde zunächst durch Probenziehen die Zyklenzahl bestimmt, bei der die Amplifikation sich im linearen Bereich befindet.

PCR-Reaktionsansatz:

2 μl Template 2,5 μl 10 x Reaktionspuffer 0,25 μl dATP (10 mM) 0,25 μl dCTP (10 mM) 0,25 μl dGTP (10 mM) 0,25 μl dTTP (10 mM) 1μl Vorwärts-Primer (50 ng/μl) 1μl Rückwärts-Primer (50 ng/μl) 1μl Red Taq-Polymerase (1U/μl) ad 25 μl DEPC-H₂O

Die Reaktion wurde in einem GeneAmp PCR System Thermal Cycler (9700) durchgeführt. Die Bedingungen variierten abhängig von dem zu untersuchenden Gen, dem GC-Gehalt der Primer und dem Typ der Zellen (siehe Tab. 3-2).

Zur Amplifikation wurde dem Thermocycler folgendes Programm eingegeben:

| Einmalig | 1 min | 94 <i>°</i> C | Aktivierung des Enzymss |
|--------------|--------|---------------|-------------------------|
| 20-40 Zyklen | x min | 94 <i>°</i> C | Denaturierung |
| | x min | х°С | Annealing |
| | 1 min | 72 <i>°</i> C | Elongation |
| Einmalig | 10 min | 72 <i>°</i> C | Endsynthese |

Die detaillierten Protokolle für die in dieser Arbeit untersuchten Gene waren wie folgt:

| Gen | Denaturierung | Anheftung | Elongation | Zyklenzahl | | | |
|-------------------------|---------------|-----------------------|-------------|------------|--|--|--|
| Maus | | | | | | | |
| sPLA ₂ -IB | 94℃, 1 min. | 57℃, 30 sec. | 72℃, 1 min. | 34 | | | |
| sPLA ₂ -IIC | 94℃, 1 min. | 54℃, 45 sec. | 72℃, 1 min. | 34 | | | |
| sPLA ₂ -IID | 94℃, 1 min. | 55℃, 30 sec. | 72℃, 1 min. | 32 | | | |
| sPLA ₂ -IIE | 94℃, 1 min. | 57℃, 30 sec. | 72℃, 1 min. | 34 | | | |
| sPLA ₂ -IIF | 94℃, 1 min. | 57℃, 30 sec. | 72℃, 1 min. | 32 | | | |
| sPLA ₂ -III | 94℃, 1 min. | 56℃, 1 min. | 72℃, 1 min. | 32 | | | |
| sPLA ₂ -V | 94℃, 1 min. | 58℃, 1 min. | 72℃, 1 min. | 34 | | | |
| sPLA ₂ -X | 94℃, 1 min. | 59℃, 30 sec. | 72℃, 1 min. | 34 | | | |
| sPLA ₂ -XIIA | 94℃, 1 min. | 57℃, 30 sec. | 72℃, 1 min. | 34 | | | |
| sPLA ₂ -XIIB | 94℃, 1 min. | 54℃, 1 min. | 72℃, 1 min. | 34 | | | |
| M-Typ-Rezeptor | 94℃, 1 min. | 62℃, 1 min. | 72℃, 1 min. | 30 | | | |
| cPLA ₂ | 94℃, 1 min. | 57℃, 1 min. | 72℃, 1 min. | 30 | | | |
| iPLA ₂ | 94℃, 1 min. | 57℃, 1 min. | 72℃, 1 min. | 26 | | | |
| MIP-2 | 94℃, 1 min. | 48℃, 1 min. | 72℃, 1 min. | 36 | | | |
| COX-1 | 94℃, 1 min. | 58℃, 1 min. | 72℃, 1 min. | 30 | | | |
| COX-2 | 94℃, 1 min. | 62℃, 1 min. | 72℃, 1 min. | 28 | | | |
| GAPDH | 94℃, 1 min. | 60℃, 1 min. | 72℃, 1 min. | 24 | | | |
| Ratte | | | | | | | |
| sPLA ₂ -IB | 94℃, 4 min. | 56℃, 60 sec. | 72℃, 3 min. | 30 | | | |
| M-Typ-Rezeptor | 94℃, 1 min. | 60℃, 1 min. | 72℃, 1 min. | 28 | | | |
| GAPDH | 94℃, 1 min. | 60 <i>°</i> C, 1 min. | 72℃, 2 min. | 23 | | | |

Tabelle 3-2: Bedingungen der sq-PCR.

min = Minuten; sec = Sekunden

Um die Spezifität der Primer sicherzustellen, wurden die PCR- Produkte sequenziert (siehe 3.4.11) und die Sequenzen mit Hilfe einer speziellen Software mit Gen-Datenbanken verglichen.

3.4.8 Real- Time PCR

Die Real- Time PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht, und durch die Messung der gebildeten Produktmenge nach jedem Zyklus zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung bietet. Das Prinzip ist die kontinuierliche Messung eines Fluoreszenzsignals, das während der PCR proportional mit der Menge des Amplifikationsproduktes ansteigt. Zum PCR-Ansatz wird neben den spezifischen Primern auch eine sequenzspezifische Hybridisierungssonde zugegeben. Die Sonde ist am 3'-Ende mit einem Quencherfarbstoff und am 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff markiert. Wenn die intakte Sonde durch Licht einer Wellenlänge von 488 nm angeregt wird, so wird die Fluoreszenz-Emission des Reporterfarbstoffs durch die räumliche Nähe zu dem Quencherfarbstoff unterdrückt (Fluoreszenz-Energietransfer, FRET). Während der PCR-Reaktion wird die hybridisierte DNA-Sonde durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase zerschnitten. Durch die Sondenhydrolyse wird die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher unterbrochen, und der Reporterfarbstoff kann das Fluoreszenzlicht emittieren (Schema siehe Abb. 3.1). Die Auswertung der Analyse erfolgt über den sogenannten CT-Wert ("threshold cycle"). Der CT-Wert drückt die Zyklenzahl aus, bei der zum ersten Mal ein Anstieg der Reporter-Fluoreszenz über das Grundrauschen ermittelt wird.



Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Real-Time PCR. R= Reporter Q= Quencher

PCR-Reaktionsansatz in 96-well-Platte:

4 μl Template (RT-Reaktions-Produkt, 1:10 in H₂O verdünnt)
8 μl SYBRgreen Mix
2 μl Vorwärts- Primer (1μM)
2 μl Rückwärts- Primer (1μM)

Die Reaktion wurde in einem GeneAmp 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) durchgeführt. Zur Amplifikation wurde dem Thermocycler folgendes Programm eingegeben:

| Einmalig | 2 min | 50 <i>°</i> C |
|-----------|--------|---------------|
| Einmalig | 10 min | 95 <i>°</i> C |
| 40 Zyklen | 15 sec | 95 <i>°</i> C |
| | 1 min | ℃ 00 |

Die Auswertung der Daten erfolgte der GeneAmp 5700 SDS Software.

3.4.9 Klonierung von PCR-Produkten mittels TOPO [™] TA-Cloning Kit

Die gewünschte DNA-Sequenz wurde nach einem Standard-PCR Protokoll amplifiziert. Das erhaltene Produkt wurde durch eine Agarose Gelelektrophorese auf Reinheit und Menge überprüft und anschließend in den TOPO-Vektor (Invitrogen) kloniert. Ansatz für Ligationsreaktion:

- 2 µl frisches PCR Produkt
- 2 µl ddH₂O
- 1 µl Salz-Lösung
- 1 µl TOPO Klonierungsvektor

Nach vermischen wurde das Reaktionsgemisch für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für weitere 5 Minuten auf Eis gestellt. 2 µl des Ligationsansatzes wurden zu 50 µl *"One shot TM"* kompetenten *E.coli* Bakterien gegeben, gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Transformation der Bakterien erfolgte durch einen Hitzeschock bei 42 °C für 30 Sekunden, was zur Permeabilisierung der Zellen führte, welche dann wieder auf Eis inkubiert wurden. Die Bakterien wurden in 250 ml *SOC-Medium* ohne Antibiotikum resuspendiert und für 1h bei 37 °C in einem Inkubator geschüttelt. Je 50 µl dieser Bakteriensuspension wurden auf eine LB-Ampicillin-

Agarplatte, die zuvor mit 50 µl X-Gal (40 mg/ml in DMSO) und 50 µl IPTG (100 mM) bestrichen wurde, ausgestrichen und über Nacht bei 37 ℃ kultiviert.

Durch das Bestreichen der Agar-Platten wurde eine blau/ weiß Selektion der Bakterien ermöglicht. Transformierte Bakterien, die ein Insert in ihr Plasmid aufgenommen haben, erscheinen weiß, da durch die Aufnahme des klonierten DNA-Fragmentes in das Lac Z-Gen dieses inaktiviert ist und sie dadurch nicht mehr in der Lage sind, β-Galactosidase zu bilden, wodurch eine Blaufärbung hervorgerufen werden könnte. Ein weißer Klon wurde gepickt, in 3 ml Ampicillin-haltiges LB-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C in einem Inkubator geschüttelt. Die Übernachtkultur wurde am nächsten Tag zur Präparation der Plasmid-DNA mittels Minipräparation verwendet.

3.4.10 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Mit Hilfe des "Qiagen Plasmid Minikit" oder "Qiagen Plasmid Maxikit" konnte Plasmid-DNA aus Bakterien isoliert werden. Die Durchführung erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers.

Die Aufreinigung erfolgt über eine Säule, deren Bindungseigenschaften die saubere Trennung der Plasmid-DNA von übrigen Zellbestandteilen ermöglicht. Je nach Größe der Säule konnten unterschiedliche Volumina einer Übernacht-Ausgangskultur eingesetzt werden.

| | Kulturvolumen | Bindekapazität (Angaben des Herstellers) |
|------------------------|---------------|---|
| Qiagen Plasmid Minikit | 1-5 ml | 20 µg |
| Qiagen Plasmid Maxikit | 100 ml | 300-500 μg |

| Tab. 3- | 3 | Bindeka | nazitäten | der | Plasmid-Kit | s |
|-----------|----|----------|-----------|-----|----------------|----|
| 1 a.b. 5- | υ. | Diriuena | pazitaten | uer | i lasiniu-itti | .0 |

Ein Teil der gewonnenen DNA wurde einem analytischen Restriktionsverdau mit der Endonuklease EcoRI unterzogen, um zu prüfen, ob der transformierte Vektor das gesuchte Insert enthielt. Nach der Restriktion wurden die Produkte auf einem 0,8% Agarose-Gel aufgetrennt. Die verbliebene DNA wurde bei -20 ℃ gelagert.

3.4.11 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde mit Hilfe des ABI-Prism TM 310 Genetic Analyser durchgeführt. Die Methode basiert auf der Didesoxynukleotid-Kettentermination-Reaktion (Sanger *et al.*, 1977). Indem im Terminationmakierungsmix die vier Didesoxy-Terminatoren (ddNTPs) mit verschiedenen Fluoreszenz-Farbstoffen markiert sind, ermöglicht diese Technik die gleichzeitige Sequenzierung der vier Reaktionen (A, C, G, T) in einem Reaktionsgefäß. Die Proben werden danach elektrophoretisch mittels Mikrokapillare voneinander getrennt. Da jeder farbstoffmarkierte Terminator Laserlicht in verschiedenen Wellenlängen emittiert, können alle vier Farben, die jeweils einem Nukleotid zugeordnet werden, in einem Durchgang detektiert und unterschieden werden. Die Rohdaten wurden mit Hilfe der "Abi Prism'-Sequenzierungsanalysen-Software auf einem "Power G3 Macintosh' Computer ausgewertet.

Die Sequenzierungsreaktion wurde in einem Thermocycler (GeneAmp 9700) mit 25 Zyklen und den folgenden Temperaturschritten durchgeführt: 96 °C für 10 Sekunden, 55 °C für 5 Sekunden, 60 °C für 4 Minuten. Für den Detektionsprozess wurden die Proben vorbereitet, wie vom Hersteller vorgeschrieben.

Sequenzierungsreaktion:

x µl PCR Produkt oder Minipräparationsprodukt (10-100 ng)

- 4 µl Sequenzierung Premix
- 1 µl Primer (3-10 pmol)
- x μl H₂O
- 10 µl Gesamtvolumen

3.4.12 Northern-Blot

Als Northern-Blot bezeichnet man die Übertragung von gelelektrophoretisch aufgetrennter RNA auf Membranen, gefolgt von dem Nachweis spezifischer Sequenzen durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten cDNA-Sonde.

10 µg- 20 µg RNA werden wie unter 3.4.4 beschrieben in einem Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde 20 Minuten in FAI-Lösung geschwenkt um eine partielle Hydrolyse zu erreichen. Nach Neutralisierung uns Äquilibrierung des Gels in GS-Puffer (2x für 15 Minuten) erfolgte der Transfer der RNA auf die Nylonmembran (Genescreen-Membran).

Dazu wurde ein wie folgt beschriebes Blotsystem verwendet:

oben Gewicht (Metallständer) Schicht aus 7-10cm Whatman 1MM-Papier 2 Lagen Whatman 3MM-Papier Genescreen-Membran äqulibriertes Gel 2 Lagen Whatman 3MM-Papier Haushaltsschwämme Wanne als Pufferreservoir unten

Der Transfer erfolgte durch die wirkenden Kapillarkräfte über Nacht, als Laufpuffer wurde 1x GS-Puffer verwendet. Die Effizienz des Transfers wurde über den Nachweis der Ethidiumbromid- gefärbten RNA auf der Membran im kurzwelligen UV-Licht kontrolliert. Anschließend wurde die RNA durch 2-minütige UV-Bestrahlung mittels eines UV-Crosslinkers kovalent an die Membran gebunden.

3.4.13 Radioaktive Markierung der DNA durch "Random-Priming"

Die radioaktive Markierung spezifischer cDNA-Sequenzen, die als Hybridisierungsproben eingsetzt werden sollen, wurde mittels "Random priming" nach dem Protokoll der Firma Amersham Pharmacia Biotech (*rediprime* TM *II Kit*) durchgeführt.

Die DNA-Markierung beginnt mit der Hybridisierung von Hexanukleotiden mit zufälligen Basensequenzen an die denaturierte DNA. Die Hexanukleotide bieten das freie 3'-OH-Ende für die Klenow-Polymerase, die den komplementären Strang in Richtung 3'-Ende der DNA synthetisiert. Als Substrat werden dabei dATP, dTTP, dGTP und (α -³²P)-dCTP angeboten.

Die DNA, d.h. das klonierte Insert (25 ng), wird zunächst 5 Minuten bei 95 °C denaturiert, 5 Minuten auf Eis abgekühlt und anschließend in das vorbereitete Rediprime Reaktionsgefäß pipettiert. Nach Zugabe des radioaktiv markierten dCTP wurde mit der Pipette gut gemischt und der Reaktionsansatz 1h bei 37 °C inkubiert und anschließend die Reaktion durch Erhitzen auf 95 °C gestoppt. Nach dem Abkühlen auf Eis wurde die DNA von nicht eingebauten dNTPs durch Gelfiltration über eine G-50-Säule (*NickTM-Columm*) gereinigt.

3.4.14 Hybridisierung mit In-vitro-markierter DNA

Vorhybridisierung und Hybridisierung erfolgten in einem verschließbaren Bleiglaskolben, der in einem erwärmten Hybridisierungsofen routierte. Um eine unspezifische Bindung der [³²P]- DNA-Probe an die Membran zu vermeiden wurde zunächst mit dem Hybridisierungpuffer ohne radioaktive Lösung für 1h bei 42 °C vorhybridisiert. Vor Zugabe wurde die [³²P]- DNA-Probe auf 95 °C erhitzt und nach Abkühlung auf Eis zusammen mit 300 µl DNA-Lösung aus Heringssperma in den Kolben zupipettiert. Nach der Hybridisierung bei 42 °C über Nacht wurde die Membran wie folgt gewaschen:

3x 20 Minuten bei 42 °C mit 2x SSC/ 0,1% SDS (Waschpuffer 1)

3x 30 Minuten bei 65 ℃ mit 0,1x SSC/ 0,1% SDS (Waschpuffer 2)

Das Signal wurde mit dem Phosphoimager BAS 1500 detektiert und quantifiziert.

Durch 5maliges waschen mit kochendem Waschpuffer 2 konnte die radioaktive cDNA von der an die Membran gebundene RNA gelöst werden. Anschließend erfolge die Rehybridisierung mit einer [³²P]- DNA-Probe für die 18S RNA, um eventuelle Variationen in der RNA-Beladung zu korrigieren.

3.5 Biochemische Methoden

3.5.1 Präparation von Zelllysaten

Zur Gewinnung von Protein wurden murine Mesangiumzellen kultiviert (s. Kapitel 3.3.1) und stimuliert (s. Kapitel 3.3.2). Zuerst wurden die Zellen 2x mit kaltem 1x PBS gewaschen und anschließend durch Abschaben in Homogenisierungspuffer (300 μ l/ 3,5 cm Schale bzw. 1 ml/ 10 cm Schale) aufgenommen.

Die Mesamgiumzellen wurden durch eine Behandlung im Ultraschallbad (Ultraschallbad Transsonic digital S) für 3 Minuten bei 80% Leistung aufgeschlossen. Um die Zelltrümmer zu entfernen, wurden die Proben bei 4000 Upm für 5 Minuten zentrifugiert (Biofuge fresco, Rotor F178818). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20 ℃ gelagert. Die Bestimmung der Proteinmenge wurde nach der Bradford-Methode durchgeführt (s. 3.5.3).

3.5.2 Präparation von Zellmembranen

Bis zum Zellaufschluss wurden die Zellen behandelt wie unter 3.5.1 beschrieben. Nach der Sonifizierung erfolgt ein Zentrifugationsschritt von 1h bei 40.000 Upm in der Ultrazentrifuge (Ultrazentrifuge Avanti centrifuge J30I). Anschließend wurde das Pellet in 200 µl Homogenisierugspuffer resuspendiert und bei -80 ℃ gelagert.

3.5.3 Bestimmung des Proteingehaltes

Die Bestimmung des Proteingehaltes der Zelllysate erfolgte nach der "Bradford"-Methode (Bradford, 1976) unter Verwendung des *Roth Quant Protein Assay*. Das Prinzip dieser Methode ist die Messung der Extinktionsänderung bei 595 nm, die durch das Vorliegen des Farbstoffes in zwei verschiedenen Formen verursacht wird. Durch das Binden des Farbstoffes Coomassie-Brilliant-Blue G250 an positiv geladene Proteine tritt eine Veränderung im Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm (protonierte braubrote kationische Form) zu 595 nm (unprotonierte blaue anionische Form) ein (Suelter, 1990).

20 μl der Proben wurden als Doppelwerte in adäquate Löcher einer 96-Loch-ELISA-Platte pipettiert. Als Standard wurden verschiedene Konzentrationen an BSA (5-150 μg/ml) verwendet. Zu den Proben wurden jeweils 180 μl des *Roti-Quant* (Roth, v/v 1:5 verdünnt in H₂O dest.) gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 595 nm und einer Referenz-Wellenlänge von 450 nm in einem Mikroplatten-Lesegerät (Bio-Rad) gemessen. Die Absorptionswerte wurden mit Hilfe der Software "Microplate Manager 4.0' (Bio-Rad) berechnet. Bei Bedarf wurden die Proben mit ddH₂O verdünnt.

3.5.4 Proteinpräzipitation mit Trichloressigsäure (TCA)

Die Methode wurde verwendet, um Proteine in einem definierten Volumen an Zellkulturüberstand oder Zelllysat für die Western-Blot Analyse zu konzentrieren. Den nach 3.5.1 bzw. 3.5.2 hergestellten Proteinproben, sowie auch die Zellkulturüberständen wurden 400 μ l 20% TCA-Lösung / ml zugegeben und das Protein durch 20minütige Inkubation auf Eis gefällt. Anschließend wurden die Proben für 20 Minuten bei 4°C und 13.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Proteinpellet in 15 μ l reduzierenden bzw. nicht-reduzierenden Laemmli-Probenpuffer aufgenommen. Nach der Neutralisierung der Proben durch die Zugabe von 5 μ l 1 M Tris/HCl (pH 9,0) wurden diese bis zur weiteren Verwendung für die Western-Blot Analyse bei -20°C gelagert.
3.5.5 Aktivitätsbestimmung der sekretorischen Phospholipasen (sPLA₂s) in Zellkulturüberständen

Die Bestimmung der sPLA₂-Aktivität im Zellkulturüberstand von Mesangiumzellen erfolgte mittels [1-C¹⁴] Ölsäure- markierten Membranen von *E.coli*-Bakterien als Substrat.

Die markierten *E.coli*-Membranen (ca. 10.000 cpm/ Probe) wurden in Puffer 1 aufgenommen (Verhältnis 1:5). Pro Probenansatz wurden 40 μ l Puffer 1 in einem Reaktionsgefäß vorgelegt, 10 μ l enzymhaltigen Zellkulturüberstand hinzubegeben und anschließend unter ständigen schwenken des Gefäßes 100 μ l *E.coli*-Memebranen addiert. Die Proben wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 300 μ l Puffer 2 pro Ansatz addiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation von 3 Minuten bei 13.000 Upm. 400 μ l des Überstandes wurden zusammen mit 3 ml Szintilisationsflüssigkeit in Szintilisationsröhrchen pipettiert. Die durch die Enzymaktivität der sPLA₂ freigewordene [1-C¹⁴] Ölsäure wurde mit Hilfe eines β-Counters (Liquid Scinillation Analyzer (β- und γ-counter) gemessen.

3.5.6 Messung von Prostaglandinen, Prostacyclinen oder Chemokinen in Zellkulturüberständen mittels ELISA

3.5.6.1 Messung Prostaglandin E₂

Der PGE2-ELISA Kit von Biotrend ist ein kompetitiver Immunassay für die quantitative Bestimmung von PGE₂ in biologischen Flüssigkeiten. Er bedient sich eines monoklonalen Antikörpers gegen PGE₂, der in kompetitiver Weise entweder an das PGE₂ in der Probe oder an mit Alkalische-Phosphatase-gekoppelte PGE2-Moleküle, die ebenfalls dem Reaktionsgemisch zugegeben werden, bindet. Der Antikörper wiederum bindet mit seinem Fc-Teil an der Oberfläche der Plattenvertiefungen und fixiert somit den Komplex an der Platte. Aus diesem Grund werden beim nachfolgenden Waschen nur überschüssige Reagenzien entfernt und der Komplex aus Antikörper und PGE2 oder Alkalische-Phosphatase-gekoppeltem PGE₂ bleibt gebunden. Als nächster Schritt wird das Alkalische-Phosphatase-Substrat zugegeben. Nur wenn das PGE₂, gekoppelt an ein Alkalische-Phosphatase-Molekül, an den Antikörper gebunden hat, kommt es zu einer gelblichen Farbentwicklung, die in einem Mikrotiter-Lesegerät bei 405 nm gemessen werden kann. Die Intensität der Gelbfärbung ist somit invers proportional zu der PGE2-Konzentration in den Proben oder dem Standard. Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe (v/v 1:2) einer PGE₂-Stammlösung ausgehend von 5.000 pg/ml bis zu 39 pg/ml verwendet. Die gemessene optische Dichte des Standards wurde dazu verwendet, die Konzentration an PGE₂ in den Proben zu ermitteln.

Die Messung der PGE₂-Menge in Zellkulturüberständen der Mesangiumzellen wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden 100 μ l des Zellkulturüberstandes oder der jeweiligen Standards zusammen mit 50 μ l Konjugat (=PGE₂, gekoppelt an ein Alkalische-Phosphatase-Molekül) und 50 μ l der Antikörperlösung auf die Platte gegeben und für 2 Stunden auf einem ELISA-Plattenschüttler bei ca. 500 Upm und Raumtemperatur inkubiert. Nach diesem Zeitraum wurden die überschüssigen Reagenzien durch dreimaliges Waschen der Vertiefungen mit Waschpuffer entfernt und die Platte durch Ausklopfen auf Küchenpapier getrocknet. Darauf folgte die Zugabe von 200 μ l Alkalische-Phosphatase-Substrat. Nach einer Inkubationzeit von 45 Minuten bei Raumtemperatur ohne Schütteln wurde die Enzymreaktion mit Hilfe 50 μ l Stop-Puffer beendet und die Intensität der entstandenen Gelbfärbung bei 405 nm in einem Mikrotiter-Lesegerät ermittelt.

Zur Berechnung der Menge an gebundenem PGE₂ pro Probe in pg/ml wurden folgende Formeln angewendet:

- 1. durchschnittliche Netto-Optische Dichte (OD) = durchschnittliche OD x NSB OD
- 2. Prozent gebunden = Netto OD/Netto B0 OD x 100
- 3. Steigung (m) der Standard-Kurve errechnen

y = mLn(x) + b

4. Menge an PGE₂ errechnen

(EXP(- % gebunden/m + b/m))

B0 = maximale Bindung; NSB = nicht-spezifische Bindung

3.5.6.2 Messung von Prostacyclin (PGI₂)

Da PGI₂ nur eine kurze Halbwertzeit von 60 Minuten in Blutplasma bzw. 2-3 Minuten in Puffer hat, ist es eine gängige Methode anstatt PGI₂ das stabile Hydrationsprodukt 6-keto-PGF_{1 α} zu messen. Dies erfolgte durch einen *6-keto-PGF_{1\alpha}* - *ELISA-Kit* von Biotrend.

Das Prinzip des ELISAs und die Durchführung ist gleich derer für PGE₂, wie unter 3.5.6.1 beschrieben. Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe einer PGF_{1 α}-Stammlösung ausgehend von 50.000 pg/ml bis zu 3.2 pg/ml verwendet.

3.5.6.3 Messung von "Macrophage Inflammatory Protein 2" (MIP-2)

Mit dem Maus *MIP-2 Immunassay* von R&D Systems kann das Chemokin MIP-2 mittels der ELISA-Technik in Zellkulturüberständen nachgewiesen werden. Eine 96-Loch ELISA-Platte ist mit einem spezifischen polyklonalen Antikörper für MIP-2 beschichtet. Je 50 μ l der Standardlösungen, Kontrollen und Proben werden in die dafür vorgesehenen Löcher pipettiert und für 2h bei Raumtemperatur inkubiert, sodass das vorhandene MIP-2 an den Antikörper binden kann. Nach einem Waschschritt, bei dem nicht gebundene Substanzen entfernt wurden, wurde 100 μ l eines Enzym-gekoppelter polyklonalen Antikörpers spezifisch für MIP-2 zu den Proben gegeben und wiederum für 2h bei RT inkubiert. Nach erneutem waschen wurden 100 μ l/ Probe einer Substrat-Lösung zupipettiert, wodurch sich die Proben aufgrund der enzymatischen Reaktion blau färben. Nach Inkubation von 30 Minuten wurden 100 μ l einer Stop-Lösung zugegeben, was eine Gelbfärbung der Proben verursacht. Die Messung erfolgt bei 450 nm in einem Mikrotiter-Lesegerät. Die Intensität der gemessenen Färbung ist proportional zum MIP-2-Gehalt der Probe. Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe einer MIP-2-Stammlösung ausgehend von 500 pg/ml bis zu 7,8 pg/ml verwendet.

3.5.7 Bestimmung der Nitrit-Konzentration in Zellkulturüberständen (Griess-Reaktion)

Die Nitrit-Konzentration in Zellkulturüberständen wird mit Hilfe der Griess-Reaktion ermittelt. Hierzu wurde von jeder Probe 200 μ l Zellkulturüberstand in eine 96-Loch Mikrotiterplatte überführt uns jeweils mit 20 μ l 1% Sulfamilamidlösung (SA, gelöst in 1.2 M HCl) und 20 μ l 0,1% N-Naphthyethylendiamin-Dihydrochlorid (NE, gelöst in H₂O) versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 5 Minuten bei RT kann die Extinktion bei 540 nm in einem Mikrotiter-Lesegerät gemessen werden. Für die Quantifizierung der Nitrit-Konzentration wurde ein NaNO₂-Standard von 1 μ M-100 μ M verwendet.

3.5.8 Western-Blot

Die Western-Blot-Methode dient der Identifikation und Quantifizierung spezifischer Proteine in komplexen Proteingemischen, wie Zell-Lysate oder Gewebe-Lysate. Nach Auftrennung der Proteine, abhängig von ihrer Größe, im elektrischen Feld werden sie auf eine Membran transferiert und dadurch immobilisiert. Auf der Membran erfolgt der Nachweis des Proteins mittels eines spezifischen Antikörpers. Der gebundene erste Antikörper wird durch einen zweiten Antikörper, der ein Enzym, die Peroxidase, gekoppelt ist, detektiert.

3.5.8.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelktrophorese

Proteine können durch SDS-Polyacryamid-Gelelktrophorese unter denaturierenden und je nach Probe reduzierenden Bedingungen proprtional zu ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Dabei wandern die zu untersuchenden Moleküle in einem elektrischen Feld durch eine Gelmatrix, gebildet von einem Gemisch aus Acrylamid und Bisacrylamid. Acrylamid bildet in Anwesenheit freier Radikale in einer Kettenreaktion lange Polymere, Bisacrylamid dient dazu, diese Polymere zu vernetzen. Als Katalysator (N,N,N',N'wurde TEMED Tetramethylethylendiamin), als Radikalbildner Ammoniumperoxodisulfat eingesetzt. SDS (Natriumdodecylsulfat) ist ein anionisches Detergens, welches die Eigenladung der Proteine so effektiv überdeckt, dass Micellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseeinheit entstehen (1,4 g SDS pro 1 g Protein). Die Laufgeschwindigkeit der Proteine im Gel ist nun nur noch von der relativen Molekülmasse abhängig. Um eine schärfere Bandentrennung zu erreichen wird über das Trenngel ein Sammelgel gegossen. Die Matrix im Sammelgel besitzt größere Poren und einen anderen pH-Wert als das Trenngel. Darin wandern die Proteine schnell und ohne eine Auftrennung als scharfe Bande in einem Gebiet hoher Feldstärke. Mit Erreichen der Grenzfläche zum Trenngel wird ihre Geschwindigkeit drastisch, und nun abhängig von der Größe, verringert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Gelen mit den Maßen 10x 15x 0,15 cm (Länge x Breite x Dicke; Hoefer Kammern). Für Proteine von 120 kDa wurden 10% Trenngele verwendet, für Proteine von 15-20 kDa 15% Trenngele (siehe Tabelle 3-4).

63

| | | Puffer | Acrylamid | ddH ₂ O | 10% SDS | 10% APS | TEMED |
|----------------|-----|---------|-----------|--------------------|---------|---------|-------|
| Trenn- gel | 10% | 7,5 ml | 7,5ml | 12 ml | 300 µl | 300 µl | 15 µl |
| | 15% | 7,5 ml | 15 ml | 6,9 ml | 300 µl | 300 µl | 15 µl |
| Sammel- gel | | 3,75 ml | 2 ml | 9,1 ml | 150 µl | 45 µl | 15 µl |

| | Tabelle 3-4: Zu | isammensetzung vor | Trenngel und | Sammelgel b | ei der SDS-PAGE |
|--|-----------------|--------------------|--------------|-------------|-----------------|
|--|-----------------|--------------------|--------------|-------------|-----------------|

Für die Detektion von intrazellulären Proteinen wurden 35-150 μg Gesamtprotein (s. 3.5.1) in 2x Laemmli-Puffer aufgenommen und auf das Gel aufgetragen; zur Untersuchung von extrazellulären Proteinen 1,5 ml TCA-gefällter Zellkulturüberstand (s. 3.5.4) verwendet.

Für die Western-Blot Analyse von der iNOS wurden die Proben für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt und anschließend auf das Proteingel aufgetragen, bei der Analyse der sPLA₂s und des M-Typ-Rezeptors wurden die Proben vor Auftrag nicht denaturiert. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Stromstärke über Nacht bei 7 mA durchgeführt; als Laufpuffer wurde 1x PAGE verwendet.

3.5.8.2 Transfer auf eine PVDF-Membran

Die im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden zum immunologischen Nachweis auf eine Polyvinylidenfluorid-(PVDF)-Membran elektrotranferiert, wobei die elektrische Ladung der separierten Proteine ausgenutzt wird.

Der Elektro-Blot wurde nach der "*Semi-Dry"*-Methode im kontinuierlichen Puffersystem durchgeführt. Zunächst wurde das Polyacrylamidgel in Transferpuffer inkubiert. Parallel dazu wurde das auf Gelgröße zugeschnittene Whatman 3 MM Filterpapier ebenfalls in Transfer-Puffer äquilibriert. Die Trägermembran wurde nach Aktivierung mit Methanol, kurz mit Wasser gewaschen und ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert. Der Blot wurde dann folgendermaßen aufgebaut:

Kathodenplatte (oben)

6 Blätter 3MM Whatmanpapier

Poyacrylamidgel

PVDF-Membran

6 Blätter 3MM Whatmanpapier

Anodenplatte (unten)

Nachdem der Blot wie beschrieben und luftblasenfrei aufgebaut wurde, wurden die Proteine innerhalb von einer Stunde bei 0,8 mA/cm² auf die PVDF-Membran transferiert. Nach dem erfolgten Transfer wird der noch feuchte Blot sofort in Blocklösung überführt oder luftgetrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -4 ℃ gelagert. Das Gel wird nach dem Blotten durch Anfärben mit Coomassie Brilliant Blau auf Effektivität und das Auftragen von äquivalenten Mengen an Protein überprüft.

3.5.8.3 Immundetektion

Der immunologische Nachweis von speziellen Proteinen erfolgt zunächst durch einen spezifischen Primärantikörper, der seinerseits durch einen Sekundärantikörper erkannt wird.

Für den weiteren Prozess wurde die getrocknete Membran zur Aktivierung für 15 Sekunden in Methanol getaucht und anschließend mit ddH₂O gespült. Zum Abblocken unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran für 1h in Blocklösung bei RT inkubiert. Des Weiteren erfolgte die Inkubation mit dem spezifischen Primärantikörper und nach 3maligen waschen mit Waschpuffer wurde die spezifische Bindung des Primärantikörpers durch die Inkubation mit dem spezies-spezifischen Zweitantikörpers für 1 Stunde bei RT detektiert. Die Bedingungen für die Western-Blot Analysen sind in Tabelle 3-5 zusammengefasst.

Nach einem weiteren Waschschritt wurde die Membran für 1 Minute bei Raumtemperatur mit einem Mix aus 50% *ECL-Reagent I* und 50% *ECL-Reagenz II* inkubiert und die Chemolumineszenz durch Autoradiographie detektiert. Der Röntgenfilm wurde dabei in einer Autoradiographie-Kassette bei Raumtemperatur exponiert und maschinell (Hyperprocessor, Amersham) entwickelt.

| Primär- antikörper | Blockpuffer | Verdünnung | Inkubations- zeit | Waschpuffer | Sekundär- antikörper | |
|-----------------------|-------------------------|------------|----------------------|------------------|---------------------------------|--|
| Maus | | | | | | |
| sPLA ₂ -IB | NETG-Puffer | 1:150 | 2h | NETG-Puffer | Anti-Kaninchen HRP, 1:10.000 | |
| sPLA ₂ -V | NETG-Puffer | 1:150 | 2h | NETG-Puffer | Anti-Kaninchen HRP, 1:10.000 | |
| sPLA ₂ -X | NETG-Puffer | 1:150 | 2h | NETG-Puffer | Anti-Kaninchen HRP, 1:10.000 | |
| M-Typ- Rezeptor | 5% Milch- pulver/PBS | 1:1000 | 3h | 1x PBS- Tween | Anti-Kaninchen HRP, 1:10.000 | |
| iNOS | 3% BSA/ PBS | 1:2000 | über Nacht | 1x PBS- Tween | Anti-Kaninchen HRP, 1:10.000 | |
| COX-1 | 5% Milch- pulver/PBS | 1:1000 | über Nacht | 1x PBS- Tween | Anti-Kaninchen HRP, 1:10.000 | |
| COX-2 | 5% Milch- pulver/PBS | 1:1000 | über Nacht | 1x PBS- Tween | Anti-Ziege HRP, 1:10.000 | |
| β-Aktin | 2% Milch- pulver/PBS | 1:10.000 | 1h | 1x PBS- Tween | Anti-Maus HRP, 1:10.000 | |
| Ratte | | | | | | |
| sPLA ₂ -IB | 2% BSA/ PBS | 1:1000 | 2h | 1x PBS- Tween | Anti-Kaninchen HRP, 1:15.000 | |
| M-Typ- Rezeptor | 5% Milch- pulver/PBS | 1:500 | 2h | 1x TBS- Tween | Anti-Kaninchen HRP, 1:15.000 | |
| β-Aktin | 2% BSA/ PBS | 1:10.000 | 30 min. | 1x PBS- Tween | Anti-Maus HRP, 1:10.000 | |

Tabelle 3-5: Western-Blot Bedingungen.

