

**Identification of prostaglandin receptors
in human ureters**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Matthias Oll
aus Bad Frankenhausen
2014

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Professor Dr. med. Dr. h.c. Stefan C. Müller
2. Gutachter: Professor Dr. med. Glen Kristiansen

Tag der Mündlichen Prüfung: 15.04.2014

Aus der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie
Direktor: Professor Dr. med. Dr. h.c. Stefan C. Müller

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis	4
2. Deutsche Zusammenfassung.....	5
2.1. Einleitung	5
2.2. Methoden	6
2.3. Ergebnisse	7
2.4. Diskussion	9
3. Publikation.....	11
Background	11
Methods	12
Results	12
Discussion	15
Conclusion	16
4. Literaturverzeichnis der Zusammenfassung.....	17
5. Danksagung.....	20
6. Lebenslauf	21

1. Abkürzungsverzeichnis

ACTB	actin, beta
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
cAMP	cyclische Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary Deoxyribonucleic Acid
COX	Cyclooxygenase
Cq	Cycle quantification
FFPE	Formalin-Fixed Paraffin Embedded
FFT	Fresh-Frozen-Tissue
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
Gi	inhibitory regulative G-protein
Gq	phosphatidylinositol signal pathway G-protein
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
pH	potentia Hydrogenii
PGD2	Prostaglandin D2
PGE2	Prostaglandin E2
PTGER1	Prostaglandin E Rezeptor 1, EP1
PTGER2	Prostaglandin E Rezeptor 2, EP2
PTGER3	Prostaglandin E Rezeptor 3, EP3
PTGER4	Prostaglandin E Rezeptor 4, EP4
PTGFR	Prostaglandin F2alpha Rezeptor
TBST	Tris-buffered Saline and Tween

2. Deutsche Zusammenfassung

2.1. Einleitung

Prostaglandine sind Gewebshormone, welche durch die Cyclooxygenasen (COX1 und COX2) aus Arachidonsäure oder Eicosapentaensäure gebildet werden und bei der Entstehung von Schmerz und der Kontraktion bzw. der teilweisen Dilatation von Ureteren oder Arterien eine Rolle spielen. Die Hemmung der COX durch nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) spielt deshalb eine Rolle an der Reduktion von Schmerzen und der Dilatation von Ureteren bei Patienten, welche unter einer Nierenkolik oder einer Obstruktion eines Ureters leiden (Nørregaard et al., 2006). Insbesondere die Expression von COX2 scheint bei der Harnleiterkolik eine wichtige Rolle zu spielen und stellt deshalb auch ein mögliches Ziel in der Bekämpfung von Schmerzen dar (Chaignat et al., 2008).

Jedoch stehen NSAR eng in Verbindung mit möglichen und starken Nebenwirkungen, wie einer verminderten renalen Durchblutung und der Entstehung von Magen- und Duodenalulzerationen. Prostaglandine stellen eine interessante Alternative dar, weil eine schmerzstillende Wirkung erzielt werden könnte, ohne die Nebenwirkungen von NSAR in Kauf nehmen zu müssen. Die Einteilung der Prostaglandine erfolgt in Prostaglandin F_{2α} (PGF_{2a}) und Prostaglandin D₂ (PGD₂), welche eine Kontraktion des Ureters verursachen und Prostaglandin E₂ (PGE₂), welches über vier verschiedene Rezeptorsubtypen PTGER1-4 eine Wirkung vermittelt.

PTGER1 (Prostaglandin E Rezeptor 1, EP1) und PTGER3 (Prostaglandin E Rezeptor 3, EP3) bewirken eine Kontraktion glatter Muskulatur, während PTGER2 (Prostaglandin E Rezeptor 2, EP2) und PTGER4 (Prostaglandin E Rezeptor 4, EP4) glatte Muskelzellen relaxieren. Alle Rezeptoren vermitteln ihre Wirkung über G-Protein-gekoppelte Mechanismen, wie cyclische Adenosinmonophosphat (cAMP) Stimulation über G_q (bei PTGER2 und PTGER4), cAMP Inhibition über G_i (bei PTGER3) und einer Aktivierung von Phosphatidylinositol (bei PTGER1) (Breyer et al., 1996). Während das Vorkommen der verschiedenen Rezeptortypen im Tiermodell nachgewiesen wurde (Nørregaard et al., 2006), steht der Nachweis der Verteilung dieser Rezeptoren im menschlichen Harntrakt noch aus.

Die folgende Studie untersucht die Expression von PTGER1-4 und PTGFR (Prostaglandin F2 alpha Rezeptor) im menschlichen Ureter. Dafür wurden Die Ureter in proximale, distale und in einen mittigen Abschnitt und dem Nierenbecken eingeteilt. Insbesondere PTGER1 und PTGER3 könnten zukünftige Ziele bei der Therapie einer Urolithiasis und eine Alternative zu gängigen COX-Inhibitoren darstellen.

2.2.Methoden

Die Proben stammen von insgesamt 23 Patienten, 17 davon mit malignen Erkrankungen der Niere, bzw. der ableitenden Harnwege (Nierenzellkarzinom und Urothelkarzinom) und sechs Patienten mit einer nicht-malignen Indikation zur Nephroureterektomie, zum Beispiel einer chronischer Pyelonephritis (n = 1), vesicoureteralem Reflux (n = 2), obstruktivem Megaureter (n = 1), Nierenbeckenabgangsstenose (n = 1) und einem Patienten mit unklarer Genese (n = 1). Die Gewebeproben vom Ureter der Patienten, wurden in verschiedene Abschnitte (proximal, distal, mittig) und Nierenbecken eingeteilt und in Paraffin eingebettet (Formalin-Fixation Paraffin Embedded, FFPE). Weitere drei Proben dieses Patientenkollektivs wurden als Frischgewebe (Fresh-Frozen Tissue, FFT) bei -80 °C archiviert.

Die für die Immunhistochemie verwendeten Paraffinblöcke wurden durch Xylol- und Alkoholreihen entwacht und anschließend einer Mikrowellen-Citrat Behandlung unterzogen. Die Immunhistochemie beruht auf dem Prinzip der Antikörper/Antigen-Konjugation. Dabei bindet ein Primärantikörper an ein für ihn typisches Epitop auf dem Probengewebe und haftet fest daran. Dieser Primärantikörper kann im nächsten Schritt von einem Sekundärantikörper erkannt werden. Verwendet wurde das EnVision[®] Reagenz (Fa. Dako) gegen Kaninchen-Antikörper. Der Sekundärantikörper trägt eine vielfache Peroxidasemarkierung, welche die Bildung und Verstärkung des Färbesignals mittels AEC (Fa. Dako, 3-Amino-9-Ethylcarbazol) ermöglicht. Danach erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämalaun. Analog zur Vorgehensweise bei den FFPE-Geweben ging ich bei den FFT-Geweben vor.

