

**Charakterisierung unterschiedlicher Signal- und Stoffwechselwege in
humanen Atemwegsfibroblasten im Hinblick auf ihre Beteiligung an der
Regulation der Proliferation und der Kollagensynthese**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Vorgelegt von

Susanne Dorotheé Haag

aus

Bernkastel-Kues

Bonn 2009

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Kurt Racké
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Klaus Mohr

Tag der mündlichen Prüfung: 08.12.2009

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulserver der ULB Bonn unter http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert

Erscheinungsjahr 2010

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
I EINLEITUNG	- 1 -
1 Remodelingprozesse bei chronischen Erkrankungen der Atemwege	- 3 -
1.1 <i>Asthma bronchiale</i> und COPD	- 3 -
1.2 Remodelingprozesse in der Lunge	- 4 -
1.3 Aufbau und Bedeutung der Extrazellulärmatrix	- 6 -
1.4 Die Rolle von Atemwegsfibroblasten im Remodelinggeschehen	- 8 -
1.4.1 Fibroblasten	- 8 -
1.4.2 Myofibroblasten	- 9 -
2 Funktion und Lokalisation der Arginase unter besonderer Berücksichtigung der Atemwege	- 10 -
2.1 Arginase und Polyaminsynthese	- 12 -
2.2 Arginase und Kollagensynthese	- 13 -
2.3 Regulation der Arginaseisoformen durch Zytokine und Wachstumsfaktoren	- 14 -
3 Das Cholinerge System der Atemwege und die Bedeutung von Muskarinrezeptorantagonisten in der Therapie chronisch-obstruktiver Atemwegserkrankungen	- 16 -
3.1 Das cholinerge System der Atemwege	- 16 -
3.1.1 Nikotinische Acetylcholinrezeptoren	- 17 -
3.1.2 Muskarinische Acetylcholinrezeptoren	- 17 -
3.2 Muskarinrezeptorantagonisten in der Therapie chronischer Atemwegserkrankungen	- 19 -
3.3 Beteiligung von Muskarinrezeptoren am Remodelinggeschehen	- 21 -
4 Die Bedeutung erhöhter cAMP-Spiegel nach Rezeptoraktivierung in Atemwegsfibroblasten	- 23 -
4.1 cAMP-vermittelte Signalwege	- 23 -
4.1.1 PKA	- 25 -
4.1.2 Epac	- 26 -
4.2 Mögliche therapeutische Effekte einer rezeptorvermittelten Aktivierung der Adenylylcyclase in Lungenfibroblasten unter besonderer Berücksichtigung der EP2-Rezeptoren	- 29 -

II	ZIELSETZUNG	- 32 -
III	MATERIAL UND METHODEN	- 35 -
1	Material	- 35 -
1.1	Arbeitsgeräte	- 35 -
1.2	Verbrauchsmaterialien	- 36 -
1.3	Enzyme	- 36 -
1.4	Größenmarker und Nukleinsäuren	- 36 -
1.5	Kits für die Molekularbiologie	- 37 -
1.6	Chemikalien	- 37 -
1.7	Radiochemikalien	- 39 -
1.8	Nährmedien	- 39 -
1.9	Testsubstanzen	- 40 -
1.10	Antikörper und Primer	- 41 -
1.10.1	Primärantikörper	- 41 -
1.10.2	Sekundärantikörper	- 41 -
1.10.3	Primer für die semiquantitative PCR	- 42 -
1.10.4	Primer für die quantitative Real-Time PCR	- 43 -
1.11	Software	- 43 -
2	Methoden	- 44 -
2.1	Zellkultur	- 44 -
2.1.1	Präparation und Kultur der primären humanen Lungenfibroblasten	- 44 -
2.1.2	Kultur der humanen Fibroblastenzelllinien	- 45 -
2.2	Arginaseassay	- 46 -
2.3	Assays mit radioaktiv markierten Bausteinen	- 48 -
2.3.1	³ [H]-Thymidin-Inkorporationsassay	- 48 -
2.3.2	³ [H]-Prolin-Inkorporationsassay	- 49 -
2.4	mRNA Expressionsanalyse	- 51 -
2.4.1	RNA-Präparationen (mit DNase-Verdau)	- 51 -
2.4.2	Konzentrationsbestimmung der RNA	- 51 -
2.4.3	Reverse Transkription	- 52 -
2.4.4	Polymerase-Kettenreaktion	- 52 -
2.4.4.1	Semiquantitative PCR	- 52 -
2.4.4.2	Real-Time PCR	- 53 -
2.4.5	Agarose-Gelelektrophorese	- 54 -
2.5	Isolierung genomischer DNA	- 55 -
2.6	Arbeiten mit Proteinen	- 56 -
2.6.1	Rap1-Aktivierungsassay	- 56 -
2.6.2	Kernproteinpräparation	- 57 -
2.6.3	Nicht-selektive Proteinpräparation	- 58 -
2.6.4	Kollagenaseverdau	- 59 -

2.6.5	Proteinkonzentrationsmessung nach Lowry	- 59 -
2.6.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	- 60 -
2.6.7	Western Blot	- 62 -
2.6.8	Strippen bereits detektierter Membranen	- 63 -
2.7	Transfektionsversuche mit siRNA mittels Lipofektion	- 64 -
2.8	Statistische Auswertung	- 66 -
IV	ERGEBNISSE	- 67 -
1	Bedeutung der Arginase I und II bei fibrotischen Prozessen in humanen Lungenfibroblasten	- 67 -
1.1	Expression und Aktivität der Arginase I und II	- 67 -
1.2	Einfluss von IL-4 und IL-13 auf die Expression und Aktivität der Arginase I und II	- 69 -
1.3	Expression der Ornithindecaboxylase und Ornithinaminotransferase	- 70 -
1.4	Einfluss der Arginase(aktivität) auf die Kollagen I-Synthese	- 71 -
1.5	Beeinflussung der Arginaseexpression durch PDGF und Auswirkung auf die Proliferation	- 73 -
2	Effekte von Muskarinrezeptoragonisten und -antagonisten auf die Kollagensynthese in humanen Lungenfibroblasten	- 77 -
2.1	Expression der Muskarinrezeptoren M1-M5	- 77 -
2.2	Etablierung des [³ H]-Prolin-Inkorporationsassays zur Untersuchung der Kollagensynthese	- 79 -
2.3	Einfluss von Muskarinrezeptoren auf die Kollagensynthese	- 81 -
2.4	Effekt von Tiotropium auf die Muskarinrezeptor-vermittelte Kollagensynthese	- 82 -
2.5	Charakterisierung des Signalweges der Muskarinrezeptor-vermittelten Kollagensynthese	- 83 -
2.6	Einfluss von Nikotin auf die Kollagensynthese	- 85 -
2.7	Einfluss von Muskarinrezeptoragonisten/-antagonisten auf die Kollagensynthese in primären humanen Lungenfibroblasten und Hel 299-Zellen	- 86 -
3	Antifibrotische Eigenschaften erhöhter cAMP-Spiegel in humanen Lungenfibroblasten und Charakterisierung der beteiligten Signalwege	- 88 -
3.1	Etablierung des Proliferationsprotokolls	- 88 -
3.2	Einfluss cAMP-erhöhender Substanzen auf die Proliferation	- 89 -
3.3	Einfluss von Isoprenalin auf die Proliferation	- 90 -
3.4	Einfluss von Butaprost auf die Proliferation	- 91 -
3.5	Prostaglandin E-Rezeptorexpression	- 92 -
3.6	Rolle der Proteinkinase A bei der cAMP-vermittelten antiproliferativen Wirkung	- 93 -
3.7	Rolle von Epac1/2 bei der cAMP-vermittelten antiproliferativen Wirkung	- 96 -
3.7.1	Expression von Epac1 und Epac2	- 96 -
3.7.2	Einsatz spezifischer cAMP-Analoga zur Differenzierung zwischen PKA- und Epac-vermittelten Signalwegen	- 96 -
3.7.3	Untersuchung der Beteiligung von Epac1 und Epac2 an der cAMP-vermittelten Proliferationsinhibition mittels siRNA-Technik	- 98 -
3.7.3.1	Etablierung der siRNA-Transfektion mittels Lipofektion	- 98 -
3.7.3.2	Nachweis des <i>Knock-Downs</i> auf mRNA-Ebene	- 99 -

3.7.3.3	Nachweis des Epac- <i>Knock-Downs</i> auf Proteinebene	- 101 -
3.7.3.4	Funktionelle Untersuchungen zur Proliferation nach Epac1/2- <i>Knock-Down</i>	- 103 -
3.8	Charakterisierung des Rap1-Aktivitätsmusters nach cAMP-Erhöhung	- 105 -
3.9	Bedeutung des MAP-Kinase-Signalweges bei der cAMP-vermittelten Inhibition der Proliferation	- 106 -
3.10	Effekte einer erhöhten cAMP-Konzentration auf die Proliferation in primären humanen Lungenfibroblasten und Charakterisierung des Signalweges	- 108 -
3.11	Zusätzliche antifibrotische Eigenschaften erhöhter cAMP-Spiegel in humanen Atemwegsfibroblasten	- 111 -
3.11.1	Auswirkungen erhöhter cAMP-Spiegel auf die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten	- 111 -
3.11.2	Auswirkung erhöhter cAMP-Spiegel auf die Kollagensynthese	- 112 -
V	DISKUSSION	- 114 -
1	Bedeutung der Arginase I und II bei profibrotischen Prozessen in humanen Lungenfibroblasten	- 114 -
1.1	Expression und Aktivität der Arginase I und II	- 114 -
1.2	Einfluss von IL-4 und IL-13 auf die Expression und Aktivität der Arginase I und II	- 116 -
1.3	Expression der Enzyme Ornithindecaboxylase und Ornithinaminotransferase	- 117 -
1.4	Einfluss der Arginase(aktivität) auf die Kollagen I-Synthese	- 117 -
1.5	Beeinflussung der Arginaseexpression durch PDGF und Auswirkung auf die Proliferation	- 120 -
1.6	Zusammenfassende Beurteilung der Bedeutung der Arginase	- 122 -
2	Effekte von Muskarinrezeptoragonisten und -antagonisten auf die Kollagensynthese in humanen Lungenfibroblasten	- 123 -
2.1	Expression der Muskarinrezeptoren M1-M5	- 123 -
2.2	[³ H]-Prolin-Inkorporationsassays zur Untersuchung der Kollagensynthese	- 124 -
2.3	Einfluss von Muskarinrezeptoragonisten /-antagonisten auf die Kollagensynthese	- 125 -
2.4	Untersuchungen zum Signalweg der Muskarinrezeptor-vermittelten Kollagensynthese	- 126 -
2.5	Zusammenfassende Beurteilung des Einflusses von Muskarinrezeptoren auf die Kollagensynthese	- 128 -
3	cAMP-vermittelte antifibrotische Effekte in humanen Lungenfibroblasten und Charakterisierung der beteiligten Signalwege	- 129 -
3.1	Antiproliferative Effekte einer cAMP-Erhöhung	- 129 -
3.2	Rolle der Proteinkinase A bei der antiproliferativen Wirkung von cAMP	- 130 -
3.3	Rolle der Epac-Proteine bei der antiproliferativen Wirkung von cAMP	- 133 -
3.4	Untersuchungen zur Beteiligung von Rap1 und der MAP-Kinase	- 136 -
3.5	Effekte einer erhöhten cAMP-Konzentration auf die Proliferation von primären humanen Lungenfibroblasten	- 139 -
3.6	Inhibition der Kollagenbildung und der Differenzierung infolge erhöhter cAMP-Spiegel	- 139 -
3.7	Zusammenfassende Beurteilung cAMP-vermittelter antifibrotischer Prozesse in humanen Lungenfibroblasten	- 140 -

VI	ZUSAMMENFASSUNG	- 142 -
VII	SCHLUSSFOLGERUNGEN	- 145 -
VIII	LITERATURVERZEICHNIS	- 146 -
	PUBLIKATIONSLISTE	- 165 -
1	Wissenschaftliche Originalarbeiten	- 165 -
2	Poster und Kongressbeiträge	- 165 -

Abkürzungsverzeichnis

A

Abb.	Abbildung
AKAP	<i>A kinase anchoring proteins</i>
ATP	Adenosintriphosphat

B

Bidest.	bidestilliert
BSA	bovines Serumalbumin

C

cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CAT-2	<i>cationic amino acid transporter-2</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> , DNA, die aus mRNA revers transkribiert wurde
ChAT	Cholinacetyltransferase
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i> , chronisch- obstruktive Lungenerkrankung
COX	Cyclooxygenase
CREB	<i>cAMP responsive element binding protein</i>

D

DAG	Diacetylglycerol
DEP	<i>Dishevelled, Egl-10, Pleckstrin</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DFMO	Difluoromethylornithin
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
E	
EC ₅₀	Konzentration eines Agonisten, die eine halbmaximale Wirkung hervorruft
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition
EP1-4	Prostaglandin E ₂ -Rezeptor 1-4
Epac1/2	<i>exchange protein directly activated by cAMP</i> , s. auch RAPGEF3 und RAPGEF4
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
EZM	Extrazellulärmatrix
F	
FEV ₁	Forcierte expiratorisches Volumen in der 1. Sekunde
FGF	<i>fibroblast growth factor</i> , Fibroblastenwachstumsfaktor
FKS	fetales Kälberserum
G	
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>guanine exchange factor</i> , Guaninnukleotidaustauschfaktor
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i> , Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
GTP γ S	Guanosin-5'-O-(3-thiotriphosphat)
H	
[³ H]	Tritium (Isotop des Wasserstoffs)

I

IC ₅₀	Konzentration eines Inhibitors, die eine 50%ige Hemmung bewirkt
IGF	<i>insulin-like growth factor</i> , insulinähnlicher Wachstumsfaktor
IL	Interleukin
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
IPF	idiopathische pulmonale Fibrose
ISPF	α -Isonitrosopropriophenon

K

K _D	Gleichgewichts-Dissoziationskonstante, Maß für die Affinität eines Pharmakons zu einem Rezeptor
konz.	konzentriert

M

M1-M5	Muskarinrezeptor 1-5
MAP-Kinase	<i>mitogen-activated protein kinase</i> , Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK	MAP-Kinase-Kinase
MEM	<i>Minimal Essential Medium Eagle</i>
MMP	Matrixmetalloprotease
MOPS	3-Morpholino-propan-sulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> -RNA, Boten-RNA
% (m/V)	Masse in Volumen-Prozent

N

n	Anzahl der Messwerte
NEAA	<i>non essential amino acids</i> , nicht essentielle Aminosäuren
NO	Stickstoffmonoxid
ns siRNA	<i>non silencing</i> siRNA

O

OAT	Ornithinaminotransferase
-----	--------------------------

OCT	<i>organic cationic transporter</i> , organischer Kationentransporter
ODC	Ornithindecaboxylase
P	
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
pA ₂	negativer dekadischer Logarithmus der Antagonistenkonzentration, bei der die Agonistenkonzentration verdoppelt werden müsste, um den gleichen Effekt wie bei Abwesenheit des Antagonisten zu beobachten
P5C	L-Pyrrolin-5-carboxylat
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i> , Wachstumsfaktor aus Blutplättchen
PDGF R A/B	PDGF-Rezeptor A/B
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
phLFb	primäre humane Lungenfibroblasten
PhI	Phosphataseinhibitoren
PI	Proteaseinhibitoren
PKA	Proteinkinase A
PKI 14-22	<i>Protein Kinase A inhibitor fragment 14-22</i>
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
prFb	primäre tracheale Fibroblasten der Ratte
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R	
RA	<i>ras-associating domain</i>
RAM	Alveolarmakrophagen der Ratte
Rap1/2	<i>ras related protein 1/2</i>
RAPGEF3	<i>rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 3</i> , neuer offizieller Name für Epac1
RAPGEF4	<i>rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 4</i> , neuer offizieller Name für Epac2

RAM	Alveolarmakrophagen der Ratte
REM	<i>ras exchange motif</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
S	
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	<i>standard error of the means</i> , Standardfehler des Mittelwerts
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
α -SMA	<i>α-smooth-muscle-Aktin</i>
SPS	<i>sodium pyruvat solution</i>
T	
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBST	<i>Tris buffered saline + Tween</i>
TCA	Trichloressigsäure
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i> , transformierender Wachstumsfaktor
Tris (-HCl)	Tris(hydroxymethyl)aminomethan (hydrochlorid)
U	
U	Unit
V	
% V/V	Volumenprozent

I Einleitung

Chronische Erkrankungen der Atemwege wie *Asthma bronchiale* und die chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (COPD) haben in den letzten Jahren durch eine ansteigende Prävalenz zunehmend an Bedeutung gewonnen. Es handelt sich bei beiden um komplexe Krankheitsbilder der Atemwege, die durch entzündliche Prozesse gekennzeichnet sind und bei denen es als Langzeitfolge zu Umbauprozessen in der Lunge, dem sogenannten Remodeling, kommt (Bousquet *et al.*, 2000). Diese strukturellen Umbauprozesse sind durch eine pathologische Zunahme des Bindegewebes gekennzeichnet und führen zu deutlichen Funktionseinschränkungen des Lungengewebes (Jeffery, 2001; Bergeron und Boulet, 2006). Atemwegsfibroblasten sind als strukturgebende Zellen des Bindegewebes und als Hauptproduzenten der Extrazellulärmatrix (EZM) wesentlich an diesem Remodelinggeschehen beteiligt und tragen zudem durch eine vermehrte Proliferation und Migration zum bindegewebigen Umbau bei (Johnson und Burgess, 2004). Die humanen Atemwegsfibroblasten stehen bis dato noch nicht im Fokus der Therapie chronischer Atemwegserkrankungen, könnten jedoch ein interessantes therapeutisches Ziel sein, um Remodelingvorgänge und die damit einhergehende Funktionseinschränkung der Atemwege aufzuhalten.

Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Arbeit humane Atemwegsfibroblasten als Zellmodell genutzt, um verschiedene Signal- und Stoffwechselwege, die an der Regulation der Proliferation und der Kollagensynthese beteiligt sind, zu charakterisieren.

Folgende Fragestellungen wurden untersucht:

- 1) Welche Rolle spielt die Arginase in humanen Atemwegsfibroblasten bei der Regulation der Kollagensynthese und der Proliferation? Diese Frage ergibt sich aus der Funktion der Arginase als Lieferant der Aminosäure L-Ornithin, die ein wichtiger Präkursor für den Kollagenbestandteil L-Prolin und die bei der Proliferation beteiligten Polyamine ist, zusammen mit ihrer markanten Hochregulation im Lungengewebe auf Expressions- und Aktivitätsebene in verschiedenen Asthmodellen.

- 2) Sind Muskarinrezeptoren in humanen Atemwegsfibroblasten an der Regulierung der Kollagensynthese beteiligt und wenn ja, welcher Muskarinrezeptorsubtyp ist für diesen Effekt verantwortlich?

- 3) Welche Bedeutung haben erhöhte cAMP-Spiegel (cAMP = zyklisches Adenosinmonophosphat) in humanen Atemwegsfibroblasten in der Kontrolle fibrotischer Eigenschaften und welche nachgeschalteten Signalwege sind an diesen Effekten beteiligt? Insbesondere sollte die differentielle Rolle der Proteinkinase A und der Epac-Proteine (Epac = *exchange protein directly activated by cAMP*) in diesem Kontext näher charakterisiert werden.

1 Remodelingprozesse bei chronischen Erkrankungen der Atemwege

1.1 *Asthma bronchiale* und COPD

Asthma bronchiale

Beim *Asthma bronchiale* handelt es sich um eine chronisch-entzündliche Erkrankung der Atemwege, die durch eine Hyperreagibilität der Atemwege und rezidivierende Episoden einer Atemwegsobstruktion gekennzeichnet ist. Man unterscheidet zwischen dem extrinsisch-allergischen Asthma und dem intrinsischen Asthma (Buhl *et al.*, 2006). Typische Symptome sind Atemnot, Atemnebengeräusche sowie Engegefühl in der Brust, Husten und vermehrte Sputumproduktion, wobei die Beschwerden bei adäquater Behandlung reversibel sind. Die Limitierung des Atemflusses wird wesentlich durch vier Mechanismen verursacht: akute Bronchokonstriktion, Ödem und Schwellung der Atemwegswände, Verlegung der Atemwege durch ein hochvisköses Sekret und bindegewebiger Umbau der Atemwege (Buhl *et al.*, 2006). Die Erkrankung erstreckt sich auf die gesamten Atemwege aber nicht auf das Lungenparenchym (Barnes, 2000b). Vielfältige Zelltypen sind an dieser chronisch-entzündlichen Erkrankung beteiligt: CD4-positive T-Lymphozyten, eosinophile Granulozyten, und Mastzellen (Jeffery, 2001) und deren Mediatoren, allen voran TGF- β , IL-4, IL-5, IL-13, IL-17, Leukotriene, PDGF und GM-CSF, sind hier besonders hervorzuheben (Busse und Lemanske, Jr., 2001). Im Zusammenhang mit den strukturellen Umbauvorgängen kommt hier dem TGF- β (*transforming growth factor β*) eine besondere Bedeutung zu, da es die Nettosynthese von Proteinen der Extrazellulärmatrix wie Kollagen und Fibronectin erhöht (Bartram und Speer, 2004) und auch zu einer verstärkten Proliferation glatter Muskelzellen führt (Xie *et al.*, 2007).

COPD

Die chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (COPD, *chronic obstructive pulmonary disease*) ist eine Lungenerkrankung mit progredienter, auch nach Gabe von Bronchodilatoren und/oder Kortikosteroiden nicht vollständig reversibler Atemwegsobstruktion auf dem Boden einer chronischen Bronchitis und/oder eines Lungenemphysems. Typische Symptome sind die vermehrte Schleimproduktion, Husten, Keuchen und Atemlosigkeit. Der Krankheitsverlauf ist durch eine progrediente Verschlechterung der Lungenfunktion und eine zunehmende Beeinträchtigung der Lebensqualität gekennzeichnet (Vogelmeier *et*

al., 2007). Die Krankheitssymptome erstrecken sich hauptsächlich auf die peripheren Atemwege und das Lungenparenchym (Barnes, 2000b). Auslöser ist in 90 % der Fälle Zigarettenrauch, durch den es zu einer dauerhaften Reizung des Lungengewebes und zur Initiierung eines Entzündungsprozesses kommt, der zu einem aggressiven Gewebeumbau führen kann (Barnes, 2000a). An dem Entzündungsgeschehen sind wesentlich Makrophagen, neutrophile und eosinophile Granulozyten sowie CD8-positive T-Lymphozyten beteiligt, die in erhöhter Zahl nachgewiesen werden können (Pesci *et al.*, 1998; Di Stefano *et al.*, 1998). Die Entzündungsmediatoren bei der COPD sind weniger gut charakterisiert als diejenigen beim *Asthma bronchiale*. Es konnten jedoch deutlich erhöhte Level an Leukotrien B, TNF- α und IL 8 im Sputum von COPD-Patienten nachgewiesen werden (Keatings *et al.*, 1996; Hill *et al.*, 1999; Bergeron und Boulet, 2006).

1.2 Remodelingprozesse in der Lunge

Auch wenn die Krankheitsbilder *Asthma bronchiale* und COPD sich deutlich voneinander abgrenzen lassen, kommt es bei beiden Erkrankungen zu fibrotischen Veränderungen im Lungengewebe, dem sogenannten Remodeling. Charakteristika sind: eine pathologische Vermehrung von Bindegewebe mit verstärkter Proliferation von Fibroblasten und einer vermehrten Sekretion von Bestandteilen der Extrazellulärmatrix, Hypertrophie und Hyperplasie der glatten Muskelzellen, eine Verdickung der Basalmembran, ein eingeschränktes Lumen und vermehrte Schleimsekretion (Bousquet *et al.*, 2000, s. a. Abb. I-1). Insgesamt resultiert aus diesen Umbauprozessen eine Verhärtung des Gewebes, das an Elastizität verliert und seine Funktion nur noch eingeschränkt erfüllen kann.

Die Ursache dieser strukturellen Umbauprozesse ist meist eine inadäquate chronische Entzündung, deren Folge eine Verletzung der Epithelschicht und des darunter liegenden Gewebes ist. Ausgelöst durch Allergene, Zigarettenrauch oder andere reizende Stoffe kommt es zur Einwanderung und Aktivierung von Entzündungszellen in das Gewebe. Es handelt sich um einen multifaktoriellen, multizellulären Prozess, an dem Epithelzellen, neutrophile und eosinophile Granulozyten, Lymphozyten, Mastzellen und Makrophagen wesentlich beteiligt sind (Bousquet *et al.*, 2000). Durch diese Zellen werden Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren (u. a. IGF, TGF- β , PDGF, Prostaglandine, Leukotriene, FGF und Interleukine) freigesetzt, die zu einer Hypertrophie und Hyperplasie von glatten Muskelzellen führen; ferner locken sie Fibroblasten aus dem umliegenden Geweben an, die sich durch Kontraktion des Zytoskeletts zielgerichtet in das entzündete Areal bewegen und sorgen bei diesen für eine verstärkte Proliferation und Synthese von Matrixproteinen, wobei hier vor allem vermehrt Kollagen I und III sezerniert

werden (Wilson und Li, 1997). Die gesteigerte Zellvermehrung fördert zwar die Heilung des verletzten Gewebes, kann jedoch bei einer Dysregulation eine Fibrose auslösen und somit die normale Lungenfunktion beeinträchtigen. Es gibt andererseits vielfältige Hinweise darauf, dass die übermäßige Gewebebildung auf einen Mangel an antifibrotischen Gegenregulationsmechanismen zurückzuführen ist (Wilborn *et al.*, 1995; Keerthisingam *et al.*, 2001; Peters-Golden, 2003). Es resultiert ein Ungleichgewicht in der Gewebemöostase zugunsten profibrotischer Prozesse. So wird beispielsweise von einer verminderten COX-2-Expression in fibrotischen Geweben berichtet (Chambers *et al.*, 2003). Als Folge dessen wird weniger Prostaglandin E₂ gebildet, welches unter physiologischen Bedingungen die Kollagensynthese und die Proliferation von Fibroblasten hemmt.

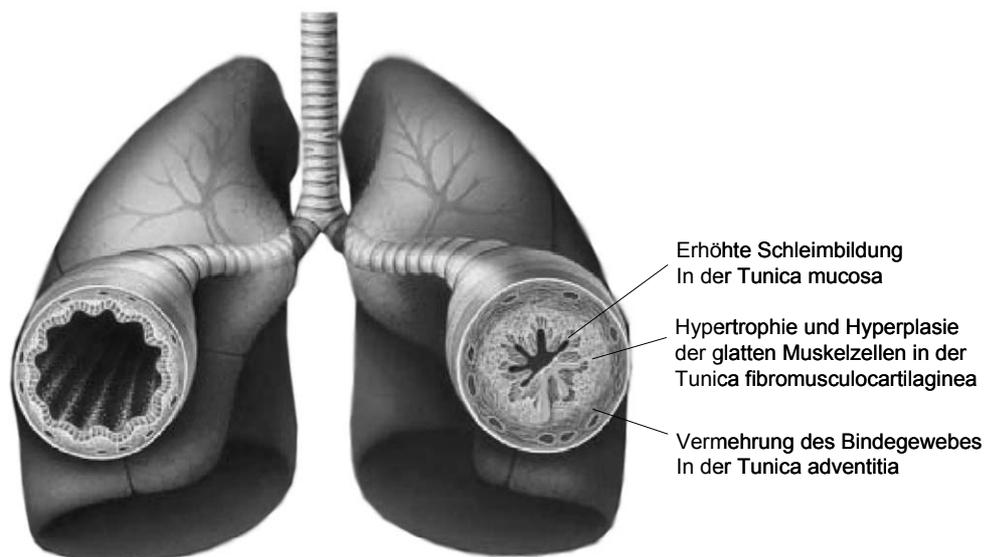


Abb. I-1 Schematische Gegenüberstellung einer normalen Lunge (links) und einer asthmatischen Lunge (rechts), bei der die Verdickung der Atemwegswände und das eingeeengte Volumen deutlich werden. Die *Tunica mucosa*, bestehend aus dem respiratorischen Epithel und der *Lamina propria*, zeigt eine erhöhte Mukussekretion. Bei der *Tunica fibromusculocartilaginea*, die sich aus einer ringförmigen Muskelschicht und unregelmäßig eingelagerten Knorpelstücken zusammensetzt, kommt es zu einer deutlichen Hypertrophie und Hyperplasie der Muskelzellen und die *Tunica adventitia*, die vor allem aus lockerem Bindegewebe und darin eingelagerten Fibroblasten besteht, weist eine deutliche Vermehrung der Extrazellulärmatrix und der in ihr liegenden Zellen auf. Abgeändert nach Jeffery, 2001.

Inwiefern dieses Remodelinggeschehen den Krankheitsverlauf beeinflusst wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Vorwiegend werden mit den strukturellen Veränderungen negative Effekte assoziiert. Boulet *et al.* (1997) und Chetta *et al.* (1997) konnten in klinischen Studien nachweisen, dass eine positive Korrelation zwischen dem Ausmaß der subepithelialen Fibrose und der Hyperreagibilität asthmatischer Atemwege besteht. Zwischen der Zahl an Fibroblasten und glatten Muskelzellen in den Atemwegswänden von Asthmatikern und dem forcierten expiratorischen Volumen in der 1. Sekunde (FEV₁)

wurde ein negativer Zusammenhang nachgewiesen (Benayoun *et al.*, 2003; Pepe *et al.*, 2005), was sich nachteilig auf die Langzeitprognose der Betroffenen auswirkt.

Es existieren allerdings auch Untersuchungen, die vermuten lassen, dass eine Verdickung der Atemwegswände zu einer Verminderung der im Asthma typischen Hyperreagibilität führt und somit positive Auswirkungen haben könnte (Lambert *et al.*, 1994; Milanese *et al.*, 2001).

1.3 Aufbau und Bedeutung der Extrazellulärmatrix

Die extrazelluläre Matrix (Extrazellulärmatrix, EZM) ist ein komplexes Geflecht von Makromolekülen, das zwischen den Zellen im sogenannten Interzellularraum liegt. Sie stellt einen wesentlichen Teil des Bindegewebes der Atemwege dar und bestimmt zudem die physikalischen Eigenschaften des Gewebes. Die Makromoleküle der extrazellulären Matrix werden von in ihr liegenden Zellen synthetisiert und im Anschluss sezerniert, wobei den Fibroblasten eine zentrale Funktion bei der Synthese zukommt. Primär dient die EZM als Fixierungsmöglichkeit für die in ihr eingebetteten Zellen. Hierbei ist sie jedoch einem ständigen Fließgleichgewicht unterworfen, wobei Auf- und Abbauvorgänge sich unter physiologischen Umständen stets die Waage halten (Fernandes *et al.*, 2006). Für den Ab- und Umbau der EZM sind vornehmlich Matrixmetalloproteasen (MMPs) und deren Inhibitoren, die TIMPs (*tissue inhibitors of MMPs*) verantwortlich (Page-McCaw *et al.*, 2007), die täglich mehr als 10 % der EZM neu strukturieren (McAnulty *et al.*, 1988). Darüber hinaus nimmt sie auch wichtige Aufgaben in der Zell-Zell-Kommunikation wahr (Fernandes *et al.*, 2006).

Es gibt in der Matrix zwei Hauptklassen von Makromolekülen: (1) langkettige Polysaccharide vom Glykosaminglykan-Typ (GAG), wie beispielsweise die Hyaluronsäure, Heparansulfate und Chondroitinsulfate und (2) faserförmige Proteine, wie das Kollagen, Elastin und Laminin. Da die Kollagene die Hauptproteine der EZM darstellen und deren Produktion im Rahmen dieser Arbeit genauer untersucht wurde, sollen diese im Folgenden als Bestandteile der extrazellulären Matrix näher beschrieben werden.

Die Kollagene sind eine Familie faserförmiger Proteine und gehören mit bis zu 25 % des Gesamtproteinanteils zu den häufigsten Proteinen in Säugern (Trackman, 2005). Die Großfamilie der Kollagene lässt sich in Fibrillen-bildende Kollagene und nicht-fibrilläre Kollagene einteilen, wobei die Fibrillen-bildenden Kollagene mit den Haupttypen Kollagen I, II und III (mit ~90 %) am häufigsten vertreten sind (Alberts *et al.*, 2008). Bis heute wurden 28 verschiedene Kollagentypen identifiziert (Typ I-XXVIII), die nach ihrer Gewebelokalisation, ihrer molekularen Struktur, ihrem Aggregationsverhalten im

Extrazellularraum und ihrer Funktion unterschieden werden (Prockop und Kivirikko, 1995; Kadler *et al.*, 2007).

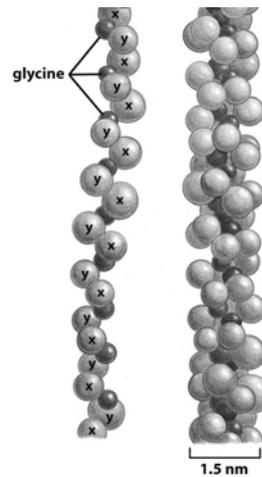


Abb. I-2 Links: Kalottenmodell einer einzelnen Kollagen- α -Kette. Die Kette stellt eine linksgängige Helix mit drei Aminosäuren je Windung dar, in der jede dritte Aminosäure einem Glycin entspricht. X und Y können beliebige Aminosäuren sein, wobei X gewöhnlich L-Prolin und Y Hydroxyprolin ist. Rechts: Tripelhelixmodell eines Kollagenmoleküls bestehend aus drei α -Ketten. Entnommen aus Alberts *et al.*, 2008.

Charakteristisch für den Aufbau von Kollagenmolekülen ist die lange, unbewegliche Helikalstruktur, in der drei α -Kollagen-Polypeptidketten zu einer seilartigen, linksgedrehten Superhelix umeinander gewunden sind (Ottani *et al.*, 2002, s. Abb. I-2). Bis dato konnten 42 verschiedene Gene identifiziert werden, die unterschiedliche α -Ketten kodieren und gewebespezifisch exprimiert werden (Alberts *et al.*, 2008). Kollagene enthalten sehr viel Glycin (Gly) und L-Prolin (Pro), die beide für die Ausbildung der Tripelhelix von Bedeutung sind. Prolin stabilisiert aufgrund seiner Ringstruktur die helikale Konformation in jeder α -Kette und Glycin ermöglicht als kleinste Aminosäure eine möglichst dichte Packung der drei α -Ketten. Die charakteristische Untereinheit des Kollagens stellt die Tripeptideinheit mit der Formel $(\text{Gly-X-Y})_n$ dar, wobei die Aminosäure in der X-Position häufig L-Prolin und die Aminosäure in der Y-Position meist Hydroxyprolin darstellt. Die posttranslationale Hydroxylierung der Prolinreste zu Hydroxyprolin trägt hier zur Stabilisierung der Konformation bei (Trackman, 2005). Dieses lösliche Prokollagen wird in den Extrazellularraum sezerniert, wo die Propeptide proteolytisch gespalten werden, so dass sich die entstandenden tripelhelikalen Kollagenmoleküle spontan zu hochorganisierten unlöslichen Strukturen, wie beispielsweise Fibrillen oder Netzen, zusammenlagern (Alberts *et al.*, 2008).

1.4 Die Rolle von Atemwegsfibroblasten im Remodelinggeschehen

1.4.1 Fibroblasten

Fibroblasten sind Bindegewebszellen mesenchymaler Herkunft. Sie haben ein spindel-förmiges Aussehen, einen hellen, ovalen Zellkern und spielen eine wichtige Rolle beim Auf- und Abbau der extrazellulären Matrix und somit bei der Aufrechterhaltung der Gewebemöostase. Sie sind als strukturgebende Zellen des Bindegewebes im Körper ubiquitär zu finden und auch in allen Lungenabschnitten vertreten.

Zu den Produkten von Fibroblasten gehören hauptsächlich Kollagene, die zusammen mit den ebenfalls gebildeten Proteoglykanen für eine erhöhte Festigkeit der extrazellulären Matrix sorgen. Sie sind aber auch für die Synthese von Zytokinen und anderen Mediatoren – wie beispielsweise TGF- β , ET-1, GM-CSF, IL-8, PDGF und PGE₂ – zuständig und haben in dieser Hinsicht eine wichtige parakrine und autokrine Funktion (Laurent *et al.*, 2007).

Fibroblasten werden in gesundem Gewebe durch die sie umgebene Extrazellulärmatrix von der weiteren Synthese von Matrixproteinen abgehalten (Tomasek *et al.*, 2002). Durch die Verletzung des Gewebes kann es zum Verlust der schützenden Matrix kommen. Als Folge setzen benachbarten Zellen, insbesondere Makrophagen, Lymphozyten und Epithelzellen, aber auch Fibroblasten selbst Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren frei, wobei insbesondere dem TGF- β eine bedeutende Rolle bei der Initiierung dieses Prozesses zukommt (Bartram und Speer, 2004; Laurent *et al.*, 2007). Die Fibroblasten werden durch diese veränderte Mikroumgebung aktiviert und zur Proliferation sowie zur Synthese von Matrixproteinen gebracht (Hinz, 2007). Im Rahmen der normalen Wundheilung migrieren Fibroblasten in das verletzte Areal und sorgen durch die Bildung und Sekretion von Kollagenen und einer Fibronektin-reichen Matrix für den Wundverschluss (Hinz, 2007). Durch die übermäßige Aktivierung kann es jedoch zu einer Fibrosierung des betroffenen Areals kommen (Laurent *et al.*, 2007).

Die Fibroblasten und insbesondere Lungenfibroblasten stellen keine einheitliche Zellpopulation dar. Sie zeigen deutliche regionale Unterschiede hinsichtlich ihrer Größe, ihrer Form, ihrer Syntheseleistung und ihrem Gehalt an α -smooth-muscle-Aktin (Fries *et al.*, 1994; Kotaru *et al.*, 2006) und folglich auch gewebespezifische Unterschiede hinsichtlich ihrer Funktion. Zudem weisen Fibroblasten im Gegensatz zu anderen Zellen keine typischen Oberflächenmarker auf, was eine eindeutige Charakterisierung und Zuordnung zu Subpopulationen erschwert (Phan, 2008).

1.4.2 Myofibroblasten

Eine Schlüsselfunktion im Remodelinggeschehen bei chronischen Atemwegserkrankungen kommt den sogenannten Myofibroblasten zu. Hierbei handelt es sich um einen Fibroblasten-Phänotyp, der aufgrund der erhöhten Konzentration an α -smooth-muscle-Aktin (α -SMA) in dieser Hinsicht Ähnlichkeit mit Glattmuskelzellen besitzt und infolgedessen eine gesteigerte Kontraktilität aufweist (Hinz *et al.*, 2001). Es besteht ein klarer Zusammenhang zwischen der verdickten Basalmembran, die ein histopathologisches Charakteristikum des *Asthma bronchiale* darstellt, und der Anzahl an Myofibroblasten in dieser Gewebeschicht (Brewster *et al.*, 1990). Myofibroblasten synthetisieren im Vergleich zu Fibroblasten deutlich mehr Matrixproteine und sind somit maßgeblich an strukturellen Umbauprozessen des Bindegewebes beteiligt. Die Konzentration an α -smooth-muscle-Aktin wird auch als Marker genutzt, um den Differenzierungsstatus von Fibroblasten hin zu Myofibroblasten zu untersuchen. Myofibroblasten können sich aus verschiedenen Vorläuferzellen entwickeln: die Hauptquelle sind die vor Ort befindlichen Fibroblasten, die bei einem Gewebeschaden aktiviert werden und zu Myofibroblasten differenzieren (Hinz, 2007). Zusätzlich leiten sich die Myofibroblasten von Fibrozyten ab, welche im Blut zirkulierende Fibroblastenvorläuferzellen darstellen, die im Falle einer Verletzung in das betroffene Gewebe einwandern und dort differenzieren können (Abe *et al.*, 2001; Gomperts und Strieter, 2007). Ein weiterer Mechanismus ist der Übergang von Epithelzellen zu Myofibroblasten (EMT = epitheliale-mesenchymale Transition, Kim *et al.*, 2006), der vor allem durch TGF- β induziert wird, welches im geschädigten Gewebe von Blutplättchen, Epithelzellen, Makrophagen aber auch von Fibroblasten selbst abgegeben wird (Corrin *et al.*, 1994; Coker *et al.*, 1997). Die hohe kontraktile Kraft der Myofibroblasten und ihre Fähigkeit zur Synthese von Matrixproteinen sind essentiell für die normale Wundheilung und tragen wesentlich zum raschen Wundverschluss bei. Dabei lagert sich das Aktin zu einer Vielzahl intrazellulärer Filamente zusammen, die das betroffene Areal stark kontrahieren. Zahlreiche Zell-Zell-Verbindungen ermöglichen die Synchronizität dieses Vorgangs, der die Kollagenfasern entlang der Zugkraft ausrichtet (Hinz *et al.*, 2007). Normalerweise nimmt die Anzahl an Myofibroblasten nach dem Wundverschluss durch Apoptose ab (Desmouliere *et al.*, 1995). Sie können allerdings auch bei fehlender Deaktivierung zu pathologischen Zuständen durch die übermäßige Produktion von Bestandteilen der Extrazellulärmatrix führen.

2 Funktion und Lokalisation der Arginase unter besonderer Berücksichtigung der Atemwege

Die Arginase, verantwortlich für die Katalyse von L-Arginin zu L-Ornithin und Harnstoff, ist ein Schlüsselenzym des in der Leber stattfindenden Harnstoffzyklus und dient somit zur Entgiftung des im Stoffwechsel anfallenden Stickstoffs (Jenkinson *et al.*, 1996). Sie ist allerdings auch in Geweben lokalisiert, in denen die komplette Enzymausstattung für den Harnstoffzyklus fehlt, was eine Beteiligung der Arginase an weiteren physiologischen Prozessen nahe legt. Die Arginase kommt in zwei Isoformen, nämlich Arginase I und II, vor. Diese weisen insgesamt eine 60%ige Sequenzhomologie auf, wobei das katalytische Zentrum der beiden Isoformen zu 100 % homolog ist (Iyer *et al.*, 1998). Die Arginaseenzyme werden durch unterschiedliche Gene auf verschiedenen Chromosomen (6q23 bzw. 14q24) kodiert, weisen eine unterschiedliche subzelluläre Lokalisation und Gewebeverteilung auf, unterscheiden sich aber hinsichtlich ihrer enzymatischen Eigenschaften kaum voneinander (Wu und Morris, Jr., 1998). Die Arginase I ist ein zytoplasmatisches Enzym, das überwiegend in der Leber zu finden ist und für 98 % der Gesamtarginaseaktivität im Körper verantwortlich ist (Ricciardolo *et al.*, 2005), wohingegen die Arginase II in den Mitochondrien lokalisiert ist, in vielen Geweben, u. a. in der Niere und der Prostata, vorkommt (Jenkinson *et al.*, 1996; Morris, Jr. *et al.*, 1997) und für die restlichen 2 % der Arginaseaktivität des Körpers zuständig ist. Beide Arginaseisoformen konnten auch im Lungengewebe nachgewiesen werden, u. a. in bronchialen Epithelzellen, Fibroblasten und Alveolarmakrophagen (Que *et al.*, 1998; Klasen *et al.*, 2001; Lindemann und Racké, 2003; Xu *et al.*, 2004; Kitowska *et al.*, 2008), wobei es bei der Expression und deren funktioneller Bedeutung speziesspezifische Unterschiede zu geben scheint (Kitowska *et al.*, 2008).

Die Bedeutung der Arginase I wird an Arginase I Knockout-Mäusen deutlich, die 10-12 Tage nach ihrer Geburt an einer Stickstoffintoxikation sterben und zudem deutlich reduzierte Level an L-Prolin und L-Ornithin aufweisen (Iyer *et al.*, 2002).

Ihre Rolle als Lieferant für L-Ornithin, das als Ausgangsstoff für die Polyamin- und Prolinsynthese dient, legt ihre Bedeutung in der Genese fibrotischer Lungenerkrankungen nahe, da Polyamine bedeutsame Faktoren für ein vermehrtes Zellwachstum sind, und L-Prolin ein essentieller Baustein für die Kollagensynthese ist. Beide Prozesse – eine verstärkte Proliferation und eine vermehrte Kollagensynthese – sind Charakteristika fibrotischer Erkrankungen.

In einer Microarray-Analyse konnten Zimmermann *et al.* (2003) die Hochregulation verschiedener, am L-Argininstoffwechsel beteiligter Proteine im Rahmen asthmatischer Lungenerkrankungen feststellen. In zwei verschiedenen Asthmodellen wurde in Mäusen eine deutliche Hochregulation der Arginase I und II und CAT-2, einem für die L-Arginin-Aufnahme verantwortlichen Aminosäuretransporter, nachgewiesen und diese wurden als typische Asthma-Signaturgene charakterisiert. Die markante Hochregulation (bis zu 40fach) dieser Gene ging mit einer erhöhten Harnstoff- und Putrescinsynthese einher und untermauert die Bedeutung der Arginase und des L-Argininstoffwechsels im asthmatischen Geschehen. In humanen bronchoalveolären Lavagen von Asthmatikern wurde ebenfalls eine Steigerung der Arginase I-Expression, v. a. in Makrophagen, im Vergleich zu Nicht-Asthmatikern belegt (Zimmermann *et al.*, 2003). Zudem zeigten Blutuntersuchungen bei Asthma-Patienten eine deutlich erhöhte Arginaseaktivität und erniedrigte freie L-Arginin-Spiegel im Vergleich zu Nicht-Asthmatikern (Morris *et al.*, 2004).

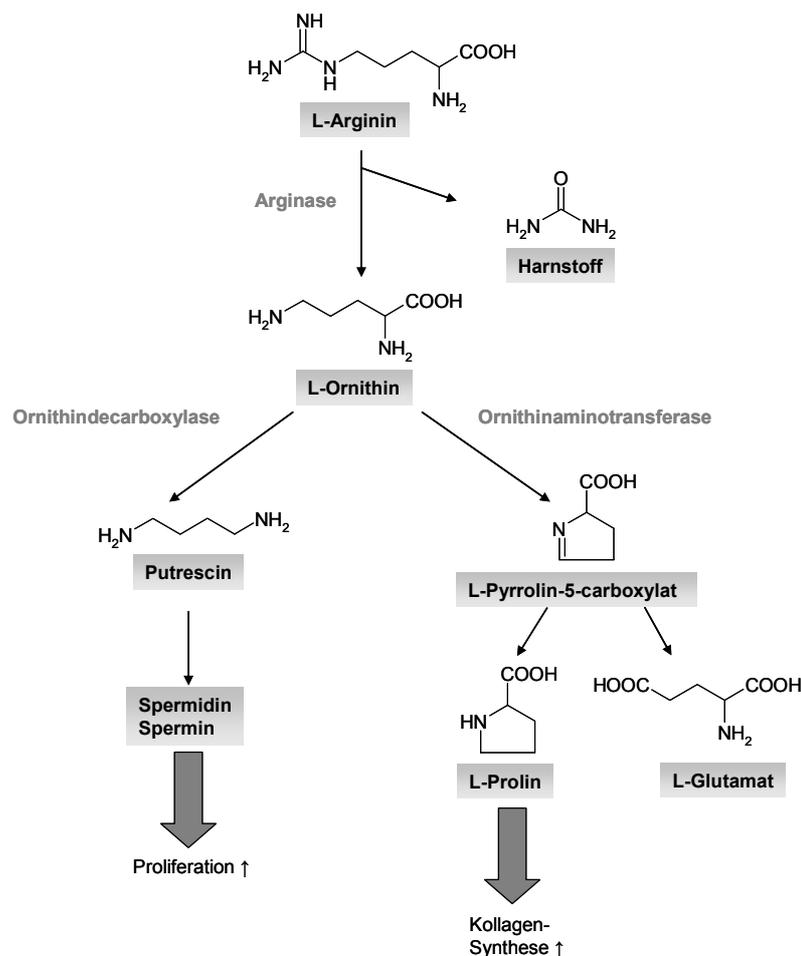


Abb. I-3 Schematische Darstellung der Arginaseumsatzreaktion und nachgeschalteter Stoffwechselwege, die die mögliche Bedeutung der Arginaseenzyme bei der Proliferation und Kollagensynthese verdeutlichen.

Auch im Krankheitsbild der COPD scheint die Arginase eine Rolle zu spielen. In Ratten, die über 2-13 Wochen Zigarettenrauch ausgesetzt wurden, zeigte sich ein deutlicher Arginase I-Anstieg auf mRNA-Ebene gemessen im Microarray (Gebel *et al.*, 2006). In einer Studie an Raucherlungen konnte zudem ein Zusammenhang zwischen dem Rauchen und einer Expression der Arginase I und der Ornithindecaboxylase (ODC) hergestellt werden (Bergeron *et al.*, 2007), die vor allem in Epithelzellen und glatten Muskelzellen erhöht war. In einem Herpesvirus-induzierten Fibrosemodell an der Maus stieg die Arginase I-Expression und deren Aktivität ebenfalls deutlich an (Mora *et al.*, 2006).

Darüber hinaus bedeutsam für die Pathologie von Lungenerkrankungen ist die Konkurrenzsituation der Arginasen mit den NO-Synthasen um das gemeinsame Substrat L-Arginin. Durch die Hochregulation der Arginase im Entzündungsgeschehen kann es zu einer Substratdepletion für die NO-Synthasen kommen und infolgedessen zu einer verminderten Synthese des bronchienerweiternden Stickstoffmonoxids (NO), was zu einer verstärkten Hyperreagibilität und Obstruktion der Atemwege beitragen könnte (Meurs *et al.*, 2003). Diese Hypothese konnte in einem *in vitro*-Asthmamodell an Meerschweinchen-tracheen bestätigt werden in dem eine Inhibition der erhöhten Arginaseaktivität durch den potenten Arginaseinhibitor nor-NOHA eine Metacholin-induzierte Bronchokonstriktion unterdrücken konnte (Meurs *et al.*, 2002).

2.1 Arginase und Polyaminsynthese

L-Ornithin, ein Produkt der Arginasereaktion, ist ein wichtiger Ausgangsstoff für die Biosynthese von Polyaminen, z. B. Putrescin, Spermin und Spermidin (s. Abb. I-3). Der geschwindkeitsbestimmende Schritt in der Polyaminsynthese ist die Umsetzung von L-Ornithin mittels der zytosolischen Ornithindecaboxylase zu Putrescin, welches enzymatisch weiter zu Spermidin und Spermin umgesetzt werden kann (Thomas und Thomas, 2001). Die Kollokalisierung von Arginase I und ODC im Zytosol lässt vermuten, dass durch Arginase I produziertes L-Ornithin leicht für die Polyaminsynthese genutzt werden kann.

Polyamine sind kleine aliphatische Polykationen, die in millimolaren Konzentrationen in der Zelle vorkommen und die aufgrund ihrer positiven Ladung Interaktionen mit zellulären Makromolekülen, allen voran der negativ geladenen DNA, eingehen können (Thomas und Thomas, 2001). Auch die Bindung von Proteinen untereinander und an die DNA wird durch Polyamine moduliert (Thomas und Thomas, 2001). Ihre damit einhergehende Beteiligung an Wachstums- und Differenzierungsprozessen wurden bereits früh erkannt (Tabor und Tabor, 1984) und konnte in mehreren Zellsystemen nachgewiesen werden.

Bereits 1982 entdeckten Hölttä und Pohjanpelto, dass CHO-Zellen, denen die Arginase fehlte, in serumfreiem Medium nur dann wachsen können, wenn dem Medium L-Ornithin oder Polyamine zugesetzt werden. Zudem zeichneten sich Brustkrebstzelllinien mit erhöhter Arginaseaktivität auch durch erhöhte Polyaminlevel und ein verstärktes Zellwachstum aus, das nach Inhibition der Arginase durch NOHA (n-Hydroxyarginin), einem Intermediat der NO-Synthese, unterdrückt werden konnte (Singh *et al.*, 2000); in diesem Zellsystem war ausschließlich Arginase II zu finden. Gleichermäßen wirkte sich in Caco-2-Zellen, einer Kolonkarzinomzelllinie, die Hemmung der Arginase negativ auf das Wachstum der Zellen aus (Buga *et al.*, 1998). In glatten Muskelzellen der Rattenaorta führte eine Transfektion der Zellen mit Arginase I bzw. eine Induktion der Arginase I-Expression durch IL-4-Gabe zu einer verstärkten Polyaminsynthese und einem vermehrten Zellwachstum (Ignarro *et al.*, 2001). Eine Überexpression von Arginase I in glatten Muskelzellen der Ratte führte zu erhöhten Polyaminlevel und förderte das Zellwachstum (Wei *et al.*, 2001). Die Überexpression beider Isoformen in bovinen Endothelzellen erhöhte die Anzahl an Zellen nach 4tägiger Beobachtung um 69 % im Falle einer Arginase I-Überexpression und um 75 % bei einer Überexpression der Arginase II (Li *et al.*, 2002); auch dieser Effekt war durch Inkubation mit Difluoromethylornithin (DFMO), einem Inhibitor der Ornithindecaboxylase, nahezu vollständig inhibierbar. Ob die Arginase limitierend für die Polyaminsynthese und folglich das Proliferationsverhalten ist, soll in der vorliegenden Arbeit an humanen Atemwegsfibroblasten im *in vitro*-Zellmodell untersucht werden. Eine Inhibition der Arginase und folglich der Polyaminsynthese könnte in diesem Kontext therapeutisch interessant sein, um ein vermehrtes Zellwachstum – wie es bei Remodelingvorgängen in den Atemwegen zu finden ist – zu unterbinden.