3.5.9 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz wurde 1940 von dem Mikrobiologen Albert Coons eingeführt. Die Methode wurde zur spezifischen Detektion von Proteinen in Geweben verwendet und basiert auf der Erkennung eines bestimmten Proteins durch einen spezifischen Antikörper, an den wiederum ein spezifischer Fluorochrom-gekoppelter Zweit-Antikörper bindet. Durch die Einwirkung von Licht gibt das Fluorochrom fluoreszierendes Licht ab, das durch ein Fluoreszenz-Mikroskop analysiert werden kann.

Der Vorteil dieser Methode gegenüber der Immunhistochemie, die auf einer enzymatischen Farbentwicklung basiert, ist, dass die Detektion von fluoreszierendem Licht sensitiver ist als die von sichtbarem Licht, wodurch geringere Mengen an Protein nachgewiesen werden können. Des Weiteren ermöglicht die Immunfluoreszenz-Methode die Kolokalisation mehrerer Proteine, indem die verwendeten Zweit-Antikörper an verschiedene Fluorochrome gekoppelt sind. Bei der Kolokalisation muss darauf geachtet werden, dass die verwendeten Erst-Antikörper aus verschiedenen Spezies stammen, so dass durch die Bindung des korrespondierenden Zweit-Antikörpers eine spezifische Färbung des gesuchten Proteins möglich ist.

3.5.9.1 Färbung von Paraffinschnitten aus Rattennieren

Für die Immunfluoreszenz wurden 6 um dicke Paraffinschnitte von der Mausniere verwendet. Zur Entparaffinierung wurden die Schnitte zweimal 5 Minuten in Xylol, zweimal 10 Minuten in 100% Ethanol und danach zweimal 10 Minuten in 96 % Ethanol getaucht. Die Rehydratisierung erfolgte für 5 Minuten in ddH₂O, gefolgt von 10 Minuten in 1 x PBS. Anschließend wurden die Schnitte in 10 mM Citratpuffer dreimal für 3 Minuten bei 760 Watt in der Mikrowelle erhitzt, um die Epitope zu demaskieren. Die Schnitte wurden danach 10-20 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt und anschließend dreimal 5 Minuten mit 1 x PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen des Erst-Antikörpers zu blockieren, wurden die Schnitte 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 15% Ziegenserum behandelt. Die Blockierlösung wurde abpipettiert und die Schnitte mit dem in 15% Ziegenserum verdünnten Primärantikörper inkubiert (siehe Tabelle 3-6). Als Kontrollen wurden zum einen Schnitte anstatt mit dem Primärantikörper mit dem entsprechenden Prä-Immunserum in gleicher Konzentration behandelt, um die Spezifität des Primärantikörpers auszutesten. Zum anderen wurde durch die Inkubation der Schnitte mit 15% Ziegenserum anstelle des Primärantikörpers kontrolliert, ob der Sekundärantikörper unspezifisch an Proteine des Gewebes binden kann. Die Proben wurden über Nacht bei 4°C mit dem jeweiligen Erst-Antikörper inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal 5 Minuten mit 1 x PBS gewaschen, der entsprechende Sekundärantikörper in 15% Ziegenserum 1:400 verdünnt und die Schnitte mit diesem für 35 Minuten bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Die Schnitte wurden danach dreimal 5 Minuten mit 1 x PBS gewaschen, leicht abgetrocknet und mit Fluoreszenz-Eindeckmedium von DAKO eingedeckt. Die SO gefärbten Schnitte wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 (Zeiss, Göttingen, Germany) analysiert. Um die sPLA₂-Enzyme darzustellen, wurde monochromatisches Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm mit einem "dichroic beam splitter" (FT 488/543) und einem Emissionsbandpaß-Filter von 505 bis 530 nm verwendet. Die Aufnahmen wurden bei unterschiedlichen Vergrößerungen gemacht.

3.5.9.2 Imuncytologische Färbung von murinen Mesangiumzellen

Zum Immuncytologischen Nachweis der verschiedenen Zielproteine wurden murine Mesangiumzellen, wie unter 3.2.3 beschrieben, in 6-Loch Platten auf Deckgläsern ausgesät und kultiviert. Nachdem der Zellrasen eine Konfluenz von ca. 80% erreicht

hatte, wurden die Überstände abgenommen und die auf den Deckgläsern gewachsenen Zellen 3 x kurz mit PBS gewaschen. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten bei Raumtemperatur. Nach dem Waschen wurden die Zellen für 10 Minuten mit 3% Paraformaldehyd/PBS fixiert und anschließend für 5 Minuten mit 1% Triton X-100/PBS permeabilisiert. Zur Entfernung des Tritons wurde 3 x kurz mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 30 Minuten mit 0.5% BSA/ddH₂O geblockt. Die Inkubation mit den entsprechenden, in Blockpuffer verdünnten Primärantikörpern erfolgte für 1 Stunde (siehe Tabelle 3-6). Nachdem erneut 3 x mit PBS gewaschen wurde, wurde der 1:400 in Blockpuffer verdünnte Zweitantikörper für 1 Stunde auf die Zellen aufgetragen. Abschließend wurde 3x mit PBS gewaschen, und die Deckgläser 1x kurz in ddH₂O getaucht, um restliche Salze zu entfernen. Die Deckgläser wurden nun mit dem Zellrasen nach unten auf einen Objektträger überführt und mit Fluoreszenz-Eindeckmedium von DAKO eingedeckt. Die Expression der Zielproteine wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 (Zeiss, Göttingen, Germany) wie unter 3.5.9.1 analysiert.

| Primär- Antikörper | Spezies | Verdünnung | Sekundär- antikörper | Fluoreszenz- Farbstoff | | |
|---------------------------|-----------|------------|-------------------------|---------------------------|--|--|
| Maus | | | | | | |
| "Smooth muscle"- Aktin | Maus | 1:500 | anti-Maus IgG | ALEXA Fluor 488 | | |
| Zytokeratin | Maus | 1:500 | anti-Maus IgG | ALEXA Fluor 488 | | |
| Ratte | | | | | | |
| sPLA ₂ -IB | Kaninchen | 1:400 | anti-Kaninchen IgG | ALEXAFluor 488 (grün) | | |
| M-Typ-Rezeptor | Kaninchen | 1:10 | anti-Kaninchen IgG | ALEXAFluor 488 (grün) | | |
| HIS-48 | Maus | 1:2 | anti-Maus IgG | ALEXAFluor 594 (rot) | | |
| ED-1 | Maus | 1:2 | anti-Maus IgG | ALEXAFluor 594 (rot) | | |

Tabelle 3-6: Primär- und Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz.

3.5.10 sPLA₂ M-Typ-Rezeptor Bindungsstudien

Anhand der Bindungsstudien sollte die Expression des sPLA₂ M-Typ-Rezeptors auf Proteinebene in murinen Mesangiumzellen untersucht werden. Als negativ Kontrolle wurden Mesangiumzellen aus M-Typ-Rezeptor-knockout Mäusen verwendet. Das Prinzip dieser Methode besteht darin die hohe Bindungsaffinität des radioaktiv markierten Liganden zum Rezeptorprotein auszunutzen und anschließend die radioaktive Strahlung des gebundenen Liganden zu messen. Die Intensität der Strahlung ist proportional zur Expression des Rezeptorproteins.

Die Bindungsstudien wurden sowohl an frisch isolierten Zellmembranen als auch direkt an lebenden Zellen durchgeführt. Als Ligand wurde *Oxyuranus scutellatus*-Toxin 2 (OS₂) verwendet; die Markierung mit ¹²⁵ lod erfolgte wie in Lambeau *et al.* (1989) beschrieben. Der radioaktiv markierte Ligand ¹²⁵I-OS₂ (100.000 cpm) und außerdem nicht markiertes

 OS_2 als konkurrierendes Molekül wurden zusammen in Bindungspuffer für 5 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden frisch isolierte Zellmembranen (siehe 3.5.2) in einer Konzentration von 1 mg/ml zu den Liganden gegeben und für 1h bei RT inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen wurde der Mix über eine GF/C Glasfasersäule filtriert, die vorher mit 0,5% Polyethylenamin äquilibriert wurde. Der K_{0.5}- Wert ist definiert als die Konzentration des sPLA₂ Konkurrenzmolekül, welches 50% der spezifischen Bindung inhibiert.

Für Bindungsstudien an lebenden Zellen wurden die Zellen wie unter 3.3.1 beschrieben in 3,5 cm Schalen kultiviert. Nach einmaligem waschen der Zellen mit 1x PBS wurde der

radioaktiv markierte Ligand ¹²⁵I-OS₂ (200.000 cpm/ml) zu den Zellen gegeben und für 1h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit Bindungspuffer gewaschen. Durch Zugabe von 1 ml 10% NaOH wurden die Zellen lysiert und anschließend von dem Boden der Zellkulturplatte geschabt. Die Intensität der radioaktiven Strahlung wurde mit einem β -/ γ -Counter gemessen.

3.5.11 Statistik

Die erhobenen Befunde in den Zellkulturexperimenten sind als Mittelwerte aus drei unabhängigen Parallelansätzen pro Experiment (n=3) angegeben. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Student's t-Test für gepaarte Daten. Ein P-Wert von weniger als 0.05 (p < 0.05) wurde als statistisch signifikant erachtet.

Von den Ergebnissen der Immunfluoreszenz ist jeweils eine repräsentative Färbung dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Expression des spezifischen sPLA₂ M-Typ-Rezeptors und seines Liganden sPLA₂-IB in der Rattenniere

Während einer akuten Pankreatitis sind erhöhte Spiegel der sPLA₂-IB in der menschlichen Niere zu finden, welcher scheinbar dort in die verstärkte Eicosanoid-Biosynthese involviert ist (Hietaranta *et al.*, 1992; Motyoshi *et al.*, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von Ratten-Mesangiumzellen mit exogener sPLA₂-IB in der erhöhten Expression der sPLA₂-IIA resultiert, was vermutlich aber nicht über die katalytische Aktivität, sondern über die Bindung an den M-Typ-Rezeptor (MTR) vermittelt wird (Beck *et al.*, 2003).

Deshalb war es von Interesse zu untersuchen, welche Rolle die sPLA₂-IB und der MTR während einer Glomerulonephritis spielen. Für experimentelle *in-vivo*-Studien wurde das Anti-Thy1.1-Glomerulonephritis-Modell (vgl. 3.2) in der Ratte verwendet. Die *in-vitro*-Untersuchungen wurden an primären Ratten-Mesangiumzellen, Ratten-Endothelzellen und isolierten Leukozyten aus der Ratte, welche mit dem proinflammatorischen Zytokin IL-1β stimuliert wurden, durchgeführt.

4.1.1 Expression der sPLA₂-IB im Anti-Thy-1.1-Glomerulonephritis-Modell

In den folgenden Experimenten wurde die mRNA- und Protein-Expression der sPLA₂-IB während einer induzierten Anti-Thy1.1-Glomerulonephritis (Anti-Thy1.1-GN) in Ratten untersucht. Dafür wurden Gesamt-mRNA bzw. Gesamt-Protein-Extrakte aus Ratten-Nieren nach verschiedenen Zeitpunkten der Induktion der Anti-Thy1.1-GN hergestellt und mittels sq-PCR- bzw. Western-Blot-Technik die Expressionsspiegel der sPLA₂-IB analysiert.

Abbildung 4.1 (A) zeigt, dass die mRNA-Expressionsspiegel der sPLA₂-IB schon 2h nach Induktion der Anti-Thy1.1-GN im Vergleich zur Kontrolle (0h) anstiegt. Nachdem er 6h nach Induktion ein Maximum erreicht hatte, fällt er nach 24h wieder ab und erreichte nach 7-14 Tagen das Kontrollniveau. Mittels Western-Blot-Analyse (Abb. 4.1 (B)) konnte ein leichter Anstieg der sPLA₂-IB Protein-Expression 6h nach Induktion der Anti-Thy1.1-GN verzeichnet werden. Das Expressionsmaximum wurde hier nach 24h erreicht. Nach 7 bzw. 14 Tagen ist die sPLA₂-IB- Protein-Expression schon deutlich schwächer, aber noch nicht wieder auf Kontrollniveau zurückgekehrt.



Abbildung 4.1 (A+B): Expression der sPLA₂-IB während der Anti-Thy1.1-GN in Rattennieren.

Die Anti-Thy1.1-GN wurde durch Gabe des Antikörpers Thy 1.1 (OX7) wie unter 3.2 beschrieben induziert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Ratten getötet und aus den Nieren Gesamt-RNA bzw. Gesamt-Protein isoliert. (A) <u>sq-PCR</u>: 5 μ g Gesamt-RNA wurden in die RT-Reaktion eingesetzt, wovon je 2 μ l für die Durchführung der sq-PCR mit spezifischen Primerpaaren für die sPLA₂-IB (vgl. 3.4.7) verwendet wurden. Aliquots der PCR-Produkte wurden auf einem Agarosegel aufgetragen und mit Hilfe von UV-Licht visualisiert. Als Standardisierung diente GAPDH. (B) <u>Western-Blot-Analyse</u>: 100 μ g des Protein-Lysat wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Die Detektion erfolgte durch Inkubation mit einem spezifischen Erst-Antikörper gegen die Ratten-sPLA₂-IB in einer Konzentration von 1:1000, der Zweit-Antikörper wurde in einer Konzentration von 1:15.000 verwendet. Als Ladungskontrolle wurde β -Aktin detektiert. Die Experimente wurden dreimal durchgeführt und vergleichbare Ergebnisse erzielt. h= Stunde d= Tage

4.1.2 Expression der sPLA₂-IB in glomerulären Mesangiumzellen und Endothelzellen der Ratte

Wie unter 4.1 gezeigt, wird die sPLA₂-IB während der Anti-Thy1.1-GN auf mRNA- und Protein-Ebene induziert. Im Weiteren sollte nun festgestellt werden, welcher Zelltyp im Glomerulus für die sPLA₂-IB Expression verantwortlich ist und wie die sPLA₂-IB unter entzündlichen Bedingungen reguliert wird.

Hierzu wurden Mesangiumzellen und Endothelzellen aus dem Rattenglomerulus wie unter 3.3.1 beschrieben isoliert und kultiviert und mit den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β (1 nM) und TNF α (1 nM), einzeln oder in Kombination, für 24h inkubiert. Außerdem wurde geprüft, ob die sPLA₂-IB Einfluss auf ihre eigene Genexpression hat. Dafür wurden die Zellen mit exogener sPLA₂-IB (aus dem Rinder-Pankreas, 1 μ M) bzw. mit der katalytisch inaktiven Mutante dieses Enzyms, der H48Q (1 μ M), ebenfalls für 24h behandelt. Bei dem

Enzym H48Q wurde das Histidin 48 in der katalytischen Domäne gegen ein Glutamat ausgetauscht. Dies hat keinen Einfluss auf die Struktur des Enzyms, führt aber zur katalytischen Inaktivität (Janssen *et al.*, 1999). Die mRNA-Expression wurde mittels sq-PCR-Technik, die Proteinexpression mittels Western-Blot-Analyse untersucht (Abb. 4.2 (A+B)).

Abbildung 4.2 (A) zeigt, dass die sPLA₂-IB auf mRNA-Ebene unter unstimulierten Bedingungen von Endothelzellen schwach, aber konstitutiv exprimiert wurde. Mit den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β und TNF α , einzeln oder in Kombination gegeben, konnte keine weitere Erhöhung des sPLA₂-Expressionsspiegel erreicht werden. Wurden die Endothelzellen jedoch mit exogener sPLA₂-IB bzw. ihrer katalytisch inaktiven Mutante stimuliert, so fand eine starke Induktion der sPLA₂-IB Expression statt. Der Nachweis des sPLA₂-IB-Proteins in den Zellkulturüberständen zeigte, dass die Endothelzellen bereits unter unstimulierten Bedingungen die sPLA₂-IB offensichtlich konstitutiv sezernieren und dies durch die Behandlung mit den Zytokinen IL-1 β und TNF α leicht gesteigert werden konnte. Dagegen konnte in den Mesangiumzellen die sPLA₂-IB auf mRNA-Ebene nicht nachgewiesen werden.

Die Western-Blot Analyse mit den sPLA₂-IB-behandelten Zellen war technisch nicht möglich, da die exogene sPLA₂-IB wie auch die inaktive sPLA₂-IB-Mutante mit dem Antikörper kreuzreagieren.



Abbildung 4.2 (A+B): Nachweis der sPLA₂-IB in glomerulären Endothelzellen und Mesangiumzellen der Ratte.

Die Zellen wurden wie unter 3.3.2 beschrieben kultiviert und anschließend für 24h mit TNF α (1 nM), IL-1 β (1 nM), sPLA₂-IB (1 μ M) bzw. H48Q (1 μ M) stimuliert. (A) <u>sq-PCR</u>: 5 μ g Gesamt-RNA wurden in die RT-Reaktion eingesetzt, wovon je 2 μ I für die Durchführung der sq-PCR mit spezifischen Primerpaaren für die sPLA₂-IB (vgl. 3.4.7) verwendet wurden. Aliquots der PCR-Produkte wurden über auf einem Agarosegel aufgetragen und mit Hilfe von UV-Licht visualisiert. Als Standardisierung diente GAPDH. (B) <u>Western-Blot</u>: Je 2 ml Zellkulturüberstand wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Die Detektion erfolgte durch

Inkubation mit einem spezifischen Erst-Antikörper gegen die Ratten sPLA₂-IB in einer Konzentration von 1:1000, der Zweit-Antikörper wurde in einer Konzentration von 1:15.000 verwendet. Als Ladungskontrolle wurde β -Aktin detektiert. Als Positivkontrolle wurden 3 μ g rekombinantes sPLA₂-IB Protein aus dem Schwein aufgetragen. Die Experimente wurden dreimal durchgeführt und vergleichbare Ergebnisse erzielt. pos. Ktr= positiv Kontrolle Ktr= Kontrolle IB= sPLA₂-IB

4.1.3 Detektion der sPLA₂-IB in infiltrierenden Immunzellen in der Rattenniere

Wie in 4.1.2 gezeigt werden konnte, wird die sPLA₂-IB von Ratten-Endothelzellen konstitutiv exprimiert, und eine Verstärkung der Expression konnte nach Gabe von exogener sPLA₂-IB festgestellt werden. Im Folgendem sollte nun untersucht werden, ob auch Immunzellen wie Monozyten und Granulozyten, die als frühes Ereignis einer Glomerulonephritis in die Niere einwandern, eine Quelle der sPLA₂-IB-Produktion darstellen könnten (Roy-Chaudhury *et al.*, 1995). Hierzu wurden Paraffinschnitte von Kontrollnieren bzw. Nieren 6h nach Induktion der Anti-Thy1.1-GN angefertigt und immunhistologisch angefärbt. Als spezifischer Marker für Neutrophile diente der HIS-48 Antikörper, für Monozyten der ED-1 Antikörper.

Die Abbildung 4.3 (A) zeigt eine deutliche Färbung zum einen des sPLA₂-IB-Proteins (2) und zum anderen der Neutrophile (3) in den Glomeruli 6h nach Induktion der Anti-Thy1.1-GN im Vergleich zu den Kontrollnieren (1). Das Übereinanderlegen dieser Bilder zum Nachweis der Kolokalisation zeigte deutlich, dass die vermehrte sPLA₂-IB-Expression in den Neutrophilen in den Glomeruli erfolgte (4). Auch die Expression der Monozyten (Abb. 4.3 (B)-(3)) war 6h nach Induktion der Glomerulonephritis deutlich höher im Vergleich zur Kontrolle (1). Ein Teil dieser infiltierten Immunzellen war demnach für die erhöhte Expression der sPLA₂-IB verantwortlich, wie in Bild (4) durch die Kolokalisation zu sehen ist.



Abbildung 4.3 (A+B): Kolokalisation der sPLA₂-IB und der Immunzellen in Rattennieren. Kolokalisation der sPLA₂-IB und Neutrophile (HIS-48) (A) bzw. Monozyten ED-1 (B) durch immunhistologische Färbungen. Die Markierungen wurden in Paraffinschnitten von Kontrollnieren bzw. 6h nach Induktion der Anti-Thy-1.1-GN durchgeführt wie in 3.5.9.1 beschrieben. Der sPLA₂-IB Antikörper wurde in einer Konzentration von 1:400, die Antikörper HIS-48 und ED-1 von je 1:2 eingesetzt. Die Zweit-Antikörper ALEXA 488 (grün) bzw. 594 (rot) wurden in Konzentrationen von je 1:400 verwendet. Die Bilder wurden mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops aufgenommen. Vergrößerung 400x.

4.1.4 Expression des sPLA₂-M-Typ-Rezeptors unter entzündlichen Bedingungen in der Rattenniere

Studien zeigen, dass die sPLA₂-IB in der Eicosanoid-Biosynthese involviert ist (Motyoshi *et al.*, 2001), obwohl dieser Subtyp nur über geringe Kapazität verfügt, Arachidonsäure direkt aus zellulären Membranen freizusetzen (Singer *et al.*, 2002). Die sPLA₂-IB kann aber über die Bindung an den M-Typ-Rezeptor (MTR) die Freisetzung von AA initiieren (Ancian *et al.*, 1995; Lambeau und Lazdunski, 1999). Da die sPLA₂-IB von glomerulären Endothelzellen, als auch von einwandernden Neutrophilen und Monozyten exprimiert wird (vgl. 4.1.2 und 4.1.3) war nun von Interesse, ob der MTR in der Niere exprimiert wird. Des Weiteren sollte auch untersucht werden, ob er unter entzündlichen Bedingungen *in-vitro* und *in-vivo* hochreguliert wird.

4.1.4.1 In-vivo Expression des MTR in Rattennieren

Die Regulation der Expression des MTR sollte mittels Immunfluoreszenz-Detektion untersucht werden. Paraffinschnitte von Kontrollnieren und von Nieren 6h nach Induktion der Anti-Thy1.1-GN wurden mit einem spezifischen Antikörper gegen den Ratten-MTR markiert. In Abbildung 4.4 ist zu sehen, dass 6h nach Induktion einer Anti-Thy1.1-GN eine deutliche Induktion der MTR-Expression im Glomerulus zu erkennen war (B), während in den Kontrollnieren (A) kein MTR-Protein zu detektieren war.



Abbildung 4.4 (A+B): Expression des MTRs während einer Anti-Thy1.1-GN in der Rattenniere.

Die Markierungen wurden in Paraffinschnitten von Kontrollnieren (A) bzw. 6h nach Induktion der Anti-Thy1.1-GN (B) durchgeführt. Der MTR Antikörper wurde in einer Konzentration von 1:10 eingesetzt. Der Fluorochrom-gekoppelte Zweit-Antikörper ALEXA 488 (grün) wurde in Konzentration von 1:400 verwendet. Die Auswertung erfolgte an einem Konfokalen Laser-Scanning Mikroskop. Vergrößerung 630x.

4.1.4.2 In-vitro Expression des MTR in glomerulären Zellen der Rattenniere

Die *in-vitro*-Studien wurden an primären glomerulären Mesangiumzellen und Endothelzellen durchgeführt. Die Zellen wurden wie unter 3.3.1.2 beschrieben kultiviert und anschließend für 24h mit dem proinflammatorischem Zytokin IL-1 β in einer Konzentration von 1 nM stimuliert. mRNA bzw. Protein wurde isoliert und mittels sq-PCR bzw. Western-Blot die Expression des MTRs analysiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass unstimulierte primäre Mesangiumzellen (Ktr=Kontrolle) den MTR weder auf mRNA- noch auf Protein-Ebene exprimierten (Abb. 4.5 (A+B)). Die Stimulation mit IL-1 β aber verursachte eine deutliche Induktion dieses Gens. In den glomerulären Endothelzellen wurde der MTR konstitutiv auf mRNA-Ebene schwach exprimiert, und auch hier fand durch eine Behandlung mit IL-1 β eine starke Hochregulation sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene statt.



Abbildung 4.5 (A+B): Nachweis des MTRs in glomerulären Endothel- und Mesangiumzellen der Ratte.

Die Zellen wurden wie unter 3.3.1.2 beschrieben kultiviert und anschließend für 24h mit IL-1 β (1 nM), stimuliert. (A) <u>sq-PCR</u>: Für die sq-PCR wurde Gesamt-RNA isoliert und je 5 µg in die RT-Reaktion eingesetzt, wovon je 2 µl für die Durchführung der sq-PCR mit spezifischen Primerpaaren für den MTR (vgl. 3.4.7) verwendet wurden. Als Standardisierung diente GAPDH. (B) <u>Western-Blot</u>: Je 100 µg Protein-Lysat wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Die Detektion erfolgte durch Inkubation mit einem spezifischen Erst-Antikörper gegen den Ratten-MTR in einer Konzentration von 1:500, der Zweit-Antikörper wurde in einer Konzentration von 1:15.000 verwendet. Als Ladungskontrolle diente β -Aktin. Als positiv Kontrolle wurden 2 ng rekombinantes MTR Protein aufgetragen. Die Experimente wurden dreimal durchgeführt und vergleichbare Ergebnisse erzielt. Die pos. Ktr= Positivkontrolle Ktr= Kontrolle MTR = M-Typ-Rezeptor

4.2 Untersuchungen zur Expression und Regulation der murinen sPLA₂s und des M-Typ-Rezeptors (MTR) in MTRknockout-Mäusen

Bisher stehen spezifische Antagonisten des MTR nicht zur Verfügung, die helfen könnten, dessen Rolle in proinflammatorischen Signaltransduktionsprozessen aufzuklären. Eine elegante Alternative ist die Herstellung einer MTR-knockout-Maus, um nach Isolierung von Organen und Zellen gezielte pharmakologische Fragestellungen zu Signaltransduktions-mechanismen bearbeiten zu können.

Die MTR-knockout-Maus wurde wie unter 3.1 beschrieben generiert und uns von Dr. Kohji Hanasaki, Shionogi Research Laboratries, Osaka, Japan zur Verfügung gestellt. Durch das Einfügen eines Resistenz-Gens in den Wildtyp-Stamm C57BL/6 wurde das

Translations-Start-Codon zerstört, sodass diese Maus nicht mehr in der Lage ist, das MTR-Protein zu exprimieren (Hanasaki *et al.*, 1997). Als Kontrollstamm wurde die C57BL/6-Maus verwendet. Aus beiden Mausstämmen wurden, wie unter 3.3.1.1 beschrieben, glomeruläre Mesangiumzellen isoliert und als Zellkulturmodelle verwendet.

4.2.1 Charakterisierung von Wildtyp-Maus-Mesangiumzellen

4.2.1.1 Überprüfung der Reinheit der Mesangiumzellkultur

Glomeruläre Mesangiumzellen wurden aus den Nieren von 5 Wochen alten C57BL/6 Wildtypmäusen isoliert und anschließend kultiviert (vgl. 3.3.1). Da in den Glomeruli neben Mesangiumzellen noch andere Zelltypen wie Endothel- und Epithelzellen vorhanden sind, sollte geprüft werden, ob durch die Isolierungsprozedur eine reine Mesangiumzellkultur erhalten worden war.

Bis jetzt konnten noch keine eindeutigen und zuverlässigen Marker spezifisch für Mesangiumzellen identifiziert werden. Allerdings können durch verschiedene spezifische Marker die Anwesenheit von Endothel- und Epithelzellen in der Kultur ausgeschlossen werden (Radeke et al., 1994). Hierzu wurden immunzytologische Färbungen wie unter 3.5.9.2 beschrieben durchgeführt. Zum Einen wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen "smooth muscle"-Aktin markiert, auf das nur Mesangiumzellen aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu glatten Muskelzellen positiv reagieren, nicht aber Endothel- oder Epithelzellen, die dieses Protein nicht exprimieren. Zum anderen wurde eine Markierung mit Zytokeratin, einem spezifischen Marker für Endothel- und Epithelzellen durchgeführt. Hier konnte bei Mesangiumzellen keine Färbung gezeigt werden. Durch diese Färbungen sowie durch die morphologisch charakteristische sternförmige Gestalt der Mesangiumzellen konnte gezeigt werden, dass es sich um eine reine Mesangiumzellkultur handelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.6 dargestellt. Die gleichen Untersuchungen wurden mit Mesangiumzellen aus MTR-knockout-Mäusen durchgeführt und zeigten das gleiche Ergebnis (nicht dargestellt).



Abbildung 4.6 (A-C): Charakterisierung der Mesangiumzellkultur durch immunzytologische Färbungen.

Immunzytologische Färbungen: Die Mesangiumzellen wurden auf Deckgläschen kultiviert, anschließend fixiert und permeabilisiert. Nach Blockieren mit 0.5% BSA wurden die Zellen mit den jeweiligen Erst-Antikörpern inkubiert und anschließend mit einem Fluorochrom-gekoppelten Zweit-Antikörper behandelt. Die Bilder wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops aufgenommen. (A) Erst-Antikörper: *"smooth muscle"*-Aktin in der Konzentration 1:500, Vergrößerung 400x (B) Erst-Antikörper, Vergrößerung 400x. Bei allen drei Experimenten wurde als Zweit-Antikörper AlexaFluor 488-gekoppeltes anti-Maus IgG in der Konzentration 1: 600 verwendet.

4.2.1.2 Proliferation von murinen Mesangiumzellen in Kultur

Da keine Erfahrungswerte in der Kultivierung von Mesangiumzellen aus der Maus vorlagen, sollte das Proliferationsverhalten der Zellen unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen untersucht werden. Dazu wurden die Zellen wie unter 3.3.1.2 beschrieben in einer Dichte von $0,25 \times 10^5$ Zellen pro Ø3,5 cm-Schale in Kulturmedium ausgesät und in einem Inkubator bei 37° C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ kultiviert. Nach der jeweiligen Kultivierungsdauer (1-4 Tage) wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin von der Kulturschale gelöst und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

In Abbildung 4.7 ist eine Proliferationskurve der Maus-Mesangiumzellen dargestellt. Tag 0 kennzeichnet den Tag der Aussaat. Die Wachstumskurve zeigt bis zu Tag 3 einen proportionalen Verlauf. Von Tag 3 zu Tag 4 ist keine weitere Zunahme der Zellzahl mehr zu verzeichnen. Zur Stimulation wurden die Zellen nach Aussaat zwei Tage in serumhaltigem Kulturmedium bis zu einer Konfluenz von ca. 70% kultiviert. Während der folgenden 24h in serumfreien Medium als Vorbereitung auf die Stimulation, konnte weiterhin eine geringe Proliferation der Zellen verzeichnet werden (Daten nicht gezeigt).

Mesangiumzellen isoliert aus MTR-knockout-Mäusen zeigten das gleiche Proliferationsverhalten wie Wildtyp-Mesangiumzellen (Daten nicht dargestellt).



Abbildung 4.7: Proliferationskurve von unstimulierten Maus-Mesangiuzellen in Kultur. Maus-Mesangiumzellen wurden in einer Dichte von 0,25 x 10⁵ Zellen pro \emptyset 3,5 cm-Schale in Kulturmedium ausgesät und in einem Inkubator bei 37° C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ kultiviert. Nach der jeweiligen Kultivierungsdauer (1-4 Tage) wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin von der Zellkulturschale gelöst und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Experimente wurden dreimal durchgeführt und vergleichbare Ergebnisse erzielt.

4.2.2 Untersuchungen zur mRNA-Expression des MTR in Nieren von Wildtyp- und MTR-knockout-Mäusen sowie in isolierten Maus-Mesangiumzellen

Für diese Untersuchungen wurde Gesamt-RNA aus isolierten Nieren bzw. subkonfluenten Mesangiumzellkulturen von Wildtyp- und MTR-knockout-Mäusen nach der Trizol[®]-Methode isoliert (vgl. 3.4.1). Mit der RNA wurde eine Reverse-Transkriptase-Reaktion (RT-Reaktion) und anschließende sq-PCR durchgeführt (vgl. 3.4.6 und 3.4.7).

Die qualitative Analyse in Abbildung 4.8 zeigt, dass in den Nieren von Wildtyp-Mäusen (A) und in den Mesangiumzellen (B) mRNA für den MTR detektiert werden konnte. Ebenso konnte auch in den MTR-knockout Mäusen spezifische MTR-mRNA nachgewiesen werden. Dies ist jedoch nicht überraschend, da nur die Proteinsynthese des MTR ausgeschaltet wurde, nicht jedoch die Transkription der MTR-mRNA.



Abbildung 4.8 (A+B): mRNA-Expression des MTRs in Wildtyp- bzw. MTR-knockout-Mäusen. (A) RNA-Isolierung aus schockgefrorenen Nieren von Wildtyp- bzw. MTR-knockout-Mäusen. (B) RNA-Isolierung aus subkonfluenten Mesangiumzellkulturen aus Wildtyp bzw. MTRknockout-Mäusen. Zuvor wurden die Zellen 24h serumfrei inkubiert. Für die sq-PCR wurde Gesamt-RNA isoliert und je 5 µg in die RT-Reaktion eingesetzt, wovon je 2 µl für die Durchführung der sq-PCR mit spezifischen Primerpaaren für den MTR (vgl. 3.4.7) verwendet wurden. Als Standardisierung diente GAPDH. WT= Wildtyp KO= knockout MTR= M-Typ-Rezeptor.

4.2.3 Untersuchungen zur Protein-Expression des M-Typ-Rezeptors in Wildtyp- und MTR-knockout-Mäusen

Im Folgenden sollte die Expression des MTRs auf Proteinebene untersucht werden. Hier wurde ein negatives Ergebnis bei den MTR-knockout–Mäusen erwartet

4.2.3.1 Nachweis des MTRs mittels Western-Blot-Analyse

Die Nieren wurden aus fünf Wochen alten C57BL/6 Wildtyp- bzw. MTR-knockout Mäusen isoliert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zu einem späteren Zeitpunkt wurden die Nieren aufgetaut und zur Isolierung von Proteinen im Gemisch mit dem entsprechenden Homogenisierungspuffer im Ultraturrax zerkleinert (vgl. 3.5.1). Die Mesangiumzellen aus Wildtyp- bzw. MTR-knockout-Mäusen wurden wie unter 3.3.1.2 beschrieben kultiviert und für den Versuch 24h serumfrei inkubiert. Die weitere Präparation der Zelllysate sowie die Isolierung und Auftrennung der Proteine erfolgte wie in 3.5.1 und 3.5.8 beschrieben. Die Immundetektion wurde mit einem polyklonalen Antikörper gegen den MTR durchgeführt, als Positivkontrolle diente rekombinantes MTR-Protein. Beides wurde uns von Dr. G. Lambeau, Valbonne/Frankreich zur Verfügung gestellt. Das Zellprotein wurde unter nicht-reduzierenden Bedingungen analysiert; die Inkubationsbedingungen für den MTR-Antikörper sind der Tabelle 3-5 zu entnehmen.

In Abbildung 4.9 (A) ist gezeigt, dass das ca. 180 kDa große MTR-Protein im Proteinextrakt der ganzen Nieren der Wildtypmäuse detektiert werden konnte. Im Proteinextraxt der Nieren von MTR-knockout-Mäusen konnte erwartungsgemäß keine Proteinbande detektiert werden. Dies ist der Nachweis, dass die MTR-knockout Mäuse nicht in der Lage sind MTR Protein zu exprimieren, obwohl mRNA des MTRs in der Zelle vorliegt. Zugleich wurde damit die Spezifität des MTR-Antikörpers bestätigt, da keine

81

weiteren Banden in den MTR-knockout-Proteinproben erkannt wurden. Dass die Positivkontrolle bei einer geringeren Größe detektiert wurde (ca. 150 kDa) ist damit zu erklären, dass hier rekombinantes Protein des löslichen Rezeptors verwendet wurde. Dieser ist etwas kleiner als die membrangebunde Form des MTRs (Higashino *et al.*, 2002). In den Lysaten von kultivierten Mesangiumzellen sowohl von Wildtyp- als auch MTR-knockout-Mäusen war kein Nachweis des Rezeptor-Proteins möglich (Abbildung 4.9 (B)). Es konnte nur das rekombinante MTR-Protein, welches als Positivkontrolle diente, detektiert werden. Daraus lässt sich schließen, dass das MTR-Protein, welches unter nichtentzündlichen Bedingungen in der Niere von gesunden C57BL/6-Wildtyp-Mäusen exprimiert wird, nicht von den Mesangiumzellen stammt.