Zur Quantifizierung der mRNA wurde aus den Geweben mit Hilfe des RecoverAll[®] Total Nucleic Acid Isolation Kit (Fa. Ambion) isoliert. Nach dem Entwachsen der Schnitte und

einem Proteinverdau erfolgte die Aufreinigung über eine Silikagel-Säule. Für die Umschreibung der mRNA in cDNA (complementary Deoxyribonucleic Acid) verwendeten wir das Enzym reverse Transkriptase des SuperScript III First Strand Synthesis System (Fa. Invitrogen). Die RTq-PCR wurde mit den spezifischen Primern für die jeweiligen Prostaglandinrezeptoren mit einem SYBR-GreenER-Master-Mix (Fa. Invitrogen) an einem ABI Prism 7900HT (Fa. Applied Biosystems) gemessen. Eingeschlossen wurden Positivkontrollen (Niere, $n = 4$), Negativkontrollen (Uterus, $n = 2$) und eine No-Template-Control (NTC = Wasser).

Die Färbeergebnisse der Histologie wurden an einem Mikroskop mit einem Score von 0 (negativ), 1 (leicht positiv), 2 (positiv) bis 3 (stark positiv) bewertet, jeweils für Urotholzellen und Muskelzellen. Die statistischen Auswertungen erfolgten mit SPSS Statistics v20 (IBM). Der Chi-quadrat Test (Häufigkeitstest) wurde zum Vergleich von Proteinexpressionen im Urothel und der glatten Muskulatur sowie des Ureters eingesetzt. Der Friedmann-Test (Gleichheit des Lageparameters mit gepaarten Stichproben) und der Mann-Whitney-U-Test wurden angewandt zum Vergleich von Proteinexpression in den verschiedenen Arealen der Ureterproben. Eine statistische Signifikanz wurde bei $p < 0.05$ angenommen.

2.3. Ergebnisse

Die nachfolgenden Auswertungen beziehen sich ausschließlich auf die Färbungen im Paraffingewebe. Der Zustand der Urothelzellen im Gefriergewebe war dagegen unbefriedigend. Unabhängig davon verhielten sich die muskulären Färbungen gleich.

Die Prostaglandinrezeptoren wurden zytoplasmatisch angefärbt. Innerhalb eines Präparates war die Färbeintensität der Zellen gleichmäßig. Es konnte kein Unterschied zwischen obstruierten und nicht obstruierten Uretergeweben $p > 0,28$ (Mann-Whitney-U-Test) gefunden werden. Die Untersuchungen ergaben jedoch einen deutlichen Unterschied zwischen den einzelnen Zielproteinen wie auch in den einzelnen Ureterabschnitten (Friedman-test: $p < 0,001$):

- PTGER1 zeigte in den meisten Proben eine eindeutige Färbung. Es gibt einen deutlichen Unterschied zwischen Urothel, mit einer starken Expression und glatter Muskulatur, welche eher moderate Färbung zeigte. Die Verteilung von PTGER1 fällt zwischen den einzelnen Ureterabschnitten vergleichbar aus.

- PTGER2 fand sich in zirka 50 % der Präparate im Urothel und zeigte eine schwache Expression unabhängig vom Ureterabschnitt. Die PTGER2-Färbung in den Muskelzellen war ebenfalls schwach und in nur 15-20 % der Proben vorhanden. Es ergab sich keine Färbung im Nierenbecken.
- PTGER3 war im Urothel negativ oder kaum nachweisbar (10 %), unabhängig vom Gewebe. PTGER3 fand sich deutlich häufiger und stärker exprimiert in der glatten Muskulatur. Für die Lokalisation zeigte sich eine Verteilung von 62 % in distalen Abschnitten, 80 % in mittleren Abschnitten und 46 % in proximalen Abschnitten des Ureters, während im Nierenbecken nur 23 % PTGER3 Expression in schwacher oder moderater Färbung zu finden war.
- PTGER4 war schwach exprimiert und vorwiegend im Urothel zu finden. Die Verteilung mit 23 % im distalen, 14 % im mittleren und 35 % im proximalen Ureter, sowie 31 % im Nierenbecken ist unauffällig. Außer in 13 % der distalen Abschnitte gab es keine Muskelfärbungen.
- PTGFR zeigte in den meisten Proben eine schwache bis moderate Expression und eine einheitliche Verteilung zwischen Muskulatur und Urothel. Weniger als 15 % hatten keine darstellbare PTGFR Expression.

Im nächsten Schritt wurden die mRNA Expressionprofile von PTGER1-4 und PTGFR untersucht. Aus dem vorliegenden FFPE-Gewebe konnte keine, qualitativ und quantitativ ausreichend hochwertige RNA extrahiert werden. Daraufhin verwendeten wir Proben aus Frischgewebe (FFT). Aufgrund der geringen Probenanzahl ($n = 3$) und der geringen Konzentration des Probenmaterials, war nur eine eingeschränkte Bewertung möglich. Die Expression der Target-RNA zeigte sich nur geringfügig über dem Quantifikationslimit (Cq 30-32), bei einem Stabilitätswert für die Housekeeper ACTB und GAPDH von 0,538 (DataAssist Software). In allen Proben fanden sich trotzdem detektierbare Mengen PTGER1-4 und PTGFR mRNA, welche sich jedoch nicht mit der Proteinexpression aus der IHC korrelieren ließ ($p > 0.3$).

2.4.Diskussion

Im Hinblick auf neue Strategien in der Behandlung von obstruktiven Erkrankungen des Ureters stellen Prostaglandine eine interessante Alternative zu gängigen Behandlungsmethoden dar. Es wurden schon umfangreiche Arbeiten zur Identifikation von Prostaglandinrezeptoren im Tiermodell angefertigt (Nørregaard et al., 2006), der Nachweis im menschlichen Harntrakt fehlte jedoch. Bisher besteht die Therapie unter anderem in der Verwendung nichtsteroidaler Antirheumatika (NSAR). Besonders selektive COX2-Inhibitoren scheinen zur Schmerzbekämpfung geeignet zu sein (Nørregaard et al., 2006). Jedoch haben sowohl selektive, als auch nicht-selektive COX-Inhibitoren erhebliche Nebenwirkungen, wie eine gesteigerte Blutungsneigung und gastrointestinale Beschwerden (Labianca et al., 2012). Ebenso stehen NSAR unter Verdacht renale Nebenwirkungen zu verursachen, wie Salz- und Flüssigkeitsretention (Bao et al., 2012) und sogar ein Nierenversagen kann daraus resultieren (Musu et al., 2011). Aktuelle Studien zeigten bereits die Wirkung von PGE₂ auf obstruktive (Kontraktion) und nicht-obstruktive Ureteren (Dilatation) (Lowry et al., 2005), wobei die gegensätzlichen Effekte auf die unterschiedlichen Subtypen zurückgeführt werden können (Ankem et al., 2005). So sind PTGER₂ und PTGER₄ an einer Relaxation von glatter Muskulatur beteiligt (Regan et al., 1994), während PTGER₁ und PTGER₃ eine Kontraktion bewirken (Funk et al., 1993).