2.2 Arginase und Kollagensynthese

L-Ornithin stellt weiterhin einen wichtigen Ausgangsstoff für die Prolinsynthese dar, da L-Prolin ein Hauptbestandteil des Kollagens und somit essentiell für dessen Biosynthese ist (Meurs *et al.*, 2003). Das von der Arginase gebildete L-Ornithin kann durch die mitochondrial lokalisierte Ornithinaminotransferase (OAT) zu L-Pyrrolin-5-carboxylat (P5C) umgesetzt werden, welches seinerseits als Substrat der P5C-Reduktase zu L-Prolin verstoffwechselt werden kann (s. Abb. I-3). Schon früh wurde die Bedeutung von L-Ornithin als Präkursor für L-Prolin in *in vitro*-Versuchen an CHO-Zellen (Smith und Phang, 1979) und der Zusammenhang zwischen dem freien Prolinpool und der Kollagensynthese im Fall der humanen Leberzirrhose erkannt (Kershenobich *et al.*, 1970).

Im Rahmen von Gewebeverletzungen steigt der Prolinbedarf im Gewebe an, da neues Kollagen für den Wundverschluss gebildet werden muss (Albina *et al.*, 1993). Die Arginase als Ornithinlieferant könnte in diesem Zusammenhang ein wichtiges Enzym bei der Prolinsynthese darstellen und tatsächlich konnte schon eine gegenüber normalen Fibroblasten stark erhöhte Arginase I-Expression in Wundfibroblasten der Ratte nachgewiesen werden (Witte *et al.*, 2002).

In einem Fibrosemodell an der Maus wurde ein positiver Zusammenhang zwischen der Arginaseexpression und der Kollagensynthese in der Lunge hergestellt (Endo *et al.*, 2003). Auch eine Kolokalisation des Kollagen-spezifischen Chaperons HSP47 mit der Arginase II in verschiedenen Lungenzellen wurde beobachtet, wodurch ein Zusammenhang zwischen Arginaseaktivität und Prolin- bzw. Kollagensynthese nahegelegt wird (Endo *et al.*, 2003). Die Verknüpfung zwischen dem L-Arginin-Stoffwechsel und einer erhöhten Kollagensynthese wurde auch in einer Versuchsreihe an glatten Muskelzellen der Ratte deutlich: die glatten Muskelzellen wurden einer Kraft ausgesetzt, die den physiologischen Blutstrom imitieren sollte; dadurch konnte die Expression von CAT-2, der Arginase I und Arginase II, sowie die Synthese von L-Prolin und Kollagen induziert und gleichzeitig die Aktivität iNOS und der ODC inhibiert werden (Durante *et al.*, 2000); es scheint folglich, dass unter dem Einfluss einer Scherkraft der L-Argininstoffwechsel gezielt in Richtung Prolin- und Kollagensynthese gelenkt wird, um dem Gewebe mehr Festigkeit zu verleihen. Einen weiteren Beweis für die Bedeutung der Prolinbereitstellung für die Kollagensynthese lieferte dieselbe Arbeitsgruppe im darauffolgenden Jahr: sie konnten in Glattmuskelzellen der Ratte nachweisen, dass die Prolinsynthese und in der Folge auch die TGF- β_1 -stimulierte Kollagensynthese durch den OAT-Inhibitor L-Canalin unterdrückt werden konnte (Durante *et al.*, 2001).

Auch in diesem Zusammenhang wird der mögliche therapeutische Nutzen einer Arginaseinhibition deutlich. Es wird folglich durch den Einsatz von Arginaseinhibitoren eine verminderte Kollagenbildung in der Lunge und damit eine weniger ausgeprägte Fibrosierung des Gewebes erhofft. Aber auch hier stellt sich die Frage, ob die Arginase in humanen Atemwegsfibroblasten für die Regulation dieser Prozesse essentiell ist.

2.3 Regulation der Arginaseisoformen durch Zytokine und Wachstumsfaktoren

Die Expression der Arginase I und Arginase II wird zell- und gewebespezifisch durch vielfältige Stimuli reguliert.

Bereits mehrfach konnte die Hochregulation der Arginase durch die TH₂-spezifischen Zytokine IL-4 und IL-13 nachgewiesen werden, denen auch eine zentrale Bedeutung im

asthmatischen Entzündungsgeschehen zukommt (Wills-Karp, 1999). Schon 1995 konnte die Induktion der Arginaseexpression durch TH₂-spezifische Zytokine in Makrophagen gezeigt werden (Durante *et al.*, 2000). Auch Rattenfibroblasten reagierten nach einer Inkubation mit IL-4 und IL-13 mit einer ausgeprägten Hochregulation der Arginaseexpression und der Arginaseaktivität (Lindemann und Racké, 2003). Des Weiteren induzierten die Interleukine IL-4 und IL-13 in einem Asthmodell an Ratten die Aktivität und Expression der beiden Arginaseisoformen (Zimmermann *et al.*, 2003).

Die Bedeutung der IL-4- und IL-13-Rezeptorexpression im Rahmen fibrotischer Prozesse zeigte sich in in-vitro Studien an humanen Lungenfibroblasten, die nach Aktivierung mit IL-4 und IL-13 einen profibrotischen Phänotyp ausbildeten (Doucet *et al.*, 1998). Außerdem wurde in der bronchioalveolären Lavage von Patienten mit idiopathischer, pulmonaler Fibrose (IPF) – einer schweren progressiven, fibrotischen Erkrankung der Lunge – ein erhöhter IL-4-Spiegel nachgewiesen (Emura *et al.*, 1990).

Auch dem PDGF (*platelet derived growth factor*) wird eine Beteiligung an fibrotischen Prozessen zugeschrieben (Yi *et al.*, 1996; Bonner, 2004) und die verstärkte Expression dieses Wachstumsfaktors in fibrotischen Lungenerkrankungen, wie der idiopathischen pulmonalen Fibrose, spricht für dessen Bedeutung (Martinet *et al.*, 1987). In arteriellen Glattmuskelzellen der Ratte konnte der Wachstumsfaktor PDGF die Polyaminsynthese steigern und eine anschließende Hemmung der Polyaminsynthese durch den ODC-Inhibitor DFMO wirkte sich negativ auf deren Proliferationsverhalten aus (Thyberg und Fredholm, 1987). Dies legt eine Mitwirkung der an der Polyaminsynthese beteiligten Arginase an der PDGF-vermittelten Proliferation nahe. Auch andere Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise EGF (*epidermal growth factor*), vermochten die Arginaseaktivität in bovinen Lungenepithelzellen zu steigern (Nelin *et al.*, 2005).

Die Auswirkungen der TH₂-spezifischen Zytokine IL-4 und IL-13 bzw. des Wachstumsfaktors PDGF auf die Arginaseexpression und die Arginaseaktivität sind für humane Lungenfibroblasten noch nicht näher charakterisiert worden und sollten im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

3 Das Cholinerge System der Atemwege und die Bedeutung von Muskarinrezeptorantagonisten in der Therapie chronisch-obstruktiver Atemwegserkrankungen

3.1 Das cholinerge System der Atemwege

Das cholinerge System im Respirationstrakt ist wesentlich für die Aufrechterhaltung des Muskeltonus und die Mukussekretion verantwortlich (Barnes, 2004), trägt darüber hinaus aber noch zu einer Vielzahl anderer physiologischer und pathophysiologischer Prozesse bei (Racké und Matthiesen, 2004). Acetylcholin ist der klassische Transmitter des parasympathischen vegetativen Nervensystems und wird sowohl von neuronalen als auch von nicht-neuronalen Zellen freigesetzt (Wessler *et al.*, 1998). Als Hauptquelle des neuronalen Acetylcholins dienen die parasympathischen Neurone, die ausgehend vom Nervus Vagus die Glattmuskelschicht und die submukösen Drüsen innervieren (Barnes, 2004). Dort wird das Acetylcholin durch das Enzym Cholinacetyltransferase (ChAT) unter Verwendung von Cholin und Acetyl-CoenzymA synthetisiert und in synaptischen Vesikeln bevorratet, aus denen es nach Depolarisation in den synaptischen Spalt freigesetzt werden kann (Racké und Matthiesen, 2004). Das ausgeschüttete Acetylcholin entfaltet seine Wirkung an prä- oder postsynaptischen Rezeptoren und wird zur Deaktivierung durch das membrangebundene Enzym Acetylcholinesterase zu Cholin und Essigsäure gespalten. Die parasympathische Innervierung beschränkt sich aber vorwiegend auf die proximalen Atemwege und reicht nicht bis in die distalen Atemwege und ins Lungenparenchym. Hier scheint dem nicht-neuronalen Acetylcholin als auto- und parakrinem Mediator eine Schlüsselfunktion zuzukommen. Als mögliche Lieferanten des nicht-neuronalen Acetylcholins kommen zahlreiche Zellen in Frage, die über cholinerge Rezeptoren verfügen und die ChAT als Acetylcholin-synthetisierendes Enzym exprimieren, u. a. Epithelzellen, T- und B-Lymphozyten, Neutrophile, Mastzellen, Alveolarmakrophagen und glatte Muskelzellen (Wessler und Kirkpatrick, 2001; Racké *et al.*, 2006; Wessler und Kirkpatrick, 2008). Die Ausschüttung des nicht-neuronalen Acetylcholins, das anders als neuronales Acetylcholin nicht in Speichervesikeln bevorratet wird, scheint direkt nach der Synthese über einen aktiven Transport mittels Mitglieder der OCT (*organic cation transporter*)-Familie zu erfolgen (Wessler *et al.*, 2001). Die weite Verbreitung von Zellen im Lungengewebe, die Komponenten des cholinergen Systems exprimieren und das auch in Regionen, die nicht parasympathisch innerviert sind, legt die Vermutung nahe, dass dem

nicht-neuronalen Acetylcholin eine essentielle Rolle in den Atemwegen zukommt, und dass eine Dysregulation an pathologischen Prozessen beteiligt sein könnte.

Es werden zwei Gruppen von Cholinozeptoren unterschieden, die nach ihren selektiven Agonisten benannt sind: Nikotinrezeptoren und Muskarinrezeptoren.

3.1.1 Nikotinische Acetylcholinrezeptoren

Nikotinrezeptoren sind transmembranäre, ligandengesteuerte Ionenkanäle, die nach Rezeptoraktivierung eine Depolarisation der Membran auslösen (Gotti und Clementi, 2004). Sie kommen hauptsächlich im zentralen Nervensystem, in den vegetativen Ganglien und an der neuromuskulären Endplatte vor. Der Nikotinrezeptor ist ein zylindrisches Transmembranprotein, das sich homolog oder heterolog aus fünf Untereinheiten zusammensetzt, wobei bis dato 17 verschiedene Untereinheiten (α_{1-10} , β_{1-4} , γ , δ und ϵ) identifiziert werden konnten (D'hoedt und Bertrand, 2009). Durch das Auftreten verschiedener Untereinheiten entsteht eine Vielzahl von verschiedenen Rezeptor-Isoformen, die sich durch unterschiedliche pharmakokinetische Eigenschaften, charakteristische Aktivierungsmuster und verschiedene pharmakologische Eigenschaften auszeichnen (Kalamida *et al.*, 2007). In den Atemwege finden sich nikotinische Acetylcholinrezeptoren auf den autonomen Ganglienzellen, aber auch auf nicht-neuronalen Zelltypen, u. a. auf Fibroblasten, Epithelzellen, Endothelzellen, Makrophagen und glatten Muskelzellen (Racké und Matthiesen, 2004; Carlisle *et al.*, 2004; Racké *et al.*, 2006).

3.1.2 Muskarinische Acetylcholinrezeptoren

Bis heute konnten fünf verschiedene Muskarinrezeptorsubtypen mittels molekularbiologischer Methoden identifiziert und charakterisiert werden (Caulfield und Birdsall, 1998). Die Muskarinrezeptoren M1-M5 gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die Signale über GTP (Guanosintriphosphat)-bindende Proteine in das Zellinnere weiterleiten (Wess *et al.*, 1995). G-Proteine sind intrazelluläre, membranständige Heterotrimere, die sich aus einer α - und einer $\beta\gamma$ -Untereinheit zusammensetzen (Gudermann *et al.*, 1996). Die α -Untereinheit wird zur weiteren Klassifizierung der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren herangezogen und es werden vier G-Protein-Familien unterschieden: $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ und $G\alpha_{12}$ (Krauss, 2003). Nach Rezeptoraktivierung ist die α -Untereinheit hauptverantwortlich für die Weiterleitung des Signals in den Zellen, aber

auch die $\beta\gamma$ -Untereinheit kann an der Signalübertragung beteiligt sein (Clapham und Neer, 1997).

Die Muskarinrezeptorsubtypen sind an unterschiedliche G-Proteine gekoppelt. So interagieren die geradzahigen Rezeptoren (M2 und M4) bevorzugt mit G-Proteinen der Untergruppe $G\alpha_i$, was zu einer Hemmung der Adenylylcyclase und damit zu einer verminderten Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat und unter anderem einer geringeren Aktivität der Proteinkinase A (PKA) führt (s. Abb. I-4, A). Ferner ist eine Ras-vermittelte Aktivierung der MAP-Kinase-Signalkaskade über diesen Weg beschrieben (Winitz *et al.*, 1993). Die ungeradzahigen Muskarinrezeptoren (M1, M3 und M5) sind vorwiegend mit $G\alpha_q$ -Proteinen assoziiert. Nach Rezeptorbindung kommt es zu einer Aktivierung der Phospholipase C (PLC), die das Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in die beiden Endprodukte Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) hydrolysiert (Lanzafame *et al.*, 2003). Das DAG bewirkt die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), die weitere Effektorproteine phosphorylieren kann, wohingegen das IP_3 zu einer Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern führt (s. Abb. I-4, B). Darüber hinaus sind die angestoßenen Signaltransduktionswege nach Muskarinrezeptoraktivierung sehr komplex und werden durch zahlreiche Interaktionspartner reguliert und moduliert (Lanzafame *et al.*, 2003).

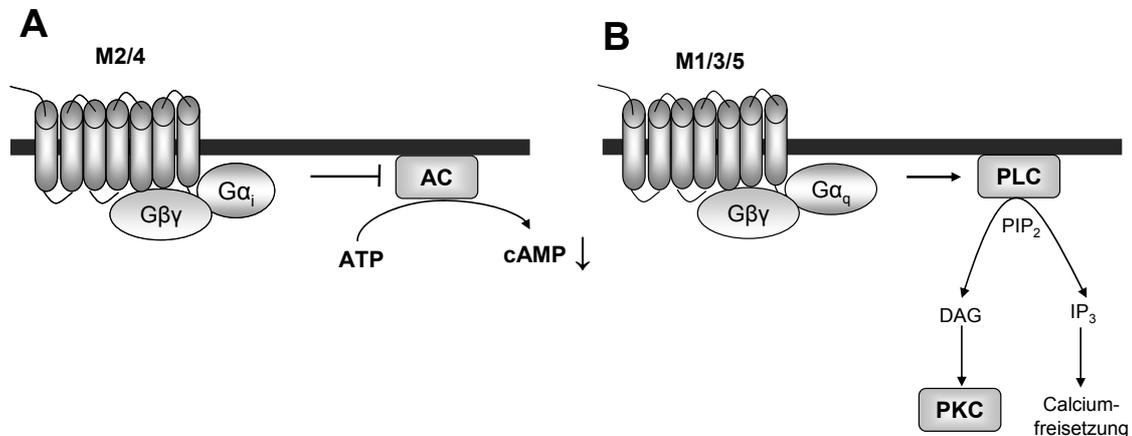


Abb. I-4 Schematische Darstellung der Signalwege der Muskarinrezeptoren (A) M2 und M4 und (B) M1, M3 und M5.

AC = Adenylylcyclase, ATP = Adenosintriphosphat, cAMP = zyklisches Adenosinmonophosphat, DAG = Diacylglycerol, IP_3 = Inositol-1,4,5-triphosphat, PIP_2 = Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, PKC = Proteinkinase C, PLC = Phospholipase C

Im Lungengewebe sind hauptsächlich die Muskarinrezeptoren M1-M3 vertreten. Im peripheren Lungengewebe und in den Alveolarwänden finden sich vornehmlich M1-Rezeptoren (Casale und Ecklund, 1988), wohingegen in den großen Atemwegen vorwiegend M2- und M3-Rezeptoren nachgewiesen wurden (Roffel *et al.*, 1987; Mak *et al.*, 1992). Der M2-Rezeptor befindet sich hauptsächlich auf der Zellmembran glatter

Muskelzellen, wo er funktionell der Relaxation der Atemwegsmuskulatur nach β -Rezeptorstimulation entgegenwirkt, und als präsynaptischer, inhibitorischer Autorezeptor auf parasymphatischen Nervenendigungen (Zaagsma *et al.*, 1997; Belmonte, 2005). In Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe konnte eine deutliche Expression in humanen Lungenfibroblasten nachgewiesen werden (Matthiesen *et al.*, 2006). M3-Rezeptoren spielen eine wesentliche Rolle bei der Kontraktion glatter Muskelzellen. Sie sind die vorherrschenden muskarinischen Rezeptoren auf submukösen Drüsen und somit maßgeblich an der (patho)physiologischen Schleimbildung beteiligt (Barnes, 2004).

3.2 Muskarinrezeptorantagonisten in der Therapie chronischer Atemwegserkrankungen

Im Asthma-Tiermodell konnte bereits eine Hyperaktivität des parasymphatischen Nervensystems und eine damit einhergehende Hyperreagibilität der Atemwege nachgewiesen werden (Santing *et al.*, 1995). Im Rahmen chronisch-entzündlicher Erkrankungen kommt es zu einer erhöhten Freisetzung von Acetylcholin (Larsen *et al.*, 1994), einer vermehrten Expression des Enzyms Cholinacetyltransferase (Profita *et al.*, 2009) und zu einer Dysregulation autoinhibitorischer, präsynaptischer M2-Rezeptoren (ten Berge *et al.*, 1995), was insgesamt zu einer Überaktivität des parasymphatischen Systems der Lunge führt und eine erhöhte Kontraktivität und Mukussektion der Atemwege nach sich zieht. Ob diese Überaktivierung mit einer vermehrten Muskarinrezeptorexpression einhergeht, wird kontrovers diskutiert (Raaijmakers *et al.*, 1984; Haddad *et al.*, 1996; Profita *et al.*, 2009).

Mit Ipratropium (Atrovent[®]) und Tiotropium (Spiriva[®]) stehen zwei potente Anticholinergika zur inhalativen Bronchodilatation bei Patienten mit COPD zur Verfügung (s. Abb. I-5), wobei sich Tiotropium durch seine lang anhaltende Wirkung und seine damit einhergehende nur 1x-tägliche Applikation und die höhere Affinität zu den Muskarinrezeptoren gegenüber Ipratropium auszeichnet (Disse *et al.*, 1999). Tiotropium weist ähnliche Dissoziationskonstanten an den Rezeptoren M1-M3 auf, dissoziiert aber am schnellsten vom M2-Rezeptor (3,6 h) und hat eine deutlich längere Verweildauer am M1- und am M3-Rezeptor (14,6 h bzw. 34,7 h), so dass eine kinetische Präferenz für diese beiden Subtypen resultiert (Disse *et al.*, 1999).

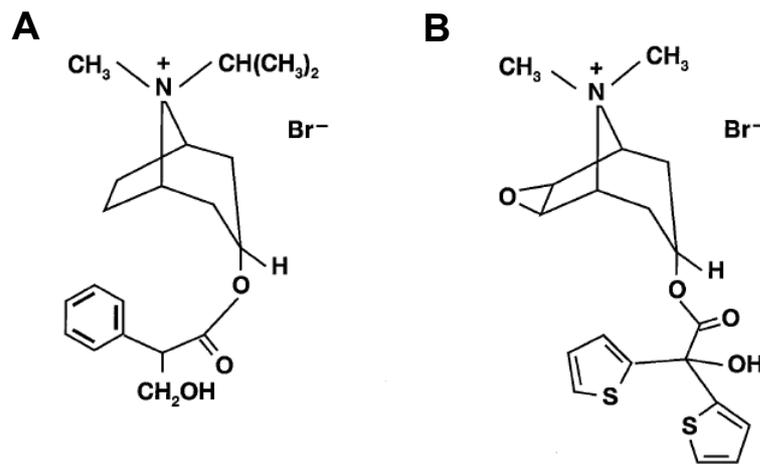


Abb. I-5 Strukturformeln der therapeutisch genutzten Muskarinrezeptorantagonisten Ipratropiumbromid (A) und Tiotropiumbromid (B).

Die klinische Wirksamkeit von Tiotropium und dessen positiver Effekt auf den Krankheitsverlauf von COPD-Patienten wurde in zahlreichen Studien nachgewiesen (Vincken *et al.*, 2002; Casaburi *et al.*, 2002; Tashkin und Kesten, 2003; Anzueto *et al.*, 2005). Neben der direkten bronchodilatierenden Wirkung konnte eine Drosselung der Verschlechterung der Lungenparameter erreicht werden: die Einsekundenkapazität FEV₁, ein Messparameter für die Lungenfunktion, konnte nach 1jähriger Behandlung mit Tiotropium signifikant gegenüber Placebo gesteigert werden. Zudem traten weniger Atembeschwerden und weniger Exazerbationen auf und das Allgemeinbefinden der Patienten konnte deutlich verbessert werden (Vincken *et al.*, 2002; Casaburi *et al.*, 2002). In der kürzlich publizierte 4jährige UPLIFT-Studie konnte der positive Effekt einer Langzeittherapie mit Tiotropium teilweise bestätigt werden (Tashkin *et al.*, 2008). Zwar zeigte eine Tiotropiumbehandlung keine Verbesserung des FEV₁ gegenüber einer mit β_2 -Sympathomimetika und inhalativen Kortikosteroiden behandelten Kontrollgruppe, in einer Subgruppenanalyse führte eine Behandlung mit Tiotropium allerdings zu einer verlangsamten Abnahme des FEV₁ gegenüber einer Kontrollgruppe, die nicht mit β_2 -Sympathomimetika und inhalativen Kortikosteroiden behandelt wurde; zudem konnte die Lebensqualität der Patienten unter Tiotropiumbehandlung gesteigert werden und die Rate an Exazerbationen nahm signifikant ab (Tashkin *et al.*, 2008).

Anticholinergika, insbesondere Tiotropium, stellen somit ein wichtiges Standbein in der Therapie von chronisch-obstruktiven Lungenerkrankungen dar und es ist erstmalig möglich, den Krankheitsverlauf aufzuhalten, was eine therapeutische Wirksamkeit der Anticholinergika über die Bronchodilatation hinaus vermuten lässt. Hervorzuheben ist auch die gute Verträglichkeit der Anticholinergika, bei denen sich ausser einer schwach

ausgeprägten Mundtrockenheit keine klinisch relevanten Nebenwirkungen feststellen lassen.

3.3 Beteiligung von Muskarinrezeptoren am Remodelinggeschehen

Im Blickpunkt der wissenschaftlichen Forschung steht bereits seit längerem die Frage, ob die übermäßige Aktivierung von Muskarinrezeptoren in der Lunge zusätzlich zur Bronchokonstriktion und vermehrten Mukusekretion auch negative Auswirkungen auf die strukturellen Umbauprozessen im Rahmen chronischer Atemwegserkrankungen haben könnte, so dass ein Einsatz von Anticholinergika sich auch positiv auf das Remodelinggeschehen auswirken und damit die Langzeitprognose von COPD-Patienten verbessern könnte.

Anhaltspunkte dafür lassen sich vielfältig in der Literatur finden: in bovinen Glattmuskelzellen der Trachea verstärkte eine Aktivierung des M3-Rezeptors den proliferativen Effekt von PDGF deutlich (Gosens *et al.*, 2003). Zudem wiesen Gosens *et al.* (2005) in einem Asthmamodell an Meerschweinchen nach einer 12-wöchigen Sensibilisierungsphase mit wiederholter Ovalbumin-Exposition einen Anstieg der Muskelmasse und eine erhöhte Kontraktilität der Atemwege nach. Dies konnte in einer Tiotropium-inhalierenden Kontrollgruppe größtenteils verhindert werden, was auf eine Beteiligung muskarinischer Prozesse an der Proliferation der Muskelzellen hinweist. In dem gleichen Asthmamodell an Meerschweinchen konnte ebenfalls die Hypertrophie von Drüsenzellen, die typischerweise in asthmatischen Atemwegen zu finden ist, komplett unterdrückt werden (Bos *et al.*, 2007). Auch die Inhibition der ChAT verringerte die Proliferationsrate von humanen Bronchialepithelzellen (Klapproth *et al.*, 1997). In Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe konnte eine deutliche Steigerung der Proliferationsrate von humanen Lungenfibroblasten(zelllinien) nach Gabe von Muskarinrezeptoragonisten (Carbachol und Oxotremorin) nachgewiesen werden, die sowohl durch die Vorinkubation mit Atropin als auch mit Tiotropium komplett unterdrückt werden konnte (Matthiesen *et al.*, 2006).

Zusätzlich darf auch die Beteiligung des nicht-neuronalen Acetylcholin am inflammatorischen Geschehen nicht ausser Acht gelassen werden: so bewirkt Acetylcholin die Freisetzung inflammatorischer Mediatoren, wie beispielsweise Interleukin 8, Eotaxin und Leukotrien B₄ (Sato *et al.*, 1998; Profita *et al.*, 2005) und die klonale Expansion von Lymphozyten (Kawashima und Fujii, 2000), so dass die Inhalation von Anticholinergika auch antiinflammatorische Effekte mit sich bringen dürfte.

Ob die Kollagensynthese humaner Lungenfibroblasten auch einer Vermittlung über Muskarinrezeptoren unterliegt, war bis dato noch nicht bekannt und sollte in der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden. Bei einer möglichen Beteiligung sollte auch der Muskarinrezeptorsubtyp und der beteiligte Signalweg näher charakterisiert werden, der für diesen Effekt verantwortlich ist.

4 Die Bedeutung erhöhter cAMP-Spiegel nach Rezeptoraktivierung in Atemwegsfibroblasten

Schon seit langer Zeit ist bekannt, dass eine cAMP-Erhöhung in Fibroblasten einen antifibrotischen Phänotyp hervorbringt (Baum *et al.*, 1980; Clark *et al.*, 1983). Es kommt in Folge gesteigerter cAMP-Spiegel zu einer verlangsamten Proliferation, einer verminderten Kollagensynthese, einer abgeschwächten Migration und die Differenzierung hin zu Myofibroblasten kann unterdrückt werden (Kolodsick *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004; White *et al.*, 2005). Wie zu Beginn der Einleitung ausführlich dargelegt, kommt den Atemwegsfibroblasten eine entscheidende Rolle beim Ab- und Aufbau der Extrazellulärmatrix und somit auch bei pathologischen, fibrotischen Umbauprozessen im Rahmen chronischer Lungenerkrankungen zu. Von therapeutischem Interesse ist es folglich eine übermäßige Aktivierung von Fibroblasten, die mit einer vermehrten Proliferation, erhöhter Synthese von Proteinen der Extrazellulärmatrix und einer Differenzierung hin zu Myofibroblasten einhergeht, zu unterbinden. Bis heute steht, trotz vielfältiger Versuche therapeutisch in das fibrotische Geschehen einzugreifen, noch kein Arzneimittel auf diesem Gebiet zur Verfügung (Giri, 2003), so dass die Erforschung antifibrotischer Prozesse und der beteiligten Signalwege von zentralem Interesse für die Entwicklung neuer therapeutischer Optionen sind. Vor diesem Hintergrund stellen cAMP-erhöhende Substanzen einen möglichen therapeutischen Ansatzpunkt dar und eine genauere Untersuchung der cAMP-vermittelten, antifibrotischen Wirkung in (primären) humanen Lungenfibroblasten und der sich anschließenden Signalwege scheint von besonderem Interesse.

4.1 cAMP-vermittelte Signalwege

Im Jahre 1958 konnten Sutherland und Rall Adenosin-3',5'-monophosphat (zyklisches Adenosinmonophosphat, cAMP) als zentralen intrazellulären Botenstoff identifizieren, der an der Übertragung vielfältiger Funktionen – wie der Sekretion, der Migration, dem Zytoskelettaufbau, der Proliferation, der Differenzierung und der Apoptose – in der Zelle beteiligt ist (Beavo und Brunton, 2002; Giri, 2003). Durch Aktivierung G-Proteingekoppelter Rezeptoren, die über eine $G\alpha_s$ -Untereinheit verfügen, kommt es zu einer Aktivierung der membranständigen Adenylylcyclase, die zelluläres Adenosintriphosphat (ATP) in cAMP umwandelt (s. Abb. I-6). Typische Aktivatoren sind Hormone,

Wachstumsfaktoren und Neurotransmitter. Die intrazelluläre cAMP-Konzentration wird neben der Synthese durch die Adenylylcyclase (Cooper, 2003) auch durch deren Inhibition nach Aktivierung $G\alpha_i$ -gekoppelter Rezeptoren und durch den Abbau von cAMP durch Phosphodiesterasen reguliert (Maurice *et al.*, 2003; Tasken und Aandahl, 2004). Eine bedeutende Rolle bei der Adaption des cAMP-Spiegels spielt die Kompartiment-spezifische intrazelluläre Lokalisation der am Auf- und Abbau von cAMP beteiligten Komponenten, so dass Mikrodomänen mit einer lokal regulierten cAMP-Konzentration resultieren; ein Abdiffundieren des Botenstoffes wird durch die in unmittelbarer Nähe befindlichen Phosphodiesterasen unterbunden (Zaccolo und Pozzan, 2002; Wong und Scott, 2004)

Eine Erhöhung der cAMP-Spiegel in der Zelle kann mehrere nachgeschaltete Signalwege anstoßen. Einerseits erfolgt die Regulation von Ionenkanälen, die für die Übertragung olfaktorischer und visueller Signale verantwortlich sind, über die cAMP-Konzentration (Goulding *et al.*, 1992); andererseits können Effektorproteine wie die Proteinkinase A oder die Guaninnukleotidaustauschfaktoren Epac1 und Epac2 aktiviert werden (Krauss, 2003). Weitere Effektoren sind bis dato noch nicht identifiziert, wobei diese Fragestellung weiterhin Gegenstand der aktuellen Forschung ist (Dremier *et al.*, 2003).

Da in (Lungen-)Fibroblasten der Proteinkinase A und den Guaninnukleotidaustauschfaktoren Epac1 und Epac2 eine zentrale Funktion zukommt, sollen diese im Folgenden genauer betrachtet werden.

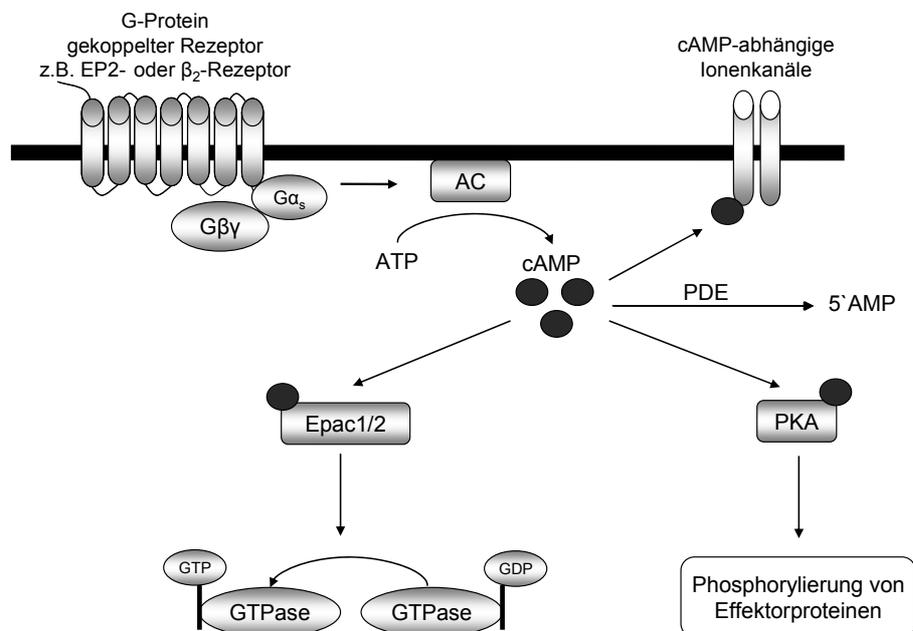


Abb. I-6 Schematische Darstellung cAMP-vermittelter Signalwege in der Zelle. AC = Adenylylcyclase, ATP = Adenosintri-phosphat, cAMP = zyklisches Adenosinmonophosphat, 5'AMP = 5'-Adenosinmonophosphat, Epac1/2 = Guaninnukleotidaustauschfaktoren (*exchange protein directly activated by cAMP*), GDP = Guanosindiphosphat, GTP = Guanosintri-phosphat, PDE = Phosphodiesterase, PKA = Proteinkinase A,

4.1.1 PKA

Die Proteinkinase A (cAMP-abhängige Kinase, PKA) wurde 1968 im Labor von Edwin G. Krebs erstmals entdeckt (Walsh *et al.*, 1968). Seitdem konnte sie als Schlüsselenzym im Zellstoffwechsel mit vielfältigen Funktionen charakterisiert werden (Tasken und Aandahl, 2004; Seino und Shibasaki, 2005) und wurde lange Zeit als alleiniger Überträger cAMP-vermittelter Signalwege betrachtet. Im inaktiven Zustand liegt das Enzym als Heterotetramer, bestehend aus zwei regulatorischen und zwei katalytischen Einheiten, vor. Bei der regulatorischen Untereinheit werden vier verschiedene Typen (RI α , RI β , RII α und RII β) unterschieden und auch die katalytischen Untereinheit weist drei Suuypen auf (C α , C β , C γ). Diese können sich entweder zum PKA-Typ-I-Holoenzym (RI α ₂C₂, RI β ₂C₂) zusammensetzen, das vor allem zytoplasmatisch zu finden ist oder zum PKA-Typ-II-Holoenzym (RII α ₂C₂, RII β ₂C₂), das vorwiegend mit zytoskelettalen Strukturen, Organellen und Membranen assoziiert ist (Seino und Shibasaki, 2005). Die unterschiedliche Gewebeverteilung und die differenzierte Zusammensetzung der PKA-Holoenzyme trägt zu der Vielfalt der biologischen Funktionen bei, die durch die Proteinkinase A vermittelt werden können (Skalhegg und Tasken, 2000).

Die kooperative Bindung von je zwei cAMP-Molekülen an das Holoenzym führt durch Dissoziation des Komplexes in die regulatorische Untereinheit und zwei enzymatisch wirksame Untereinheiten zur Aktivierung der PKA. In ihrer aktiven Form können diese Untereinheiten Zielproteine an Serin- oder Threoninresten durch Übertragung des γ -Phosphates des ATPs phosphorylieren und somit aktivieren (s. Abb. I-7).

Ein weiterer Regulationsmechanismus für die Aktivität der Proteinkinase A ist deren kompartimentspezifische Lokalisation durch Ankerproteine, die sogenannten AKAPs (*A kinase anchoring proteins*). Die regulatorische Untereinheit der PKA wird auf diese Weise an definierten subzellulären Strukturen in der Nähe wichtiger Effektorproteine fixiert, so dass eine hochorganisierte Mikrokompartimentierung resultiert (Zaccolo und Pozzan, 2002; Wong und Scott, 2004). An diesen Ankerproteinen können zusätzlich andere an der cAMP-Signalkaskade beteiligte Komponenten lokalisiert sein; hier sind insbesondere verschiedene Phosphodiesterase und die Epac-Proteine zu nennen (Dodge-Kafka *et al.*, 2005), die durch die gemeinsame Lokalisation innerhalb der Zelle eine definierte räumliche und zeitliche zelluläre Antwort auf veränderte cAMP-Spiegel ermöglichen.

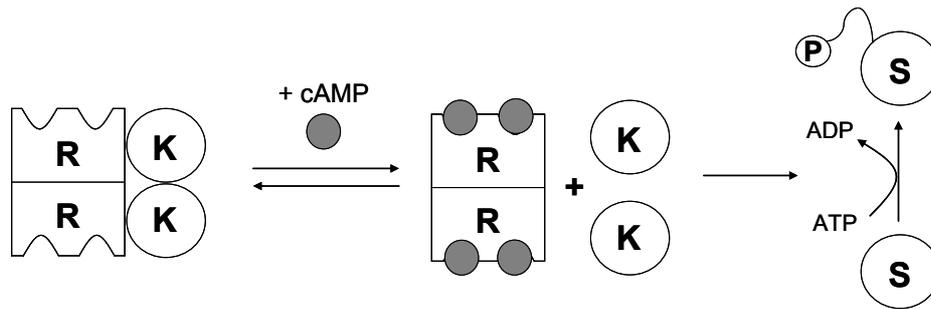


Abb. I-7 Schematische Darstellung der Regulation der Proteinkinase A (abgeändert nach Krauss, 2003); R = regulatorische Untereinheit, K = katalytische Untereinheit, S = Substratprotein, P = Phosphatrest, cAMP = zyklisches Adenosinmonophosphat, ADP = Adenosindiphosphat, ATP = Adenosintriphosphat

Durch Phosphorylierung zytoplasmatischer und nukleärer Effektorproteine ist die Proteinkinase A an vielfältigen Prozessen, wie dem Zellzyklus, der Proliferation, der Differenzierung, der Mikrotubuli-Dynamik, der Regulation von Ionenkanälen, der Genexpression und dem Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsel, beteiligt (Skalhegg und Tasken, 2000; Tasken und Aandahl, 2004; Seino und Shibasaki, 2005).

Im Zusammenhang mit ihrer Funktion in Atemwegsfiblasten ist eine kürzlich erschienene Arbeit von besonderem Interesse, die die Beteiligung der Proteinkinase A an der cAMP-vermittelten Inhibition der Kollagenbildung in primären humanen Lungenfibroblasten belegt (Huang *et al.*, 2007).

4.1.2 Epac

Bei der Suche nach weiteren cAMP-Effektoren, die die PKA-unabhängige Aktivierung des kleinen G-Proteins Rap1 erklären können, wurde im Jahr 1998 von zwei unterschiedlichen Arbeitsgruppen der Guaninnukleotidaustauschfaktor Epac entdeckt (de Rooij *et al.*, 1998; Kawasaki *et al.*, 1998). Guaninnukleotidaustauschfaktoren sind Aktivatoren kleiner G-Proteine sie ersetzen an diesen GDP durch GTP und sorgen somit für die Signalweiterleitung innerhalb der Zelle. Rap1 war die erste kleine GTPase für die eine Aktivierung durch Epac beschrieben wurde (de Rooij *et al.*, 1998; Kawasaki *et al.*, 1998). Weitere Untersuchungen zeigten, dass Rap2 (de Rooij *et al.*, 2000), Ras (Lopez De Jesus *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006) und weitere kleine G-Proteine (Roscioni *et al.*, 2008) ebenfalls durch Epac-Proteine aktiviert werden können. Der Guaninnukleotidaustauschfaktor kommt in zwei von unterschiedlichen Genen exprimierten Isoformen, nämlich Epac1 (neuer offizieller Name RAPGEF3, *Rap guanine nucleotide exchange factor 3*) und Epac2 (neuer offizieller Name RAPGEF4, *Rap guanine nucleotide exchange factor 4*), vor und die Bedeutung dieser beiden Guaninnukleotidaustauschfaktoren für die cAMP-vermittelte Signalübertragung in der Zelle wird zunehmend erkannt. In der Expression gibt es gewebe-

und zellspezifische Unterschiede: Epac1 wird ubiquitär exprimiert wohingegen Epac2 hauptsächlich im Gehirn und in endokrinen Geweben vorkommt (Kawasaki *et al.*, 1998). Die Epac-Proteine sind an der Plasmamembran, perinukleär und an der Kern- oder der Mitochondrienmembran lokalisiert, wobei die subzelluläre Lokalisation der Epac-Proteine stark Zellzyklus-abhängig zu sein scheint (Qiao *et al.*, 2002) und zudem einen wichtigen Faktor für die Regulation darstellt. Es handelt sich bei Epac1 und Epac2 um Multidomänenproteine, die sich grob in eine N-terminale regulatorische und eine C-terminale katalytische Untereinheit unterteilen lassen (s. Abb. I–8). Die regulatorische Untereinheit besteht aus der DEP-Domäne (*Dishevelled*, *Egl-10*, *Pleckstrin-domain*), die für die Membranlokalisierung der Epac-Proteine verantwortlich ist (de Rooij *et al.*, 1998) und einer Domäne, die cAMP mit hoher Affinität bindet (cAMP-B, K_D für die Bindung von cAMP von 2,8 μM für Epac1 und von 1,2 μM für Epac2). Im Falle von Epac2 konnte eine zweite cAMP-bindende Domäne identifiziert werden (cAMP-A), die das zyklische Nukleotid allerdings mit einer geringeren Affinität bindet (K_D für die cAMP-Bindung von 87 μM) und deren biologische Funktion noch nicht genauer charakterisiert wurde (de Rooij *et al.*, 2000; Roscioni *et al.*, 2008). Die katalytische Untereinheit setzt sich aus drei Domänen zusammen: dem *ras exchange motif* (REM) als Brücke zwischen der regulatorischen und der katalytischen Region, der *ras-associating domain* (RA), die typisch für Ras-interagierende Proteine ist, und der CDC25-Homologie-Domäne (CDC25HD), die für die Guaninnukleotidaustauschfunktion der Epac-Proteine verantwortlich ist.

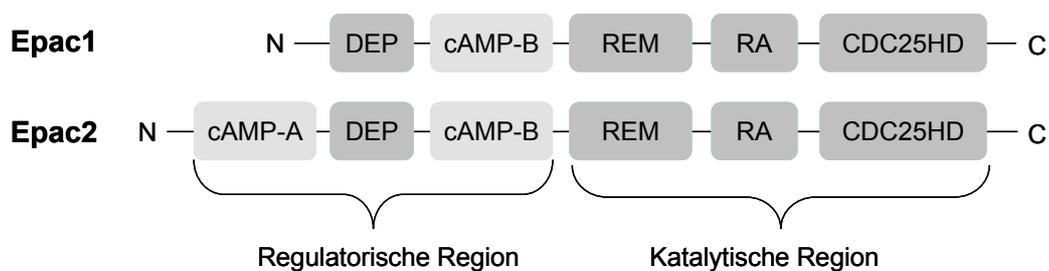


Abb. I–8 Schematische Darstellung der Multidomänenproteine Epac1 und -2 (abgeändert nach Bos, 2006).

C	c-terminales Ende des Proteins
cAMP-A/B:	cAMP-bindende Domänen
DEP	(<i>Dishevelled</i> , <i>Egl-10</i> , <i>Pleckstrin</i>)-Domäne
N	N-terminales Ende des Proteins
REM	<i>ras exchange motif</i>
RA	<i>ras-associating domain</i>
CDC25HD	CDC25-Homologie-Domäne

Anhand der Röntgenkristallstruktur von Epac2 wurde die Regulation des Guaninnukleotid-austauschfaktors durch cAMP näher charakterisiert: in Abwesenheit von cAMP bedeckt die regulatorische Region die katalytische Region. Dies führt zu einer sterischen

Abdeckung des katalytischen Zentrums, das nach Anlagerung von cAMP und nachfolgender Konformationsänderung freigelegt wird, so dass das Protein als Guaninnukleotidaustauschfaktor fungieren kann (Rehmann *et al.*, 2006).

Die Bedeutung der Epac-Proteine wird durch ihre Beteiligung an vielfältigen Funktionen in der Zelle, so z. B. an der Integrin-vermittelten Zelladhäsion (Gupta und Yarwood, 2005), an Sekretionsvorgängen (Ozaki *et al.*, 2000), an der Formation von Zell-Zell-Verbindungen (Kooistra *et al.*, 2005), der Regulation intrazellulärer Calciumspiegel (Schmidt *et al.*, 2001), der Apoptose (Kwon *et al.*, 2004), der Zelldifferenzierung (Shi *et al.*, 2006; Martini *et al.*, 2008) und der Genexpression (Lotfi *et al.*, 2006), unterstrichen.

Vor allem der Einsatz membrangängiger, Epac-spezifischer cAMP-Analoga hat die Forschung auf diesem Gebiet bereichert. Diese Substanzen stellen wirkungsvolle pharmakologische Werkzeuge dar, um zwischen PKA- und Epac-vermittelten Signalwegen zu unterscheiden. Im Jahr 2002 gelang Enserink und Kollegen mit der Synthese von 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (s. Abb. I-9, B) zum ersten Mal die Herstellung eines Epac-spezifischen cAMP-Analogons, welches nicht zu einer Aktivierung der PKA führte (Enserink *et al.*, 2002). Durch Methylierung der Ribose konnte die für die PKA-Interaktion essentielle Hydroxylgruppe maskiert werden. Da die für diese Wechselwirkung verantwortliche Aminosäure Glutamat an der cAMP-Bindestelle der Epac-Proteine nicht vorkommt, beeinträchtigt die Maskierung die Interaktion des Analogons mit den Epac-Proteinen nicht. Durch die zusätzliche Einführung eines Parachlorophenylthioestes an Position 8 des Adenins konnte die Spezifität dahingehend optimiert werden, dass das Analogon mit einer 4.6fach höheren Affinität an die Epac-Proteine bindet als das cAMP selbst und infolgedessen auch als „Superaktivator“ der Epac-Proteine bezeichnet wird (Rehmann *et al.*, 2003; Holz *et al.*, 2008).

Eine Weiterentwicklung dieses cAMP-Analogons ist das Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS (s. Abb. I-9, B), ein Phosphorothioat-Derivat des 8-pCPT-2'-O-Me-cAMPs, das im Gegensatz zu der Ursprungsverbindung resistent gegenüber einem hydrolytischen Abbau durch Phosphodiesterasen ist, so dass durch bioaktive Metabolite ausgelöste Effekte unterbunden und sicher auf die Aktivierung der Epac-Proteine zurückgeführt werden können. Als Negativkontrolle Epac-vermittelter Signalwege bietet sich 8-pCPT-2'-O-Me-cGMP (s. Abb. I-9, D) an, ein cGMP-Analogon, das die gleichen Substituenten wie 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP aufweist, aber nicht zu einer Aktivierung Epac-abhängiger Signalkaskaden führt (Holz *et al.*, 2008).

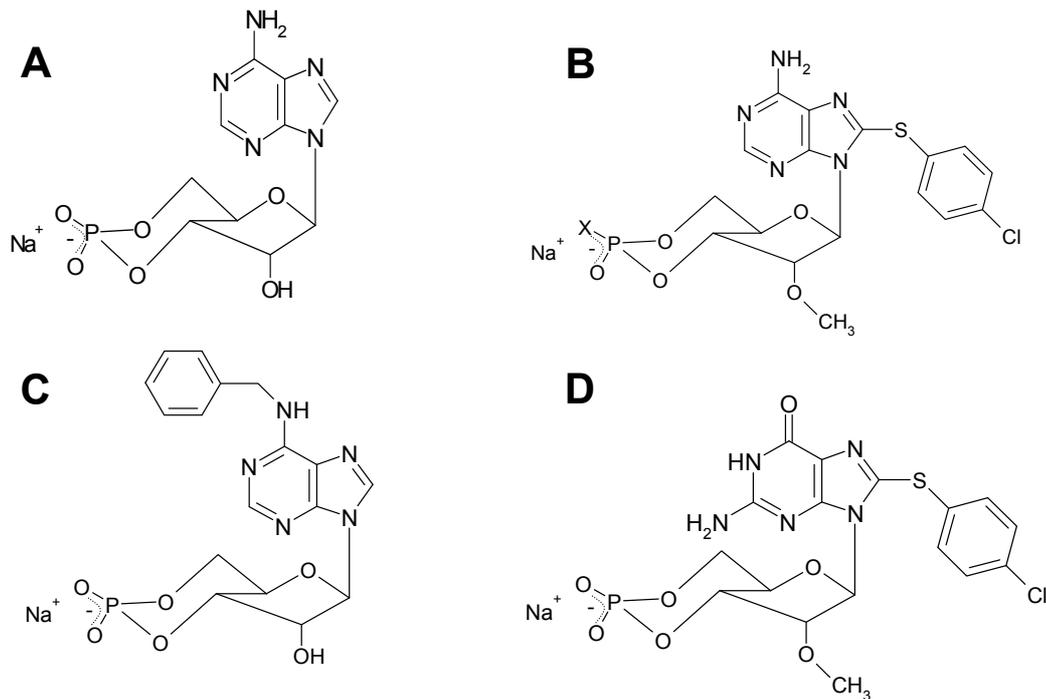


Abb. I-9 Strukturformeln von cAMP abgeleiteten cAMP-Analoga
 (A) cAMP als Leitstruktur für die Entwicklung spezifischer Analoga
 (B) x = O: 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP,
 x = S: Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS (Epac-spezifische cAMP-Analoga)
 (C) 6-Bnz-cAMP (PKA-spezifisches cAMP-Analagon)
 (D) 8-pCPT-2'-O-Me-cGMP (cAMP-Analagon, das weder die PKA noch die Epac-Proteine aktiviert)

Analog zu den Epac-spezifischen Analoga gibt es auch cAMP-Derivate, die präferentiell die Proteinkinase A aktivieren, wie beispielsweise das 6-Bnz-cAMP (s. Abb. I-9, C). Durch die Einführung des Benzylrestes in Position 6 des Adenins wird eine Interaktion des Analogons mit Epac-Proteinen sterisch unterbunden, wohingegen die PKA-Aktivierung weiterhin möglich ist (Christensen *et al.*, 2003).

4.2 Mögliche therapeutische Effekte einer rezeptorvermittelten Aktivierung der Adenylylcyase in Lungenfibroblasten unter besonderer Berücksichtigung der EP2-Rezeptoren

Prostaglandin E₂ (PGE₂, s. Abb. I-10)) ist ein Lipidmediator, der sich von der Arachidonsäure unter Katalyse der Cyclooxygenaseenzyme (COX-1 und -2) ableitet. Dem Prostaglandin E₂ wird eine Vielzahl verschiedener physiologischer Funktionen zugeschrieben: im Allgemeinen wird PGE₂ als proinflammatorischer Mediator betrachtet, der in vielen entzündlichen Krankheiten eine Rolle spielt aber auch an physiologischen Prozessen wie der Magensäuresekretion, dem renalen Blutfluss und der Ovulation beteiligt ist (Narumiya *et al.*, 1999). In der Lunge nimmt das Prostaglandin E₂ allerdings eine

Sonderstellung ein und es vermittelt dort antiinflammatorische, bronchodilatierende und antifibrotische Effekte (Vancheri *et al.*, 2004).

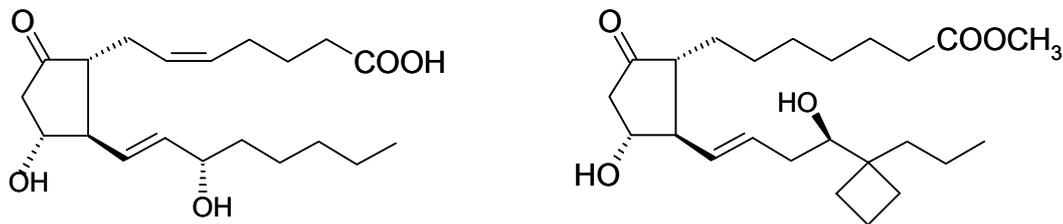


Abb. I-10 Strukturformel des Prostaglandin E₂ (links) und des EP2-Rezeptor-spezifischen Agonisten Butaprost (rechts)

Die Aktivität des Prostaglandin E₂ wird durch vier verschiedene EP-Rezeptorsubtypen vermittelt (EP1-EP4), die an unterschiedliche G-Proteine gekoppelt sind (Sugimoto und Narumiya, 2007). Bei den EP2- und EP4-Subtypen handelt es sich um G_{αs}-gekoppelte Rezeptoren, so dass eine Aktivierung dieser Rezeptoren eine gesteigerte cAMP-Synthese in der Zelle nach sich zieht. Die Aktivierung des EP1-Rezeptors führt zu einer intrazellulären Calciummobilisation und die EP3-Rezeptoren können an unterschiedliche G-Proteine koppeln und somit sowohl zu einer Aktivierung oder einer Inhibierung der Adenylylcyclase als auch einer Calciumfreisetzung in der Zelle führen. Durch die zell- und gewebespezifische Expression der Rezeptorsubtypen und die verschiedenenartigen nachgeschalteten Signalkaskaden erklärt sich die enorme Vielfalt der biologischen Effekte die durch Prostaglandin E₂ ausgelöst werden können.

In der Lunge wird das Prostaglandin E₂ maßgeblich von Epithelzellen und glatten Muskelzellen aber auch von Fibroblasten freigesetzt und es scheint dort an vielfältigen physiologischen Funktionen, wie der Bronchodilatation, dem Entzündungsgeschehen und auch der Gewebemöostase, beteiligt zu sein (Vancheri *et al.*, 2004).