Abbildung 4.9: Detektion des MTR-Proteins in ganzen Nieren und in isolierten Mesangiumzellen von Wildtyp- bzw. MTR-knockout-Mäusen.

(A) Nachweis des MTR in ganzen Nieren von Wildtyp- (WT) bzw. MTR-knockout-Mäusen (KO). (B) Nachweis des MTR in Mesangiumzellkulturen von WT bzw. KO-Mäusen. <u>Western-Blot:</u> 250 μg Gesamt-Protein wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Der Nachweis des MTR erfolgte mit einem spezifischen Antikörper in einer Konzentration von 1:1.000; der Zweit-Antikörper wurde in einer Konzentration von 1:10.000 eingesetzt. Als Positivkontrolle diente 2 ng rekombinantes MTR-Protein. pos. Ktr= Positivkontrolle

4.2.3.2 Nachweis des MTR mittels Rezeptor-Bindungsstudien

Zur weiteren Identifizierung des MTR auf Proteinebene in Wildtyp-Mesangiumzellen wurden Bindungsstudien durchgeführt (vgl. 3.5.10). Diese Bindungsstudien sind wesentlich sensitiver als die Western-Blot-Analyse, da 1 fmol MTR-Protein/mg Gesamtprotein bzw. 1 fmol MTR-Protein/1 Mio. Zellen detektiert werden kann. Das Prinzip dieser Methode besteht darin, die hohe Bindungsaffinität des radioaktiv markierten Liganden zum Rezeptorprotein auszunutzen und anschließend die radioaktive Strahlung

des gebundenen Liganden zu messen. Die Intensität der Strahlung ist proportional zur Expression des Rezeptorproteins. Die Bindungsstudien wurden sowohl an frisch isolierten Zellmembranen (vgl. 3.5.2) als auch direkt an lebenden Zellen durchgeführt. Als Negativkontrolle wurden Mesangiumzellen aus MTR-knockout-Mäusen verwendet. Als spezifischer Ligand für den MTR wurde *Oxyuranus scutellatus*-Toxin 2 (OS₂) verwendet; die Markierung mit ¹²⁵ lod erfolgte wie in Lambeau *et al.* (1989) beschrieben.

In diesen Untersuchungen konnte keine spezifische Bindung des OS₂-Liganden an Zellmembranproteine der Wildtyp-Mesangiumzellen bzw. direkt an lebenden Zellen nachgewiesen werden. Dies bestätigt, dass murine Wildtyp-Mesangiumzellen unter nichtentzündlichen Bedingungen keine nachweisbaren Mengen an MTR-Protein exprimieren.

Um zu prüfen, ob der MTR in Mesangiumzellen unter proinflammatorischen Bedingungen induziert wird, wurden die Zellen mit einem Mix aus proinflammatorischen Zytokinen (TNF α – 0,5 nM, IL-1 β – 0,25 nM und IFN γ – 5 ng/ml) wie unter 3.3.2 beschrieben stimuliert. Aus diesen Zellen wurde Zelllysat bzw. Zellmembranen präpariert und eine Western-Blot-Analyse mit anschließender Immundetektion bzw. Bindungsstudien durchgeführt. Auch bei diesen Experimenten konnte keine Proteinexpression des MTRs in Mesangiumzellen der Wildtyp-Mäuse nachgewiesen werden.

Da das Protein des MTR in Wildtyp-Mesangiumzellen der Maus nicht exprimiert zu sein scheint (vgl. 4.2.2), war es nicht sinnvoll, Studien bezüglich der Rolle des Rezeptors im Vergleich zu Mesangiumzellen aus M-Typ-Rezeptor-knockout Mäusen durchzuführen. Deshalb wurden in den folgenden Untersuchungen nur noch Wildtyp-Mesangiumzellen als Zellsystem verwendet.

4.3 Charakterisierung der Phospholipasen A₂ in Maus-Mesangiumzellen

Nicht nur die cPLA₂, sondern auch sPLA₂s sind in der Lage, Fettsäuren aus zellulären Membranen freizusetzen. Daher können sie in vielen Organen sowohl physiologische als auch pathophysiologische Prozesse auslösen oder verstärken. In Mesangiumzellen der Rattenniere wurden hauptsächlich die Expression und Regulation der sPLA₂-IIA und -V untersucht (vgl. 1.5.2.2). Über das Expressionsmuster der sPLA₂s in murinen Mesangiumzellen lagen zu Beginn der Studien noch keine Informationen vor. Um zu untersuchen, welche der zehn bislang in Säugern identifizierten sPLA₂-Subtypen in murinen Mesangiumzellen unter unstimulierten Bedingungen auf mRNA-Ebene exprimiert werden, wurde eine Realtime-PCR wie unter 3.4.8 beschrieben für alle sPLA₂-Subtypen sowie zum Vergleich für die cPLA₂- α und die iPLA₂ durchgeführt.

Je 5 µg Gesamt-RNA wurden zu cDNA revers transkribiert (vgl. 3.4.6) und zusammen mit den jeweils spezifischen Primern in den PCR-Reaktionsansatz gegeben. Die Sequenzen der Primer sind in Tabelle 2-1 dargestellt. Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abbildung 4.10 graphisch dargestellt.

Es konnte gezeigt werden, dass die mRNA Expression der verschiedenen PLA₂s in murinen Mesangiumzellen relativ zueinander große quantitative Unterschiede aufweist. Die höchste Expression zeigt die sPLA₂-XIIA. Erwartungsgemäß waren auch die iPLA₂ und cPLA₂ stark exprimiert. Die sPLA₂-IB, sPLA₂-IIE, sPLA₂-III, sPLA₂-V und sPLA₂-X konnten auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden, jedoch in wesentlich geringerem Maße im Vergleich zur sPLA₂-XIIA. Die sPLA₂-IIC, sPLA₂-IID, sPLA₂-IIF und sPLA₂-XIIB konnten nicht detektiert werden.



Abbildung 4.10: mRNA-Expression der verschiedenen sPLA₂-Enzyme in murinen Mesangiumzellen.

<u>Realtime-PCR:</u> 5 µg Gesamt-RNA wurden in die RT-Reaktion eingesetzt und in cDNA umgewandelt. Mit Hilfe einer Realtime-PCR und den jeweiligen spezifischen Primern (vgl. Tab.2-1) konnte die jeweilige Expressionstärke der einzelnen Subtypen ermittelt werden. Die Reaktion wurde in einem GeneAmp 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der GeneAmp 5700 SDS Software. Die Werte sind auf die Werte der gemessenen GAPDH normiert; der höchste Wert mouse Group XIIA (mGXIIA) wurde auf 100% gesetzt. Die Experimente wurden dreimal durchgeführt und vergleichbare Ergebnisse erzielt.

4.4 Die Regulation von Phospholipasen A₂ in Maus-Mesangiumzellen unter entzündlichen Bedingungen

4.4.1 Nachweis der mRNA- und Protein-Expression der sPLA₂s

Bisher gab es keine Untersuchungen zur Regulation der sPLA₂-Expression in Maus-Mesangiumzellen durch proinflammatorische Cytokine. Daher wurde die Expression dieser Enzyme unter inflammatorischen Bedingungen analysiert. Die Wildtyp Maus-Mesangiumzellen wurden wie unter 3.3.1.2 beschrieben kultiviert und mit dem Mix aus den proinflammatorischen Zytokinen TNF α - 0,5 nM, IL-1 β - 0,25 nM und IFN γ - 5 ng/ml für 24h behandelt. Zuerst wurden alle sPLA₂-Subtypen sowie die cPLA₂ und iPLA₂ bezüglich ihrer mRNA-Expression mittels sq-PCR untersucht. Die Ergebnisse wurden anschließend mit der Methode der Realtime-PCR bestätigt.

Die Subtypen sPLA₂-IB, -X und -XIIA werden bereits unter unstimulierten Bedingungen konstitutiv exprimiert, und nach Inkubation mit entzündlichen Zytokinen ist keine Veränderung der Expression auf mRNA-Ebene feststellbar (Abb. 4.11 (A), (E) und (F)). Bei der sPLA₂-IIE konnte nach Zytokin-Stimulation ein leichter Anstieg, etwa um das 2fache, der mRNA-Expression gemessen werden (Abb. 4.11 (B)); bei der cPLA₂ und der iPLA₂ konnte ebenfalls eine Hochregulation der mRNA-Expression verzeichnet werden, nämlich um das 3-fache (Abb. 4.11 (G)) bzw. 2,5-fache (Abb. 4.11 (H)). Eine deutliche Herunterregulierung der mRNA-Expression nach Behandlung mit proinflammatorischen Zytokinen konnte bei den sPLA₂s-III und -V gezeigt werden (Abb. 4.11 (C) und (D)). Die Expression war um etwa das 6fache niedriger als unter unstimulierten Bedingungen.

Auch unter entzündlichen Bedingungen werden nur diejenigen sPLA₂s exprimiert, welche auch unter Kontroll-Bedingungen nachgewiesen wurden (vgl. Abb. 4.10). Eine Neuinduktion der Genexpression einer sPLA₂ durch proinflammatorische Zytokine konnte nicht beobachtet werden.

Abbildung 4.11 (A-I): Die mRNA-Expression von Phospholipasen A₂ in Maus-Mesangiumzellen unter Kontroll- und proinflammatorischen Bedingungen.

Die Mesangiumzellen wurden für 24h mit einem Mix aus proinflammatorischen Zytokinen behandelt (vgl. 3.3.2) und anschließend für die RNA-Isolierung geerntet. 5 μ g wurden in die RT-Reaktion eingesetzt, mit der eine sq-PCR (vgl. 3.4.7) bzw. Realtime-PCR (vgl. 3.4.8) für die verschiedenen PLA₂s durchgeführt wurde. Als Abgleich diente GAPDH (I). Die Ergebnisse der Realtime-PCR wurden auf GAPDH normiert und sind hier graphisch dargestellt. Die Experimente wurden dreimal durchgeführt und vergleichbare Ergebnisse erzielt. Ktr = Kontrolle ZM = Zytokin-Mix



Nachdem in Maus-Mesangiumzellen die mRNA-Expression für die sPLA₂-IB, IIE, -III, -V, -X und -XIIA gezeigt werden konnte, sollten diese nun auch auf Protein-Ebene untersucht werden. Die Zellen wurden ebenfalls für 24h mit proinflammatorischen Zytokinen (TNFα -0,5 nM, IL-1β-0,25 nM und IFNγ- 5 ng/ml) inkubiert und anschließend zur Proteinisolierung (vgl. 3.5.1) geerntet. Da die sPLA₂s Enzyme sind, welche potentiell von den Zellen sezerniert werden können, wurden auch die Zellkulturüberstände der Versuche gesammelt und Protein aus ihnen isoliert. Die Präzipitation der Proteine aus Zelllysat oder Zellkulturüberständen erfolgte mit Trichloressigsäure wie unter 3.5.4 beschrieben. Die gefällten Proteine wurden unter nicht-reduzierenden Bedingungen mittels einer SDS-PAGE getrennt. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der Western-Blot-Methode (vgl. 3.5.8). Die Immundetektion erfolgte mit polyklonalen Antikörpern gegen die verschiedenen Subtypen der sPLA2s. Die Antikörper wurden uns von Dr. G. Lambeau, Valbonne/ Frankreich und Prof. Michael. Gelb, Seattle/ USA zur Verfügung gestellt, wo sie zuvor auf ihre Spezifität überprüft wurden (Singer et al., 2002). Als Positivkontrolle diente rekombinantes Protein des jeweiligen sPLA₂-Subtyps. In 1,5 ml gefällten Zellkulturüberständen konnten die sPLA₂-IB, -V und -X immunologisch detektiert werden (vgl. Abb. 4.12). Sowohl bei der sPLA₂-IB auch als bei der -X waren keine Expressionsunterschiede zwischen der Kontrolle und den Zytokin-behandelten Proben zu erkennen. Dies entspricht dem Expressionmuster auf mRNA-Ebene (vgl. Abb. 4.11 (A) und (E)). Bei der sPLA₂-V scheint es, dass die Proteinexpression unter entzündlichen Bedingungen etwas schwächer ist als der Kontrollwert, was auch schon auf mRNA-Ebene zu sehen war (vgl. Abb. 4.11 (D)). Die sPLA₂-IIE konnte mit dem entsprechenden Antikörper nicht detektiert werden.

Auf den Membranen, auf denen 200 µg gefälltes **Zelllysat** aufgetragen wurde, konnten mit den zur Verfügung stehenden Antikörpern dagegen keine sPLA₂-Proteine detektiert werden (Daten nicht dargestellt).



Abbildung 4.12: Proteinexpression von sPLA₂s in Maus-Mesangiumzellen unter Kontrollund entzündlichen Bedingungen.

Die Maus Mesangiumzellen wurden für 24h mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF α - 0,5 nM, IL-1 β -0,25 nM und IFN γ - 5 ng/ml behandelt. Je 1,5 ml der Zellkulturüberstände wurden mit TCA gefällt und unter nicht-reduzierenden Bedingungen in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die Western-Blot-Analyse wurde mit den spezifischen Antikörpern des jeweiligen sPLA2-Subtyps in einer Konzentration von 1:150 durchgeführt. Der Zweit-Antikörper Meerrettich-Peroxidase-gekoppeltes Esel-anti-Kaninchen IgG wurde in einer Konzentration von 1:10.000 verwendet. Als Positivkontrollen wurden je 2 ng des rekombinanten Proteins aufgetragen. Als Ladungskontrolle diente das Coomassieblue-angefärbte Proteingel. Die Experimente wurden dreimal durchgeführt und vergleichbare Ergebnisse erzielt. pos. Ktr = Positivkontrolle Ktr = Kontrolle ZM = Zytokin-Mix

Zusammenfassend zu diesen Analysen kann gesagt werden, dass in Maus-Mesangiumzellen auf mRNA-Ebene die sPLA₂-IB, sPLA₂-IIE, sPLA₂-III, sPLA₂-V, sPLA₂-X und sPLA₂-XIIA exprimiert werden. Nach der Behandlung mit proinflammatorischen Zytokinen konnte eine schwächere Expression der sPLA₂-III und sPLA₂-V festgestellt werden, wogegen die sPLA₂-IIE nach dieser Stimulation etwas stärker exprimiert wurde. Auf die mRNA-Expression der sPLA₂-IB, sPLA₂-X und sPLA₂-XIIA hat der Zytokin-Mix keinen Effekt.

Auf Protein-Ebene konnten nur die sPLA₂-IB, -V und -X in Zellkulturüberständen nachgewiesen werden. Die Expression der sPLA₂-IB und sPLA₂-X blieb nach Stimulation mit dem Zytokin-Mix unverändert, während das Protein der sPLA₂-V unter entzündlichen Bedingungen herunterreguliert wurde. Die sPLA₂-IIE konnte in Zellkulturüberständen nicht nachgewiesen werden. In Zellysaten konnten die sPLA₂-IB, sPLA₂-IIE, sPLA₂-V und sPLA₂-X weder in der Kontrolle noch nach Stimulation mit dem Zytokin-Mix detektiert

werden. Die sPLA₂-III und -XIIA konnten als Proteine nicht untersucht werden, da keine spezifischen Antikörper zur Verfügung standen.

4.4.2 Untersuchung der sPLA₂-Aktivität in den Zellkulturüberständen von Maus-Mesangiumzellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Maus-Mesangiumzellen die Proteine der sPLA2-IB, sPLA₂-V und sPLA₂-X sezernieren, wurde nun die Aktivität dieser Enzyme im Zellkulturüberstand gemessen. Dazu wurden die Zellkulturüberstände der Mesangiumzellen nach 24-stündiger Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen $(TNF\alpha, IL-1\beta \text{ und } IFN\gamma)$ bzw. den entsprechenden Kontrollwerten geerntet und die enzymatische Aktivität der sPLA2s mit Hilfe von [1-C14] Ölsäure-markierten E.coli-Membranen als Substrat bestimmt. Die durch die Enzymaktivität der sPLA₂ freigewordene $[1-C^{14}]$ -Ölsäure wurde mit Hilfe eines β -Flüssigkeitsszintillationszählers gemessen (vgl. 3.5.5). Eine Unterscheidung zwischen den einzelnen sPLA₂-Enzymen ist bei dieser Messung nicht möglich.

Bei der Messung der eingesetzten 20 µl Zellkulturüberstand von stimulierten und nichtstimulierten Mesangiumzellen konnte keine sPLA₂-Aktivität gemessen werden, obwohl sie als Protein im Überstand nachgewiesen worden waren. Ursache hierfür kann sein, dass die sezernierten Proteinmengen sehr gering sind, sodass deren Aktivität unter der Nachweisgrenze dieses Tests liegt.

4.4.3 Auswirkungen von sPLA₂- und cPLA₂-Inhibitoren auf die Genexpression der Phospholipasen A₂

In Kapitel 4.3 ist das Expressionsmuster von PLA₂s in Maus-Mesangiumzellen dokumentiert. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Subtypen der sPLA₂ sowie die cPLA₂ und iPLA₂ unter Kontrollbedingungen konstitutiv von diesen Zellen exprimiert werden.

Frühere sog.,*cross-talk*"-Untersuchungen haben gezeigt, dass in Rattenmesangiumzellen, die mit exogenen sPLA₂s behandelt wurden, die cPLA₂ aktiviert wurde (Huwiler *et al.* 1997), und umgekehrt, dass in Mausmakrophagen P388D1 die endogene cPLA₂-Aktivität und die nachgeschaltete Eicosanoid-Biosynthese nötig sind, um die Expression der sPLA₂-V zu induzieren (Shinohara *et al.*, 1999).

Daher war von Interesse, ob in den Maus-Mesangiumzellen eine ähnliche Beeinflussung der Signaltransduktion durch die Aktivitäten der zellulären oder eventuell sezernierten Phospholipasen A₂ stattfindet. Sowohl für die sekretorischen als auch für die cytosolischen Phospholipasen standen uns spezifische Inhibitoren zu Verfügung.

Der spezifische **sPLA₂-Inhibitor Methyl-Indoxam** (Me-IDX) ist ein Indol-Analogon, welches im katalytischen Zentrum der sPLA₂ bindet und damit die Enzymaktivität blockiert (IC₅₀ = 0,01- 0,02 μ M). Da dieser Inhibitor aufgrund seiner Struktur nicht die Zellmembran passieren kann, hemmt er in Zellkultur-Versuchen ausschließlich die extrazellulär vorhandenen sekretorischen Phospholipasen A₂ (Smart *et al.*, 2004).

Zur Hemmung der cytosolischen PLA₂ stehen verschiedene Inhibitoren zur Verfügung. In diesem Experiment wurde der **cPLA₂α-Inhibitor Pyrrolidin-1** (PYR-1) aus der Klasse der Pyrrolidin-haltigen Verbindungen gewählt. Er ist ein sehr potenter cPLA₂- α -Inhibitor (IC₅₀ = 0,2-0,5 μ M), hat aber keine inhibitorischen Effekte auf die sPLA₂s (Ghomaschi *et al.*, 2001). PYR-1 ist ladungsneutral und kann somit die Zellmembran passieren und ist daher für den Einsatz in Zellkulturexperimenten geeignet.

Im Folgenden wurden Maus-Mesangiumzellen mit Me-IDX in einer Konzentration von 3 μ M und PYR-1 ebenfalls in einer Konzentration von 3 μ M für 24h stimuliert. Dies sind Konzentrationen, die eine maximale Inhibition der Enzymaktivitäten erwarten lassen.

Dieser Versuch wurde unter Kontroll-Bedingungen bzw. unter gleichzeitiger Stimulation mit dem Zytokin-Mix TNF α (0,5 nM), IL-1 β (0,25 nM) und IFN γ (5 ng/ml) durchgeführt. Anschließend wurde die mRNA isoliert und mittels Realtime-PCR die Expression der verschiedenen PLA₂-Gene analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.13 (A-H) dargestellt.

Veränderungen in der Genexpression, die kleiner als das dreifache des Kontrollwertes sind, wurden als nicht-signifikant angesehen. Die Analysen zeigen, dass bei der Expression der sPLA₂-IB, -IIE und –V, sowie der iPLA₂ und cPLA₂ weder der sPLA₂-Inhibitor Me-IDX noch der cPLA₂- α -Inhibitor PYR-1 inhibitorische Effekte ausübten (vgl. Abb. 4.15 A+ B+ D+ G+ H).

In Bild C ist die einzige deutliche Änderung allein durch die Zytokinstimulation zu sehen, nämlich die Abnahme der sPLA₂-III-Expression. Diese Reduktion wurde durch die gleichzeitige Gabe von PYR-1 partiell aufgehoben, d.h. die Zytokin-induzierte Abnahme wäre cPLA₂-vermittelt.

Dagegen wurde die sPLA₂-X durch die Kombination von PYR-1 und Zytokinen deutlich herunterreguliert, während die Zytokine allein kaum einen Effekt hatten (Bild E). Bei der Expression der sPLA₂-XIIA (Bild F) ist zu sehen, dass sich mit sPLA₂-Inhibitor Me-IDX die

Expression verstärkte. Auch die Expression der sPLA₂-XIIA wurde durch die Kombination von Zytokin-Mix und PYR-1 reduziert.

Diese Ergebnisse deuten auf eine komplexe, cPLA₂-vermittelte Regulation der intrazellulären sPLA₂s hin, die in zukünftigen Untersuchungen im Einzelnen genauer hinterfragt werden muss.



Abbildung 4.13 (A-H): Effekte von spezifischen PLA₂-Inhibitoren auf die Genexpression von sPLA₂s (A-F), iPLA₂ (G) und cPLA₂ (H).

Die Zellen wurden 24h mit den Inhibitoren Me-IDX bzw. PYR-1 je in der Konzentration von 3 μ M stimuliert. Die Zellen wurden unter Kontrollbedingungen bzw. entzündlichen Bedingungen (zusätzliche Gabe des Zytokin-Mixs) inkubiert. Die Analyse der Genexpression erfolgte mittels Realtime-PCR (vgl. 3.4.8). Die Reaktion wurde in einem GeneAmp 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte der GeneAmp 5700 SDS Software. Die Werte wurden auf GAPDH normiert. Die Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt, die folgenden Werte in xfache Veränderung darauf bezogen. Werte zwischen 3 und -3 wurden als nicht signifikante Veränderungen angesehen. Die Experimente wurden dreimal durchgeführt und vergleichbare Ergebnisse erzielt. Me-IDX = Methyl-Indoxam PYR-1 = Pyrrolidin-2 ZM = Zytokin-Mix

4.5 Die Regulation von Entzündungsmediatoren in Maus-Mesangiumzellen unter entzündlichen Bedingungen

Um in späteren Untersuchungen einen *"cross-talk"* zwischen sPLA₂-Enzymen und weiteren Entzündungsmediatoren, die potentiell von den Maus-Mesangiumzellen freigesetzt werden, zu überprüfen, wurden im Folgenden verschiedene Mediatoren ausgewählt und in diesem Zellsystem nach Cytokinstimulation näher charakterisiert.

4.5.1 Die Prostaglandinproduktion in Maus-Mesangiumzellen nach Stimulation mit entzündlichen Zytokinen

In den Zellkulturüberständen von Zytokin-stimulierten Mesangiumzellen und deren Kontrollen wurden Prostaglandin E_2 und Prostaglandin I_2 (Prostacyclin) mittels Prostaglandin *EIA-Kit* analysiert (vgl. 3.5.6). Da PGI₂ nur eine kurze Halbwertzeit von 60 Minuten im Blutplasma bzw. 2-3 Minuten in Puffer hat, ist es eine gängige Methode, stattdessen das stabile Endprodukt 6-keto-PGF_{1α} zu messen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.14 (A+B) dargestellt.

Zunächst konnte festgestellt werden, dass beide Prostaglandine konstitutiv von Mesangiumzellen produziert und freigesetzt werden. Nach der Inkubation mit den Zytokinen zeigt die Messung von Prostaglandin E₂ als auch das Prostaglandin I₂ nur einen leichten, nicht signifikanten Anstieg. Auffällig ist auch, dass die Menge an gemessenem 6-keto-PGF₁ α (=PGI₂), und zwar sowohl der Kontrollwert als auch nach Zytokinstimulation, circa 20mal höher ist als die jeweils gemessene Menge an PGE₂.



Abbildung 4.14: Prostaglandinproduktion nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen in Maus-Mesangiumzellen

Die Prostaglandinmessungen wurden mit Hilfe eines PGE_2 EIA-Kits (A) bzw. eines 6-keto- $PGF_{1\alpha}$ -EIA-Kits (B) durchgeführt. Zur Messung wurden Zellkulturüberstände von nicht-behandelten bzw. mit Zytokin-Mix (TNF- α (0,5 nM), IL-1 β (0,25 nM) und IFN γ (5 ng/ml)) behandelten Mesangiumzellen verwendet. Die Experimente wurden dreimal durchgeführt und vergleichbare Ergebnisse erzielt. Ktr = Kontrolle ZM = Zytokin-Mix

4.5.2 Die Expression der Cyclooxygenasen nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen in Maus-Mesangiumzellen

Durch immunhistochemische Untersuchungen wurde bereits in Nierenschnitten von Kontrollmäusen die COX-1, nicht aber die COX-2 im Glomerulus nachgewiesen (Campean *et al.*, 2003). Im Folgenden sollte untersucht werden, welche der beide Isoformen COX-1 und COX-2 in Mesangiumzellen exprimiert werden und wie sie durch Zytokin-Stimulation reguliert werden.

Die Ergebnisse der mRNA- und Protein-Analyse sind in Abbildung 4.15 dargestellt. Auf mRNA-Ebene (Abb. 4.15 (A)) konnten beide Isoformen COX-1 und COX-2 mittels sq-PCR nachgewiesen werden. Beide Isoformen werden konstitutiv, d.h. bereits unter nichtstimulierten Bedingungen exprimiert. Nach 24-stündiger Behandlung mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF α (0,5 nM), IL-1 β (0,25 nM) und IFN γ (5 ng/mI) scheint bei beiden Isoformen ein leichter Anstieg der mRNA-Expression stattzufinden. Der Nachweis auf Proteinebene erfolgte mit Hilfe der Western-Blot-Analyse. Auch hier konnte festgestellt werden, dass sowohl die COX-1 als auch die COX-2 konstitutiv exprimiert werden (Abb. 4.15 (B)). Im Gegensatz zur mRNA-Expression konnte aber keine weitere Steigerung der Protein-Expression unter entzündlichen Bedingungen beobachtet werden.

Die große Menge an konstitutiv produzierten Prostaglandinen, insbesondere PGI₂ und die konstante Expression der beiden Cyclooxygenasen lässt darauf schließen, dass eine kontinuierliche Arachidonsäure-Freisetzung zur Substratbereitstellung für die Cyclooxygenasen erfolgen muss. Völlig unklar ist bisher jedoch gewesen, welche der Phospholipasen für diese verantwortlich ist/sind.



Abbildung 4.15 (A+B): Expression der COX-1 und -2 nach Zytokinstimulation von Maus-Mesangiumzellen.

(A) Nachweis der mRNA-Expression mittels <u>sq-PCR</u>: je 5 µg RNA wurden in die RT-Reaktion eingesetzt, wovon anschließend 2 µl in die sq-PCR eingesetz wurden. Die Ermittlung erfolgte mit spezifischen Primern für die COX-Isoformen; als Abgleich diente GAPDH. (B) Nachweis der Protein-Expression mittels <u>Western-Blot</u>: je 200 µg Protein aus Zelllysat wurden mittels eines SDS-Gels aufgetrennt und auf einer PVDF-Membran immobilisiert und anschließend mit Hilfe der spezifischen Erst-Antikörpern (COX-1 und COX-2 je in der Konzentration von 1:1000) detektiert. Der Zweit-Antikörper wurde in einer Konzentration von 1:10.000 eingesetzt. Als Ladungsabgleich diente β-Aktin. Die Versuche wurden dreimal wiederholt und vergleichbare Ergebnisse erzielt. Ktr = Kontrolle, ZM = Zytokin-Mix.

4.5.3 Regulation der Prostaglandin-Biosynthese nach Gabe spezifischer sPLA₂-und cPLA₂-Inhibitoren

Sowohl sPLA₂s als auch die cPLA₂α vermitteln die Freisetzung von Arachidonsäure und liefern somit das Substrat für die Eicosanoid-Biosynthese (Leslie, 1997; Balsinde *et al.*, 2002). Daher sollte untersucht werden, welche Phospholipasen A₂ potentiell an der Prostaglandin-Produktion in Maus-Mesangiumzellen beteiligt sein können. Hierzu wurden die in Abschnitt 4.4.3 vorgestellten sPLA₂- und cPLA₂-Inhibitoren eingesetzt.

Die Zellen wurden wie üblich kultiviert und mit serumfreien Medium auf die Stimulation vorbereitet. Anschließend wurden sie für 24h mit dem sPLA₂-Inhibitor Me-IDX in einer Konzentration von 3 μ M und dem cPLA₂ α -Inhibitor PYR-1, ebenfalls in der Konzentration von 3 μ M, inkubiert. Zusätzlich wurde in diesem Versuch noch ein weiterer sehr potenter cPLA₂-Inhibitor, das Astra zeneca-1 (AZ-1) (Connolly *et al.*, 2002) in einer Konzentration von 5 μ M eingesetzt. Da diese Zellen schon einen relativ hohen Spiegel an konstitutv exprimierten Prostaglandinen aufweisen und auch keine drastische Veränderung nach Stimulation mit proinflammatorischen Zyokinen stattfand (vgl. 4.5.1), wurden diese Versuche unter Kontrollbedingungen durchgeführt. Die Prostaglandine PGE₂ und PGI₂ wurden in den Zellkulturüberständen mittels EIA detektiert.

In Abbildung 4.16 (A) ist die Produktion von PGE₂ graphisch dargestellt. Der Kontrollwert wurde 100% gesetzt, die anderen Werte prozentual darauf bezogen. Bei dem Einsatz des sPLA₂-Inhibitors Me-IDX war keine signifikante Reduktion der PGE₂-Produktion zu erkennen. Dagegen war beim Einsatz der cPLA₂α-Inhibitoren bei PYR-1 eine deutliche Senkung des PGE₂-Spiegels festzustellen. Der Wert beträgt ca. 60% der Kontrollwertes. Der Effekt des AZ-1 war schwächer, doch auch hier konnte der PGE₂-Spiegel auf ca. 75% des Ausgangwertes gesenkt werden.

Bei der Produktion des PGI₂ (Abb. 4.16 (B)) zeigten die Inhibitoren insgesamt stärkere Effekte. Durch Hemmung der sPLA₂-Aktivität mit Me-IDX konnte der PGI₂-Spiegel um 20% gesenkt werden. Noch stärkere Effekte zeigten aber auch hier die cPLA₂ α -Inhibitoren PYR-1 und AZ-1, durch welche die PGI₂-Spiegel um ca. 70% bzw. 60% gesenkt wurden.

Die Ergebnisse zeigen, dass zwar vorwiegend, wie zu erwarten, die cPLA₂ Arachidonsäure in den Maus- Mesangiumzellen für die konstitutive Prostaglandin-Biosynthese bereitstellt. Jedoch zeigten die Effekte des nicht-zellpermeierenden sPLA₂-Inhibitors Me-IDX, dass auch eine extrazelluläre sPLA₂-Aktivität daran beteiligt sein muss, obwohl diese bisher nicht näher charakterisiert werden konnte.


Abbildung 4.16 (A+B): Effekte der PLA₂-Inhibitoren auf die Prostaglandinbildung in Maus-Mesangiumzellen.

Damit stellte sich aber gleichzeitig die Frage, ob prinzipiell extrazelluläre sPLA₂s die Prostaglandin-Biosynthese verstärken können und damit auch zelluläre Signalkaskaden aktivieren können, die zu einer veränderten Expression proinflammatorischer Gene führt.

4.6 Effekte von exogenen sekretorischen Phospholipasen A₂ auf die Entzündungsmediatoren in Maus-Mesangiumzellen

4.6.1 Einfluss von exogenen sPLA₂s auf die Genexpression der zellulären sPLA₂

Sekretorische Phosholipasen A₂ (sPLA₂s) müssen nicht von Mesangiumzellen selbst sezerniert werden, sondern können bei entzündlichen Erkrankungen in großen Mengen von verschiedenen Zelltypen sezerniert werden, um anschließend ihre Wirkung autokrin oder parakrin auszuüben. Insbesondere infiltrierende Immunzellen (Makrophagen, Neutrophile) können nach dem Einwandern in entzündete Gewebe sPLA₂s sezernieren, die den Entzündungsprozess durch ihre Aktivität oder durch Bindung an den MTR verstärken (Balboa *et al.*, 1996; Morioka *et al.*, 2000a; Traggiani *et al.*, 2005). Exogene sPLA₂s können unter Entzündungsbedingungen zudem über die Zirkulation in die Niere gelangen, um dort pathophysiologische Agonisten für Mesangiumzellen darzustellen. Daher war von großem Interesse, ob eine Behandlung der Maus-Mesangiumzellen mit exogenen sPLA₂s Effekte auf die Eicosanoid-generierenden Systeme hat, d.h. auf die

Die Maus-Mesangiumzellen wurden für 24h mit den Inhibitoren in den Konzentrationen Me-IDX= 3 μ M, PYR-1= 3 μ M und AZ-1= 5 μ M inkubiert. In den Zellkulturüberständen wurden mittels spezifischer EIAs die Prostaglandine detektiert. Der Kontrollwert wurde 100% gesetzt, die restlichen Werte zeigen die prozentuale Abweichung im Vergleich zur Kontrolle. *= p < 0,05 **= p < 0,01 ***= p < 0,001 im Vergleich zum Kontrollwert. Die Experimente wurden dreimal durchgeführt und vergleichbare Ergebnisse erzielt. Ktr = Kontrolle IDX= Methyl-Indoxam PYR-1= Pyrrolidin-2 AZ-1= Astra zeneca-1

Expression der endogenen Phospholipasen sowie der Cyclooxygenasen und die Produktion von Prostaglandinen.

Für diesen Versuch wurden die rekombinanten Enzyme sPLA₂-IB, -IIA, -V und X gewählt. Wie zuvor festgestellt wurde, werden die sPLA₂-IB, -V und -X von Maus-Mesangiumzellen unter entzündlichen Bedingungen wie auch Kontroll-Bedingungen sezerniert (vgl. 4.4). Die Expression der sPLA₂-IIA ist bei diesen Zellen nicht möglich, da sie aufgrund ihres genetischen Hintergrunds (Maus-Stamm C57BL/6) einen natürlichen Knockout für diese sPLA₂ aufweist (Kennedy *et al.*, 1995). Trotzdem wurde auch dieses Enzym eingesetzt, da bekannt ist, dass die sPLA₂-IIA während einer Entzündung von einwandernden Immunzellen sezerniert werden kann (Wada *et al.*, 1997) und somit potentiell als Agonist auf Mesangiumzellen wirken könnte.

Die Mesangiumzellen wurden für 24h mit den rekombinanten sPLA₂s in einer Konzentration von 100 nM mit oder ohne den Zytokin-Mix TNF α (0,5 nM), IL-1 β (0,25 nM) und IFN γ (5 ng/ml) inkubiert. Zunächst wurde untersucht, ob die exogen gegebenen sPLA₂s einen Effekt auf die mRNA-Expression der zellulären sPLA₂ ausüben. Hierzu wurde für alle sPLA₂s eine sq-PCR durchgeführt. Es konnten keine Veränderungen im Expressionsmuster der zellulären sPLA₂s durch exogene sPLA₂s festgestellt werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

4.6.2 Einfluss von exogenen sPLA₂s auf die Prostaglandin-Produktion

Nun sollte überprüft werden, ob exogene sPLA₂ einen Einfluss auf die Prostaglandin-Produktion haben. Die Ergebnisse sind graphisch in der Abbildung 4.17 (A+B) gezeigt.

Zu sehen ist, dass die Behandlung der Mesangiumzellen mit den Enzymen sPLA₂-IB und sPLA₂-IIA keinen Einfluss auf die Produktion von PGE₂ und PGI₂ hatte. Auch die Kombination dieser beiden Enzyme mit dem Zytokin-Mix brachte keine Veränderung in den Prostaglandin-Spiegeln im Vergleich zum Kontrollwert.