In unserer Studie konnten wir die Verteilung von PTGER₁ in den Zellen des Urothels von Nierenbecken (100 %) und dem proximalen Abschnitt (80 %) zeigen, mit abnehmender Expression in den distalen gelegenen Abschnitten. Die glatte Muskulatur zeigte eine moderate Expression vor allem im proximalen Ureter (85 %). Das Urothel der Blase wurde bereits ausführlich untersucht und Effekte für PTGER₁ beschrieben (Wang et al., 2008). Auch die Rolle von PTGER₁ in der Entstehung von entzündungsbedingtem Schmerz wurde gezeigt (Johansson et al., 2011), welche durch eine Herunterregulierung der Expression von COX₂ vermittelt wird (Haddad et al., 2012).

Für den PTGER₁-Antagonisten (GW848687X, 2,6-substituiertes Pyridin) wurde bereits eine hervorragende Wirksamkeit in Modellen von Entzündungsreaktionen gezeigt (Giblin et al., 2007). So wurde angenommen, dass PTGER₁ eine Modulierung der

Aldosteronwirkung beim Einbau von Natriumkanälen in die Zellwände der Sammelrohre im Nierenmark bewirkt (Gonzales et al., 2009).

PTGER3 zeigte in der Studie eine schwache bis mittlere Expression in glatter Muskulatur und negative Ergebnisse in Urothelzellen. Die PTGER3 vermittelte Wirkung über CRE (cAMP Response Elements) (Audoly et al., 1999) scheint ein mögliches Ziel der anti-inflammatorischen Therapie bei Entzündungen der Haut zu sein (Goulet et al., 2004). PTGER2 und PTGER4 wurden nur schwach oder gar nicht im Urothel und der glatten Muskulatur exprimiert.

Folgende Limitationen der Studie sind zu nennen: Die verwendeten Proben stammten von Patienten mit unterschiedlichen Grunderkrankungen. Zudem war die Anzahl verfügbarer Proben relativ gering, was die statistische Aussagekraft eingeschränkt. Die Gewebe-Fixierung führte zu einer deutlichen Einschränkung der RNA-Integrität, was den Vergleich von Protein und mRNA Expression nahezu unmöglich machte.

Zusammenfassend zeigte sich, eine deutliche Expression von PTGER1 Rezeptoren im menschlichen Harntrakt und eine eventuell damit verbundene Therapieoption, durch Verwendung eines PTGER1-Rezeptor-Antagonisten, in der Behandlung von Urolithiasis bedingten Schmerzen und eine Möglichkeit das Behandlungsspektrum der COX-Inhibitoren zu ergänzen und damit verbundene Nebenwirkungen zu reduzieren.

3. Publikation

Oll et al. *BMC Urology* 2012, **12**:35
<http://www.biomedcentral.com/1471-2490/12/35>



RESEARCH ARTICLE

Open Access

Identification of prostaglandin receptors in human ureters

Matthias Oll¹, Claudia Baumann¹, Turang E Behbahani¹, Alexander von Ruecker^{2,3}, Stefan C Müller¹ and Jörg Ellinger^{1,4*}

Abstract

Background: Prostaglandins play an important role in ureteral obstruction, but the detailed expression profiles of the prostaglandin receptors (PTGER1, PTGER2, PTGER3, PTGER4, PTGFR) remain unknown in the different parts of the human ureter.

Methods: The expression pattern of PTGER1, PTGER2, PTGER3, PTGER4 and PTGFR was determined in human distal, mid and proximal ureter and renal pelvis samples using immunohistochemistry (protein levels) and quantitative real-time PCR (mRNA).

Results: PTGER1 was highly expressed in most samples irrespective of the ureteral localization; however, urothelial cells had higher levels of PTGER1 than smooth muscle cells. PTGFR was also moderately to strongly expressed in urothelial and smooth muscle cells. In comparison, PTGER2-4 expression was mostly unexpressed or weakly expressed in urothelial and smooth cells in all regions.

Conclusions: Our data indicate high levels of PTGER1 in ureters.

Keywords: Prostaglandin receptor, PTGER1, EP1, Ureter, Cyclooxygenase

Background

Inhibition of cyclooxygenase (COX) activity and the concurrent reduction of prostaglandin synthesis via non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are reported to reduce pain, pressure and ureteral contractility in patients experiencing ureteric colic or obstruction [1]. The synthesis of prostaglandins in patients with obstructed ureters contributes to alterations in renal hemodynamic function during ureteral obstruction, thus recent studies indicate NSAIDs to be beneficial in these patients. Especially COX2 mRNA has been shown to be upregulated in obstructed ureters and represents a valuable pharmaceutical target in patients with urolithiasis [2]. Potential toxic side effects of COX inhibitors include a decrease in renal perfusion, inhibition of platelet aggregation and gastric ulcerations. Beside COX-inhibitors, prostanoids (PG) represent an estimable physiological

target in obstructed ureters: Granting that PGs constitute a heterogeneous group, PGF_{2a} (prostaglandin F_{2a}) and PGD₂ (prostaglandin D₂) cause ureteral contractility, PGE₂ (prostaglandin E₂) acts condition-dependent via four receptor subtypes (PTGER1-4) while PTGER1 (prostaglandin E receptor 1; alias EP1) and PTGER3 (prostaglandin E receptor 3; EP3) induce smooth-muscle contractility and PTGER2 (prostaglandin E receptor 2; EP2) and PTGER4 (prostaglandin E receptor 4; EP4) contribute to smooth muscle relaxation. PGE₂-receptors represent G-protein coupled receptors which act via different signal transduction pathways: cAMP stimulation via G_q (PTGER2 and PTGER4), cAMP inhibition via G_i (PTGER3) or activation via phosphatidylinositol hydrolysis (PTGER1) [3]. The existence of PGE₂-receptor subtypes has been verified in numerous animal models [1], yet the distribution of PGE₂ receptors in the human urinary tract is not sufficiently examined. The impact of PTGER2 and PTGER3 is subject to further present studies, investigating the suppression of cytokine production [4] and the modulation of bone-related diseases [5]. Our study investigates the expression profiles of PTGER1-4

* Correspondence: joerg.ellinger@ukb.uni-bonn.de

¹Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie, Universitätsklinikum Bonn, Bonn, Germany

⁴Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie, Universitätsklinikum Bonn, Sigmund-Freud-Strasse 25, 53105, Bonn, Germany

Full list of author information is available at the end of the article



and PTGER (prostaglandin F2 alpha receptor) in urothelial and smooth muscle cells in the renal pelvis, proximal, mid and distal human ureter. High expression profiles of PTGER1 and PTGER3 in obstructed ureters could contribute to new treatment approaches, complementing the therapy of urolithiasis as an alternative to the widespread use of COX inhibitors to provide superior efficacy while minimizing potential side effects of current therapy strategies.