Die möglichen positiven Effekte des Prostaglandin E₂ im Zusammenhang mit chronischen Atemwegserkrankungen konnten bereits vielfach unter Beweis gestellt werden; so führte beispielsweise die Inhalation von PGE₂ in Metacholin-exponierten Mäusen zu einer Bronchodilatation, die in EP2-Rezeptor-Knockout-Mäuse nicht mehr detektierbar ist (Sheller *et al.*, 2000). Antiinflammatorische Effekte des Prostaglandin E₂ kommen durch eine verminderte Rekrutierung von am Entzündungsgeschehen beteiligten Zellen und die verminderte Freisetzung von Entzündungsmediatoren zustande; dies zeigte sich beispielsweise in einer Placebo-kontrollierten Studie mit asthmatischen Patienten (Hartert *et al.*, 2000), in der die Prostaglandin D₂-Freisetzung aus Mastzellen und die Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten durch die Inhalation von PGE₂ deutlich vermindert werden konnte. Im Hinblick auf das Remodelinggeschehen treten vor allem die positiven

antifibrotischen Effekte des Prostaglandin E₂ in den Vordergrund. In Atemwegs-fibroblasten konnte der ausgeprägte inhibitorische Effekt des Prostaglandin E₂ auf die Proliferation, die Kollagensynthese und die Differenzierung bereits mehrfach belegt werden (Kolodsick *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004). In diesem Zusammenhang konnte auch eine um 50 % reduzierte Konzentration von Prostaglandin E₂ im Lungensekret von Patienten mit idiopathischer pulmonaler Fibrose im Vergleich zu gesunden Probanden nachgewiesen werden (Borok *et al.*, 1991). Es scheint folglich ein wichtiger antifibrotischer Mediator im Lungengewebe dieser Patienten zu fehlen und dies könnte eine Erklärung für die übermäßige Fibrosierung sein. Untermauert wird die Bedeutung des PGE₂ bei der Genese fibrotischer Lungenerkrankungen auch durch Ergebnisse an isolierten Lungenfibroblasten von IPF-Patienten, bei denen eine stark verminderte COX-2-Induktion einhergehend mit einer deutlich abgeschwächten PGE₂-Synthese nachgewiesen werden konnte (Wilborn *et al.*, 1995). Gleiches ließ sich auch bei glatten Muskelzellen isoliert aus asthmatischen Atemwegen feststellen, bei denen signifikant weniger COX-2 und PGE₂ verglichen mit nicht-asthmatischen Zellen zu finden war (Chambers *et al.*, 2003). Diese Daten betonen die physiologische Bedeutung endogener PGE₂-Spiegel bei der Aufrechterhaltung der Gewebemöostase und stützen die Hypothese, dass es bei fibrotischen Erkrankungen zu einem Ungleichgewicht zwischen pro- und antifibrotischen Signalwegen kommt (Charbeneau und Peters-Golden, 2005). Da chronische Lungenerkrankungen häufig mit einer Schädigung des Lungenepithels einhergehen und somit die Hauptlieferanten des PGE₂ weniger von diesem bedeutenden, antifibrotischen Lipidmediator synthetisieren können, könnte eine externe therapeutische Gabe von EP-Rezeptoragonisten ein sinnvoller Ansatz sein, um eine übermäßige Fibrosierung des Gewebes zu verhindern.

II Zielsetzung

Den Fibroblasten der Atemwege kommt eine bedeutende Rolle bei fibrotischen Umbauprozessen zu, die als Langzeitfolge chronischer Atemwegserkrankungen auftreten. Eine Überaktivierung der Atemwegsfibroblasten als Folge der inadäquaten Kontrolle der bei chronischen Atemwegserkrankungen auftretenden Entzündung führt zu einer übermäßigen Bildung von Bindegewebe und trägt somit zur Fibrosierung der Atemwege bei. Fibroblasten sind durch eine verstärkte Proliferation und Synthese von Komponenten der Extrazellulärmatrix wesentlich an diesem bindegewebigen Umbau beteiligt. Bis dato stehen noch keine therapeutischen Optionen zur Behandlung dieser übermäßigen Fibrosierung zur Verfügung. Auch bezüglich der Signalwege, die fibrotische bzw. antifibrotische Effekte in Atemwegsfibroblasten auslösen, besteht noch ein enormer Forschungsbedarf. Ein tiefergehendes Verständnis fibrotischer Vorgänge in Fibroblasten und die Identifizierung von an fibrotischen Prozessen beteiligten Komponenten ist vor dem Hintergrund neuer therapeutischer Optionen von besonderem Interesse.

In diesem Zusammenhang wurden in der vorliegenden Arbeit humane Atemwegsfibroblasten als *in vitro*-Zellmodell genutzt, um verschiedene Signal- und Stoffwechselwege zu untersuchen, die an der Regulation der Kollagensynthese und der Proliferation beteiligt sein und somit im Remodelinggeschehen der Atemwege eine Rolle spielen könnten.

1) Die aktive Beteiligung der Arginaseisoenzyme an fibrotischen Prozessen wie der vermehrten Kollagenbildung aber auch einer verstärkten Proliferation wird in der Literatur rege diskutiert. Im Mittelpunkt der Untersuchungen stand die Frage, ob und inwiefern die Arginaseisoenzyme in humanen Atemwegsfibroblasten exprimiert werden und ob sie über die Bereitstellung von L-Ornithin die fibrotischen Eigenschaften wie die Kollagenbildung und die Proliferation in diesen Zellen beeinflussen. Auch eine mögliche Regulation der Arginaseisoenzyme durch Entzündungsmediatoren, wie die Interleukine IL-4 und IL-13 oder der Wachstumsfaktor PDGF, die charakteristischerweise bei Atemwegserkrankungen eine Rolle spielen, sollte vor diesem Hintergrund untersucht werden.

2) Eine weitere Fragestellung war, ob und in welchem Maße die verstärkte Aktivität des cholinergen Systems im Rahmen chronisch-entzündlicher Atemwegserkrankungen an strukturellen Umbauprozessen beteiligt ist und ob der Einsatz von Anticholinergika in der Therapie chronischer Atemwegserkrankungen über die Bronchodilatation und Inhibition der Mukussekretion hinaus positive Effekte auf die chronischen Umbauprozesse haben könnte. Die durch Muskarinrezeptoragonisten ausgelöste vermehrte Proliferation von Atemwegsfibroblasten und die Antagonisierbarkeit dieses Effektes durch Anticholinergika konnte bereits charakterisiert werden (Matthiesen *et al.*, 2006; Pieper *et al.*, 2007). Bis dato gibt es aber noch keine Daten zum Einfluss von Muskarinrezeptoren auf die Kollagensynthese von Atemwegsfibroblasten und die möglichen positiven Auswirkungen von Anticholinergika in diesem Zusammenhang. Ob Muskarinrezeptoren an der Kollagensynthese beteiligt sind und wenn ja, welcher Muskarinrezeptorsubtyp bzw. welcher Signalweg dafür verantwortlich ist, sollte an humanen Lungenfibroblasten näher untersucht werden.

3) Die starke antifibrotische Wirkung erhöhter intrazellulärer cAMP-Spiegel in Atemwegsfibroblasten ist schon seit langem bekannt. Die Signalwege der verschiedenen antifibrotischen Effekte nach Erhöhung der cAMP-Spiegel sind allerdings noch nicht genauer untersucht. Kürzlich konnte der Signalweg der cAMP-vermittelte Inhibition der Kollagensynthese in Atemwegsfibroblasten näher charakterisiert werden und die Beteiligung der Proteinkinase A an diesem Prozess beschrieben werden (Huang *et al.*, 2007). Entsprechende Untersuchungen zur Aufklärung des Signalweges der cAMP-vermittelten Inhibition der Proliferation lagen für Atemwegsfibroblasten noch nicht vor.

Ziel der Untersuchungen war die Aufklärung des Signalweges der antifibrotischen Wirkungen des Botenstoffes cAMP in (primären) humanen Lungenfibroblasten. Neben der Proteinkinase A rückten dabei die Guaninnukleotidaustauschfaktoren Epac1 und Epac2 in den Mittelpunkt des Interesses, deren Bedeutung bei der cAMP-vermittelten Signalübertragung zunehmend erkannt wird.

Um sich diesen Fragestellungen zu nähern, wurden mehrere humane Atemwegsfibroblastenzelllinien (MRC 5, Hel 299, IMR 90) und primäre humane Lungenfibroblasten (phLFb) mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden und funktionellen Assaysystemen

untersucht. Hierzu wurden hauptsächlich die Techniken der Expressionanalyse mittels RT-PCR und Western Blot auf mRNA bzw. auf Proteinebene, radioaktive Assaysysteme zur Bestimmung der Proliferationsrate und der Kollagensynthese, ein nicht-radioaktiver Enzymassay zur Ermittlung der Arginaseaktivität, ein kommerzielles Assaysystem zur Ermittlung der Rap1-Aktivität und die siRNA-Technik (siRNA = *small interfering RNA*) zum gezielten *Knock-Down* der Epac-Proteine verwendet.

III Material und Methoden

1 Material

1.1 Arbeitsgeräte

Analysenwaage BP221 D, 2258	Sartorius, Göttingen
Autoklav 80230	Webeco, Bad Schwartau
Brutschränke: Incubator Infrared CO ₂	Forma Scientific, Marietta, USA
Steri-Cycle CO ₂ Incubator	Thermo Electron, Dreieich
Elektrophorese- und Blottingkammer: NuPAGE	Invitrogen, Karlsruhe
Photodokumentationssystem Power Shot G5	Canon, Krefeld
Mikroskop IMT2-RFL	Olympus, Hamburg
Halbmikro-Küvetten 10 x 4 x 45 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Heizblöcke und Thermocycler:	
PCR Thermal Reactor	MWG, Ebersberg
MyCycler	BioRad, München
Hyperfilm ECL	Amersham, Braunschweig
pH-Elektrode SenTix 81	WTW GmbH, Weilheim
pH-Meter inoLab 1	WTW GmbH, Weilheim
Photometer: DU-64	Beckman, München
Gene Quant II	Pharmacia, Freiburg
SmartSpecTMPlus	BioRad, München
PVDF Blotting Membran Immobilion P	Millipore, Eschborn
Quarzküvette 10x15 mm Suprasil	Hellma, Müllheim
Real-Time PCR, MX3000P	Stratagene, La Jolla, USA
Sicherheitswerkbänke LaminAir HB HBB 2436	Holten, Allerød, Dänemark
Spannungsgeräte: 2297 Macrodrive 5	LKB Bromme, Schweden
Power Pac 300	BioRad, München
Szintillationszähler Tri-Carb 2100TR	Packard, Dreieich
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg

Zentrifugen: 54115 C, 5804 R Kühlzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Labofuge GL, Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Mini-Zentrifuge MCF 2360	LMS, Tokio, Japan

1.2 Verbrauchsmaterialien

Bechergläser, 10, 20, 100, 250, 1000 ml	Schott AG, Mainz
Glasflaschen, 500, 1000 ml	Schott AG, Mainz
Glas-Petrischale	Schott AG, Mainz
Halbmikro-Küvetten, 10x4x45 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Kryo-Röhrchen	Nunc, Roskilde, Dänemark
Kunststoffröhrchen, 13 ml, steril	Sarstedt, Nümbrecht
Messpipetten, 5, 10, 20 ml	Brand, Wertheim
Messzylinder, 250, 500 ml	Brand, Wertheim
Multischalen Nunclon Surface, 6-, 12- und 12-Loch-Platten	Nunc, Roskilde, Dänemark
Pipettenspitzen, 10, 100, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen (mit Filtereinsatz), 10, 100, 1000 µl	MßP, San Diego, USA
Pipettenspitzen Multi-Pipetten, 1 ml, 10 ml, 12,5 ml	Combitips plus, Eppendorf, Hamburg
Polyethylen-Röhrchen, 8 ml	Packard Instrument, Dreieich
Reaktionsgefäße, 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße, 0,5, 2 ml,	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen, 50 ml, steril	Cellstar, Greiner Bio-one, Solingen
Zellkulturflaschen, 160, 400 ml	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellschaber, 25 cm	Sarstedt, Nümbrecht

1.3 Enzyme

Collagenase Typ 2 (277 u/mg)	Worthington, Lakewood, USA
Collagenase, High Purity	Sigma-Aldrich, München
DNase (RNase free DNase Set)	Qiagen, Hilden
Omniscript Reverse Transkriptase	Qiagen, Hilden
RNase Inhibitor RNasin Plus (40 U/µl)	Promega, Madison, USA
Taq DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe

1.4 Größenmarker und Nukleinsäuren

BLOCK-iT™ Fluorescent Oligo	Invitrogen, Karlsruhe
-----------------------------	-----------------------

DNA Ladder Ready-Load 100bp	Invitrogen, Karlsruhe
Epac1 siRNA (human), custom (GCACCUACGUCUGCAACAA)	Pierce/ Perbio, Rockford, USA
Epac2 siRNA (h), sc-41702	Santa Cruz, USA
Kaleidoskop Prestained Standards	BioRad, München
dNTP-Mix (je 10 mM pro Nukleotid)	Fermentas, St. Leon-Rot
Oligonukleotide (dT)18	MWG, Ebersberg
ON-TARGETplus siCONTROL	Pierce/ Perbio, Rockford, USA

1.5 Kits für die Molekularbiologie

BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD)	Roche, Mannheim
DC (Detergent compatible) Protein Assay Kit	BioRad, München
<i>EZ-DetectTM Rap1-Activation Kit</i>	Pierce/ Perbio, Rockford, USA
NE-PER [®] <i>Nuclear and Cytoplasmic Extraction-Kit</i>	Pierce/ Perbio, Rockford, USA
Reagents	
Omniscript RT Kit	Qiagen, Hilden
QuantiTect [®] SYBR [®] Green PCR	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
TaqDNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe

1.6 Chemikalien

Agarose NEEO	Roth, Karlsruhe
Aprotinin	Sigma-Aldrich, München
AquaResist	VWR, Darmstadt
L-Arginin HCl	Sigma-Aldrich, München
L-Ascorbinsäure	Merck, Darmstadt
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, München
BSA (bovines Serumalbumin)	Sigma-Aldrich, München
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt

Entwickler-Stammlösung	Sigma-Aldrich, München
Ethanol, absolut	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München
Etylendiamintetraacetat (EDTA), Disodium Salt	Sigma-Aldrich, München
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin
Ficoll 400	Sigma-Aldrich, München
Fixierer-Stammlösung	Sigma-Aldrich, München
Glycin	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Merck, Darmstadt
α -Isonitrosopropiophenon	Sigma-Aldrich, München
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Leupeptin (Hemisulfate Salt)	Sigma-Aldrich, München
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Lumasafe plus Szintillationsflüssigkeit	Lumac LSC, Groningen
Magnesiumchlorid Hexahydrat (MgCl ₂ x 6 H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Mangan(II)chlorid Monohydrat (MnCl ₂ x H ₂ O)	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver, fettfrei	Heirler, Radolfzell
MOPS SDS Running-Buffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe
N-(1-Napthyl)-ethylendiamin Dihydrochlorid	Sigma-Aldrich, München
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich, München
Natriumfluorid	Merck, Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid Plätzchen (NaOH)	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, München
Non essential amino acids (100x)	Sigma-Aldrich, München
Nonidet P-40	Roche, Mannheim

Penicillin/Streptomycin-Lösung (10000 U/ml, 10 mg/ml)	Sigma-Aldrich, München
Pepstatin A	Sigma-Aldrich, München
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, München
Phosphorsäure 85 % (H ₃ PO ₄)	Roth, Karlsruhe
Ponceau S	Sigma-Aldrich, München
Protease	Sigma-Aldrich, München
Pronase	Calbiochem, San Diego, USA
RotiLoad 1	Roth, Karlsruhe
Salzsäure 32 % (konz. HCl)	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure 95 % (konz. H ₂ SO ₄)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, München
Sodium Pyruvat Solution (SPS) 100 mM	PAA, Cölbe
Sulfanilamid	Merck, Darmstadt
Trichloressigsäure (TCA)	Merck, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan- Hydrochlorid (Tris HCl)	Boehringer, Mannheim
Triton X-100	Boehringer, Ingelheim
Trypan Blue Stain (0,4 %)	Sigma-Aldrich, München
10xTrypsin-EDTA Lösung	Sigma-Aldrich, München
Tween 20	Sigma-Aldrich, München

1.7 Radiochemikalien

[³ H]-Prolin (spezifische Aktivität = 1,813 TBq/mmol)	Perkin Elmer; Boston
[³ H]-Thymidin (spezifische Aktivität = 370 GBq/mmol)	Perkin Elmer, Boston

1.8 Nährmedien

<i>Minimal Essential Medium Eagle</i> (MEM) <i>with Earle's Salt</i>	PAA, Cölbe
<i>Opti-MEM[®] I Reduced-Serum Medium</i> (1X),	Invitrogen, Karlsruhe

1.9 Testsubstanzen

Testsubstanzen	Lösungsmittel der Stammlösung	Eingesetzte Konzentration	Firma	Funktion
AH 6809	DMSO	10 μ M	Sigma	Antagonist am DP, EP1- und EP2-Rezeptor
BEC = S-(2-Boronoethyl)-L-cystein	H ₂ O	100 μ M	Alexis	Arginaseinhibitor
6-Bnz-cAMP	H ₂ O	1-500 μ M	Biolog	Selektiver PKA-Aktivator
8-Bromo-cAMP	10 mM NaOH	10 μ M-600 μ M	Sigma	Synthetisches cAMP-Analagon
Butaprost	DMSO	100 pM - 3 μ M	Sigma	Selektiver EP2-Rezeptor-Agonist
Carbachol	H ₂ O	100 nM - 10 μ M	Sigma	Nicht selektiver cholinerg Agonist
8-pCPT-2'-O-Me-cAMP	H ₂ O	1-300 μ M	Biolog	Selektiver Epac-Aktivator
8-pCPT-2'-O-Me-cGMP	H ₂ O	1-100 μ M	Biolog	cGMP-Analagon (Epac-Negativkontrolle)
Cycloheximid	H ₂ O	30 μ g/ml	Sigma	Inhibitor der Proteinbiosynthese
Dibutyryl cAMP	H ₂ O	10 μ M-600 μ M	Sigma	Synthetisches cAMP-Analagon
Forskolin	DMSO	1-30 μ M	Hoechst	Aktivator der Adenylylcyclase
H89	DMSO	10 nM-10 μ M	Calbiochem	PKA-Inhibitor
IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin)	DMSO	1-30 μ M	Biomol	Nicht-selektiver PDE-Inhibitor
Interleukin 13	0,1 % BSA in 1xPBS	10 ng/ml	Sigma	Zytokin
Interleukin 4	0,1 % BSA in 1xPBS	10 ng/ml	Sigma	Zytokin
Isoprenalin	H ₂ O (0,01 mg/ml Ascorbinsäure)	1 nM-1 μ M	Sigma	Nicht-selektiver β -Rezeptoragonist
KT5720	DMSO	1-300 nM	Calbiochem	PKA-Inhibitor
Nikotin(hydrogen-tartrat)	H ₂ O	1-100 μ M	Sigma	Agonist am nikotinischen Acetylcholinrezeptor
Nor-NOHA, N ^o -hydroxy-nor-L-arginin	H ₂ O	1-100 μ M	Alexis	Arginaseinhibitor
Oxotremorin	H ₂ O	100 nM-10 μ M	Sigma	Agonist am muskarinischen Acetylcholinrezeptor
PD 98059	DMSO	30 μ M	Sigma	MEK-Inhibitor
PDGF-AB, human	0,1 % BSA in 4 mM HCl	1-100 ng/ml	Sigma	Wachstumsfaktor
Pertussistoxin	H ₂ O	0,1 μ g/ml	Sigma	Toxin aus Bordetella pertussis
PKI 14-22	H ₂ O	100 nM-30 μ M	Sigma	PKA-Inhibitor, Oligopeptid

Testsubstanzen	Lösungsmittel der Stammlösung	Eingesetzte Konzentration	Firma	Funktion
Propranololhydrochlorid	H ₂ O	100 nM	Calbiochem	β-Adrenozeptorblocker
Rp-8-Br-cAMPS	H ₂ O	100 μM	Biolog	Membranpermeabler Antagonist der PKA
Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS	H ₂ O	1-100 μM	Biolog	Spezifischer, membranpermeabler Epac-Aktivator (metabolisch stabil)
TGF-β, human, rekombinant	0,1 % BSA in 4 mM HCl	5 ng/ml	Sigma	Wachstumsfaktor
Tiotropiumbromid	H ₂ O	10 pM-10 nM	Boehringer-Ingelheim	Muskarinrezeptor-Antagonist
Tyrphostin AG 1296	DMSO	5 μM	Sigma	Selektiver PDGF-Rezeptor-Inhibitor

1.10 Antikörper und Primer

1.10.1 Primärantikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Herkunft
<i>α-smooth-muscle</i> -Aktin	Maus	1:1000	Sigma
Kollagen I	Kaninchen	1:750	Cedarlane
p-CREB	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling
Epac1 (A5)	Maus	1:200	Santa Cruz
Epac2 (A7)	Maus	1:200	Santa Cruz
Epac2 (M18)	Ziege	1:200	Santa Cruz
ERK 2	Kaninchen	1:500	Santa Cruz
p42/44	Kaninchen	1:1000	New England Biolabs
Rap1	Kaninchen	1:1000	Pierce
α-Tubulin	Maus	1:1000	Cedarlane

1.10.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Herkunft
anti-Kaninchen	Ziege	1:2667	Calbiochem
anti-Maus	Ziege	1:5000	Santa Cruz
anti-Ziege	Esel	1:2000	Santa Cruz

1.10.3 Primer für die semiquantitative PCR

Primer	Sequenz (sense und anti-sense)	Länge (bp)	Annealing-temp. (°C)	Zyklen
β-Aktin	5'-CACTCTTCCAGCCTTCCTTC-3' 5'-CTCGTCATACTCCTGCTTGC-3'	813	56	23
Arginase I	5'-TTCTCAAAGGGACAGCCACG-3' 5'-CGAAACAAGCCAAGGTTATTGC-3'	870	56	35-40
Arginase II	5'-AAGGAGTGGAGCATGGTCCC-3' 5'-GCTTGAAGCAATCACATCTACTGC-3'	848	56	30
Epac1	5'-GCACTTCGTGGTACATTATCTGG-3' 5'-GAATGTCTCTGTTGGGTCATGAG-3'	412	56	30
Epac2	5'-CCATCTTTCTACCACAGTGAAAC-3' 5'-GTGTTAATGACATCACAGTATAC-3'	439	54	30
EP1-Rezeptor	5'-CTCGCCGCGCTGTGCAACACGC-3' 5'-GGCCTCCCAGGCGCTCGGTGTTAGGCC-3'	653	62	40
EP2-Rezeptor	5'-TTCATCCGGCACGGGCGGACCGC-3' 5'-GTCAGCCTGTTTACTGGCATCTG-3'	517	62	30
EP3-Rezeptor	5'-CCATCCCCTCCTCACCTC-3' 5'-CGATGTGCTCCCAACGCT-3'	397	59	40
EP4-Rezeptor	5'-TTTCCAGACTGAGCAGGACAAGGT-3' 5'ATAGGCATGGTTGATGGCCAGGTA-3'	525	56	35
M1-Rezeptor	5'-CAGGCAACCTGCTGGTACTC-3' 5'-CGTGCTCGGTTCTCTGTCTC-3'	538	58	35
M2-Rezeptor	5'-CTCCTCTTAACAATAGCCTGG-3' 5'-GGCTCCTTCTTGTCCTTCTT-3'	654	53	35
M3-Rezeptor	5'-GGACAGAGGCAGAGACAGAA-3' 5'-GAAGGACAGAGGTAGAGTGG-3'	560	60	35
M4-Rezeptor	5'-ATCGCTATGAGACGGTGGAA-3' 5'-GTTGGACAGGAACTGGATGA-3'	498	58	35
M5-Rezeptor	5'-ACCACAATGCAACCACCGTC-3' 5'-ACAGCGCAAGCAGGATCTGA-3'	751	57	35
ODC	5'-CCTTCGTGCAGGCAATCTCT-3' 5'-GCTGCATGAGTCCCACGCA-3'	636	55	30
OAT	5'-GGGAGCATGGGTCCACATACGGT-3' 5'-CACATCAAAACAATTCAACTGAA-3'	606	55	30
PDGF-R A	5'-AACTGATCCCGAGACTCCTG-3' 5'-CCGCACCTCTACAACAAAATG-3'	565	54	35
PDGF-R B	5'-ACCATTCCATGCCGAGTAACA-3' 5'-CAGGTGTAGGTCCCCGAGTCT-3'	437	56	35

1.10.4 Primer für die quantitative Real-Time PCR

Primer	Sequenz	Länge (bp)	Annealing-Temp. (°C)	Zyklen
Epac1	5'-AGTTTCCCACCTCCACGAGGAC-3' 5'-ACATAAGCCCAGGTGCTGGCTG-3'	99	55	50
Epac2	5'-CATGACCAAGATGTCTTGGTGC-3' 5'-GTGTTAATGACATCACAGTATAC-3'	106	55	50
GAPDH	5'-CTGCACCACCAACTGCTTAGC-3' 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'	87	55	50

1.11 Software

Software	Anwendung
Adobe Standard 8.0	Erstellen von PDF-Dokumenten
Graph Pad Prism 5.00	Graphische Darstellungen
Graph Pad InStat 3.01	Statistische Auswertungen
MS Office 2003	Berechnungen/ Abbildungen/ Textverarbeitung
MxPro	Auswertung der Real-Time PCR
IrfanView 4.00	Photobearbeitung
RFLPscan 2.01	Quantitative Erfassung optischer Dichten

2 Methoden

2.1 Zellkultur

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit primären humanen Lungenfibroblasten (phLFb) und mit verschiedenen humanen Lungenfibroblastenzelllinien gearbeitet (MRC 5, IMR 90, Hel 299). Für alle Zellen wurde *Minimum Essential Medium Eagle (MEM with Earles's Salts)* der Firma PAA verwendet, das je nach Versuchsbedingungen mit einer Antibiotikaauslösung, Natriumpyrosulfat (SPS), nicht essentiellen Aminosäuren (NEAA) und verschiedenen Mengen an FKS (0, 1, 5, 10 %) versetzt wurde.

2.1.1 Präparation und Kultur der primären humanen Lungenfibroblasten

Die primären humanen Lungenfibroblasten (phLFb) wurden aus einem peripheren Lungengewebestück gewonnen, das Patienten mit einem Bronchialkarzinom nach ihrem Einverständnis im Rahmen einer Lobektomie entnommen wurde. Das Gewebe wurde bis zur Kultivierung in kalter (4°C) 1xPBS gelagert. Das ca. 4x6 cm große Lungenstück wurde unter der *Laminar Flow* mit Hilfe einer Pinzette und eines Skalpells zerkleinert. Die so erhaltenen Gewebestückchen wurden 30 Minuten bei 37°C (Wasserbad) in einer Pronaselösung (1 mg/ml in Fibroblastenmedium mit 10 % FKS) verdaut, im Anschluss 2x mit 1xPBS gewaschen, auf die Kavitäten einer 6 Well-Patte verteilt und mit humanem Fibroblastenmedium mit 15 % FKS bedeckt. Der erste Mediumwechsel erfolgte nach 24 h, die weiteren alle zwei bis drei Tage. Nach maximal zwei Wochen waren die Fibroblasten zu Zellfoci ausgewachsen, so dass die Gewebestückchen entfernt werden konnten. Die ausgewachsenen Zellnester zeigten morphologisch ein typisches Fibroblastenaussehen. Bei einer Konfluenz der Zellen von 80 % erfolgte eine Weiterpassagierung der Fibroblasten in Zellkulturflaschen. Zu diesem Zweck wurde das Fibroblastenmedium abgesaugt und der Zellrasen mit 37°C warmer 1xPBS-Lösung gewaschen. Es folgte die Zugabe von 2 ml 1xTrypsin-EDTA-Lösung, mit der die Fibroblasten ca. 2 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Die Trypsin-EDTA-Lösung wurde abgesaugt, die Fibroblasten durch leichtes Klopfen von dem Zellkulturplattenboden abgelöst, in Medium mit 10 % FKS aufgenommen und in 75 mm Zellkulturschalen überführt. Der Inhalt der Zellkulturflasche wurde mit FKS-haltigem Medium auf 15 ml ergänzt.

Zur Aussaat einer definierten Menge an Fibroblasten wurden die Zellen nach dem Trypsinieren gezählt. Dazu wurden die Zellen mit Medium vom Boden ab gespült, in ein

steriles Röhrchen überführt, 5 Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das resultierende Pellet in einer definierten Menge Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde in der Neubauer-Zählkammer bei gleichzeitiger Bestimmung der Zellvitalität mittels Trypan-Ausschlussfärbung eruiert. Die Zählkammer wurde mit einer Mischung aus 1 Teil der Zellsuspension und 4 Teilen einer 0,15%igen Trypanblaulösung gefüllt und die Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt. Die im kompletten Volumen der Zellsuspension vorliegende Zellzahl konnte nun mit Hilfe des Kammerfaktors rechnerisch bestimmt werden.

10xPBS pH 7,4 (-Mg ²⁺ , -Ca ²⁺)	27 mM KCl
	15 mM KH ₂ PO ₄
	1,38 M NaCl
	81 mM Na ₂ KPO ₄

Diese Stammlösung wurde zur Sterilisation autoklaviert und bei Bedarf 1+9 mit destilliertem Wasser verdünnt.

Standardfibroblastenmedium	<i>MEM with Earles's Salts</i> (mit L-Glutamine)
	0-15 % FKS
	100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
	1 mM SPS
	1xNEAA

0,15 % Trypanblau	0,4 % <i>Trypan Blue Stain</i>
	3:8 verdünnt mit sterilem 1xPBS

2.1.2 Kultur der humanen Fibroblastenzelllinien

Die in Kryo-Röhrchen eingefrorenen Fibroblastenzelllinien wurden in einem 37°C warmen Wasserbad zügig aufgetaut und der Inhalt in eine 75 cm²-Kulturflasche überführt, die kurze Zeit vorher in den Inkubator gestellt wurde, um das darin enthaltene FKS-haltige Medium zu equilibrieren. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt, um noch vorhandene DMSO-Reste aus dem Einfriermedium zu entfernen. Nach Erreichen der Konfluenz konnten die Fibroblasten expandiert werden. Dazu wurden die Zellen mit 1xPBS gewaschen, trypsiniert, in Medium resuspendiert und in der Neubauer-Zählkammer gezählt (s. III.2.1.1). Bei den weiterkultivierten Fibroblasten wurde zweimal pro Woche das Medium erneuert. Für ein erneutes Einfrieren der Zellen wurden diese in Einfriermedium

resuspendiert (9 Teile Kulturmedium mit 10 % FKS + 1 Teil DMSO) und in einer Kryobox bei -80°C eingefroren, wodurch ein langsames Herunterkühlen um 1°C pro Minute erreicht werden konnte. Nach dem Erreichen der -80°C wurden die Fibroblasten im Stickstofftank bei -196°C gelagert.

MRC 5-Zellen

Bei den MRC 5-Zellen handelt es sich um humane Fibroblasten, die aus der Lunge eines 14-wöchigen, männlichen, kaukasischen Fetus im Jahr 1966 gewonnen wurde. Die Verdopplungszeit beträgt circa 19 Stunden und nach 42 bis 46 Verdopplungszeiten ist die Seneszenz erreicht.

ATCC Katalognummer: CCL-171

LGC, Promochem, Wesel

IMR 90-Zellen

Die als IMR 90-Zellen bezeichnete humane Fibroblastenzelllinie wurde aus der Lunge eines 15-wöchigen, weiblichen, kaukasischen Fetus gewonnen. Die Seneszenz wird nach 58 Verdopplungszeiten erreicht.

ATCC Katalognummer: CCL-186

LGC, Promochem, Wesel

Hel 299-Zellen

Die Hel 299-Zellen sind humane Fibroblasten, die aus der Lunge eines männlichen, schwarzen Embryos gewonnen wurden. Sie erreichen bereits nach 18 Verdopplungszeiten die Seneszenz.

ATCC Katalognummer: CCL-137

LGC, Promochem, Wesel

2.2 Arginaseassay

Nach Corraliza *et al.*, 1995

Das Enzym Arginase katalysiert die Umsatzreaktion des Substrates L-Arginin zu L-Ornithin und dem Nebenprodukt Harnstoff. Als Kofaktor benötigt die Arginase Mn^{2+} -Ionen, durch die bei einem pH-Optimum von 9,7 das katalytische Zentrum des Enzyms aktiviert wird. Die Arginaseaktivität wird in den Fibroblasten zum Zeitpunkt der Zellyse bestimmt und beruht auf dem Prinzip der photometrischen Erfassung des Harnstoffs, der bei der Umsatzreaktion von L-Arginin zu L-Ornithin und Harnstoff gebildet wird.

0,2 Mio Atemwegsfibroblasten (MRC 5 bzw. phLFB) wurden auf 6-Well-Zellkultur-schalen ausgesät, mit 1 ml Fibroblastenmedium mit 10 % FKS bedeckt und 48 h kultiviert.

Nach erfolgtem Medienwechsel wurden die Testsubstanzen zugegeben und die Zellen 40 h inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der Überstand verworfen und die adhärennten Zellen wurden 30 min mit 750 µl 0,1 % Triton X-100 mit Proteaseinhibitoren lysiert. 50 µl des erhaltenen Lysates wurden für die Proteinbestimmung nach Lowry (s. III.2.6.5) verwendet. 500 µl des Zelllysates wurden mit 500 µl Tris-gepufferter Manganchlorid-lösung pH 7,4 versetzt. Um die Bindung der Mn^{2+} -Ionen an das Enzym zu beschleunigen wurden die Ansätze 10 min bei 56°C im Wasserbad erhitzt. 50 µl dieses aktivierten Lysates wurden im Verhältnis 1+1 mit Tris-gepufferter L-Argininlösung pH 9,7 versetzt. Im Anschluss erfolgte die 1-stündige Umsatzreaktion bei 37°C im Wasserbad. Zur Bestimmung der absoluten Harnstoffmenge im Versuchsansatz wurde während der Inkubationszeit eine 0,5 µg/µl Harnstoff-Standardlösung hergestellt, die mit einer 25 mM Tris-HCl-Lösung pH 9,7 und einer Triton-Tris- Mn^{2+} -Lösung derart versetzt wurde, dass Lösungen mit absoluten Harnstoffmengen von 1, 2, 5, 10, 15, 20 und 25 µg in einem Endvolumen von je 100 µl resultierten. Der Leerwert bestand aus 50 µl 25 mM Tris-HCl pH 9,7 sowie 50 µl Triton-Tris- Mn^{2+} -Lösung. Da es sich um eine empfindliche Nachweisreaktion handelt, wurde grundsätzlich eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Umsatzreaktion wurde durch Zugabe von 800 µl Säuremix sowohl zu jeder Probe als auch zu den Standards beendet und zu jedem Reaktionsansatz wurden 50 µl einer 9 %igen ISPF-Lösung (ISPF = α -Isonitrosopropriophenon) pipettiert. Nach gründlicher Durchmischung wurden die verschlossenen Röhrchen für 45 min bei 100°C im Wasserbad inkubiert. Der durch Reaktion von ISPF mit dem während der Umsatzphase in den Proben gebildeten bzw. in den Standards vorgelegten Harnstoff entstandene Farbstoff wurde gegen den Leerwert bei 540 nm spektralphotometrisch vermessen und der Harnstoffgehalt mit Hilfe einer Regressionsgeraden bestimmt.

Eine internationale Einheit Arginaseaktivität ist definiert durch die Bildung von 1 µmol Harnstoff pro Minute bei einer Temperatur von 37°C und einen pH-Wert von 9,5. Die Ergebnisse der Messung wurden in mU/mg Protein angegeben.

Lysepuffer für Arginaseassay:	0,1 % Triton X-100
	1 mM PMSF
	2 mM EDTA pH 8
	1 µM Pepstatin A
	1 µM Leupeptin
Manganchlorid-Lösung pH 7,4:	5 mM $MnCl_2$
	25 mM Tris-HCl

	20 % NaOH zur pH-Einstellung auf pH 7,4
L-Arginin-Lösung pH 9,7:	0,5 M L-Arginin 250 mM Tris-HCl pH 9,7 20 % NaOH zur pH-Einstellung auf pH 9,7
Triton-Tris-Mn ²⁺ -Lösung:	1 Teil 0,1 % Triton X-100 + PI 1 Teil Manganchlorid-Lösung pH 7,4
Säuremix:	1 Teil H ₂ SO ₄ konz. 3 Teile H ₃ PO ₄ 85 % 7 Teile Aqua bidest.
α-Isonitrosopropiophenon:	9 % ISPF in Ethanol (w/w)

2.3 Assays mit radioaktiv markierten Bausteinen

2.3.1 ³[H]-Thymidin-Inkorporationsassay

Die klassische Methode, neu synthetisierte DNA zu quantifizieren funktioniert über die Bereitstellung radioaktiv markierter Nukleotide (Naito *et al.*, 1987). Zu diesem Zweck wurde tritiiertes Thymidin (³[H]-Thymidin) verwendet. Die Quantifizierung der Einbaurate von ³[H]-Thymidin in neu synthetisierte DNA gibt Aufschluss über das Proliferationsverhalten der untersuchten Zellen und es ist möglich, dieses in Abhängigkeit von verschiedenen Substanzen zu quantifizieren.

0,05 Mio Fibroblasten wurden auf einer 12-Well-Zellkulturplatte ausgesät und mit 1 ml Fibroblastenmedium mit 10 % FKS versetzt. Nach einer initialen, 5-stündigen Adhärenzphase wurde das Medium abgesaugt und durch FKS-freies Medium ersetzt, das bis zum Schluss beibehalten wurde (in einigen Fällen wurde dieses Protokoll abgewandelt; die genauen Versuchsbedingungen sind dem jeweiligen Ergebnisteil zu entnehmen). Am nächsten Morgen wurden die Testsubstanzen zugesetzt und weitere 5 Stunden später erfolgte die Zugabe von 1 µl einer ³[H]-Thymidin-Lösung (37 MBq/ml) pro Well. Nach 24-stündiger ³[H]-Thymidin-Einbauphase erfolgte der Assay. Das Medium wurde abgesaugt und verworfen, jedes Well mit 1 ml kalter 1xPBS Lösung gespült, mit 1 ml 5 % (m/V) Trichloressigsäure (TCA) versetzt und 10 min bei 37°C inkubiert. Nach erneutem Waschen mit 1xPBS wurden die Zellen mit 1 ml 0,1 M NaOH ca. 1 h bei 37°C lysiert.

Anschließend wurden 200 µl 1 M Tris-HCl pH 7,4 zugesetzt, 300 µl der Proben mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und im Szintillationscounter der Firma Packard vermessen. Als Leerwert dienten 300 µl einer Mischung aus 1 ml 0,1 M NaOH mit 200 µl 1 M Tris-HCl pH 7,4 in 3 ml Szintillationsflüssigkeit.

Trichloressigsäure	5 % in Aqua bidest. (m/V)
Natriumhydroxid	0,1 M in Aqua bidest.
Tris-HCl pH 7,4	1 M Tris-HCl in Aqua bidest. HCl (konz.) zur pH-Einstellung auf 7,4

2.3.2 ³[H]-Prolin-Inkorporationsassay

Bei der [³H]-Prolininkorporation handelt es sich um eine Methode, um neu synthetisiertes Kollagen im Zelllysate zu erfassen. Die Methode wurde bereits 1971 von Peterkofsky und Diegelmann entwickelt und nachfolgend in vielen weiteren Studien eingesetzt und optimiert (Trevisan *et al.*, 1997; Eickelberg *et al.*, 1999; Goulet *et al.*, 2007).

0,1 Mio Atemwegsfibroblasten (phLFb bzw. Zelllinien) wurden auf 12-Well-Zellkulturplatten ausgesät und mit 1 ml Fibroblastenmedium mit 10 % FKS versetzt. Nach ca. 18 h wurde das FKS-haltige Medium abgesaugt und durch FKS-freies Fibroblastenmedium ersetzt. Nach 24-stündiger Hungerphase wurden die Testsubstanzen und zeitgleich 1 µl einer [³H]-Prolin-Lösung (37 MBq/ml) pro Well zu den nahezu konfluenten Fibroblastenkulturen gegeben, da Fibroblasten unter konfluenten Bedingungen deutlich mehr Kollagen synthetisieren als unter subkonfluenten Bedingungen (Shen und Strecker, 1975). Die Inkorporationsphase dauerte weitere 24 Stunden. Zu Beginn des Assays wurden alle Überstände abgenommen und verworfen, jedes Well zweimal mit 1 ml kalter 1xPBS Lösung gespült, mit 1 ml 20 % TCA versetzt und 1 h bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Plattenboden abgelöst, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 10 min bei 13.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das erhaltene Pellet wurde 2x mit je 1 ml 10 % TCA gewaschen und jeweils zentrifugiert. Nach den Waschsritten wurde das Pellet in 300 µl 0,2 M NaOH lysiert, gevortext und mit 300 µl 0,2 M HCl neutralisiert. 300 µl der Proben wurden mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und im Szintillationscounter der Firma Packard vermessen. Als Leerwert dienten 300 µl einer Mischung aus 150 µl 0,2 M NaOH mit 150 µl 0,2 M HCl in 3 ml Szintillationsflüssigkeit.

Zur Etablierung des Assaysystems schloss sich an die Neutralisation des Lysates ein Kollagenaseverdau an, um das in die Kollagenmoleküle eingebaute [³H]-Prolin von dem Prolin unterscheiden zu können, welches in andere Proteine eingebaut wurde. Zu diesem Zweck wurden 300 µl des neutralisierten Lysates mit 100 µl einer Kollagenaselösung versetzt (2 mg/ml Collagenase Typ 2 in TES-Puffer) und diese Mischung wurde 1 h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden zu jeder Probe 100 µl einer 50%igen TCA-Lösung (m/V) gegeben, um den Kollagenverdau zu beenden. Diese Mischung wurde 1 h auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 13.000 U/min zentrifugiert. Durch die Inkubation mit Kollagenase wurden die Kollagenmoleküle in kleine, lösliche Proteinfragmente verdaut, die durch TCA nicht mehr präzipitierbar sind und sich somit nach der Zentrifugation im Überstand befinden. Der Überstand wurde komplett abgenommen und im Szintillationscounter der Firma Packard vermessen.

Trichloressigsäurelösung	10/20/50 % Trichloressigsäure in Aqua bidest. (m/V)
Natriumhydroxid	0,2 M in Aqua bidest.
HCl	0,2 M in Aqua bidest.
TES-Puffer	50 mM Tris-Base 5 mM EDTA 20 mM NaCl 0,36 mM CaCl ₂ x 2 H ₂ O in Aqua bidest.

Da die Kollagenase eine Calciumkonzentration von 5 mM benötigt, wurde dieser Puffer vor Gebrauch mit 100 mM CaCl₂-Lösung auf einen Calciumgehalt von 5 mM eingestellt.

2.4 mRNA Expressionsanalyse

2.4.1 RNA-Präparationen (mit DNase-Verdau)

0,2-0,5 Mio Fibroblasten wurden auf 35 mm Zellkulturschalen ausgesät und mit 2 ml Kulturmedium versetzt. Je nach Protokoll wurden die Zellen mit Testsubstanzen inkubiert und wenn erforderlich mit siRNA transfiziert (die entsprechenden Protokolle sind dem jeweiligen Ergebnisteil zu entnehmen). Nach der Inkubationszeit wurde das Medium verworfen und der Zellrasen mit dem RPE-Lysepuffer lysiert, der vorher 1:100 mit β -Mercaptoethanol versetzt wurde. Die Isolierung der RNA erfolgte mit Hilfe des *RNeasy Tissue Kits* der Firma Qiagen nach Herstellerangaben. In Fällen, in denen die Primer nicht intronübergreifend angeordnet waren (Muskarinrezeptoren M1-M5), wurde ein zusätzlicher DNase-Verdau mit Hilfe des *RNase free DNase Set* (Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt, um eine Verunreinigung mit genomischer DNA ausschließen zu können. Zum Schutz der RNA vor Hydrolyse durch RNasen wurden wässrige Lösungen mit DEPC (Diethylpyrocarbonat)-vorbehandeltem, autoklaviertem Wasser hergestellt und sämtliche Glaswaren vor ihrer Verwendung sterilisiert. Des Weiteren wurde die isolierte RNA bei -80°C gelagert.

DEPC-Wasser: 0,1 % DEPC in Aqua bidest.
 über Nacht inkubiert, anschließend autoklaviert

2.4.2 Konzentrationsbestimmung der RNA

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte photometrisch durch Messung der Absorption von Nukleinsäuren bei einem Absorptionsmaximum von 260 nm. Zur Kontrolle der Reinheit wurde zusätzlich die Absorption bei 280 nm gemessen. Die Bestimmung wurde entweder mit dem Photometer GeneQuant II (Pharmacia) oder mit dem SmartSpecTM Plus (BioRad) durchgeführt; zur Messung wurden entweder Quarzküvetten oder Einwegküvetten verwendet. Zunächst wurde das Photometer mit dem Lösungsmittel (RNase-freies Wasser) kalibriert und anschließend die Proben in einer 1:40-Verdünnung vermessen. Zur Bestimmung der Reinheit einer RNA-Präparation wurde jeweils das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu der Absorption bei 280 nm bestimmt. Die RNA-Konzentration berechnet sich aus der Absorption bei 260 nm, dem Verdünnungsfaktor und einem Multiplikationsfaktor, der für RNA 40 beträgt, da 40 μ g/ml RNA bei einer Wellenlänge von 260 nm einen Extinktionswert von 1 aufweisen.

2.4.3 Reverse Transkription

Zum Nachweis der exprimierten Transkripte durch anschließende PCR-Amplifikation musste die isolierte mRNA zunächst mittels des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA (*complementary DNA*) umgeschrieben werden. Hierbei wurde das Enzym *Omniscript Reverse Transcriptase* der Firma Qiagen verwendet. Für die Reaktion wurde 1 µg Gesamt-RNA aus der in III.2.4.1 beschriebenen Präparation eingesetzt, mit 0,5 mM dNTP-Mix, 1 µM Oligo(dT)₁₈ Primern, 0,25 U RNase Inhibitor und 4 U Omniscript Reverse Transkriptase versetzt und mit RNase-freiem Wasser auf 20 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben 60 min bei 37°C und anschließend 10 min bei 93°C im Heizblock inkubiert, kurz zentrifugiert und sofort auf Eis gelagert. Mit sterilem Wasser wurde das Volumen auf 100 µl ergänzt und die cDNA bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Durch Verwendung RNase freier Arbeitsmaterialien und Arbeiten auf Eis wurde die RNA vor RNase-Abbau geschützt.

2.4.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde 1987 von Kary B. Mullis entwickelt und dient der *in vitro*-Amplifikation spezifischer Sequenzbereiche der DNA (Mullis und Faloona, 1987). Mit Hilfe der PCR ist es möglich, wenige Kopien einer Zielsequenz enzymatisch stark zu amplifizieren und sie somit einer weiterführenden Analytik zugänglich zu machen. Die verschiedenen Zyklen einer PCR laufen dabei temperaturabhängig ab. Die doppelsträngige DNA wird in Einzelstränge aufgeschmolzen (Denaturierung). Beim darauffolgenden Abkühlen hybridisieren sequenzspezifische Oligonukleotide (Primer) mit den komplementären Abschnitten der Einzelstränge (Annealing). Im letzten Schritt verlängert die eingesetzte hitzestabile DNA-Polymerase die Primer von 5' nach 3' komplementär zum jeweiligen Einzelstrang (Elongation). Durch mehrfache Wiederholung dieses aus drei Schritten bestehenden Zyklus erfolgt eine exponentielle Amplifikation.

2.4.4.1 Semiquantitative PCR

Jede PCR wurde standardmäßig in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt. Als Template dienten jeweils 5 µl des betreffenden cDNA-Pools, die mit je 0,5 µM 5'- („sense“-) Primer und 3'- („antisense“-) Primer, je 0,2 mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1,5 mM MgCl₂ und 1,5 U Taq-Polymerase der Firma Invitrogen versetzt

wurden. Die Primerpaare wurden – soweit möglich – intronübergreifend angeordnet, um Amplifikation genomischer DNA-Reste auszuschließen.

In einem PCR Zyklus wurden die folgenden Reaktionsschritte durchlaufen, die je nach Annealingtemperatur der Primer und Länge des zu amplifizierenden Fragments angepasst wurden:

Denaturierung	94°C	45 sek
Annealing	51-60°C	30 sek
Elongation	72°C	30 sek-1 min

Dem ersten Zyklus wurde eine 3-minütige initiale Denaturierungsphase vorgeschaltet. Nach dem letzten Zyklus wurde eine 10-minütige finale Elongation durchgeführt, um die Synthese unvollendeter PCR-Produkte zu beenden. Die Anzahl der Zyklen lag zwischen 23 und 40. 20-50 µl der Proben wurden anschließend wie in III.2.4.5 beschrieben gelelektrophoretisch aufgetrennt.

2.4.4.2 Real-Time PCR

Bei der quantitativen Real-Time PCR wird die entstandene DNA-Menge nach jedem PCR-Zyklus bestimmt (Holland *et al.*, 1991; Higuchi *et al.*, 1992). Der Verlauf der PCR kann somit in Echtzeit (*real-time*) bestimmt werden. Die Bestimmung der Produktmenge erfolgt indirekt über die Messung eines Fluoreszenzfarbstoffs, dessen Signalintensität proportional zur DNA-Menge ist. Die Quantifizierung wird in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen, da nur in dieser Phase die PCR-Effizienz konstant ist (Pfaffl, 2001). Um immer am Anfang der exponentiellen Phase messen zu können, wird der CT-Wert (*Threshold Cycle* = "Schwellenwert-Zyklus") verwendet, der den Zyklus beschreibt, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Neben der Spezifität ist die PCR-Effizienz ein maßgebliches Bewertungskriterium der quantitativen Real-Time PCR. Unter optimalen Bedingungen wird die maximale PCR-Effizienz (E) von $E = 2$ erreicht, d. h. jeder PCR-Zyklus führt zu einer Verdopplung der eingesetzten Produkte. Experimentell kann die Effizienz aus relativen Standardkurven ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Verdünnungen einer cDNA-Probe vermessen (1:3 bis 1:300) und die CT-Werte gegen den Logarithmus der relativen Konzentration aufgetragen. Aus der Steigung der Geraden kann die Effizienz der PCR ermittelt werden und diese darf nur um 10 % von der optimalen Effizienz abweichen, damit die Ergebnisse zur Auswertung kamen.

Zur Quantifizierung der relativen Expression eines Zielgens ist eine Normalisierung auf einen internen Standard erforderlich (Vandesompele *et al.*, 2002). Dieser dient dazu,

Konzentrationsunterschiede zwischen den Proben auszugleichen, die bei der Analyse von cDNAs auftreten, da z. B. die Effizienz der reversen Transkription von Probe zu Probe variieren kann. Als interne Standards werden in der Regel Gene verwendet, deren Expression unabhängig von Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen ist (Haushaltsgene oder *housekeeping-genes*). Wir haben für diesen Zweck die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet.

Für die Real-Time PCR wurde die cDNA 1:3 mit RNase-freiem Wasser verdünnt und der Mastermix hergestellt, bestehend aus dem 7,5 µl QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix der Firma Qiagen, je 0,45 µl des sense- und antisense-Primers und 1,6 µl RNase-freiem Wasser pro Ansatz. Anschließend wurden pro Versuchssatz 5 µl verdünnte cDNA mit 10 µl Mastermix vereinigt, so dass ein Gesamtvolumen von je 15 µl resultierte. Die Real-Time PCR wurde mit dem Gerät Mx3000P der Firma Stratagene durchgeführt. Folgendes Programm wurde durchlaufen:

1x	95°C für 10 min (initiale Aktivierung der HotStarTaq [®] DNA Polymerase)
50x	95°C für 30 sek (Denaturierung)
	55°C für 30 sek (Annealing)
	72°C für 30 sek (Elongation)

Im Anschluss wurde die Spezifität der Primer mit Hilfe der Schmelzkurvenanalytik bestimmt und das PCR-Produkt zur Größenbestimmung einer Agarose-Gelelektrophorese unterzogen.

2.4.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die während der PCR amplifizierten DNA-Fragmente wurden anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Bei der Elektrophorese werden Nukleinsäuren gemäß ihrer Wanderungsgeschwindigkeit in einem elektrischen Feld aufgetrennt, das an eine Gelmatrix angelegt wird. Dabei ist ihre Wanderungsgeschwindigkeit abhängig von der Stärke des elektrischen Feldes, der Nettoladung, Größe und Konformation der Moleküle, sowie der Ionenstärke, der Temperatur und der Porengröße der verwendeten Gelmatrix.

Die hier verwendeten 1,2%igen Agarosegele wurden mit 0,33 µg/ml des Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid versetzt und in horizontale Gelträger gegossen. Die erstarrten Gele wurden in der Elektrophoresekammer mit 0,5xTBE-Puffer bedeckt und

20-50 µl der PCR-Probe, deren Dichte zuvor mit 10 % Probenpuffer erhöht wurde, aufgetragen. Im elektrischen Feld konstanter Stärke (~15 V/cm) wandern die negativ geladenen DNA-Moleküle zur Anode und legen dabei entsprechend ihrer Länge unterschiedliche Strecken im Gel zurück. Durch die Interkalation des Ethidiumbromids in die Helixstruktur konnten die DNA-Stränge im UV-Licht visualisiert und mit dem Photodokumentationssystem Power Shot G5 der Firma Canon festgehalten werden. Anhand eines parallel aufgetragenen Größenstandards wurde die Länge der Fragmente qualitativ beurteilt. Die photographische Dokumentation erlaubte eine densitometrische Vermessung der Bandenintensität mittels RFLPscan-Software. Die quantitative Beurteilung im Expressionsniveau erfolgte abschließend nach Bildung des Quotienten der Bandenstärke des Zielgens zur Bandenstärke des konstitutiv exprimierten Strukturgens β -Aktin.