Im Gegensatz dazu konnte eine Zunahme der Prostaglandin-Produktion nach der Inkubation mit den Enzymen sPLA₂-V und sPLA₂-X verzeichnet werden. Abbildung 4.17 (A) zeigt, dass die PGE₂-Produktion durch die sPLA₂-V um das 3,5fache, und durch die sPLA₂-X sogar um das 8,5fache im Vergleich zum Kontrollwert erhöht war. Bei der gleichzeitigen Inkubation mit dem Zytokin-Mix war keine weitere Steigerung der Prostaglandin-Produktion mehr zu verzeichnen. Die alleinige Gabe des Zytokin-Mix zeigte wie schon zuvor in Abschnitt 4.5.1 gezeigt keinen Effekt im Vergleich zum Kontrollwert.

Auch bei der Messung der PGI₂-Produktion konnte gezeigt werden, dass die sPLA₂-X den stärksten Effekt hatte. Die sPLA₂-V zeigte nur einen schwachen Effekt, die sPLA₂-IB und -IIA keinen Effekt auf die PGI₂-Ausschüttung. Auch hier brachte die zusätzliche Inkubation mit dem Zytokin-Mix keine Veränderungen. Wieder sehr deutlich zu erkennbar ist, dass der konstitutive PGI₂-Spiegel etwa 20fach höher lag als der des PGE₂.



Abbildung 4.17 (A+B): Effekte exogener sPLA₂s auf die Prostaglandin-Produktion in Maus-Mesangiumzellen.

Die Zellen wurden für 24h mit rekombinanten sPLA₂-IB, -IIA, -V und -X in einer Konzentration von 100 nM stimuliert. Dies wurde unter Kontrollbedingungen oder unter zusätzlicher Gabe von einem Zytokin-Mix durchgeführt. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände gesammelt und die PGE₂-Produktion (A) (vgl. 3.5.6.1) bzw. die PGI₂-Produktion (B) (vgl. 3.5.6.2) mittels *PG-EIA-Kits* gemessen. ### = p< 0,001 im Vergleich zum Kontrollwert *** = p< 0,001 im Vergleich zu Zytokinstimulierten Zellen. Die Experimente wurden dreimal durchgeführt und vergleichbare Ergebnisse erzielt. Ktr = Kontrolle, IB = sPLA₂-IB, IIA = sPLA₂-IIA, V = sPLA₂-V, X = sPLA₂-X, ZM = Zytokin-Mix.

Da im vergangenen Versuch gezeigt werden konnte, dass die effektivste Induktion der Prostaglandin-Produktion durch Stimulation mit der sPLA₂-X ohne zusätzliche Zytokingabe erreicht wurde, sollte dieser Effekt nun genauer untersucht werden. Hierzu wurden Dosis-Wirkungskurven und Zeitkinetiken durchgeführt.

Die Mesangiumzellen wurden zunächst für 24h mit ansteigenden Konzentrationen dieses Enzyms inkubiert. Die gewählten Konzentrationen betrugen 3 nM, 10 nM, 30 nM und 100 nM. Schon mit der niedrigsten Konzentration (3 nM) des rekombinanten Enzyms konnte eine starke Steigerung der PGE₂-Expression (5facher Anstieg im Vergleich zur konstitutiven Expression bzw. 3,5facher Anstieg der PGI₂-Produktion im Vergleich zur konstitutiven Expression) verzeichnet werden (Abb. 4.18 (A+B)). Dieser Anstieg konnte mit höheren Konzentrationen der sPLA₂-X noch auf ein 7faches (PGE₂) bzw. 5,5faches (PGI₂) gesteigert werden. Da aber bereits mit einer Konzentration von 10 nM fast maximale Prostaglandin-Spiegel erreicht werden konnte, wurde diese Konzentration für die folgenden Stimulationen mit der sPLA₂-X verwendet.



Abbildung 4.18 (A+B): Dosis-Wirkungs-Kurve der sPLA₂-X auf die Prostaglandin-Produktion in Maus-Mesangiumzellen.

Die Zellen wurden für 24h serumfrei gesetzt und anschließend mit dem rekombinanten Enzym sPLA₂-X in den Konzentrationen 3 nM, 10 nM, 30nM und 100 nM für weitere 24h inkubiert. Die Zellkulturüberstände wurden gesammelt und die PGE₂- und die PGI₂-Produktion mittels *PG-EIA-Kits* (vgl. 3.5.6.1 bzw. vgl. 3.5.6.2) gemessen. Die Experimente wurden dreimal durchgeführt und vergleichbare Ergebnisse erzielt. *** = p< 0,001 im Vergleich zur Kontrolle Ktr = Kontrolle

Um Zeitverlauf der Prostaglandin-Freisetzung aus Mesangiumzellen durch die sPLA₂-X zu untersuchen, wurden die Zellen mit 10 nM des rekombinanten Protein für 0,5h, 1h, 2h, 4h, 8h und 24h inkubiert. Die Ergebnisse aus diesem Versuch sind in Abbildung 4.19 dargestellt und zeigen, dass schon nach 30 min. ein signifikanter Anstieg der PGE₂-Produktion mit der sPLA₂-X stattfand und da bereits etwa die Hälfte des Maximalwertes erreicht wurde (4.19 (A)). Auf diesem Spiegel hält sich der Wert bis zu 8h, dann erfolgt wiederum ein Anstieg bis nach 24h der Maximalwert erreicht ist. Im Gegensatz dazu ist bei PGI₂ erst nach 8h das erste Mal ein signifikanter Anstieg zu erkennen. Danach stieg der PGI₂-Spiegel nochmals deutlich an und erreichte bei 24h sein Maximum. Spätere Zeitpunkte wurden nicht gemessen, da eine Langzeit-Inkubation mit der exogenen sPLA₂-X für die Zellen toxisch war.

Die COX-1 bzw. -2-Expression war unter diesen Bedingungen nicht verändert, was mit Real-Time PCR nachgewiesen wurde (Daten nicht gezeigt). Sie stellte also keinen limitierenden Faktor für die verzögerte PGI₂-Biosynthese dar. Daher muss davon ausgegangen werden, dass weitere Enzyme wie z.B. die Prostaglandin E₂-Synthasen und Prostacyclin-Synthase durch die Behandlung mit der sPLA₂-X auf mRNA-, Protein- oder Aktivitätsebene reguliert werden. Dies wird in zukünftigen Untersuchungen zu überprüfen sein.



Abbildung 4.19 (A+B): Zeitverlauf der Prostaglandin-Produktion nach Inkubation von Maus-Mesangiumzellen mit exogener sPLA₂-X.

Die Zellen wurden mit dem rekombinanten Enzym sPLA₂-X (10 nM) für 0,5h, 1h, 2h, 4h, 8h bzw. 24h inkubiert. Die Zellkulturüberstände wurden gesammelt und die PGE₂- und die PGI₂-Produktion mittels *PG-EIA-Kits* gemessen (vgl. 3.5.6.1 bzw. vgl. 3.5.6.2) gemessen. Die Experimente wurden dreimal durchgeführt und vergleichbare Ergebnisse erzielt. * = p< 0,05 ** = p<0,01 *** = p< 0,001 im Vergleich zur Kontrolle. Ktr = Kontrolle

4.6.3 Die Effekte von Cyclooxygenase- (COX)-Inhibitoren auf die Prostaglandinbildung in Maus-Mesangiumzellen

Wie in Kapitel 4.5.2 gezeigt werden konnte, werden sowohl die Cyclooxygenase-1 (COX-1) als auch die Cyclooxygense-2 (COX-2) konstitutiv auf mRNA- und Protein-Ebene in Maus-Mesangiumzellen exprimiert. Im Hinblick auf eine gezielte Pharmakotherapie von entzündlichen Nierenerkrankungen war es von Interesse herauszufinden, über welche der beiden COX-Isoformen zum Einen die konstitutive, und zum Anderen die sPLA₂-Xinduzierte Prostaglandinbildung in den Mesangiumzellen vermittelt wird. Um dies zu untersuchen wurden unstimulierte und sPLA₂-X-behandelte Mesangiumzellen mit den COX-Inhibitoren Indomethacin und Rofecoxib behandelt und anschließend die Prostaglandin-Produktion in den Überständen gemessen. Indomethacin ([1-(p-Chlorbenzoyl)-5methoxy-2-methylindol-3-yl]-essigsäure) gehört zu den "NSAIDs" ("nonsteroidal anti-inflamatory drugs") und wirkt vorwiegend über die Hemmung der COX-1, weniger der COX-2 (COX-1:IC₅₀= 9 nM; COX-2: IC₅₀= 310 nM) (Hart und Boardman, 1963; Kato *et al.*, 2001). Rofecoxib ((4-[4-(Methylsulfonyl)phenyl]-3-phenylfuran-2(5h)-on)) gehört ebenfalls zu der Gruppe der "NSAIDs", ist aber ein spezifischer COX-2-Inhibitor (COX-1:IC₅₀= >50 μ M; COX-2:IC₅₀= 26 nM (Chan *et al.*, 1999). Die Inhibitoren wurden in drei verschiedenen Konzentrationen (10 nM, 30 nM und 100 nM) für 24h gegeben. In den gesammelten Zellkulturüberständen wurde die Freisetzung von PGE₂ und PGI₂ gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.20 (A+B) dargestellt.

COX-1-Inhibitor Indomethacin:

Sowohl bei PGE₂ als auch PGI₂ war ein ca. 3facher Anstieg der Prostaglandin-Ausschüttung durch Stimulation mit der exogenen sPLA₂-X zu verzeichnen. Durch die Behandlung mit dem COX-1-Inhibtor Indomethacin konnte die Prostaglandinfreisetzung deutlich gehemmt werden. Durch den Einsatz von 10 nM Inhibitor ging der Wert von PGE₂ auf ca. 40% des induzierten Wertes zurück, bei höheren Konzentrationen (30 nM bzw. 100 nM) sogar auf Kontrollniveau zurück. Bei der Prostaglandin I₂-Ausschüttung zeigte sich ein ähnliches Bild (B), wobei hier schon mit der niedrigsten Konzentration von Indomethacin (10 nM) die PGI₂-Ausschüttung auf das Kontrollniveau reduziert werden konnte. Mit der höchsten Konzentration von 100 nM konnte die Freisetzung sogar unter den Kontrollwert gesenkt werden, was zeigt, dass hier auch partiell die konstitutive Expression gehemmt wurde.



Abbildung 4.20 (A+B): Effekte des COX-1-Inhibitors Indomethacin auf die Prostaglandinbildung.

Die Maus-Mesangiumzellen wurden für 24h mit der exogenen sPLA₂-X (10 nM) und dem COX-1-Inhibitor Indomethacin in den Konzentrationen 10 nM, 30 nM und 100 nM inkubiert. In den gesammelten Überständen wurde die Prostaglandin-Produktion gemessen. Der höchste Wert (Induktion mit sPLA₂-X) wurde 100% gesetzt, die restlichen Werte zeigen die relative prozentuale Abweichung. ***= p< 0,001 im Vergleich zu 100% Die Experimente wurden dreimal durchgeführt und vergleichbare Ergebnisse erzielt. Ktr = Kontrolle Indo=Indomethacin

COX-2-Inhibitor Rofecoxib:

In Abbildung 4.21 (A+B) ist die Prostaglandin-Freisetzung nach Behandlung der Zellen mit Rofecoxib (10, 30 und 100 nM) dargestellt. Im deutlichen Unterschied zu Indomethacin (vgl. Abb. 4.20) zeigte der COX-2-Inhibitor Rofecoxib keinen Effekt auf die Prostaglandin-Synthese. Bei einer ca. 3fachen Induktion der Prostaglandin-Synthese durch die exogene sPLA₂-X konnte durch die Behandlung mit Rofecoxib kein Rückgang der PGE₂- bzw. PGI₂-Auschüttung verzeichnet werden. Erst bei einer sehr hohe Konzentration des Inhibitors von 20 μ M konnte die PG-Synthese um ca. 20% gehemmt werden (Ergebnis nicht gezeigt). Da Rofecoxib aber einen IC₅₀ von >50 μ M für die COX-1 aufweist, ist auch bei einer Konzentration von 20 μ M noch eine spezifische Hemmung der COX-2 weitestgehend gewährleistet. Damit scheint eindeutig zu sein, dass die COX-1 das primäre Enzym ist, welches für die sPLA₂-X-vermittelte Prostaglandin-Produktion verantwortlich ist.



Abbildung 4.21 (A+B): Effekte des COX-2-Inhibitors Rofecoxib auf die Prostaglandinbildung.

Die Maus-Mesangiumzellen wurden für 24h mit der exogenen sPLA₂-X (10 nM) und dem COX-2-Inhibtor Rofecoxib in den Konzentrationen 10 nM, 30 nM und 100 nM inkubiert. In den gesammelten Überständen wurden die Prostaglandine gemessen. Der höchste Wert (Induktion mit sPLA₂-X) wurde 100% gesetzt, die restlichen Werte zeigen die prozentuale Abweichung im Vergleich dazu. Die Experimente wurden dreimal durchgeführt und vergleichbare Ergebnisse erzielt. Ktr = Kontrolle, Rofe= Rofecoxib.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass exogene sPLA₂s, und hier insbesondere die sPLA₂-X einen deutlichen Einfluss auf die Prostaglandin-Produktion von Maus-Mesangiumzellen ausüben können, war von Interesse, ob auch andere wichtige Entzündungsmediatoren in diesen Zellen durch die exogene sPLA₂-X reguliert werden. Ausgewählt wurden die iNOS-induzierte NO-Produktion sowie das Chemokin MIP-2, da diese wesentlich zur Entstehung und Progression von entzündlichen Erkrankungen der Niere beitragen (Cattell, 2002; Feng *et al.*, 1995). Dazu musste zunächst überprüft werden, unter welchen Bedingungen die aus den Nieren der C57BL/6-Mäuse isolierten Mesangiumzellen in der Lage sind, diese Mediatoren zu produzieren.

4.6.4 Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) und Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen in Maus-Mesangiumzellen

In Ratten-Mesangiumzellen konnte bereits nachgewiesen werden, dass diese nach Stimulation mit entzündungsfördernden Zytokinen wie z.B. IL-1 β große Mengen an NO freisetzen, welches von der iNOS produziert wird (Pfeilschifter, 2000). Des Weiteren kann Stickstoffmonoxid selbst die Expression von weiteren inflammatorischen Mediatoren wie das CXC Chemokin MIP-2 (Walpen *et al.*, 2001), IL-8, MIP-1 α , MCP-1 (Pfeilschifter *et al.*, 2001) oder die sPLA₂-IIA (Rupprecht *et al.*, 1999) induzieren und stellt sich somit als ein zentraler Mediator der Entstehung und Progression von Entzündungsprozessen dar.

Zunächst wurden die Zellen mit verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen für 24 Stunden mit IL-1 β (1 nM), TNF α (2nM) und IFN γ (10 ng/ml) stimuliert. Mittels Western-Blot Analyse wurde das iNOS-Protein detektiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.22 dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die Zytokine IL-1 β und TNF α alleine nicht die iNOS induzieren konnten. Die Kombination der beiden Zytokine erreichte nur eine schwache Expression dieses Proteins. Erst wenn man die Zellen mit einem Mix aus allen 3 genannten Zytokinen (ZM) inkubierte, erfolgte eine sehr starke Induktion der iNOS. In unstimulierten Zellen (Ktr) konnte ebenfalls keine Expression nachgewiesen werden.



Abbildung 4.22: Expression des iNOS-Proteins nach Stimulation mit verschiedenen Zytokinen in Maus-Mesangiumzellen.

Die Zellen wurden für 24h mit den Zytokinen IL-1 β (1 nM), TNF α (2 nM) oder im Mix zusammen mit IFN γ (10 ng/ml) stimuliert. Der <u>Western-Blot</u> mit je 40 μ g Zelllysat/ Probe wurde wie unter 3.5.8 beschrieben durchgeführt. Der Erst-Antikörper gegen die iNOS wurde in einer Konzentration von 1:2000 eingesetzt, der Zweit-Antiköper in einer Konzentration von 1:1.000. Als Ladungs- und Transferkontrolle wurde β -Aktin verwendet. Die Experimente wurden dreimal durchgeführt und vergleichbare Ergebnisse erzielt. Ktr = Kontrolle, ZM = Zytokin-Mix.

Ergebnisse

Da somit festgestellt wurde, dass die iNOS nur mit dem Mix aus den drei Zytokinen induziert werden kann, sollte nun überprüft werden, welche Konzentrationen dafür notwendig sind. In Abbildung 4.23 zeigt ein iNOS-Western-Blot die Expression dieses Proteins nach Behandlung der Zellen für 24 Stunden mit dem Mix aus den Zytokinen IL-1 β , TNF α und IFN γ , wobei die Zytokin-Konzentrationen im Vergleich zum vorherigen Versuch reduziert wurden. Für Zytokin-Mix 1 (ZM 1) wurden die Konzentrationen IL-1 β – 0,25 nM, TNF α – 0,5 nM und IFN γ – 5 ng/ml, für Zytokin-Mix 2 (ZM 2) wurden die Konzentrationen IL-1 β –0,5 nM, TNF α – 1 nM und IFN γ – 10 ng/ml, verwendet. Zu sehen ist, dass selbst bei den niedrigsten Konzentrationen noch eine sehr starke Induktion der Protein-Expression stattfand. Somit wurde in den folgenden Experimenten die Konzentrationen des Zytokin-Mix 1 verwendet.





Die Zellen wurden für 24h mit dem Zytokin-Mix bestehend aus IL-1 β , TNF α und IFN γ stimuliert. Zytokin-Mix 1 (ZM 1) = IL-1 β 0,25 nM, TNF α 0,5 nM und IFN γ 5 ng/ml; Zytokin-Mix 2 (ZM 2) = IL-1 β 0,5 nM, TNF α 1 nM und IFN γ 10 ng/ml. Der Western-Blot mit je 40 µg Zelllysat/Probe wurde wie unter 3.5.8 beschrieben durchgeführt. Der Erst-Antikörper gegen die iNOS wurde in einer Konzentration von 1:2000 eingesetzt, der Zweit-Antikörper in einer Konzentration von 1:10.000. Als Ladungs- und Transferkontrolle wurde β -Aktin verwendet. Die Experimente wurden dreimal durchgeführt und vergleichbare Ergebnisse erzielt. Ktr = Kontrolle, ZM = Zytokin-Mix.

Auch die Bildung von NO wurde nach Stimulation mit verschiedenen Zytokinen gemessen. Von Ratten-Mesangiumzellen ist bekannt, dass sie nach Stimulation mit dem proinflammatorischen Zytokin II-1 β große Mengen an NO produzieren (Pfeilschifter, 2000).

Nun sollte untersucht werden, ob IL-1 β allein auch die NO-Bildung in Maus-Mesangiumzellen induzieren kann. Dazu wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an IL-1 β stimuliert und die NO-Bildung als Nitrit-Produktion mit Hilfe der Griess-Reaktion in den Zellkulturüberständen gemessen. Zusätzlich wurden die Zellen mit einem Mix aus Zytokinen, ebenfalls in verschiedenen Konzentrationen, behandelt. Der Zytokin-Mix war wie folgt zusammengesetzt: Zytokin-Mix $\frac{1}{2}$ (ZM $\frac{1}{2}$) TNF α 0,25 nM, IL-1 β 0,125 nM und IFN γ 2,5 ng/ml; Zytokin-Mix 1 (ZM1) TNF α 0,5 nM, IL-1 β 0,25 nM und IFN γ 5 ng/ml; Zytokin-Mix 2 (ZM2) TNF α 1 nM, IL-1 β 2 nM und IFN γ 10 ng/ml.

Das Ergebnis in Abbildung 4.24 zeigt, dass allein mit IL-1 β , auch in hohen Konzentrationen von 2 nM, in Maus-Mesangiumzellen keine NO-Bildung induziert werden konnte. Da mit IL-1 β in den Maus-Mesangiumzellen kein iNOS-Protein zu detektieren war (Abb. 4.22), war nicht zu erwarten, dass unter diesen Bedingungen NO gebildet wird, denn andere NO-Synthasen (neuronale NOS oder endotheliale NOS) werden von Mesangiumzellen nicht exprimiert.

Im Gegensatz dazu konnten aber die Zytokine als Kombination bereits in sehr niedrigen Konzentrationen (TNF α 0,25 nM, IL-1 β 0,125 nM und IFN γ 2,5 ng/ml) eine signifikante NO-Bildung induzieren. Verdoppelte man die Konzentrationen der Zytokine (TNF α 0,5 nM, IL-1 β 0,25 nM und IFN γ 5 ng/ml), fand eine weitere Steigerung der Induktion statt, jedoch weniger als um den Faktor 2. Wurden die Konzentrationen nochmals verdoppelt (TNF α 1 nM, IL-1 β 2 nM und IFN γ 10 ng/ml), fand keine signifikante Steigerung mehr statt. Damit konnte gezeigt werden, dass mit den Konzentrationen der Zytokine im ZM1 die maximale NO-Produktion erzielt wird.



Abbildung 4.24: Messung der Nitrit-Konzentration in Zellkulturüberständen von Zytokinbehandelten Maus-Mesangiumzellen.

Die Zellen wurden wie oben angegeben mit verschiedenen Konzentrationen an IL-1 β bzw. 3 verschiedene Konzentrationen des Zytokin-Mix wie angegeben für 24h behandelt. Je 200 μ l Zellkulturüberstand wurden in die Griess-Reaktion (vgl. 3.5.7) eingesetzt. Die Messung erfolgte bei 540 nm an einem Mikrotiter-Lesegerät. Für die Quantifizierung der Nitrit-Konzentration wurde ein NaNO₂-Standard von 1 μ M-100 μ M verwendet. Die Experimente wurden dreimal durchgeführt und vergleichbare Ergebnisse erzielt. *** p< 0,001 im Vergleich zur Kontrolle, ### <p 0,001 n.s.= nicht signifikant.

Um die Regulation der iNOS auf RNA-Ebene zu untersuchen, wurden eine Northern-Blot-Analyse sowie eine sq-PCR durchgeführt. Die Maus-Mesangiumzellen wurden 24 Stunden mit dem ZM1 inkubiert. Anschließend wurde die RNA isoliert und der Northern-Blot und die sq-PCR wie unter 3.4.12 und 3.4.7 beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.25 (A-D) dargestellt. Auch auf mRNA-Ebene war eine deutliche Induktion der iNOS nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen festzustellen.



Abbildung 4.25 (A-D): mRNA- und Protein-Expression der iNOS in Maus-Mesangiumzellen unter entzündlichen Bedingungen.

Die Zellen wurden für 24h mit einen Mix aus den Zytokinen IL-1 β 0,25 nM, TNF α 0,5 nM und IFN γ 5 ng/ml (= ZM1) inkubiert, anschließend wurde RNA bzw. Protein isoliert. (A): Der <u>Northern-Blot</u> wurde wie unter 3.4.12 beschrieben durchgeführt. Eingesetzt wurden je 10 µg Gesamt-RNA. Die Signale, die auf der Northern Blot-Membran mittels eines Phosphoimagers detektiert wurden, wurden im Verhältnis zur Intensität des Signals der 18S korrigiert. (B): <u>Graphische Darstellung</u>: Der Kontrollwert wurde gleich 1 gesetzt, der stimulierte Wert zeigt den xfachen Anstieg im Vergleich zur Kontrolle. (C): Die <u>sq-PCR</u> wurde wie unter 3.4.7 beschrieben durchgeführt. Für die sq-PCR wurden je 5 µg in die RT reaktion eingesetzt, wovon anschließend 2 µl für die sq-PCR verwendet wurden. Als Ladungskontrolle wurde die Expression der GAPDH detektiert (D) <u>Western-Blot-Analyse:</u> Je 40 µg Zelllysat/ Probe wurden wie unter 3.5.8 beschrieben analysiert. Der Erst-Antikörper wurde in einer Konzentration von 1:2000 eingesetzt, der Zweit-Antikörper in einer Konzentration von 1:10.000. Als Ladungs- und Transferkontrolle wurde β -Aktin verwendet. Die Experimente wurden dreimal durchgeführt und vergleichbare Ergebnisse erzielt. Ktr = Kontrolle, ZM1 = Zytokin-Mix1.

4.6.5 Die Expression des Chemokins MIP-2 in Maus-Mesangiumzellen unter entzündlichen Bedingungen

Als CXC-Chemokin besitzt das *"Macrophage Inflammatory Protein-2"* (MIP-2) chemotaktische Aktivität für Neutrophile (Tessier *et al.* 1997, 1998; Ohtsuka *et al.*, 2001), welche bei massiver Einwanderung zur Aufrechterhaltung einer Entzündung und weiter zur Schädigung von Gewebe führen können (Matzer *et al.*, 2004). Die Produktion von MIP-2 konnte in entzündlichen Krankheiten der Glomerulonephritis beobachtet werden (Feng *et al.*, 1995), sodass es von großem Interesse war, die Expression des MIP-2 unter entzündlichen Bedingungen in Maus-Mesangiumzellen zu untersuchen.

Es wurde sowohl die Expression auf mRNA Ebene, sowie auch die Freisetzung des Proteins in den Zellkulturüberständen gemessen. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 4.26- 4.28 dargestellt.

Da Chemokine frühe Mediatoren der Entzündungsreaktion sind, wurde als erstes eine Zeitkinetik der mRNA-Expression durchgeführt. Abbildung 4.26 (A) zeigt einen Northern-Blot, bei welchem die Zellen jeweils für den angegebenen Zeitraum (2h, 4h bzw. 24h) mit dem Zytokin-Mix ZM1 stimuliert wurden. In Abbildung 4.26 (B) ist das Ergebnis graphisch ausgewertet. In den unstimulierten Zellen konnte eine sehr schwache MIP-2-Expression detektiert werden, die über 24 h unverändert blieb. Nach zwei Stunden Inkubation mit ZM1 stieg die Expression der MIP-2 mRNA auf das ca. 5fache des Kontrollwertes an. Nach weiteren zwei Stunden war die Expression schon wieder auf etwa die Hälfte des Maximalwertes reduziert, und dieser Spiegel wurde bis zu 24 Stunden nach Zytokingabe gehalten. Da aus diesem Experiment deutlich sichtbar wurde, dass das Expressionsmaximum der MIP-2 mRNA bei 2h nach Zytokinbehandlung liegt, wurde die mRNA für folgende Untersuchungen der MIP-2-Expression jeweils zu diesem Zeitpunkt isoliert. Die deutliche Induktion der MIP-2 mRNA-Expression durch den Zytokin-Mix wurden durch die Methoden der sq-PCR und der Realtime-PCR bestätigt (vgl. Abb. 4.26 (C) und (D)).

Die Freisetzung des MIP-2-Proteins von Mesangiumzellen wurde mit Hilfe eines spezifischen Zytokin-ELISAs gemessen. Auch hier wurde zuerst eine Zeitkinetik durchgeführt, bei der die Zellkulturüberstände nach 2h-, 4h-, 8h- bzw. 24h-Inkubation mit dem Zytokin-Mix verwendet wurden. Schon nach 2stündiger Inkubation war eine deutliche MIP-2-Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle zu detektieren (Abb. 4.27 (A)). Nach 24stündiger Behandlung mit Zytokinen konnte der höchste Wert an MIP-2-Protein im Überstand gemessen werden, sodass in folgenden Experimenten für diese Messung die Zellkulturüberstände nach 24 h geerntet wurden. Abbildung 4.27 (B) zeigt die signifikante

109



erhöhte Freisetzung von MIP-2-Protein nach 24 Stunden unter stimulierten Bedingungen im Vergleich zu nicht-behandelten Zellen.

Abbildung 4.26 (A-D): mRNA-Expression von MIP-2 in Maus-Mesangiumzellen unter entzündlichen Bedingungen.

(A): Der <u>Northern-Blot</u> wurde wie unter 3.4.12 beschrieben durchgeführt. Eingesetzt wurden je 20 μg Gesamt-RNA. Signale, die auf der Northern-Blot-Membran mittels eines Phosphoimagers detektiert wurden, wurden im Verhältnis zur Intensität des Signals der 18S korrigiert. (B): <u>Graphische Darstellung</u>: Der höchste Wert wurde 100% gesetzt, die übrigen Werte hierzu ins Verhältnis gesetzt. (C): Die <u>sq-PCR</u> wurde wie unter 3.4.7 beschrieben durchgeführt. Für die sq-PCR wurden je 5 μg in die RT reaktion eingesetzt, wovon anschließend 2 μl für die sq-PCR verwendet wurden. Die Ermittlung erfolgte über spezifische Primer, der Abgleich durch GAPDH. (D): <u>Realtime-PCR</u>: Die Methode wurde wie unter 3.4.8 beschrieben durchgeführt. Die Ermittlung erfolgte über spezifische Primer, GeneAmp 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte der GeneAmp 5700 SDS-Software. Die Werte sind auf die Werte der gemessenen GAPDH normiert.



Abbildung 4.27 (A+B): Freisetzung von MIP-2-Protein aus Maus-Mesangiumzellen unter entzündlichen Bedingungen.

Die Messung des MIP-2 Proteins erfolgte mit Hilfe eines MIP-2 Immunassays und wurde wie in 3.5.6.3 beschrieben durchgeführt. (A): Zeitkinetik. Die Proben der Zellkulturüberstände wurden nach 2h, 4h, 8h bzw. 24h Inkubation geerntet und MIP-2 mittels eines MIP-2-ELISAs gemessen. (B): Dieser Graph zeigt den gemessenen Wert nach 24-stündiger Inkubation mit Zytokin-Mix (ZM) im Vergleich zur Kontrolle. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Students t-test: * p< 0,05; ***p< 0,001 Die Experimente wurden dreimal durchgeführt und vergleichbare Ergebnisse erzielt.

Es ist bekannt, dass die Expression von MIP-2 in Ratten-Mesangiumzellen allein durch das proinflammatorische Zytokin IL-1β induziert wird (Walpen *et al.*, 2001).

Nun sollte untersucht werden, ob IL-1 β allein auch die MIP-2-Bildung in Maus-Mesangiumzellen induzieren kann. Dazu wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an IL-1 β (0,25 nM -2 nM) stimuliert und die MIP-2 mit Hilfe eines ELISAs in den Zellkulturüberständen gemessen. Zum Vergleich wurden die Zellen wie in den vorangegangenen Versuchen mit dem Zytokin-Mix, ebenfalls in verschiedenen Konzentrationen, behandelt. Das Ergebnis in Abbildung 4.28 zeigt, dass in niedrigen Konzentrationen (0,25 nM bzw. 0,5 nM) IL-1 β keine MIP-2-Expression in Maus-Mesangiumzellen induzierte. Erhöhte man die Konzentration von IL-1 β auf 1 nM bzw. 2 nM, konnte MIP-2, wenn auch nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte eine Kombination verschiedener Zytokine, wie sie im Zytokin-Mix vorkommt, bereits in sehr niedrigen Konzentrationen (ZM1/2) eine signifikante MIP-2-Bildung induzieren. Verdoppelt bzw. vervierfachte man die Konzentrationen der Zytokine, fanden jeweils weitere deutliche Steigerungen der Induktion statt.



Abbildung 4.28: Freisetzung von MIP-2-Protein aus Maus-Mesangiumzellen nach stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen.

Die Messung des MIP-2 Proteins erfolgte mit Hilfe eines MIP-2 Immunassays und wurde wie in 3.5.6.3 beschrieben durchgeführt. Die Zellen wurden wie oben angegeben mit verschiedenen Konzentrationen an IL-1 β bzw. dem Zytokin-Mix bestehend aus TNF α , IL-1 β und IFN γ für 24h behandelt. Die Experimente wurden dreimal durchgeführt und vergleichbare Ergebnisse erzielt.

4.6.6 Effekte exogener sPLA₂s auf die NO- und MIP-2-Ausschüttung

Es wurde bereits in früheren Studien beobachtet, dass exogene sPLA₂s proinflammatorische Gene von Entzündungsmediatoren induzieren (Triggiani *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2003; Jo *et al.*, 2004; Beck *et al.*, 2003a). Zudem wurde gezeigt, dass in 3Y1 Ratten-Fibroblasten die Zytokin-induzierte sPLA₂-IIA Expression, welche zur Eicosanoidbiosynthese führt, durch MIP-2 reguliert wird (Kuwata *et al.*, 1998; Kuwata *et al.*, 2005).

Daher war von Interesse, ob sPLA₂s die Expression der Entzündungsmediatoren NO und MIP-2 verändert. Maus-Mesangiumzellen wurden mit verschiedenen rekombinanten sPLA₂-Enzymen behandelt und die NO- und MIP-2-Produktion in den Zellkulturüberständen gemessen. Abbildung 4.29 zeigt, dass die Enzyme sPLA₂-IB, -IIA, -V und -X keinerlei Einfluss auf die NO-Produktion hatten, ebenso wenig wie auf die MIP-2-Ausschüttung. Wie schon zuvor gezeigt, wurden beide Mediatoren unter nichtstimulierten Kontrollbedingungen nur sehr schwach bzw. gar nicht exprimiert. Ein

deutlicher Anstieg zeigte sich unter entzündlichen Bedingungen nach Gabe von proinflammatorischen Zytokinen. Ein potenzierender Effekt durch Koinkubation mit den exogenen sPLA₂s konnte nicht festgestellt werden.



Abbildung 4.29 (A+B): Effekte exogener sPLA₂s auf die NO- und MIP-2-Ausschüttung. Die Zellen wurden für 24h mit rekombinanten sPLA₂-IB, -IIA, -V und -X in einer Konzentration von je 100 nM stimuliert. Dies wurde unter Kontrollbedingungen oder unter zusätzlicher Gabe des Zytokin-Mix durchgeführt. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände gesammelt und die NO-Produktion (A) mittels der Griess-Reaktion (vgl. 3.5.7) bzw. die MIP-2-Ausschüttung (B) mittels eines MIP-2 Immunassays (vgl. 3.5.6.3) gemessen. Die Experimente wurden dreimal durchgeführt und vergleichbare Ergebnisse erzielt. Ktr = Kontrolle, IB = sPLA₂-IB, IIA = sPLA₂-IIA, V = sPLA₂-V, X = sPLA₂-X, ZM = Zytokin-Mix.

4.6.7 Regulation der MIP-2-Expression durch Stickstoffmonoxid (NO)

Sowohl das Chemokin MIP-2 als auch Stickstoffmonoxid (NO) werden von Maus-Mesangiumzellen durch proinflammatorische Zytokine in großen Mengen freigesetzt (vgl. 4.6.4 und 4.6.5). In Ratten-Mesangiumzellen konnte gezeigt werden, dass endogenes NO die Zytokin-induzierte Expression von MIP-2 vermittelt (Walpen *et al.*, 2001). Schon früher wurde von Mühl und Pfeilschifter (1995) beschrieben, dass, ebenfalls in Ratten-Mesangiumzellen, NO seine eigene Biosynthese in einem positiven *"Feed-back"* beeinflusst, da die iNOS als NO-induziertes Gen identifiziert wurde. Für die Maus-Mesangiumzellen waren solche Effekte bisher nicht bekannt. Daher wurde die Gelegenheit, Maus-Mesangiumzellen in Kultur zu haben, genutzt, um zu überprüfen, ob NO auch in diesen Zellen einen Einfluss auf die MIP-2-Expression ausübt.

4.6.8 Effekte des iNOS-Inhibitors L-NMMA auf die MIP-2-Expression

L-NMMA (*N*^G-monomethyl-L-Arginin, ALEXIS Biochemicals) ist ein spezifischer Inhibitor für die NO-Synthasen und hemmt somit die NO-Bildung in Zellen (Rees *et al.*, 1989). Zunächst wurde untersucht, in welchen Konzentrationen L-NMMA die Zytokin-induzierte NO-Bildung hemmen kann. Anschließend wurde überprüft, ob diese Hemmung der endogenen NO-Bildung einen Einfluss auf die MIP-2-Ausschüttung in Maus-Mesangiumzellen hat.

Die Mesangiumzellen wurden für 24h mit dem Zytokin-Mix inkubiert. Zusätzlich wurden sie mit verschiedenen Konzentrationen (0,5 mM, 1 mM, 2 mM und 3 mM) des iNOS-Inhibitors L-NMMA stimuliert. Die Hemmung der Zytokin-induzierten NO-Bildung durch den Inhibitor wurde mittels der Griess-Reaktion (vgl. 3.5.7) gemessen. Außerdem wurde der MIP-2 Gehalt in diesen Überständen analysiert und somit der Effekt des iNOS-Inhibitors auf die MIP-2-Expression untersucht.

Wie in Abbildung 4.30 dargestellt ist, konnte der iNOS-Inhibtor L-NMMA die Zytokininduzierte NO-Bildung in Maus-Mesangiumzellen sehr effizient hemmen (bis zu 93%). Schon bei einer Konzentration von 0,5 mM L-NMMA wurde der Wert von 30 μ M NO, induziert durch Zytokine, auf 5 μ M gesenkt. Bei höheren Konzentrationen des Inhibitors bis 3 mM wurde nahezu kein NO mehr von den Zellen gebildet.