Methods

Tissue samples

Tissue samples were obtained from 17 patients with malignant kidney tumors (renal cell carcinoma and urothelial cell carcinoma of the renal pelvis) and 6 patients with non-malignant disease undergoing nephroureterectomy for hydronephrotic kidney (chronic pyelonephritis, n=1; vesicoureteral reflux, n=2; obstructive megaureter, n=1; ureteropelvic junction obstruction, n=1; unknown etiology, n=1). Separate samples from the proximal ureter, mid ureter, distal ureter and renal pelvis of the above mentioned patients were embedded in paraffin after formalin-fixation (FFPE). Ureter samples from 3 patients were archived as fresh-frozen (FF) tissue and stored at -80°C . All tissue samples were collected within the framework of the Biobank at the Universitätsklinikum Bonn. All patients gave written informed consent prior to the collection of tissues. This study has been approved by the ethical committee of the University of Bonn, Germany (approval number 036/08).

Immunohistochemistry

FFPE tissues were deparaffinized with xylol/ethanol and rehydrated; FF sections were warmed up at room temperature and rehydrated. The slides were then placed in citrate buffer (pH 5.0-6.0) for optimal labeling and cooked in a microwave for 20 minutes at 600 W. After cooling for 30 minutes, the slides were rehydrated, incubated in hydrogen peroxide for 10 minutes to block the peroxidase and washed with Tris-buffered saline with Tween (0.01% Tween 20, pH 7.6). The antibodies (PTGER1: Cayman, #101740, dilution 1:100; PTGER2: Sigma-Aldrich, #P7747, 1:500; PTGER3: Sigma-Aldrich, #HPA010689, 1:80; PTGER4: Sigma-Aldrich, #HPA012756, 1:100; PTGFR: Sigma-Aldrich, #NLS3890, 1:200; IgG: Dako, # P8622) were solved in Antibody Diluent (Dako, # K6008) and incubated overnight at 4°C . The slides were then washed with Tris-buffered saline with Tween. Afterwards, the EnVision Kit (Dako, #K4003) was used for visualization. Counterstaining was performed with haematoxylin. Staining was evaluated by a single investigator (M.O.). Human benign uterus was used as negative and kidney as positive control. In preliminary experiments, we have also investigated the

expression pattern of target proteins in bladder, renal, ovary, colon and liver tissue (data not shown). The staining patterns were analogous to literature descriptions.

Quantitative Real-Time PCR

RNA was isolated from FFPE and FF tissue of the renal pelvis, proximal ureter, mid ureter and distal ureter using the RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE (Ambion, Foster City, CA, USA) according to the manufacturers recommendations. We did not perform laser microdissection for separate analysis of urotheliale and muscle cells because of the low amount of tissue. Reverse transcription was performed using the SuperScript III Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and quantitative real-time PCR was performed using the SYBR GreenER Kit (Invitrogen); primer sequences are listed in Table 1. Each plate included a positive (kidney tissue) and negative control (uterus) and a water blank. PCR experiments were done with an ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Statistical analysis

All statistical tests were performed using IBM SPSS Statistics v20. The chi-square test was used to compare protein expression levels in urothelial and smooth muscle cells, and different parts of the human ureter respectively. The Friedman-test for paired-samples was applied to compare protein expression levels in different ureter samples. Statistical significance was concluded at $p < 0.05$.

Results

Immunohistochemistry

Initially, we compared immunohistochemical staining of FF and FFPE tissue. The evaluation of FF tissue staining results was limited due to the fact that urothelial cells detached from muscle tissue. Thus, we restricted the analysis below to FFPE tissue. It should be noted that staining results of muscle cells were similar in FF and FFPE tissues.

We observed cytoplasmic expression of PTGER1-4 and PTGFR (see Figure 1). The target proteins were

Table 1 Primer sequences

Gene	Forward primer	Reverse primer
GAPDH	CCCCGGTTTCTATAAATTGAGC	CACCTTCCCCATGGTGTCT
ACTB	CCAACCCGAGAGAAGATGA	CCAGAGGCCGTACAGGGATAG
PTGER1	ATGGTGGTGTCTGCATCT	CGCTGCAGGGAGGTAGAG
PTGER2	CCACCTCATTCTCTGGCTA	AGGTCCCATTTTCTCTTCG
PTGER3	ATCATGTGCGTGTGTCTCG	TGCAGTGTCTCAACTGATGTCT
PTGER4	CTCCCTGGTGGTGTCTCAT	GGCTGATATACTGGTTGACGA
PTGFR	GGGATCTACAGCCAGACCAG	GTGTCTATGTCTCTCAACCG

detected in all cells at homogenous intensity within a given sample, and therefore protein expression was scored negative, low, moderate or high in a sample. We did not notice expression differences in obstructed and non-obstructed ureter tissues ($p > 0.28$, Mann–Whitney–U-test). The expression of each target protein was markedly different in the ureters (see Figure 2), and also the expression level of the proteins was different in the various parts of the ureter and renal pelvis (Friedman-test: $p < 0.001$; see Additional file 1: Table S1 for expression profiles in the different samples):

- *PTGER1* was expressed in most samples, but expression was increased in urothelial compared to smooth muscle cells. Most samples demonstrated high *PTGER1* expression levels in urothelial cells, whereas muscle cells were expressing *PTGER1* at moderate levels. Further analysis of *PTGER1* expression profiles depicted comparable expression profiles in the renal pelvis, as well as the lower, mid and proximal ureter.
- *PTGER2* expression was less prevalent: Urothelial cells demonstrated limited staining, irrespective of the localization in the examined ureter. In comparison,

PTGER2 expression profiles showed weak staining of muscle cells in 15-20% of the ureter samples. *PTGER2* expression was shown to be undetected in muscle cells located in the renal pelvis.

- *PTGER3* was rarely detected in urothelial cells (10%) of the renal pelvis and the distal and proximal ureter. In comparison, *PTGER3* was more prevalent in the smooth muscle cells, with different expression profiles, depending on the ureter localization: Expression profiles were lower in the upper parts of the examined ureters. In total, 62% of the distal ureter, 80% of the mid ureter, 46% of the proximal ureter and 23% of the renal pelvis samples expressed *PTGER3* at low or moderate levels.

- *PTGER4* expression was low, and detected more frequently in urothelial cells than in muscle cells. Only 13% of distal ureter muscle cells were expressing *PTGER4* at low levels. *PTGER4* expression was also low in urothelial cells, but detected in the distal ureter (23%), mid ureter (14%), proximal ureter (33%) and renal pelvis (31%).
- *PTGFR* expression was detected in most of the ureter samples: Less than 15% of the samples had undetectable *PTGFR* levels. The expression of *PTGFR* was similar in urothelial and smooth muscle cells.