5xTBE-Puffer:	0,45 M Tris 0,45 M Borsäure 0,012 M EDTA
Agarosegel:	1,2 % (m/V) Agarose in 0,5xTBE 0,33 µg/ml Ethidiumbromid
Probenpuffer:	15 % (m/V) Ficoll 400® 0,25 % (m/V) Bromphenolblau 0,5xTBE

2.5 Isolierung genomischer DNA

Um für die Polymerase-Kettenreaktionen der humanen Fibroblasten – insbesondere der verschiedenen Muskarinrezeptoren – eine Positivkontrolle zu erhalten, wurde die genomische DNA aus der Zelllinie MRC 5 gewonnen.

Die MRC 5-Zellen wurden in einer 75 cm² Zellkulturflasche bis zur Konfluenz kultiviert, trypsiniert und die DNA anschließend mit Hilfe des *DNeasy Tissue Kits* der Firma Qiagen nach Herstellerangaben isoliert. Die Konzentration der DNA-Lösung wurde nach erfolgreicher Isolation in einer 1:40-Verdünnung photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm erfasst.

2.6 Arbeiten mit Proteinen

2.6.1 Rap1-Aktivierungsassay

Der Rap1-Aktivierungsassay dient zur Isolation von aktivem Rap1 aus Zelllysaten. Zu diesem Zweck wurde das *EZ-DetectTM Rap1 Activation Kit* (Pierce, Rockford, USA), der sogenannte *pull-down*-Assay, verwendet. Das Prinzip dieses Assays ist es, dass nur aktives, also GTP-gebundenes Rap an die Rap1-bindende Domäne (RBD) des Rap-Effektorproteins Ral-GDS bindet. Durch diese Bindung wird die intrinsische GTPase-Aktivität von Rap1 unterbunden und die Deaktivierung wird folglich verhindert. Der im Assaykit vorhandene RalGDS-RBD-Komplex ist mit GST (Glutathion-S-Transferase) fusioniert und kann nach Rap1-Bindung auf einer Glutathion-Matrix immobilisiert werden kann. Nicht aktiviertes Rap1 kann folglich durch Waschschrte entfernt werden. Im Anschluss wird das immobilisierte, an das Fusionsprotein gebundene, aktivierte Rap1 durch einen Denaturierungspuffer von der Matrix gewaschen und kann einer Western Blot-Analyse unterzogen werden.

0,3-0,5 Mio MRC 5-Zellen wurden auf 55 mm-Zellkulturschalen ausgesät und mit Fibroblastenmedium mit 10 % FKS versetzt. Vor der Substanzzugabe wurden die Zellen über Nacht serumfrei kultiviert. 18 Stunden nach der Serumdeprivation wurden die Testsubstanzen zugegeben, deren Inkubationszeiten zwischen 7,5 und 120 min lagen. Die Lyse erfolgte im Anschluss auf Eis mit je 0,3 ml Lysepuffer ergänzt um Proteaseinhibitoren. Nach Zentrifugation des Lysates (16.000 g, 15 min, 4°C) wurde aus dem Überstand die Proteinkonzentration wie in III.2.6.5 beschrieben bestimmt und jeweils 500 µg Gesamtprotein für die Durchführung des Assays verwendet. Der Proteinextrakt wurde zusammen mit dem Fusionsprotein 1 h bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde das aktivierte Rap1 mit 50 µl des *2xSDS Sample-Buffer* eluiert und 5 min bei 100°C gekocht. Nach erneuter Zentrifugation konnte ein Aliquot des Eluats wie in III.2.6.6 beschrieben elektrophoretisch aufgetrennt und einer Western Blot-Analyse unterzogen werden. Analog zu den Proben wurde auch mit einer Positiv- bzw. Negativkontrolle verfahren, wobei hier GTPγS bzw. GDP zum Zelllysate gegeben wurden.

Lysepuffer + PI	1 mM PMSF
	0,1 µg/ml Leupeptin
	2 µg/ml Aprotinin

2.6.2 Kernproteinpräparation

Um die Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB (*cAMP responsive element binding protein*) nachweisen zu können, wurde eine Kernproteinpräparation durchgeführt, da sich dieses Protein als Transkriptionsfaktor typischerweise im Zellkern befindet. Zu diesem Zweck wurde das *NE-PER[®] Nuclear and Cytoplasmic Extraction-Kit* der Firma Pierce verwendet und die Kerne nach Herstellerangaben aus dem Gesamtzelllysat herauspräpariert. Es wurden je 0,5 Mio MRC 5-Zellen in 55 mm Zellkulturschalen ausgesät und mit Fibroblastenmedium mit 10 % FKS versetzt. Vor der Substanzzugabe wurden die Zellen über Nacht serumfrei kultiviert. Die Substanzzugabe erfolgte dergestalt, dass vor Zugabe des CREB-Aktivators (in diesem Fall Butaprost) die Zellen je 1 h mit Proteinkinase-A-Inhibitoren vorinkubiert wurden. 15 Minuten nach Zugabe des CREB-Aktivators wurden die Zellen auf Eis gestellt, das Medium abgesaugt, der Zellrasen mit 37°C warmer PBS-Lösung gewaschen und die Zellen in je 1 ml kalter PBS-Lösung (4°C) mit Proteaseinhibitoren (PI) abgeschabt. Die Fibroblasten wurden in sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 10 Minuten bei 4°C und 6000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und aus dem Pellet wurde mit Hilfe der CER-Puffer I und II (*cytoplasmic extraction reagent I/ II*) und des NER-Puffers (*nuclear extraction reagent*) ergänzt und Protease- bzw. Phosphataseinhibitoren gemäß des mitgelieferten Protokolls die zytoplasmatischen Proteine und die Kernproteine herauspräpariert. Die Extrakte wurden bei -80°C gelagert oder direkt wie in III.2.6.5 beschrieben vermessen und anschließend für die Western Blot-Analyse verwendet.

PBS + PI	2 µg/ml Aprotinin
	2 µg/ml Leupeptin
	1 mM PMSF
CER I/NER + PI + PhI	2 µg/ml Aprotinin (PI)
	2 µg/ml Leupeptin (PI)
	1 mM PMSF (PI)
	1 mM NaOV ₄ (PhI)
	35 mM NaF (PhI)

2.6.3 Nicht-selektive Proteinpräparation

Für die Präparation der Proteine wurden je 0,5 Mio Lungenfibroblasten auf 55 mm-Zellkulturschalen ausgesät und mit 2-3 ml Fibroblastenmedium mit 10 % FKS bedeckt. Je nach Versuchsansatz wurde nach Erreichen einer gewissen Konfluenz auf Medium mit 0-10 % FKS umgestellt. Protokoll-abhängig wurden die Zellen mit Testsubstanzen inkubiert und wenn erforderlich mit siRNA transfiziert (die entsprechenden Versuchsbedingungen sind dem jeweiligen Ergebnisteil zu entnehmen). Um die Kollagen-I-Synthese mittels Western Blot zu erfassen, wurde der konditionierte Überstand verwendet, wohingegen der Western Blot in allen anderen Fällen mit dem Zelllysat durchgeführt wurde. Zu diesem Zweck wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einmal vorsichtig mit 2 ml kalter PBS-Lösung gewaschen. Die adhärenenten Lungenfibroblasten wurden mit 300 µl RIPA-Puffer mit Proteaseinhibitoren (PI) lysiert. Bei der Bestimmung der MAP-Kinase-Aktivität wurde dem RIPA-Puffer zusätzlich zu den Proteaseinhibitoren noch Phosphataseinhibitoren (PhI) zugesetzt, um eine Dephosphorylierung der Proteine nach der Lyse zu verhindern. Die Lysate wurden abgeschabt, in sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 10 min bei 4°C und 6000 U/min zentrifugiert, um grobe Zellreste abzutrennen. Der Überstand wurde entweder bei -20°C gelagert oder es wurde direkt mit der Proteinbestimmung, der Gelelektrophorese und anschließender Western Blot-Analyse fortgefahren.

RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCL 150 mM NaCl 0,5 % Natriumdeoxycholat 1 % Nonidet P-40 0,1 % SDS
PI	1 mM PMSF 2 mM EDTA pH 8 1 µM Pepstatin A 1 µM Leupeptin
PhI	35 mM NaF 1 mM NaVO ₄

2.6.4 Kollagenaseverdau

Um die Spezifität des Kollagen I-Antikörpers zu bestätigen, wurde zur Validierung des Antikörpers ein Kollagenaseverdau durchgeführt. Jeweils 0,1 mg Kollagenase (*High Purity* aus *Clostridium histolyticum*, Sigma, C 0773) wurde in 1 ml TES-Puffer gelöst, so dass diese Lösung eine enzymatische Aktivität von 190 U/ml aufwies. Die Kollagenaselösung wurde dem Überstand der Proteinpräparation zugesetzt, so dass eine finale Kollagenaseaktivität von 60 U/ml resultierte. Diese Proben wurden 4 Stunden bei 37°C unter konstanter Agitation inkubiert und anschließend entweder bei -80°C gelagert oder es wurde direkt im Anschluss ein Western Blot mit den verdauten Proben durchgeführt. Bei hoher Spezifität des Kollagen I-Antikörpers sollten in den Proben, die diesem Verdau unterzogen wurden, im darauf folgenden Western Blot keine Kollagen I-Signale detektierbar sein.

TES-Puffer	50 mM Tris-Base
	5 mM EDTA
	20 mM NaCl
	5 mM CaCl ₂
	Aqua bidest.

2.6.5 Proteinkonzentrationsmessung nach Lowry

Die von Lowry *et al.* 1951 zur quantitativen Bestimmung von Protein veröffentlichte Kombination von Biuret-Reaktion mit dem Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz wird als Lowry-Assay bezeichnet, bei dem sich in alkalischer Lösung ein instabiler, blauer Kupfer-Protein-Komplex. Dieser unterstützt die Reduktion von Molybdat bzw. Wolframat, die in Form ihrer Heteropolyphosphorsäuren eingesetzt werden (Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz), durch vornehmlich Tyrosin, Tryptophan und, in geringerem Maße, Cystein, Cystin und Histidin. Dabei wird Cu²⁺ im Kupfer-Protein-Komplex zu Cu⁺ reduziert, das dann mit dem Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz reagiert. Aufgrund der zusätzlichen Farbreaktion ist die Sensitivität gegenüber dem reinen Biuret-Assay enorm gesteigert. Die resultierende tief blaue Färbung wird bei einer Wellenlänge von 750 nm vermessen. Die Reagenzien stammen aus dem *DC Protein Assay Kit* der Firma Biorad und wurden laut Herstellerangaben eingesetzt.

50 µl des Zelllysates aus dem Arginaseassay (in Tritonlösung mit Proteaseinhibitoren) bzw. 5 µl des Zelllysates aus der Proteinpräparation (im jeweiligen Lysepuffer mit Protease- und Phosphataseinhibitoren), aufgefüllt auf 50 µl mit 0,1 % Tris-Triton-Lösung, wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert. Im Anschluss wurden 100 µl frisch hergestelltes Arbeitsreagenz A (1 % Reagenz S in Reagenz A) und unmittelbar danach 800 µl Reagenz B zum Lysat gegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Entsprechend wurde mit je 50 µl Standards aus Rinderserumalbumin verfahren, das in Konzentrationen von 50, 100, 300, 700, 1100 und 1500 µg/ml in 0,1 % Triton X-100 vorlag. Nach Ende der Inkubationszeit wurde nach Kalibrierung die Absorption bei 750 nm spektralphotometrisch vermessen und die Konzentration der Proteinproben konnte anhand der Regressionsgeraden der Standards interpoliert werden.

2.6.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung der durch die Proteinpräparation gewonnenen Proteingemische wurde die SDS-PAGE (*sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) verwendet, eine analytische Methode zur Trennung von Proteinen im elektrischen Feld.

Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Detergenz, das die Eigenladungen von Proteinen effektiv überdeckt. Auf diese Weise entstehen Mizellen mit konstanter negativer Ladung im Verhältnis 1,4 g SDS pro Gramm Protein und eine Auftrennung nach Größe der Proteine im elektrischen Feld wird möglich. Bei der Probenvorbereitung werden die Proben mit einem Überschuss an SDS erhitzt und so die Tertiär- und Sekundärstrukturen durch Aufspalten der Wasserstoffbrücken und durch Streckung der Moleküle aufgelöst. Schwefelbrücken zwischen Cysteinen werden durch die Zugabe einer reduzierenden Thiolverbindung (hier β -Mercaptoethanol) aufgespalten. Die stark negativ geladenen Proteine wandern in einem Spannungsfeld in Richtung der Anode und können in einer Polyacrylamidmatrix durch den Molekularsiebeffekt nach ihrer Molekularmasse getrennt werden.

Zur Vorbereitung wurden die Proteinproben mit $\frac{1}{4}$ Volumenanteil Roti[®]-Load versetzt, einem reduzierenden Probenpuffer der Firma Roth und anschließend 10 min bei 70°C denaturiert. Die Proben wurden proteinnormalisiert aufgetragen, so dass überall die gleiche, genau definierte Proteinmenge verwendet wurde

Für die Durchführung der Gelelektrophorese kam das System NuPAGE der Firma Invitrogen zum Einsatz. Es wurden vorgefertigte Gele der Firma Invitrogen (NuPAGE[®] Novex[®] Bis-Tris Gele) und als Elektrophoresepuffer 20xNuPAGE[®] MOPS SDS Running

Buffer (Invitrogen) verwendet, der unmittelbar vor der Anwendung mit Aqua dest. verdünnt wurde. Als Größenstandard wurden 5 μ l eines Kaleidoskopmarkers (Biorad) aufgetragen.

Die Gelelektrophorese lief unter einer konstanten Spannung von 200 V bis der im Probenpuffer enthaltene Blaumarker den unteren Rand des Gels erreicht hatte (ca. 80 Minuten).

2.6.7 Western Blot

Als Western Blot bzw. Immunoblot wird eine Übertragung von Proteinen auf eine Trägermembran bezeichnet, um sie einer anschließenden Analyse besser zugänglich zu machen.

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden im *Wet-Blot*-Verfahren elektrophoretisch auf eine proteinbindende PVDF-Membran transferiert. Dieser Vorgang fand ebenfalls in der NuPAGE-Apparatur ergänzt um das *XCell IITM Blot*-Modul statt. Schon während der Protein-Gelelektrophorese wurde eine auf Gelgröße zurechtgeschnittene PVDF-Membran für die Proteinübertragung vorbereitet, indem sie zunächst 1-3 Sekunden mit Methanol befeuchtet, dann 1-2 Minuten in Aqua dest. gewaschen und schließlich 20 min in Transferpuffer equilibriert wurde. Auch das Proteingel wurde im Anschluss an die Elektrophorese 5 min in Transferpuffer gewaschen, um anhaftende Salze und Detergenzien zu entfernen. Im Anschluss wurde der *Wet-Blot* zusammengebaut, indem die PVDF-Membran unter Vermeidung von Luftblasen auf das Proteingel gelegt wurde und zwischen je einem mit Transferpuffer getränkten Filterpapier und je zwei Schwämmen arretiert wurde. Diese Sandwich-Anordnung konnte nun in die NuPAGE-Apparatur eingesetzt werden, die im Anschluss mit 4°C kaltem Transferpuffer befüllt wurde. Der Blotvorgang dauerte 90 Minuten und wurde bei einer konstanten Spannung von ca. 40 Volt durchgeführt. Zur Kontrolle der Blottingeffizienz wurde das Proteinbandenmuster nach dem Transfer durch eine Ponceau-Färbung sichtbar gemacht und anschließend mit TBS-Lösung entfärbt. Im Anschluss wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen in 5%iger Blockinglösung inkubiert (je nach Protokoll entweder 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C). Der nächste Schritt bestand in der Inkubation der Membran mit dem spezifischen Primärantikörper, der in 3%iger Blockinglösung verdünnt wurde (Verdünnungen s. III.1.10.1). Die Inkubation mit dem Primärantikörper fand entweder über Nacht bei 4°C oder 90 min bei Raumtemperatur statt. Nach je zwei 10-minütigen Waschschritten mit 0,1 % TBST und 3%iger Blockinglösung folgte nun die Bindung des Sekundärantikörpers (Verdünnungen s. III.1.10.2), der sich gegen konstante Bereiche des jeweiligen Erstantikörpers richtet und mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP, *horseradish peroxidase*) konjugiert ist. Der Sekundärantikörper wurde in 3%iger Blockinglösung verdünnt und die Membran 45 min inkubiert. Anschließend wurde viermal 15 min mit 0,1 % TBST gewaschen. In der Zwischenzeit wurde das Detektionsreagenz aus dem Chemilumineszenz-Kit der Firma Roche angesetzt. Bei der Nachweisreaktion katalysiert das an den Sekundärantikörper gekoppelte Enzym die Substratumsetzung in ein lumineszierendes Produkt. Nach dem letzten Waschschriff wurde

die TBST-Lösung abgegossen und die mit Proteinen besetzte Membranseite 60 s mit Detektionslösung benetzt. Anschließend wurde die Membran in einen Gefrierbeutel eingeschlagen und in einer Filmkassette fixiert. Ein Röntgenfilm wurde für 5 s bis 5 min exponiert, entwickelt, fixiert und ausreichend gewässert. Mit einem zweiten Film wurde die Belichtungsdauer optimiert. Nach dem Trocknen konnten die Filme gescannt und mit Hilfe der RFLP-Scan-Software die optische Dichte der Proteinbanden gemessen und quantitativ ausgewertet werden.

Transferpuffer:	25 mM Tris 192 mM Glycin 20 % (V/V) Methanol
Ponceau S Lösung:	0,2 % (m/V) Ponceau S 3 % (m/V) Trichloressigsäure
TBS pH 7,5:	50 mM Tris 150 mM Natriumchlorid HCl zur pH-Einstellung auf pH 7,5
TBST:	0,05 % bzw. 0,1 % (V/V) Tween 20 in TBS
Blockinglösung:	3 % bzw. 5 % (m/V) fettfreies Milchpulver in 0,05 % TBST

2.6.8 Strippen bereits detektierter Membranen

Nach dem Western Blot konnte die Membran einer Detektion mit einem weiteren Antikörper zugänglich gemacht werden. Zu diesem Zweck musste die bereits getrocknete PVDF-Membran mit Methanol befeuchtet werden; es folgte ein 5-minütiger Waschschritt mit Aqua bidest., das Ablösen des bereits gebundenen Antikörpers mit 0,2 M NaOH für weitere 5 Minuten und erneutes Wässern. Die Membran konnte nun wieder geblockt und mit einem neuen Antikörper behandelt werden.

2.7 Transfektionsversuche mit siRNA mittels Lipofektion

RNA-Interferenz (RNAi) ist eine Methode zur spezifischen Inhibition der Expression eines Gens. Das Phänomen der RNAi ist ein evolutionär konservierter Mechanismus, von dem vermutet wird, dass er der Virusabwehr und zum Schutz vor mobilen genetischen Elementen (Transposons) dient. Dieser Mechanismus wird in Säugetierzellen methodisch genutzt, indem kleine, 21-23 Nukleotide lange, doppelsträngige RNA mittels Transfektion in die Zelle einschleust werden und so der Abbau sequenzhomologer mRNA durch zell-eigene Enzymsysteme bewirkt wird. Für die Entdeckung des Mechanismus der RNA-Interferenz erhielten die beiden Wissenschaftler Andrew Z. Fire und Craig C. Mello 2006 den Nobelpreis für Medizin. Sie konnten in einer Veröffentlichung aus dem Jahr 1998 (Fire *et al.*, 1998) zeigen, dass doppelsträngige RNA-Moleküle im Fadenwurm *Coenorhabditis elegans* verwendet werden können, um Gene sequenzspezifisch stillzulegen.

Für die transiente Transfektion der MRC 5-Zellen wurde das kationische Liposom LipofectaminTM 2000 (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet, das mit der negativ geladenen siRNA Komplexe bildet, die nach Fusion mit der Zellmembran in die Zellen aufgenommen werden.

0,04-0,2 Mio MRC 5-Zellen wurden auf Zellkulturplatten ausgesät und mit Fibroblastenmedium mit 10 % FKS bedeckt. Nach 24 h wurden die Zellen mit siRNA transfiziert, wobei die Konfluenz zu diesem Zeitpunkt zwischen 30 und 50 % lag. Für die Transfektion wurden zwei Lösungen hergestellt: Lösung A setzte sich aus dem Transfektionsmedium *Opti-MEM[®] I Reduced-Serum Medium* und der gelösten siRNA zusammen, so dass eine finale RNA-Konzentration nach Zugabe zu den Zellen von 25-50 nM resultierte; Lösung B bestand aus dem Transfektionsmedium *Opti-MEM[®] I Reduced-Serum Medium* und einer geeigneten Menge LipofectaminTM 2000 (0,75-3 µl je nach Größe des zu transfizierenden Wells). Lösung A und B wurden miteinander gemischt und 25 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde bei den zu transfizierenden Platten das Medium abgesaugt und durch Antibiotika-freies Fibroblastenmedium mit 1 % FKS ersetzt. Nach der Inkubationszeit wurde die siRNA-Lipofectamin-Mischung auf die Zellkulturschalen pipettiert und durch leichtes Schütteln gleichmäßig verteilt. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde jeweils ein Ansatz analog zum beschriebenen Protokoll mit *BLOCK-iTTM Fluorescent Oligo* transfiziert, einem fluoreszierenden Oligonukleotid, das nach erfolgreicher Transfektion in den Kern transloziert, so dass die Effizienz der Transfektion anhand der Fluoreszenz in der Zelle begutachtet werden kann.

In einigen Fällen (s. Ergebnisteil) wurde 24 h nach der 1. Transfektion eine weitere Transfektion wie beschrieben durchgeführt, um den zeitlich begrenzten Effekt einer transienten Transfektion mit siRNA zu verlängern. Die Inkubationszeit mit siRNA betrug je nach Versuchsansatz 24-120 h und ist dem jeweiligen Ergebnisteil zu entnehmen.

2.8 Statistische Auswertung

Bei den angegebenen Mittelwerten handelt es sich um das arithmetische Mittel aus mindestens drei Einzelversuchen. Als Maß der Streuung ist der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben.

Um auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen einer Kontrolle und zwei oder mehr voneinander unabhängigen Gruppen zu testen wurde das statistische Modell der einseitigen Varianzanalyse (*one-way ANOVA*) mit anschließenden *Dunnett's post hoc* Test durchgeführt. Wurden alle voneinander unabhängigen Gruppen miteinander verglichen, so wurde nach der einseitigen Varianzanalyse der Bonferroni-Test angewandt. Für die statistischen Tests wurde das Computerprogramm Graph Pad InStat 3.01 verwendet

Lag die Irrtumswahrscheinlichkeit bei $p < 0,05$ wurde der Unterschied als signifikant (*) erachtet, bei einer geringeren Irrtumswahrscheinlichkeit ($p < 0,01$) als hoch signifikant (**) und bei $p < 0,001$ (***) als extrem signifikant kategorisiert.

Die beschriebenen statistischen Anwendungen sind nur anwendbar, wenn die Messwerte normalverteilt sind. Diese Voraussetzung wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test überprüft.

IV Ergebnisse

1 Bedeutung der Arginase I und II bei fibrotischen Prozessen in humanen Lungenfibroblasten

1.1 Expression und Aktivität der Arginase I und II

Wie in der Einleitung bereits ausführlich dargelegt, kommt es im Rahmen chronisch-entzündlicher Atemwegserkrankungen zu einer Hochregulation der Arginase (Zimmermann *et al.*, 2003), der eine bedeutende Rolle bei Remodelingvorgängen zugeschrieben wird. Welche Rolle die Arginase in humanen Atemwegsfibroblasten im Hinblick auf deren Beitrag zur Zellproliferation und Kollagensynthese spielt, ist noch nicht bekannt und sollte im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Atemwegsfibroblastenzelllinien (MRC 5, Hel 299, IMR 90) und primäre humane Lungenfibroblasten (phLFb) zunächst hinsichtlich ihrer Arginase-expression mit Hilfe der mRNA-Expressionsanalyse untersucht.

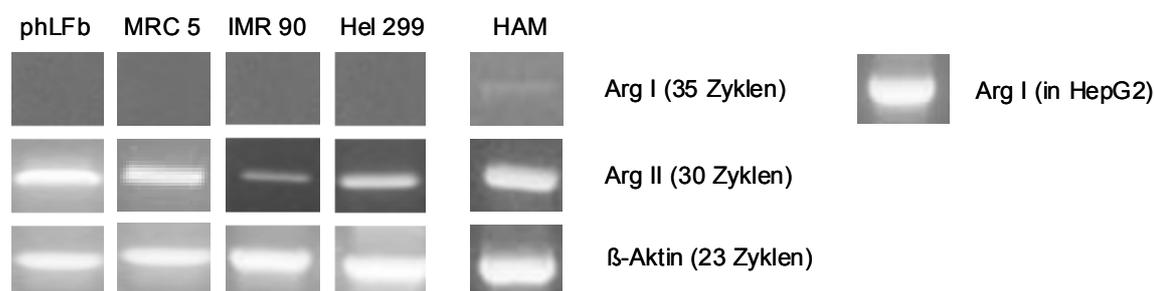


Abb. IV-1 Expression der Arginase I (Arg I) und II (Arg II) in verschiedenen Fibroblastenzelllinien (MRC 5, IMR 90 und Hel 299) der Lunge, in primären humanen Lungenfibroblasten (phLFb) und in humanen Alveolarmakrophagen (HAM). Die Zellen wurden bis zur Konfluenz in Nährmedium mit 10 % FKS kultiviert. Im Anschluss wurde die Gesamt-RNA isoliert und eine RT-PCR mit der angegebenen Zyklenzahl und den jeweils spezifischen Primern durchgeführt. Gezeigt sind repräsentative Gelausschnitte der jeweiligen PCRs (MRC 5, phLFb und HAM $n \geq 3$, IMR 90 und Hel 299 $n = 1$). Als Positivkontrolle für die Arginase I-PCR wurden humane Hepatozyten der Zelllinie HepG2 verwendet, die bekanntermaßen die Arginase I exprimieren.

In allen untersuchten Zellen konnte nach 30 Zyklen eine deutliche Expression der Arginase II detektiert werden, wohingegen die Arginase I in humanen Atemwegs-fibroblasten nicht nachzuweisen war (s. Abb. IV–1). Auch nach 40 PCR-Zyklen konnte keine Arginase I-Expression detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Als Positivkontrolle der Arginase I-PCR wurden HepG2-Zellen verwendet, eine humane Leberzelllinie, von der bekannt ist, dass sie Arginase I exprimiert; hier wurde erwartungsgemäß eine deutliche Arginase-I-Expression detektiert.

Vergleichend wurden auch humane Alveolarmakrophagen (HAM) hinsichtlich ihrer Arginaseexpression untersucht. Hier zeigte sich eine sehr schwache Arginase I-Expression und die Arginase II war auch hier die dominante Isoform.

Nachdem mit Hilfe der semiquantitativen PCR das Expressionsmuster der beiden Arginaseisoformen in verschiedenen Atemwegsfibroblastenzelllinien und in primären humanen Lungenfibroblasten bestimmt worden war, stellte sich die Frage, wie hoch die enzymatische Arginaseaktivität in den untersuchten Zellen ist. Zu diesem Zweck wurde ein Assay verwendet, der es ermöglicht, den Harnstoff als Produkt der Arginasekatalyse photometrisch zu erfassen. Weder in phLFb noch in MRC 5-Zellen war es mit Hilfe dieses Assays möglich, eine Arginaseaktivität zu detektieren, da die umgesetzte Harnstoffmenge unterhalb der Nachweisgrenze ($< 2,5$ mU/mg Protein) dieses Assays lag (s. Tab. IV-1).

Zelltyp	Arginaseaktivität [mU/mg Protein]
RAM	253 ± 40 n = 6
prFb	$20,4 \pm 1,7$ ¹⁾ n = 18
phLFb	< Nachweisgrenze n = 26
MRC 5	< Nachweisgrenze n = 11

Tab. IV-1 Vergleich der basalen Arginaseaktivität in Alveolarmakrophagen der Ratte (RAM) und in primären trachealen Fibroblasten der Ratte (prFb) mit den Daten aus humanen Atemwegsfibroblasten (MRC 5 und phLFb). Die Fibroblasten wurden 40 h unter Kontrollbedingungen kultiviert. Anschließend wurde die Arginaseaktivität im Zelllysate bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. 1) Referenzdaten entnommen aus Lindemann und Racké, 2003.

Zum Vergleich wurden bereits veröffentlichte Daten der Arginaseaktivität in primären trachealen Fibroblasten der Ratte (prFb) herangezogen, bei denen dieser photometrische Assay eine deutlich messbare Arginaseaktivität zeigte (Lindemann und Racké, 2003). Mitgeführte Proben aus Alveolarmakrophagen der Ratte (RAM) dienten als

Positivkontrolle und zeigen wie zu erwarten eine ausgeprägte Arginaseaktivität, die ca. 10fach über der entsprechenden Arginaseaktivität der Lungenfibroblasten der Ratte lag.

1.2 Einfluss von IL-4 und IL-13 auf die Expression und Aktivität der Arginase I und II

Den Th₂-Zytokinen, insbesondere IL-4 und IL-13, kommt eine bedeutende Rolle bei entzündlichen Atemwegserkrankungen wie *Asthma bronchiale* zu (Bodey *et al.*, 1999). Es konnte für Atemwegsfibroblasten der Ratte gezeigt werden, dass IL-4 und IL-13 sowohl zu einer Steigerung der Expression der Arginase I und II als auch zu einer erhöhten Aktivität der Arginase führen (Lindemann und Racké, 2003). Es sollte nun untersucht werden, ob sich diese Ergebnisse auf humane Atemwegsfibroblasten übertragen lassen. Zu diesem Zweck wurden MRC 5-Zellen und primäre humanen Lungenfibroblasten mit IL-4 und IL-13 inkubiert und auf ihre Expression und die Aktivität der Arginase hin untersucht. Es konnte nach 20-stündiger Inkubation der Fibroblasten mit IL-4 und IL-13 keine erhöhte Expression der Arginase II gezeigt werden und auch die Expression der Arginase I konnte durch Einsatz der Interleukine nicht angeregt werden (s. Abb. IV–2). Eine Arginaseaktivität war auch nach 40-stündiger Inkubation mit IL-4 und IL-13 im photometrischen Assaysystem nicht messbar (Daten nicht gezeigt).

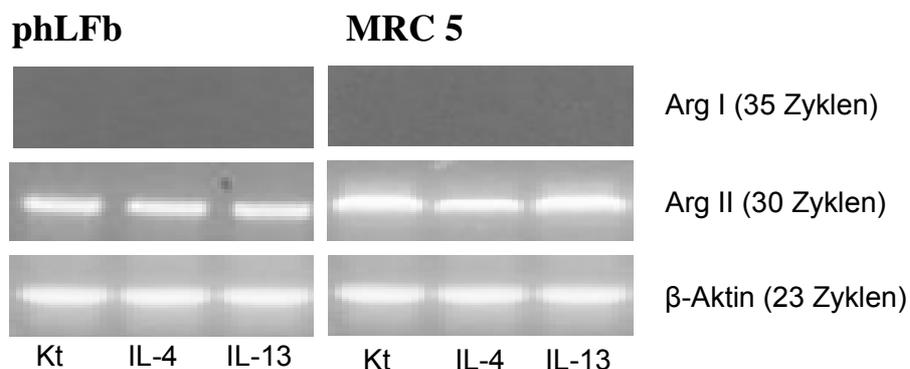


Abb. IV–2 Effekt der Interleukine 4 und 13 auf die Expression der Arginase-Isoenzyme (Arg I und Arg II) in primären humanen Lungenfibroblasten (phLFb) und MRC 5-Zellen. Die Zellen wurden 20 h in An- oder Abwesenheit von Interleukin 4 (IL-4, 10 ng/ml) und Interleukin 13 (IL-13, 10 ng/ml) kultiviert. Nach anschließender Isolierung der Gesamt-RNA wurde eine RT-PCR mit der angegebenen Zyklenzahl und den jeweils spezifischen Primerpaaren durchgeführt. Gezeigt sind repräsentative Gelausschnitte der PCRs mit phLFb (n = 3, links) und MRC 5-Zellen (n = 3, rechts); Kt = Kontrolle.

1.3 Expression der Ornithindecaboxylase und Ornithinaminotransferase

Das bei der Umsatzreaktion der Arginase entstehende Ornithin dient als Substrat für verschiedene weitere Stoffwechselwege. Es kann einerseits durch die Ornithindecaboxylase zu Putrescin, einem an Proliferationvorgängen beteiligten Polyamin, metabolisiert werden; andererseits stellt das Ornithin ein Substrat der Ornithinaminotransferase dar, die durch die Bereitstellung von L-Pyrrolin-5-carboxylat an der körpereigenen Prolinsynthese beteiligt ist. Zuerst sollte das Expressionmuster dieser beiden Enzyme in humanen Lungenfibroblasten untersucht werden, um anschließend den Einfluss dieser Stoffwechselwege auf die Proliferation und die Kollagensynthese in diesen Zellen näher zu charakterisieren. Mittels mRNA-Expressionsanalyse konnte sowohl in phLFb als auch in MRC 5-Zellen eine Expression dieser beiden Enzyme nach 30 Zyklen nachgewiesen werden, so dass beide beschriebenen Stoffwechselwege in diesen Zellen grundsätzlich möglich sind (s. Abb. IV-3).

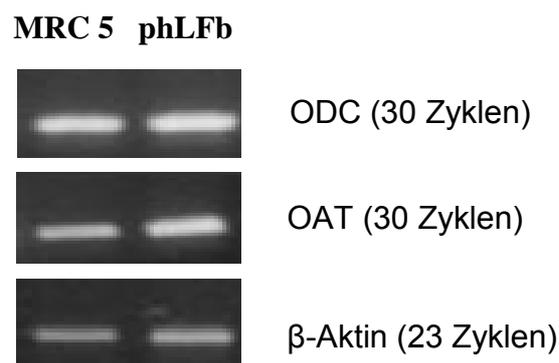


Abb. IV-3 Expression der Ornithindecaboxylase (ODC) und der Ornithinaminotransferase (OAT) in MRC 5-Zellen und in primären humanen Lungenfibroblasten (phLFb). Die Zellen wurden bis zur Konfluenz in Fibroblastenmedium mit 10 % FKS kultiviert. Im Anschluss wurde die Gesamt-RNA isoliert und eine RT-PCR mit der angegebenen Zyklenzahl und den jeweils spezifischen Primern durchgeführt. Gezeigt sind repräsentative Gelausschnitte der jeweiligen PCRs mit MRC 5-Zellen (n = 2, links) und mit primären humanen Lungenfibroblasten (phLFb, n = 2, rechts).

1.4 Einfluss der Arginase(aktivität) auf die Kollagen I-Synthese

Zur Charakterisierung des Einflusses der Arginase auf die Kollagenbildung wurde ein Western Blot mit einem Antikörper gegen Kollagen I etabliert, wobei das von den Fibroblasten sezernierte Kollagen I im Kulturüberstand erfasst wurde. Zu diesem Zweck wurden MRC 5-Zellen mit TGF- β (5 ng/ml), einem bekannten Induktor der Kollagensynthese, inkubiert. In ausgewählten Versuchen wurden zur Validierung des Kollagen I-Antikörpers einige unbehandelte Proteinpräparationen vor dem eigentlichen Western Blot einem gezielten Kollagenabbau durch Kollagenase unterzogen. TGF- β führte erwartungsgemäß zu einer deutlichen Steigerung des Kollagen I-Proteinniveaus auf 174 % des Niveaus unter Kontrollbedingungen und durch Inkubation der untersuchten Probe mit Kollagenase kam es zu einem Verschwinden der Kollagen I-Banden (s. Abb. IV–4). Dieses Ergebnis bestätigt die Spezifität des Antikörpers für Kollagen I und damit dessen Eignung zur Detektion und Quantifizierung dieses Proteins. Zusätzlich zeigt dieses Ergebnis, dass es sich bei den detektierten Banden tatsächlich um Kollagen handelt.

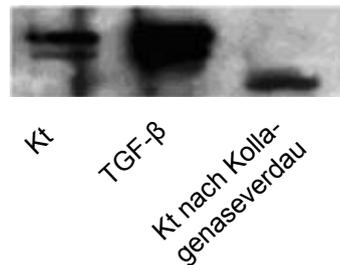
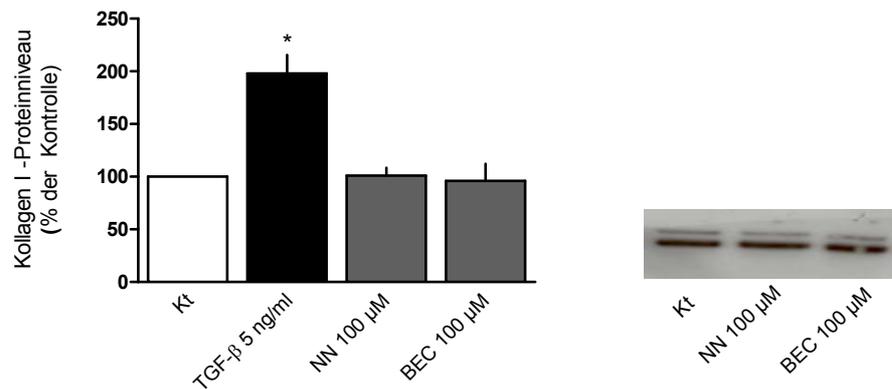


Abb. IV–4 Repräsentativer Western Blot mit einem Antikörper gegen Kollagen I. Die MRC 5-Zellen wurden nahezu bis zur Konfluenz wachsen gelassen und dann 2 Tage in An- oder Abwesenheit von TGF- β (5 ng/ml) inkubiert. Anschließend wurden 10 μ l des konditionierten Kulturüberstandes entweder einem Kollagenaseverdau wie in III.2.6.4 beschrieben unterzogen oder ohne weitere Behandlung mittels SDS-PAGE aufgetrennt. (n > 3); Kt = Kontrolle.

Nachdem die Eignung des Kollagen I-Antikörpers nachgewiesen wurde, konnten nun Untersuchungen mit Arginaseinhibitoren durchgeführt werden, um einen möglichen Einfluss der Arginase in Fibroblasten auf die Kollagensynthese untersuchen zu können. Zu diesem Zweck wurden zwei potente Arginaseinhibitoren in primären humanen Lungenfibroblasten und in MRC 5-Zellen verwendet: zum einen Nor-NOHA (N^o-Hydroxy-nor-L-arginin, Custot *et al.*, 1997) und zum anderen BEC (S-(2-Boronoethyl)-L-cystein x NH₄, Kim *et al.*, 2001). Bei beiden handelt es sich um potente, kompetitive Inhibitoren der Arginase I und II (Ash, 2004). Die Zellen wurden in serumhaltigem, prolinfreiem Medium kultiviert. 48 h vor der Proteinpräparation wurde ihnen durch einen Medienwechsel nach Spülen mit 1xPBS das Serum entzogen und die Arginaseinhibitoren zugesetzt. Nach 48-

stündiger Inkubation wurde das sezernierte Kollagen im Überstand mittels Western Blot quantifiziert. Die sezernierte Kollagen I-Menge konnte aber durch den Einsatz der beiden Arginaseinhibitoren nicht signifikant reduziert werden, wohingegen der Referenzstimulus TGF- β den erwarteten Anstieg der Kollagenmenge zeigte (s. Abb. IV–5).

A phLFb



B MRC 5

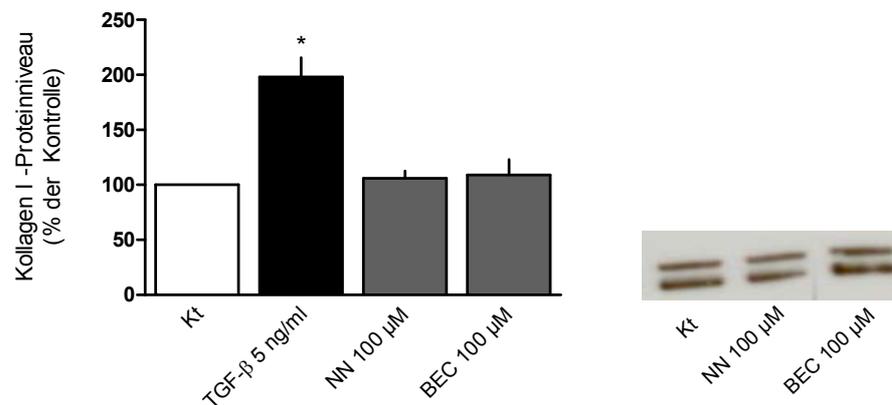


Abb. IV–5 Western Blot-Analyse mit einem Antikörper gegen Kollagen I in phLFb (A) und MRC 5-Zellen (B). Die Atemwegsfibroblasten wurden in prolinfreiem Medium kultiviert. Durch diese Maßnahmen sollte gewährleistet werden, dass den Zellen kein L-Prolin extern zugeführt wird. 48 h vor der Proteinpräparation wurde ihnen nach sorgfältigem Spülen mit 1xPBS das Serum entzogen. Die Inkubation mit TGF- β bzw. norNOHA (NN) und BEC dauerte zwei Tage. Anschließend wurden 10 μ l des konditionierten Kulturüberstandes einer SDS-PAGE unterzogen und der Immunoblot mit dem Antikörper gegen Kollagen I durchgeführt. Mittels Bestimmung der optischen Dichte der Proteinbanden wurden mehrere unabhängige Versuche semiquantitativ ausgewertet (links). Die Ergebnisse sind dargestellt in Prozent des Mittelwertes der Kontrollen der jeweiligen Zellpräparation (Mittelwert + SEM, n = 3). Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Gel (rechts). Signifikanzen der Unterschiede verglichen mit der jeweiligen Kontrolle (Kt) * p < 0,05.

1.5 Beeinflussung der Arginaseexpression durch PDGF und Auswirkung auf die Proliferation

Wie in der Einleitung erörtert, kommt es bei entzündlichen Lungenerkrankungen zu einer erhöhten Freisetzung des Wachstumsfaktors PDGF. Ob dieser sich auch auf die Expression der Arginaseisoenzyme auswirkt und darüber Einfluss auf die Proliferationsrate der Zellen nimmt, ist noch nicht bekannt und sollte näher untersucht werden. Zunächst wurde der PDGF-Rezeptorexpressionsstatus mittels mRNA-Expressionsanalyse an primären humanen Lungenfibroblasten bestimmt und im Folgenden die Auswirkungen einer PDGF-Exposition auf die Expression der Arginase I und II eruiert. Diese Versuchsreihe wurde ausschließlich an primären humanen Lungenfibroblasten durchgeführt. In den untersuchten Zellen konnte eine deutliche Expression der beiden PDGF-Rezeptoren (PDGF R-A/B) nachgewiesen werden (s. Abb. IV-6, A).

A phLFb



B

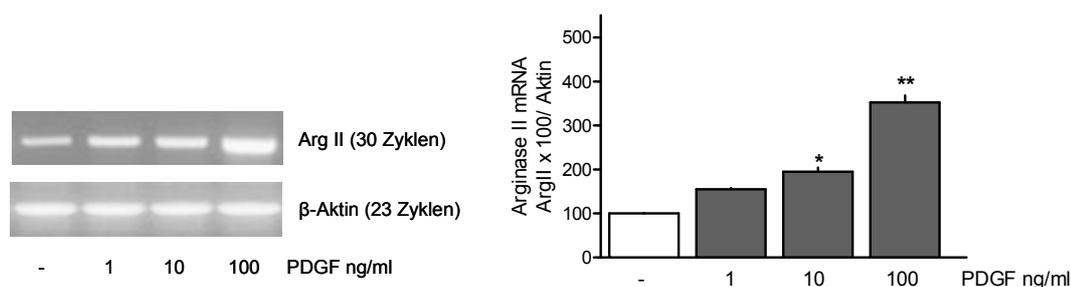


Abb. IV-6 (A) PDGF-Rezeptorexpression in primären humanen Lungenfibroblasten (phLFb). Die Zellen wurden bis zur Konfluenz in Fibroblastenmedium mit 10 % FKS kultiviert. Im Anschluss wurde die Gesamt-RNA isoliert und eine RT-PCR mit der angegebenen Zyklenzahl und den jeweils spezifischen Primern durchgeführt. Gezeigt sind repräsentative Gelausschnitte der jeweiligen PCRs (n = 2).

(B) Effekte von PDGF auf die Expression der Arginase II in phLFb. Die Zellen wurden 20 h in An- oder Abwesenheit von PDGF (1-100 ng/ml) kultiviert. Nach anschließender Isolierung der Gesamt-RNA wurde eine RT-PCR mit der angegebenen Zyklenzahl und den jeweils spezifischen Primerpaaren durchgeführt; gezeigt ist ein repräsentatives Gel (links). Mittels Bestimmung der optischen Dichte der PCR-Banden wurden mehrere unabhängige Versuche semiquantitativ ausgewertet (rechts). Die Ergebnisse sind dargestellt als Quotient der optischen Dichten der untersuchten Transkripte mit den entsprechenden Werten des Kontrolltranskripts β -Aktin (Mittelwert + SEM, n = 6). Signifikanzen der Unterschiede verglichen mit der jeweiligen Kontrolle * p < 0,05, ** p < 0,01.

Die 20-stündige Inkubation der primären humanen Lungenfibroblasten mit PDGF (1-100 ng/ml) führte zu einer hoch signifikanten Expressionsteigerung der Arginase II auf bis zu 392 % des Niveaus unter Kontrollbedingungen (s. Abb. IV-6, B). Die Expression der Arginase I konnte aber auch durch den Einsatz von PDGF nicht induziert werden (Daten nicht gezeigt).

Ob der Anstieg der Arginase II-Expression nach Inkubation der phLFb über den PDGF-Rezeptor vermittelt wurde, sollte durch den Einsatz von Tyrphostin AG 1296 (5 μ M), einem selektiven Inhibitor der Tyrosinkinaseaktivität des PDGF-Rezeptor-Proteins (Gazit *et al.*, 1996), überprüft werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation mit Tyrphostin AG 1296 die Hochregulation der Arginase II durch PDGF verhinderte (s. Abb. IV-7).

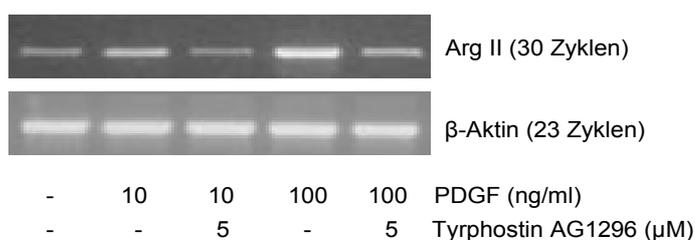
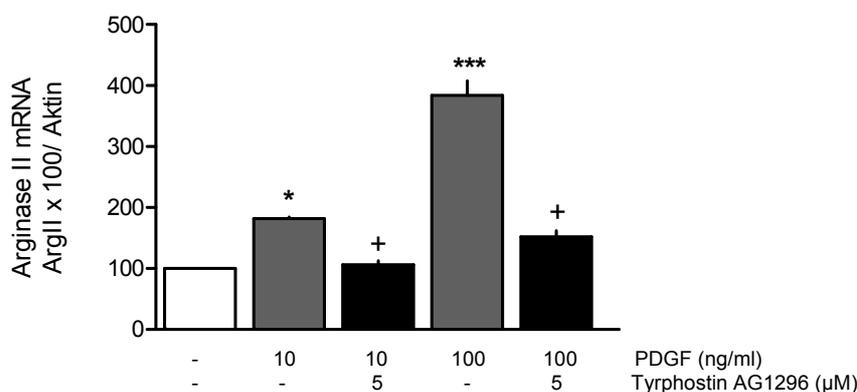
A**B**

Abb. IV-7 (A) Effekte von Tyrphostin AG 1296, einem spezifischen Inhibitor der PDGF-Rezeptor-Tyrosinkinaseaktivität, auf die PDGF-induzierte Expression der Arginase II in phLFb. Die Zellen wurden 20 h in An- oder Abwesenheit von PDGF (10/100 ng/ml) und Tyrphostin AG 1296 (5 μ M) kultiviert. Nach anschließender Isolierung der Gesamt-RNA wurde eine RT-PCR mit der angegebenen Zyklenzahl und den jeweils spezifischen Primerpaaren durchgeführt. Gezeigt ist ein repräsentatives Gel (n = 3-6).

(B) Mittels Bestimmung der optischen Dichte der PCR-Banden wurden mehrere unabhängige Versuche semiquantitativ ausgewertet. Die Ergebnisse sind dargestellt als Quotient der optischen Dichten der untersuchten Transkripte mit den entsprechenden Werten des Kontrolltranskripts β -Aktin (Mittelwert + SEM, n = 3-6). Signifikanzen der Unterschiede: verglichen mit der Kontrolle * p < 0,05, *** p < 0,001; verglichen mit der PDGF-behandelten Probe: + p < 0,05.

Im Folgenden wurde der proliferative Effekt von PDGF auf primäre humane Lungenfibroblasten untersucht. Die deutliche, konzentrationsabhängige Steigerung der Proliferation auf bis zu 498 % des Niveaus unter Kontrollbedingungen (s. Abb. IV–8) bestätigte die in der Literatur beschriebene Proliferationssteigerung des Wachstumsfaktors (Bonner, 2004). Auch der proproliferative Effekt war durch zusätzliche Inkubation mit Tyrphostin AG 1296 inhibierbar und somit PDGF-Rezeptor-vermittelt.

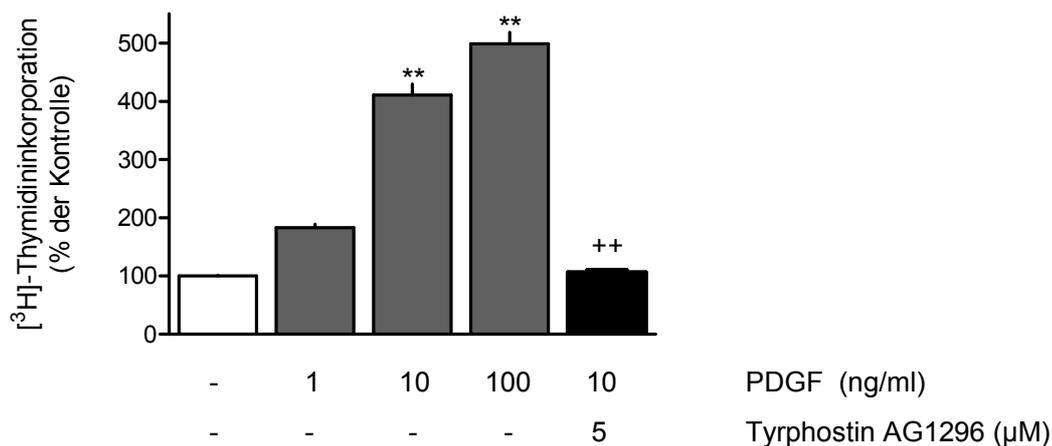


Abb. IV–8 Proproliferative Effekte von PDGF auf pHLFb und Hemmung dieses Effektes durch den PDGF-Tyrosinkinaseinhibitor Tyrphostin AG 1296. Die Atemwegsfibroblasten wurden 30 h in An- oder Abwesenheit von PDGF (1-100 ng/ml) bzw. Tyrphostin AG 1296 (5 μM) kultiviert. 24 h vor der Zellyse wurde [³H]-Thymidin (37 kBq/Well) zugegeben. Anschließend wurde das inkorporierte [³H]-Thymidin als Maß für die DNA-Neusynthese im Zellysat quantifiziert. Die Ergebnisse sind dargestellt in Prozent des Mittelwertes der Kontrollen des jeweiligen Versuchansatzes (Mittelwert + SEM, n = 6-12). Signifikanzen der Unterschiede: verglichen mit der jeweiligen Kontrolle ** p < 0,01, *** p < 0,001; verglichen mit der entsprechenden PDGF-behandelten Probe: ++ p < 0,05.

Es stellte sich nun die Frage, ob der stark proliferative Effekt des PDGFs zumindest partiell über die Hochregulation der Arginase II und der damit einhergehenden vermehrten Polyaminsynthese hervorgerufen wird. Um diesen Zusammenhang genauer zu überprüfen, wurde das Proliferationsverhalten der primären humanen Lungenfibroblasten unter Einsatz des Arginaseinhibitors nor-NOHA (1-100 μM) in An- und Abwesenheit von PDGF (1-100 ng/ml) untersucht. Der Einsatz des Arginaseinhibitors wirkte sich aber weder auf Proliferationsverhalten der Zellen unter Kontrollbedingungen noch auf das durch PDGF (10 ng/ml) gesteigerte Proliferationsniveau aus (s. Abb. IV-9).