Die Hemmung der endogenen NO-Bildung durch den iNOS-Inhibitor L-NMMA zeigte jedoch im Gegensatz zu den Ratten-Mesangiumzellen keinen Effekt auf die MIP-2-Bildung in Maus-Mesangiumzellen, wie in Abbildung 4.31 dargestellt ist. Der Spiegel der MIP-2-Ausschüttung, der durch die Zytokine induziert wurde, blieb trotz Inkubation mit dem Inhibitor unverändert.



Abbildung 4.30: Effekt des iNOS-Inhibitors L-NMMA auf die NO-Bildung in Maus-Mesangiumzellen.

Die Zellen wurden für 24h mit dem Zytokin-Mix bestehend aus TNF α (0,5 nM), IL-1 β (0,25 nM) und IFN γ (5 ng/ml) stimuliert. Zusätzlich wurden sie mit dem iNOS-Inhibitor L-NMMA in den Konzentrationen 0,5 mM, 1 mM, 2 mM und 3 mM inkubiert. Anschließend wurde die Nitrit-Bildung mit Hilfe der Griess-Reaktion in den Zellkulturüberständen an einem Mikrotiter-Lesegerät ermittelt. *** = p< 0,001 im Vergleich zum Zytokin-induzierten Wert. Die Experimente wurden dreimal durchgeführt und vergleichbare Ergebnisse erzielt. Ktr = Kontrolle



Abbildung 4.31: Effekt des iNOS-Inhibitors L-NMMA auf die MIP-2-Bildung in Maus-Mesangiumzellen.

Die Zellen wurden für 24h mit dem Zytokin-Mix bestehend aus TNF α (0,5 nM), IL-1 β (0,25 nM) und IFN γ (5 ng/ml) stimuliert. Zusätzlich wurden sie mit dem iNOS-Inhibitor L-NMMA in den Konzentrationen 0,5 mM, 1 mM, 2 mM und 3 mM inkubiert. Anschließend wurde die MIP-2-Bildung mit Hilfe des Immunoassay in Zellkulturüberständen an einem Mikrotiter-Lesegerät ermittelt. Die Experimente wurden dreimal durchgeführt und vergleichbare Ergebnisse erzielt. Ktr = Kontrolle

4.6.9 Effekte des NO-Donors DETA-NONOat auf die MIP-2-Expression

Es sollte untersucht werden, ob das exogen zugesetzte NO einen Effekt auf die MIP-2-Expression in Maus-Mesangiumzellen hat. Hierzu wurden die Mesangiumzellen für 24h mit dem Zytokin-Mix inkubiert. Zusätzlich wurden sie mit verschiedenen Konzentrationen (25 μ M, 50 μ M, 100 μ M und 250 μ M) des NO-Donors DETA- NONOat stimuliert. DETA-NONOat((Z)-1-[2-(2-Aminoethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino]diazen-1-uim-1,2-doilate] (ALEXS Biochemicals) ist ein NO-Donor, welcher in Puffer-Milieu NO über 24h an seine Umgebung abgeben kann und dadurch ideal für Zellkulturexperimente geeignet ist. In den behandelten Zellen wurde die MIP-2-Freisetzung mittels eines Immunoassays (3.5.6.3) bestimmt.

In Abbildung 4.32 ist zu sehen, dass das zusätzlich durch DETA-NO zur Verfügung gestellte NO in den Zellen keinen Einfluss auf die MIP-2-Bildung hatte. Der Spiegel der MIP-2-Ausschüttung, der durch die Zytokine induziert wurde, blieb trotz Inkubation mit dem NO-Donor nahezu unverändert.



Abbildung 4.32: Effekt des NO-Donors DETA-NO auf die MIP-2-Bildung in Maus-Mesangiumzellen.

Die Zellen wurden für 24h mit dem Zytokin-Mix bestehend aus TNF α (0,5 nM), IL-1 β (0,25 nM) und IFN γ (5 ng/ml) stimuliert. Zusätzlich wurden sie mit dem NO-Donor DETA-NO in den Konzentrationen 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M und 250 μ M inkubiert. Anschließend wurde die MIP-2-Bildung mit Hilfe des Immunoassay in Zellkulturüberständen an einem Mikrotiter-Lesegerät ermittelt. Die Experimente wurden dreimal durchgeführt und vergleichbare Ergebnisse erzielt. Ktr = Kontrolle

Zusammengefasst kann also festgestellt werden, dass die Maus-Mesangiumzellen sich hinsichtlich der Regulation proinflammatorischer Mediatoren erheblich von den Ratten-Mesangiumzellen unterscheiden. Dies gilt sowohl für die Sensitivität gegenüber Zytokin-Stimulation, Expression und Freisetzung der sPLA₂s, Expression des MTR, Prostaglandinproduktion, als auch die NO-vermittelte Regulation der Genexpression von MIP-2.

5 Diskussion

5.1 Expression des spezifischen M-Typ-Rezeptors und seinem Liganden sPLA₂-IB in der Rattenniere

Bisher war nur für wenige sPLA₂ Enzyme geklärt, dass sie an den MTR binden und darüber eine potentielle Rolle bei verschiedenen Signaltransduktionskaskaden spielen könnten. Hierzu gehört die sPLA₂-IB, für die eine Bindung an den Ratten-, Kanninchenund den Maus-MTR nachgewiesen wurde (Cuppilard *et al.*, 1999).

Die Ergebnisse verschiedener Studien zeigten bereits, dass die sPLA2-IB eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen zu spielen scheint. Während einer akuten Pankreatitis wurde die sPLA2-IB in erhöhten Expressions-Spiegeln in der Niere nachgewiesen (Hieteranta et al., 1992). Außerdem kann die sPLA₂-IB nachweislich über die MAPKinase-Kaskade und die cPLA₂ die Bildung von proinflammatorischen Lipidmediatoren fördern (Kishino et al., 1995; Beck et al., 2003) sowie die Proliferation von Mesangiumzellen stimulieren (Huwiler et al., 1997). Die proinflammatorischen Effekte der sPLA₂-IB scheinen zumindest partiell über den MTR vermittelt zu sein. Über den MTR in Ratten-Mesangiumzellen werden durch die sPLA₂-IB in-vitro die Expression proinflammatorischer Enzyme wie die iNOS (Park et al., 2003) oder die sPLA₂-IIA (Beck et al., 2003) aktiviert. Um mehr über die Bedeutung der sPLA2-IB und des MTR bei entzündlichen Erkrankungen zu erfahren, wurden in-vivo-Studien an der Rattenniere nach Induktion einer Anti-Thy1.1-Glomerulonephritis (Anti-Thy1.1-GN), bzw. *in-vitro*-Studien an verschiedenen Zellen aus der Niere nach Stimulation mit dem proinflammatorischem Zytokin IL-1β durchgeführt.

In den ersten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass nach der Induktion der Anti-Thy1.1-GN die Expression der sPLA₂-IB in der Gesamt-Niere sowohl auf mRNA-Ebene (Maximum 6h nach Induktion) als auch auf Protein-Ebene (Maximum 24h nach Induktion) deutlich erhöht ist (vgl. Abb. 4.1). Durch immunhistologische Experimente stellte sich heraus, dass die nachgewiesene sPLA₂-IB fast ausschließlich von Zellen des Glomerulus exprimiert wird (Daten nicht gezeigt). Somit wurden für die folgenden *in-vitro*-Studien glomeruläre Mesangiumzellen und glomeruläre Endothelzellen verwendet und diese bezüglich ihres Expressionsmusters dersPLA₂-IB untersucht (vgl. Abb. 4.2). Die Endothelzellen zeigen eine konstitutive Expression dieser sPLA₂, allerdings konnte die Gabe des proinflammatorischen Zytokins IL-1β die Expression nicht merklich erhöhen. Auffällig ist die starke Induktion der Expression nach exogener Gabe sowohl des katalytisch aktiven Enzyms sPLA₂-IB als auch der katalytisch inaktiven Mutante H48Q (Janssen *et al.*, 1999). Die katalytisch inaktive Mutante der sPLA₂-IB ist ein elegantes Werkzeug, um Prozesse zu untersuchen, die unabhängig von der Fettsäurefreisetzung und potentiell über den MTR oder andere Bindungsproteine an der Zelloberfläche vermittelt werden.

Die Induktion der endogenen sPLA₂-IB durch das exogen zugesetzte Enzym lässt vermuten, dass die von den Endothelzellen selbst freigesetzte sPLA₂-IB über einen positiven *"feed back loop"* auf ihre eigene Genexpression wirken und diese verstärken. Dass auch die katalytisch inaktive Mutante H48Q die Expression der sPLA₂-IB induziert, deutet darauf hin, dass dieses Enzym den Effekt auf die eigene Biosynthese über die Bindung an den MTR vermittelt und nicht primär über die enzymatische Aktivität. Ein ähnlicher *"feed-back"*-Mechanismus wurde auch für die sPLA₂-IIA in Ratten-Mesangiumzellen beschrieben (Beck *et al.*, 2003).

Die katalytische Aktivität kann auch insofern ausgeschlossen werden, als die sPLA₂-IB als extrazelluläres Enzym nicht in der Lage ist, von Phospholipiden der Plasmamembran adhärenter Zellen Fettsäuren freizusetzen (Singer *et al.*, 2002). Behandelt man z.B. Mesangiumzellen, die zuvor für 24 h mit [¹⁴C]-Ölsäure oder einer anderen radioaktiv markierten Fettsäure vorinkubiert wurden mit diesem Enzym, kann keine Fettsäurefreisetzung in den Zellkulturüberstand nachgewiesen werden (M. Kaszkin-Bettag, persönliche Mitteilung). Dies unterstützt die Vermutung, dass die intrazelluläre Signaltransduktion durch exogene sPLA₂-IB durch den MTR vermittelt wird.

In unseren Untersuchungen konnte eine Expression der sPLA₂-IB in Mesangiumzellen nicht nachgewiesen werden. Andererseits wurde schon früher gezeigt, dass in diesen Zellen eine Stimulation mit exogener sPLA₂-IB zusammen mit dem Zytokin TNFα eine Expression der sPLA₂-IIA herbeiführt (Beck *et al.*, 2003). Die sPLA₂-IIA konnte in großen Mengen in entzündungsgeschädigten Glomeruli, wie auch in Monozyten und Makrophagen nachgewiesen werden (Wada *et al.*, 1997). In weiteren Untersuchungen konnte beobachten werden, dass die mRNA-Expression der sPLA₂-IIA in der Niere nach der Induktion einer Anti-Thy1.1-GN zeitabhängig hochreguliert wurde (Daten nicht gezeigt). Somit liegt die Vermutung nahe, dass die sPLA₂-IIA, induziert durch die exogene sPLA₂-IB, ein autokriner und/oder parakriner Mediator im Fortschreiten einer Glomerulonephritis ist.

119

Da proinflammatorische Bedingungen in glomerulären Endothelzellen die Expression der $sPLA_2$ -IB nur im geringen Maße erhöhen und in Mesangiumzellen dieses Enzym gar nicht exprimiert wird, müssen andere Zellen für den massiven Anstieg der $sPLA_2$ -IB-Expression in der Niere während einer Glomerulonephritis verantwortlich sein. Daraufhin wurden Immunzellen, wie Monozyten und Granulozyten, die als frühes Ereignis einer Glomerulonephritis in die Glomeruli einwandern (Bagchus *et al.*, 1990; Roy-Chaudhury *et al.*, 1995; Westerhuis *et al.*, 2000) untersucht. Sowohl Monozyten exprimieren konstitutiv $sPLA_2$ -IB mRNA und Protein. Nach Stimulation mit IL-1 β konnte diese $sPLA_2$ verstärkt im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden. In Granulozyten wird die $sPLA_2$ -IB auf mRNA-Ebene durch Stimulation mit IL-1 β induziert und auch als Protein konnte sie nach Behandlung mit IL-1 β in den Zelllysaten detektiert werden (Daten nicht gezeigt). In Nierenschnitten konnte 6h nach Induktion einer Anti-Thy1.1-GN die Einwanderung von Neutrophilen in den Glomerulus, welche die $sPLA_2$ -IB exprimieren, gezeigt werden. Auch ein Teil der eingewanderten Monozyten scheinen zu dem verstärkten $sPLA_2$ -IB-Expression in der Niere beizutragen (vgl. Abb. 4.3).

Wie bereits erwähnt, verfügt die sPLA₂-IB nur über eine geringe Kapazität, Arachidonsäure direkt aus der Membran freizusetzen (Singer *et al.*, 2002). Andererseits besitzt die sPLA₂-IB die höchste Bindungsaffinität zu dem MTR in der Ratte (Beck *et al.*, 2003; Valentin und Lambeau, 2000; Lambeau *et al.*, 1995) und kann über diesen Weg die Freisetzung von AA Initiieren. Dies kann zum einen über die Aktivierung der cPLA₂ erfolgen (Ancian *et al.*, 1995; Lambeau und Lazdunski, 1999; Huwiler *et al.*, 1997; Fonteh *et al.*, 2000) oder durch die Induktion der sPLA₂-IIA, was folgend zur einer erhöhten AA-Freisetzung und anschließender Prostaglandin-Bildung führt. (Kishino *et al.*, 1994; Kishino *et al.*, 1995). In früheren Studien wurde gezeigt, dass in Ratten-Mesangiumzellen die sPLA₂-IB unabhängig von ihrer katalytischen Aktivität die Expression der sPLA₂-IIA und die Prostaglandin-Bildung stimulieren kann. Beck *et al.* (2003) konnten zusätzlich zeigen, dass für diesen Prozess die Aktivierung der cPLA₂ und des Transkriptionsfaktors Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor α (PPAR α) notwendig ist und wahrscheinlich auch der MTR hierbei beteiligt ist.

In unseren Untersuchungen zeigten wir, dass die Expression des MTRs in der Niere während einer Glomerulonephritis deutlich erhöht ist. Wie die Ergebnisse einer Immunfluoreszenzmarkierung von Nierenschnitten darstellen (vgl. Abb. 4.4), wird der MTR 6h nach Induktion einer Anti-Thy1.1-GN von glomerulären Zellen exprimiert. *In-vitro* zeigten sowohl Ratten-Mesangium- als auch -Endothelzellen eine Erhöhung des MTR auf mRNA- und Protein-Ebene nach Stimulation mit dem proinflammatorischen Zytokin IL-1β

120

(vgl. Abb. 4.5). Das spricht dafür, dass die zellulären Effekte, die durch die Gabe von exogener sPLA₂-IB in Ratten-Mesangiumzellen beobachtet wurden, auf die Bindung des Enzyms an den MTRs zurückzuführen ist, dessen Expression unter entzündlichen Bedingungen erhöht ist.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass während einer Glomerulonephritis die sPLA₂-IB in stark erhöhtem Maße in der Ratten-Niere vorhanden ist, und auch das MTR-Protein deutlich verstärkt in den Glomeruli auftritt. Die sPLA₂-IB wird einerseits von den vorhandenen Endothelzellen im Glomerulus freigesetzt und zum anderen von Immunzellen, die als frühes Ereignis einer Glomerulonephritis in die Niere einwandern. Die sPLA₂-IB zeigt eine starke Bindungsaffinität für den MTR, über welchen die Freisetzung von Arachidonsäure initiiert, aber auch die Expression der sPLA₂-IIA verstärkt und die Prostaglandin-Bildung stimuliert wird. Dies sind Prozesse, die zur Progression einer Gromerulonephritis beitragen könnten. Darum war es von besonderem Interesse, mehr über die Funktion des M-Typ-Rezeptors bei entzündlichen Prozessen in der Niere bzw. in glomerulären Zellen zu erfahren. Im Rahmen meiner Dissertation bot sich die Möglichkeit, diesbezüglich Studien an MTR-knockout Mäusen vorzunehmen, welche freundlicherweise von Dr. Kohji Hanasaki, Shionogi Research Laboratries, Osaka, Japan, für diese Untersuchungen zur Verfügung gestellt wurden.

5.2 Untersuchungen zur Expression und Regulation des M-Typ-Rezeptors (MTR) in MTR-knockout Mäusen

Die MTR-knockout-Maus wurde wie unter 3.1 beschrieben generiert. Durch das Einfügen eines Resistenz-Gens in den Wildtyp-Stamm C57BL/6 wurde das Translations-Start-Codon zerstört, sodass diese Maus nicht mehr in der Lage ist, das MTR-Protein zu exprimieren. Phenotypsich weisen die MTR-knockout-Mäuse keine Unterschiede zur Wildtypmaus (Stamm C57BL/6) auf. Sie sind fertil und gesund; es zeigen sich keine Unterschiede in der Blutzellen- und Plasmalipid-Zusammensetzung (Hanasaki *et al.*, 1997).

Hanasaki *et al.* (1997) zeigten in ihren Studien, dass MTR knockout-Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen eine signifikant höhere Überlebensrate nach einem LPSinduzierten endotoxischen Schock aufwiesen. Auch die Plasmaspiegel von den Entzündungsmediatoren TNF α und IL-1 β , welche nach LPS-Behandlung von Zellen freigesetzt werden (Morrison and Ryan, 1987), waren in MTR-knockout-Mäusen deutlich niedriger als bei den Wildtypmäusen. Dies deutet an, dass der MTR eine Rolle bei der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen während des endotoxischen Schocks spielt.

Um die Funktion des MTRs in proinflammatorischen Signaltransduktionsprozessen aufzuklären, wurden sowohl aus Wildtyp-Mäusen als auch aus MTR-knockout-Mäusen, wie unter 3.3.1.1 beschrieben, glomeruläre Mesangiumzellen isoliert und als Zellkulturmodelle verwendet.

Die Reinheit der Mesangiumzellkulturen wurde wie in 4.2.1.1 gezeigt überprüft. Immunhistologische Färbungen zeigten, dass die Zellen "smooth muscle"-Aktin exprimieren (vgl. Abb. 4.6.A), auf das nur Mesangiumzellen aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu glatten Muskelzellen positiv reagieren, nicht aber Endothel- oder Epithelzellen, welche ebenfalls in den Glomeruli lokalisiert sind (Radeke et al., 1994). Die Markierung mit Zytokeratin, einem spezifischen Endothelzell- und Epithelzellmarker, war negativ (vgl. Abb. 4.6.B). Außerdem war die morphologisch charakteristische sternförmige Gestalt der Mesangiumzellen gut zu erkennen. Somit wurde gezeigt, dass es sich hier um eine reine aus Mesangiumzellen handelt. In gesunden Individuen Kultur *in-vivo* sind Mesangiumzellen eine Zellpopulation mit geringer Proliferationsrate, im Gegensatz zu z.B. Epithelzellen, welche eine konstante Wachstumsrate aufweisen (Striker und Striker, 1985). Unter Zellkulturbedingungen, d.h. Wachstum in Plastikschalen und durch die Zugabe von FKS in das Wachstumsmedium werden Mesangiumzellen zur Proliferation angeregt (Menè, 2000).

Sowohl die Überprüfung auf die Reinheit der Kultur, als auch die Proliferationsstudien wurden an Mesangiumzellen aus der Wildtyp- sowie aus der MTR-knockout-Maus durchgeführt. Beide Zelltypen haben einen völlig identischen Phänotyp und zeigen weder in den immuncytologischen Färbungen, der Morphologie oder im Proliferationsverhalten Unterschiede auf.

Um den Knockout des MTRs zu überprüfen, wurden RNA-Extrakte aus ganzen Nieren bzw. aus kultivierten Mesangiumzellen von Wildtyp- bzw. MTR-knockout-Mäusen mittels sq-PCR hinsichtlich der Expression der MTR-mRNA untersucht. Die MTR-mRNA konnte sowohl in der Niere als auch in den Mesangiumzellen und zwar sowohl bei den Wildtyp-, als auch MTR-knockout-Mäusen nachgewiesen werden. Für den Nachweis des MTR-Proteins mittels spezifischer Antikörper wurde für die MTR-knockout-Maus dagegen ein negatives Ergebnis erwartet. Während im Zelllysat aus der Gesamt-Niere der Wildtyp-Maus eindeutig das MTR-Protein (ca. 180 kDa) mittels Western-Blot-Technik nachgewiesen werden konnte, war in den Zelllysaten der MTR-knockout-Nieren kein Signal zu detektieren. Dass die Positivkontrolle bei einer geringeren Größe detektiert wurde (ca. 150 kDa) ist damit zu erklären, dass hier rekombinantes Protein des löslichen Rezeptors verwendet wurde. Dieser ist etwas kleiner als die membrangebunde Form des MTRs (Higashino *et al.*, 2002). Es konnte bestätigt werden, dass den MTR-knockout-Mäusen trotz Expression der MTR-mRNA die Fähigkeit fehlt den MTR als Protein zu exprimieren. Zum anderen zeigt dieses Ergebnis, dass in der Niere Zelltypen vorhanden sind, die den MTR als Protein unter Kontrollbedingungen exprimieren.

Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit ergaben aber auch, dass der MTR von Maus-Mesangiumzellen **nicht** exprimiert wird. Weder bei Mesangiumzellen aus den Wildtyp-Mäusen noch aus MTR-knockout-Mäusen konnte das Protein detektiert werden. Um dieses Ergebnis zu bestätigen wurden Rezeptor-Bindungsstudien durchgeführt, welche wesentlich sensitiver als sind als die Detektion des Proteins mittels Western-Blot-Analyse (vgl. 3.5.10). Die Bindungsstudien wurden sowohl an frisch isolierten Zellmembranen als auch direkt an lebenden Wildtyp-Mesangiumzellen unter Kontroll- und entzündlichen Bedingungen durchgeführt. Als Negativkontrolle wurden Mesangiumzellen aus MTR-knockout-Mäusen verwendet. Es konnte an den Zellmembranen bzw. direkt an den lebenden Zellen keine spezifische Bindung des spezifischen MTR-Liganden OS₂ festgestellt werden, sodass hiermit bestätigt wurde, dass Maus-Mesangiumzellen keine nachweisbaren Mengen des MTRs exprimieren.

Mesangiumzellen stellen also nicht den Zelltyp in der Maus-Niere dar, welcher das MTR-Protein unter Kontrollbedingungen bzw. entzündlichen Bedingungen exprimiert. Dies ist ein Unterschied zu Mesangiumzellen aus der Ratten-Niere, welche den MTR nach Gabe des proinflammatorischen Zytokins IL-1β auf Proteinebene exprimieren (vgl. Abb. 4.5 B).

Mögliche Zellen in der Maus-Niere, welche den MTR exprimieren, könnten glomeruläre Endothelzellen sein. Auch in der Ratte konnte bereits gezeigt werden, dass diese Zellen dieses Protein unter Kontrollbedingungen schwach und nach Stimulation mit IL-1β verstärkt exprimieren (vgl. Abb. 4.5.B).

Da das Protein des MTR in Wildtyp-Mesangiumzellen der Maus nicht exprimiert zu sein scheint (vgl. 4.2.2), war es nicht sinnvoll, Studien bezüglich der Rolle des Rezeptors im Vergleich zu Mesangiumzellen aus MTR-knockout-Mäusen durchzuführen. Deshalb wurden in den folgenden Untersuchungen nur noch Wildtyp-Mesangiumzellen als Zellsystem verwendet.

123

5.3 Charakterisierung der Phospholipasen A₂ in Maus-Mesangiumzellen

Phospholipasen A₂ können durch ihre Fähigkeit Fettsäuren aus zellulären Membranen freizusetzen, welche zu Lipidmediatoren umgewandelt werden, viele physiologische und pathophysiologische Prozesse aktivieren und verstärken. Speziell die Freisetzung von Arachidonsäure ist ein entscheidender Schritt, da diese als Vorläufermolekül für Eicosanoide dient (Murakami et al., 1998). Im Besonderen die Prostaglandine spielen in der Niere eine wichtige Rolle. Zum Einen sind sie für die Aufrechterhaltung der Hömöostase und für verschiedene Nierenfunktionen wie Hämodynamik, Renin-Sekretion, tubuläre Transportprozesse, Proliferation und Apoptose verantwortlich (Nasrallah und Hébert, 2005). Zum Anderen sind sie in der Pathogenese der Hypertonie (Qi et al., 2002), in Elektrolyt- Funktionsstörungen wie dem Bartter-Syndrom (Reinalter et al., 2002) sowie bei entzündlichen Nierenerkrankungen beteiligt (Hartner et al., 2000). Nach wie vor ist nur unvollständig geklärt, welche Rolle die sPLA₂s bei diesen Prozessen spielen, zumal es sich immer mehr herauskristallisiert, dass es bedeutende Spezies-spezifische Unterschiede im Expressionsmuster und in der Funktion der einzelnen sPLA₂s in verschiedenen Organen und Geweben zu geben scheint (Six und Dennis, 2000; Singer et al., 2002).

Bislang ist über die Expression der sPLA₂s in der Mausniere wenig bekannt. Auf mRNA-Ebene konnte die sPLA₂-IB, sPLA₂-IIA, s-PLA₂-IIE und sPLA₂-V (Eerola *et al.*, 2006), sowie die sPLA₂-XII und sPLA₂-III in Kontrolltieren nachgewiesen werden (Touqui und Alaoui-El-Azher, 2001). Da über die Expression von PLA₂s speziell in murinen glomerulären Mesangiumzellen bislang noch keine Erkenntnisse vorlagen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Expressionsmuster der mRNA-Expression der PLA₂s in murinen Mesangiumzellen erstellt. Das Ergebnis der Realtime-PCR zeigt, dass die sPLA₂-IB, -IIE, -III, -V, -X, -XIIA, die iPLA₂ und die cPLA₂ konstitutiv exprimiert werden. Für die sPLA₂-IIC, -IID, -IIF, -XIIB konnte keine Expression nachgewiesen werden (vgl. Abb. 4.10).

sPLA₂s können über verschiedene Wege durch ihre katalytische Aktivität auf die Freisetzung von AA in der Zelle wirken und somit den Eicosanoidstoffwechsel beeinflussen. Zum einen über den Heperansulfat-Shuttling-Weg, bei dem durch die Umverteilung der sPLA₂s in das Zellinnere der Kontakt zu den von ihnen bevorzugten Phospholipidsubstraten ermöglicht wird (Murakami und Kudo, 2004) oder zum anderen über den sog. externen Plasmamembran-Weg, bei dem die sPLA₂s direkt von der PC-reichen Plasmamembran AA abspalten können (Hanasaki *et al.*, 1999; Murakami *et al.*, 1999). Eine weitere Variante ist die Signaltransduktion über den MTR. Da aber in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass murine Mesangiumzellen keinen MTR auf Proteinebene

exprimieren (vgl. Abb. 4.9 B) und somit dieser Weg nicht genutzt werden kann, spielt die sPLA₂-IB in diesen Zellen keine Rolle bei der Freisetzung von AA. Eine Funktion der sPLA₂-IB könnte sein, dass sie, nachdem sie von den Mesangiumzellen sezerniert wurde, auf benachbarte Zellen, also parakrin, über deren MTR die Signaltransduktion steuert. Als potentielle Zielzellen kämen Endothelzellen in Frage. In dieser Arbeit wurde die Expression des MTRs in Maus-Endothelzellen der Niere nicht untersucht. Es konnte aber gezeigt werden, dass in glomerulären Endothelzellen der Ratte der MTR exprimiert wird und unter entzündlichen Bedingungen eine deutliche Verstärkung der Expression stattfindet (vgl. Abb. 4.5). Im Zuge zukünftiger Untersuchungen wären zellspezifische Lokalisationsstudien für den Rezeptor interessant.

5.4 Die Regulation der Phospholipasen A₂ in Maus-Mesangiumzellen unter entzündlichen Bedingungen

Unter entzündlichen Bedingungen ist die cPLA₂ das Enzym, welches den Hauptanteil der AA zur Biosynthese von Eicosanoiden zur Verfügung stellt (Kudo und Murakami, 2002). Viele Studien in verschiedenen Zellsystemen haben aber gezeigt, dass auch die sPLA₂s eine Rolle bei der Generierung von AA spielen und wichtig für die Initiierung und Amplifizierung der Eicosanoidproduktion während Entzündungsreaktionen sind (Triggiani et al., 2005). Bisher konzentrierten sich die meisten Untersuchungen vor allem auf die sPLA₂-IIA, da mittlerweile auch in klinischen Studien gezeigt wurde, dass sie eine Rolle in der Pathogenese von verschiedenen akuten und chronischen entzündlichen Krankheiten. wie der Sepsis (Guidet et al., 1996), rheumatider Athritis (Seilhammer et al., 1989) oder Asthma (Bowton et al., 1997) spielt. Jedoch hat der Einsatz von mehr oder weniger spezifischen Inhibitoren dieses Enzyms nicht den erhofften klinischen Erfolg bei diesen Erkrankungen gezeigt (Zeiher et al., 2005). Dies ließ vermuten, dass weitere sPLA₂s an entzündlichen Prozessen im Organismus auf vielfältigste Weise beteiligt sein müssen. Üblicherweise wird die Expression und Regulation von Proteinen zunächst in Mausmodellen untersucht, da man in diesem Tiermodell die Möglichkeit hat, mittels moderner Technologien wie der knockout-Maus oder der siRNA die Expression dieser Proteine gezielt auszuschalten und die physiologischen Konsequenzen für den Organismus zu studieren. Im Hinblick auf die Funktionen der sPLA₂s war es aber zunächst erforderlich, eine Vorstellung davon zu haben, welche dieser Enzyme überhaupt in der Maus exprimiert werden. Dies erfolgte bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen in den unterschiedlichsten Organen.

In der Maus gilt die sPLA₂-V als der am stärksten exprimierte Subtyp der sPLA₂s. Er konnte in verschiedenen Geweben detektiert werden, besonders im Herz, Lunge und Milz. Nach LPS-behandlung konnte in diesen Geweben ein Anstieg der mRNA-Expression nachgewiesen werden und auch in Niere und Darm fand eine Induktion dieser sPLA₂ nach LPS-Gabe statt (Sawada *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu konnte die sPLA₂-IIA nur im Darm nachgewiesen werden (in Balb/cJ-Mäusen) und durch die LPS-Behandlung war die Expression kaum verstärkt. In C57BL/6-Mäusen war die sPLA₂-IIA nicht zu detektieren, da aufgrund einer *"frame-shift"*-Mutation ein natürlicher knockout dieses Gens vorliegt (Kennedy *et al.*, 1995). In unstimulierten wie auch in LPS-aktivierten Maus-Makrophagen konnte eine deutliche mRNA-Expression der sPLA₂-V nachgewiesen werden, welche dort eine Rolle im AA-Metabolismus zugeschrieben wird (Balboa *et al.*, 1996). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass in der Maus die sPLA₂-V eine Hauptfunktion bei Entzündungsreaktionen zu spielen scheint, im Gegensatz zu der Ratte, bei der diese Rolle eher von der sPLA₂-IIA übernommen wird (Pfeilschifter, 1995).

Da die Expression der sPLA₂s in den Mesangiumzellen der Maus bisher unbekannt war und eine Kenntnis der Expression der einzelnen Enzyme für zukünftige knockout-Studien bezüglich entzündlicher Nierenerkrankungen von großem Interesse war, wurden in dieser Arbeit alle sPLA₂ Subtypen hinsichtlich ihrer Expression und Regulation unter entzündlichen Bedingungen auf mRNA- und Protein-Ebene untersucht.

Die in Abbildung 4.10 dargestellten Ergebnisse der mRNA-Expression mittels Realtimeund sq-PCR zeigen, dass die sPLA₂-IB, -IIE, -III, -V, -X und -XIIA, sowie die cPLA₂ und iPLA₂ in den Maus-Mesangiumzellen exprimiert werden. Die höchste Expression zeigt die sPLA₂-XIIA, ebenso zeigten erwartungsgemäß auch die iPLA₂ und cPLA₂ eine starke Expression. Im Gegensatz dazu konnten die sPLA₂-IB, sPLA₂-IIE, sPLA₂-III, sPLA₂-V und sPLA₂-X auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden, jedoch in wesentlich geringerem Maße. Durch Gabe der proinflammatorischen Zytokine TNF α , IL-1 β und IFN γ wurden in den Zellkulturexperimenten entzündliche Bedingungen erzeugt. Für die sPLA₂-III und sPLA₂-V wurde nach dieser Behandlung überraschenderweise eine Abnahme der Expression festgestellt, die sPLA₂-IIE wurde im Gegensatz hierzu stärker exprimiert. Auf die mRNA-Expression der sPLA₂-IB, -X und -XIIA hatte der Zytokin-Mix keinen Effekt (vgl. Abb. 4.11).

Die Abnahme der Expression der sPLA₂-III und -V nach Zytokin-Gabe steht im Gegensatz zu der bislang vorherrschenden Meinung, dass diese sPLA₂s als vorwiegend proinflammatorische Proteine unter entzündlichen Bedingungen verstärkt exprimiert werden. Speziell für die sPLA₂-V in der Maus wurde bislang, wie oben beschrieben, eine Induktion bzw. Hochregulation dieses Enzyms in der Entzündung beobachtet. Doch in mehreren Studien wurde bereits eine abgeschwächte Expression von sPLA₂s in verschiedenen Geweben unter entzündlichen Bedingungen gezeigt. Die Behandlung von humanen Keratinozyten mit dem Phorbolester TPA, welcher normalerweise ein starker Induktor von inflammatorischen Prozessen in der Haut ist (Marks und Fürstenberger, 1990), führt zu einer Abnahme der Expression der sPLA₂-IIA, -V und -X (Schadow et al., 2001). Auch die Zytokin-induzierte mRNA-Expression der sPLA2-IIA in Ratten-Mesangiumzellen wird durch das TPA gehemmt (Scholz et al., 1999). Hamagushi et al. (2003) konnten zeigen, dass die Expression der sPLA2-IID mRNA aus der Gesamt-Niere der Maus mit zunehmender LPS-Konzentration abnimmt. Wie hier gezeigt, weist als einzige die sPLA₂-IIE in Maus-Mesangiumzellen einen schwachen Anstieg der Expression nach Zytokin-Gabe auf und könnte ein potentieller Ersatz für die inflammatorische sPLA2-IIA sein, welche in diesem Mausstamm natürlicherweise nicht vorkommt. Die sPLA2-IIE konnte jedoch trotz ihrer vergleichsweise starken Expression auf mRNA-Ebene als Protein trotz eines spezifischen Antikörpers nicht detektiert werden. Eine Erklärung hierfür wäre, dass die sPLA₂-IIE verstärkt gebunden an Glypican, ein Heperan-Proteoglykan der Plasmamembran, vorliegt (Murakami et al., 1998) und somit nicht frei im Zellkulturüberstand zu finden ist. Die Sensitivität des Antikörpers kann kein Grund sein für die Nicht-Detektierbarkeit der sPLA2-IIE, da die Antiseren für die Maus-sPLA2s Mengen von nur 1ng im Western-Blot detektieren können (Eerola et al., 2006; Degousee et al., 2002)

Sowohl die cPLA₂, als auch die iPLA₂ werden in Maus-Mesangiumzellen unter entzündlichen Bedingungen leicht verstärkt exprimiert und könnten so zu einer Erhöhung der AA-Freisetzung und damit zur leicht erhöhten Prostaglandin-Bildung nach Zytokingabe beitragen (vgl. Abb. 4.14).

Des Weiteren konnten auf Protein-Ebene die sPLA₂-IB, -V und -X mittels spezifischer Antikörper in Zellkulturüberständen von Mesangiumzellen nachgewiesen werden. (vgl. Abb. 4.12). Alle drei Enzyme werden konstitutiv exprimiert; bei der sPLA₂-V ist eine leichte Abnahme nach Gabe des Zytokin-Mix erkennbar, während die sPLA₂-IB und -X durch die Zytokine nicht beeinflusst werden. Diese Ergebnisse entsprechen den zuvor besprochenen Daten der mRNA-Expression. Bei weiteren Western-Blot-Analysen durchgeführt mit Proteinextrakten aus dem Zelllysat konnten keine sPLA₂s detektiert werden. Die sPLA₂-III und sPLA₂-XIIA, welche deutlich auf mRNA-Ebene zu finden waren, konnten nicht auf Protein-Ebene untersucht werden, da mir keine spezifischen Antikörper für diese Enzyme zur Verfügung standen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass verschiedene sPLA₂s auf mRNA-Ebene in Maus-Mesangiumzellen exprimiert werden, wovon die sPLA₂-IB, -V und -X auch auf

Protein-Ebene nachgewiesen werden konnten. Als Protein wird nur die sPLA₂-V unter entzündlichen Bedingungen reguliert, da sie nach Zytokin-Gabe schwächer exprimiert wird. Sie scheidet damit als verantwortliches Enzym in Mausmodellen für entzündliche Nierenerkrankungen wohl eher aus. Dementsprechend wäre eine sPLA₂-V-knockout-Maus eher nicht als ein solches Modelltiersystem geeignet.