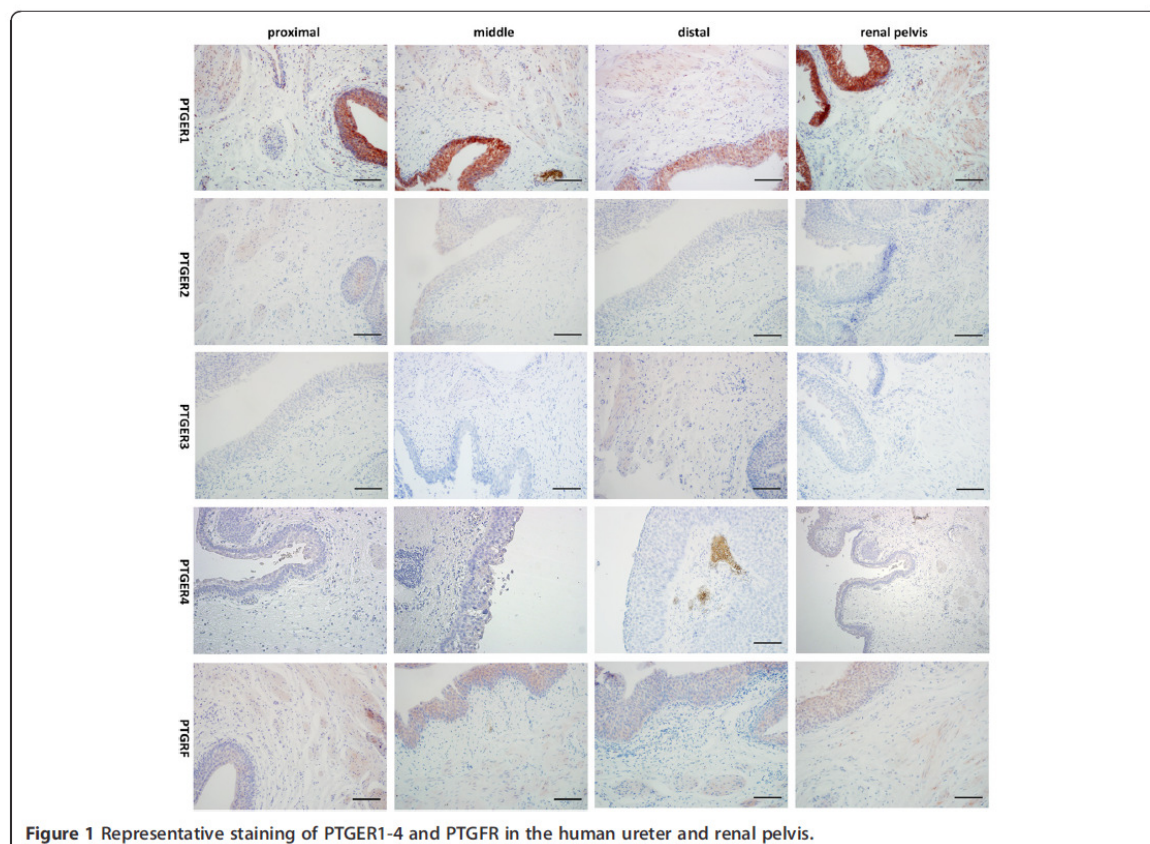
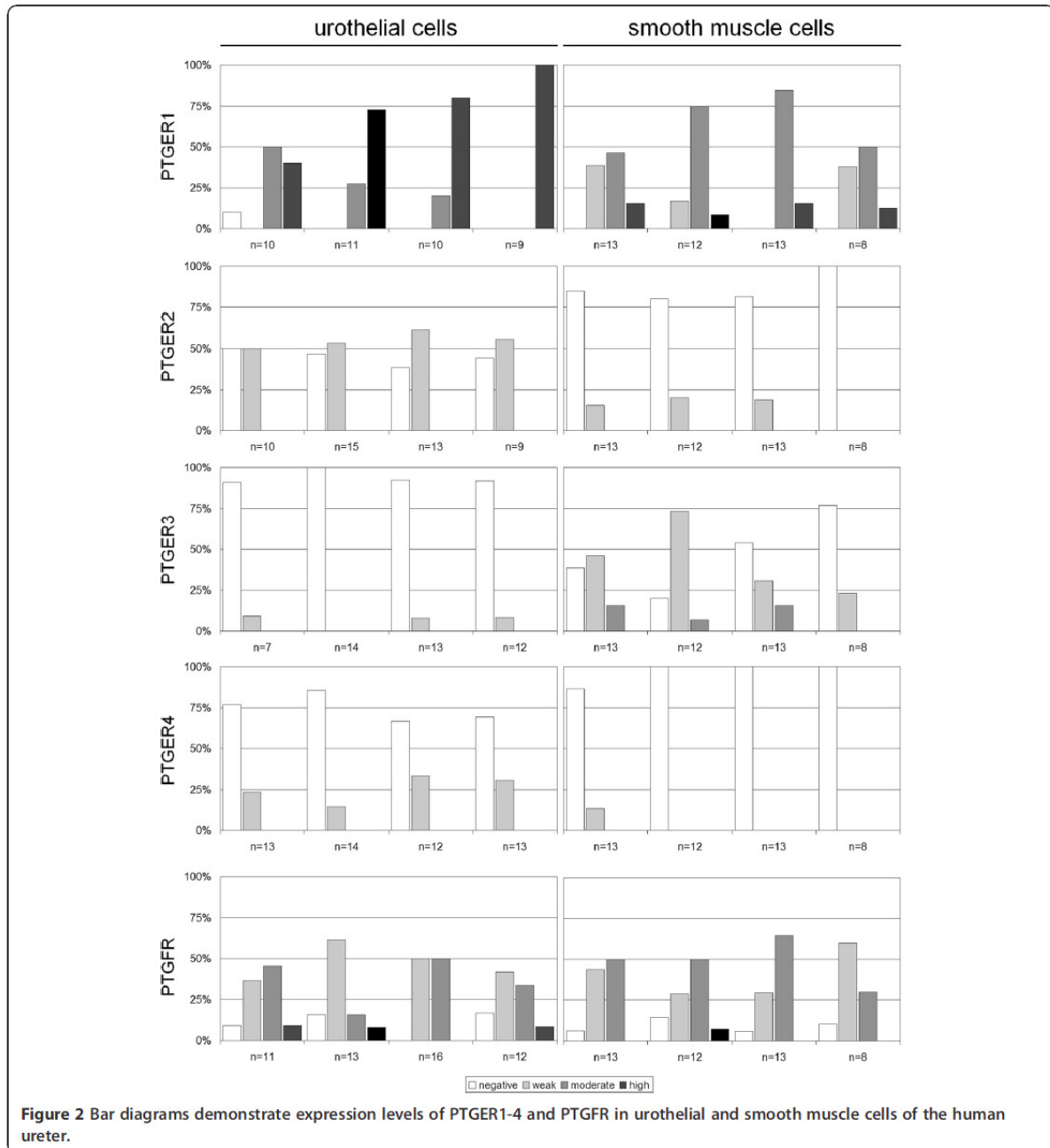


Figure 1 Representative staining of PTGER1-4 and PTGFR in the human ureter and renal pelvis.