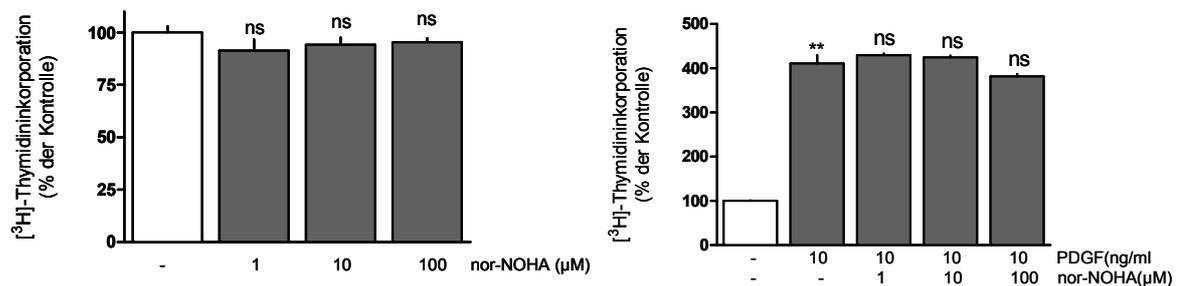


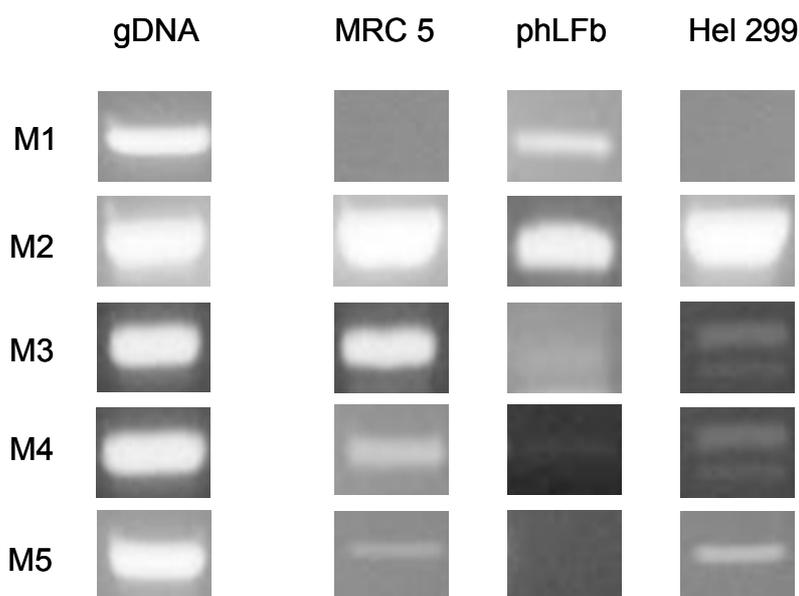
Abb. IV-9 Effekte des Arginaseinhibitors Nor-NOHA auf das proliferative Verhalten von phLFb in Ab- und Anwesenheit von PDGF (linke bzw. rechte Abbildung). Die Atemwegsfibroblasten wurden 30 h in An- oder Abwesenheit von Nor-NOHA (1-100 μM) bzw. PDGF (10 ng/ml) inkubiert. 24 h vor der Zellyse wurde $[\text{}^3\text{H}]$ -Thymidin (37 kBq/Well) zugegeben. Anschließend wurde das inkorporierte $[\text{}^3\text{H}]$ -Thymidin als Maß für die DNA-Neusynthese im Zellysate quantifiziert. Die Ergebnisse sind dargestellt in Prozent des Mittelwertes der Kontrollen des jeweiligen Versuchansatzes (Mittelwert + SEM, n = 9). Signifikanzen der Unterschiede: ns = nicht signifikant unterschiedlich verglichen mit dem jeweiligen Wert in Abwesenheit von Nor-NOHA; ** p < 0,01 verglichen mit der unbehandelten Kontrolle.

2 Effekte von Muskarinrezeptoragonisten und -antagonisten auf die Kollagensynthese in humanen Lungenfibroblasten

2.1 Expression der Muskarinrezeptoren M1-M5

Wie in der Einleitung bereits ausführlich dargelegt, wird eine Beteiligung von Muskarinrezeptoren bei chronischen Umbauprozessen der Atemwege diskutiert. Ein gesteigertes Proliferationsverhalten konnte bereits für am Remodelinggeschehen beteiligte Zellen, wie beispielsweise Lungenfibroblasten (Matthiesen *et al.*, 2006; Pieper *et al.*, 2007) oder glatte Muskelzellen (Gosens *et al.*, 2003), nachgewiesen werden. Es stellte sich die Frage, ob Muskarinrezeptoren darüber hinaus auch die Synthese von Strukturproteinen, wie beispielsweise des Kollagens, beeinflussen. Zunächst wurde der Muskarinrezeptor-expressionsstatus bei mehreren Lungenfibroblastenzelllinien (MRC 5- und Hel 299-Zellen) und in primären humanen Lungenfibroblasten (phLFb) untersucht (s. Abb. IV–10). In allen untersuchten Zellen konnte der M2-Rezeptor als der am stärksten exprimierte Rezeptor identifiziert werden und die M2-Expressionslevel zeigten zwischen den verschiedenen Zellen kaum Unterschiede (s. Abb. IV–10). Der M1-Rezeptor konnte hingegen nur in phLFb detektiert werden und das Expressionsniveau des M3-Rezeptors unterschied sich bei den untersuchten Zellen deutlich (MRC 5 > Hel 299 > phLFb). Der M4- und der M5-Rezeptor war in allen untersuchten Zellen nur schwach exprimiert. Dieses Expressionsmuster veränderte sich durch eine Weiterpassagierung der Zellen nicht, wobei die Passagen 1 bis 13 untersucht wurden.

A



B

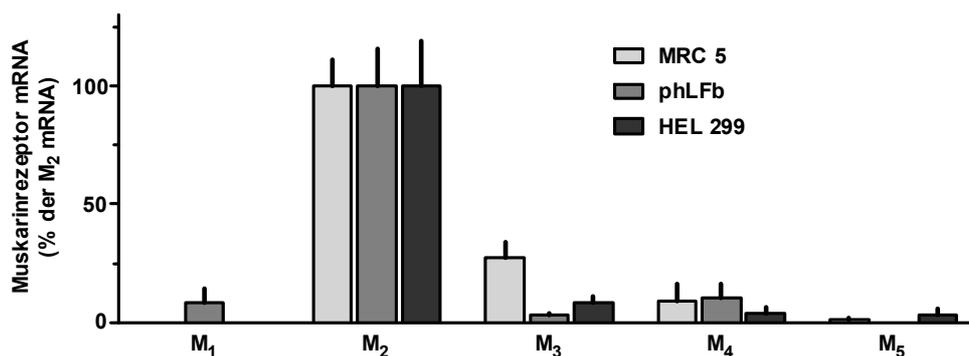


Abb. IV-10 Expression der verschiedenen Muskarinrezeptoren (M₁-M₅) in MRC 5-Zellen, HeL 299-Zellen und in phLFb. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz in Fibroblastenmedium mit 10 % FKS kultiviert. Im Anschluss wurde die Gesamt-RNA isoliert, jede Probe einem DNase-Verdau unterzogen und eine RT-PCR mit jeweils 35 Zyklen und den jeweils spezifischen Primern durchgeführt. Gezeigt sind repräsentative Gelausschnitte der jeweiligen PCRs. Als Positivkontrolle diente genomische DNA (gDNA), die aus MRC 5-Fibroblasten gewonnen wurde.

(A) Repräsentative Gelausschnitte.

(B) Densitometrische Auswertung. Angegeben sind die Mittelwerte + SEM (n = 7-11). Die Werte wurden sowohl über β -Aktin normalisiert, um die eventuell schwankende Qualität der cDNA-Synthese auszugleichen, als auch über das jeweilige PCR-Produkt der genomischen DNA normalisiert, um die eventuell variable Effektivität der Primer zu berücksichtigen. Die Expression des M₂-Rezeptor wurde in der jeweiligen Zellpopulation als Bezugspunkt für die übrigen Muskarinrezeptoren gewählt und jeweils gleich 100 % gesetzt

2.2 Etablierung des [³H]-Prolin-Inkorporationsassays zur Untersuchung der Kollagensynthese

Im Folgenden sollte der Einfluss verschiedener Muskarinrezeptoragonisten auf die Gesamtkollagensynthese mit Hilfe des [³H]-Prolin-Inkorporationsassays untersucht werden. Zur Etablierung des Assays wurden bekannte Inhibitoren (Butaprost, Forskolin) und TGF- β als Stimulator der Kollagensynthese verwendet, um zu untersuchen, ob die aus der Literatur bekannten Ergebnisse in unserem Assaysystem abgebildet werden können (s. Abb. IV–11).

MRC 5

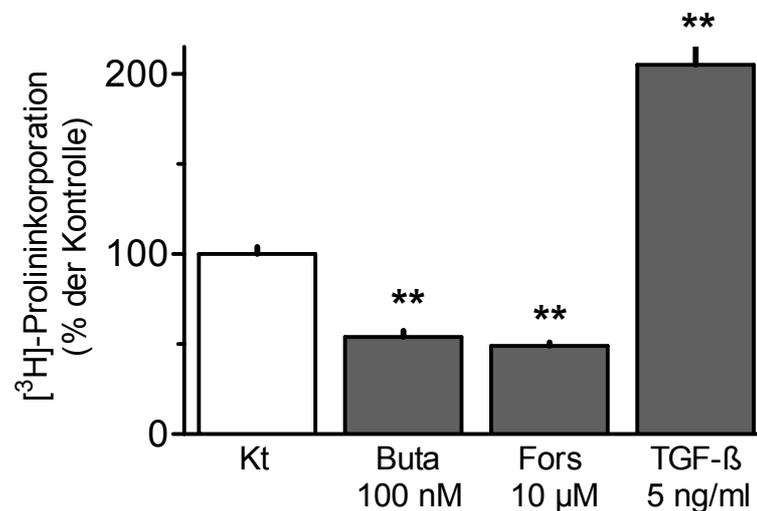


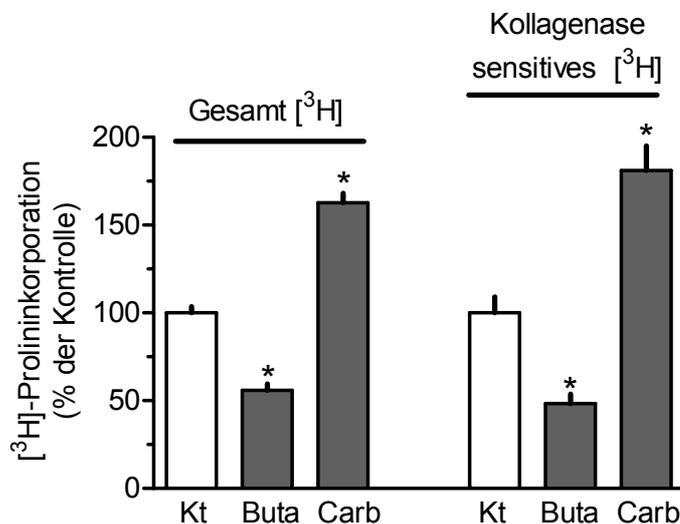
Abb. IV–11 Validierung des [³H]-Prolin-Inkorporationsassays mit Hilfe bekannter Inhibitoren bzw. Induktoren der Kollagensynthese. Die Atemwegsfibroblasten wurden 24 h mit Butaprost (Buta, 100 nM), Forskolin (Fors, 10 µM) oder TGF- β (5 ng/ml) inkubiert. Zeitgleich wurde [³H]-Prolin (37 kBq/Well) zugegeben. Anschließend wurde das inkorporierte [³H]-Prolin als Maß für die Kollagensynthese quantifiziert. Die Ergebnisse sind dargestellt in Prozent des Mittelwertes der Kontrollen des jeweiligen Versuchansatzes (Mittelwert + SEM, n = 9-15). Signifikanzen der Unterschiede verglichen mit der jeweiligen Kontrolle (Kt): ** p < 0,01.

Zur weiteren Etablierung des [³H]-Prolin-Inkorporationsassays wurden die Proben einem Kollagenaseverdau unterzogen und die Ergebnisse der verdauten Proben und der nicht verdauten Proben miteinander verglichen (s. Abb. IV–12). Durch diese Vorgehensweise ist es möglich, das in das Gesamtprotein eingebaute L-Prolin (s. Abb. IV–12, A, links) von demjenigen zu unterscheiden, welches nur in Kollagen eingebaut wurde (s. Abb. IV–12, A, rechts). Die Zellen wurden mit Butaprost (100 nM) und Carbachol (10 µM) behandelt. Die

Erfassung des [^3H]-Prolins im Gesamtprotein ergab eine Inhibition der Kollagensynthese durch Butaprost um 44 % und eine Steigerung der Kollagensynthese durch Carbachol um 63 %. Die Quantifizierung des sich nach Kollagenaseverdau im Überstand befindenden [^3H]-Prolins führte zu vergleichbaren Ergebnissen. Da sich nach quantitativer Auswertung der beiden Versuchsreihen ca. 80 % des eingebauten L-Prolins tatsächlich im Kollagen wiedergefunden haben (s. Abb. IV–12, B) und der Kollagenaseverdau sich nicht auf das Ergebnis der Untersuchung auswirkte (s. Abb. IV–12, links), wurde im Folgenden der Assay ohne einen anschließenden Kollagenaseverdau durchgeführt.

MRC 5

A



B

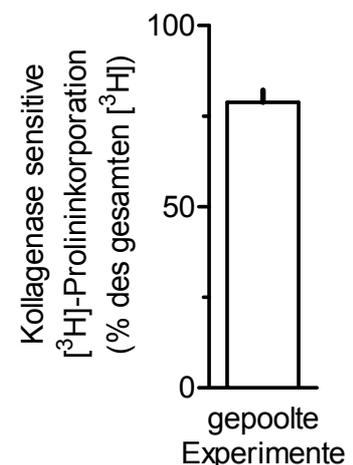


Abb. IV–12 Validierung des [^3H]-Prolin-Inkorporationsassays mittels Durchführung eines Kollagenaseverdau.

A: Vergleich der Effekte von Butaprost (Buta, 100 nM) und Carbachol (Carb, 10 μM) ohne (links) und mit (rechts) Kollagenaseverdau in MRC 5-Zellen. Für den Kollagenaseverdau wurde nach der Proteinpräzipitation ein Aliquot des neutralisierten Gesamtlisates einer 1-stündigen Inkubation mit Kollagenase II (2 mg/ml) unterzogen und im Anschluss das freigesetzte [^3H]-Prolin im Überstand quantifiziert. Die Ergebnisse sind dargestellt in Prozent des Mittelwertes der Kontrollen des jeweiligen Versuchansatzes (Mittelwert + SEM, n = 4-6). Signifikanzen der Unterschiede verglichen mit der jeweiligen Kontrolle (Kt): * p < 0,05.

B: Anteil des [^3H]-Prolins, das nach Kollagenaseverdau (1 h, 37°C) aus dem Proteinpräzipitat freigesetzt wurde ausgedrückt als Prozent des [^3H]-Prolins im Gesamtpräzipitat.

2.3 Einfluss von Muskarinrezeptoren auf die Kollagensynthese

Die Wirkung muskarinischer Agonisten auf die Kollagensynthese wurde nach 24-stündiger Inkubation der Fibroblasten mit den Muskarinrezeptoragonisten Oxotremorin (10 μM) und Carbachol (0,1-10 μM) untersucht (s. Abb. IV–13). Carbachol ist ein synthetisch hergestelltes, nicht-selektives Parasympathomimetikum, welches sowohl muskarinische als auch nikotinische Cholinozeptoren aktivieren kann, wohingegen Oxotremorin ein sehr potenter reiner Muskarinrezeptoragonist ist (Ringdahl und Jenden, 1983). Carbachol steigerte die [^3H]-Prolininkorporation konzentrationsabhängig (0,1-10 μM) hochsignifikant um bis zu 60 % mit einer halbmaximalen effektiven Konzentration (EC_{50}) von 220 nM. Oxotremorin (10 μM) erhöhte die [^3H]-Prolininkorporation um 68 %.

MRC 5

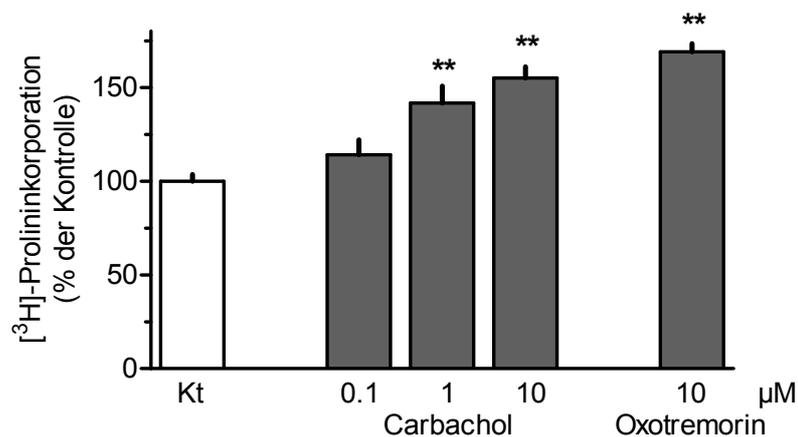


Abb. IV–13 Effekte von Muskarinrezeptoragonisten auf die Kollagensynthese. Die Atemwegs-fibroblasten wurden 24 h mit Carbachol (0,1-10 μM) oder Oxotremorin (10 μM) inkubiert. Zeitgleich wurde [^3H]-Prolin (37 kBq/Well) zugegeben. Anschließend wurde das inkorporierte [^3H]-Prolin als Maß für die Kollagensynthese quantifiziert. Die Ergebnisse sind dargestellt in Prozent des Mittelwertes der Kontrollen des jeweiligen Versuchansatzes (Mittelwert + SEM, n = 11-24). Signifikanzen der Unterschiede verglichen mit der Kontrolle (Kt): ** p < 0,01.

2.4 Effekt von Tiotropium auf die Muskarinrezeptor-vermittelte Kollagensynthese

Es sollte ferner untersucht werden, ob der durch Carbachol (10 μM) ausgelöste, die Kollagensynthese-fördernde Effekt durch Präinkubation mit dem Muskarinrezeptor-antagonisten Tiotropiumbromid (0,01-10 nM) unterdrückt werden konnte. Tatsächlich kam es zu einer deutlichen, konzentrationsabhängigen Abschwächung der durch Carbachol induzierten Kollagensynthese, die ab einer Tiotropium-Konzentration von 1 nM sogar komplett unterdrückt werden konnte (s. Abb. IV-14). Die halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC_{50}) für diesen Hemmeffekt betrug 110 pM.

MRC 5

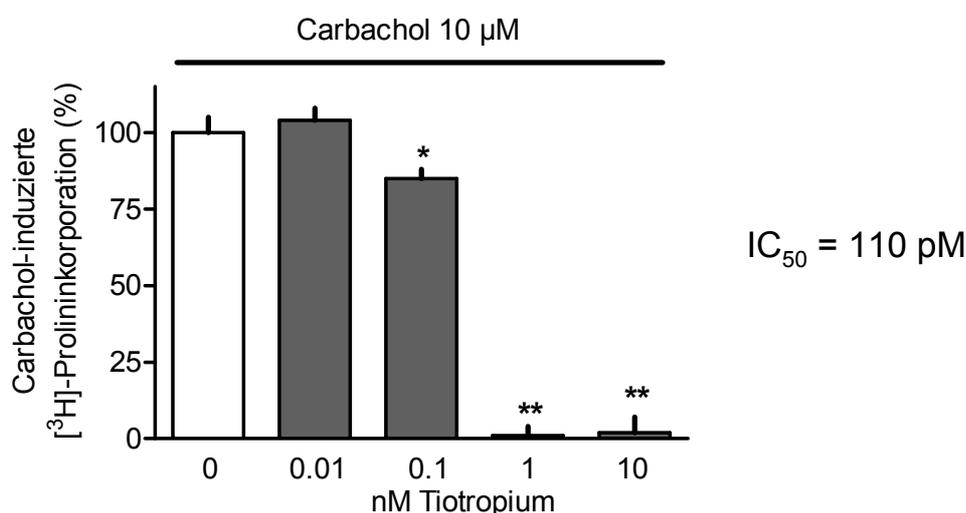


Abb. IV-14 Konzentrationsabhängiger inhibitorischer Effekt von Tiotropium auf die Carbachol-induzierte Kollagensynthese in humanen Lungenfibroblasten (MRC 5) bestimmt mittels ^3H -Prolininkorporation. Die Atemwegsfibroblasten wurden 24 h mit Carbachol (10 μM) inkubiert und das Tiotropium wurde 30 min vor dem Agonisten zu den Zellen gegeben. Die Zugabe von ^3H -Prolin (37 kBq/Well) erfolgte parallel zur Carbacholzugabe. Anschließend wurde das inkorporierte Prolin als Maß für die Kollagensynthese quantifiziert. Gezeigt ist die Inhibition der Carbachol-induzierten Kollagensynthese in Prozent (Mittelwert + SEM, n = 6-9). Der durchschnittliche Carbachol-induzierte Anstieg der Kollagensynthese lag in dieser Serie von Experimenten bei 54 %. Signifikanzen der Unterschiede verglichen mit der durch 10 μM Carbachol induzierten Kollagensynthese: * p < 0,05, ** p < 0,01.

2.5 Charakterisierung des Signalweges der Muskarinrezeptor-vermittelten Kollagensynthese

Die Muskarinrezeptor-vermittelte Steigerung der Kollagensynthese konnte in den humanen Lungenfibroblasten (MRC 5-Zellen) eindeutig gezeigt werden; es stellte sich aber zudem die Frage, über welchen Muskarinrezeptorsubtyp dieses Signal vermittelt wird. Pharmakologische Untersuchungen in (primären) humanen Lungenfibroblasten ließen den Schluss zu, dass die Muskarinrezeptor-vermittelte Steigerung der Proliferationsrate über $G\alpha_i$ -gekoppelte Rezeptoren vermittelt wird und wahrscheinlich dem M2-Rezeptor zugeschrieben werden kann (Matthiesen *et al.*, 2006). Ob auch die Steigerung der Kollagensynthese über einen $G\alpha_i$ -gekoppelten Rezeptor verläuft, sollte im Folgenden untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde Pertussistoxin als pharmakologisches Werkzeug eingesetzt. Dieses Bakterientoxin aus *Bordetella pertussis* ist in der Lage, selektiv die Aktivierung $G\alpha_i$ -gekoppelter Proteine zu unterdrücken (Bokoch *et al.*, 1983). Der Zusatz des Pertussistoxins (0,1 $\mu\text{g/ml}$) senkte die basale [^3H]-Prolininkorporation um ~20 % und konnte den durch Carbachol ausgelösten Effekt auf die Kollagensynthese komplett unterdrücken, was auf eine Beteiligung $G\alpha_i$ -gekoppelter Rezeptoren, also entweder M2 oder M4, an der Signalübertragung schließen lässt (s. Abb. IV–15).

MRC 5

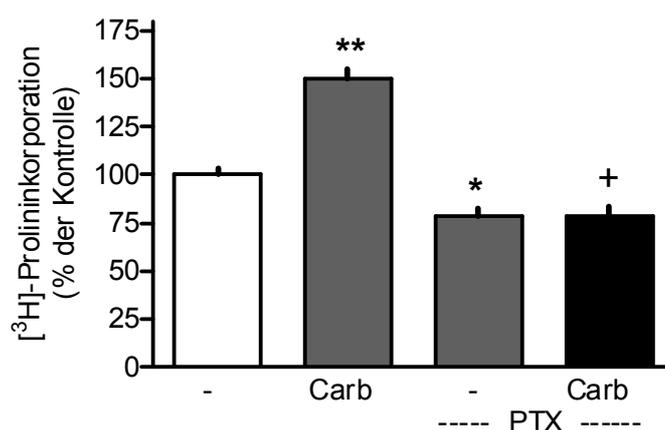


Abb. IV–15 Effekte von Carbachol (Carb, 10 μM) und/oder Pertussistoxin (PTX, 0,1 $\mu\text{g/ml}$) auf die Kollagensynthese in MRC 5-Zellen. Die Atemwegsfibroblasten wurden 24 h mit Carbachol (10 μM) und [^3H]-Prolin (37 kBq/Well) inkubiert. Die Pertussistoxinzugabe erfolgte 3 h zuvor. Anschließend wurde das inkorporierte [^3H]-Prolin als Maß für die Kollagensynthese quantifiziert. Die Ergebnisse sind dargestellt in Prozent des Mittelwertes der Kontrollen des jeweiligen Versuchsansatzes (Mittelwert + SEM, n = 6). Signifikanzen der Unterschiede: verglichen mit der jeweiligen Kontrolle * p < 0,05, ** p < 0,01; verglichen mit der Carbachol-behandelten Probe + p < 0,05.

Bereits mehrfach konnte in der Literatur eine Initialisierung der MAP-Kinase-Signalkaskade nach Aktivierung von Muskarinrezeptoren nachgewiesen werden. So zeigen beispielsweise tracheale Glattmuskelzellen des Hundes eine Aktivierung der p42/p44-MAP-Kinase als Antwort auf eine Aktivierung von M2-Rezeptoren (Hedges *et al.*, 2000). Gleichfalls wird die Muskarinrezeptor-vermittelte Proliferationssteigerung in humanen Atemwegsfibroblasten über eine Aktivierung dieses Signalweges vermittelt (Matthiesen *et al.*, 2007). Ob die MAP-Kinase-Signalkaskade auch bei der Induktion der Kollagensynthese beteiligt ist, sollte mit Hilfe des spezifischen Inhibitors der MAP-Kinase-Kinase (MEK, MAPKK) PD 98059 (Alessi *et al.*, 1995) untersucht werden. Die basale [³H]-Prolininkorporation wurde durch den Einsatz von PD 98059 (30 µM) nicht beeinflusst, wohingegen die Carbachol-induzierte Kollagensynthese durch den MEK-Inhibitor nahezu vollständig unterdrückt werden konnte (s. Abb. IV–16).

MRC 5

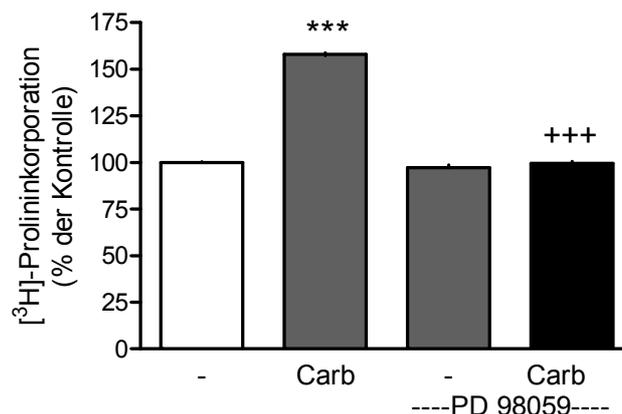


Abb. IV–16 Effekte von Carbachol (Carb, 10 µM) und/oder PD 98059 (30 µM) auf die Kollagensynthese in MRC 5-Zellen. Die Atemwegsfibroblasten wurden 24 h mit Carbachol (10 µM) und [³H]-Prolin (37 kBq/Well) inkubiert. Die Zugabe von PD 98059 erfolgte 30 min zuvor. Anschließend wurde das inkorporierte [³H]-Prolin als Maß für die Kollagensynthese quantifiziert. Die Ergebnisse sind dargestellt in Prozent des Mittelwertes der Kontrollen des jeweiligen Versuchansatzes (Mittelwert + SEM, n = 15). Signifikanzen der Unterschiede: verglichen mit der jeweiligen Kontrolle *** p < 0,001; verglichen mit der Carbachol-behandelten Probe +++ p < 0,001.

2.6 Einfluss von Nikotin auf die Kollagensynthese

Da Carbachol zusätzlich zu seiner Muskarinrezeptor-agonistischen Wirkung auch Nikotinrezeptoren aktivieren kann, stand die Frage im Raum, ob die Steigerung der Kollagensynthese partiell auch über diesen Rezeptortyp vermittelt wird. Ob dies der Fall ist, sollte in einer Versuchsreihe mit dem reinen Nikotinrezeptoragonisten Nikotin untersucht werden. Die Inkubation mit Nikotin (1-100 μM) zeigte einen leicht steigernden aber nicht statistisch signifikanten Einfluss auf die [^3H]-Prolininkorporation (s. Abb. IV-17).

MRC 5

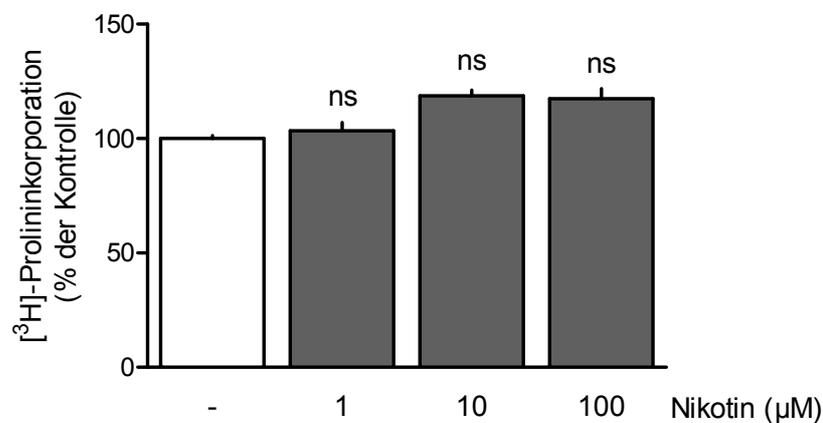


Abb. IV-17 Effekte von Nikotin (1-100 μM) auf die Kollagensynthese in MRC 5-Zellen. Die Atemwegsfibroblasten wurden 24 h mit Nikotin (1-100 μM) und [^3H]-Prolin (37 kBq/Well) inkubiert. Anschließend wurde das inkorporierte [^3H]-Prolin als Maß für die Kollagensynthese quantifiziert. Die Ergebnisse sind dargestellt in Prozent des Mittelwertes der Kontrollen des jeweiligen Versuchansatzes (Mittelwert + SEM, n = 6, ns = kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu der unbehandelten Probe).

2.7 Einfluss von Muskarinrezeptoragonisten/-antagonisten auf die Kollagensynthese in primären humanen Lungenfibroblasten und Hel 299-Zellen

Inwiefern die in MRC 5-Zellen dargelegten Ergebnisse Allgemeingültigkeit besitzen und sich auch auf andere Fibroblastenzelllinien übertragen lassen, sollte in Untersuchungen mit weiteren Lungenfibroblasten geklärt werden. Zu diesem Zweck wurden primäre humane Lungenfibroblasten (phLFb) verwendet, um die physiologische Relevanz der vorliegenden Ergebnisse zu untermauern, und Hel 299-Zellen, eine weitere humane Lungenfibroblastenzelllinie. Der steigernde Effekt auf die Kollagensynthese ließ sich in beiden Zellsystemen nachweisen (s. Abb. IV–18 und Abb. IV–19) und die halbmaximal effektive Konzentration (EC_{50}) von Carbachol in phLFb war mit 165 nM mit derjenigen in MRC 5-Zellen (220 nM) vergleichbar. In beiden Zellsystemen war der Kollagen-stimulierende Effekt der Muskarinrezeptoragonisten durch Tiotropium (10 nM) antagonisierbar.

phLFb

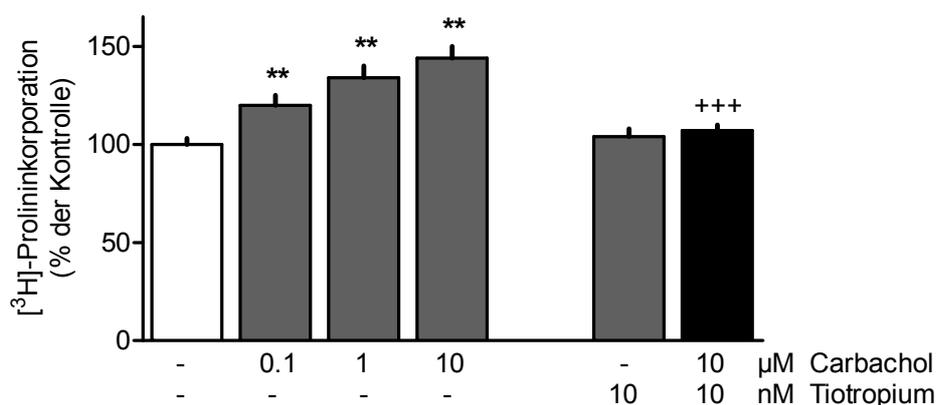


Abb. IV–18 Effekte von Carbachol und/oder Tiotropium auf die Kollagensynthese in primären humanen Lungenfibroblasten (phLFb). Die Atemwegsfibroblasten wurden 24 h mit Carbachol (0,1-10 μM) und [³H]-Prolin (37 kBq/Well) inkubiert. Tiotropium wurde 30 min zuvor zugegeben. Anschließend wurde das inkorporierte [³H]-Prolin als Maß für die Kollagensynthese quantifiziert. Die Ergebnisse sind dargestellt in Prozent des Mittelwertes der Kontrollen des jeweiligen Versuchansatzes (Mittelwert + SEM, n = 12). Signifikanzen der Unterschiede: verglichen mit der jeweiligen Kontrolle ** p < 0,01; verglichen mit der entsprechenden Carbachol-behandelten Probe +++ p < 0,001.

Hel 299

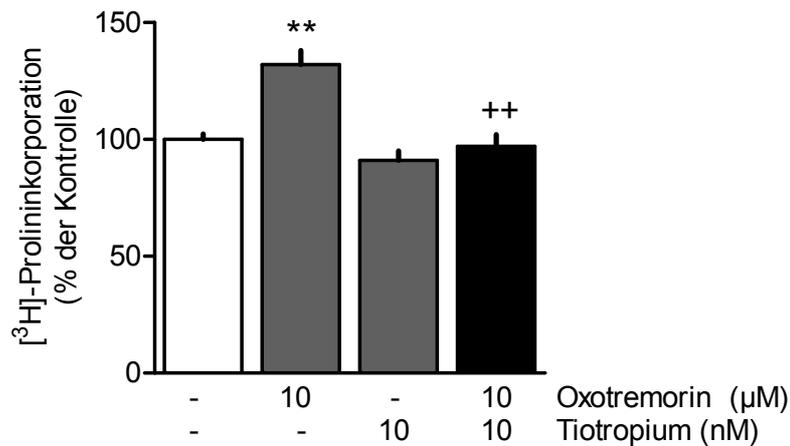


Abb. IV-19 Effekte von Oxotremorin (10 μM) und/oder Tiotropium (10 nM) auf die Kollagensynthese in Hel 299-Zellen. Die Atemwegsfibroblasten wurden 24 h mit Oxotremorin (10 μM) und [³H]-Prolin (37 kBq/Well) inkubiert. Die Zugabe von Tiotropium erfolgte 30 min zuvor. Anschließend wurde das inkorporierte [³H]-Prolin als Maß für die Kollagensynthese quantifiziert. Die Ergebnisse sind dargestellt in Prozent des Mittelwertes der Kontrollen des jeweiligen Versuchansatzes (Mittelwert + SEM, n = 6). Signifikanzen der Unterschiede: verglichen mit der jeweiligen Kontrolle ** p < 0,01; verglichen mit der Oxotremorin-behandelten Probe ++ p < 0,01.

3 Antifibrotische Eigenschaften erhöhter cAMP-Spiegel in humanen Lungenfibroblasten und Charakterisierung der beteiligten Signalwege

3.1 Etablierung des Proliferationsprotokolls

Zur Charakterisierung des Proliferationsverhaltens von (primären) humanen Lungenfibroblasten wurde die [³H]-Thymidin-Inkorporation als Methode gewählt, die eine Quantifizierung neu synthetisierter DNA ermöglicht (Naito *et al.*, 1987).

Zur Untersuchung von Proliferationsvorgängen in humanen Lungenfibroblasten wurde zunächst ein Standardprotokoll etabliert (s. Abb. IV-20, A). Begonnen wurde mit einer 5-stündigen Adhärenzphase mit Fibroblastenmedium, das 10 % FKS enthielt, um den Zellen optimale Anwachsbedingungen zu bieten. Nach dieser initialen Phase wurde, das Medium durch FKS-freies Medium ersetzt und die Zellen einer ca. 14-stündigen Hungerphase zur Synchronisation des Zellzyklus ausgesetzt. Im Anschluss wurden die Testsubstanzen hinzugefügt und weitere 5 Stunden später das radioaktiv markierte [³H]-Thymidin zugesetzt. Nach der 24-stündigen Inkorporationsphase wurde das eingebaute, radioaktive [³H]-Thymidin als Maß für die Proliferation quantifiziert.

Unter diesen FKS-freien Versuchsbedingungen wurden mit ca. 10.000 dpm (*disintegrations per minute*) schon akzeptable [³H]-Thymidineinbauraten erreicht; so konnte auf einen Zusatz von FKS in der Inkorporationsphase verzichtet werden und reine Substanzeffekte besser untersucht werden.

Von diesem Protokoll abweichende Parameter werden in dem jeweiligen Ergebnisteil erörtert.

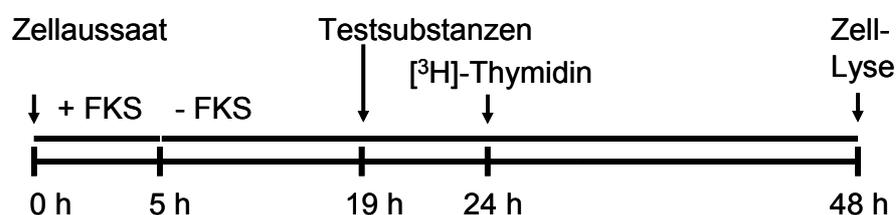
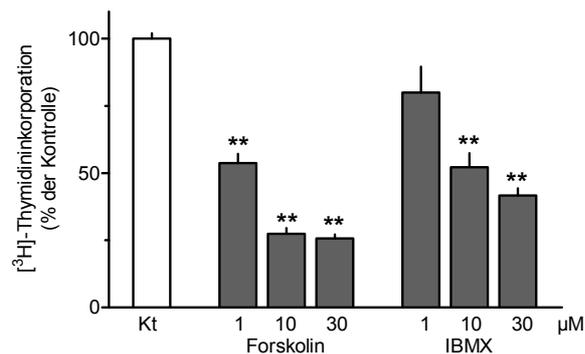


Abb. IV-20 Standardversuchsschema für die Durchführung der Proliferationsversuche. FKS = fetales Kälberserum.

3.2 Einfluss cAMP-erhöhender Substanzen auf die Proliferation

Die ausgeprägten antiproliferativen Effekte, die mit einer erhöhten cAMP-Konzentration in Fibroblasten einhergehen, wurden in der Einleitung bereits ausführlich dargelegt. Um diese Effekte auch in dem von uns verwendeten Zellmodell zu bestätigen, wurden Proliferationsversuche mit cAMP-erhöhenden Substanzen an MRC 5-Zellen durchgeführt. Es wurden Forskolin, ein Diterpen aus dem Harfenkraut (*Coleus forskohlii*), das direkt die Adenylylcyclase aktiviert und IBMX, ein nicht-selektiver Phosphodiesteraseinhibitor, eingesetzt; zudem wurden mit 8-Br-cAMP und Dibutyryl-cAMP zwei zellpermeable cAMP-Analoga untersucht. Bei allen verwendeten Substanzen kam es zu einer konzentrationsabhängigen, hochsignifikanten Hemmung der [³H]-Thymidin-Inkorporation und folglich der Proliferationsrate (s. Abb. IV–21).

A MRC 5



B MRC 5

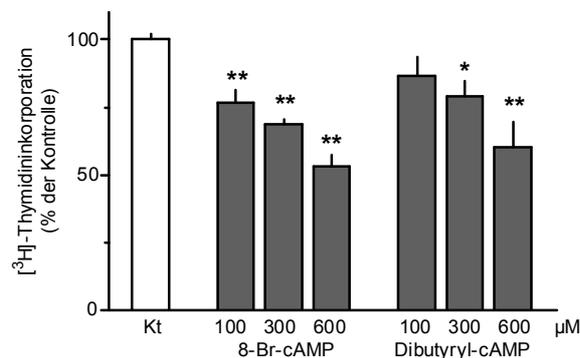


Abb. IV–21 Effekte von Forskolin und IBMX (A) sowie 8-Br-cAMP und Dibutyryl-cAMP (B) auf die Proliferation von MRC 5-Zellen. Die Zellen wurden 30 h in An- oder Abwesenheit der jeweiligen Testsubstanzen kultiviert. 24 h vor der Zelllyse wurde [³H]-Thymidin (37 kBq/Well) zugegeben. Anschließend wurde das inkorporierte [³H]-Thymidin als Maß für die DNA-Neusynthese im Zelllysate quantifiziert. Die Ergebnisse sind dargestellt in Prozent des Mittelwertes der Kontrollen des jeweiligen Versuchansatzes (Mittelwert + SEM, n = 6-21). Signifikanzen der Unterschiede verglichen mit der jeweiligen Kontrolle: * p < 0,05, **p < 0,01.

3.3 Einfluss von Isoprenalin auf die Proliferation

Da der Einsatz von β -Sympathomimetika ein wichtiges Standbein in der Therapie chronischer Atemwegserkrankungen ist und diese Rezeptoren ihre Wirkung ebenfalls über die Aktivierung $G\alpha_s$ -gekoppelter Rezeptoren ausüben, stellte sich die Frage, ob auch durch diese Substanzen eine proliferationshemmende Wirkung in Fibroblasten vermittelt werden kann und sie somit über die bronchodilatatorische Wirkung hinaus noch einen zusätzlichen klinischen Nutzen haben könnten. Aus Abb. IV–22 wird ersichtlich, dass die Inkubation mit Isoprenalin, einem nicht-selektiven β -Sympathomimetikum, zu einer extrem signifikanten Reduktion der Proliferation von MRC 5-Zellen führte; die Vorinkubation mit Propranolol, einem nicht-selektiven β -Rezeptorantagonisten, bewirkte eine Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve.

MRC 5

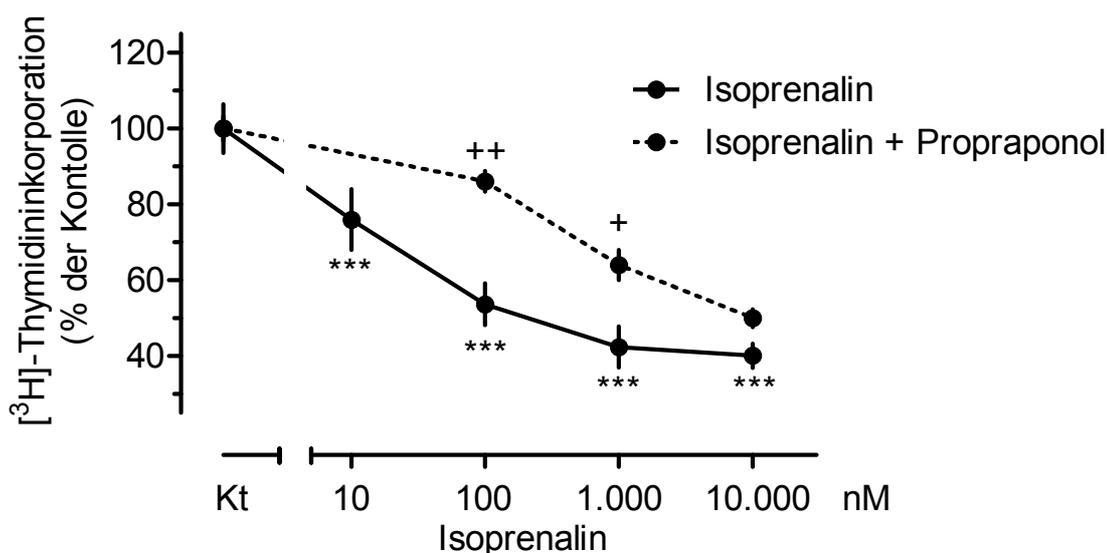


Abb. IV–22 Effekt von Isoprenalin in An- und Abwesenheit des β -Rezeptorantagonisten Propranolol (100 nM) auf die Proliferation von MRC 5-Zellen. Die Zellen wurden 30 h in An- oder Abwesenheit von Isoprenalin (10 nM–10 μ M) kultiviert. Der Antagonist Propranolol wurde 30 min zuvor zugegeben. 24 h vor der Zelllyse wurde [3 H]-Thymidin (37 kBq/Well) zugegeben und anschließend wurde das inkorporierte [3 H]-Thymidin als Maß für die DNA-Neusynthese im Zelllysate quantifiziert. Die Ergebnisse sind dargestellt in Prozent des Mittelwertes der Kontrollen des jeweiligen Versuchansatzes (Mittelwert \pm SEM, n = 6–24). Signifikanzen der Unterschiede: verglichen mit der jeweiligen Kontrolle (Kt) *** p < 0,001; verglichen mit dem jeweiligen Wert in Abwesenheit von Propranolol: + p < 0,05, ++ p < 0,01.

3.4 Einfluss von Butaprost auf die Proliferation

Die positiven Effekte, die mit einer erhöhten Prostaglandin E₂-Konzentration in der Lunge einhergehen, wurden in der Einleitung bereits ausführlich dargelegt. Es ist aus der Literatur bereits hinreichend bekannt, dass verschiedene antifibrotische Effekte über erhöhte cAMP-Spiegel nach EP2-Rezeptoraktivierung erklärt werden können (Huang *et al.*, 2007). Die Beteiligung der Proteinkinase A an der cAMP-vermittelten Inhibition der Kollagensynthese in humanen Lungenfibroblasten konnte kürzlich belegt werden (Huang *et al.*, 2008). Ob dieser Signalweg auch für die Vermittlung der antiproliferativen Wirkung einer erhöhten cAMP-Konzentration in humanen Zellen verantwortlich ist oder ob andere Effektormoleküle an diesem Effekt beteiligt sind, ist Gegenstand der nachfolgend gezeigten Untersuchungen.

Zunächst wurde die antiproliferative Wirkung des selektiven EP2-Rezeptoragonisten Butaprost (1-1000 nM, (Regan *et al.*, 1994)) in An- und Abwesenheit des EP1/2-Rezeptorantagonisten AH 6809 (Woodward *et al.*, 1995) untersucht.

MRC 5

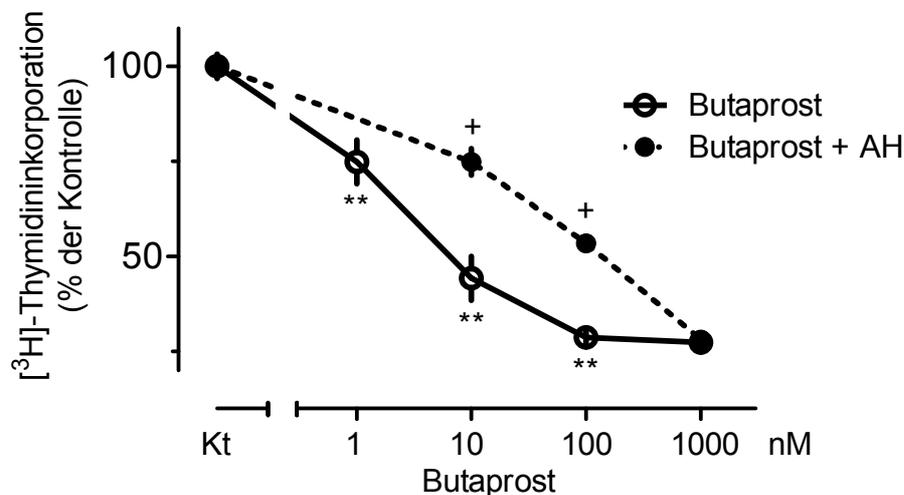


Abb. IV-23 Effekt des EP2-Rezeptoragonisten Butaprost in An- und Abwesenheit des EP1/2-Rezeptorantagonisten AH 6809 (AH, 10 μ M) auf die Proliferation von MRC 5-Zellen. Die Zellen wurden 30 h in An- oder Abwesenheit von Butaprost (1-1000 nM) kultiviert. Der Antagonist AH 6809 wurde 30 min vor Agonistenzugabe zupipettiert. 24 h vor der Zellyse wurde [³H]-Thymidin (37 kBq/Well) zugegeben. Anschließend wurde das inkorporierte [³H]-Thymidin als Maß für die DNA-Neusynthese quantifiziert. Die Ergebnisse sind dargestellt in Prozent des Mittelwertes der Kontrollen des jeweiligen Versuchansatzes (Mittelwert \pm SEM, n = 6-20). Signifikanzen der Unterschiede: verglichen mit der Kontrolle ** p < 0,01; verglichen mit dem jeweiligen Wert in Abwesenheit von AH 6809 + p < 0,05.

Der EP2-Rezeptoragonist Butaprost konnte die [³H]-Thymidin-Inkorporation und folglich die *de novo*-DNA-Synthese konzentrationsabhängig mit einer IC₅₀ von 2,3 nM um bis

75 % inhibieren (s. Abb. IV–23). Durch Präinkubation des Versuchsansatzes mit dem EP1/2-Rezeptorantagonisten AH 6809 (10 μ M) konnte die Konzentrations-Wirkungs-Kurve deutlich nach rechts verschoben werden; der errechnete pA_2 -Wert dieser Antagonisierung liegt mit 6,1 im Bereich des bereits bekannten Literaturwertes (Abramovitz *et al.*, 2000), so dass der antiproliferative Effekt des Butaprosts tatsächlich EP2-Rezeptor-vermittelt zu sein scheint.

3.5 Prostaglandin E-Rezeptorexpression

Nachfolgend wurde der EP-Rezeptor-Expressionsstatus in (primären) humanen Lungenfibroblasten mittels RT-PCR charakterisiert. Sowohl in primären humanen Lungenfibroblasten als auch auf MRC 5-Zellen war der EP2-Rezeptor am stärksten exprimiert und konnte bereits nach 30 PCR-Zyklen detektiert werden. Zum Nachweis der EP3- und EP4-Rezeptoren waren 40 bzw. 35 Amplifikationszyklen notwendig und eine Expression der EP1-Rezeptoren konnte auch nach 40 Zyklen in beiden Zelltypen nicht nachgewiesen werden (s. Abb. IV–24).

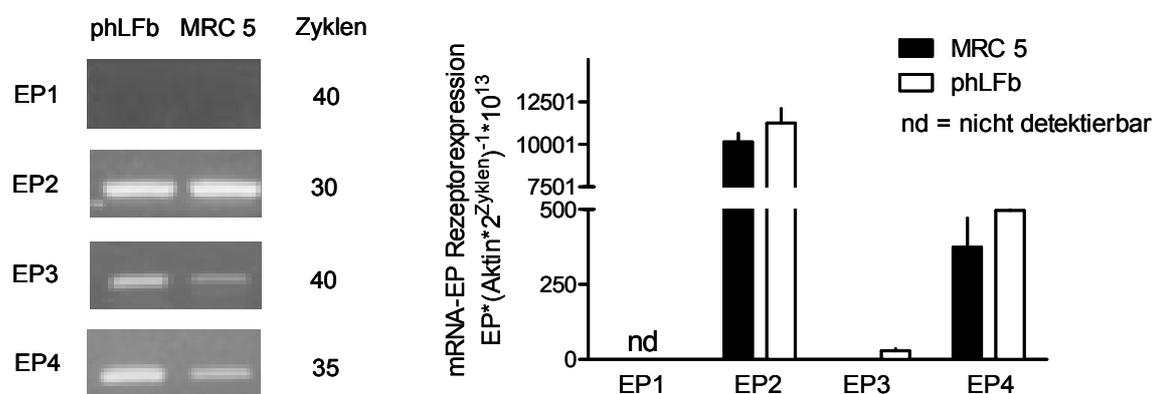


Abb. IV–24 mRNA-Expression von Prostaglandin E-Rezeptoren (EP1-4) in MRC 5-Zellen und in primären humanen Lungenfibroblasten (phLFb). Die Zellen wurden bis zur Konfluenz in Fibroblastenmedium mit 10 % FKS kultiviert. Im Anschluss wurde die Gesamt-RNA isoliert, einem DNase-Verdau unterzogen und eine RT-PCR mit der angegebenen Zyklenzahl und den jeweils spezifischen Primern durchgeführt. Links: repräsentative Gelausschnitte der jeweiligen PCRs. Rechts: densitometrische Auswertung ausgedrückt als arbiträre Einheiten (s. Achsenbeschriftung); angegeben sind die Mittelwerte + SEM (n = 3) normalisiert über β -Aktin und über die jeweilige Zyklenzahl.

3.6 Rolle der Proteinkinase A bei der cAMP-vermittelten antiproliferativen Wirkung

Eine Erhöhung intrazellulärer cAMP-Spiegel kann unterschiedliche Signalwege anstossen. In humanen Atemwegsfibroblasten sind hier insbesondere die Proteinkinase A und die Epac-Proteine von Bedeutung und es sollte im weiteren Verlauf untersucht werden, ob der durch eine cAMP-Erhöhung ausgelöste, antiproliferative Effekt über einen dieser Wege vermittelt wird. Es wurde zuerst die Wirkung von drei verschiedenen, häufig benutzten PKA-Inhibitoren auf die Proliferation untersucht. KT5720 (Kase *et al.*, 1987) und H89 (Chijiwa *et al.*, 1990), beide als potente PKA-Inhibitoren beschrieben, zeigten eine ausgeprägte antiproliferative Wirkung. PKI 14-22, ein Oligopeptid und Abkömmling des endogenen PKA-Inhibitors, zeigte hingegen bei Konzentrationen bis zu 10 μM eine proliferationssteigernde Wirkung und war ab einer Konzentration von 30 μM für die Atemwegsfibroblasten toxisch (s. Abb. IV–25), was neben der stark abgesenkten [^3H]-Thymidin-Inkorporationsrate auch mikroskopisch durch ein Absterben der Zellen deutlich wurde.