Nach dem erfolgreichen Nachweis von drei sPLA₂s in dem Zellkulturüberstand von Mesangiumzellen, wurde dieser hinsichtlich der sPLA₂-Aktivität mittels eines speziellen Assays untersucht (vgl. 3.5.5). Doch weder in den Kulturüberständen von Zytokinbehandelten Zellen, noch von unbehandelten Zellen konnte eine spezifische sPLA₂-Aktivität nachgewiesen werden. Möglicherweise war der Test nicht sensitiv genug, um die Enzymaktivität potentiell vorhandener sPLA₂s nachzuweisen.

Der Einsatz von spezifischen sPLA₂- bzw. cPLA₂-Inhibitoren ermöglichte es uns, zu untersuchen, ob die Aktivität dieser PLA2s einen Einfluss auf ihr eigenes Expressionsverhalten haben bzw. regulierend auf die Eicosanoidbiosynthese wirken. Frühere Studien zeigten bereits, dass in Ratten-Mesangiumzellen die Aktivierung der cPLA₂ durch die Behandlung mit exogenen sPLA₂s erfolgte (Huwiler et al. 1997). Außerdem kann in diesen Zellen die exogene sPLA2-IB die Zytokin-stimulierte Transkription der proinflammatorischen sPLA₂-IIA über die Aktivierung des PPAR α potenzieren. Zudem kann die endogene sPLA2-IIA durch eine autokrine "feed-back"-Aktivierung ihre eigene Expression steigern (Beck et al., 2003). Shinohara und Mitarbeiter (1999) zeigten in Mausmakrophagen P388D1, dass die endogene cPLA₂-Aktivität und die nachgeschaltete Eicosanoid-Biosynthese nötig sind, um die Expression der sPLA₂-V zu induzieren. In Ratten-Fibroblasten konnte durch die Inhibition der cPLA₂ die Expression der sPLA₂-IIA gehemmt werden (Kuwata et al., 1998). Diese Ergebnisse zeigen, dass ein sog. "cross-talk" zwischen den verschiedenen Phospholipasen A₂ in der Zelle stattfindet. Verwendet wurden in dieser Arbeit der spezifische sPLA2-Inhibitor Me-IDX und der spezifische Inhibitor der cPLA₂ PYR-1, jeweils in Konzentrationen, in denen eine optimale Hemmung erwartet wurde. Nach Stimulation der Mesangiumzellen mit den jeweiligen Inhibitoren bzw. in Kostimulation mit dem Zytokin-Mix wurden mittels Realtime-PCR die Expressionen der verschiedenen PLA₂s untersucht. Wie in Abbildung 4.13 gezeigt, wurde die Expression der sPLA2-IB, -IIE und -V, sowie der iPLA2 und cPLA2 weder von dem sPLA₂-Inhibitor Me-IDX noch von dem cPLA₂-α-Inhibitor PYR-1 beeinflusst. Die Herunterregulierung der sPLA2-III nach Zytokinbehandlung wurde durch den Inhibitor PYR-1 partiell aufgehoben. Dies spricht dafür, dass die Zytokin-stimulierte Abnahme der sPLA₂-III über die cPLA₂α vermittelt wird. Die sPLA₂s spielen keine Rolle bei der Regulierung ihrer eigenen Genexpression, da nach deren Hemmung durch Me-IDX keine Änderung zu erkennen ist. Bei der sPLA₂-X liegt der umgekehrte Fall vor. Wurde die cPLA₂α mittels PYR-1 gehemmt, war eine schwächere Expression der konstitutiven sPLA₂-X-Expression erkennbar. Den gleichen Effekt zeigte PYR-1 bei der Expression der sPLA₂-XIIA, auch sie wurde bei einer Kostimulation mit Zytokinen und dem Inhibitor schwächer exprimiert. Auffällig war hier, dass unter Kontrollbedingungen die Inhibition der sPLA₂s durch Me-IDX zu einem Anstieg in der sPLA₂-XIIA-Expression führt. Dies deutet auf eine konstitutive extrazelluläre sPLA₂- Aktivität hin, welche die Expression der sPLA₂-XIIA unter nicht stimulierten Bedingungen hemmt. Eine konstitutive freie sPLA₂-Aktivität im Zellkulturüberstand konnte mit den uns zur Verfügung stehenden Methoden jedoch nicht nachgewiesen werden.

Insgesamt deuten diese Ergebnisse auf komplexe Regulationen der sPLA₂s hin, die zum Teil cPLA₂-vermittelt zu sein scheinen und die in zukünftigen Untersuchungen im Einzelnen genauer hinterfragt werden müssen.

5.5 Die Bedeutung der Phospholipasen A₂ bei der Biosynthese von Lipidmediatoren in Maus-Mesangiumzellen

Als wichtige bioaktive Lipidmediatoren in der Zelle wurden die Prostaglandine untersucht. Prostaglandine spielen sowohl physiologisch als auch pathophysiologisch in der Niere eine wichtige Rolle. Sie sind z.B. für die Aufrechterhaltung der Homöostase und die Regulation von verschiedenen Nierenfunktionen wie Hämodynamik, Renin-Sekretion, tubuläre Transportprozesse, Proliferation und Apoptose verantwortlich (Nasrallah und Hébert, 2005). Auf der anderen Seite sind sie an pathophysiologischen Prozessen beteiligt. So spielen sie in der Pathogenese der Hypertonie (Qi *et al.*, 2002), in Elektrolyt-Funktionsstörungen wie dem Bartter-Syndrom (Reinalter *et al.*, 2002) sowie bei entzündlichen Nierenerkrankungen eine wichtige Rolle (Hartner *et al.*, 2000).

In dieser Arbeit wurden die beiden Prostaglandine E₂ und I₂ (Prostacyclin) untersucht, für welche die meisten renalen Funktionen beschrieben werden. PGI₂ ist ein sehr instabiles Produkt und da es in Lösungen nur eine Halbwertzeit von ca. 3 Minuten besitzt, ist es eine gängige Methode, das stabile Endprodukt 6-keto-PGF_{1α} zu messen. Wie in Abbildung 4.14 gezeigt, wird sowohl PGE₂ als auch PGI₂ konstitutiv von Maus-Mesangiumzellen exprimiert. Nach einer Inkubation mit den proinflammatorischen Zytokinen TNFα, IL-1β und IFNγ konnte nur eine schwache, nicht signifikante Steigerung der Prostaglandin-

Synthese erreicht werden. Dieses Ergebnis ist eher überraschend, da für Prostaglandine E_2 und I_2 beschrieben wird, dass sie unter entzündlichen Bedingungen vermehrt ausgeschüttet werden und ihnen daher auch eine Rolle bei der Aufrechterhaltung einer Entzündungsreaktion zugeteilt wird. In Ratten-Mesangiumzellen führt eine Stimulation mit dem proinflammatorischem Zytokin IL-1 β zu einem Anstieg der PG-Synthese, welche durch die cAMP-generierende Substanz Forskolin weiter potenziert wird (Pfeilschifter *et al.*, 1989; Schalkwijk *et al.*, 1991). Schildknecht *et al.* (2004) zeigten, dass die Behandlung von glatten Muskelzellen, ein den Mesangiumzellen verwandter Zelltyp, aus dem Rind mit den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β oder TNF α bzw. mit LPS zu einem Anstieg von PGI₂ und PGE₂ führt.

In verschiedenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die erhöhte PGE₂-Synthese unter entzündlichen Bedingungen durch die Induktion bzw. Aktivierung von PLA₂s und damit erhöhte Verfügbarkeit von AA stammt. In Ratten-Mesangiumzellen führt die Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen zu einer Induktion des sPLA₂-IIA-Gens und einer gesteigerten Produktion von PGE₂ (Schalkwijk *et al.*, 1992; Pfeilschifter *et al.*, 1993; Walker *et al.*, 1995). In Maus-Macrophagen scheint dagegen die sPLA₂-V verantwortlich für die LPS-induzierte PGE₂-Produktion über COX-2 zu sein. Auch scheint die cPLA₂ eine Rolle bei der Eicosanoid-Produktion zu spielen, zumindest wird ihr eine regulatorische Funktion bei der Expression der sPLA₂-V zugeschrieben (Shinohara *et al.*, 1999).

Wie in dieser Arbeit aber gezeigt, werden in Maus-Mesangiumzellen die Prostaglandine E₂ und I₂ unter entzündlichen Bedingungen kaum verstärkt produziert. Dies könnte zu der Beobachtung passen, dass die sPLA₂s, welche in der vorliegenden Arbeit in Maus-Mesangiumzellen nachgewiesen werden konnten, unter entzündlichen Bedingungen keine erhöhte Expression aufwiesen. Die leichte Erhöhung der PG-Synthese kann auf die leicht verstärkte cPLA₂- und iPLA₂-mRNA-Expression zurückgeführt werden (vgl. Abb. 4.11). Durch erhöhte Expression dieser Enzyme steigt der Betrag an freigesetzter AA an, sodass mehr Prostaglandine produziert werden können.

Auffällig ist, dass die Menge an konstitutiv freigesetztem PGI_2 etwa 20mal höher ist als PGE_2 . Sie gelten beide als starke Vasodilatatoren, im Gegensatz zu Thromboxan A_2 und $PGF_{2\alpha}$, welche vasokonstriktorische Eigenschaften besitzen (Breyer und Breyer, 2001; Nasjletti und Arthur, 1998; Boffa *et al.*, 2004). PGE₂ spielt eine Rolle bei der Regulation der Natrium-Resorption (Brater *et al.*, 2001). PGI₂ erhöht den Kalium-Spiegel hauptsächlich durch die Sekretion von Renin und die Aktivierung des Renin-Angiotensin-

System, welches zu einer verstärkte Sekretion von Aldosteron führt. Außerdem erhöht PGI₂ den renalen Blutfluss und die glomeruläre Filtrationsrate (Harris, 2002). PGI₂ ist ein sehr instabiles Produkt und besitzt eine Halbwertszeit von nur wenigen Minuten. Durch diese stark erhöhte Synthese könnte die kurze Wirkdauer kompensiert werden. Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass PGI₂ durch verschiedene Mechanismen präventive Effekte bei Nierenerkrankungen ausübt. Togawa *et al.* (1997) konnten zeigen, dass das PGI₂-Analogon Beraprost die Expression der MAPK-Phosphatase induziert und die Proliferation von kultivierten Mesangiumzellen stoppt. Außerdem zeigte PGI₂ einen präventiven Effekt bei einer experimentellen Glomerulonephritis, indem es die intraglomeruläre Koagulation inhibiert (Kushiro *et al.* 1998).

Für die zuvor beschriebenen Prozesse spielen die Cyclooxygenasen eine wichtige Rolle. Beschrieben wird die COX-1 als der konstitutiv exprimierte Typ, der damit vorwiegend Prostaglandine zur Verfügung stellt, welche physiologische Aufgaben übernehmen. Die COX-2 wird als induzierbare Form bezeichnet, da ihre Expression hauptsächlich durch proinflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren induziert wird, was in Ratten-Mesangiumzellen mit IL-1β gezeigt wurde (Martin et al., 1994; Rzymkiewicz et al., 1994). Somit ist sie vor allem für die erhöhte Prostaglandin-Produktion in entzündetem Gewebe verantwortlich (Crofford et al., 1997; Herschman et al., 1997). Aber auch die COX-2 kann konstitutiv exprimiert werden und ist somit auch für physiologische Prozesse verantwortlich, wie in der Ratten-Niere (Harris et al., 1994) oder der Maus-Niere gezeigt werden konnte (Ferguson et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass beide COX-Enzyme konstitutiv auf Protein-Ebene in Maus-Mesangiumzellen exprimiert werden (vgl. Abb. 4.15), im Gegensatz zu Ratten-Mesangiumzellen, die die COX-2 nicht konstitutiv exprimieren (Tsai et al., 2004). Die leicht verstärkte Expression sowohl der COX-1 als auch der COX-2 unter entzündlichen Bedingungen auf mRNA-Ebene spiegelt sich auf Protein-Ebene nicht wieder. Auch dies passt zu dem Ergebnis, dass kaum eine Erhöhung der PG-Synthese unter entzündlichen Bedingungen stattfindet, da keine verstärkte Expression der COX-Proteine stattfindet. Durch vermehrte Untersuchungen auf diesem Gebiet wächst die Annahme dass die COX-1 und COX-2 verschiedene Rollen in der Regulation des AA-Stoffwechsels spielen (Smith et al., 1996). Scheinbar läuft die frühe PG-Synthese, welche einige Minuten nach Stimulation eintritt, über die COX-1. Die späte Synthese von Prostaglandinen, welche über mehrere Stunden dauern kann, läuft über die COX-2, parallel mit der Induktion ihrer Expression (Murakami et al., 1994; Bingham et al., 1996; Reddy und Herschman, 1997; Kuwata et al., 1998; Naraba et al., 1998; Morham et al., 1995). In Maus-Mesangiumzellen wird sowohl die COX-1 als auch
die COX-2 konstitutiv exprimiert, sodass anzunehmen ist, dass beide Isoformen zur stetigen Produktion von Prostaglandinen beitragen. Ob die verschiedenen PLA₂s an eine bestimmte der beiden Isoformen gekoppelt, d.h. eine räumliche Kolokalisation der beiden Enzyme vorliegt, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

Da sowohl sPLA₂s als auch die cPLA₂ α die Freisetzung von AA vermitteln und somit das Substrat zur Eicosanoid-Biosynthese liefern (Leslie, 1997; Balsinde *et al.*, 2002), wurde in dieser Arbeit untersucht, welche der PLA₂ an der Prostaglandin-Produktion in Maus-Mesangiumzellen beteiligt sind. Wie die Ergebnisse in Abbildung 4.16 zeigen, kann die konstitutive PGE₂ bzw. PGI₂-Produktion durch die cPLA₂-Inhibitoren PYR-1 bzw. AZ-1 deutlich gesenkt werden. Dies zeigt, wie erwartet, dass die cPLA₂ α einen Großteil der AA für die PG-Produktion zur Verfügung stellt. Doch trotz Hemmung der cPLA₂, die bei den gewählten Konzentrationen der Inhibitoren vollständig sein sollte, ist die PG-Produktion nicht zum völligen Stillstand gekommen. Dies zeigt, dass den Zellen noch andere Quellen für AA zur Verfügung stehen. Dieses könnte die iPLA₂ und /oder vor allem die sPLA₂s sein. Dass sPLA₂s an der Eicosanoidbiosynthese beteiligt sind, wird damit gezeigt, dass bei Hemmung der sPLA₂s durch den nicht zellpermeablen Inhibitor Me-IDX die Prostaglandin-Produktion zurückgeht. In Maus-Mesangiumzellen kommen die sPLA₂-IB, -V und -X in Frage, welche auf Proteinebene mittels Western-Blot nachgewiesen werden konnten (vgl. Abb. 4.12).

Zu klären wäre, ob die beiden Enzyme sPLA₂ und cPLA₂ unabhängig voneinander arbeiten oder sich bei der AA-Freisetzung gegenseitig beeinflussen. Von Han *et al.* (2003) wurde ein bestehender "*cross talk*" zwischen den sPLA₂s und der cPLA₂ α in der H₂O₂induzierten AA-Freisetzung in murinen Mesangiumzellen diskutiert. Sie zeigten, dass die H₂O₂-induzierte Aktivierung der PKC und ERK1/2 zur Aktivitätssteigerung der cPLA₂ α führt, welche das hauptverantwortliche Enzym für die AA-Freisetzung ist. Den in diesen Zellen transfizierten sPLA₂-IIA und sPLA₂-V wurde in ihrem Modell eine regulatorische Funktion zugeschrieben, indem sie ebenfalls über die Aktivierung der PKC und ERK1/2 die Aktivität der cPLA₂ α potenzieren.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Ergebnisse darauf hindeuten, dass sowohl sPLA₂s als auch die cPLA₂ AA zur PG-Synthese beisteuern, welche in Maus-Mesangiumzellen wahrscheinlich über beide Isoformen der COX erfolgt. Da diese beteiligten Enzyme der PG-Synthese bereits konstitutiv exprimiert werden und auch unter entzündlichen Bedingungen keine verstärkte Expression nachgewiesen werden konnte,

132

lässt dies vermuten, dass die relativ große Mengen an Prostaglandinen benötigt werden, um die physiologischen Funktionen in der Mausniere sicherzustellen.

Allerdings muss man immer in Betracht ziehen, dass diese *in-vitro*-Untersuchungen an kultivierten Maus-Mesangiumzellen durchgeführt worden sind. Das Wachstum der Zellen erfolgt in Medium, welches Serum mit vielen Wachstumsfaktoren enthält und damit einen pseudoentzündlichen Zustand darstellen könnte. Dies könnte die Zellen in einen permanent angeregten Zustand versetzen in welchem Enzyme wie die COXen eine erhöhte Expression aufweisen und folgend große Mengen an Prostaglandinen produzieren. Weiterführend müssten *in-vivo*-Studien durchgeführt werden, um zu bestätigen, dass Mesangiumzellen auch in einem physiologisch intakten Umfeld diese Enzyme konstitutiv exprimieren.

5.6 Die Regulation der Entzündungsmediatoren NO und MIP-2 in Maus-Mesangiumzellen

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein Biomolekül, welches sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch bei der Entzündungsreaktion eine wichtige Rolle spielt. NO wird durch die NO-Synthasen aus L-Arginin synthetisiert. In dieser Arbeit wurde nur die induzierbare NO-Synthase (iNOS) in Maus-Mesangiumzellen untersucht, da die beiden anderen Isoformen, die endotheliale NOS und die neuronale NOS hauptsächlich in Endothelzellen bzw. neuronalen Zellen exprimiert wird, nicht aber in Mesangiumzellen (Pfeilschifter *et al.*, 2001). Das in niedrigen Konzentrationen konstitutiv gebildete NO in der Niere hat schützende Funktionen, wie die Senkung des glomerulären Kapillardrucks und Regulierung des renalen Blutflusses (Romero und Strick, 1993). Die unter pathophysiologischen Bedingungen durch die iNOS gebildeten großen Mengen NO können zu Zell- und Gewebeschädigung führen. Die iNOS kann in den meisten Zelltypen durch zwei Mechanismen induziert werden: zum Einen durch proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β , TNF α und IFN γ und bakterielles LPS und zum Anderen aber auch durch pathophysiologische Bedingungen wie Hypoxie und ROS (Pfeilschifter *et al.*, 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in Maus-Mesangiumzellen die Induktion der iNOS erst nach Stimulation mit einem Mix aus drei proinflammatorischen Zytokinen- IL-1 β , TNF α und IFN γ erfolgte (vgl. Abb. 4.22). Durch die jeweilige Gabe von IL-1 β oder TNF α konnte keine Induktion erreicht werden; gibt man diese Zytokine in Kombination, so konnte auf dem Western-Blot ein schwaches Signal des iNOS-Proteins detektiert werden. Erst mit der zusätzlichen Gabe von IFN γ wurde eine sehr starke Induktion der iNOS-Expression erreicht. Dies zeigt eine maßgebliche Rolle des IFN γ in dieser Signalkaskade. Untersuchungen zeigen, dass der iNOS-Promoter der Maus eine *"Interferon-\gamma-activated site"* (GAS) enthält, welche für die vollständige Expression des iNOS-Gen in Folge einer IFN γ -Stimulation notwendig ist. Die Aktivierung erfolgt durch den Transkriptionsfaktor STAT1 α (Gao *et al.,* 1997). Dennoch ist für die Induktion des iNOS-Gens die Kombination der drei Zytokine wichtig, da durch IFN γ allein auch keine Induktion stattfindet (Daten nicht gezeigt). Dies spricht dafür, dass die Induktion gleichzeitig auch über NF- κ B Signalweg stattfindet, welcher durch IL-1 β und TNF α aktiviert wird (Gosh und Karin, 2002). Hier liegt ein klarer Unterschied zu Ratten-Mesangiumzellen vor, da bekannt ist, dass in diesen die iNOS allein durch IL-1 β oder TNF α induziert werden kann und keine Kombination mit IFN γ notwendig ist (Pfeilschifter *et al.,* 1992).

Durch Western-Blot-Analysen und Messung der abgegebenen NO-Konzentrationen der Zellen konnten wir zeigen, dass die Konzentrationen von 0,5 nM TNF α , 0,25 nM IL-1 β und 5 ng/ml IFNy gegeben in Kombination ausreichten, um eine maximale Induktion der iNOS zu erreichen (vgl. Abb. 4.23). Auch schon mit sehr niedrigen Konzentrationen der Zytokine (TNF α 0,25 nM, IL-1 β 0,125 nM und IFN γ 2,5 ng/ml) konnte eine signifikante NO-Produktion gemessen werden. Dies zeigt, dass diese Mesangiumzellen schon bei geringen Konzentrationen an proinflammatorischen Stimuli in der Lage sind, große Mengen an NO zu produzieren, welche maßgeblich an der Aufrechterhaltung einer Entzündungsreaktion beteiligt sind. Diese Zytokine können von den Mesangiumzellen selbst freigesetzt werden (Menè et al., 1989) und dann autokrin und parakrin wirken. Außerdem können sie von während der Entzündungsreaktion einwandernden Immunzellen stammen, die dann zur Induktion der iNOS führen können. Wie gezeigt sind Mesangiumzellen ein Hauptproduktionsort für NO. Allerdings stellen sie auch ein Angriffsort für NO da, welches an der Regulation verschiedener induzierbarer Gene, wie Zytokine, Chemokine oder Wachstumsfaktoren beteiligt ist (Pfeilschifter et al., 2002). Tetsuka et al. (1996) zeigten, dass in Ratten-Mesangiumzellen NO ein wichtiger Mediator bei der Zytokin-induzierten Prostaglandinsynthese durch die COX-2 ist. Auch die Tatsache, dass NO-Donoren die Zytokin-induzierte iNOS-Expression noch verstärken kann, wie in Ratten-Mesangiumzellen gezeigt werden konnte (Mühl und Pfeilschifter, 1995), bestätigt, dass NO eine sehr wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung einer Entzündung in der Niere spielt.

Das CXC Chemokin MIP-2 ist ebenfalls ein wichtiger Entzündungsmediator. Chemokine sind in ruhenden Zellen meist nicht exprimiert, doch kann die Hochregulation schnell induziert werden, sodass die Chemokin-mRNA 1% der gesamten zellulären RNA

134

ausmachen kann. Diese Induktion erfolgt typischerweise durch proinflammatorische Zytokine oder bakterielles LPS (Baggiolini *et al.*, 1994). MIP-2 besitzt chemotaktische Aktivität für Neutrophile (Tessier *et al.* 1997, 1998; Ohtsuka *et al.*, 2001), welche bei massiver Einwanderung zur Aufrechterhaltung einer Entzündung und als Folge zur Schädigung von Gewebe führen können (Matzer *et al.*, 2004).

In dieser Arbeit wurde die Expression von MIP-2 als potentiellem Entzündungsmediator in Maus-Mesangiumzellen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die MIP-2 mRNA-Expression mit einem Mix aus den proinflammatorischen Zytokinen TNF α , IL-1 β und IFN γ sehr schnell induziert wird und schon nach 2h das Maximum erreichte (vgl. Abb. 4.26). Dies konnte auch in einem Antikörper-induzierten Glomerulonephritis-Modell bei Ratten gezeigt werden, wo die mRNA für MIP-2 schon 1h nach Induktion der Krankheit anstieg, wogegen die mRNA des Chemokins MCP-1, welches chemotaktische Aktivität für Monozyten aufweist, erst später erscheint (Feng et al., 1995; Tam et al., 1996). Auch freigesetztes MIP-2-Protein konnte schon nach 2h in Kulturüberständen von Zytokinbehandelten Mesangiumzellen gemessen werden. Doch das Maximum wurde erst nach 24h erreicht, was bedeutet, dass über Stunden MIP-2 synthetisiert wird und nach Sezernierung im Extrazellularraum akkumuliert. Man könnte sich also vorstellen, dass auf diese Weise über eine Zeitspanne von mind. 24h eine Rekrutierung von Neutrophilen in die entzündete Niere stattfindet. Auch für MIP-2 wurde untersucht, ob es allein mit dem Zytokin IL-1ß induziert werden kann, wie es für Mesangiumzellen aus der Ratte bereits nachgewiesen ist (Walpen et al., 2001). Doch auch mit hohen Konzentrationen von 2 nM IL-1 β findet keine Induktion statt. Erst zusammen in dem Mix aus TNF α , IL1 β und IFN γ erfolgt die Expression von MIP-2 (vgl. Abb. 4.28). Hier zeigt sich eine Ähnlichkeit zur iNOS-Induktion, we ebenfalls das IFN γ für eine Induktion notwendig ist. Dies unterscheidet die Maus-Mesangiumzellen deutlich von den Ratten-Mesangiumzellen, in denen MIP-2 und die iNOS allein mit IL-1β induziert werden können.

Durch diese Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Mesangiumzellen in der Maus eine zentrale Rolle bei einer Entzündung spielen, da unter entzündlichen Bedingungen verschiedene Entzündungsparameter wie Prostaglandine, NO und MIP-2 von ihnen produziert werden. Diese Mediatoren nehmen einen großen Einfluss auf die Initiierung und Aufrechterhaltung einer Entzündungsreaktion. In wieweit die sPLA₂s eine Rolle auf die Induktion oder die Verstärkung der Expression dieser Mediatoren Einfluss nehmen wurde im Folgenden untersucht.

5.7 Effekte von exogenen sekretorischen Phospholipasen A₂ auf die Entzündungsmediatoren in Maus-Mesangiumzellen

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die sPLA₂-IB, sPLA₂-V und sPLA₂-X von Maus-Mesangiumzellen sowohl konstitutiv als auch unter entzündlichen Bedingungen exprimiert werden. Ihre Bedeutung für proinflammatorische Prozesse in diesen Zellen konnte jedoch noch nicht geklärt werden. Hierzu wären weitere Studien mittels siRNA oder Untersuchungen in Mesangiumzellen aus den entsprechenden sPLA₂-knockout-Mäusen notwendig.

Eine wichtige Rolle bei Entzündungsprozessen könnte jedoch sPLA₂s zukommen, die von verschiedenen anderen Zelltypen sezerniert werden und z.B. über die Zirkulation parakrine Effekte ausüben können. Aber auch infiltrierende Immunzellen wie Makrophagen und Neutrophile können nach dem Einwandern in entzündete Gewebe sPLA₂s in großen Mengen freisetzen (Balboa *et al.*, 1996; Morioka *et al.*, 2000a; Traggiani *et al.*, 2005). Durch die Behandlung der Mesangiumzellen mit rekombinanten sPLA₂s wurde diese pathophysiologische Situation nachgeahmt und die Effekte auf die Entstehung von Entzündungsmediatoren untersucht.

Die exogene Gabe der sPLA₂-IB, sPLA₂-IIA, sPLA₂-V und sPLA₂-X zeigten keine Effekte auf die Genexpression der verschiedenen sPLA₂-Subtypen (Daten nicht gezeigt). Dies steht im Gegensatz zu Ratten-Mesangiumzellen, in denen gezeigt werden konnte, dass die Gabe von verschiedenen exogenen sPLA₂s zu einer deutlichen Verstärkung der TNFα-induzierten Expression der sPLA₂-IIA führt (Beck *et al.*, 2003).

Ein deutlicher Effekt durch die exogene Gabe von sPLA₂s wurde bei der Prostaglandin-Produktion gefunden (vgl. Abb. 4.17). Vor allem die sPLA₂-V und sPLA₂-X sind sehr starke Induktoren sowohl der PGE₂- als auch der PGI₂-Synthese. Durch die sPLA₂-IB wurde keine Steigerung der basalen PG-Produktion erreicht. Da die sPLA₂-IB aber weder über den Heparansulfat-Shuttling-Weg noch direkt an der Plasmamembran AA freisetzen kann, ist dieses Ergebnis nicht verwunderlich. Die sPLA₂-IB kann jedoch durch die Bindung an den MTR die AA-Freisetzung initiieren (Ancian *et al.*, 1995; Lambeau und Lazdunski, 1999). Da aber wie in dieser Arbeit gezeigt die Maus-Mesangiumzellen den MTR nicht exprimieren, fehlt der sPLA₂-IB ein Weg zur AA-Freisetzung der so zur erhöhten PG-Produktion beitragen kann. Auch die sPLA₂-IIA, welche hauptsächlich über den Heperansulfat-Shuttling-Weg AA freisetzt, zeigt keinen Effekt in diesen Zellen. Es wurde bereits gezeigt, dass humane sPLA₂-IIA keine Fettsäuren freisetzen kann, wenn sie exogen zu adhärenten Zellen gegeben wird (Bezzine *et al.*, 2000). Gründe dafür sind, dass die Plasmamembran-Phospholipide unter physiologischen Bedingungen eng gepackt sind, wodurch die meisten sPLA₂s nicht in die Plasmamembran eintauchen können, um an der sn-2-Position Fettsäuren abzuspalten. Zudem ist die äußere Schicht der Plasmamembran unter physiologischen Bedingungen reich an PC, welches allerdings kein bevorzugtes Substrat der sPLA₂-IIA ist (Singer *et al.*, 2002).

Eine starke Erhöhung der Prostaglandin-Produktion konnte mit der sPLA₂-V und sPLA₂-X erreicht werden. Beide haben eine relativ hohe Affinität zu Phosphatidylcholin in der äußeren Plasmamembran und sind somit in der Lage AA direkt aus der Plasmamembran abzuspalten (Murakami *et al.*, 1999 und 2001a; Hanasaki *et al.*, 1999). Beide Enzyme werden von den Maus-Mesangiumzellen selbst sezerniert und könnten so autokrin bzw. parakrin zur erhöhten PG-Produktion beitragen. Die sPLA₂-V und sPLA₂-X sind aber auch die vorherrschenden sPLA₂-Enzyme, welche von Maus-Makrophagen exprimiert werden (Balboa *et al.*, 1996; Morioka *et al.*, 2000a), sodass durch die Infiltration dieser Immunzellen während einer Entzündung ein hohes Maß dieser sPLA₂s im Gewebe vorliegt. Für Milzzellen aus der Maus konnte bereits gezeigt werden, dass exogen gegebene sPLA₂-X die PGE₂-Produktion induziert (Saiga *et al.*, 2005).

Der zeitliche Verlauf der sPLA₂-X-induzierten Prostaglandin-Synthese zeigte Unterschiede zwischen dem PGE₂ und PGI₂. Schon 30 min. nach Gabe der sPLA₂-X fand ein signifikanter Anstieg der PGE₂-Produktion statt, wobei ca. die Hälfte des Maximalwertes erreicht wurde (vgl. Abb. 4.19a). Dieses Niveau hielt sich bis 8h nach Beginn der Behandlung, und nach 24h konnte ein weiterer Anstieg detektiert werden. Die PGI₂-Synthese zeigt während der ersten 8h nach Gabe der sPLA₂-X keine Erhöhung. Erst nach 24h ist eine volle Wirkung der sPLA₂-X zu erkennen. Hier scheint hauptsächlich der späte Weg der PG-Synthese stattzufinden. Da, wie untersucht die COX-1 und die COX-2 unter diesen Bedingungen nicht verändert waren, stellen diese Enzyme keinen limitierenden Faktor für die verzögerte PGI₂-Synthese dar. Anzunehmen ist, dass weitere Enzyme der Biosynthese wie die PGE₂-Synthasen und Prostacyclin-Synthasen durch die Behandlung mit der sPLA₂-X reguliert werden. Dies soll Ziel zukünftiger Untersuchungen sein.

Im Hinblick auf eine gezielte Pharmakotherapie von Entzündungsprozessen in der Niere war es von Interesse herauszufinden, über welche der beiden COX-Isoformen zum Einen die konstitutive, und zum Anderen die sPLA₂-X-induzierte Prostaglandinbildung in den Mesangiumzellen vermittelt wird. Dies wurde durch die Behandlung von Maus-Mesangiumzellen mit den COX-Inhibitoren Indomethacin bzw. Rofecoxib untersucht. Beide gehören zu der Gruppe der "NSAIDs" (*"non-steroidal anti-inflammatory drugs*"), Indomethacin hemmt allerdings vorwiegend die COX-1 (Hart und Boardman, 1963; Kato

et al., 2001), während mit Rofecoxib ein spezifischer COX-2-Inhibitor verwendet wurde (Chan et al., 1999). Die Ergebnisse zeigen, dass Indomethacin eine starke Hemmung der sPLA₂-X-induzierten PGE₂und PGI₂-Freisetzung verursacht. Bei höheren Konzentrationen kann der PG-Spiegel sogar unter den Kontrollwert gesenkt werden (vgl. Abb. 4.20). Im Gegensatz dazu zeigt der spezifische COX-2-Hemmer Rofecoxib keinerlei Einfluss auf die Prostaglandin-Freisetzung (vgl. Abb. 4.21). Diese Ergebnisse zeigen sehr deutlich, dass sowohl die sPLA₂-X-induzierte und zumindest partiell die konstitutive PG-Produktion über die COX-1 vermittelt werden und die COX-2 anscheinend keine Rolle spielt. Dies zeigte auch Tegeder et al. (2000) in der Ratten-Niere, das nämlich die Freisetzung der Prostaglandine E₂ und I₂ durch die Behandlung mit einem spezifischen COX-2-Inhibitor kaum beeinflusst waren.

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, setzen Maus-Mesangiumzellen unter entzündlichen Bedingungen Mediatoren wie NO und MIP-2 frei, welche eine große Rolle bei der Aufrechterhaltung einer Entzündungsreaktion spielen. Für sPLA2s konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass sie regulatorische Effekte auf Entzündungsmediatoren wie NO, Cytokine und Chemokine ausüben können (Park et al., 2003; Jo et al., 2004; Granata et al., 2005; Beck et al., 2003a). Dies wurde nun auch in Maus-Mesangiumzellen untersucht. Die Inkubation der exogenen sPLA₂-IB, -IIA, -V und -X zeigte keine Auswirkungen auf die NO- bzw. MIP-2-Fresietzung unter Kontroll- wie auch unter entzündlichen Bedingungen (vgl. Abb. 4.29). Dies ist anders als in Maus-Macrophagen, in denen Park et al., (2003) zeigen konnten, dass die sPLA2-IIA durch die Einbindung des MTRs und Aktivierung der PI3K/Akt-Wegs die iNOS-Expression und damit die NO-Produktion induziert. In humanen Neutrophilen stimuliert die sPLA2-IB die Expression des Zytokins IL-8. Da dies unabhängig von ihrer Aktivität stattfindet, wird auch hier ein Signalweg vermutet, in welchem der MTR mit einbezogen ist (Jo et al., 2004). In humanen Lungen-Makrophagen konnte eine Produktion der Zytokine TNF α und IL-6 durch die sPLA₂-IB und sPLA₂-X induziert werden (Granata et al., 2005). Gezeigt wurde, dass eine Aktivierung des ERK1/2-Signalweges notwendig ist, doch auch hier spielt die Aktivität der sPLA₂s keine Rolle. Vermutet wird, dass auch hier der MTR eine Rolle spielt. Auch in humanen Lungen-Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass die sPLA2-IIA und die sPLA₂-IB die Produktion von IL-8 erhöhen. Die Signaltransduktion erfolgt über die Aktivierung des MAPKinase ERK1/2-Weg (Beck et al., 2003a). Die an den MTR gekoppelten intrazellulären Signalwege sind noch nicht vollständig aufgeklärt, doch sprechen einige Studien dafür, dass die Signaltransduktion über die Aktivierung der MAPKinasen läuft (Hanasaki und Arita, 2002). Diese Studien deuten darauf hin, dass abhängig vom Zelltyp und vom sPLA₂-Subtyp die Induktion von Entzündungsmediatoren durch sPLA₂s weniger über ihre Aktivität stattfindet, sondern über die Bindung an den MTR und seine intrazelluläre Signaltransduktion. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Studien an MTR-knockout-Mäusen, die zeigten, dass in Abwesenheit des Rezeptors die Plasmaspiegel von TNF α und IL-1 β in einem LPS-induziertem Schock signifikant niedriger sind (Hanasaki *et al.,* 1997). Durch das Fehlen des MTRs in den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Maus-Mesangiumzellen konnten die sPLA₂s keine Signalwege über den MTR aktivieren und somit keinen Einfluss auf die Expression von NO und MIP-2 nehmen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde also gezeigt, dass in Maus-Mesangiumzellen exogene sPLA₂s keinen Einfluss auf die Gen-Regulation der Entzündungsmediatoren NO und MIP-2 haben. Im nächsten Schritt wurde überprüft, in wieweit diese Mediatoren sich gegenseitig in ihrer Expression beeinflussen bzw. ihre eigene Expression induzieren, um einen Ansatzpunkt zu finden, an dem das Fortschreiten der Entzündungsreaktion unterbrochen werden kann.