Real-Time PCR

We next investigated the expression profiles of PTGER1-4 and PTGFR mRNA in ureter tissue. We first tried to examine mRNA in FFPE materials. Most probably due to the low amount of available material and the consequences of formalin-fixation, the amount and quality of RNA was not sufficient for PCR experiments: We did neither detect any target gene nor the reference genes ACTB and GAPDH in

the ureter tissue. We therefore used FF tissue for PCR. Again, the low amount of each tissue impeded the mRNA quantification: the expression levels of the target genes were only marginal above the quantification limit (C_q values 30 to 32); the stability values for ACTB and GAPDH were 0,538 (as determined using the DataAssist software). All three samples had detectable amounts of PTGER1-4 and PTGFR mRNA. But, mRNA and protein levels (detected by

immunohistochemistry in adjacent FF tissue) were not correlated (all $p > 0.3$). Small amount of mRNA were even detected in samples without traceable corresponding protein. See Table 2.

Discussion

The analysis of prostaglandin receptor expression profiles in obstructed human ureters plays an important role in the attempt to implement new therapy strategies with better efficiency and reduced side effects in comparison to current standards. Previous studies have already documented the role and significance of prostaglandin receptors in animal models [1], leaving the need to analyze distribution profiles in the human urinary tract. By now, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are widespread used against acute pain. Especially COX2 has been demonstrated to show an increased expression in obstructed ureters and represents a valuable target for selective COX2 inhibitors, such as parecoxib [1]. Selective and non-selective COX-inhibitors have many side effects such as gastrointestinal side effects and a promotion of bleeding [6]. NSAIDs are also under suspicion to cause renal dysfunction, such as salt and fluid retention and hypertension [7]. Even acute renal failure is a possible adverse reaction [8]. In the view of potential side effects, recent studies have demonstrated the effect of PGE2 on obstructed ureters: Lowry et al. showed that PGE2 increases contractility in obstructed ureters and relaxes non-obstructed ureters [9]. The demonstrated condition-dependence of PGE2 receptors might be contributed to its various subtypes [10]: While Regan et al. [11] report that PTGER2 and PTGER4 subtypes relax smooth-muscle contractility, Neves et al. [12] showed a

contractile effect, mediated by PTGER1 and PTGER3. Our study demonstrates high expression profiles of PTGER1 in urothelial cells of the renal pelvis (100%) as well as the proximal ureter (80%) decreasing rates to the distal part of the ureter. Accordingly, smooth muscle cells showed moderate to high expression profiles of PTGER1, especially in the proximal part of ureters (85%). So far, PTGER1 expression profiles have sufficiently been examined for bladder urothelial cells [13]. Ikeda et al. state that PTGER1 receptors in the urothelium of the bladder may facilitate the inflammation-induced micturition reflex via primary nerve activity [13]. On the other hand Johansson et al. were recently able to demonstrate the significant contribution of PTGER1 receptors to inflammation induced pain [14]. Interestingly, PTGER1 receptors play an important role in resolving inflammation through down-regulation of COX2 [15]. This aspect, along with strong expression profiles of PTGER1 in our study, underlines the need to introduce a selective PTGER1 antagonist complementary to the use of COX2 inhibitors.

PTGER1 receptor antagonists have been shown to have an excellent profile in inflammatory models [16]. So far, the activation of PTGER1 has been shown to specifically activate the action of aldosterone on epithelial sodium channels expression in the renal medulla [17]. Concurrently, Ankem et al. [10] indicate that the PTGER3 subtype of the PGE2 receptor is involved in hypercontractility during ureteral obstruction. However, the authors conclude that PTGER3 is not the sole factor contributing to the condition dependency of prostaglandin receptors. Our study shows consistent results with weak to moderate expression profiles of PTGER3 in smooth muscle cells of the proximal, mid and

Table 2 Comparison of prostaglandin receptors' mRNA and protein levels in different ureteral locations

	PTGER1		PTGER2		PTGER3		PTGER4		PTGER	
	PCR	IHC	PCR	IHC	PCR	IHC	PCR	IHC	PCR	IHC
A-distal	1.00	+++	1.00	++	1.00	-	1.00	+	1.00	+++
A-middle	1.44	++	0.31	+	0.37	+++	1.27	-	0.34	++
A-proximal	3.15	+++	0.62	+	0.42	-	1.09	+	0.64	++
A-renal pelvis	2.73	++	0.55	-	0.36	⊖	1.63	⊖	0.55	⊖
B-distal	0.61	++	0.14	++	0.69	++	0.67	-	0.31	+
B-middle	0.41	++	0.22	++	0.95	++	0.87	-	0.31	++
B-proximal	0.21	++	0.20	+	1.04	++	0.83	-	0.30	+++
B-renal pelvis	1.09	++	0.30	+	0.76	+	1.00	⊖	0.33	⊖
C-distal	1.28	+++	0.46	++	0.73	++	0.81	-	0.59	+++
C-proximal	1.11	++	0.36	++	1.23	++	0.84	-	0.64	++
C-renal pelvis	3.51	+	0.29	+	2.14	+	1.80	⊖	0.49	⊖

Note: Sample A: pyelonephritis, non-obstructed; Sample B: hydronephrotic kidney, non-obstructed; Sample C: renal cell carcinoma, non-obstructed
Abbreviations: - = -; + = +; ++ = ++; +++ = +++; ⊖ = tissue not available.

distal ureter, as well as negative expression in urothelial cells. PTGER3 receptors may function via cAMP response elements (CRE) [18] and have been shown to be useful targets for anti-inflammatory therapy in cutaneous inflammation [19]. In contrast, PTGER2 and PTGER4 subtypes showed negative to weak expression profiles in urothelial as well as smooth muscle cells.

Some limitations of our study need to be discussed: upper urinary tract tissue samples were obtained from patients with different pathologies (cancer, chronic pyelonephritis, vesicoureteral reflux, obstructive megaureter, ureteropelvic junction obstruction) and obstructive and non-obstructive ureters. Associated chronic inflammatory states - although excessive infiltration of tissues with leukocytes was not seen - altering prostaglandin receptor expression patterns may influence the results. Furthermore, PCR experiments were hindered by RNA degradation, and data interpretation has to be done with caution. It has to be mentioned that the collection of large numbers of urinary tract samples with an homogenous clinic is difficult; a larger cohort might demonstrate differences of prostaglandin receptor expression in obstructive and non-obstructive ureters.

Conclusions

High expression levels of PTGER1 in obstructed ureters support rational drug development, as e.g. EP3 antagonists, to complement the treatment of patients with urolithiasis as an alternative to the widespread and unselective use of COX2 inhibitors to provide superior efficiency while minimizing potential side effects.