MRC 5

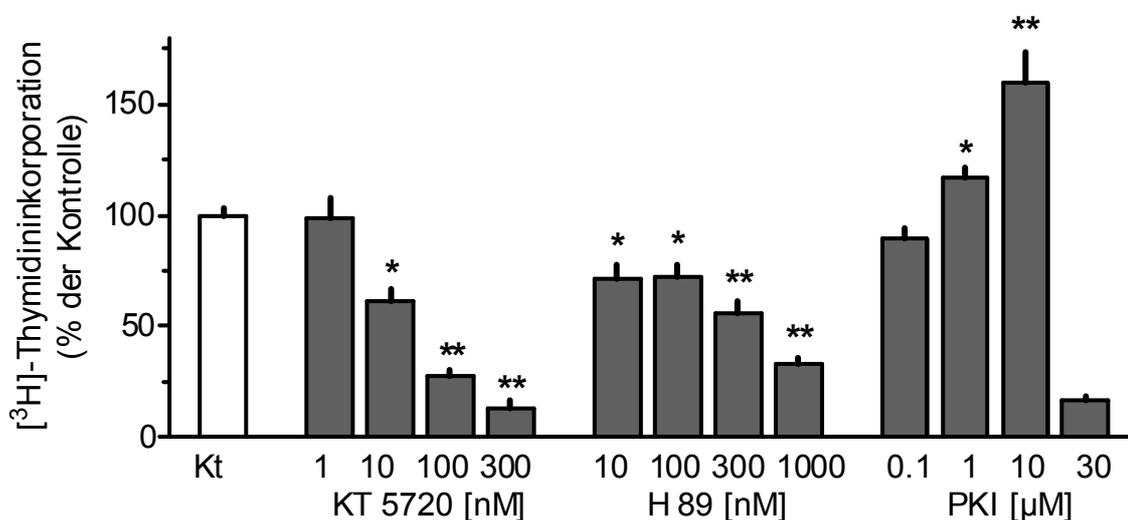


Abb. IV–25 Wirkung verschiedener PKA-Inhibitoren auf die Proliferation von MRC 5-Zellen. Die Zellen wurden 30 h in An- oder Abwesenheit der jeweiligen Testsubstanzen kultiviert. 24 h vor der Zellyse wurde [^3H]-Thymidin (37 kBq/Well) zugegeben. Anschließend wurde das inkorporierte [^3H]-Thymidin als Maß für die DNA-Neusynthese quantifiziert. Die Ergebnisse sind dargestellt in Prozent des Mittelwertes der Kontrollen des jeweiligen Versuchansatzes (Mittelwert + SEM, n = 6-17). Signifikanzen der Unterschiede verglichen mit der unbehandelten Kontrolle (Kt) * p < 0,05, ** p < 0,01.

Zum Nachweis der inhibitorischen Aktivität dieser Substanzen wurde die Wirksamkeit der Inhibitoren untersucht, die PKA-induzierte CREB-Phosphorylierung zu unterbinden (s. Abb. IV–26). Der Transkriptionsfaktor CREB ist ein typisches Effektorprotein der Proteinkinase A, das nach deren Aktivierung phosphoryliert und somit aktiviert wird. Es konnte aber bei keinem der verwendeten PKA-Inhibitoren eine ausreichende Inhibition der CREB-Phosphorylierung detektiert werden. Einzig H99 (10 μM) war in der Lage, die CREB-Phosphorylierung komplett zu unterdrücken, aber dies in einem Konzentrationsbereich ($> 10 \mu\text{M}$), der für die Zellen bereits toxisch war. Auf Interaktionsexperimente mit Butaprost wurde verzichtet, da unter diesen Bedingungen keine konklusiven Ergebnisse zu erwarten gewesen wären.

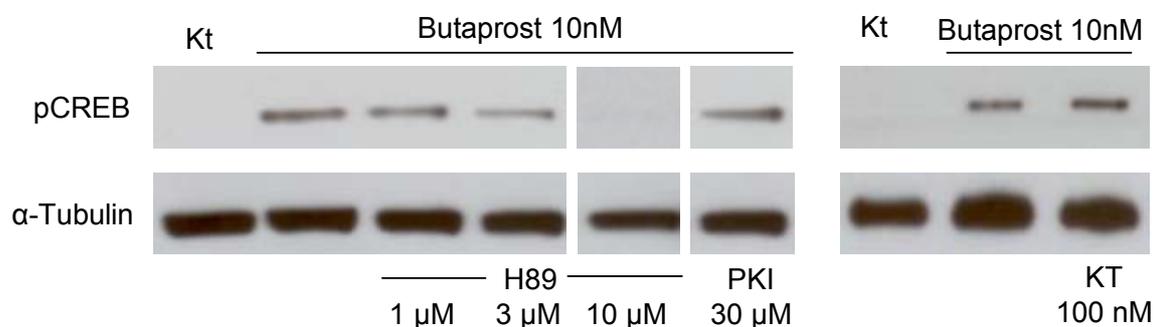


Abb. IV–26 Effekte von Butaprost (10 nM) in An- oder Abwesenheit verschiedener PKA-Inhibitoren auf die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB in MRC 5-Zellen analysiert mittels Western Blot. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz wachsen gelassen, wobei die letzten 18 h vor der Lyse serumfrei waren. Die Inkubationszeit mit Butaprost betrug jeweils 15 min und die PKA-Inhibitoren (H89: 1-10 μM , PKI: 30 μM , KT5720: 100 nM) wurden 1 h vor der Zugabe von Butaprost auf die Zellen gegeben. Die Atemwegs-fibroblasten wurden lysiert und die Kerne mit Hilfe des NE-PER[®] *Nuclear and Cytoplasmic Extraction-Kits* präpariert. Obere Reihe: phosphorylierte Form des Transkriptionsfaktor CREB (pCREB); untere Reihe: α -Tubulin als Referenzprotein. Gezeigt sind Gelausschnitte aus repräsentativen Western Blot (n = 2).

Mit dem cAMP-Analagon Rp-8-Br-cAMPS (Gjertsen *et al.*, 1995) wurde ein weiterer potenter PKA-Inhibitor verwendet, der keine Wirkung auf die Proliferation der MRC 5-Zellen ausübte (s. Abb. IV–27, links) und zudem in der Lage war die CREB-Phosphorylierung (s. Abb. IV–27, rechts) größtenteils zu unterdrücken. In durchgeführten Interaktionsexperimenten mit Butaprost (B, 10 nM) und mit Forskolin (F, 10 μ M) konnte aber keine Antagonisierung des antiproliferativen Effektes der beiden Substanzen detektiert werden (s. Abb. IV–27, links).

MRC 5

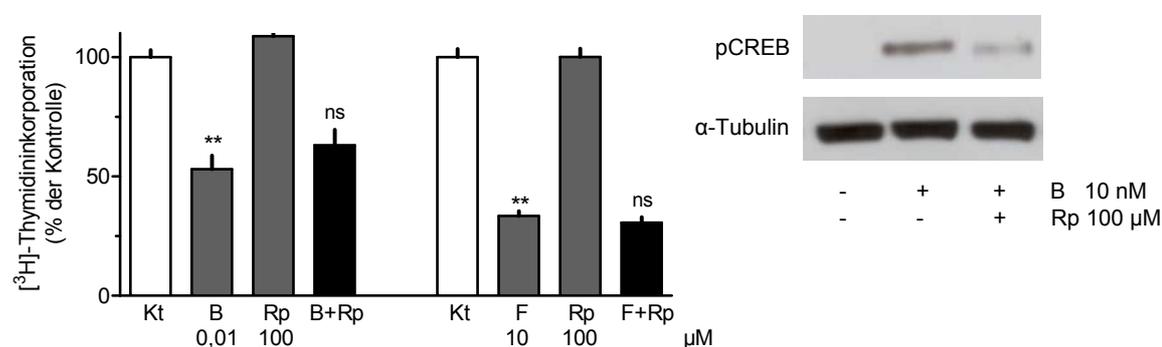


Abb. IV–27 Links: Effekte von Butaprost (B, 10 nM) und Forskolin (F, 10 μ M) in An- und Abwesenheit des PKA-Inhibitors Rp-8-Br-cAMPS (Rp, 100 μ M) auf die Proliferation von MRC 5-Zellen. Die Zellen wurden 30 h in An- oder Abwesenheit der jeweiligen Testsubstanzen kultiviert, wobei der PKA-Inhibitor 1 h vor Butaprost bzw. Forskolin zugegeben wurde. 24 h vor der Zelllyse wurde ^3H -Thymidin (37 kBq/Well) zupipettiert. Anschließend wurde das inkorporierte ^3H -Thymidin als Maß für die DNA-Neusynthese quantifiziert. Die Ergebnisse sind dargestellt in Prozent des Mittelwertes der Kontrollen des jeweiligen Versuchansatzes (Mittelwert \pm SEM, n = 7-10). Signifikanzen der Unterschiede verglichen mit der jeweiligen Kontrolle (Kt): ** p < 0,01, ns = nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zur Butaprost- bzw. Forskolin-behandelten Probe.

Rechts: Inhibitorischer Effekt von Rp-8-Br-cAMPS auf die Butaprost-induzierte Phosphorylierung von CREB (pCREB) analysiert mittels Western Blot in MRC 5-Zellen. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz wachsen gelassen, wobei die letzten 18 h vor der Lyse serumfrei waren. Die Inkubationszeit mit Butaprost betrug 15 min und der PKA-Inhibitor wurde 1 h vor der Zugabe von Butaprost auf die Zellen gegeben. Die Atemwegs-fibroblasten wurden lysiert und die Kerne mit Hilfe des NE-PER[®] Nuclear and Cytoplasmic Extraction-Kits präpariert. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot (n = 3).

3.7 Rolle von Epac1/2 bei der cAMP-vermittelten antiproliferativen Wirkung

3.7.1 Expression von Epac1 und Epac2

Nachdem gezeigt wurde, dass die Proteinkinase A wahrscheinlich nicht maßgeblich an der Inhibition der Proliferation in humanen Atemwegsfibroblasten beteiligt ist, wurde die Rolle der Guaninnukleotidaustauschfaktoren Epac1 und Epac2 näher untersucht. Zu diesem Zweck wurde zuerst das Expressionsmuster der beiden Isoformen mittels semiquantitativer RT-PCR in MRC 5-Zellen und in primären humanen Lungenfibroblasten (phLFb) näher charakterisiert. Es konnte eine deutliche Expression der beiden Isoformen Epac1 und Epac2 nach 30 PCR-Zyklen sowohl in MRC 5-Zellen als auch in primären humanen Lungenfibroblasten detektiert werden (s. Abb. IV–28).

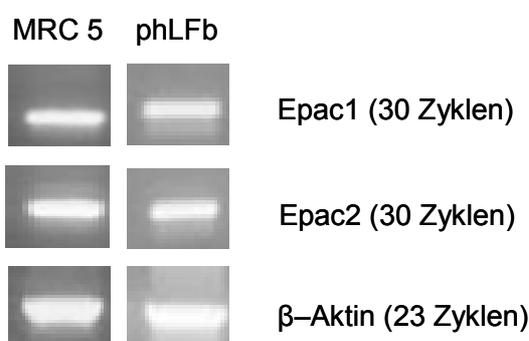


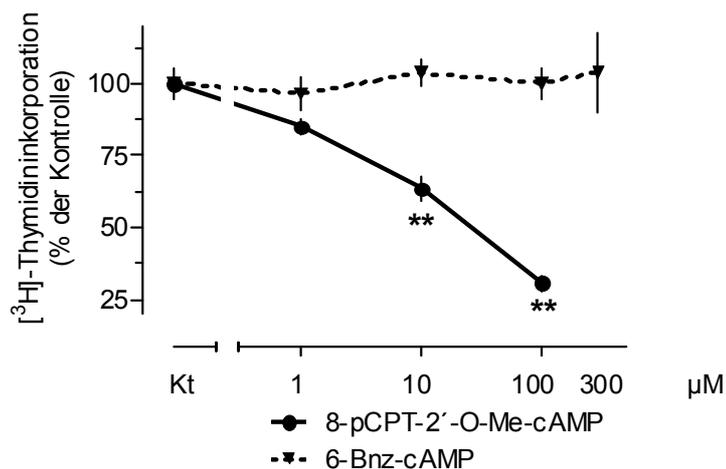
Abb. IV–28 mRNA-Expression von Epac1 und Epac2 in MRC 5-Zellen und in phLFb. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz in Fibroblastenmedium mit 10 % FKS kultiviert. Im Anschluss wurde die GesamtrNA isoliert und eine RT-PCR mit der angegebenen Zyklenzahl und den jeweils spezifischen Primern durchgeführt. Gezeigt sind repräsentative Gelausschnitte der jeweiligen PCRs ($n > 3$).

3.7.2 Einsatz spezifischer cAMP-Analoga zur Differenzierung zwischen PKA- und Epac-vermittelten Signalwegen

Zur Unterscheidung zwischen PKA- und Epac-vermittelten Signaltransduktion bieten sich cAMP-Analoga an, die spezifisch einen der beiden Signalwege aktivieren (s. Einleitung, Abb. I–9). 6-Bnz-cAMP, ein spezifischer PKA-Aktivator, zeigte in Konzentrationen bis zu 300 μM keinen Effekt auf die Proliferation von MRC 5-Zellen (s. Abb. IV–29, A, gestrichelte Linie), wohingegen 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP, ein spezifischer Aktivator der Epac-Proteine, die Proliferation konzentrationsabhängig hoch signifikant um bis zu 70 % inhibieren konnte (s. Abb. IV–29, A, durchgezogene Linie). Bestätigen ließen sich diese Ergebnisse durch den Einsatz des hydrolyseresistenten Epac-Aktivators Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS (1-100 μM), der ebenfalls zu einer hoch signifikanten

Hemmung der Proliferation führte (s. Abb. IV-29, B, durchgezogene Linie). Als Negativkontrolle wurde 8-pCPT-2'-O-Me-cGMP (1-100 μ M), ein cGMP-Analogen mit den gleichen Substituenten wie der Epac-Aktivator 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP, verwendet; hierbei konnte kein Einfluss auf die Proliferation festgestellt werden (s. Abb. IV-29, B, gestrichelte Linie).

A MRC 5



B MRC 5

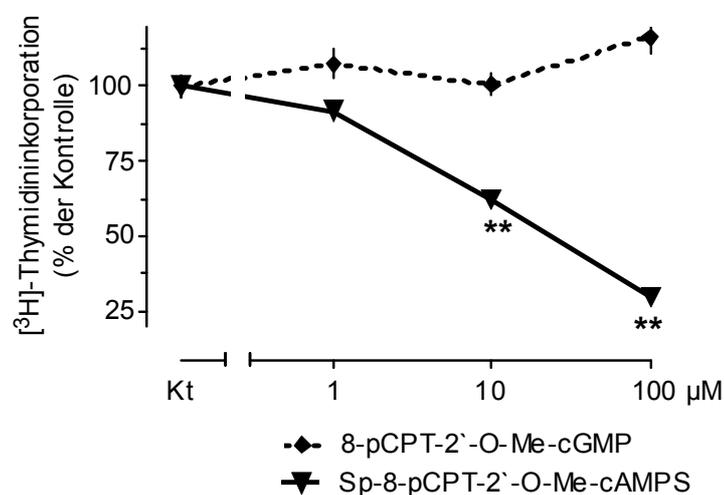


Abb. IV-29 Konzentrationsabhängige Effekte von 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP und 6-Bnz-cAMP (A) sowie 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP und Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS (B) auf die Proliferation von MRC 5-Zellen. Die Zellen wurden 30 h in An- oder Abwesenheit der jeweiligen Testsubstanzen kultiviert. 24 h vor der Zelllyse wurde [3 H]-Thymidin (37 kBq /Well) zugegeben. Anschließend wurde das inkorporierte [3 H]-Thymidin als Maß für die DNA-Neusynthese im Zelllysate quantifiziert. Die Ergebnisse sind dargestellt in Prozent des Mittelwertes der Kontrollen des jeweiligen Versuchansatzes (Mittelwert \pm SEM, n = 9-21). Signifikanzen der Unterschiede verglichen mit der jeweiligen Kontrolle: ** p < 0,01.

3.7.3 Untersuchung der Beteiligung von Epac1 und Epac2 an der cAMP-vermittelten Proliferationsinhibition mittels siRNA-Technik

3.7.3.1 Etablierung der siRNA-Transfektion mittels Lipofektion

Da bis dato noch keine pharmakologischen Inhibitoren der Epac-Proteine entwickelt wurden, müssen andere molekularbiologische Methoden verwendet werden, um die Rolle der Epac-Proteine an der cAMP-vermittelten Hemmung der Proliferation in Lungenfibroblasten zu untersuchen. Zu diesem Zweck bietet sich die Technik der siRNA an, mit deren Hilfe gezielt einzelne Genprodukte in der Zelle herunterreguliert werden können. Begonnen wurde diese Versuchsreihe mit der Etablierung der optimalen Transfektionsbedingungen. Mit Hilfe des kationischen Liposoms LipofectamineTM 2000 wurde der Fluoreszenzmarker BLOCK-iTTM Fluorescent Oligo (50 nM, FITC (*fluorescein isothiocyanate*)-markierte, doppelsträngige RNA, die sich im Kern anreichert) in die Zelle eingeschleust. Die fluoreszierende RNA kann als Stellvertreter für die zu verwendende siRNA benutzt werden und gibt Aufschluss über die Transfektionseffizienz des Systems. Im Zellkern detektierte Fluoreszenz wird als erfolgreiche Aufnahme der doppelsträngigen RNA gedeutet. Wie in Abb. IV–30 zu sehen, konnte durch die gewählten Transfektionsbedingungen in fast allen Zellen Fluoreszenz im Kern detektiert werden, was für eine hohe Transfektionseffizienz spricht und gute Voraussetzungen für eine Aufnahme der siRNA in die Zellen bietet. Mit diesem Transfektionsprotokoll wurde in den folgenden Versuchen die gegen Epac1 und Epac2 gerichtete siRNA in die MRC 5-Zellen eingeschleust.

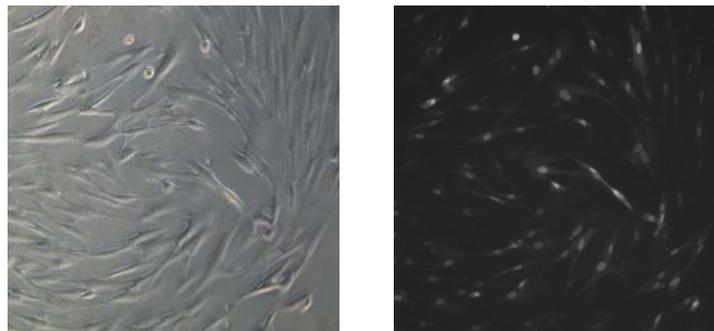
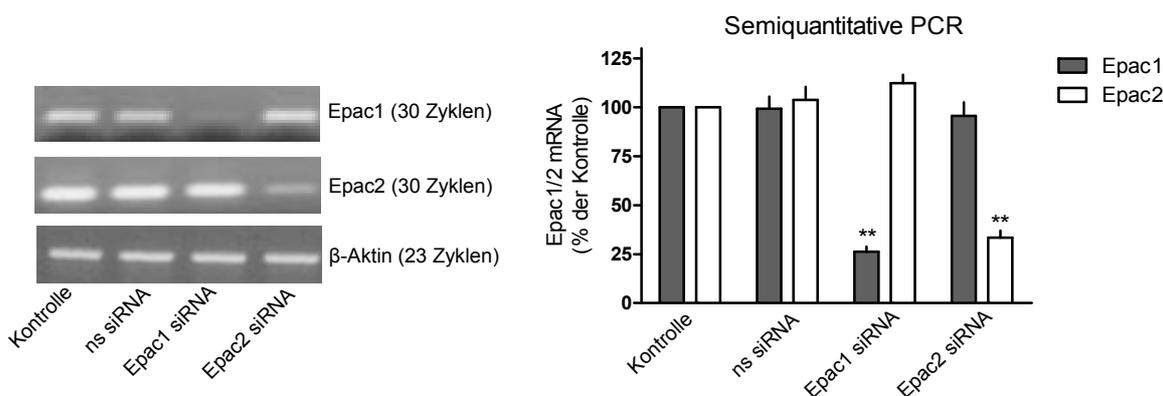


Abb. IV–30 Kontrolle der Transfektionseffizienz für die siRNA-Versuche mit Hilfe der fluoreszenzmarkierten doppelsträngigen RNA (BLOCK-iTTM Fluorescent Oligo, Invitrogen) in MRC 5-Zellen. Links: Weißlichtaufnahme; rechts: Aufnahme nach Fluoreszenzanregung.

3.7.3.2 Nachweis des *Knock-Downs* auf mRNA-Ebene

Die erfolgreiche Transfektion der MRC 5-Zellen mit siRNA gegen Epac1 und Epac2 wurde mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR (s. Abb. IV–31, A), aber auch der quantitativen Real-Time PCR (s. Abb. IV–31, B) nachgewiesen. 2×10^5 MRC 5-Zellen wurden ausgesät, bei ca. 40%iger Konfluenz mit siRNA wie unter III.2.7 beschrieben transfiziert, 24 h später lysiert, die Gesamt-RNA isoliert und diese einer semiquantitativen PCR bzw. einer Real-Time PCR unterzogen.

A MRC 5



B MRC 5

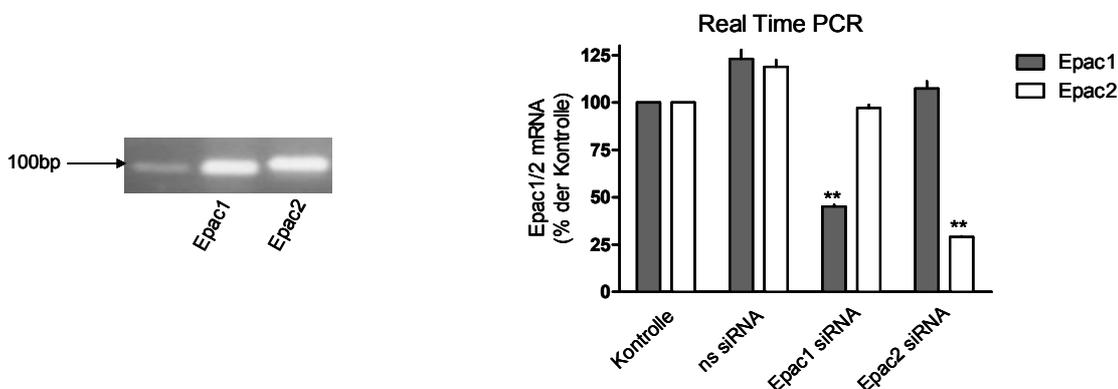


Abb. IV–31 Effekte der eingesetzten siRNAs auf die Expression von Epac1 und Epac2 in MRC 5-Zellen bestimmt mittels semiquantitativer RT-PCR (A) oder Real-Time PCR (B). 2×10^5 MRC 5-Zellen wurden pro 35 mm Zellkulturschale in Fibroblastenmedium mit 10 % FKS ausgesät. Die Transfektion mit siRNA gegen Epac1, Epac2 bzw. *non silencing* (ns) siRNA wurde 24 h nach der Aussat in antibiotikafreiem Medium mit 1 % FKS wie in III.2.7 beschrieben durchgeführt. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert, die Gesamt-RNA isoliert und diese einer semiquantitativen PCR bzw. einer Real-Time PCR unterzogen. Gezeigt sind repräsentative Gelausschnitte der semiquantitativen PCRs (A, links) und deren densitometrische Auswertung (A, rechts) dargestellt als Mittelwerte + SEM (n = 5) normalisiert über β -Aktin.

Im unteren Bildabschnitt ist ein repräsentatives Gel nach Auftragen und Auftrennung der Real-Time PCR-Produkte zur Bestätigung der richtigen Produktgröße zu sehen (B, links). Im rechten Bildabschnitt ist die quantitative Auswertung mehrerer Real-Time PCRs als Mittelwerte + SEM (n = 5) normalisiert über das Referenzgen GAPDH dargestellt. Signifikanzen der Unterschiede verglichen mit der jeweiligen Kontrolle: ** p < 0,01.

Die Transfektion der Zellen mit gegen Epac1 gerichteter siRNA führte in der semiquantitativen RT-PCR zu einer hoch signifikanten Reduktion der Epac1-mRNA, ohne einen Einfluss auf die Epac2-Transkriptmenge zu haben. Analoges konnte für die Transfektion der MRC 5-Zellen mit siRNA gegen Epac2 detektiert werden: es wurde eine hoch signifikante Expressionsminderung des Epac2-Transkriptes nachgewiesen, ohne die Epac1-Expression zu beeinflussen. Die Spezifität dieses *Knock-Downs* wurde dadurch bestätigt, dass die Transfektion der Zellen mit einer unspezifischen siRNA (ns siRNA, *non silencing* siRNA) die Expression der beiden Epac-Isoformen nicht beeinflusste. Die Untersuchung des *Knock-Downs* mittels Real-Time PCR bestätigte diese Ergebnisse.

3.7.3.3 Nachweis des Epac-*Knock-Downs* auf Proteinebene

Nach dem Nachweis der erfolgreichen Herunterregulierung der Epac1- und Epac2-Expression auf mRNA-Ebene, stand im Folgenden der *Knock-Down* auf Proteinebene im Mittelpunkt des Interesses.

Mit dem monoklonalen Antikörper Epac (A-5): sc28366 (Santa Cruz) konnte ein spezifischer Antikörper gegen Epac1 für das Zellsystem validiert werden, der zum Nachweis des *Knock-Downs* auf Proteinebene herangezogen wurde.

Obwohl bereits 24 h nach der Transfektion mit Epac1-siRNA das mRNA-Expressionsniveau hoch signifikant abgesenkt werden konnte, war dieser Effekt auch 48 h nach der Transfektion auf Proteinebene noch nicht detekierbar (Daten nicht gezeigt). Dies lässt auf eine lange Halbwertszeit des Epac1-Proteins schließen, was durch Experimente mit Cycloheximid bestätigt werden konnte; eine Inkubation der Zellen mit Cycloheximid (CHX, 30 μ M), das als Translationshemmer die Proteinneusynthese unterbindet, konnte das Epac1-Proteinniveau weder nach 24 noch nach 48 h signifikant verringern und das Verhältnis von Epac1-Protein zu dem Strukturprotein α -Tubulin blieb über diesen Zeitraum nahezu konstant (s. Abb. IV-32, A). Die Gesamtproteinmenge nahm erwartungsgemäß im Laufe der Inkubation mit Cycloheximid ab; in den Kontrollen betrug sie \sim 226 μ g Protein/Well und nach 24- bzw. 48-stündiger Inkubation mit Cycloheximid nur noch \sim 168 bzw. \sim 143 μ g Protein/Well.

Im abgeänderten Transfektionprotokoll wurde dieser langen Halbwertszeit Rechnung getragen. Es wurde 24 h nach der ersten Transfektion eine zweite durchgeführt und die Zellen wurden erst 96 h nach der zweiten Transfektion zur Proteinanalyse lysiert. Mit Hilfe dieses Protokolls konnte eine hoch signifikante Reduktion des Proteinniveaus von Epac1 um \sim 60 % erreicht werden (s. Abb. IV-32, B).

Es wurden mehrere Antikörper gegen Epac2 mittels Western Blot untersucht (Epac2 (M-18): sc-9383 und Epac2 (A-7): sc-28326, beide von der Firma Santa Cruz), es konnte jedoch kein Epac2-Antikörper gefunden werden, mit dem eine Detektion der Expression des Proteins möglich war.

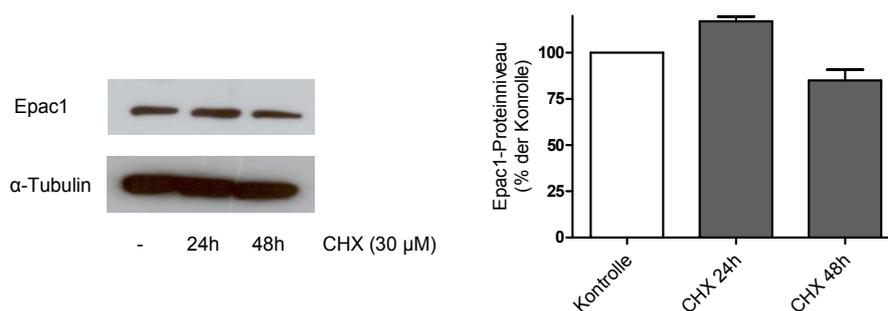
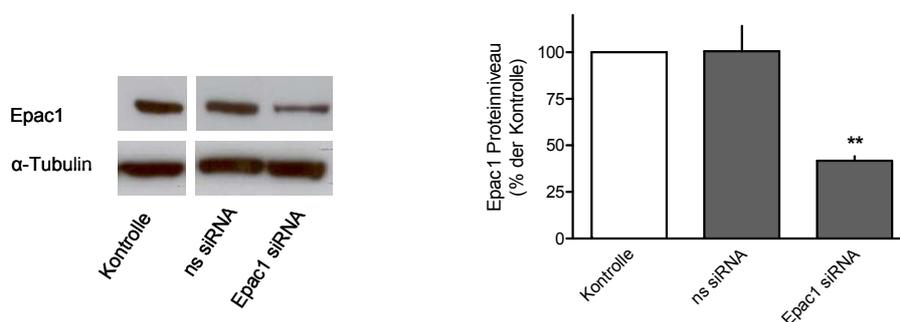
A MRC 5**B MRC 5**

Abb. IV-32 (A) Effekte von Cycloheximid (30 μ M) auf das Epac1-Proteiniveau in MRC 5-Zellen. 2×10^5 MRC 5-Zellen wurden in 55 mm-Zellkulturschalen ausgesät und bis zur Konfluenz in Fibroblastenmedium mit 10 % FKS kultiviert. Nach der sich anschließenden 24- bzw. 48-stündigen Inkubation mit Cycloheximid wurden die Zellen mit RIPA-Puffer (mit Proteaseinhibitoren) lysiert und proteinnormalisiert im Western Blot untersucht. Links: repräsentativer Western Blot, rechts: densitometrische Auswertung (n = 3).

(B) Effekte der Epac1 siRNA und der ns (*non silencing*) siRNA auf das Epac1-Expressionsniveau in MRC 5-Zellen. 2×10^5 MRC 5-Zellen wurden in 55 mm-Zellkulturschalen ausgesät und 24 h in Medium mit 10 % FKS wachsen gelassen. Im Anschluss wurde auf antibiotikafreies Medium mit 1 % FKS umgestellt, da ein kompletter Verzicht auf FKS über den langen Zeitraum des Protokolls bei zweimaliger Transfektion für die Zellen nicht tolerierbar war. Zeitgleich wurde die Transfektion durchgeführt und 24 h später wiederholt. 96 h nach der zweiten Transfektion wurden die Zellen lysiert und proteinnormalisiert einer Western Blot-Analyse unterzogen. Links: repräsentativer Western Blot, rechts: densitometrische Auswertung; n = 3; Signifikanzen der Unterschiede verglichen mit der Kontrolle: ** p < 0,01.

3.7.3.4 Funktionelle Untersuchungen zur Proliferation nach Epac1/2-*Knock-Down*

Mit diesem Protokoll, das eine erfolgreiche Herabregulierung von Epac1 auf dem Proteinniveau garantierte, wurden im Folgenden Proliferationsexperimente durchgeführt (s. Abb. IV–33). Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Herabregulierung des Epac1-Proteinniveaus den antiproliferativen Effekt von Butaprost deutlich abmildert. Es kam zu einer signifikanten Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve nach Transfektion der Zellen mit Epac1-siRNA. Die halbmaximal effektive Konzentration von Butaprost (EC_{50}) wurde um mehr als das 10fache auf 30 nM gesteigert, wobei der Maximaleffekt von Butaprost sich allerdings nicht änderte. Im Gegensatz dazu zeigte die Transfektion mit Epac2-siRNA keinen signifikanten Einfluss auf den Effekt von Butaprost (s. Abb. IV–34). Die Transfektion der Zellen mit siRNA, die gegen keine Zielsequenz in der Zelle gerichtet war (ns siRNA), zeigte erwartungsgemäß keine Veränderung im Proliferationsverhalten gegenüber der Kontrolle, was *off-target*-Effekte der siRNA in diesem experimentellen Prozedere ausschließt.

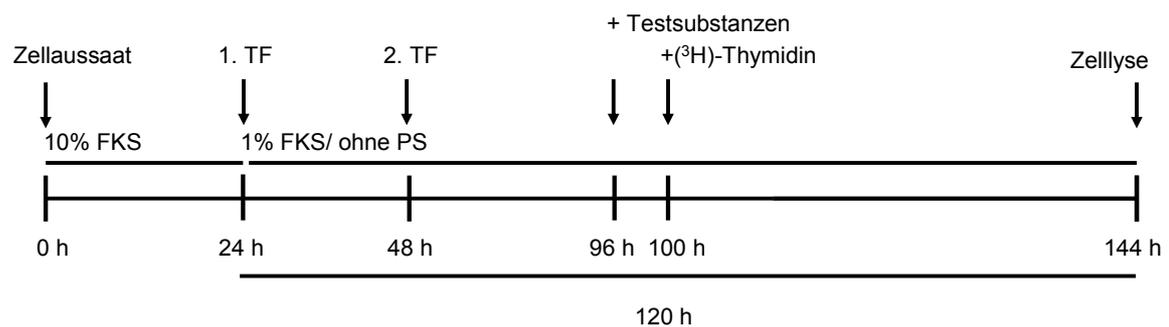


Abb. IV–33 Schematische Darstellung des Protokolls für die Proliferationsversuche nach Transfektion mit siRNA. FKS = fetales Kälberserum, PS = Antibiotikamischung (Penicillin/ Streptomycin), TF = Transfektion.

MRC 5

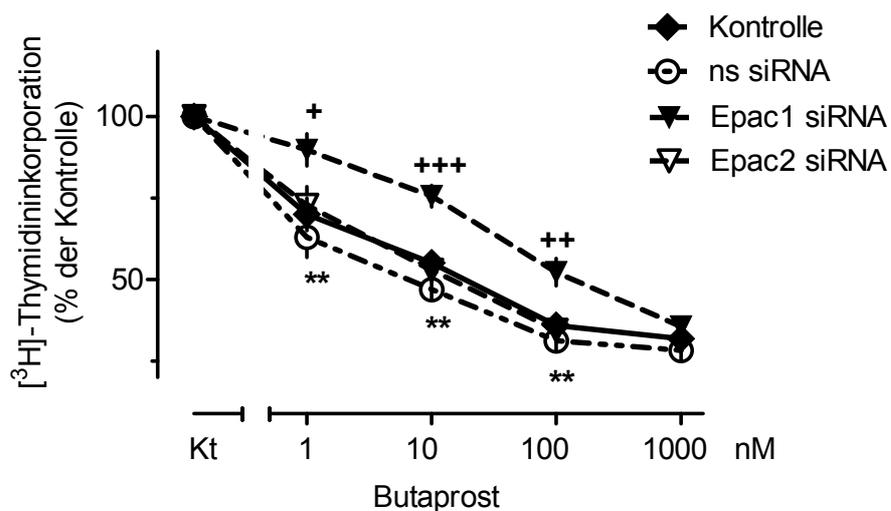


Abb. IV-34 Effekte von Butaprost auf die Proliferation von MRC 5-Zellen nach Vorbehandlung mit siRNA gegen Epac1, Epac2 bzw. ns siRNA. Die Zellen wurden wie im Schema dargestellt behandelt und nach erfolgreicher 2facher Transfektion 48 h mit Butaprost (1 nM-1 μ M) kultiviert. 44 h vor der Zellyse wurde [3 H]-Thymidin (37 kBq/Well) zugegeben und anschließend wurde das inkorporierte [3 H]-Thymidin als Maß für die DNA-Neusynthese im Zelllysate quantifiziert. Die Ergebnisse sind dargestellt in Prozent des Mittelwertes der Kontrollen des jeweiligen Versuchansatzes (Mittelwert \pm SEM, n = 9). Signifikanzen der Unterschiede: verglichen mit der jeweiligen Kontrolle (Kt) ** p < 0,01; verglichen mit dem jeweiligen Wert der nicht-transfizierten Probe + p < 0,05, ++ p < 0,01, +++ p < 0,001.

3.8 Charakterisierung des Rap1-Aktivitätsmusters nach cAMP-Erhöhung

Rap1 ist ein bekanntes und gut charakterisiertes Effektorprotein des Austauschfaktors Epac; es sollte im Folgenden untersucht werden, ob durch Inkubation mit Butaprost eine Aktivierung des kleinen G-Proteins Rap1 ausgelöst wird und dieses somit *down-stream* von Epac für die cAMP-vermittelte antiproliferative Wirkung verantwortlich sein könnte. Mit Hilfe des *EZ-DetectTM Rap1 Activation Kit* (Pierce, Rockford, USA), das es ermöglichte aktiviertes (GTP-gebundenes) Rap1 von nicht aktiviertem (GDP-gebundenem) Rap1 zu unterscheiden (s. III.2.6.1), konnte dieser Zusammenhang untersucht werden. Durch Einsatz von Butaprost (100 nM) war eine schnelle aber transiente Aktivierung mit einem maximalen Effekt nach ca. 15 min detektierbar (s. Abb. IV–35). Als Positivkontrolle, die eine erfolgreiche Durchführung des Assays bestätigte, wurde Proben analog zum Versuchsprotokoll mit GTP γ S behandelt, welches zu einer stabilen Rap1-Aktivierung führte; dies konnte im Western Blot deutlich detektiert werden. Analog wurde eine Negativkontrolle mit GDP behandelt, welches GTP von aktiviertem Rap verdrängt und somit zu einer kompletten Inaktivierung von Rap1 führt, was durch das Fehlen der Rap1-Bande im Western Blot nachgewiesen wurde.

MRC 5

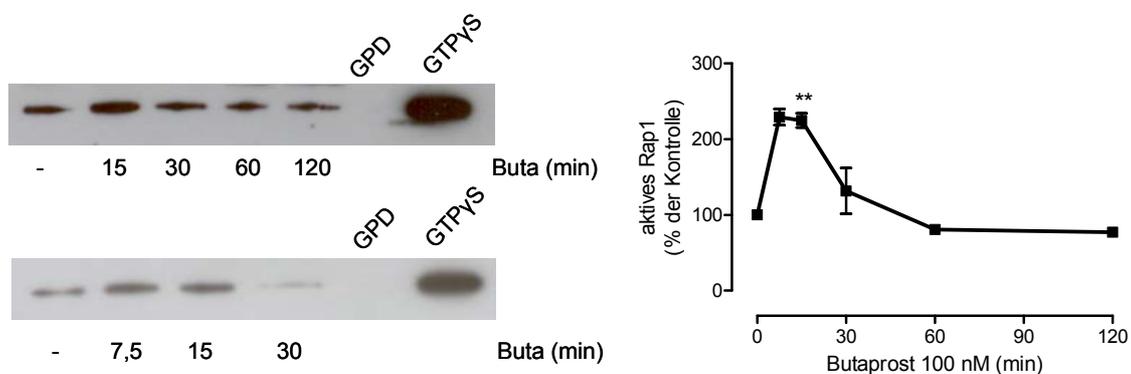
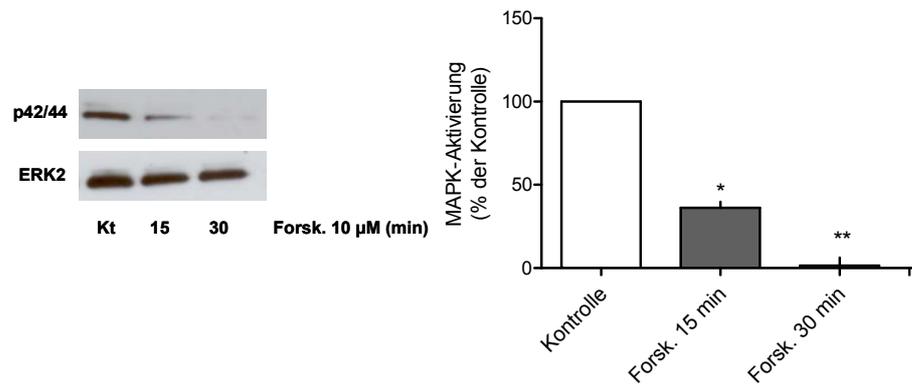


Abb. IV–35 Effekt von Butaprost (Buta, 100 nM) auf die Rap1-Aktivierung in MRC 5-Zellen. 5×10^5 MRC 5-Zellen wurden in 55 mm Zellkulturschalen ausgesät und 48 h in Fibroblastenmedium mit 10 % FKS gefolgt von einer 18-stündigen serumfreien Hungerphase kultiviert. Die Zellen wurden dann für die angegebenen Zeiten mit Butaprost inkubiert und anschließend wurde im Zelllysate das GTP-beladene Rap1 mit Hilfe des *EZ-DetectTM Rap1 Activation Kit* (s. III.2.6.1) extrahiert und im Western Blot bestimmt. Um die Funktionalität des Assays nachzuweisen, wurden das Zelllysate zusätzlich mit GDP (1 mM; Negativkontrolle) und GTP γ S (0,1 mM; Positivkontrolle) inkubiert und je ein Aliquot entsprechend den Proben behandelt und im Western Blot untersucht. Gezeigt sind zwei repräsentative Western Blots mit überlappenden Zeitfenstern (links) und die densitometrische Auswertung einer Serie von Experimenten (Mittelwert \pm SEM, n = 3, rechts). Signifikanzen der Unterschiede verglichen mit der Kontrolle: ** p < 0,01

3.9 Bedeutung des MAP-Kinase-Signalweges bei der cAMP-vermittelten Inhibition der Proliferation

Schon seit langem wird ein inhibitorischer Einfluss einer cAMP-Erhöhung auf die Aktivität der MAP-Kinase-Signalkaskade in verschiedenen Zellsystemen diskutiert (Stork und Schmitt, 2002). Ob die Inhibition der Proliferation in Atemwegsfibroblasten nach cAMP-Erhöhung möglicherweise ebenfalls unter Beteiligung der MAP-Kinase-Signalkaskade abläuft, sollte im Western Blot mit Hilfe eines Antikörpers untersucht werden, der spezifisch die phosphorylierte und somit aktivierte Form der p42/44-MAP-Kinase erkennt. Durch den Einsatz von Forskolin konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der p42/44-MAP-Kinase nach 30 min nahezu vollständig unterdrückt werden konnte (s. Abb. IV-36, A). Die Inkubation mit dem Epac-Aktivator 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (100 μ M) zeigte einen weniger ausgeprägten Effekt; zwar konnte die Aktivität der p42/44-MAPK tendenziell inhibiert werden, es kam jedoch nur zu einem transienten Abfall der MAP-Kinase-Aktivität nach 15, 30 oder 45 Minuten, wobei sich die übrigen Werte auf Kontrollniveau befanden. Dadurch, dass das Aktivitätsminimum immer zu einem anderen Zeitpunkt gemessen wurde, konnte im Zeitverlauf kein statistisch signifikanter Abfall gemessen werden. Der Effekt wurde aber nach dem Poolen der jeweiligen Minimalwerte statistisch signifikant (in Abb. IV-36). Die Inkubation mit dem PKA-Aktivator 6-Bnz-cAMP (100 μ M) zeigte keinen Hemmeffekt auf die p42/44-MAP-Kinase-Aktivität.

A MRC 5



B MRC 5

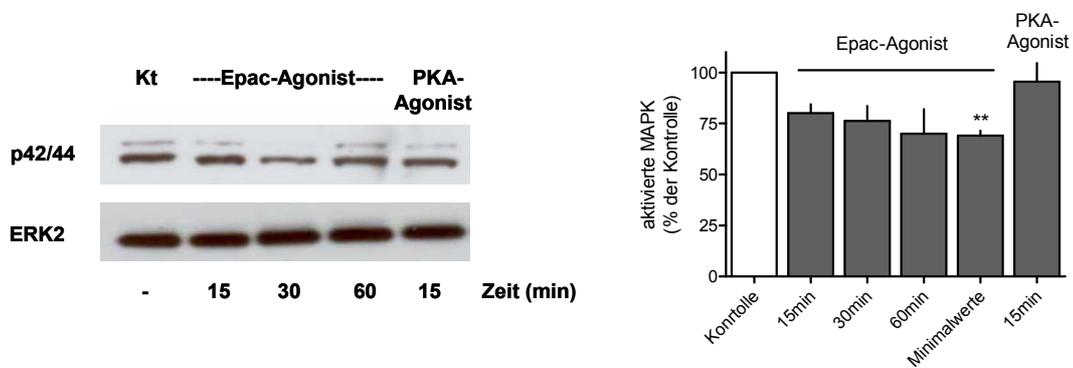


Abb. IV-36 (A) Effekte von Forskolin (Forsk., 10 µM) und (B) spezifischer cAMP-Analoga auf die Aktivität der p42/44-MAP-Kinase ermittelt im Western Blot. 5×10^5 MRC 5-Zellen wurden in 55 mm Zellkulturschalen ausgesät und bis zur 80%igen Konfluenz in Fibroblastenmedium mit 10 % FKS gefolgt von einer 18-stündigen Hungerphase kultiviert. Um die MAP-Kinase-Signalkaskade zu aktivieren wurde nach der Synchronisierungsphase wieder 1 % FKS zugesetzt und die Zellen dann für die angegebenen Zeiten mit Forskolin (A) oder spezifischen cAMP-Analoga (B) inkubiert. Anschließend erfolgte die Zellyse mit RIPA-Puffer mit Protease- und Phosphataseinhibitoren. Der Aktivierungszustand der p42/44-MAP-Kinase wurde über den Einsatz eines Antikörpers im Western Blot bestimmt, der nur die phosphorylierte und somit aktivierte Form der p42/44-MAP-Kinase erkennt. Die unphosphorylierte Form ERK2 (*extracellular regulated kinase 2*) diente als Referenzprotein

Gezeigt sind (links) repräsentative Western Blots und (rechts) die densitometrische Auswertung einer Serie von Experimenten (Mittelwert + SEM, n = 3-9). Signifikanzen der Unterschiede verglichen mit der Kontrolle: * p < 0,05, ** p < 0,01

3.10 Effekte einer erhöhten cAMP-Konzentration auf die Proliferation in primären humanen Lungenfibroblasten und Charakterisierung des Signalweges

Es sollte nun untersucht werden, ob die in MRC 5-Zellen gefundenen Ergebnisse sich auch auf primäre humanen Lungenfibroblasten übertragen lassen, um die physiologische Bedeutung der Effekte zu untermauern. Zu diesem Zweck wurden Schlüsselexperimente in den Primärzellen wiederholt. Alle Ergebnisse ließen sich an phLFb bestätigen: es kam zu einer hoch signifikanten Inhibition der Proliferation durch Butaprost (s. Abb. IV–37), die durch den Einsatz des cAMP-Analogons Dibutyryl-cAMP (10- 1000 μ M) und des Adenylylcyclaseaktivators Forskolin (1-30 μ M) nachgeahmt werden konnte (s. Abb. IV–38, A und B).

phLFb

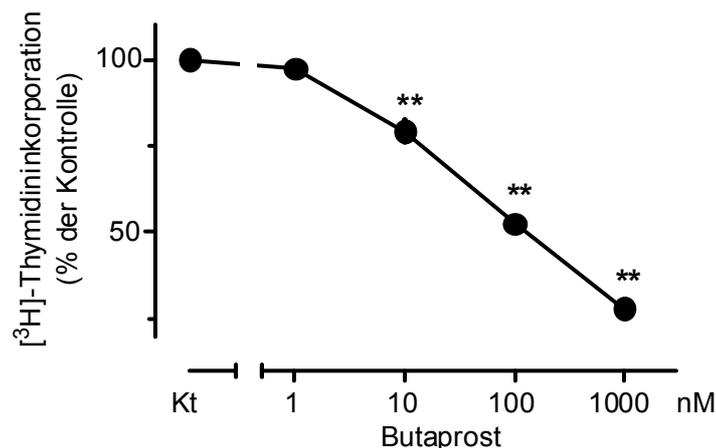


Abb. IV–37 Effekt des EP2-Rezeptoragonisten Butaprost auf die Proliferation von primären humanen Lungenfibroblasten (phLFb). Die Zellen wurden 30 h in An- oder Abwesenheit von Butaprost (1 nM-1 μ M) kultiviert. 24 h vor der Zellyse wurde [³H]-Thymidin (37 kBq/Well) zugegeben. Anschließend wurde das inkorporierte [³H]-Thymidin als Maß für die DNA-Neusynthese im Zellysat quantifiziert. Die Ergebnisse sind dargestellt in Prozent des Mittelwertes der Kontrollen des jeweiligen Versuchansatzes (Mittelwert \pm SEM, n = 6-9). Signifikanzen der Unterschiede verglichen mit der Kontrolle (Kt): ** p < 0,01.

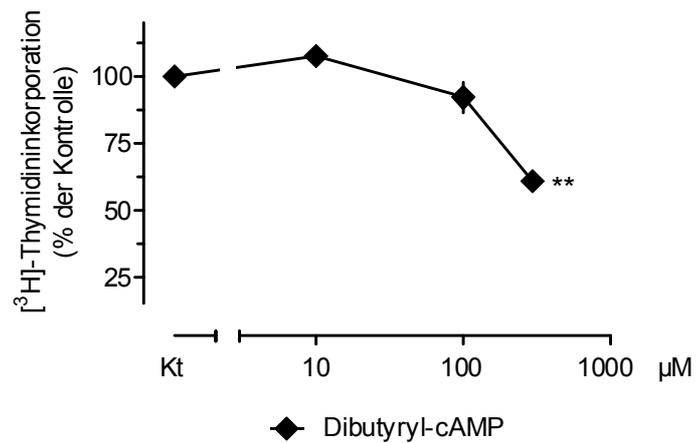
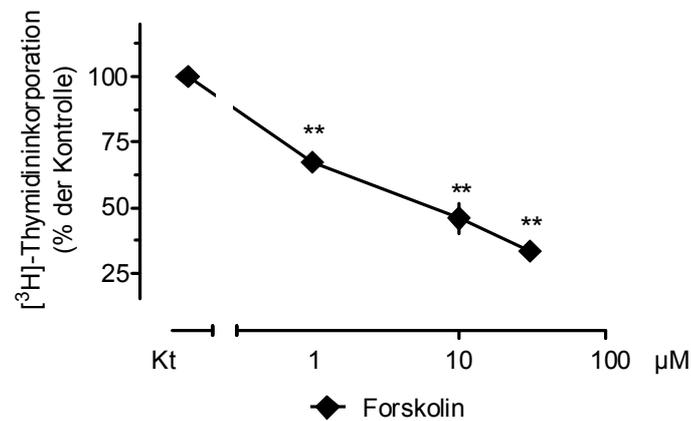
A phLFb**B phLFb**

Abb. IV-38 Konzentrationsabhängiger Effekt von Dibutyryl-cAMP (A) und Forskolin (B) auf die Proliferation von primären humanen Lungenfibroblasten. Die Zellen wurden 30 h in An- oder Abwesenheit der jeweiligen Testsubstanzen kultiviert. 24 h vor der Zelllyse wurde $[^3\text{H}]$ -Thymidin (37 kBq/Well) zugegeben. Anschließend wurde das inkorporierte $[^3\text{H}]$ -Thymidin als Maß für die DNA-Neusynthese im Zelllysat quantifiziert. Die Ergebnisse sind dargestellt in Prozent des Mittelwertes der Kontrollen des jeweiligen Versuchansatzes (Mittelwert \pm SEM, n = 6). Signifikanzen der Unterschiede verglichen mit der jeweiligen Kontrolle (Kt): ** p < 0,01.

Auch der Einsatz der spezifischen cAMP-Analoga bestätigte die für MRC 5-Zellen gezeigten Ergebnisse: der Epac-Aktivator 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (1-100 μM) hemmte die Proliferation hoch signifikant, wohingegen der PKA-Aktivator 6-Bnz-cAMP (1-100 μM) das Proliferationsverhalten primärer humaner Lungenfibroblasten nicht beeinflusste (s. Abb. IV-39).

phLFb

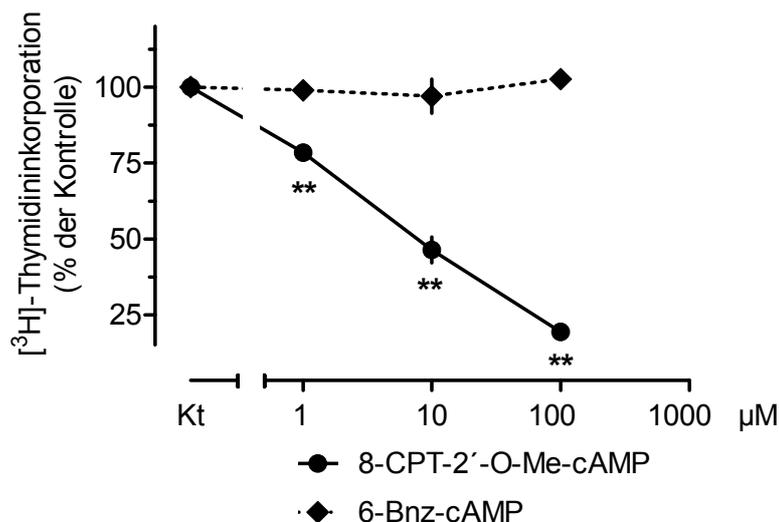


Abb. IV-39 Konzentrationsabhängige Effekte von 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP und 6-Bnz-cAMP auf die Proliferation von primären humanen Lungenfibroblasten (phLFb). Die Zellen wurden 30 h in An- oder Abwesenheit der jeweiligen Testsubstanzen kultiviert. 24 h vor der Zellyse wurde [^3H]-Thymidin (37 kBq/Well) zugegeben. Anschließend wurde das inkorporierte [^3H]-Thymidin als Maß für die DNA-Neusynthese im Zelllysate quantifiziert. Die Ergebnisse sind dargestellt in Prozent des Mittelwertes der Kontrollen des jeweiligen Versuchansatzes (Mittelwert \pm SEM, n = 6). Signifikanzen der Unterschiede verglichen mit der jeweiligen Kontrolle (Kt): ** p < 0,01.