5.8 Regulation von Entzündungsmediatoren durch Stickstoffmonoxid (NO)

Als erstes wurde der Einfluss von endogenen NO auf die MIP-2 Freisetzung untersucht. Mit dem spezifischen NOS-Inhibitor L-NMMA (Rees *et al.*, 1989) wurde in einer Konzentration von 1 mM die Zytokin-induzierte NO-Bildung in Maus-Mesangiumzellen nahezu zum Stillstand gebracht (vgl. Abb. 4.30). Doch zeigte die Hemmung der NO-Synthese keinerlei Effekt auf die Zytokin-induzierte MIP-2-Ausschüttung (vgl. Abb. 4.31). Auch die Gabe von exogenem NO durch den NO-Donor DETA-NONOat in Konzentrationen bis zu 250 μM zeigte keine Veränderung in der MIP-2-Konzentration in den Zellkulturüberständen. Diese Ergebnisse zeigen, dass in den Maus-Mesangiumzellen NO keinen Einfluss auf die MIP-2-Expression hat und somit sich dieses Chemokin nicht als NO-reguliertes Gen darstellt. Auch hier liegt ein großer Unterschied zu Ratten-Mesangiumzellen vor. In diesen wurde MIP-2 als NO-Reguliertes Gen identifiziert, da endogenes NO die Zytokin-induzierte Expression von MIP-2 verstärkt (Walpen *et al.*, 2001). Es wurden bislang viele Gene identifiziert, welche durch NO reguliert werden, wie u.a. die sPLA₂-IIA (Rupprecht *et al.*, 1999), die COX-2 (Diaz- Cazola et al., 1999; Tetsuka

et al., 1996), Interleukin-8 (Allen und Tresini, 2000; Brown *et al.*, 1993) oder TNF α (Eigenthaler *et al.*, 1999; VanDervort *et al.*, 1994).

Eines der ersten Gene allerdings, welches als Zielgen für eine transkriptionelle Regulierung durch NO identifiziert wurde war die iNOS selbst. Man vermutete, dass in Ratten-Mesangiumzellen NO über einen positiven *"feedback loop"* seine eigene Biosynthese positiv beeinflusst (Mühl und Pfeilschifter, 1995). Allerdings konnte dies nicht für die Maus-Mesangiumzellen bestätigt werden. Nach der Gabe des NO-Donors war keine Verstärkung der iNOS-Expression detektierbar (Daten nicht gezeigt).

Zwar werden NO und MIP-2 in Maus-Mesangiumzellen durch dieselben Induktoren, nämlich dem Mix aus TNF α , IL-1 β und IFN γ induziert, doch findet keine gegenseitige Beeinflussung statt, sodass anzunehmen ist, dass die Signaltransduktionswege unabhängig voneinander ablaufen.

6 Zusammenfassung

Die sekretorischen Phospholipasen A₂ (sPLA₂) gehören zur Superfamilie der Phospholipasen A₂, und die meisten von ihnen sind in der Lage, die Hydrolyse der Esterbindung an der sn-2-Position von Phospholipiden zu katalysieren, wodurch freie Fettsäuren und Lysophospholipide entstehen. In Säugern wurden bislang 10 verschiedene sPLA₂ Enzyme identifiziert, und einige von ihnen sind in der Lage, speziell Arachidonsäure freizusetzen. Diese Fettsäure dient als Vorläufermolekül von Eicosanoiden, welche sowohl physiologische als auch pathophysiologische Prozesse im Organismus steuern. Insbesondere war vor allem die sPLA₂-IIA bezüglich ihrer proinflammatorischen Eigenschaften in Krankheiten wie rheumatider Athritis oder der Glomerulonephritis gut untersucht.

Ebenfalls bekannt war, dass die im Pankreassaft vorkommende sPLA₂-IB eine Rolle bei Entzündungsprozessen in der Niere spielt. Ihre Effekte auf Säugerzellen führen jedoch kaum zu einer direkten Fettsäurefreisetzung, sondern sie scheint vorwiegend über den spezifischen sPLA₂ M-Typ-Rezeptor (MTR) ihre Wirkungen auf intrazelluläre Signalwege zu entfalten. In glomerulären Mesangiumzellen der Ratte wurde gezeigt, dass die sPLA₂-IB über Bindung an den MTR die Induktion von proinflammatorischen Genen wie der sPLA₂-IIA vermittelt. Deshalb wurden in dieser Arbeit weiterführende Studien zur Aufklärung der Lokalisation und der Signaltransduktion der sPLA₂s sowie die Bedeutung des MTR bei *in- vivo-* und *in vitro*-Modellsystemen für entzündliche Nierenerkrankungen durchgeführt.

*In-vivo-*Studien in der Ratten-Niere zeigten, dass nach Induktion einer Anti-Thy1.1-Glomerulonephritis die Expression der sPLA₂-IB, ebenso wie die des M-Typ-Rezeptors in den Glomeruli deutlich erhöht ist. In Mesangiumzellen konnte die sPLA₂-IB nicht nachgewiesen werden, dafür aber in Monozyten und Granulozyten, die als Immunzellen im frühen Stadium einer Glomerulonephritis in die Niere einwandern.

In *in vitro*-Studien in glomerulären Endothelzellen konnte außerdem nachgewiesen werden, dass eine katalytisch inaktive Mutante der sPLA₂-IB ihre eigene Expression steigern konnte, und es wurde geschlossen, dass dieser Effekt MTR-vermittelt ist.

Hohe Spiegel der sPLA₂-IB, welche eine hohe Affinität für den MTR besitzt, könnten also während einer Glomerulonephritis Signalwege, wie die Freisetzung von Arachidonsäure, Induzierung der sPLA₂-IIA-Expression und Prostaglandin-Bildung, über den MTR vermitteln und somit zur Progression einer Nierenentzündung beitragen.

Daher war es von Interesse, mehr über die Funktion des MTRs bei entzündlichen Prozessen in der Niere bzw. glomerulären Zellen zu erfahren. Dies sollte im Rahmen der

vorliegenden Arbeit anhand von MTR-knockout-Mäusen untersucht werden. Als Zellmodell für *in-vitro*-Studien wurden glomeruläre Mesangiumzellen, isoliert aus MTR-knockout-Mäusen (C57BL/6) bzw. (C57BL/6) Wildtyp-Mäusen, verwendet, um potentielle Unterschiede in der MTR-vermittelten Signaltransduktion herauszuarbeiten. Da aber nach Western-Blot-Analysen und sensitiven Bindungsstudien mit selektiven Liganden kein MTR-Protein in den Wildtyp-Mesangiumzellen detektiert werden konnte, wurden keine weiteren Vergleichsstudien bezüglich des MTRs durchgeführt.

In den folgenden Untersuchungen wurden daher ausschließlich Mesangiumzellen der Wildtyp-Mäuse als Zellsystem verwendet. Um die Bedeutung der sPLA₂s insbesondere in zukünftig etablierten murinen Nierenentzündungsmodellen verstehen zu können, war das primäre Ziel, das Expressionsmuster der sPLA₂s in Maus-Mesangiumzellen zu untersuchen.

Mittels semiquantitativer PCR konnte ermittelt werden, dass die sPLA₂-IB, -IIE, -III, -V, -X und -XIIA konstitutiv auf mRNA-Ebene exprimiert werden, wobei die sPLA₂-XIIA in wesentlich höheren Mengen vorhanden ist im Vergleich zu den anderen sPLA₂s. Unter entzündlichen Bedingungen, welche in Zellkulturexperimenten durch die Gabe eines Zytokin-Mixes bestehend aus TNFα, IL-1β und IFNγ erzeugt wurden, konnte nur bei der sPLA₂-IIE ein schwacher Anstieg in der Expression verzeichnet werden. Im Gegensatz dazu waren die sPLA₂-V und sPLA₂-III schwächer exprimiert als bei Kontrollbedingungen, was darauf hin deutet, dass eine proinflammatorische Rolle für diese Enzyme eher unwahrscheinlich ist. Auf Proteinebene, eingeschränkt durch die Verfügbarkeit der spezifischen Antikörper, wurden nur die sPLA₂-IB, -V und -X in Zellkulturüberständen nachgewiesen. Durch den Einsatz von spezifischen cPLA₂- und sPLA₂-Inhibitoren bekamen wir erste Hinweise darauf, dass die zytosolische PLA₂ (cPLA₂) an der Regulation der Expression der sPLA₂s beteiligt ist. Dies muss jedoch in zukünftigen Untersuchungen noch genauer hinterfragt werden.

Untersucht wurde des Weiteren, ob die sPLA₂s selbst als *"second messenger"* fungieren indem sie die Bildung von weiteren Entzündungsmediatoren stimulieren. Die exogene Stimulation mit der sPLA₂-V und -X führte zu einer Induktion der Prostaglandine E₂ und I₂ (Prostacyclin), welche wichtige physiologische Funktionen in der Niere ausüben, aber auch in der Entzündungsreaktion mitwirken können. Einen wichtigen Schritt in der Metabolisierung von AA zu Prostaglandinen übernehmen die Cyclooxygenasen (COX), welche als beide Isoformen (COX-1 und COX-2) konstitutiv in Maus-Mesangiumzellen exprimiert werden. Durch den Einsatz spezifischer COX-1 bzw. COX-2-Inhibitoren wurde deutlich, dass die sPLA₂X-induzierte Prostaglandin-Synthese COX-1-abhängig abläuft, während die COX-2 in Maus-Mesangiumzellen anscheinend keine Rolle für die sPLA₂vermittelte Prostaglandinsynthese spielt.

Andere wichtige und typische Zytokin-induzierte Entzündungsmediatoren, die von Mesangiumzellen produziert werden, wie z.B. NO und MIP-2, wurden durch die Behandlung mit exogenen sPLA₂s nicht beeinflusst. Ein interessanter Nebeneffekt dieser Studien war die Erkenntnis, dass in den Maus-Mesangiumzellen das NO keinen regulatorischen Effekt auf die Zytokin-induzierte MIP-2-Genexpression hatte, im Unterschied Ratten-Mesangiumzellen. Dies erneut, zu zeigt dass Signaltransduktionsmechanismen bei Entzündungsprozessen Spezies-spezifisch betrachtet werden müssen.

Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass verschiedene sPLA₂-Enzyme in Maus-Mesangiumzellen exprimiert werden und diese an der konstitutiven Biosynthese von Prostaglandinen beteiligt sind. Der spezifische M-Typ-Rezeptor wird in diesen Zellen im Gegensatz zu den Ratten-Mesangiumzellen weder unter physiologischen noch unter proinflammatorischen Bedingungen exprimiert und spielt daher vermutlich keine Rolle bei der Signaltransduktion der sPLA₂s. Da in absehbarer Zeit keine spezifischen sPLA₂-Inhibitoren zur Verfügung stehen werden, sind *in-vivo*-Studien in sPLA₂-knockout Mäusen ein interessanter Ansatz, um die Rolle der sPLA₂s bei der Progression einer Glomerulonephritis zu verstehen.

143

7 Literaturverzeichnis

- Allen RG, Tresini M (2000) Oxidative stress and gene regulation. *Free Radical Biol Med.;* 28:463-499
- Ancian P, Lambeau G, Mattei MG, Lazdunski M. (1995) The human 180-kDa receptor for secretory phospholipases A₂. Molecular cloning, identification of a secreted soluble form, expression, and chromosomal localization. *J Biol Chem.*; 270(15):8963-8970
- Anders AJ, Vielhauer V, Schlöndorff D (2003) Chemokines and chemokine receptors are involved in the resolution or progression of renal disease. *Kidney Int.*; 63(2):401-415
- Arita H, Hanasaki K, Nakano T, Oka S, Teraoka H, Matsumoto K. (1991) Novel Proliferative effect of phospholipase A₂ in Swiss 3T3 cells via specific binding site. J Biol Chem.; 266(29):19139-19141
- Bagchus WM, Hoedmaeker PJ, Rozing J, Bakker WW (1986) Glomerulonephritis induced by monoclonal anti -Thy1.1 antibodies. A sequential histological and ultrastructural studying the rat. *Lab Invest.*; **55**(6): 680-687
- Baggiolini M, Dewald B, Moser B (1994) Interleukin-8 and related chemotactic cytokines: CXC and CC chemokines. *Adv Immunol.*; **55**:97-179
- Baggiolini M, Dewald B, Moser B (1997) Human chemokines: an update. Annu Rev Immunol.; **15**:675-705
- Baggiolini M (1998) Chemokines and leukocyte traffic. Nature; 392(6676): 565-568
- Balboa MA, Balsinde J, Winstead JA, Tischfield EA, Dennis J (1996) Novel group V phospholipase A₂ involved in arachidonic acid mobilization in murine P388D1 macrophages *J Biol Chem.*; **271**(50): 32381-32384
- Balsinde J, Balboa MA, Dennis EA (1997) Antisense inhibitionof group VI Ca²⁺independent phospholipase A₂ blocks phospholipid fatty acid remodelling in murine P388D1<macrophages. *J Biol Chem.*; **274**: 9400
- Balsinde J, Shinohara H, Lefkowitz LJ, Johnson CA, Balboa MA, Dennis EA (1999) Group V phospholipase A₂-dependent induction of cyclooxygenase-2 in macrophages. *J Biol Chem.*; 274(37): 25967-25970
- Balsinde J, Balboa MA, Yedgar S, Dennis EA (2000) Group V phospholipase A₂-mediated oleic acid mobilization in lipopolysaccharide-stimulated P388D(1) macrophages. J Biol Chem.; 275(7): 4783-4786
- Balsinde J, Winstead MV, Dennis EA (2002) Phospholipase A₂ regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Letters*; **531**(1):2-6
- Beck GCH, Yard BA, Schulte J, Haak M, van Ackern K, van der Woude FJ, Kaszkin M (2003a) Secreted phospholipases A₂ induce the expression of chemokines in mikrovascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun.*; **300**: 731-737

- Beck KF, Mohaupt MG, Sterzel RB (1995) Endothelin-1 inhibits cytokine-stimulated transcription of inducible nitric oxide synthase in glomerular mesangial cells. *Kidney Int.*; **48**(6):1893-1899
- Beck KF, Eberhardt W, Frank S, Huwiler A, Messmer UK, Mühl H, Pfeilschifter J (1999) Inducible NO-synthase: role in cellular signalling. J Exp Biol.; 202(Pt 6): 645-653
- Beck S, Lambeau G, Scholz-Pedretti K, Gelb MH, Janssen MJ, Edwards SH, Wilton DC, Pfeilschifter J, Kaszkin M. (2003) Potentiation of tumor necrosis factor alphainduced secreted phospholipase A₂ (sPLA₂)-IIA expression in mesangial cells by an autocrine loop involving sPLA₂ and peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation. *J Biol Chem.*; **278**(32):29799-29812
- Benbaruch A, Michiel DF, Oppenheim JJ (1995) Signal and receptors involved in recruitment of inflammatory cells. *J Biol Chem.*; **270**(20): 11703-11706
- Bezzine S, Koduri RS, Valentin E, Murakami M, Kudo I, Ghomashchi F, Sadilek M, Lambeau G, Gelb MH. (2000) Exogenously added human group X secreted phospholipase A₂ but not the group IB, IIA, and V enzymes efficiently release arachidonic acid from adherent mammalian cells. *J Biol Chem.*; **275**(5):3179-3191
- Bhattacharya M, Peri KG, Almazan G, Ribeiro Da-Silva A, Sichi H, Durocher Y, Abramovitz M, Hou X, Varma DR, Chentob S (1998) Nuclear localization of prostaglandin E₂ receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*.; **95**(26): 15792-15797
- Bingham CO, Murakami M, Fujishima H, Hunt JE, Austen KF, Arm JP (1994) A heparinsensitve phospholipase A₂ and prostaglandin endoperoxide synthase-2 are functionally linked ithe delayed phase of prostaglandin D₂ generation in mouse bone marrow-derived mast cells. *J Biol Chem.*; **271**:25936-25944
- Bingham CO, Fijneman RJ, Friend DS, Goddeua RP, Rogers RA, Austen KF, Arm JP (1999) Low molecular weight group IIA and group V phospholipase A₂ enzymes have different intracellular locations in mouse bone marrow-derived mast cells *J Biol Chem.*; **274**(44): 31476-31484
- Birkeland SA, Storm HH (2003) Glomerulonephritis and malignancy: a population-based analysis. *Kidney Int.*; **63**(2): 716- 721
- Boffa JJ, Just A, Coffman TM, Arendshorst WJ (2004) Thomboxan receptor mediates renal vasoconstriction and contributes to acute renal failure in endotoxemic mice. *J Am Soc Nephrol.;* **15**: 2358-2365
- Bogdan C (2001) Nitric oxide and the immune response. Nature Immunol.; 2(10): 907-916
- Bowton DL, Seeds MC, Fasano MB, Goldsmit B, Bass DA (1997) Phospholipase A₂ and arachidonate increase in bronchoalveolar lavage fliud after inhaled antigen challenge in asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med.*; **155**(2): 421-425
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle protein binding. *Anal Biochem.*; **72**: 248-254

- Brater DC, Harris C, Redfern JS, Gertz BJ (2001) Renal effects of COX-2 selective inhibitors. *Am J Nephrol.*; **21**:1-15
- Breyer MD, Breyer RM (2001) G protein-coupled prostanoid receptors and the kidney. Annu Rev Physiol.; 63:579-605
- Brown Z, Robson RL, Westwick J (1993) L-Arginine/nitric oxide pathway: a possible signal transduction mechanism for the regulation for the chemokine IL-8 in human mesangial cells. *Adv Exp Med Biol.;* **351**:65-75
- Brüne B (2002) Nitric oxide and apoptosis in mesangial cells. Kidney Int.; 61(3): 786-789
- Boventre JV, Gronich JH, Nemenoff RA (1990) Epidermal growth factors enhances Glomerular mesangial cell soluble phospholipase A₂ activity. *J Biol Chem.*; **265**(9): 4934-4938
- Bonventre J. (2004) Cytosolic phospholipase A₂ alpha reigns supreme in arthritis and bone resorption. *Trends Immunol.*; **25**(3):116-119
- Buckland AG, Wilton DC (2000) The antibacterial properties of secreted phospholipases A_{2.} Biochim Biophys Acta.; **1488**: 71-82
- Campean V, Theilig F, Paliege A, Breyer M Bachmann S (2003) Key enzymes for renal Prostaglandin synthesis:site-specific expressionin rodent kidney (rat, mouse) *Am J Physiol Renal Physiol*;**285**:F19-F32
- Cattell V (2002) Nitric oxide and glomerulonephritis. *Kidney Int.*; 61(3): 816-821
- Chan CC, Boyce S, Bideau S, Charleson W, Cromlish D, Ethier D, Evans J, Ford-Hutchinson AW, Forrest MJ, Gauthier JY, Gordon R, Gresser M, Guay J, Kargman S, Kennedy B, Leblanc Y, Leger S, Mancini J, O´Neil GP, Oullet M, Patrick D, Percival D, Perrier H, Prasit P, Rodger I, Tagari P, Therien M, Vickers P, Visco D, Wang Z, Webb J, Wong E, Xu LJ, Young RN, Zamboni R, Riendeau D (1999) Rofecoxib [Vioxx, MK-0966; 4-(4´-Methylsulfonylphenyl)-3-phenyl-2(5H)-furanone]: A potent and orally active cyclooxygenase-2 inhibitor pharmalogical and biochemical profiles. JPET.; 290(2): 551-560
- Chandrasekharan NV, Dai H, Roos LT, Evason NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL (2002) COX-3, a cyclooxygeanse-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/ antipyretic drugs: cloning, structure and expression. *Proc Natl Acad Sci USA*.; **99**(21): 13926-13931
- Chen J, Engle SJ, Seilhamer JJ, Tischfield JA. (1994) Cloning and recombinant Expression of a novel human low molecular weight Ca⁽²⁺⁾⁻dependent phospholipase A₂. *J Biol Chem.*; **269**(4):2365-2368.
- Clark JD, Lin LL, Kriz RW, Ramesha CS, Sultzman LA, Lin AY, Milona N, Knopf JL. (1991) A Novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA₂ contains a Ca⁽²⁺⁾dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. *Cell*.; **65**(6):1043-1051

- Connolly S, Bennion C, Botterell S, Croshaw PJ, Hallam C, Hardy K, Hartropp P, Jackson CG, King SJ, Lawrence L, Mete A, Murray D, Robinson DH, Smith GM, Stein L, Walters I, Wells E, Withnall WJ (2002) Design and synthesis of a novel and potent series of inhibitors of cytosolic phospholipases A₂ based on a 1,3-disubstituted propan-2-one skeleton. *J Med Chem.*; **45**(6):1348-1362
- Couser WG (1999) Glomerulonephritis. *The Lancet*; **353**(9163): 1509-1515 Crofford LJ, Tan B, McCarthy CJ, Hla T. (1997) Involvement of nuclear factor kappa B in the regulation of cyclooxygenase-2 expression by interleukin-1 in rheumatoid synoviocytes. *Arthritis Rheum.*; **40**(2):226-236
- Crowl RM, Stoller TJ, Conroy RR, Stoner CR. (1991) Induction of phospholipase A₂ gene expression in human hepatoma cells by mediators of the acute phase response. *J Biol Chem.*; **266**(4):2647-2651
- Cunningham MA, Rondeau E, Chen X, Coughlin SR, HoldsworthS, Tipping PG (2000) Protease- activated receptor-1 mediates thrombin-dependent cell-mediated renal inflammation in crescentic glomerulonephritis. *J Exp Med.*; **191**(3): 455-462
- Cupillard L, Koumanov K, Mattei MG, Lazdunski M, Lambeau G. (1997) Cloning, Chromosomal mapping, and expression of a novel human secretory phospholipase A₂. *J Biol Chem.*;**272**(25):15745-15752
- Cupillard L, Mulherkar R, Gomez N, Kadam S, Valentin E, Lazdunski M, Lambeau G (1999) Both group IB and group IIA secreted phospholipases A₂ are natural ligands of the mouse 180-kDa M-type receptor. *J Biol Chem.*; **274**(11):7043-7051
- Daniel C, Duffield J, Brunner T, Steinmann-Niggli K, Lods N, Marti HP (2001) Matrix metalloproteinases inhibitors cause cell cycle arrest and apoptosis in glomerular mesangial cells. *J Pharmaol Exp Ther.*; **297**(1): 57-68
- Davidson FF, Dennis EA (1990) Evolutionary relationships and implications for the regulation of phospholipase A₂ from snake venom to human secreted forms. *J Mol Evol.*; **31**(3): 228-238
- Davies NM, Good RL, Roupe KA, Yanez JA (2004) Cyclooxygenase-3: axiom, dogma, anomaly, enigma or splice error?- not easy as 1,2,3. *J Pharm Pharmaceut Sci.*; **7**(2): 217-226
- DeWitt DL, Smith WL (1988) Primary structure of Prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determinedfrom the complementary DNA sequence. *Proc Natl Acad Sci USA*.; **85**(5):1412-1416
- Di Belgiojoso GB, Ferrario F, Landriani N (2002) Virus-related glomerular diseases: histological and clinical aspects. *J Nephrol.*; **15**(5): 469-479
- Diaz-Cazola M, Perez-Sala D, Lamas S (1999) Dual effect of nitric oxide donors on cyclooxygenase-2 expression in human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol.;* **10**:943-952

- Diez E, Louis-Flamberg P, Hall RH, Mayer RJ (1992) Substrate specificities and Properties of human phospholipases A₂ in a mixed vesicle model. *J Biol Chem.*; **267** (26):18342-18348
- Donadio JV, Grande JP (2002) IgA nephropathy. N Engl J Med.; 347(10): 738-48
- Downeey P, Sapirstein A, O'Leary E, Bonventre JV, Lander ES (2001) Renal concentrating defect in mice lacking group IV cytosolic phospholipase A₂. *Am J Physiol Renal Physiol.*; **280**: F607
- Eckert R, Randall D, Augustine G (1993) Tierphysiologie. Thieme Verlag, 2. Auflage, S.441
- Eerola LI, Surrel F, Nevalainen TJ, Gelb MH, Lambeau G, Laine VJ (2006) Analysis of expression of secreted phospholipases A₂ in mouse tissues at protein and mRNA levels. *Biochim Biophys Acta.*; **1761**:745-756
- Eigenthaler M, Lohmann SM, Walter U, Pilz RB (1999) Signal transduction by cGMPdependent proteinkinases and their emerging roles in the regulation of cell adhesion and gene expression. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.;* **135**:173-209
- Eremina V, Sood M, Haigh J, Nagy A, Lajoie G, Ferrara N (2003) Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and aquired renal diseases. *J Clin Invest.*; **111**(5):707-716
- Feng L, Xia Y, Yoshimura T, Wilson CB (1995) Modulation of neutrophil influx in glomerulonephritis in the rat with anti-macrophage inflammatory protein-2 antibody. *J Clin Invest.*; **95**(3):1009-1017
- Ferguson S, Hébert RL, Laneuville O (1999) NS-398 upregulates constitutives cyclooxygenase-2 expression in the M-1 cortical collecting duct cell line. *J Am Soc Nephrol.*; **10**(11): 2261-2271
- Fonteh AN, Atsumi G, LaPorte T, Chilton FH. (2000) Secretory phospholipase A₂ receptormediated activation of cytosolic phospholipase A₂ in murine bone marrowderived mast cells. *J Immunol*.;**165**(5):2773-2782
- Foreman-Wykert AK, Weinrauch Y, Elsbach P, Weiss J (1999) Cell-wall determinants of the bactericidal action group IIA phospholipase A₂ against gram-positive bacteria. *J Clin Invest.*;**103**(5):715
- Fouqueray B, Boutard V, Philippe C, Kornreich A, Marchant A, Perez J, Goldman M, Baud L (1995) Mesangial cell-derived interleukin-10 modulates mesangial cell Response to lipopolysaccharide. *Am J Pathol.*;**147**(1):176-182
- Funk CD (2001) Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology. Science; **294**(5548): 1871-1875
- Gao J, Morrison DC, Parmely TJ, Russell SW, Murphy WJ (1997) An interferon-γactivated site (GAS) is necessary for full expression of the mouse iNOS Gene in response to interferon-γ and lipopolysaccharide. J Biol Chem.; 272(2):1226-1230

- Gelb MH, Valentin E, Ghomashchi F, Lazdunski M, Lambeau G. (2000) Cloning and Recombinant expression of a structurally novel human secreted phospholipase A₂. J Biol Chem.;**275**(51):39823-39826
- Gelb MH, Lambeau G, Maxey K (2003) cayman currents, Ausgabe 14
- Ghomashchi F, Stewart A, Hefner Y, Ramanadham S, Turk J, Leslie CC, Gelb MH. (2001) A pyrrolidine-based specific inhibitor of cytosolic phospholipase A₂ alpha blocks arachidonic acid release in a variety of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta.*;**1513**(2):160-166
- Gilroy DW, Newson J, Sawmynaden P, Willoughby DA, Croxtall JD (2004) A novel role for phospholipase A₂ isoforms in the checkpoint control of acute inflammation. *FASEB*.; **18**:489-498
- Gijon MA, Spencer DM, Kaiser AL, Leslie CC (1999) Role of phosphorylation sites and the C2 domain in regulation of cytosolic phospholipase A₂. *J Cell Biol.*; 145(6):1219-32
- Gòmez-Guerrero C, Hernández-Vargas P, López-Franco O, Ortiz- Munoz G, Egido J (2005) Mesangial cells and glomerular inflammation: from the pathogenesis to novel therapeutic approaches. *Curr Drug Target Inflamm Allergy*.; **4**(3): 341-351
- Gosh S, Karin M (2002) Missing pieces in the NF-κB puzzle. Cell.; 109:S81-96
- Granata F, Petraroli A, Boilard E, Bezzine S, Bollinger J, Del Vecchio L, Gelb MH, Lambeau G, Marone G, Triggiani M (2005) Activation of cytokine production by secreted phospholipase A₂ in human lung macrophages expressing the Mtype-receptor. *J Immunol*.; **174**:464-474
- Gronich JH, Boventre JV Nemenoff RA (1988) Identification and characterization of a hormonally regulated form of phospholipase A₂ in rat renal mesangial cells. *J* Biol Chem.; **263** (32):16645-51
- Guidet B, Piot O, Masliah J, Barakett V, Maury E, Bereziat G, Offenstadt G. (1996) Secretory non pancreatic phopholipase A₂ in severe sepsis: relation to endotoxin, cytokines and thromboxane B2. *Infection*.; **24**(2):103-108
- Haas U, Podda M, Behne M, Gurrieri S, Alonso A, Fürstenberger G, Pfeilschifter J, Lambeau G, Gelb MH, Kaszkin M (2005) Characterization and differentiationdependent regulation of secreted phospholipases A₂ in human keratinocytes and in healthy and psoriatic human skin. *J Invest Dermatol*.;**124**(1):204-11
- Haapamaki MM, Gronoos JM, Nurmi H, Soderlund K, Peuravuori H, Alanen K, Nevalainen TJ (1998) Elevated group II pshospholipase A₂ mass concentration in serum and colonic mucose in Crohn's disease. *Clin Chem Lab Med.*; **36**(10): 751-755
- Hamaguchi K, Kuwata H, YoshiharaK, Masuda S, Shimbara S, Oh-ishi S, Murakami M, Kudo I (2003) Induction of distinct sets of secretory phospholipase A₂ in rodents during inflammation. *Biochim Biophys Acta.*; **1635**:37-47

- Han SK, Kim KP, Koduri R, Bittova L, Munoz NM, Leff AR, Wilton DC, Gelb MH, Cho W. (1999) Roles of Trp31 in high membrane binding and proinflammatory activity of human group V phospholipase A₂. *J Biol Chem.*; **274**(17):11881-11888
- Hanasaki K, Yasunori Y, Ishizaki J, Itoh T, Arita H (1997) Resistance to Endotoxic Shock in Phospholipase A₂ Receptor-deficient Mice. *J Biol Chem.*; **272**(52): 32792-32797
- Hanasaki K, Ono T, Saiga A, Morioka Y, Ikeda M, Kawamoto K, Higashino K, Nakano K, Yamada K, Ishizaki J, Arita H. (1999) Purified group X secretory phospholipase A₂ induced prominent release of arachidonic acid from human myeloid leukemia cells. *J Biol Chem.*; **274** (48):34203-34211
- Hanasaki K, Arita H (1999a)Biological and pathological functions of phospholipase A₂ receptor. *Arch Biochem Biophys.*; **372**(2): 215-223
- Hanasaki K, Arita H (2002) Phospholipase A₂ receptor: a regulator of biological functions of secretory phospholipase A₂. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*; **68-69**:71-82.
- Hanel AM, Schuttel S, Gelb MH (1993) Processive interfacial catalysis by mammalian 85-Kilodalton phospholipases A₂ enzymes on product-containing vesicles: application to the determination of substrate preferences. *Biochemistry*. 32(23):5949-5958
- Hara S, Kudo I, Chang HW, MatsutaK, Miyamoto T, Inouc K (1989) Purification and characterization of extracellular phospholipase A₂ from human synoial fluid in rheumatoid arthritis. *J Biochem.* (Tokyo); **105**: 395- 399
- Hart FD, Boardman PL (1963) Indomethacin: A new non-steroid anti-inflammatory agent. Br Med J.; **19**(5363): 965-970
- Harris RC, McKanna JA, Akai Y, Jacobson HR, Dubois RN (1994) Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney increases with salt restriction. *J Clin Invest.*; **94**(6): 2504-2510
- Harris RC, Breyer MD (2001) Physiological regulation of cyclooxygenase-2 in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.*; **281**(1):F1-F11
- Harris RC (2002) Cyclooxygenase-2 inhibition and renal physiology. *Am J Cardiol.*; **89**(suppl):10D-17D
- Hartner A, Pahl A, Brune K, Goppelt-Struebe M (2000) Upregulation of cyclooxygenase-1 and the PGE₂ receptor EP2 in rat and human mesangioproliferative glomerulonephritis. *Inflamm Res.*; **49**(7):345-354
- Harwig SS, Tan L, Qu XD, Cho Y, Eisenhaueer PB, Lehrer RI (1995) Bactericidal properties of murine intestinal phospholipase A₂. *J Clin Invest.*; **95**(2):603-610
- Hatch GM, Vance DE, Wilton DC (1993) Rat liver mitochondrial phospholipase A₂ is an endotoxin-stimulated membrane-associated enzyme of Kupffer cells which is released during liver perfusion. *Biochem J.*; **293** (Pt1):143-150

- Herschman HR, Reddy ST, Xie W. (1997) Function and regulation of prostaglandin synthase-2. *Adv Exp Med Biol.*; **407**:61-66
- Higashino K, Yokota Y, Ono T, Kamitani S, Arita H, Hanasaki K (2002) Identification of a soluble form phospholipase A₂ receptor as a circulating endogenous inhibitor for secretory phopholipases A₂. *J Biol Chem.*; **277**(16):13583-13588
- Hirabayashi T, Shimizu T. (2000) Localization and regulation of cytosolic phospholipase A₂. *Biochim Biophys Acta.;* **1488**(1-2):124-138
- Hietaranta AJ, Aho HJ, Gronroos JM, Hua ZY Nevelainen TJ (1992) Pancreatic phospholipase A₂ in proximal tubules of rat kidney in experimental acute pancreatitis and after intravenous injection of the enzyme. *Pancreas.*;**7**(3):326-333
- Hricik DE, Chung-Park M, Sedor JR (1998) Glomerulonephritis. *New Engl J Med.*; **339** (13):888-899
- Ho IC, Arm JP, Bingham CO 3rd, Choi A, Austen KF, Glimcher LH. (2001) A novel group of phospholipase A₂s preferentially expressed in type 2 helper T cells. *J Biol Chem*.;**276**(21):18321-18326
- Huwiler A, Staudt G, Kramer RM, Pfeilschifter J. (1997) Cross-talk between secretory phospholipases A₂ and cytosolic phospholipase A₂ in rat renal mesangial cells. *Biochim Biophys Acta.*;**1348**(3):257-272
- Huwiler A, Pfeilschifter J (2003) Nitric oxide signalling with a special focus on lipid-derived mediators. *Biol Chem.*; **384**(10-11): 1379-1389
- Inada M, Tojo H, Kawata S, Tarui S, Okamoto M (1991) Preferential distribution of group-II like phospholipase A₂ in mononuclear phagocytic cells in rat spleen and liver. *Eur J Biochem.*; **197**(2): 323-329
- Ishizaki J, Suzuki N, Higashino K, Yokota Y, Ono T, Kawamoto K, Fujii N, Arita H, Hanasaki K (1999) Cloning and characterization of novel mouse and human secretory phospholipase A₂s. *J Biol Chem.*; **274**(35):24973-24979
- Janssen MJ, van de Wiel WA, Beiboer SH, et al (1999) Catalytic role of the active site histidine of porcinepancreatic phospholipase A₂ probed by the variants H48Q, H48N and H48K. *Protein Engineering*.;**12**:497-503
- Jo EJ, Lee YN, Lee YN, Kim JI, Kang HK, Park DW, Baek SH, Kwak JY, Bae YS (2004) Group IB secretory phospholipase A₂ stimulates CXC chemokine ligand 8 productionvia ERK and NF-kappa B in human neutrophils. *J Immunol*.; **173**(10):6433-6439
- Kato M, Nishida S, Kitasato H, Sakata N, Kawai S (2001) Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of non-steroidal anti-inflammatory drugs: investigations using human periphal monocytes. J Pharm Pharmacol.; 53(12): 1679-1685