Additional file

Additional file 1: Table S1. Overview of prostaglandin receptor expression in individual ureter samples.

Competing interests

The study was supported by an grant from Astellas Pharmaceuticals (Leiderdorp, Netherlands).

Authors' contributions

MO carried out the experiments. The manuscript was written by MO, CB, TEB and JE. MO and JE performed the statistical analyses. SCM, AR and JE participated in the study design. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank Dr. Frank Perabo and Dr. Cees Korstanje (Astellas Pharmaceuticals, Leiderdorp) for their helpful comments on study design and manuscript preparation. We thank Mrs. Doris Schmidt for excellent technical assistance.

Author details

¹Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie, Universitätsklinikum Bonn, Bonn, Germany. ²Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Bonn, Bonn, Germany. ³Hämatookologie, MVZ Labormedizin, Cologne, Germany. ⁴Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie, Universitätsklinikum Bonn, Sigmund-Freud-Strasse 25, 53105, Bonn, Germany.

Received: 15 October 2012 Accepted: 7 December 2012
Published: 10 December 2012

References

- Nørregaard R, Jensen BL, Topcu SO, Nielsen SS, Walter S, Djurhuus JC, Frøkiær J: Cyclooxygenase type 2 is increased in obstructed rat and human ureter and contributes to pelvic pressure increase after obstruction. *Kidney Int* 2006, **70**(5):872-881.
- Chaignat V, Danuser H, Stoffel MH, Z'brun S, Studer UE, Mevissen M: Effects of a non-selective COX inhibitor and selective COX-2 inhibitors on contractility of human and porcine ureters in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 2008, **154**(6):1297-1307.
- Breyer MD, Jacobson HR, Breyer RM: Functional and molecular aspects of renal prostaglandin receptors. *J Am Soc Nephrol* 1996, **7**(1):8-17.
- Ueta M, Matsuoka T, Yokoi N, Kinoshita S: Prostaglandin E2 suppresses polyinosine-polycytidylic acid (polyI:C)-stimulated cytokine production via prostaglandin E2 receptor (EP) 2 and 3 in human conjunctival epithelial cells. *Br J Ophthalmol* 2011, **95**(6):859-863.
- Noh AL, Yang M, Lee JM, Park H, Lee DS, Yim M: Phosphodiesterase 3 and 4 negatively regulate receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand-mediated osteoclast formation by prostaglandin E2. *Biol Pharm Bull* 2009, **32**(11):1844-1848.
- Labianca R, Sarzi-Puttini P, Zuccaro SM, Cherubino P, Vellucci R, Fornasari D: Adverse effects associated with non-opioid and opioid treatment in patients with chronic pain. *Clin Drug Investig* 2012, **32**(Suppl 1):53-63.
- Bao H, Ge Y, Zhuang S, Dworkin LD, Liu Z, Gong R: Inhibition of glycogen synthase kinase-3beta prevents NSAID-induced acute kidney injury. *Kidney Int* 2012, **81**(7):662-673.
- Musu M, Finco G, Antonucci R, Polati E, Sanna D, Evangelista M, Ribuffo D, Schweiger V, Fanos V: Acute nephrotoxicity of NSAID from the foetus to the adult. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2011, **15**(12):1461-1472.
- Lowry PS, Jerde TJ, Bjorling DE, Maskell JL, Nakada SY: Obstruction alters the effect of prostaglandin E2 on ureteral contractility. *J Endourol* 2005, **19**(2):183-187.
- Ankem MK, Jerde TJ, Wilkinson ER, Nakada SY: Third prize: Prostaglandin E(2)-3 receptor is involved in ureteral contractility in obstruction. *J Endourol* 2005, **19**(9):1088-1091.
- Regan JW, Bailey TJ, Pepperl DJ, Pierce KL, Bogardus AM, Donello JE, Fairbairn CE, Kedzie KM, Woodward DF, Gil DW: Cloning of a novel human prostaglandin receptor with characteristics of the pharmacologically defined EP2 subtype. *Mol Pharmacol* 1994, **46**:213-220.
- Funk CD, Furci L, Fitzgerald GA, Grygorczyk R, Rochette C, Bayne MA, Abramovitz M, Adam M, Metters KM: Cloning and expression of a cDNA for the human prostaglandin E receptor EP1 subtype. *J Biol Chem* 1993, **268**:26767-26772.
- Wang X, Momota Y, Yanase H, Narumiya S, Maruyama T, Kawatani M: Urothelium EP1 receptor facilitates the micturition reflex in mice. *Biomed Res* 2008, **29**(2):105-111.
- Johansson T, Narumiya S, Zeilhofer HU: Contribution of peripheral versus central EP1 prostaglandin receptors to inflammatory pain. *Neurosci Lett* 2011, **495**(2):98-101.
- Haddad A, Flint-Ashtamker G, Minzel W, Sood R, Rimon G, Barki-Harrington L: Prostaglandin EP1 Receptor Down-regulates Expression of Cyclooxygenase-2 by Facilitating Its Proteasomal Degradation. *J Biol Chem* 2012, **287**(21):17214-17223.
- Giblin GM, Bit RA, Brown SH, Chaignot HM, Chowdhury A, Chessell IP, Clayton NM, Coleman T, Hall A, Hammond B, Hurst DN, Michel AD, Naylor A, Novelli DR, Coccitti T, Spalding D, Tang SP, Wilson AW, Wilson R: The discovery of 6-[2-(5-chloro-2-[[[2,4-difluorophenyl]methyl]oxy]phenyl)-1-cyclopenten-1-yl]-2-pyridinecarboxylic acid, GW48687X, a potent and selective prostaglandin EP1 receptor antagonist for the treatment of inflammatory pain. *Bioorg Med Chem Lett* 2007, **17**(2):385-389.
- González AA, Céspedes C, Villanueva S, Michea L, Vio CP: E Prostanoid-1 receptor regulates renal medullary alphaENaC in rats infused with angiotensin II. *Biochem Biophys Res Commun* 2009, **389**(2):372-377.
- Audoly LP, Ma L, Feoktistov I, de Foe SK, Breyer MD, Breyer RM: Prostaglandin E-prostanoid-3 receptor activation of cyclic AMP response element-mediated gene transcription. *J Pharmacol Exp Ther* 1999, **289**(1):140-148.
- Goulet JL, Pace AJ, Key ML, Byrum RS, Nguyen M, Tilley SL, Morham SG, Langenbach R, Stock JL, McNeish JD, Smithies O, Coffman TM, Koller BH: E-prostanoid-3 receptors mediate the proinflammatory actions of prostaglandin E2 in acute cutaneous inflammation. *J Immunol* 2004, **173**(2):1321-1326.

doi:10.1186/1471-2490-12-35

Cite this article as: Oll et al.: Identification of prostaglandin receptors in human ureters. *BMC Urology* 2012 **12**:35.