3.11 Zusätzliche antifibrotische Eigenschaften erhöhter cAMP-Spiegel in humanen Atemwegsfibroblasten

3.11.1 Auswirkungen erhöhter cAMP-Spiegel auf die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten

In der Literatur wurde bereits mehrfach eine Inhibition der α -smooth-muscle-Aktin-Bildung durch cAMP in Fibroblasten beschrieben (Liu *et al.*, 2004; Swaney *et al.*, 2005). Dies konnte durch eigene Untersuchungen an MRC 5-Zellen bestätigt werden, in denen der TGF- β -induzierte Anstieg der α -smooth-muscle-Aktin-Expression durch die gleichzeitige Inkubation mit Butaprost (10 bzw. 100 nM) inhibiert und in hohen Konzentrationen sogar unter das Kontrollniveau herunterreguliert werden konnte, ohne dass das Expressionsniveau des Strukturproteins α -Tubulin verändert wurde (s. Abb. IV–40).

MRC 5

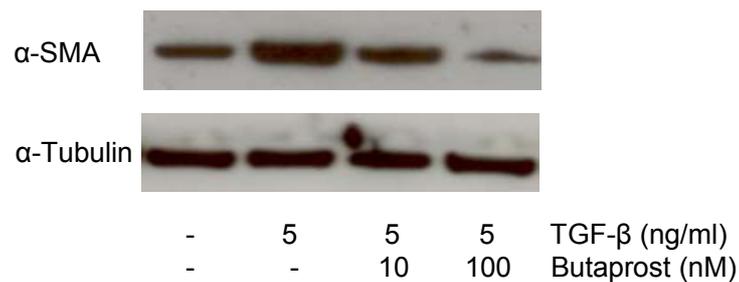


Abb. IV–40 Effekte von TGF- β (5 ng/ml) in An- oder Abwesenheit von Butaprost (10/100 nM) auf die Expression von α -smooth-muscle-Aktin (α -SMA) in MRC 5-Zellen analysiert mittels Western Blot. 5×10^5 MRC 5-Zellen wurden in 55 mm Zellkulturschalen ausgesät und 48 h in Fibroblastenmedium mit 10 % FKS kultiviert. Im Anschluss wurde auf serumfreies Medium umgestellt und zeitgleich die Testsubstanzen zugegeben. Nach der 48-stündigen Inkubationszeit wurden die Zellen mit RIPA-Puffer (+PI) lysiert und proteinnormalisiert einer Western Blot-Analyse unterzogen. Gezeigt ist ein repräsentativer Western Blot (n = 2).

3.11.2 Auswirkung erhöhter cAMP-Spiegel auf die Kollagensynthese

Die Kollagensynthese ist ebenfalls durch die Erhöhung intrazellulärer cAMP-Spiegel inhibierbar, scheint aber PKA- und nicht Epac-vermittelt zu sein (Huang *et al.*, 2007). Dies ließ sich in eigenen Untersuchungen mit Hilfe des [³H]-Prolin-Inkorporationsassay als Maß für die Neusynthese des Strukturproteins Kollagen bekräftigen. Es wurde der inhibitorische Effekt cAMP-erhöhender Substanzen, nämlich Isoprenalin (100 nM), Butaprost (100 nM) und Forskolin (10 µM), bestätigt, die alle in der Lage waren, die Prolininkorporation hoch signifikant zu hemmen (s. Abb. IV–41).

Überdies konnte gezeigt werden, dass der Einsatz des PKA-aktivierenden 6-Bnz-cAMP (1-500 µM) eine hoch signifikante Hemmwirkung auf die Kollagensynthese ausübte, wohingegen der Epac-Aktivator 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (1-500 µM) selbst in hohen Konzentrationen die [³H]-Prolininkorporation nicht beeinflusste. (s. Abb. IV–42).

MRC 5

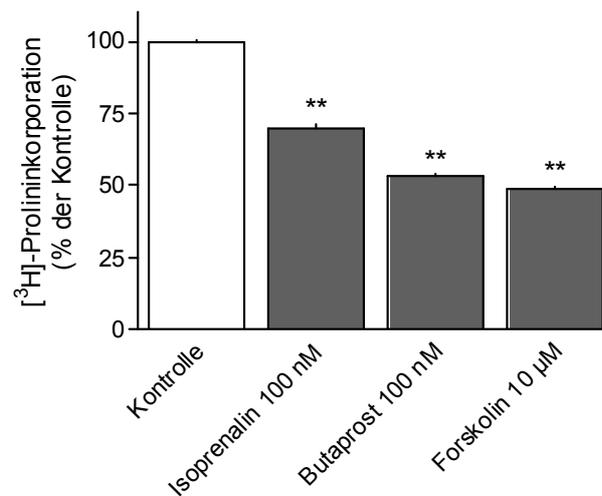


Abb. IV–41 Inhibitorische Effekte von cAMP-erhöhenden Substanzen auf die Kollagensynthese von MRC 5-Zellen ermittelt im [³H]-Prolin-Inkorporationsassay. Die Atemwegsfibroblasten wurden 24 h mit Isoprenalin (100 nM), Butaprost (100 nM) und Forskolin (10 µM) inkubiert. Zeitgleich wurde [³H]-Prolin (37 kBq/Well) zugegeben. Anschließend wurde das neu synthetisierte Kollagen anhand des eingebauten [³H]-Prolins quantifiziert. Die Ergebnisse sind dargestellt in Prozent des Mittelwertes der Kontrollen des jeweiligen Versuchsansatzes (Mittelwert + SEM, n = 6-15). Signifikanzen der Unterschiede verglichen mit der Kontrolle: ** p < 0,01.

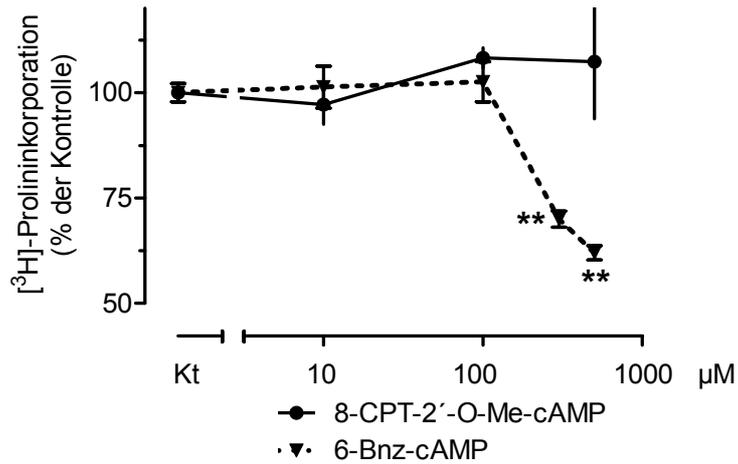


Abb. IV-42 Konzentrationsabhängige Effekte von spezifischen cAMP-Analoga auf die Kollagensynthese von MRC 5-Zellen ermittelt im [^3H]-Prolin-Inkorporationsassay. Die Atemwegs-fibroblasten wurden 24 h mit 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (1-500 μM , Epac-spezifisches cAMP-Analagon) und 6-Bnz-cAMP (1-500 μM , PKA-spezifisches cAMP-Analagon) inkubiert. Zeitgleich wurde [^3H]-Prolin (37 kBq/Well) zugegeben. Anschließend wurde das inkorporierte [^3H]-Prolin als Maß für die Kollagensynthese quantifiziert. Die Ergebnisse sind dargestellt in Prozent des Mittelwertes der Kontrollen des jeweiligen Versuchansatzes (Mittelwert + SEM, n = 6-15). Signifikanzen der Unterschiede verglichen mit der jeweiligen Kontrolle: ** p < 0,01.

V Diskussion

Es kommt im Rahmen von chronischen Atemwegserkrankungen zu Umbauprozessen in den Atemwegen – dem sogenannten Remodeling. Diese strukturellen Veränderungen sind durch eine pathologische Zunahme des Bindegewebes gekennzeichnet und führen zu deutlichen Funktionseinschränkungen. Den Atemwegsfibroblasten kommt in diesem Geschehen als Strukturgebern des Bindegewebes und als Hauptproduzenten der Extrazellulärmatrix eine besondere Bedeutung zu. *In vitro*-Untersuchungen an humanen Atemwegsfibroblasten eignen sich daher, um die strukturellen Veränderungen auf zellulärer Ebene zu untersuchen und um pro- und antifibrotischen Vorgänge in diesen Zellen besser zu verstehen.

In der vorliegenden Arbeit wurden drei unterschiedliche Fragestellungen betrachtet, die alle den Atemwegsfibroblasten im Remodelinggeschehen im Blickpunkt hatten. Im Vordergrund stand die Charakterisierung pro- und antifibrotischer Signal- und Stoffwechselwege und deren mögliche pharmakologische Modulation vor dem Hintergrund neuer oder bereits etablierter therapeutischer Optionen.

1 Bedeutung der Arginase I und II bei profibrotischen Prozessen in humanen Lungenfibroblasten

1.1 Expression und Aktivität der Arginase I und II

Wie bereits ausführlich dargelegt, stehen die beiden Arginaseisoformen im Verdacht, durch die Beteiligung an der Synthese von L-Prolin und Polyaminen, an fibrotischen Umbauprozessen im Rahmen chronischer Atemwegserkrankungen mitzuwirken. Ob und inwiefern sich dieser Zusammenhang auch für humane Lungenfibroblasten nachweisen lässt, wurde bis dato noch nicht detailliert untersucht und ist vor dem Hintergrund der

bedeutenden Rolle, die Fibroblasten bei chronischen Umbauprozessen in der Lunge spielen, von besonderem Interesse.

Zu Beginn der Untersuchungen stand die Frage nach dem Expressionsstatus der beiden Arginaseisoformen in primären humanen Lungenfibroblasten und in verschiedenen Lungenfibroblastenzelllinien (MRC 5, IMR 90 und Hel 299). In keiner der untersuchten Zellen ist eine Expression der Arginase I nachzuweisen und selbst nach einer Erhöhung der Amplifikationszyklen auf 40 kann keine Arginase I detektiert werden (s. Abb. IV–1). Dies war ausgehend von vorangegangenen Studien an Lungenfibroblasten der Ratte nicht zu erwarten, da bei diesen nach 30 PCR-Zyklen eine deutliche Expression der Arginase I nachgewiesen werden konnte (Lindemann und Racké, 2003). Die Funktionalität der Arginase I-PCR wurde anhand einer mitgeführten HepG2-Probe aufgezeigt, eine Leberzelllinie, bei der wie erwartet eine deutliche Arginase I-Expression detektierbar war, so dass das Fehlen der Arginase I-Banden nicht auf eine nicht funktionelle PCR zurückzuführen ist.

Die Arginase II ist hingegen in allen untersuchten Zellen (MRC 5, IMR 90 und Hel 299 und pHLFb) detektierbar und zeigte bereits nach 30 PCR-Zyklen eine deutliche Expression, so dass die Arginase II die dominante Isoform in (primären) humanen Lungenfibroblasten ist (s. Abb. IV–1). Die Expression der Arginase II konnte auch in Lungenfibroblasten der Ratte nachgewiesen werden, stellte hier aber die sehr viel schwächer exprimierte Isoform dar (Lindemann und Racké, 2003).

In vergleichenden Versuchen an humanen Alveolarmakrophagen zeigt sich ebenfalls, dass die Arginase II die dominante Isoform ist und die Arginase I nur sehr schwach exprimiert wird. Auch hier zeigen sich klare speziesabhängige Expressionsunterschiede, da in Alveolarmakrophagen der Ratte die Arginase I die dominante Isoform darstellt (Klasen *et al.*, 2001).

In der Einleitung wurde bereits ausführlich auf Studien von Zimmerman *et al.* (2003) eingegangen, die die Arginase I und II in zwei verschiedenen Asthmodellen an Mäusen als typische Asthmasignaturgene identifizieren konnten. In diesen Studien war die Arginase I weit mehr von der Hochregulation betroffen als die Arginase II, so dass vor allem der in den (primären) humanen Lungenfibroblasten nicht vorkommenden Isoform eine herausragende Bedeutung in diesem asthmatisch-entzündlichen Geschehen zukommt. Bestätigen ließen sich diese Microarray-Ergebnisse durch Daten aus der Proteomanalyse einer Mauslunge, bei der durch Sensibilisierung mit dem Allergen Ovalbumin eine Inflammation in der Lunge hervorgerufen wurde; auch hier war eine deutliche Hochregulation der Proteinexpression der Arginase I detektierbar (Fajardo *et al.*, 2004). In diesen Studien wurde die Aktivität und Expression der Arginase jedoch nicht auf

zellulärem Niveau untersucht, so dass aus diesen Studien nicht hervorgeht, welche Zelltypen in der Lunge wesentlich für den Anstieg der Arginaseexpression verantwortlich sind.

Mit Hilfe eines Enzymassays, der es ermöglicht, den Harnstoff als Produkt der Arginasekatalyse photometrisch zu erfassen, sollte untersucht werden, wie hoch die enzymatische Aktivität der Arginase in (primären) humanen Lungenfibroblasten ist. Es wurde mit Hilfe dieses Assays jedoch weder in pHLFb noch in MRC 5-Zellen eine Arginaseaktivität detektiert, so dass sich die Arginaseaktivität in (primären) humanen Lungenfibroblasten unterhalb der Nachweisgrenze dieses Assaysystems befindet (s. Tab. IV-1). Zum Vergleich wurden Daten von Lungenfibroblasten der Ratte herangezogen, bei denen valide Ergebnisse trotz einer niedrigen Arginaseaktivität (20,4 mU/mg Protein) gemessen werden konnten (Lindemann und Racké, 2003). Zusätzlich wurden als Positivkontrolle Alveolarmakrophagen der Ratte auf ihre Arginaseaktivität (253 mU/mg Protein) hin untersucht; diese wiesen erwartungsgemäß eine hohe Arginaseaktivität auf und bestätigten die Funktionalität des Assays.

Die fehlende Expression der Arginase I zusammen mit dem niedrigen Aktivitätsniveau, das unter den verwendeten Versuchsbedingungen nicht zu quantifizieren war, sprechen für die eingeschränkte Bedeutung der Arginase in (primären) humanen Lungenfibroblasten. Inwiefern die alleinige Expression der Arginase II ausreicht, um aktiv am Remodelinggeschehen mitzuwirken, sollte in Folgeexperimenten untersucht werden.

1.2 Einfluss von IL-4 und IL-13 auf die Expression und Aktivität der Arginase I und II

Aus Voruntersuchungen an Lungenfibroblasten der Ratte ist bekannt, dass die am Asthmageschehen beteiligten Interleukine IL-4 und IL-13 eine ausgeprägte Erhöhung sowohl der Arginase I- und Arginase II-Expression als auch eine deutliche Aktivitätssteigerung der Enzyme bewirken (Lindemann und Racké, 2003). Auch in Glattmuskelzellen der Ratte konnte eine Hochregulation der Arginase I-Expression unter dem Einfluss von IL-4 und IL-13 detektiert werden (Wei *et al.*, 2000). In den hier untersuchten (primären) humanen Lungenfibroblasten ließ sich diese Beeinflussung durch IL-4 und IL-13 nicht bestätigen (s. Abb. IV-2). Es ist in MRC 5-Zellen und in pHLFb keine Hochregulation der Arginase I und II durch Inkubation mit IL-4 bzw. IL-13 auf mRNA-Expressionsebene feststellbar. In parallel durchgeführte Untersuchungen zur

Arginaseaktivität konnte ebenfalls kein Anstieg der Enzymaktivität detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Dieser Umstand deutet darauf hin, dass die Arginaseexpression und deren Aktivität in humanen Fibroblasten und Fibroblasten der Ratte nicht auf die gleiche Weise reguliert werden und dass sich die in Ratten gewonnenen Ergebnisse nicht auf humane Systeme übertragen lassen.

1.3 Expression der Enzyme Ornithindecaboxylase und Ornithinaminotransferase

Die beiden Enzyme Ornithindecaboxylase (ODC) und Ornithinaminotransferase (OAT) sind für die Verstoffwechslung von Ornithin zu Putrescin bzw. L-Prolin verantwortlich und stellen somit wichtige Bausteine für die Polyamin- bzw. die Kollagensynthese zur Verfügung. Mit Hilfe der mRNA-Expressionsanalyse sollte der Expressionsstatus dieser Enzyme in (primären) humanen Lungenfibroblasten untersucht werden. Beide Enzyme konnten bereits nach 30 Amplifikationszyklen sowohl in MRC 5-Zellen als auch in phLFb detektiert werden (s. Abb. IV-3), so dass theoretisch beide Stoffwechselwege – die Polyamin- und die Kollagensynthese – in (primären) humanen Lungenfibroblasten stattfinden können.

1.4 Einfluss der Arginase(aktivität) auf die Kollagen I-Synthese

Es stellte sich weiterhin die Frage, inwiefern die Arginase in humanen Lungenfibroblasten an der Synthese des prolinreichen Strukturproteins Kollagen beteiligt ist. Dieser Zusammenhang wird auch durch die gemeinsame Lokalisation der in humanen Lungenfibroblasten vorkommenden Arginase II und der für die Prolinsynthese zuständigen Ornithintransferase (OAT) in den Mitochondrien nahegelegt. Da das Kollagen I das mengenmäßig bedeutendste Kollagen im Rahmen fibrotischer Lungenerkrankungen darstellt (Alberts *et al.*, 2008; Burgess, 2009), wurde ein Western Blot mit einem Kollagen I-Antikörper etabliert. Mit Hilfe dieses Western Blots wurde der Einfluss einer Arginaseinhibition auf das Ausmaß der Kollagensynthese untersucht. Mit Nor-NOHA und BEC wurden zwei potente, kompetitive Inhibitoren der Arginaseenzyme verwendet. Beide Inhibitoren sind weder in MRC 5-Zellen noch in primären humanen Lungenfibroblasten in der Lage, die Kollagen I-Synthese signifikant zu beeinflussen (s. Abb. IV-5). Dieses Ergebnis ist umso erstaunlicher, da die unter gleichen Versuchsbedingungen in

Rattenfibroblasten durchgeführten Untersuchungen nach Arginaseinhibition eine statistisch signifikante Inhibition der Kollagen I-Synthese zeigten (Warnken, 2007). In diesen Zellen konnte jedoch auch eine Expression der Arginase I beobachtet werden und eine Aktivität der Arginaseisoenzyme war im photometrischen Arginaseassay deutlich messbar. Diese speziesspezifischen Unterschiede konnten kürzlich auch von Kitowska *et al.* (2008) bestätigt werden: in einem Fibrosemodell an Mäusen wurde an isolierten Lungenfibroblasten eine erhöhte Arginaseexpression festgestellt und die TGF- β -induzierte Kollagensynthese konnte in diesen Mauszellen durch die Inhibition der Arginase vermindert werden. In der gleichen Arbeit wurden parallel primäre humane Lungenfibroblasten aus IPF-Patienten untersucht, wobei in diesen Zellen weder eine erhöhte Arginaseexpression und Arginaseaktivität noch eine Beeinflussung der Kollagensynthese nach Arginaseinhibition im Vergleich zu Lungenfibroblasten aus gesunden Probanden gezeigt werden konnte. Es lässt sich also festhalten, dass in diesem Zusammenhang Erkenntnisse aus dem Tiermodell oder aus *in vitro*-Versuchen an isolierten tierischen Zellen nicht auf humane Modelle übertragen werden können.

Die untergeordnete Bedeutung der Arginase II im Bezug auf die Prolinbereitstellung zeigte sich auch in Arginase II-Knockout-Mäusen, die sich bis auf leichte Fertilitätsstörungen normal entwickelten und verhielten und bei denen auch keine veränderten Prolinspiegel detektiert werden konnten, so dass die Biosynthese von L-Prolin durch andere Synthesewege gesichert war (Shi *et al.*, 2001).

In kultivierten humanen Atemwegsfibroblasten scheint die Kollagensynthese also weitestgehend unabhängig von dem durch die Arginase der Fibroblasten bereitgestellten Prolinpräkursor L-Ornithin zu sein. Diese *in vitro*-Versuche spiegeln aber nicht die physiologischen Bedingungen, wie sie im entzündeten oder verletzten Gewebe vorherrschen, wider. Dort findet ein Zusammenspiel zwischen vielen Zellen statt und es scheint vor allem den Makrophagen eine bedeutende Rolle bei der Bereitstellung von L-Ornithin über die Arginase zuzukommen. Im Wundgewebe von Ratten konnte eine erhöhte extrazelluläre Arginaseaktivität, einhergehend mit einem erhöhten Ornithin- und einem erniedrigten L-Argininspiegel, nachgewiesen werden (Albina *et al.*, 1988); hier wurde die extrazelluläre Arginase im Wundgewebe vor allem von toten Makrophagen geliefert, die dort über die Verstoffwechslung von L-Arginin zu L-Ornithin für die Bereitstellung eines Ausgangsproduktes für die Kollagensynthese sorgt. Aber auch in diesem Zusammenhang muss berücksichtigt werden, dass es sich um tierexperimentelle Daten handelt und sich die Situation in humanen Alveolarmakrophagen anders darstellt. In humanen Endothelzellen von Patienten mit pulmonaler arterieller Hypertonie konnte eine

erhöhte Arginaseaktivität festgestellt werden, die ebenfalls für die Bereitstellung von L-Prolin verantwortlich sein könnte (Xu *et al.*, 2004).

Die präsentierten Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass die Arginaseaktivität in humanen Lungenfibroblasten zu gering ist, um maßgeblich auf die Kollagensynthese einwirken zu können. Möglicherweise wird aber der für die Kollagensynthese bedeutende Baustein L-Prolin von anderen Zellen im entzündeten Lungengewebe freigesetzt, von Fibroblasten aufgenommen und in Kollagen eingebaut.

Aus Abb. V-1 wird ersichtlich, dass auch ein zweiter Syntheseweg des L-Prolins in humanen Fibroblasten von Bedeutung sein könnte. Alternativ zur Synthese des L-Prolins über die Arginase und L-Ornithin kann diese Aminosäure auch ausgehend von Glutamat durch mehrere nachgeschaltete enzymatische Schritte gebildet werden – ein Biosyntheseweg, der auch schon für Fibroblasten beschrieben wurde (Shen und Strecker, 1975).

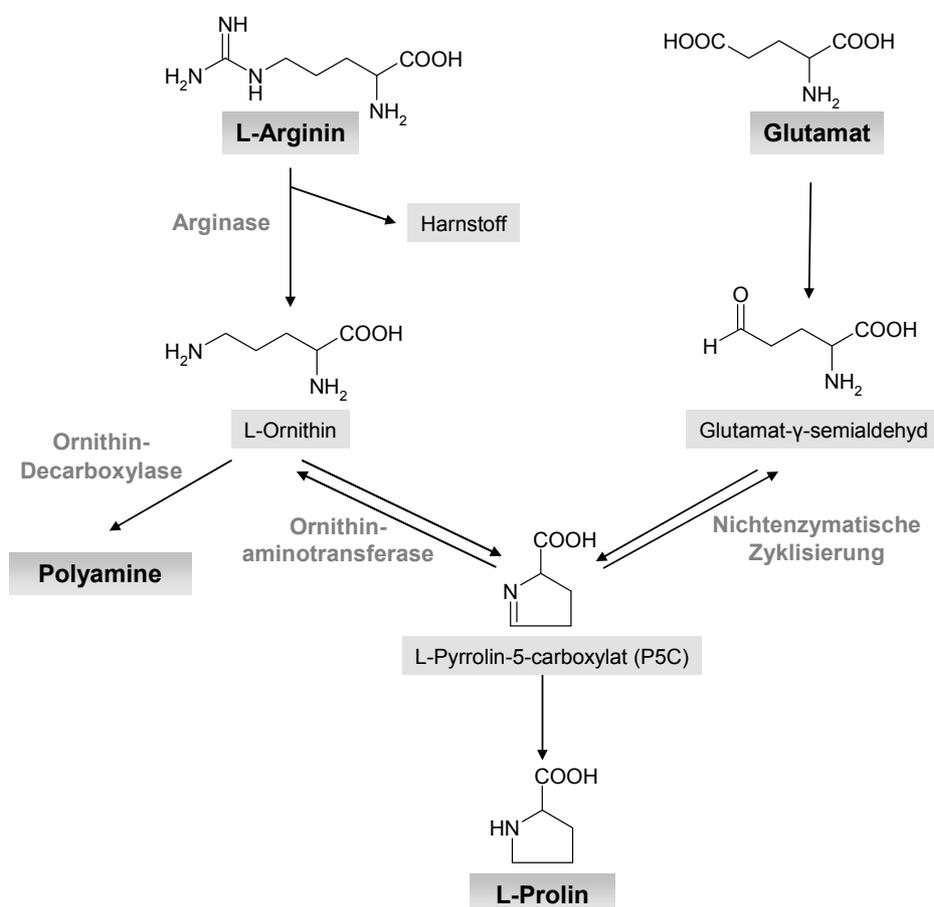


Abb. V-1 Arginaseabhängige und arginaseunabhängige Prolinbiosynthesewege ausgehend von L-Arginin bzw. Glutamat

1.5 Beeinflussung der Arginaseexpression durch PDGF und Auswirkung auf die Proliferation

Auch die Expression des Wachstumsfaktors PDGF ist im Rahmen chronisch-entzündlicher Atemwegserkrankungen deutlich erhöht und ihm scheint eine bedeutende Rolle bei der Genese fibrotischer Erkrankungen zuzukommen (Bonner, 2004). Eine mögliche Beteiligung der Arginase an seiner profibrotischen Wirkung wurde bereits früh diskutiert (Thyberg und Fredholm, 1987), ist aber bis heute noch nicht abschließend geklärt. Ob und inwiefern der Arginasestoffwechselweg an der PDGF-vermittelten profibrotischen Wirkung beteiligt ist, sollte an primären humanen Lungenfibroblasten untersucht werden. Begonnen wurde mit der Untersuchung der Rezeptorexpression. Beide Rezeptorisoformen – PDGF-Rezeptor A und B – werden in pHLFb exprimiert (s. Abb. IV–6), so dass die aus der Literatur bekannten Daten bestätigt werden konnten (Heldin *et al.*, 1988) und PDGF-vermittelte Signale in diesen Zellen grundsätzlich möglich sind.

Im Folgenden wurde untersucht, ob sich eine Inkubation mit dem Wachstumsfaktor PDGF auf die Expression und Aktivität der Arginase auswirkt. Nach 20-stündiger Inkubation der primären humanen Lungenfibroblasten mit PDGF wurde ein deutlicher, konzentrations-abhängiger Anstieg der Arginase II-Expression mit Hilfe der mRNA-Expressionsanalyse detektiert; dieser ist durch die Präinkubation mit dem PDGF-Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor Tyrphostin AG 1296 nahezu vollständig reversibel (s. Abb. IV–7), so dass der Expressionsanstieg tatsächlich über PDGF-Rezeptoren vermittelt wird. Obwohl die Transkriptmenge der Arginase II um bis zu 350 % gesteigert werden konnte, ist dieser Anstieg nicht auf Aktivitätsebene mit Hilfe des Arginaseassays erfassbar (Daten nicht gezeigt). Die Expression der Arginase I lässt sich auch durch die Inkubation mit PDGF nicht induzieren (Daten nicht gezeigt).

Wie zu erwarten bewirkte die Inkubation mit PDGF im Proliferationsassay eine deutlichen Anstieg der [³H]-Thymidin-Inkorporation, was die vielfach in der Literatur beschriebene proliferative Wirkung des Wachstumsfaktors auf Fibroblasten bestätigt (Heldin und Westermark, 1990; Bonner, 2004). Die Vermutung lag nun nahe, dass die proliferative Wirkung des PDGF zumindest partiell über die erhöhte Arginase II-Expression bewerkstelligt wird, die vermehrt Polyamine für die schnell wachsenden Zellen zur Verfügung stellt. Um sich dieser Frage zu nähern, wurde der Einfluss von PDGF auf das Proliferationsverhalten in An- und Abwesenheit des potenten Arginaseinhibitors nor-NOHA untersucht. Die 20-stündige Inkubation der primären humanen Lungenfibroblasten mit PDGF (10 ng/ml) führt zu einer Steigerung der [³H]-Thymidin-Inkorporation um ca. 300 %. Diese Proliferationssteigerung wird aber nicht durch die Präinkubation mit dem

Arginaseinhibitor gehemmt (s. Abb. IV–9), so dass eine Beteiligung der Arginase II an der PDGF-vermittelten Proliferation unwahrscheinlich ist.

Eine Inkubation der pH-LFB unter Kontrollbedingungen mit nor-NOHA vermag die Proliferationsrate der Zellen ebenfalls nicht zu beeinflussen, so dass auch unter diesen Umständen, entgegen der weit verbreiteten Meinung in der Literatur, die Arginase am Wachstumsverhalten von primären humanen Lungenfibroblasten nicht maßgeblich beteiligt zu sein scheint. Die aus der Literatur bekannten Daten wurden allerdings in Zellsystemen gewonnen, die sich durch eine Überexpression der Arginase auszeichneten (Wei *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002) und daher nicht die physiologischen *in vivo*-Bedingungen widerspiegeln.

Auch in diesem Kontext ist die Arginaseaktivität der Atemwegsfibroblasten, die mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht detektierbar ist, nicht ausreichend, um über die Bereitstellung von L-Ornithin und Polyaminen das Wachstumsverhalten der Zellen zu beeinflussen. Die in den humanen Atemwegsfibroblasten vorkommende mitochondrial lokalisierte Arginase II und die für die Polyaminsynthese verantwortliche zytosolische Ornithindecaboxylase befinden sich zudem in zwei unterschiedlichen zellulären Kompartimenten, was eine direkte Verknüpfung dieser beiden Stoffwechselschritte erschwert.

Da aber die Beteiligung der Polyamine an Proliferationsvorgängen zahlreich beschrieben wurde, muss die Beteiligung anderer Stoffwechselwege an der Bereitstellung von Polyaminen in humanen Fibroblasten in Erwägung gezogen werden. Gestützt wird dieser Befund durch Daten von Deignan *et al.* (2007), die in Knockout-Mäusen, denen eine oder beide Arginaseisoformen fehlten, keine wesentliche Beeinflussung der Polyaminspiegel feststellen konnten. Ein möglicher Mechanismus zur Bereitstellung von Polyaminen alternativ zur Synthese via Arginase in den Fibroblasten kann beispielsweise eine erhöhte Polyaminaufnahme aus dem extrazellulären Milieu sein (Pohjanpelto, 1976). Dies ist vor allem denkbar, da bei Asthmatikern deutlich erhöhte extrazelluläre Polyaminspiegel nachgewiesen werden konnten (Kurosawa *et al.*, 1992), ist aber für die hier beschriebenen *in vitro*-Versuche keine wahrscheinliche Erklärung. Wie aus Abb. V–1 ersichtlich, kann L-Ornithin als Ausgangsstoff für die Polyaminsynthese aber auch aus der Aminosäure L-Glutamat synthetisiert werden, so dass dies ein alternativer Mechanismus für die Synthese von Putrescin sein könnte, der auch unter *in vitro*-Versuchsbedingungen möglich ist.

1.6 Zusammenfassende Beurteilung der Bedeutung der Arginase

Nachgewiesenermaßen ist sowohl die Arginaseexpression als auch deren Aktivität im Rahmen chronischer Atemwegserkrankungen erhöht (Zimmermann *et al.*, 2003; Morris *et al.*, 2004; Grasmann *et al.*, 2005; Gebel *et al.*, 2006), so dass sich hinter dieser deutlichen Expression auch eine physiologische Funktion vermuten lässt.

In dem hier untersuchten zellulären Modell konnte die Bedeutung der Arginase im Remodelinggeschehen allerdings nicht bestätigt werden. Es war in humanen Atemwegsfibroblasten keine Expression der Arginase I detektierbar, wohingegen die Arginase II in allen untersuchten Atemwegsfibroblasten deutlich nachgewiesen werden konnte. Die Aktivität der Arginase, gemessen in einem photometrischen Assaysystem, lag unterhalb der Nachweisgrenze und war somit nicht quantifizierbar. Durch Inkubation der humanen Atemwegsfibroblasten mit den potenten Arginaseinhibitoren NorNOHA bzw. BEC konnte weder die Proliferation noch die Kollagen I-Synthese vermindert werden.

Es muss allerdings betont werden, dass es sich hier nur um ein einzelnes Zellmodell handelt, das untersucht wurde. Zwar kommt den humanen Atemwegsfibroblasten eine bedeutende Rolle bei pro- und antifibrotischen Prozessen im Rahmen struktureller Veränderungen im Lungengewebe zu, doch sind *in vivo* noch einer Vielzahl anderer Zellen beteiligt, die sich wechselweitig beeinflussen und konzertiert an den strukturellen Umbauvorgängen mitwirken.

Ein therapeutischer Einsatz von Arginaseinhibitoren zur Reduzierung fibrotischer Vorgänge im Rahmen chronisch-entzündlicher Atemwegserkrankungen erscheint angesichts der vorliegenden Daten fraglich. Zumindest in humanen Atemwegsfibroblasten konnten Arginaseinhibitoren *in vitro* keine Inhibition fibrotischer Prozesse auslösen. Ob eine Inhibition der Arginase in anderen Zellen der Atemwege (z. B. humane Alveolarmakrophagen, Epithelzellen, glatten Muskelzellen) von therapeutischem Nutzen ist, kann anhand der vorliegenden Daten nicht vorhergesagt werden und bedarf weiterer Untersuchungen.

In einem Asthmodell an Meerschweinchen konnte kürzlich nachgewiesen werden, dass der Einsatz von Arginaseinhibitoren sinnvoll sein könnte: die Allergen-induzierte Hyperreagibilität der Atemwege reduziert sich in Meerschweinchen nach Inhalation von Arginaseinhibitoren deutlich (Maarsingh *et al.*, 2008), was aber wahrscheinlich auf die erhöhte L-Arginin-Verfügbarkeit für die NO-Synthasen und die damit verbundene verstärkte Synthese des bronchodilatatorischen NO zurückzuführen ist. Vor dem Hintergrund der dargelegten speziesspezifischen Unterschiede in der Expression und Aktivität der Arginase können diese Daten jedoch nur als Hinweis auf einen therapeutischen Nutzen am Menschen gewertet werden.

2 Effekte von Muskarinrezeptoragonisten und -antagonisten auf die Kollagensynthese in humanen Lungenfibroblasten

2.1 Expression der Muskarinrezeptoren M1-M5

Wie in der Einleitung ausführlich dargelegt, stellt sich die Frage nach der Funktion und Bedeutung des nicht-neuronalen Acetylcholins in den Atemwegen, vor allem im Hinblick auf seine Beteiligung an Remodelingvorgängen. Insbesondere stand die mögliche Beteiligung der Muskarinrezeptoren an der Regulation der Kollagensynthese in humanen Atemwegsfibroblasten im Mittelpunkt des Interesses.

Zur näheren Charakterisierung der Beteiligung muskarinischer Vorgänge in Lungenfibroblasten wurde zunächst der Expressionsstatus der Muskarinrezeptoren M1-M5 mittels mRNA-Expressionsanalyse in verschiedenen Zelllinien humaner Atemwegsfibroblasten (MRC 5- und Hel 299-Zellen) und in primären humanen Atemwegsfibroblasten untersucht. Das Vorhandensein muskarinischer Rezeptoren auf humanen Fibroblasten ist schon seit langen bekannt (Van Riper *et al.*, 1985), eine genauere Expressionsanalyse der fünf bekannten Muskarinrezeptoren in (primären) Lungenfibroblasten wurde allerdings erst kürzlich vorgenommen. In diesem Zusammenhang konnte auch der Muskarinrezeptor-vermittelte positive Effekt auf die Proliferation dieser Zellen nachgewiesen werden (Matthiesen *et al.*, 2006; Pieper *et al.*, 2007). Weitergehende Untersuchungen in einer größeren Serie an Experimenten und an einer weiteren humanen Lungenfibroblastenzelllinie, den Hel 299-Zellen, bestätigen das Rezeptorexpressionsmuster (s. Abb. IV–10). In allen untersuchten Zellen ist der M2-Rezeptor der am stärksten exprimierte Muskarinrezeptor, so dass dieser Rezeptorsubtyp in Fibroblasten eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Dieses Ergebnis korreliert auch mit den von anderen Arbeitsgruppen kürzlich veröffentlichten Daten (Buhling *et al.*, 2007). Der M1-Rezeptor ist in phLFb, nicht aber in MRC 5- und Hel 299-Zellen zu finden. Der M3-Rezeptor ist am stärksten in MRC 5-Zellen exprimiert, gefolgt von Hel 299-Zellen und phLFb. Die Rezeptoren M4 und M5 sind in allen untersuchten Zellen nur schwach detektierbar. Dieses Expressionmuster konnte in verschiedenen Passagen nachgewiesen werden, so dass es unter Kulturbedingungen stabil zu sein scheint.

In vorangegangenen, bereits publizierten Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe konnte die Expression des M2- und des M3-Rezeptors auch auf Proteinebene mittels Western Blot nachgewiesen werden (Matthiesen *et al.*, 2006).

2.2 [³H]-Prolin-Inkorporationsassays zur Untersuchung der Kollagensynthese

Die Muskarinrezeptorvermittelte Steigerung der Proliferationsrate von humanen Atemwegsfibroblasten konnte in vorangegangenen Studien bereits nachgewiesen werden (Matthiesen *et al.*, 2006), wobei dieser Effekt hauptsächlich durch den M2-Rezeptor vermittelt wird.

Im Mittelpunkt des Interesses stand nun die Frage, ob Muskarinrezeptoren auch einen Einfluss auf die Neusynthese des Strukturproteins Kollagen haben und ob im Umkehrschluss ein therapeutischer Einsatz von Muskarinrezeptorantagonisten sich positiv auf die erhöhte Kollagensynthese bei chronisch-entzündlichen Atemwegserkrankungen auswirken könnte. Um diesen Zusammenhang untersuchen zu können, wurde die [³H]-Prolininkorporation als analytische Methode gewählt, um die Kollagenneusynthese zu erfassen. Dieses Verfahren wurde bereits Anfang der 70er von Peterkofsky und Diegelmann (1971) etabliert und ist seit dem vielfach verwendet und optimiert worden. Da L-Prolin bzw. Hydroxyprolin mit einem Anteil von 21 % Hauptbestandteile des Kollagens sind (Lehninger *et al.*, 2001) und diese nahezu exklusiv in Kollagen eingebaut werden, eignet sich die Erfassung von radioaktiv markiertem L-Prolin im (Gesamt-)Protein, um die Neusynthese zu quantifizieren. Zunächst wurde der [³H]-Prolin-Inkorporationsassay als geeignete Methode etabliert: es wurden mit Butaprost (100 nM) und Forskolin (10 µM) zwei bekannte Inhibitoren und mit TGF-β (5 ng/ml) ein bekannter Induktor der Kollagensynthese verwendet. Die in MRC 5-Zellen durchgeführten Untersuchungen bestätigen die aus der Literatur bekannten Ergebnisse: es kommt zu einer deutlichen Hemmung der [³H]-Prolininkorporation um 51 % durch Forskolin und um 48 % durch Butaprost; TGF-β steigert die [³H]-Prolininkorporation und somit die Kollagensynthese um 105 % (s. Abb. IV–11).

Zunächst wurde das in das Gesamtprotein eingebaute [³H]-Prolin erfasst. Um die Spezifität des Assaysystems zu prüfen, wurde im Folgenden ein 1-stündiger Kollagenaseverdau durchgeführt, der es ermöglicht, das in das Kollagen eingebaute [³H]-Prolin von demjenigen zu unterscheiden, welches in das Gesamtprotein eingebaut wurde. Nach diesem 1-stündigen Kollagenaseverdau konnten bereits 80 % des Gesamtprolins im Überstand detektiert werden, so dass sich ein großer Teil des eingebauten [³H]-Prolins tatsächlich im Kollagen wiederfindet. Es ist davon auszugehen, dass nach einer 1-stündigen Digestionsphase der Verdau noch nicht abgeschlossen ist und dass tatsächlich mehr als 80 % des [³H]-Prolins in Kollagen eingebaut werden. Zusätzlich unterscheiden sich die Ergebnisse, die nach einem Kollagenaseverdau erhalten wurden, nicht wesentlich von denjenigen, die ohne den Digestionsschritt erzielt wurden (s. Abb. IV–12). Es können

sowohl stimulatorische Reize als auch inhibitorische Reize auf die Kollagensynthese in einer vergleichbaren Größenordnung mit bzw. ohne Digestionsschritt detektiert werden. Mit Hilfe der Messung des Gesamttritiums nach Inkubation der Zellen mit [³H]-Prolin ist es also möglich, inhibitorische und stimulatorische Reize auf die Kollagenneusynthese zu quantifizieren.

2.3 Einfluss von Muskarinrezeptoragonisten /-antagonisten auf die Kollagensynthese

Mit Hilfe des validierten Assays konnte im Folgenden der Effekt muskarinischer Agonisten auf die Kollagensynthese in MRC 5-Zellen untersucht werden. Die zwei verwendeten Muskarinrezeptoragonisten, Carbachol (1-10 µM) und Oxotremorin (10 µM), lösen einen klaren Anstieg der Kollagensynthese um 60 % bzw. 68 % aus. Die halbmaximale effektive Konzentration (EC₅₀) des Carbachols liegt bei 220 nM (s. Abb. IV–13). Dass dieser Effekt nicht über eine agonistische Wirkung an Nikotinrezeptoren vermittelt wird, konnte in einer Versuchsreihe mit Nikotin (1-100 µM) gezeigt werden. Dieses zeigt eine leichte, aber statistisch nicht signifikante Erhöhung der Prolininkorporation (s. Abb. IV–17). Die Nikotinrezeptor-vermittelte Steigerung der Synthese von Kollagen I und Kollagen III nach inhalativer Nikotingabe konnte in Lungen von Rhesusaffen bereits gezeigt werden (Sekhon *et al.*, 2002), scheint aber in humanen Lungenfibroblasten eine untergeordnete Rolle zu spielen.

In Interaktionsexperimenten mit Tiotropiumbromid (0,01-10 nM) sollte untersucht werden, ob der Effekt der Muskarinrezeptoragonisten durch eine Präinkubation mit dem sehr potenten Muskarinrezeptorantagonisten inhibierbar ist. Ab einer Tiotropiumkonzentration von 0,1 nM ist eine statistisch signifikante Hemmung der Carbachol-induzierten Kollagensynthese erreicht worden. Diese wird ab einer Konzentration von 1 nM sogar vollständig unterdrückt, so dass der gezeigte Effekt tatsächlich Muskarinrezeptor-vermittelt zu sein scheint (s. Abb. IV–14). Es ergibt sich eine mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀) von 110 pM, was für die hohe Wirksamkeit des Muskarinrezeptorantagonisten spricht. Ähnlich potent – mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration von 14 pM – konnte in vorangegangenen Studien bereits die Muskarinrezeptor-vermittelte Proliferation durch Vorinkubation der Zellen mit Tiotropium unterdrückt werden (Matthiesen *et al.*, 2006).

Um die Allgemeingültigkeit der beschriebenen Ergebnisse zu bestätigen, wurde Schlüsselexperimente in Hel 299-Zellen und in primären humanen Lungenfibroblasten wiederholt. Auch in diesen Zellen ist der steigernde Effekt muskarinischer Agonisten auf

die Kollagensynthese detektierbar, der ebenfalls durch Tiotropium antagonisierbar ist (s. Abb. IV–18 und Abb. IV–19).

2.4 Untersuchungen zum Signalweg der Muskarinrezeptor-vermittelten Kollagensynthese

In den erwähnten vorangegangenen Untersuchungen zur Muskarinrezeptor-vermittelten Steigerung der Proliferation wurde zudem der beteiligte Signalweg untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Proliferation über den Pertussistoxin-sensitiven M2-Rezeptor ausgelöst wird (Matthiesen *et al.*, 2006). In gleicher Weise inhibiert Pertussistoxin (0,1 µg/ml) auch die Carbachol-induzierte Steigerung der Kollagensynthese in MRC 5-Zellen, was für eine Beteiligung $G\alpha_i$ -gekoppelter Rezeptoren spricht (s. Abb. IV–15). Eine genauere pharmakologische Charakterisierung dieses Effektes durch den Einsatz verschiedener Subtyp-spezifischer Inhibitoren wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Gleichwohl lässt sich festhalten, dass nur die M2- und M4-Muskarinrezeptoren ihre Signale über $G\alpha_i$ -gekoppelte Rezeptoren übertragen und dass der M2-Rezeptor der mit Abstand am stärksten exprimierte Rezeptor in (primären) humanen Lungenfibroblasten ist, wohingegen nur Spuren des M4-Rezeptors zu finden sind. So lässt sich schlussfolgern, dass der M2-Rezeptor wesentlich an der Steigerung der Kollagensynthese in Fibroblasten beteiligt ist. Auch die Tatsache, dass Oxotremorin einen stärkeren Effekt als Carbachol auf die Kollagensynthese ausübt und als Muskarinrezeptoragonist eine Präferenz für den M2-Rezeptor hat, wohingegen es am M3-Rezeptor nur partialagonistische Wirkung entfaltet, spricht für eine Vermittlung über den M2-Rezeptor. In den vorangegangenen Studien der eigenen Arbeitsgruppe zur Aufklärung des Signalweges der Muskarinrezeptor-vermittelten Proliferationsteigerung in humanen Lungenfibroblasten wurde eine ausführliche pharmakologische Charakterisierung mit mehreren Subtyp-präferierenden Antagonisten durchgeführt. Hierbei wurde der M2-Rezeptor als der am wahrscheinlichsten an dem Signalweg beteiligte Rezeptor identifiziert (Matthiesen *et al.*, 2006).

In der Einleitung wurde dargelegt, dass Tiotropium aufgrund der sehr viel längeren Verweildauer an den Rezeptoren (14,6 h an M1 und 34,7 h an M3) eine kinetische Subtypspezifität gegenüber M1- und M3-Rezeptoren aufweist (Disse *et al.*, 1999). Ungeachtet dessen ist die Halbwertszeit am M2-Rezeptor für Tiotropium mit 3,6 h nicht unerheblich und die Dissoziationskonstante (K_D) weist für die drei Rezeptorsubtypen ähnliche Werte auf (0,041 nM für M1; 0,021 nM für M2 und 0,014 nM für M3; Disse, 2001). Da die gezeigten Ergebnisse unter Gleichgewichtsbedingungen erhalten wurden, ist

die kinetische Subtypselektivität bei der Beurteilung der Ergebnisse von geringerem Interesse. Inwiefern die kinetische Subtypselektivität überhaupt von therapeutischer Relevanz ist, wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Gosens *et al.*, 2006). Eine Beteiligung der M2-Rezeptoren an der therapeutischen Wirkung von Tiotropium erscheint aber aufgrund seiner hohen Affinität zum M2-Rezeptor und seiner Verweildauer am Rezeptor, die mit 3,6 h im Vergleich mit Ipratropium, das lediglich 2-6 min an den M2-Rezeptor bindet (Disse *et al.*, 1999), recht hoch ist, wahrscheinlich. Bisher wurde die Hauptwirkung der Anticholinergika einer M3-Rezeptorblockade zugeschrieben, die hauptverantwortlich für die Bronchodilatation und die verminderte Schleimsekretion ist. Durch die vorliegenden Daten und vorangegangene Studien an Lungenfibroblasten (Matthiesen *et al.*, 2006; Pieper *et al.*, 2007) wird aber die Bedeutung einer zusätzlichen M2-Rezeptorblockade deutlich.

Eine weitere Parallele in der Muskarinrezeptor-vermittelten Proliferation und Kollagensynthese zeigt sich in der Beteiligung des MAP-Kinase-Signalwegs an beiden Effekten. Ebenso wie die Muskarinrezeptor-vermittelte Proliferation durch den Einsatz des MEK-Inhibitors (MEK = MAP-Kinase-Kinase) PD 98059 unterdrückt werden konnte (Matthiesen *et al.*, 2007), wird auch die nach Einsatz von Carbachol gesteigerte Kollagensynthese durch die Inhibition der MEK gehemmt (s. Abb. IV-16), so dass dieser Signalweg an der Vermittlung der Kollagensynthese beteiligt zu sein scheint. Dass Muskarinrezeptoragonisten in humanen Atemwegsfibroblasten zu einer deutlichen Aktivierung der ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase*), die zur Gruppe der MAP-Kinasen gehören, führen, konnte in vorangegangenen Experimenten in der eigenen Arbeitsgruppe belegt werden (Matthiesen *et al.*, 2007). Die M2-vermittelte Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade konnte u. a. auch in Rattenfibroblasten (Winitz *et al.*, 1993) und in Glattmuskelzellen des Hundes (Cook *et al.*, 2000) nachgewiesen werden. Auch bei weiteren Prozessen wie der Muskarinrezeptor-vermittelten Leukotrien B₄-Ausschüttung (Profita *et al.*, 2005) und der Proliferation von Brustkrebszellen (Jimenez und Montiel, 2005) konnte eine Beteiligung von MAP-Kinasen nachgewiesen werden. Die Signalkaskade wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht, da die funktionellen Daten im Vordergrund standen. Eine Beteiligung der Proteinkinase C und kleinen G-Proteinen wie dem Rho oder dem Ras werden bei der Muskarin-Rezeptorvermittelten MAP-Kinase-Aktivierung diskutiert (Lanzafame *et al.*, 2003), konnten aber zumindest bei der Proliferation nicht als maßgeblich beteiligte Komponenten nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

2.5 Zusammenfassende Beurteilung des Einflusses von Muskarinrezeptoren auf die Kollagensynthese

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Muskarinrezeptoren in humanen Lungenfibroblasten an der Regulation diverser pro- und antifibrotischer Prozesse beteiligt sind. Sie spielen in diesem Zellsystem nicht nur eine Rolle bei der Regulation der Proliferation, sondern beeinflussen auch die Kollagensynthese. Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass Muskarinrezeptoren die strukturellen Umbauprozesse im Rahmen chronischer Atemwegserkrankungen beeinflussen. Es ist wahrscheinlich, dass die Atemwegsfibroblasten während andauernder, inflammatorischer Prozesse im Rahmen chronischer Atemwegsentzündungen dauerhaft einer Aktivierung durch nicht-neuronales Acetylcholin unterliegen. Eine langfristige Blockade muskarinischer Rezeptoren könnte also ein Fortschreiten fibrotischer Veränderungen im Lungengewebe drosseln und sich somit positiv auf die Langzeitprognose und die Lebensqualität der betroffenen Patienten auswirken, was durch mehrere klinische Studien auch schon eindrucksvoll belegt werden konnte (Rennard *et al.*, 1996; Tashkin und Kesten, 2003; Anzueto *et al.*, 2005; Niewoehner *et al.*, 2005). Diesbezüglich neuere Daten lieferte die kürzlich publizierte UPLIFT-Studie, die die Effekte einer 4jährigen Langzeittherapie mit dem Anticholinergikum Tiotropium untersucht hat (Tashkin *et al.*, 2008); es kam unter einer Tiotropiumtherapie zu einer erhöhten Lebensqualität, einer verminderten Exazerbationsrate und Hospitalisierungsrate. Zwar zeigte eine Tiotropiumbehandlung keine Verbesserung des FEV₁ gegenüber einer mit β_2 -Sympathomimetika und inhalativen Kortikosteroiden behandelten Kontrollgruppe, in einer Subgruppenanalyse führte eine Behandlung mit Tiotropium allerdings zu einer verlangsamten Abnahme des FEV₁ gegenüber einer Kontrollgruppe, die nicht mit β_2 -Sympathomimetika und inhalativen Kortikosteroiden behandelt wurde.

Durch die vorliegenden Daten wird noch einmal die Wirksamkeit einer anticholinergen Therapie im Rahmen einer COPD-Behandlung untermauert. Hierbei ist vor allem die Bedeutung des neueren Anticholinergikums Tiotropiums zu betonen, das durch die lange Halbwertszeit des Tiotropium-Rezeptor-Komplexes und seine hohe Rezeptoraffinität besonders geeignet für die Langzeitbehandlung zu sein scheint.

3 cAMP-vermittelte antifibrotische Effekte in humanen Lungenfibroblasten und Charakterisierung der beteiligten Signalwege

3.1 Antiproliferative Effekte einer cAMP-Erhöhung

Die antifibrotischen Effekte einer erhöhten cAMP-Konzentration in Fibroblasten wurde in der Einleitung bereits ausführlich beschrieben und in der vorliegenden Arbeit konnte der proliferationshemmende Effekt einer cAMP-Erhöhung nach Aktivierung $G\alpha_s$ -gekoppelter Rezeptoren in (primären) humanen Lungenfibroblasten bekräftigt werden. Als Maß für die Messung der Proliferation wurde die [3H]-Thymidin-Inkorporation verwendet, eine häufig genutzte Methode, um die *de novo*-DNA-Synthese zu erfassen (Naito *et al.*, 1987).

In initialen Experimenten konnte der antiproliferative Effekt einer erhöhten cAMP-Konzentration bestätigt werden: der Einsatz von Forskolin und IBMX, die beide die intrazelluläre cAMP-Konzentration erhöhen, und von zwei stabilen, membrangängigen cAMP-Analoga (8-Br-cAMP und Dibutyryl-cAMP) führt zu einer hoch signifikanten, konzentrationsabhängigen Inhibition der Proliferation (s. Abb. IV–21). Dies untermauert die Beteiligung von cAMP an diesem Effekt und steht im Einklang mit Daten anderer Arbeitsgruppen (Liu *et al.*, 2004).