- Kennedy BP, Payette P, Mudgett J, Vadas P Pruzanski W, Kwan M, Tang C, Rancourt DE, Cromlish WA (1995) A natural disruption of the secretory group II phospholipase A₂ gene in inbred mouse strains. J Biol Chem.; 270(38):22378-22385
- Kim KP, Rafter JD, Bittova L, Han SK, Snitko Y, Munoz NM, Leff AR, Cho W (2001) Mechanism of human group V phospholipase A₂ (PLA₂)-induced leukotriene biosynthesis in human neutrophils. A potential role of heparan sulfate binding in PLA₂ internalization and degradation. *J Biol Chem.*; **276**(14):11126-11134
- Kini RM, Evans HJ (1989) A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipase A₂. *Toxicon.*; **27**:613-635
- Kishino J, Ohara O, Nomura K, Kramer RM, Arita H. (1994) Pancreatic-type phospholipase A₂ induces group II phospholipase A₂ expression and prostaglandin biosynthesis in rat mesangial cells. *J Biol Chem.*; **269**(7):5092-5098
- Kishino J, Kawamoto K, Ishizaki J (1995) Pankreatic-type phospholipase A₂ activates prostaglandin E₂ production in rat mesangial cells by receptor binding reaction. *J Biochem. (Tokyo)*; **117**(2):420-424
- Koolman J, Röhm KH (1998) Taschenatlas der Biochemie. Thieme Verlag, 2.Auflage, S.314
- Kramer RM, Hession C, Johansen B, Hayes G, McGray P, Chow EP Tizard R, Pepinsky RB (1989) Structure and properties of a human non-pancreatic phospholipase A₂. *J Biol Chem.*; **264**(10): 5768-5775
- Kudo I, Murakami M (2002) Phospholipase A₂ enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*; **68-69**:3-58
- Kundu GC, Mukherjee AB. (1997) Evidence that porcine pancreatic phospholipase A₂ via its high affinity receptor stimulates extracellular matrix invasion by normal and cancer cells. *J Biol Chem.*;**272**(4):2346-2353
- Kushiro M, Shikata K, Sugimoto H, Shikata Y, Miyatake N, Wada J, Miyasaka M, Makino H (1998) Therapeutic effects of prostacyclin analog on crescentic Glomerulonephritis of rats. *Kidney Int.;* **53**: 1314-1320
- Kusner DJ, Luebbers EL, Nowinski RJ, Konieczkowski M King CH, Sedor JR (1991) Cytokine- and LPS- induced synthesis of interleukin 8 from human mesangial cells. *Kidney Int.;* **39**(6): 1240-1248
- Kuwata H, Nakatani Y, Murakami M, Kudo I (1998) Cytosolic phospholipase A₂ is required for cytokine-induced expression of type IIA secretory phospholipase A₂ that mediates optimalcycloxygenase-2-dependent delayed prostaglandin E₂ generation in rat 3Y1 fibroblasts. *J Biol Chem.*; **273**(3): 1733-1740
- Kuwata H, Nonaka T, Murakami M, Kudo I (2005) Search of factors that intermediate cytokine-induced group IIA Phospholipase A₂ Expression through the cytosolic phospholipase A₂- and12/15-Lipoxygenase-dependent pathway. *J Biol Chem.*; 280(27): 25830-25839

- Lambeau G, Barhanin J, Schweitz H, Qar J, Lazdunski M (1989) Identification and properties of very high affinity brain membrane-binding sites for a neurotoxic phospholipase from the taipan venom. *J Biol Chem.*; **264** (19):11503-10
- Lambeau G, Ancian P, Nicolas JP Beiboer SH, Moinier D, Verheij H, Lazdunski M (1995) Structural elements of secretoryphospholipases A₂ involved in the binding to M-type receptors. *J Biol Chem.*; **270**: 5534-5540
- Lambeau G, Lazdunski M. (1999) Receptors for a growing family of secreted phospholipases A₂. *Trends Pharmacol Sci.*; **20**(4):162-170
- Largen PJ, Tam FWK, Rees AJ, Cattell V (1995) Rat mesangial cells have a selective role in macrophage recruitment and activation. *Exp Nephrol.*; **3**(1): 34-39
- Leslie CC, Voelker DR, Channon JY, Wall MM, Zelarney PT (1988) Properties and purification of an arachidonoyl-hydrolyzing phospholipase A₂ from a macrophage cell line, RAW 264.7. *Biochim Biophys Acta.*; **963** (3): 476-492
- Leslie CC. (1997) Properties and regulation of cytosolic phospholipase A₂. *J Biol Chem*.; **272**(27):16709-16712
- Lin LL, Wartmann M, Lin AY, Knopf JL, Seth A, Davis RJ. (1993) cPLA₂ is phosphorylated and activated by MAPkinase. *Cell.*; **72**(2):269-278.
- Lüllmann H, Mohr K, Ziegler A (1996) Taschenatlas der Pharmakologie. Thieme Verlag Stuttgart, 3. Auflage, S.40
- MacMicking J, Xie QW, Nathan C (1997) Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol.*; **15**: 323-350
- MacPhee M, Chepenik KP, Liddell RA, Nelson KK, Siracusa LD, Buchberg AM (1995) The secretory phospholipase A₂ gene is a candidate for the Mom1 locus, a major modifier of ApcMin-induced intestinal neoplasia. *Cell*; **81** (6): 957-966
- Marks F, Fürstenberger G (1990) The conversion stage of skin carcinogenesis. *Carcinogenesis.*; **11**:2085-2092
- Marks F, Fürstenberger G. (1999) Prostaglandins, leukotrienes and other eicosanoids. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim
- Marti H-P, Hertig A, Mougenot B, Rondeau E (2003) Glomerulopathien. *Schweiz Med Forum*; **46**:1108-1117
- Martin M, Neumann D, Hoff T, Resch K, DeWitt DL, Goppelt-Struebe M (1994) Interleukin-1-induced cyclooxygenase 2 expression is suppressed by cyclosporin A in rat mesangial cells. *Kidney Int.*; **45**:150-158
- Matzer SP, Zombou J, sarau HM, Röllinghoff M, Beuscher HU (2004) A synthetic non-p eptide CXCR2 antagonist blocks MIP-2 induced neutrophil migration in mice. *Immunobiology.*; **209**(3): 225-233
- Menè P, Somonson MS, Dunn MJ (1989) Physiology of the mesangial cell. *Physiol Rev.*; **69**(4): 1347-1424

Menè P (2000) Mesangial cell cultures. J Nephrol.; 14:198-203

- Moncada S, Ferriera SH, Vane JR (1973) Prostaglandins, aspirin-like drugs and the oedema of inflammation. *Nature*; **246**(5430): 217-219
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev.*; **43**(2): 109-142
- Moncada S, Higgs A (1993) The L-arginine-nitric oxide pathway. *New Engl J Med.*; **329** (27):2002-2012
- Morham SG, Langenbach R, Loftin CD, Tiano HF, Vouloumanos N, Jennette JC, Mahler JF, Kluckmann KD, Ledford A, Lee CA, Smithies O (1995) Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. *Cell*.; **83**:473-482
- Morioka Y, Ikeda M, Saiga A, Fujii N, Ishimoto Y, Arita H, Hanasaki K. (2000) Potential role of group X secretory phospholipase A₂ in cyclooxygenase-2-dependent PGE₂ formation during colon tumorigenesis. *FEBS Letters*.;**487**(2):262-266
- Morioka Y, Saiga A, Yokota Y, Suzuki N, Ikeda M, Ono T, Nakano K, Fujii N, Ishizaki J, Arita H, Hanasaki K (2000a) Mouse group X secretory phospholipase A₂ induces a potent release of arachidonic acid from spleen cells and acts as a ligand for the phospholipase A₂ receptor. *Arch Biochem Biophys.*; **381**(1): 31-42
- Morrison DC, Ryan JL (1987) Endotoxins and disease mechanisms. *Annu Rev Med.*; **24**(4):319-331
- Motoyoshi M, Sugiyama M, Atomi Y, Kimura W, Nagawa H (2001) In vivo effect of pancreatic phospholipase A₂ on the arachidonic acid cascade. *Int J Pancreatol.;* **29**(2):69-76
- Mühl H, Pfeilschifter J (1995) Amplification of nitric oxide synthase expression by nitric oxide in interleukin-1ß-stimulated rat mesangial cells. *J Clin Invest*.;**95**(4):1941-1946
- Mukherjee D (2001) Selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors and potential risk of cardiovascular events. *Biochem Pharmacol.*; **63**(5): 817-821
- Mutschler E (1997) Arzneimittelwirkungen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 7.Auflage, 559ff
- Murakami M, Matsumoto R, Austen KF, Arm JP (1994) Prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2 couple to different transmembrane stimuli to generate prostaglandin D₂ in mouse bone marrow derived mast cells. *J Biol Chem.*; **269**:22269-22275
- Murakami M, Shimbara S, Kambe T, Kuwata H, Winstead MV, Tischfield JA, Kudo I (1998) The functions of five distinct mammalian phospholipase A₂S in regulating arachidonic acid release. Type IIA and type V secretory phospholipase A₂S are functionally redundant and act in concert with cytosolic phospholipase A₂. *J Biol Chem.*; **273**(23):14411-14423

- Murakami M, Kambe T, Shimbara S, Higashino K, Hanasaki K, Arita H, Horiguchi M, Arita M, Arai H, Inoue K, Kudo I. (1999) Different functional aspects of the group II subfamily (Types IIA and V) and type X secretory phospholipase A₂s in regulating arachidonic acid release and prostaglandin generation. Implications of cyclooxygenase-2 induction and phospholipids scramblase-mediated cellular membrane perturbation. *J Biol Chem.*; **274**(44):31435-31444
- Murakami M, Kambe T, Shimbara S, Yamamoto S, Kuwata H, Kudo I. (1999a) Functional Association of type IIA secretory phospholipase A₂ with the glycosylphosphatidylinositol-anchored heparin sulfate proteoglycan in the cyclooxygenase-2-mediated delayed prostanoid-biosynthetic pathway. *J Biol Chem.*; **274**(42):29927-29936
- Murakami M, Kambe T, Shimbara S, Kudo I (1999b) Functional coupling between various phospholipase A₂ and cyclooxygenases in immediate and delayed prostanoid biosynthetic pathways. *J Biol Chem*.;**274**: 3103
- Murakami M, Kudo I (2001) Diversity and regulatory functions of mammalian secretory phospholipase A₂s. *Adv Immunol.*;**77**:163-94.
- Murakami M, Koduri RS, Enomoto A, Shimbara S, Seki M, Yoshihara K, Singer A, Valentin E, Ghomashchi F, Lambeau G, Gelb MH, Kudo I. (2001a) Distinct arachidonate-releasing functions of mammalian secreted phospholipase A₂s in human embryonic kidney 293 and rat mastocytoma RBL-2H3 cells through heparan sulfate shuttling and external plasma membrane mechanisms. *J Biol Chem.*; **276**(13):10083-10096
- Murakami M, Yoshihara K, Shimbara S, Lambeau G, Gelb MH, Singer AG, Sawada M, Inagaki N, Nagai H, Ishihara M, Ishikawa Y, Ishii T, Kudo I. (2002) Cellular arachidonate-releasing function and inflammation-associated expression of group IIF secretory phospholipase A₂. *J Biol Chem*.;**277**(21):19145-19155
- Murakami M, Masuda S, Shimbara S, Bezzine S, Lazdunski M, Lambeau G, Gelb MH, Matsukura S, Kokubu F, Adachi M, Kudo I (2003) Cellular Arachidonatereleasing function of novel classes of secretory phospholipase A₂s (groups III and XII). *J Biol Chem.*,**278**(12):10657-10667
- Murakami M, Kudo I (2004) Secretory phospholipase A₂. *Biol Pharm Bull.*; **27**(8):1158-1164.
- Nakano T, Ohara O, Teraoka H, Arita H. (1990) Glucocorticoids suppress group II phospholipase A₂ production by blocking mRNA synthesis and post-transcriptional expression. *J Biol Chem*.;**265**(21):12745-12748
- Naraba H, Murakami M, Matsumoto H, Shimbara S, Ueno A, Kudo I, Oh-ishi S (1998) Segregated coupling of phospholipases A₂, cyclooxygenases, and terminal prostanoid synthases in different phases of prostanoid biosynthesis in rat peritoneal macrophages. *J Immunol*.;**160**:2974-2982
- Nasjletti A, Arthur C (1998) Corcoran memorial lecture. The role of eicosanoids in angiotensin-dependent hypertension. *Hypertension*.; **31**:194-200
- Nasrallah R, Hébert RL (2005) Prostacyclin signalling in the kidney: implications for health and disease. *AJP-Reanl Physiol.*; **289**(2):235-246

- Nathan C (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*.;**6**(12): 3051-3064
- Nevalainen TJ, Eskola JU, Aho AJ, Havia VT, Lovgren TN, Nanto V. (1985) Immunoreactive phospholipase A₂ in serum in acute pancreatitis and pancreatic cancer. *Clin Chem.*; **31**(7):1116-11120
- Nevalainen TJ, Hietaranta AJ, Gronroos JM (1999) Phospholipase A₂ in acute pancreatitis: new biochemical and pathological aspects. *Hepatogastroenterology.*; **46**(29): 2731-2735
- Nigam S, Schewe T (2000) Phospholipase A₂s and lipid peroxydation. *Biochim Biophys Acta*.;**1488**(1-2):167-181
- Nitsch DD, Ghilardi N, Mühl H, Nitsch C, Brüne B, Pfeilschifter (1997) Apoptosis and expression of inducible nitric oxide synthase are mutually exclusive in renal mesangial cells. *Am J Pathol.*;**150**(3):889 -900
- Oka S, Arita H (1991) Inflammatory factors stimulate expression of group II phospholipase A₂ in rat cultured astrocytes. Two distinct pathways of the gene expression. J Biol Chem.; **266**(15): 9956-9960
- Ohtsuka y, Lee J, Stamm DS, Sanderson IR (2001) MIP-2 secreted by epithial cells increases neutrophil and lymphocyte recruitment in the mouse intestine. *Gut.*; **49**(4):526-533
- Pan YH, Yu BZ, Singer AG, Ghomashchi F, Lambeau G, Gelb MH, Jain MK, Bahnson BJ (2002)Crystal structure of human group X secreted phospholipase A₂.
 Electrostatically neutral interfacial surface targets zwitterionic membranes. J Biol Chem.; 277(32):29086-29093
- Park DW, Kim JR, Kim SY, Sonn JK, Bang OS, Kan SS, Kim JH, Baek SH (2003) Akt as a Mediator of secretory phopholipase A₂ receptor- involved inducible nitric oxide synthase expression. *J Immunol.*;**170**:2093-2099
- Patrick DA, Moore EE, Silliman CC, Barnett CC, Kuypers FA (2001) Secretory phospholipase A₂ activity correlates with postinjry multiple organ. *Crit Care Med.*; **29**(5):989-993
- Pautz A, Franzen R, Dorsch S, Böddinghaus B, Briner VA, Pfeilschifter J, Huwiler A (2002) Crosstalk between nitric oxide and superoxide determines ceramide formation and apoptosis in glomerular cells. *Kidney Int.*;**61**(3):790-796
- Peuravuori HJ, Funatomi H, Nevalainen TJ (1993) Group I and group II phospholipases A₂ in serum in uremia. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.*; **31**(8):491-494
- Pfeilschifter J, Pignant W, Vosbeck K, Märki F (1989) Interleukin-1 and tumor necrosis factor synergistically stimulate prostaglandinsynthesis and phospholipase A₂ release from rat mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun.*;**159**:385-394
- Pfeilschifter J, Vosbeck K (1991) Transforming growth factor beta 2 inhibits interleukin 1 beta- and tumor necrosis factor alpha- inductionof nitric oxide synthasein rat renal mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun.*;**175**(2):372-379

Pfeilschifter J, Rob P, Mülsch A, Fandrey J, Vosbeck K, Busse R (1992) Interleukin 1β and tumor necrosis factor α induce a macrophage-type of nitric-oxide synthase in rat mesangial cells. *J Clin Invest.*;**92**:2516-2523

Pfeilschifter J, Mühl H, Pignant W, Märki F, van den Bosch H (1993) Cytokine regulation of group II phospholipase A₂ expression in glomerular mesangial cells. *Eur J Clin Pharmacol.*;44,Supplement 1:S7-S9

- PfeilschifterJ (1995) Regulation of synthesis and secretion of group IIA phospholipase A₂ in clinical inflammation: Molecular approaches to pathophysiology, eds. Glaser KB und Vadas P (CRC, New york), pp25
- Pfeilschifter J (2000) Signalling pathways of nitric oxide. *Kidney Blood Press Res.*; **23**(3-5): 159-161
- Pfeilschifter J, Eberhardt W, Beck KF (2001) Regulation of gene expression by nitric oxide. *Eur J Physiol.*; **442**(4): 479-486
- Pickard RT, Strifler BA, Kramer RM, Sharp JD (1999) Molecular cloning of two new human paralogs of 85kDa cyosolic phospholipase A₂, cPLA₂γ, that is prenylated and contains homology to cPLA₂. *J Biol Chem*.;**274**(13):8823-8831
- Qi Z, Hao CM, Langenbach RI, Breyer RM, Redha R, Morrow JD, Breyer MD (2002) Opposite effect of cyclooxygenase-1 and-2 activity on the pressor response to angiotensin II. *J Clin Invest*.; **110**(1):61-69
- Qu XD, Lloyd KC, Walsh JH, Lehrer RI (1996) Secretion of type II phospholipase A₂ and cryptdin by small rat intestinal Panteth cells. *Infect Immun.* **64**(12):5161-5165
- Qu XD, Lehrer RI (1998) Secretory phospholipases A₂ is the principle bactericide for Staphylococci and other Gram-positive bacteria in human tears. *Infect Immun.*; **66**(6):2791-2797
- Radeke HH, Resch K (1992) The inflammatory function of renal mesangial cells and their interaction with the cellular immune system. *Clin Investig.*; **70**(9):825-842
- Radeke HH, Emmendörfer A, Uciechowski P, v d Ohe J, Schwinzer B, Resch K (1994) Activation of autoreactive T-lymphocytes by cultured syngeneic glomerular mesangial cells. *Kidney Int.*; **45**(3):763-774
- Reddy ST, Herschmann HR (1997) Prostaglandin synthase-1 and prostaglandin synthase-2 are coupled to distinct phospholipases for generation of prostaglandin D₂ in activated mast cells. *J Biol Chem.*; **272**:3231-3237
- Rees DD, Palmer RM, Hodson HF, Moncada S (1989) A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium–dependent relaxation. Br J Pharmacol.; 96(2): 418-424
- Reinalter SC, Jeck N, Brochhausen C, Watzer B, Nüsing RM, Seybert HW, Kömhoff M (2002) Role of cyclooxygenase -2 in hyperprotaglandin E syndrome/ antenatal Bartter syndrome. *Kidney Int.;***62**(1):253-260
- Rerolle JP, Herting a, Nguyen G, Srear JD, Rondeau EP (2000) Plasminogen activator inhibitor type 1 is a potential target in renal fibrogenesis. *Kidney Int.*; 58(5):1841-1850

- Romero JC, Strick DM (1993) Nitric oxide and renal function. *Curr Opin Nephrol Hypertens.*; **2**:114-121
- Roy-Chaudhury P, Wu B, McDonald S, Haites NE, Sipson JG Power DA (1995) Phenotypic analysis of the glomerular and periglomerular mononuclear cell infiltrates in the Thy 1.1 model of glomerulonephritis. *Lab Invest*; **72**:524-531
- Ruef C, Budde K, Lacy J, Northemann W, Baumann M, Sterzel RB, Coleman DL (1990) Interleukin 6 is an autocrin growth factor for mesangial cells. *Kidney Int.*; **38**(2): 249-257
- Rupprecht G, Scholz K, Beck KF, Geiger H, Pfeilschifter J, Kaszkin M (1999) Cross-talk between group IIA-phospholipase A₂ and inducible NO-synthase in rat renal mesangial cells. *Br J Pharmacol.*; **127**(1):51-56
- Rzymiewicz D, Leingang K, Baird N, Morrison AR (1994) Regulation of prostaglandin endoperoxide synthase gene expression in rat mesangial cells by interleukin-1 beta. *Am J Physiol.*; **266:**F39-F45
- Saiga A, Uozumi N, Ono T, Seno K, Ishimoto Y, Arita H, Shimizu T, Hanasaki K (2005) Group X secretory phospholipase A₂ can nduce arachadonic acid release and eicosanoid production without activation of cytosolic phospholipase A₂ alpha. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*;**75**:79-89
- Saiki RK, Scharf S, Fallon F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globulin genomic sequences and restriction site of analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*; **230**(4732):1350-1354
- Sambrook J, Gething MJ (1989) Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature.*; **342** (6247):224-225.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; **74**(12):5463-5467
- Sartipy P, Johnansen B, Gasvik K, Hurt-Camejo E (2000) Molecular basis of the association of group IIA phospholipase A₂ and decorin in human atherosclerotic lesions. *Circ Res*,; **86**(6):707-714
- Sawada H, Murakami M, Enomoto A, Shimbara S, Kudo I. (1999) Regulation of type V Phospholipases A₂ expression and function by proinflammatory stimuli. *Eur J Biochem.*;**263**(3):826-835
- Schadow A, Scholz-Pedretti K, Lambeau G, Gelb MH, Fürstenberger G, Pfeilschifter J, Kaszkin M (2001) Characterization of group X phospholipase A₂ as the major enzyme secreted by human keratinocytes and its regulation by the phorbol ester TPA. J Invest Dermatol.; **116**(1):31-39
- Schalkwijk C, Pfeilschifter J, Märki F, van den Bosch H (1991) Interleukin-1β, tumor necrosis factor and forskolin stimulate the synthesis and secretion of group II phospholipase A₂ in rat mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun.*; 174:268-275

- Schalkwijk C, Pfeilschifter J, Märki F, van den Bosch H (1992) Interleukin-1 beta and forskolin-induced synthesis and secretion of group II phospholipase A₂ and prostaglandin E₂ in rat mesangial cells is prevented by transforming growth factor-beta-2. *J Biol Chem.*; **267**:8846-8852
- Schall TJ (1994) The Chemokines. In Thomson AW eds. The cytokine handbook. *London Academic press*, S.419-460
- SchildknechtS, Bachschmid M, Baumann A, Ulrich V (2004) COX-2 inhibitors selectively block prostacyclin synthesis in endotoxin-exposed vascular smooth muscle cells. FASEB.; 18:757-759
- Schlöndorff D (1987) The glomerular mesangial cell: an expanding role for a specialized pericyte. *FASEB*; **1**(4):272-281
- Schlöndorff D (1995) The role of chemokines in the initiation and progression of renal disease. *Kidney Int Suppl.*; **49**:44-47
- Scholz K, Vlachojannis GJ, Spitzer S, Schini-Kerth V, van den Bosch H, Kaszkin M, Pfeilschifter J Modulation of cytokin-induced expression of secretory phospholipase A₂-type IIA by protein kinase C in rat mesangial cells. *Biochem Pharmacol.*; **58**:1751-1758
- Scholz-Pedretti K, Eberhardt W, Rupprecht G, Beck KF,Spitzer S, Pfeilschifter J, Kaszkin M (2000) Inhibition of NFkappaB-mediated pro-inflammatoy gene expression in rat mesangial cells by enolized 1,3-dioxane-4,6-ione-5-carboxamide, CGP-43182. Br J Pharmacol.;**130**:1183-1190
- Schreiner GF (1992) The mesangial phagocyte and its regulation of contractile cell biology. *J Am Soc Nephrol.*;**2**(10):74-82
- Schrier DJ, Schimmer RC, Flory CM, Tung DK, Ward PA (1998) Role of chemkines and cytokines in a reactivation model of arthritis in rats induced by injection with streptococcal cell walls. *J Leukoc Biol.*;63(3):359-363
- Schuster VL (1998) Molecular mechanism ofprotaglandin transport. Annu Rev Physiol.;60: 221-242
- Seilhamer JJ, Randall TL, Yamanaka M, Johnson LK. (1986) Pancreatic phospholipase A₂: Isolation of the human gene and cDNAs from porcine pancreas and human lung. *DNA*.;**5**(6):519-527
- Seilhammer JJ, Pruzanski W, Vadas P, Plant S, Miller JA, Kloss J, Johnson LK. (1989) Cloning and recombinant expression of phospholipase A₂ present in rheumatoid arthritic synovial fluid. *J Biol Chem.*; **264**(10):5335-5338
- Shinohara H, Balboa MA, Johanson CA, Balsinde J, Dennis EA (1999) Regualtion of delayed prostaglandin production in activated P388D1 macrophages by IV group IV cytosolic and group V secretory phospholipase A₂s. *J Biol Chem.*, 274(18):12263-12268

- Singer AG, Ghomashchi F, Le Calvez C, Bollinger J, Bezzine S, Rouault M, Sadilek M, Nguyen E,Lazdunski M, Lambeau G, Gelb MH. (2002) Interfacial kinetic and binding properties of the complete set of human and mouse groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A₂. *J Biol Chem.*; **277**(50):48535-48549
- Skidgel RA, Gao XP, Brovkovych V, Rahman A, Jho D, Predescu S, Standiford TJ, Malik AB (2002) Nitric oxide stimulates macrophage inflammatory protein 2 expression in sepsis. *J Immunol.*; **169**(4):2093-2101
- Smart BP, Pan YH, Weeks AK, Bollinger JG, Bahnson BJ, Gelb MH. (2004) Inhibition of the complete set of mammalian secreted phospholipases A2 by indole analogues: a structure-guided study. *Bioorg Med Chem.*;**12**(7):1737-1749
- Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL (1996) Prostaglandin endoperoxid H synthase (cyclooxygenase)-1 and -2. *J Biol Chem*.;**271**:33157-33160
- Smith WL, De Witt DL, Garavito RM (2000) Cyclooxygenases: Structural, Cellular and Molecular Biology. Annu Rev Biochem.;69:145-182
- Song C, Chang XJ, Bean KM, Proia MS, Knopf JL, Kriz RW. (1999) Molecular characterization of cytosolic phospholipase A₂-beta. *J Biol Chem*.;**274**(24):17063-17067
- Sozzani S,Locati M, Allavena P, Van Damme J, Mantovani A (1996) Chemokines: A superfamily of chemotactic cytokines. *Int J Clin Lab Res.*;**26**(2):69-82
- Sraer JD, Adida C, Peraldi MN, Rondeau E, Kanfer A (1993) Species-specific properties of the glomerular mesangium. *J Am Soc Nephrol*;**3**(7):1342-1350
- Steinmann-Niggli K, Küng M, Ziswiler R, Marti HP (1998) Inhibition of matrix metalloproteinases attenuates anti-Thy1.1 nephritis. *J Am Soc Nephrol*.;**9**(3): 397-407
- Sterzel BR, Schulze-Lohoff E, Marx M (1993) Cytokines and mesangial cells. *Kidney Int Suppl.*;**39**:26-31
- Sterzel BR, Rupprecht HD (1997) Glomerular Mesangial Cells. *Immunologic Renal Diseases*, Lippincott-Raven Publishers; Chapter **29**: S. 595ff.
- Striker GE, Striker LJ (1985) Biology of disease. Glomerular cell culture. *Lab Invest*.;**53**:122-131
- Suelter C (1990) Experimentelle Enzymologie. Gustav Fischer Verlag
- Sugiura T, Wada A, Itoh T, Tojo H, Okamoto M, Imai E, Kamada T, Ueda N (1995) Group II phospholipase A₂ activates mitogen-acivated protein kinase in cultured rat mesangial cells. *FEBS Lett.*;**370**(1-2):141-145
- Suzuki N, Ishizaki J, Yokota Y, Higashino K, Ono T, Ikeda M, Fujii N, Kawamoto K, Hanasaki K (2000) Structures, enzymatic properties, and expression of novel human and mouse secretory phospholipase A₂s. J Biol Chem.;275(8):5785-5793

- Tam FW, Karkar AM, Smith J, Yoshimura T, Steinkasserer A, Kurrle R, Langner K, Rees AJ (1996) Differential expression of macrophage inflammatory protein-2 and monocyte chemoattractant protein-1 in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int.*;49:715
- Taylor ME, Conary JT, Lennartz MR, Stahl PD, Drickamer K (1990) Primary structure of the mannose receptor contains multiple motifs resembling carbohydraterecognition domains. *J Biol Chem.*;**265**(21):12156-12162
- Tegeder I, Neupert W, Gühring H, Geisslinger G (2000) Effects of selective and unselective Cyclooxygenase Inhibitors on Prostanoid Release from various rat Organs. JPET.;**292**:1161-168
- Tekamp Olson P, Gallegos C, BauerD, McClain J, Sherry B, Fabre M, van Deventer S, Cerami A (1990) Cloning and characterization of cDNA for murine macrophage inflammatory protein 2 and its human homologues. *J Exp Med*.;**172**(3) 911-919
- Tessier PA, Naccache PH, Clark-Lewis I, Gladue RP, Neote KS, McColl SR (1997) Chemokine networks in vivo: involvement of CXC and CC chemokines in neutrophil extravasation in vivo in response to TNFα. *J Immunol.*;**159**(7):3595-3602
- Tessier PA, Naccache PH, Diener KR, Gladue RP Neote KS, Clark-Lewis I, McColl SR (1998) Induction of acute inflammation in vivo bystaphyococcal superantigens II. Critical role for chemokines, ICAM-1 and TNFα. *J Immunol.*;**161**(3):1204-1211
- Tetsuka T, Daphna-Iken D, Miller BW, Guan Z, Baier LD, Morrison AR (1996) Nitric oxide amplifies interleukin-1-induced cyclooxygenase 2 expression in rat mesangial cells. *J Clin Invest*:**;97**:2051-2056
- Tipping PG, Lowe MG, Holdsworth SR (1991) Glomerular Interleukin-1 production is dependent on macrophage infiltration in anti-GBM glomerulonephritis. *Kidney Int.;* **39**(1):103-110
- Tischfield JA. (1997) A reassessment of the low molecular weight phospholipase A₂ gene family in mammals. *J Biol Chem.*; **272**(28):17247-17250
- Tojo H, Ono T, Kuramitsu H, Okamoto M (1988) A phospholipase A₂ in the supernantant fraction of rat spleen: its similarity to rat pancreatic hopholipase A₂. *J Biol Chem*.; **263**(12):5724-5731
- Touqui L, Alaoui-El-Azher M (2001) Mammalian secreted phospholipases A₂ and their pathophysiological significance in inflammatory diseases. *Curr Mol Med.*;1(6): 739-754
- Triggiani M, Granata F, Oriente A, De Marino V, Gentile M, Calabrese C, Palumbo C, Marone G (2000) Secretory phospholipase A₂ induce beta-glucuronidase release and IL-6 production from human lung macrophages. *J Immunol.*; 164(9):4908-4915
- Triggiani M, Granata F, Giannattaio G, Marone G (2005) Secretory phospholipase A₂ in inflammatory and allergic diseases: Not just enzymes. *J Allergy Clin Immunol.*; **116**(5):1000-1006

- Togawa M, Haneda M, Araki S, Sugimoto T, IsonoM, Hidaka H, Yasuda H, Kashiwagi A, Kikawa R (1997) Beraprost sodium, an analogue of prostacyclin, induces the expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase and inhibits the proliferation of cultures mesangial cells. *Eur J Pharmacol.;* **336**:291-294
- Uhl W, Schrag HJ, Schmitter N, Nevalainen TJ, Aufenager J, Wheatley AM, Buchler MW (1997) Pathophysiological role of secretory type I and II phospholipase A₂ in acute pancreatitis: an experimental study in rats. *Gut.*; **40**(3):386-392
- Underwood KW, Song C, Kriz RW, Chang XJ, Knopf JL, Lin LL. (1998) A novel calcium-Independent phospholipase A₂, cPLA₂-gamma, that is prenylated and contains homology to cPLA₂. *J Biol Chem.*; **273**(34):21926-21932
- Vadas P, Pruzanski W. (1993) Induction of group II phospholipase A₂ expression and pathogenesis of the sepsis syndrome. *Circ Shock.*; **39**(2):160-167.
- Valentin E, Ghomashchi F, Gelb MH, Lazdunski M, Lambeau G. (1999) On the diversity of Secreted phospholipases A₂. Cloning, tissue distribution, and functional expression of two novel mouse group II enzymes. *J Biol Chem.*; 274(44):31195-31202
- Valentin E, Lambeau G (2000) Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A₂ and their receptors and binding proteins. *Biochim Biophys Acta.* **1488**(1-2):59-70.
- Valentin E, Singer AG, Ghomashchi F, Lazdunski M, Gelb MH, Lambeau G (2000a) Cloning and recombinant expression of human group IIF-secreted phospholipase A₂. *Biochem Biophys Res Commun.*; **279**(1):223-228.
- Valentin E, Ghomashchi F, Gelb MH, Lazdunski M, Lambeau G. (2000b) Novel human Secreted phospholipase A₂ with homology to the group III bee venom enzyme. *J Biol Chem.*;**275**(11):7492-7496
- Van Dervort AL, Yan L, Madara PJ, Cobb JP, Wesley RA, Corriveau CC, Tropea MM, Danner RL (1994) Nitric oxide regulates endotoxin-induced TNFα-production by human neutrophils. *J Immunol*.;**152**: 4102-4109
- Wada A, Tojo H, Sugiura T, Fujiwara Y, Kamada T, Ueda N, Okamoto M (1997) Group II phospholipase A₂ as an autocrine growth factor mediating interleukin-1 action on mesangial cells. *Biochim Biophys Acta*.;**1345**(1):99-108
- Walker G, Kunz D, Pignant W, van den Bosch H, Pfeilschifter J (1995) Pyrrolidine dithiocarbamate differentially affects cytokine- and cAMP-induced expression of group II phospholipase A₂ in rat renal mesangial cells. *FEBS Lett.*;**364**:218-222
- Walpen S, Beck KF, Schaefer L, Raslik I, Eberhardt W, Schaefer RM, Pfeilschifter J (2001) Nitric oxide induces MIP-2 transcription in rat renal mesangial cells and in a rat model of glomerulonephritis. *FASEB J*.;**15**(3): 571-573
- Westerhuis R, van Straaten SC, van Dixhoorn MG, van Rooijhen N, Verhagen NA, Dijkstra CD, de Heer E, Daha MR (2000) Distinctive roles of neutrophils and monocytes in anti-thy-1 nephritis. *Am J Pathol.*;**156** :303-310

- Winstead MV, Balsinde J, Dennis EA (2000) Calcium-independent phospholipase A₂: structure and function. *Biochim Biophys Acta*.;**1488**:28-39
- Wolf G, Aberle S, Thaiss F Nelson PJ, Krensky AM, Neilson EG, Stahl RA (1993) TNF alpha induces expression of the chemoattractant cytokine RANTES in cultured mouse mesangial cells. *Kidney Int.*; **44**(4):795-804
- Wolf G, Ziyadeh FN, Zahner G, Stahl RA (1996) Angiotensin II is mitogenic for cultured rat glomerular endothelial cells. *Hypertension*;**27**(4):897-905
- Wolpe SD, Davatelis G, Sherry B, Beutler B, Hesse DG, Nguyen HT, Moldawer LL, Nathan CF, Lowry SF, Cerami A (1988) Macrophage secrete a novel heparin binding protein with inflammatory and neutrophil chemokineticproperties. J Exp Med.; 167(2):2251-2259
- Wolpe SD, Sherry B, Juers D, Davatelis G, Yurt RW, Cerami A (1989) Identification and characterization of macrophage inflammatory protein 2. *Proc Natl Acad Sci* USA.; 86(2):612-616
- Yokota Y, Higashino K, Nakano K, Arita H, Hanasaki K (2000) Identification of group X secretory phospholipase A₂ as a natural ligand for mouse phospholipase A₂ receptor. *FEBS Lett.;***478**(1-2):187-191
- Yokota Y, Notoya M, Higashino K, Ishimoto Y, Nakano K, Arita H, Hanasaki K (2001) Clearance of group X phospholipase A₂ via mouse phospholipase A₂ receptor. *FEBS Lett.*;**509**(2):250-254

8 Anhang

8.1 Publikationen und Präsentationen

Beck S, Beck G, Ostendorf T, Floege J, Lambeau G, Nevalainen T, Radeke HH, Gurrieri S, Haas U, **Thorwart B**, Pfeilschifter J, Kaszkin M "Upregulation of group IB secreted phospholipase A₂ and its M-type-receptor in rat anti-Thy1.1-Glomerulonephritis" *Kidney Int. 2006 Oct;70(7):1251-60.*

03/2005 46. Frühjahrstagung der DGPT, Universität Mainz
 Poster: "Enhanced Expression of MIP-2 in Mesangial Cells from sPLA₂-Receptor knockout mice."

8.2 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die hier als Dissertation vorliegende Arbeit selbständig und mit keinen anderen als denen im Text angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Mainz, September 2006

Bettina Thorwart