4. Literaturverzeichnis der Zusammenfassung

Ankem MK, Jerde TJ, Wilkinson ER, Nakada SY. Third prize: Prostaglandin E(2)-3 receptor is involved in ureteral contractility in obstruction. *J Endourol* 2005; 19: 1088-1091

Audoly LP, Ma L, Feoktistov I, de Foe SK, Breyer MD, Breyer RM. Prostaglandin E-prostanoid-3 receptor activation of cyclic AMP response element-mediated gene transcription. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 289: 140-148

Bao H, Ge Y, Zhuang S, Dworkin LD, Liu Z, Gong R. Inhibition of glycogen synthase kinase-3beta prevents NSAID-induced acute kidney injury. *Kidney Int* 2012; 81: 662-673

Breyer MD, Jacobson HR, Breyer RM. Functional and molecular aspects of renal prostaglandin receptors. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7: 8-17

Chaignat V, Danuser H, Stoffel MH, Z'brun S, Studer UE, Mevissen M. Effects of a non-selective COX inhibitor and selective COX-2 inhibitors on contractility of human and porcine ureters in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol*. 2008; 154: 1297-1307

Funk CD, Furci L, Fitzgerald GA, Grygorczyk R, Rochette C, Bayne MA, Abramovitz M, Adam M, Metters KM. Cloning and expression of a cDNA for the human prostaglandin E receptor EP1 subtype. *J Biol Chem* 1993; 268: 26767-26772

González AA, Céspedes C, Villanueva S, Michea L, Vio CP. E Prostanoid-1 receptor regulates renal medullary alphaENaC in rats infused with angiotensin II. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 389: 372-377

Goulet JL, Pace AJ, Key ML, Byrum RS, Nguyen M, Tilley SL, Morham SG, Langenbach R, Stock JL, McNeish JD, Smithies O, Coffman TM, Koller BH. E-prostanoid-3 receptors

mediate the proinflammatory actions of prostaglandin E2 in acute cutaneous inflammation. *J Immunol* 2004; 1: 1321-1326

Haddad A, Flint-Ashtamker G, Minzel W, Sood R, Rimon G, Barki-Harrington L. Prostaglandin EP1 Receptor Down-regulates Expression of Cyclooxygenase-2 by Facilitating Its Proteasomal Degradation. *J Biol Chem* 2012, 287: 17214-17223.

Giblin GM, Bit RA, Brown SH, Chaignot HM, Chowdhury A, Chessell IP, Clayton NM, Coleman T, Hall A, Hammond B, Hurst DN, Michel AD, Naylor A, Novelli DR, Coccitti T, Spalding D, Tang SP, Wilson AW, Wilson R. The discovery of 6-[2-(5-chloro-2-[(2,4-difluorophenyl)methyl]oxy}phenyl)-1-cyclopenten-1-yl]-2-pyridinecarboxylic acid, GW848687X, a potent and selective prostaglandin EP1 receptor antagonist for the treatment of inflammatory pain. *Bioorg Med Chem Lett* 2007; 17: 385-389

Johansson T, Narumiya S, Zeilhofer HU. Contribution of peripheral versus central EP1 prostaglandin receptors to inflammatory pain. *Neurosci Lett* 2011; 495: 98-101

Labianca R, Sarzi-Puttini P, Zuccaro SM, Cherubino P, Vellucci R, Fornasari D. Adverse effects associated with non-opioid and opioid treatment in patients with chronic pain. *Clin Drug Investig* 2012; 32 Suppl 1: 53-63

Lowry PS, Jerde TJ, Bjorling DE, Maskel JL, Nakada SY. Obstruction alters the effect of prostaglandin E2 on ureteral contractility. *J Endourol* 2005; 19: 183-187

Musu M, Finco G, Antonucci R, Polati E, Sanna D, Evangelista M, Ribuffo D, Schweiger V, Fanos V. Acute nephrotoxicity of NSAID from the foetus to the adult. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2011; 15: 1461-1472

Noh AL, Yang M, Lee JM, Park H, Lee DS, Yim M. Phosphodiesterase 3 and 4 negatively regulate receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand-mediated osteoclast formation by prostaglandin E2. *Biol Pharm Bull* 2009; 32: 1844-1848

Nørregaard R, Jensen BL, Topcu SO, Nielsen SS, Walter S, Djurhuus JC, Frøkiaer J. Cyclooxygenase type 2 is increased in obstructed rat and human ureter and contributes to pelvic pressure increase after obstruction. *Kidney Int.* 2006; 70: 872-881

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

Ueta M, Matsuoka T, Yokoi N, Kinoshita S. Prostaglandin E2 suppresses polyinosine-polycytidylic acid (polyI:C)-stimulated cytokine production via prostaglandin E2 receptor (EP) 2 and 3 in human conjunctival epithelial cells. *Br J Ophthalmol* 2011; 95: 859-863

Wang X, Momota Y, Yanase H, Narumiya S, Maruyama T, Kawatani M. Urothelium EP1 receptor facilitates the micturition reflex in mice. *Biomed Res* 2008; 29:105-111

5. Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Allen, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben:

- Prof. Dr. med. Dr. h. c. Stefan C. Müller für das zur Verfügung gestellte Labor seiner Klinik
- Priv.-Doz. Dr. med. Ellinger für die Überlassung eines interessanten Themas und Unterstützung bei der Entstehung dieser Arbeit, seinem enormen Zeiteinsatz und der hervorragenden Betreuung
- Doris Schmidt für ihre geduldige und intensive Einweisung in die Handlungsabläufe und praktischen Fertigkeiten und für jegliche Hilfestellungen in jedem Stadium der Arbeit

6. Lebenslauf

Persönliche Daten

Matthias Oll
geb. am 27.04.1982 in Bad Frankenhausen
ledig

Schulbildung

1988-1992
1992-2001
Grundschule Roßleben
Gymnasium "Klosterschule" Roßleben

Zivildienst

08/2001-07/2002
Rastenberg
Kinder- und Jugendhilfe "Stiftung Finneck",

Berufsbildung/-tätigkeit

08/2002-06/2004
06/2002-09/2006
Ausbildung zum Automobilkaufmann
Automobilkaufmann Autohaus Ender, Meiningen

Hochschulstudium

2006-2013
2009
seit 08/2012
26.11.2013
05.12.2013
Studium der Humanmedizin
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Praktisches Jahr Uniklinik Bonn
1. Tertial: Chirurgie, Prof. Dr. J.C. Kalff
2. Tertial: Radiologie, Prof. Dr. H.H. Schild
3. Tertial: Innere Medizin, Prof. Dr. C. Strassburg
Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Approbation

Publikation

2012
"Identification of prostaglandin receptors in human ureters."
BMC Urology 2012, doi:10.1186/1471-2490-12-35
Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie, Bonn
Prof. Dr. Dr. S.C. Müller, PD Dr. med. J. Ellinger