Da Agonisten an $G\alpha_s$ -gekoppelten Rezeptoren typischerweise zu einer Aktivierung der Adenylylcyclase und folglich zu einer intrazellulären Erhöhung der cAMP-Konzentration führen, wurde der Einfluss des nicht-selektiven β -Sympathomimetikums Isoprenalin untersucht, das bekanntermaßen in humanen Atemwegfibroblasten diesen Signalweg aktiviert (Saltzman *et al.*, 1982). Isoprenalin hemmt die Proliferation von MRC 5-Zellen extrem signifikant um 60 % mit einer mittleren inhibitorischen Potenz (IC_{50}) von 19 nM (s. Abb. IV–22). Nach Vorinkubation der Zellen mit dem unspezifischen β -Rezeptor-antagonisten Propranolol (100 nM) kommt es zu einer Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve, so dass der gemessene Effekt β -Rezeptor-vermittelt zu sein scheint. In Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe konnte mit Hilfe der semiquantitativen PCR die Expression von β_2 -Rezeptoren in humanen Lungenfibroblasten nachgewiesen werden; β_1 - und β_3 -Rezeptoren wurden nicht detektiert (Lamyel *et al.*, 2009).

Diese Beobachtung ist insbesondere vor dem Hintergrund interessant, als dass β_2 -Sympathomimetika einen hohen Stellenwert in der Therapie des *Asthma bronchiale* haben. Es sind folglich positive Effekte auf die Langzeitwirksamkeit dieser Therapeutika möglich, die nicht über ihre bronchodilatatorische Wirkung zu erklären sind. Diese

antifibrotischen Effekte in Fibroblasten konnten in *in vitro*-Untersuchungen auch kürzlich von anderen Arbeitsgruppen bestätigt werden (Goulet *et al.*, 2007; Descalzi *et al.*, 2008). Auch in glatten Muskelzellen scheint die β -Rezeptoraktivierung eine Proliferationshemmung zu bewirken (Kassel *et al.*, 2008).

Agonisten am EP2-Rezeptor, einem Prostaglandin E₂-Rezeptorsubtyp, führen ebenfalls über die Aktivierung G α_s -gekoppelter Rezeptoren zu einer erhöhten intrazellulären cAMP-Konzentration und werden schon länger als mögliche Therapeutika für die Behandlung chronischer Atemwegserkrankungen diskutiert. Vor diesem Hintergrund sollte dieser Rezeptorsubtyp genauer untersucht werden und auch der sich anschließende Signalweg näher charakterisiert werden. Der selektive EP2-Rezeptoragonist Butaprost inhibiert die Proliferation konzentrationsabhängig um bis zu 75 % zu (s. Abb. IV–23). Die mittlere inhibitorische Konzentration für diesen Effekt beträgt 2,3 nM und spricht für die hohe Wirksamkeit des EP2-Rezeptoragonisten. Nach Präinkubation der Zellen mit AH 6809 (10 μ M), einem EP1- und EP2-Rezeptorantagonisten (Woodward *et al.*, 1995), kommt es zu einer signifikanten Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve von Butaprost, was für eine kompetitive Interaktion am Rezeptor und somit für einen EP2-Rezeptor-vermittelten Effekt spricht. Die hohe Selektivität des Butaprosts für den EP2-Rezeptorsubtyp (Boie *et al.*, 1997; Abramovitz *et al.*, 2000) und die in Folgeexperimenten bestimmte vorwiegende Expression des EP2-Rezeptorsubtyps in humanen Lungenfibroblasten spricht für die Vermittlung des antiproliferativen Signals über diesen Rezeptorsubtyp. Der EP1-Rezeptor konnte mit Hilfe der RT-PCR in (primären) humanen Lungenfibroblasten nicht nachgewiesen werden, der EP3-Rezeptor zeigt eine schwache Expression – allerdings erst nach 40 PCR-Zyklen – und der EP4-Rezeptor ist nach 35 Zyklen detektierbar, wobei zwischen den MRC 5-Zellen und den phLFb jeweils kaum Expressionsunterschiede zu verzeichnen sind (s. Abb. IV–24). Die markante EP2-Rezeptorexpression in humanen Lungenfibroblasten steht im Einklang mit Befunden anderer Arbeitsgruppen (Huang *et al.*, 2007).

3.2 Rolle der Proteinkinase A bei der antiproliferativen Wirkung von cAMP

Im Mittelpunkt des Interesses stand im Folgenden die weitere Signaltransduktion, die nach einer cAMP-Erhöhung zu der ausgeprägten antiproliferativen Wirkung in Lungenfibroblasten führt.

Der klassische Effektor des cAMPs ist die PKA und diverse EP2-Rezeptor-vermittelte Signale führen über diesen Signalweg zu Effekten in Lungenfibroblasten: Kohyama *et al.* konnten bereits 2001 die Beteiligung der PKA an der Inhibition der Chemotaxis von

Fibroblasten nach cAMP-Erhöpfung nachweisen. Die Beteiligung der PKA an der Inhibition der Kollagensynthese in Lungenfibroblasten wurde kürzlich experimentell bewiesen (Huang *et al.*, 2007). Ob und inwiefern die PKA ebenfalls für den antiproliferativen Effekt in Lungenfibroblasten verantwortlich ist, war bis dato noch nicht bekannt und sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

Gängige pharmakologische Werkzeuge zur Untersuchung der Rolle der PKA bei der Signalweiterleitung sind Inhibitoren der PKA. Mit dem Einsatz von H89, KT5720 und PKI 14-22 wurden zunächst drei klassische PKA-Inhibitoren verwendet. Die K_i -Werte für die Hemmung der PKA liegen für H89 bei 50 nM (Chijiwa *et al.*, 1990) und für KT5720 bei 60 nM (Kase *et al.*, 1987), was sie als potente Inhibitoren auszeichnet. PKI 14-22 bindet als Abkömmling des endogenen PKA-Inhibitors an die freie katalytische Untereinheit der PKA, inhibiert so die Phosphorylierung von Effektorproteinen und wird mit einem K_i -Wert von 2 nM als der potenteste und spezifischste PKA-Inhibitor betrachtet (Dalton und Dewey, 2006; Murray, 2008).

Vorab wurde die Wirkung der drei Inhibitoren auf die Proliferation charakterisiert (s. Abb. IV–25); die beiden PKA-Inhibitoren H89 und KT5720 bewirken eine konzentrationsabhängige, hoch signifikante Proliferationshemmung, wohingegen PKI 14-22 bis zu einer Konzentration von 10 μ M proproliferative Effekte ausübt und bei höheren Konzentrationen zu einem Absterben der Zellen führt. Diese Beobachtung ist vor allem erstaunlich, da es durch die Inhibition eines einzigen Effektorproteins – nämlich der PKA – sowohl zur Hemmung als auch zur Förderung der Proliferation kommen sollte. Die Diversität dieser Effekte lässt darauf schließen, dass nicht ausschließlich die PKA inhibiert wird, sondern unspezifische Effekte der eingesetzten Substanzen für den gemessenen Effekt verantwortlich sind.

Zudem ist die inhibitorische Wirksamkeit dieser Substanzen auf die PKA in humanen Lungenfibroblasten nicht hoch genug. Als Indikator zur Untersuchung der hemmenden Wirkung der PKA-Inhibitoren wurde deren Wirksamkeit ermittelt, die CREB-Phosphorylierung (CREB, *cAMP responsive element binding protein*) zu unterbinden (s. Abb. IV–26). Der Transkriptionsfaktor CREB ist ein typisches Effektorprotein der PKA, der nach deren Aktivierung phosphoryliert wird (Mayr und Montminy, 2001). Diese Phosphorylierung lässt sich im Western Blot mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers nachweisen, der nur die phosphorylierte Form des Proteins erkennt. Die 15-minütige Anwesenheit des EP2-Rezeptoragonisten Butaprost (10 nM) führt zu einem deutlichen Anstieg der CREB-Phosphorylierung, was für eine potente Aktivierung des PKA-Signalweges via EP2-Rezeptoren spricht. Diese Phosphorylierung kann aber durch die 1-stündige Vorinkubation mit KT5720 (100 nM) oder PKI 14-22 (30 μ M) nicht

abgeschwächt werden. Lediglich die Präinkubation mit H89 inhibiert die CREB-Phosphorylierung und bei einer sehr hohen Konzentration ($> 10 \mu\text{M}$) kann diese sogar vollständig unterdrückt werden. Allerdings sind diese hohen Konzentrationen in Proliferationsversuchen bereits toxisch. Die Tatsache, dass die starken Effekte der PKA-Inhibitoren bereits in einem Konzentrationsbereich auftreten, in dem noch keine PKA-Inhibition nachgewiesen werden konnte, spricht dafür, dass die Effekte auf die Proliferation durch unspezifische Wirkungen der PKA-Inhibitoren zu Stande kommen. Die ausgeprägten Eigeneffekte zusammen mit der fehlenden Wirksamkeit (fehlende Inhibition der PKA) in geeigneten Konzentrationen machen Interaktionsexperimente mit cAMP-erhöhenden Substanzen unmöglich und diese PKA-Inhibitoren können in diesem Fall nicht als pharmakologische Werkzeuge zur Untersuchung der Rolle der PKA herangezogen werden.

Die herausragende Problematik der fehlenden Spezifität eingesetzter PKA-Inhibitoren wurde in der Literatur bereits mehrfach beschrieben und kritisiert: neben der Proteinkinase A werden zahlreiche weitere Proteinkinasen, wie z. B. PDK1 (*phosphoinositide-dependent-kinase-1*) und Proteinkinase B und C, mit ähnlicher oder sogar höherer Wirksamkeit inhibiert (Davies *et al.*, 2000; Murray, 2008), was zu zahlreichen Effekten in den Zellen führen kann. Auch die Inhibition der Map-Kinase-Kinase (MEK), die in CHO- (*chinese hamster ovary*) Zellen nachgewiesen werden konnte (Olsen *et al.*, 1998), könnte die ausgeprägten antiproliferativen Eigenschaften der PKA-Inhibitoren erklären. Gleichermäßen wurde für PKI 14-22, einem Abkömmling des endogenen PKA-Inhibitors, mehrere intrazelluläre Effektoren, u. a. die Proteinkinase G, identifiziert (Glass *et al.*, 1992).

Eine Beteiligung der PKA an der antiproliferativen Wirkung von cAMP in Lungenfibroblasten konnte mit Hilfe dieser PKA-Inhibitoren nicht untersucht werden.

Mit Rp-8-Br-cAMPS wurde ein cAMP-Analogon als weiterer PKA-Inhibitor verwendet (s. Abb. IV-27). Dieser kompetitive Antagonist an der cAMP-Bindestelle der PKA zeigt in Proliferationsexperimenten keinen Eigeneffekt auf das Wachstumsverhalten der MRC 5-Zellen. Seine Wirksamkeit konnte dieser PKA-Inhibitor dadurch unter Beweis stellen, dass er in der Lage ist, eine Butaprost-induzierte Phosphorylierung von CREB größtenteils zu unterbinden. In den folgenden Interaktionsexperimenten wurde gezeigt, dass eine Präinkubation der MRC 5-Zellen mit Rp-8-Br-cAMPS ($100 \mu\text{M}$) weder die durch Butaprost noch die durch Forskolin induzierte Inhibition der Proliferation verhindert oder abschwächt.

Zur weiteren Abklärung der Rolle der PKA wurde mit 6-Bnz-cAMP ein cAMP-Analogen verwendet, das durch die Einführung des Benzylrestes in Position 6 des Adenins in der Lage ist, selektiv die PKA zu aktivieren, ohne dabei einen Einfluss auf andere cAMP-Effektoren zu haben (s. Abb. IV–29). Die Potenz dieses cAMP-Analogons, selektiv und spezifisch die PKA zu aktivieren, konnte bereits vielfach unter Beweis gestellt werden (Ogreid *et al.*, 1983; Christensen *et al.*, 2003). Der Einsatz dieser Substanz führt auch in hohen Konzentrationen (bis zu 300 μM) nicht zu einer signifikanten Inhibition der Proliferation.

Der fehlende Einfluss der PKA-Inhibition mittels Rp-8-Br-cAMP auf die cAMP-vermittelte antiproliferative Wirkung, zusammen mit dem fehlenden wachstumshemmenden Effekt des PKA-spezifischen cAMP-Analogons machen eine Beteiligung der PKA an diesem Prozess sehr unwahrscheinlich und legen die Vermutung nahe, dass andere cAMP-vermittelte Prozesse hauptverantwortlich für die antiproliferative Wirkung sind.

3.3 Rolle der Epac-Proteine bei der antiproliferativen Wirkung von cAMP

Da die Proteinkinase A wahrscheinlich nicht an der Transduktion der cAMP-vermittelten antiproliferativen Wirkung beteiligt ist, rückten die Guaninnukleotidaustauschfaktoren Epac1 und Epac2 in den Mittelpunkt des Interesses. Eine Untersuchung des Expressionsstatus mit Hilfe der semiquantitativen PCR zeigt, dass beide Isoformen sowohl in MRC 5-Zellen als auch in pHLFb deutlich exprimiert werden (s. Abb. IV–28). Dies wird durch kürzlich veröffentlichte Daten bestätigt (Yokoyama *et al.*, 2008), steht aber teilweise im Widerspruch zu Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Huang (Huang *et al.*, 2008), die in humanen Lungenfibroblasten nur eine Expression der Epac1-Isoform feststellen konnten, sich dabei allerdings auch nur auf Western Blot-Experimente stützen.

Der Einsatz Epac-spezifischer cAMP-Analoga in Proliferationsexperimenten führt zu einer hoch signifikanten, konzentrationsabhängigen Inhibition (s. Abb. IV–29). 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP, ein potenter, membrangängiger Epac-Aktivator (Christensen *et al.*, 2003; Holz *et al.*, 2008), imitiert den antiproliferativen Effekt einer erhöhten cAMP-Konzentration in humanen Fibroblasten. In *in vitro*-Studien band das Epac-spezifische 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP mit einer 4,6fach höheren Affinität an Epac-Proteine als cAMP, was ihm die Bezeichnung als Superaktivator einbrachte; die Potenz zur Epac-Aktivierung war 107mal höher als diejenige zur Aktivierung der PKA (Christensen *et al.*, 2003). Bereits in Konzentrationen von 2,2 μM konnte 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP in einem *in vitro*-Testsystem eine halbmaximale Aktivierung des Epac-Effektors Rap1 erreichen, ohne dass eine Aktivierung der PKA erfolgte; diese wurde

erst ab einer Konzentration von 100 μM festgestellt (Enserink *et al.*, 2002). Die Proliferation wurde in den vorliegenden Untersuchungen aber schon ab einer Konzentration von 1 μM gehemmt, also in einem Konzentrationsbereich, bei dem allein die Epac-Proteine aktiviert werden. Dies stützt die Bedeutung dieser Substanz als wertvolles Werkzeug zur Differenzierung zwischen Epac- und PKA-vermittelten Signalwegen. Ein weiterer verwendeter Epac-Aktivator – das Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS – hat den Vorteil, resistent gegenüber der Hydrolyse von Phosphodiesterasen zu sein (Holz *et al.*, 2008); auf diese Weise können Effekte, die über Abbauprodukte der Analoga – unabhängig von den Epac-Proteinen – vermittelt werden, ausgeschlossen werden. Dieses Phänomen trat bei einer Arbeit von Laxmann *et al.* (2006) in Protozoen-Kulturen auf, die einen antiproliferativen Effekt durch bioaktive Metaboliten des Epac-Aktivators nach Hydrolyse durch Phosphodiesterasen feststellen konnten, der unabhängig von einer Beteiligung der Epac-Proteine ausgelöst wurde. Die ausgeprägte antiproliferative Wirkung dieses hydrolyseresistenten cAMP-Analogons stützt jedoch die Vermutung, dass die Epac-Proteine an der cAMP-vermittelten Inhibition der Proliferation beteiligt sind. Die Spezifität des beschriebenen Effektes wurde durch den Einsatz von 8-pCPT-2'-O-Me-cGMP (1-100 μM) untermauert, ein cGMP-Derivat mit den gleichen Substituenten wie 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (Holz *et al.*, 2008), das keinen antiproliferativen Effekt in humanen Lungenfibroblasten vermittelt.

Leider gibt es bis zum heutigen Tag noch keinen Epac-Inhibitor, der zur Untersuchung Epac-vermittelter Signalwege beitragen könnte, so dass zur Signalwegaufklärung andere, molekularbiologische Methoden genutzt werden müssen. Um zu untersuchen, ob Epac-Proteine an der Vermittlung antiproliferativer Signalwege in humanen Lungenfibroblasten beteiligt sind und wenn ja, welche der beiden Isoformen die entscheidende ist, wurde in Folgeexperimenten die siRNA-Technik eingesetzt. Durch den Einsatz spezifischer siRNAs, gerichtet gegen Epac1 oder Epac2, kann ein partieller *Knock-Down* der beiden Isoformen erreicht werden. Nach Etablierung der Transfektionsmethode ist auf mRNA-Ebene bereits nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit der siRNA eine spezifische, hoch signifikante Reduktion der entsprechenden Epac-mRNA zu detektieren (s. Abb. IV-31). Die Ergebnisse werden durch Daten aus der Real-Time PCR gestützt, die einen vergleichbaren *Knock-Down* der jeweiligen Isoformen zeigen.

Die Effektivität des *Knock-Downs* wurde im Anschluss auf Proteinebene kontrolliert. Für den Nachweis des *Knock-Downs* für Epac1 auf Proteinebene konnte ein monoklonaler Epac1-Antikörper im Western Blot validiert werden. Aus Experimenten mit Cycloheximid kann eine sehr lange Halbwertszeit für Epac1 abgeleitet werden, da nach 48-stündiger Inkubation mit dem Translationshemmer noch keine wesentliche Abnahme des

Proteinniveaus detektierbar ist und das, obwohl die Epac1- und Epac2-Transkriptmenge auf mRNA-Ebene bereits 24 h nach der Transfektion mit siRNA bereits hoch signifikant reduziert ist (s. Abb. IV–32). Im daraufhin etablierten Transfektionsprotokoll wurde diesem Umstand Rechnung getragen und 24 h nach der ersten Transfektion eine zweite Transfektion durchgeführt, um die Transfektionseffizienz zu erhöhen und um den zeitlich begrenzten Effekt einer transienten Transfektion mit siRNA zu verlängern. Die Zellyse fand erst 96 h nach der zweiten Transfektion statt, da kürzere Zeitfenster noch keinen erfolgreichen *Knock-Down* zeigten. Mit diesem Protokoll ist ein hoch signifikanter *Knock-Down* von Epac1 auf Proteinebene auf ca. 40 % des Niveaus unter Kontrollbedingungen detektierbar.

Trotz Versuchen mit verschiedenen Antikörpern gegen Epac2 kann eine Epac2-Proteinexpression nicht detektiert werden. Dies könnte zum einen an der fehlenden Spezifität der verwendeten Antikörper und zum anderen an einem sehr niedrigen Proteinexpressionsniveau liegen. Huang *et al.* konnten in humanen Lungenfibroblasten ebenfalls keine Detektion von Epac2 auf Proteinebene feststellen (Huang *et al.*, 2008), wohingegen in humanen, kardialen Fibroblasten eine – wenn auch nur sehr schwache – Epac2-Expression auf Proteinebene nachzuweisen war (Yokoyama *et al.*, 2008). Trotz des Nachweises der Expression von Epac2 auf mRNA-Ebene scheint dies nur schwach auf Proteinebene detektierbar zu sein, so dass Epac1 anscheinend die vorherrschende Isoform in (primären) humanen Lungenfibroblasten ist.

Das Zeitprotokoll, das nach einer 2maligen Transfektion zu einem erfolgreichen *Knock-Down* von Epac1 geführt hat, wurde im Anschluss auch verwendet, um den Einfluss des *Knock-Downs* auf das Proliferationsverhalten der humanen Lungenfibroblasten zu untersuchen. Hier kann durch den partiellen *Knock-Down* von Epac1 eine deutliche Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve von Butaprost festgestellt werden (s. Abb. IV–34). Der partielle *Knock-Down* von Epac2, der zumindest auf mRNA-Ebene klar gezeigt wurde, hat keinen Einfluss auf den antiproliferativen Effekt von Butaprost und auch die mitgeführte siRNA, die sich gegen keine Zielsequenz in der Zelle richtet (ns siRNA), beeinflusst die Dosis-Wirkungs-Kurve des EP2-Rezeptoragonisten nicht signifikant. Diese Befunde stützen die Hypothese, dass Epac-Proteine – genauer gesagt Epac1 – an der cAMP-vermittelten antiproliferativen Signaltransduktion in humanen Lungenfibroblasten beteiligt sind. Erwähnenswert ist der Umstand, dass es durch den Epac1-*Knock-Down* zwar zu einer Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurve von Butaprost kam, der Maximaleffekt des Epac1-*Knock-Downs* jedoch nicht beeinflusst wurde. Eine mögliche Erklärung dieser Beobachtung könnte eine hohe Epac-Reserve sein. Dieses Phänomen ist häufiger bei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zu finden: durch eine

Sensibilisierung der Zellen reichen bereits geringe Dosen eines Agonisten aus, um maximale Effekte zu erzielen. Zusätzlich kann natürlich auch eine Beteiligung weiterer, nicht untersuchter Signalwege an der Vermittlung des Effektes nicht ausgeschlossen werden, die für den gleichbleibenden Maximalwert trotz *Epac1-Knock-Down* verantwortlich sind.

Die Rolle von *Epac2* bei der Signalübertragung kann durch die gezeigten Ergebnisse allerdings nicht vollständig geklärt werden. Untersuchungen zur Halbwertszeit des *Epac2*-Proteins liegen wegen des fehlenden, spezifischen Antikörpers nicht vor. Um auszuschließen, dass das Zeitfenster des etablierten Proliferationsprotokolls nicht geeignet ist, um einen Einfluss von *Epac2* auf die cAMP-vermittelte antiproliferative Wirkung von Butaprost zu untersuchen, wurden Proliferationsexperimente durchgeführt, bei denen der Butaprosteffekt 48 bzw. 72 h nach der zweiten Transfektion mit siRNA gemessen wurde; auch hier kann der Effekt von Butaprost nicht abgeschwächt werden (Daten nicht gezeigt). Die vorliegenden Daten stehen im Einklang mit den kürzlich publizierten Ergebnissen von Huang *et al.* (2008), die ebenfalls *Epac1* für die antiproliferative Wirkung einer cAMP-Erhöhung in Lungenfibroblasten verantwortlich machen konnten. Erwähnenswert ist auch eine kürzlich veröffentlichte Studie an glatten Muskelzellen der Lunge, bei denen gleichermaßen eine *Epac*-vermittelte Inhibition der Proliferation nachgewiesen werden konnte (Kassel *et al.*, 2008), so dass sich der antiproliferative Effekt der *Epac*-Proteine nicht nur auf Lungenfibroblasten zu beschränken scheint.

3.4 Untersuchungen zur Beteiligung von Rap1 und der MAP-Kinase

Der bis dato am besten charakterisierte Effektor der *Epac*-Proteine ist das kleine G-Protein Rap1 (de Rooij *et al.*, 1998; Kawasaki *et al.*, 1998), das durch den Austausch von GDP zu GTP durch Guaninnukleotidaustauschfaktoren wie den *Epac*-Proteinen aktiviert wird und als molekularer Schalter für zahlreiche intrazelluläre Prozesse dient (Bos *et al.*, 2001). Rap1 wurde 1989 erstmals als Gegenspieler der kleinen GTPase Ras identifiziert und kloniert (Kitayama *et al.*, 1989). Es konnte gezeigt werden, dass Rap1 die onkogene Transformation von Zellen verhindern konnte. Anfängliche Studien an einer Ovarialkarzinomzelllinie (OVCAR-3) konnten den *Epac1*-Rap1-Signalweg für die Integrin-vermittelte Adhäsion an dem extrazellulären Glykoprotein Fibronectin verantwortlich machen (Rangarajan *et al.*, 2003). Aber auch bei der Zell-Zell-Adhäsion (Price *et al.*, 2004) und der Differenzierung von Monozyten zu reifen Makrophagen scheint dieser Signalweg eine Rolle zu spielen (Bryn *et al.*, 2006).

Es stellte sich nun die Frage, ob Rap1 nach EP2-Rezeptoraktivierung stimuliert wird und ob es an der antiproliferativen Wirkung beteiligt ist. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass eine Inhibition des Zellwachstums nach cAMP-Erhöhung in Fibroblasten durch die Aktivierung von Rap1 vermittelt wird (Schmitt und Stork, 2001).

Mit Hilfe des *EZ-DetectTM Rap1-Activation Kit* (sogenannter *pull down*-Assay) ist es möglich selektiv aktiviertes, also GTP-gebundenes, Rap1 zu detektieren. Da diese Aktivierung normalerweise sehr schnell abläuft, wurden kurze Zeitfenster für die Untersuchung der Aktivierung gewählt. Tatsächlich kann eine Aktivierung von Rap1 durch die Inkubation mit Butaprost (100 nM) erreicht werden, die nach ca. 10 min ihr Maximum und wenig später wieder das Aktivitätsniveau unter Kontrollbedingungen erreicht (s. Abb. IV-35). Ergänzend zu diesen Daten konnte kürzlich in humanen Lungenfibroblasten nachgewiesen werden, dass die Rap1-Aktivierung durch PGE₂ nach Epac1-*Knock-Down* ausblieb und die Transfektion der Lungenfibroblasten mit einer konstitutiv aktiven Rap1-Mutante zu einer um 54 % verminderten Proliferationsrate führte (Huang *et al.*, 2008). Diese Ergebnisse stützen die postulierte These der Beteiligung von Epac1 und Rap1 an der cAMP-vermittelten Inhibition der Proliferation in humanen Lungenfibroblasten.

Eine cAMP-induzierte, Rap1-vermittelte Inhibition der Proliferation wurde in der Literatur bereits häufiger diskutiert, wobei ein möglicher Mechanismus die Interaktion mit der MAP-Kinase-Signalkaskade darstellt (Stork und Schmitt, 2002; Dumaz und Marais, 2005), die maßgeblich an der Übertragung mitogener Signale nach Aktivierung durch Wachstumsfaktoren beteiligt ist (Krauss, 2003). Zu Beginn dieser Signalkaskade findet meist die Ras-vermittelte Aktivierung von Raf1 statt. Diese Proteinkinase steht am Anfang der MAP-Kinase-Signalkaskade und kann diese aktivieren. Raf1 stellt aber ebenfalls ein Effektorprotein von Rap1 dar und wird von diesem nach Aktivierung in einem inaktiven Komplex gefangen gehalten, so dass es der MAP-Kinase-Signalkaskade nicht mehr zur Verfügung steht (Dumaz und Marais, 2005). Bereits 1993 konnte in NIH3T3-Fibroblasten gezeigt werden, dass eine Inkubation der Zellen mit den zellpermeablen cAMP-Analoga 8-chloro-cAMP oder Dibutyryl-cAMP die durch Wachstumsfaktoren ausgelöste ERK-Aktivierung unterdrückte (Cook und McCormick, 1993) und diese cAMP-vermittelte Inhibition der MAP-Kinase-Signalkaskade konnte ebenfalls für Adipocyten, Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Hepatozyten nachgewiesen werden, wobei hier auch häufig eine Beteiligung der PKA als wahrscheinlich angesehen werden kann (Stork und Schmitt, 2002).

Eigene Untersuchungen bestätigen den inhibierenden Einfluss von cAMP nach Forskolin-Inkubation auf die Aktivität der p42/44-MAP-Kinase in humanen

Atemwegsfibroblasten (s. Abb. IV–36). Die Phosphorylierung als Zeichen der Aktivität der MAP-Kinase kann nach 30-minütiger Inkubation mit Forskolin (10 μ M) nahezu vollständig unterdrückt werden. Im Folgenden wurden die MRC 5-Zellen mit Epac- bzw. PKA-spezifischen cAMP-Analoga inkubiert, um den Signalweg nach der cAMP-Erhöpfung zu untersuchen. Der Einsatz des Epac-Aktivator 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (100 μ M) führt zu einer leichten Abnahme der MAP-Kinase-Aktivität um ca. 20 %, die allerdings statistisch nicht signifikant ist. Das MAP-Kinase-Aktivitätsniveau wurde nach 5, 15, 30 und 60 Minuten gemessen und in jeder Messserie wurde die maximale Inhibition zu einem anderen Zeitpunkt gemessen, so dass diese Inhibition keiner eindeutigen Kinetik zu folgen schein. Statistisch signifikant wird diese Abnahme aber erst, nachdem die zeitlichen Minimalwerte gepoolt wurden. Die Inkubation mit dem PKA-Aktivator 6-Bnz-cAMP (100 μ M) zeigt keinen Einfluss auf die Aktivität der p42/44-MAP-Kinase. Es erscheint also fraglich, ob die cAMP-vermittelte MAP-Kinase-Inhibition allein über die Epac-Proteine übertragen wird; die leichte Inhibition der MAP-Kinase-Aktivität spricht zumindest für deren Beteiligung. Eine weitere Erklärung für die nur schwach ausgeprägte Inhibition der p42/44-MAP-Kinase könnte auch die unbekannte Kinetik der Wirkung des Epac-Agonisten sein, so dass die Inhibition des MAP-Kinase-Signalweges erst zu einem späteren Zeitpunkt vermittelt wird und die Wirkung deswegen weniger effektiv als diejenige des Forskolins ist. Auch anderen Arbeitsgruppen ist es nicht gelungen, einen direkten Zusammenhang zwischen einer Epac-Aktivierung und einer Inhibition des MAP-Kinase-Signalweges zu belegen (Enserink *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2008).

Es kann nun über mögliche, beteiligte Komponenten an der cAMP-vermittelten Inhibition der Proliferation spekuliert werden, die im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht untersucht wurden. Bereits mehrfach wurde in der Literatur die Beeinflussung von am Zellzyklus beteiligten Protein durch cAMP beschrieben: eine cAMP-vermittelte Expressionssteigerung des zyklin-abhängigen Kinaseinhibitors p21^{cip1} konnte für Lymphozyten nachgewiesen werden (Naderi *et al.*, 2005). Auch die Expression des zyklin-abhängigen Kinaseinhibitors p27^{kip1} wurde nach Gabe cAMP-erhöhender Substanzen in glatten Muskelzellen angestoßen (Cospedal *et al.*, 1999). Beide Kinasen sind für den Arrest der Zellen in der G₁-Phase der Zellzyklus verantwortlich und ein Übertreten in die S-Phase wird somit unterbunden. Andererseits konnte eine cAMP-vermittelte verminderte Expression der Cycline D1 und D3 nachgewiesen werden (Cospedal *et al.*, 1999; Naderi *et al.*, 2000), die für die Aktivierung zyklin-abhängiger Kinasen und damit für einen Übertritt der Zellen von der G₁-Phase in die S-Phase verantwortlich sind, was im Ergebnis ebenfalls zu einem Proliferationsstopp der Zellen führt. Ob diese Effekte jedoch über die

Aktivierung von Epac-Proteinen vermittelt werden, wurde bis dato noch nicht gezeigt und wäre ein interessanter Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen.

Auch ein verstärktes Auftreten der Apoptose nach cAMP-Erhöhung konnte bereits in verschiedenen Zellsystemen nachgewiesen werden (Chen *et al.*, 1998; Myklebust *et al.*, 1999); auch hier wäre eine Beteiligung der Epac-Proteine sicherlich vorstellbar.

3.5 Effekte einer erhöhten cAMP-Konzentration auf die Proliferation von primären humanen Lungenfibroblasten

Alle bislang diskutierten Ergebnisse zur cAMP-vermittelten, antiproliferativen Wirkung wurden an MRC 5-Zellen gewonnen, einer humanen Lungenfibroblastenzelllinie. Um die Allgemeingültigkeit der Befunde zu belegen und deren physiologische Relevanz zu unterstreichen, wurden Schlüsselexperimente in primären humanen Lungenfibroblasten wiederholt. Diese bestätigen die in MRC 5-Zellen gewonnenen Ergebnisse (s. Abb. IV–37, Abb. IV–38 und Abb. IV–39). Sowohl die Inkubation mit dem EP2-Rezeptoragonisten Butaprost als auch die mit Forskolin und Dibutyryl-cAMP führen zu einer hoch signifikanten Inhibition der Proliferation, die durch den Einstaz des Epac-Aktivators 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP, nicht aber durch den PKA-Aktivator 6-Bnz-cAMP nachgeahmt werden kann. Diese Beobachtung unterstreicht die Eignung der MRC 5-Fibroblastenzelllinie, die sich in allen untersuchten Punkten wie primäre Zellen verhält.

3.6 Inhibition der Kollagenbildung und der Differenzierung infolge erhöhter cAMP-Spiegel

In der Einführung wurde bereits ausführlich auf die weiteren antifibrotischen Auswirkungen einer cAMP-Erhöhung in Lungenfibroblasten eingegangen. In eigenen Untersuchungen wurde der Effekt von Butaprost auf die TGF- β -induzierte *α -smooth-muscle*-Aktin-Expression als Marker für den Differenzierungsgrad der MRC 5-Zellen untersucht. TGF- β führt bekanntermaßen zu einer Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten (Bartram und Speer, 2004), was sich anhand der erhöhten *α -smooth-muscle*-Aktin-Expression messen lässt. Die Inkubation mit Butaprost führt zu einer starken Attenuierung des TGF- β -Effektes auf die *α -smooth-muscle*-Aktin-Expression, die in hohen Butaprost-Konzentrationen (100 nM) sogar unter das Niveau unter Kontrollbedingungen reguliert werden kann (s. Abb. IV–40). Die *α -smooth-muscle*-Aktin-Expression dient als Marker für den Differenzierungsstatus der

Fibroblasten hin zu Myofibroblasten, einem Fibroblastenphänotyp, der sich durch eine erhöhte Syntheseleistung an Matrixproteinen auszeichnet. Eine Verhinderung dieser Differenzierung, die ein typisches Kennzeichen fibrotischer Gewebe ist, ist therapeutisch wünschenswert und könnte durch die Gabe cAMP-erhöhender Substanzen erreicht werden.

Der ausgeprägte inhibitorische Effekt einer erhöhten cAMP-Konzentration auf die Synthese des Strukturproteins Kollagen in Fibroblasten konnte auch schon vielfach in der Literatur beschrieben werden (Baum *et al.*, 1980; Liu *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2007). Eigene Untersuchungen mit Hilfe des [³H]-Prolin-Inkorporationsassays als Maß für die Kollagenneusynthese bestätigen diese Befunde und es kann eine hoch signifikante Inhibition der Kollagensynthese nach cAMP-Erhöhung – ausgelöst durch Isoprenalin (100 nM), Butaprost (100 nM) und Forskolin (10 µM) – detektiert werden (s. Abb. IV–41). Huang *et al.* (2007) wiesen in Western Blot-Experimenten an primären Lungenfibroblasten nach, dass dieser Effekt unabhängig von Epac über die Aktivierung der PKA vermittelt wird. Neuere Daten unterstützen diese These dadurch, dass eine Transfektion von Fibroblasten mit einer konstitutiv aktiven PKA zu einer verminderten Kollagensynthese führte (Huang *et al.*, 2008). Wir können diese Daten mit Hilfe unseres Assaysystems zur Quantifizierung des neugebildeten Kollagens erhärten: der Einsatz des Epac-Aktivators 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP zeigt auch in sehr hohen Konzentrationen (bis zu 500 µM) keinen Einfluss auf die Kollagensynthese, wohingegen der PKA-Aktivator 6-Bnz-cAMP ab einer Konzentration von 300 µM die Kollagensynthese hoch signifikant hemmt (s. Abb. IV–42). Bemerkenswert ist die hohe Konzentration des PKA-Aktivators, die für diese Hemmung notwendig ist, die allerdings auch in den Studien von Huang *et al.* genutzt wurde.

In Fibroblasten aus Rattenherzen stellt sich die Situation anders dar: hier scheint die Kollagensynthese sowohl durch Proteinkinase A als auch durch Epac-Proteine inhibiert zu werden (Yokoyama *et al.*, 2008). Ob sich diese Beobachtung durch spezies- oder gewebespezifische Unterschiede oder durch ein andersartiges experimentelles Prozedere erklären lässt, bedarf weiterer Untersuchungen.

3.7 Zusammenfassende Beurteilung cAMP-vermittelter antifibrotischer Prozesse in humanen Lungenfibroblasten

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in dieser Arbeit die antifibrotische Wirkung einer cAMP-Erhöhung in humanen Lungenfibroblasten bestätigt und die beteiligten Signalwege näher charakterisiert werden konnten.

Besonders interessant ist dabei die gezeigte Diversität der cAMP-vermittelten Effekte in einem einzigen Zelltyp: der Signalweg zweier antifibrotischer Prozesse – der Inhibition der Proliferation und der Kollagensynthese – verzweigt sich nach der Erhöhung intrazellulärer cAMP-Konzentrationen in zwei unterschiedliche Transduktionswege. Die Proteinkinase A scheint dabei eine wichtige Rolle bei der cAMP-vermittelten Inhibition der Kollagensynthese zu spielen, wohingegen die Epac-Proteine, genauer gesagt Epac1, an der Inhibition der Proliferation maßgeblich beteiligt zu sein scheinen. Diese Diversität der cAMP-vermittelten Signaltransduktion in einem einzigen Zelltyp konnte auch schon für weitere Zellsysteme wie beispielsweise Alveormakrophagen der Ratte beschrieben werden, bei denen die Proteinkinase A nach cAMP-Erhöhung die Leukotrien B₄- und die TNF- α -Synthese inhibierte, wohingegen Epac1 die cAMP-vermittelte Phagozytose unterband (Aronoff *et al.*, 2005).

Andererseits können die beiden cAMP-Effektoren – Proteinkinase A und Epac-Proteine – auch synergistisch wirken und sind im Zusammenspiel für einen Effekt verantwortlich, so z. B. nachgewiesen für die Wirkung der Nervenwachstumsfaktor (NGF, *nerve growth factor*) in PC12-Zellen, bei denen erst die Aktivierung beider cAMP-Effektoren zu einer neuronalen Differenzierung führte (Kopperud *et al.*, 2003).

Die für die antifibrotischen Wirkungen in Fibroblasten verantwortlichen Signalwege nach PKA- bzw. Epac-Aktivierung sind noch nicht genauer untersucht worden und geben Anlass zu ausgiebiger Spekulation, da sowohl Epac-Proteine als auch die PKA zahlreiche Interaktionspartner in der Zelle haben (Tasken und Aandahl, 2004; Holz *et al.*, 2006; Roscioni *et al.*, 2008).

Insbesondere die Entdeckung der Epac-Proteine im Jahr 1998 hat folglich das Wissen über die Signaltransduktion rund um den Botenstoff cAMP sehr bereichert. Seitdem war es vielfach möglich, diesem neuen Effektorprotein Wirkungen zuzuschreiben, die bislang der Proteinkinase A beigemessen wurden. Die Entwicklung der spezifischen cAMP-Analoga und die fortschreitenden molekularbiologischen Methoden erlauben eine immer bessere Differenzierung zwischen den verschiedenen cAMP-Effektoren.

Auch die mögliche therapeutische Bedeutung pharmakologischer Substanzen, die nach Aktivierung G α_s -gekoppelter Rezeptoren über eine erhöhte intrazelluläre cAMP-Konzentration antifibrotische Effekte vermitteln, konnte durch die gezeigten Daten betont werden. Hier sind vor allem Agonisten am Prostaglandin E-Rezeptorsubtyp EP2 zu nennen, die in klinischen Studien bereits erfolgreich getestet wurden (Gauvreau *et al.*, 1999; Hartert *et al.*, 2000), bis dato allerdings aufgrund von Nebenwirkungen – wobei hier vor allem der auftretende Husten zu nennen ist (Stone *et al.*, 1992) – noch nicht zum Einsatz kamen.

VI Zusammenfassung

Remodelingprozesse der Atemwege, die typischerweise als Langzeitfolge chronisch-entzündlicher Lungenerkrankungen auftreten, zeichnen sich maßgeblich durch ein verstärktes Zellwachstum von Bindegewebszellen und eine übermäßige Synthese und Sekretion von Matrixproteinen aus. Den Atemwegsfibroblasten kommt in diesem pathophysiologischen Geschehen eine besondere Bedeutung zu, da sie als strukturgebende Zellen des Bindegewebes und als Hauptproduzenten der extrazellulären Matrix wesentlich an der Gewebemöostase und an fibrotischen Umbauprozessen beteiligt sind.

Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Signal- und Stoffwechselwege humaner Atemwegsfibroblasten untersucht, die an der Regulation der Proliferation und der Kollagensynthese beteiligt sind bzw. sein könnten und somit die Umbauprozesse im Rahmen chronischer Atemwegserkrankungen beeinflussen könnten.

Um sich diesen Fragestellungen zu nähern wurden mehrere humane Atemwegsfibroblastenzelllinien (MRC 5, Hel 299 und IMR 90) und primäre humane Atemwegsfibroblasten mit Hilfe molekularbiologischer Methoden und funktioneller Assays untersucht. Zur Erfassung der Proliferationsrate diente der [³H]-Thymidin-Inkorporationsassay und die Quantifizierung der Kollagenneusynthese erfolgte mit Hilfe des [³H]-Prolin-Inkorporationsassay. Die Aktivität der intrazellulären Arginase wurde durch einen photometrischen Assay ermittelt, der den Harnstoff als Produkt der Arginasekatalyse erfasst. Expressionsanalysen auf mRNA-Ebene und Veränderungen der mRNA-Transkriptmenge wurden mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR und der quantitativen Real-Time PCR durchgeführt. Der Western Blot wurde zur Bestimmung der Proteinmenge im Zelllysate und im Zellüberstand verwendet. Durch den Einsatz der siRNA-Technik konnten gezielt die Epac-Proteine herunterreguliert und so deren Einfluss auf die Proliferation in humanen Atemwegsfibroblasten näher charakterisiert werden. Ein kommerzielles Assaykit diente zur Erfassung des aktivierten Rap1 im Zelllysate.

Zusammenfassend ließen sich folgende Ergebnisse erzielen:

- 1) Die bedeutende Hochregulation der Arginaseisoenzyme im Rahmen chronischer Atemwegserkrankungen im Lungengewebe zusammen mit ihrer Rolle als Ornithinlieferant, das als Ausgangsprodukt zur Synthese des Kollagenbausteins L-Prolin und der Polyamine

dient, lässt die Frage nach ihrer Bedeutung in Stoffwechselfvorgängen, die an der Steuerung von Zellwachstum und der Bereitstellung von extrazellulären Matrixproteinen beteiligt sind, aufkommen. Die Frage der Expression der beiden Arginaseisoenzyme und deren funktioneller Bedeutung in humanen Atemwegsfibroblasten sollte in der vorliegenden Arbeit näher charakterisiert werden. In humanen Atemwegsfibroblasten konnte mit Hilfe der semiquantitativen mRNA-Expressionsanalyse lediglich die Arginase II detektiert werden; eine Arginase I-Expression auf mRNA-Ebene war nicht nachzuweisen. Die enzymatische Aktivität der Arginase in humanen Atemwegsfibroblasten war mit den zur Verfügung stehenden Methoden im photometrischen Assaysystem nicht messbar. Eine Steigerung der mRNA-Expression der Arginase I und II durch die Interleukine 4 und 13, wie sie in Rattenfibroblasten gezeigt werden konnte, war in humanen Atemwegs-fibroblasten nicht detektierbar. Zwar werden die beiden Ornithin-verstoffwechslenden Enzyme Ornithinaminotransferase und Ornithindecaboxylase in humanen Atemwegs-fibroblasten exprimiert, aber weder die Kollagen I-Synthese noch die Proliferation wurde durch eine Inhibition der Arginase im *in vitro*-Zellmodell beeinflusst. Die Expression der Arginase II konnte durch Inkubation der Zellen mit dem Wachstumsfaktor PDGF auf bis zu 392 % des Expressionsniveaus unter Kontrollbedingungen gesteigert werden, aber auch hier wirkte sich eine gleichzeitige Inhibition der Arginase nicht negativ auf das Proliferationsverhalten der Zellen aus.

- 2) Klinische Studien deuten darauf hin, dass der Muskarinrezeptorantagonist Tiotropium die zunehmende Verschlechterung der Lungenfunktion bei Patienten mit chronisch-obstruktiver Lungenerkrankung aufzuhalten vermag, was auf eine Beteiligung cholinergischer Mechanismen an den strukturellen Veränderungen im Rahmen chronischer Atemwegs-erkrankungen hinweist. In der vorliegenden Arbeit wurde die Beteiligung von Muskarinrezeptoren an der Kollagensynthese in humanen Atemwegsfibroblasten genauer untersucht. Das Expressionsmuster muskarinischer Rezeptoren in humanen Atemwegs-fibroblasten konnte durch den Einsatz der semiquantitativen PCR bestätigt werden, wobei der M2-Rezeptor der hervortretende Muskarinrezeptor ist. Mit Hilfe des [³H]-Prolin-Inkorporationsassays als Maß für die Kollagenneusynthese konnte gezeigt werden, dass die Muskarinrezeptoragonisten Carbachol (10 µM) bzw. Oxotremorin (10 µM) die Kollagen-synthese von humanen Atemwegsfibroblasten um ca. 55 % bzw. 65 % steigern können. Durch Präinkubation der Zellen mit dem Muskarinrezeptorantagonist Tiotropium wird der Muskarinrezeptor-vermittelte Anstieg der Kollagensynthese konzentrationsabhängig gehemmt (IC₅₀ = 110 pm). Die Muskarinrezeptor-vermittelte Steigerung der Kollagen-synthese scheint über einen Gα_i-gekoppelten Rezeptor zu verlaufen, da eine Vorinkubation der Zellen mit Pertussistoxin die Steigerung der Kollagensynthese verhindert. Da der M2-Rezeptor sehr stark in humanen Atemwegsfibroblasten vertreten ist und nur Spuren des ebenfalls Gα_i-gekoppelten M4-Rezeptor zu finden sind, ist es wahrscheinlich, dass die Steigerung der Kollagensynthese über den M2-Rezeptor vermittelt wird. Analog zur Muskarinrezeptor-vermittelten Steigerung der Proliferation scheint an der Steigerung der

Kollagensynthese ebenfalls der MAP-Kinase-Signalweg beteiligt zu sein, da der Effekt durch Inhibition dieses Signalweges unterdrückt werden konnte.

- 3) Die antifibrotischen Effekte erhöhter cAMP-Spiegel in Fibroblasten sind bereits seit langen bekannt. Mit Hilfe des [³H]-Thymidin-Inkorporationsassays konnte bestätigt werden, dass cAMP-erhöhende Substanzen (Forskolin und IBMX) und cAMP-Analoga (8-Br-cAMP und Dibutyryl-cAMP) die Proliferation von humanen Atemwegsfibroblasten inhibieren. G_α_s-gekoppelte Rezeptoragonisten, wie beispielsweise das nicht-selektive β-Sympathomimetikum Isoprenalin und der EP2-Rezeptoragonist Butaprost, vermögen ebenfalls das Proliferationsniveau von humanen Atemwegsfibroblasten deutlich zu senken. Die darüber hinaus beteiligten Signalwege sind allerdings nur teilweise charakterisiert und neben dem klassischen cAMP-Effektor – der Proteinkinase A (PKA) – sind hier die Guaninnukleotidaustauschfaktoren Epac1 und Epac2 von Interesse

Ein PKA-spezifisches cAMP-Analogon (6-Bnz-cAMP) zeigte auch in hohen Konzentrationen (300 μM) keine Auswirkungen auf die Proliferation der Atemwegs-fibroblasten und der PKA-Inhibitor Rp-8-Br-cAMPS verhinderte trotz nachgewiesener Hemmwirkung auf die PKA die EP2-Rezeptor-vermittelte Inhibition der Proliferation nicht, so dass die PKA nicht an der cAMP-vermittelten Inhibition der Proliferation beteiligt zu sein scheint. Folglich rückten die beiden Guaninnukleotidaustauschfaktoren Epac1 und Epac2 in den Mittelpunkt der Untersuchungen. Deren Expression konnte mit Hilfe der RT-PCR und der Real Time-PCR in humanen Atemwegsfibroblasten nachgewiesen werden. Die Epac-spezifischen cAMP-Analoga (8-pCPT-2'-O-Me-cAMP und Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS) inhibierten die Proliferation von humanen Atemwegsfibroblasten um bis zu 70 %. Mit Hilfe der siRNA-Technik ist es gelungen, den Guaninnukleotidaustauschfaktor Epac1 auf mRNA- und Proteinebene herunterzuregulieren, was in funktionellen Untersuchungen zu einer signifikanten Abschwächung der cAMP-induzierten Proliferationshemmung führte. Nach einem Knock-Down von Epac2 konnte dies nicht gesehen werden. Zusammenfassend scheint also der cAMP-vermittelte, antiproliferative Effekt nicht über die PKA, sondern über die Epac-Proteine, genauer gesagt Epac1, vermittelt zu werden.

Eine Inkubation der humanen Atemwegsfibroblasten mit dem EP2-Rezeptoragonisten Butaprost führte ferner zu einer schnellen aber transienten Aktivierung von Rap1, das als weiteres Effektormolekül *down-stream* von EPAC bei der Signalweiterleitung des antiproliferativen Effektes cAMP-erhöhender Substanzen beteiligt zu sein scheint.

Auch die Kollagensynthese in humanen Atemwegsfibroblasten wird durch cAMP-erhöhende Substanzen wie beispielsweise Isoprenalin, Butaprost und Forskolin signifikant inhibiert. Diese Inhibition konnte durch das PKA-spezifische cAMP-Analogon 6-Bnz-cAMP, nicht aber über das Epac-spezifische 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP imitiert werden, so dass die cAMP-vermittelte Inhibition der Kollagensynthese im Gegensatz zur Proliferation über die Proteinkinase A vermittelt wird.

VII Schlussfolgerungen

Durch die vorliegenden Daten – gewonnen an verschiedenen humanen Atemwegsfibroblastenzelllinien und an primären humanen Atemwegsfibroblasten – wird die Bedeutung dieses Zelltyps im Rahmen chronischer Umbauprozesse der Atemwege deutlich. Humane Atemwegsfibroblasten bieten interessante Angriffsmöglichkeiten und exprimieren vielversprechende Targets für neue therapeutische Optionen, die eine Progression von Remodelingvorgängen im Rahmen chronischer Atemwegserkrankungen drosseln könnten. Auch bereits etablierte Therapieoptionen im Rahmen chronischer Atemwegserkrankungen, wie Anticholinergika und β -Sympathomimetika, erscheinen durch die präsentierten Ergebnisse in einem neuen Licht. Muskarinrezeptoren und β -Adrenozeptoren spielen nicht nur eine herausragende Rolle bei der Regulation des Muskeltonus in den Atemwegen, sie scheinen auch an der Gewebemöostase über die Regulation der Proliferation von Fibroblasten und glatten Muskelzellen und deren Kollagensynthese beteiligt zu sein. Dieser funktionelle Antagonismus zwischen den beteiligten Rezeptoren innerhalb einer Zelle kann unter physiologischen Bedingungen eine optimale Adaption an die vorherrschenden Gegebenheiten garantieren, bei Überwiegen des einen oder anderen Signalweges kann aber auch eine pathophysiologische Situation, wie die vermehrte Fibrosierung des Gewebes, resultieren. Der antifibrotische Effekt von Muskarinrezeptorantagonisten und β_2 -Sympathomimetika im *in vitro*-Zellmodell legt die Vermutung nahe, dass deren Einsatz zur Therapie chronischer Atemwegserkrankungen zu einer Drosselung der Remodelingprozesse führen und sich langfristig positiv auf den Krankheitsverlauf auswirken könnte, wie es in klinischen Studien bereits gezeigt werden konnte. Der inhibitorische Effekt der β -Sympathomimetika scheint über die Erhöhung intrazellulärer cAMP-Spiegel vermittelt zu werden und auch andere Agonisten an $G\alpha_s$ -gekoppelten Rezeptoren, wie beispielsweise der EP2-Rezeptor, könnten vor diesem Hintergrund von therapeutischem Nutzen sein. Von besonderem Interesse bei der cAMP-vermittelten Inhibition fibrotischer Prozesse in humanen Atemwegsfibroblasten ist die Diversität der beteiligten Signalwege: Während die cAMP-vermittelte Inhibition der Kollagensynthese über die Aktivierung der PKA ausgelöst wird, scheint die Inhibition der Proliferation von humanen Atemwegsfibroblasten wesentlich über den Guaninnukleotidaustauschfaktor Epac1 vermittelt zu werden.

Die Interpretation der vorliegenden Daten zur Expression und Aktivität der Arginaseisoformen in humanen Atemwegsfibroblasten lässt den Einsatz von Arginaseinhibitoren zur Therapie chronischer Atemwegserkrankungen allerdings fraglich erscheinen. Zumindest in humanen Atemwegsfibroblasten scheint der Arginase als Lieferant der Prolin- und Polyaminvorläufers L-Ornithin nur eine untergeordnete Bedeutung zuzukommen. Die vielversprechenden Daten an Rattenfibroblasten, die eine Inhibition der Kollagensynthese nach Hemmung der Arginase zeigten, ließen sich *in vitro* in humanen Atemwegsfibroblasten nicht bestätigen.

VIII Literaturverzeichnis

- Abe R, Donnelly SC, Peng T, Bucala R and Metz CN (2001) Peripheral Blood Fibrocytes: Differentiation Pathway and Migration to Wound Sites. *J Immunol* 166:7556-7562.
- Abramovitz M, Adam M, Boie Y, Carriere M, Denis D, Godbout C, Lamontagne S, Rochette C, Sawyer N, Tremblay NM, Belley M, Gallant M, Dufresne C, Gareau Y, Ruel R, Juteau H, Labelle M, Ouimet N and Metters KM (2000) The Utilization of Recombinant Prostanoid Receptors to Determine the Affinities and Selectivities of Prostaglandins and Related Analogs. *Biochim Biophys Acta* 1483:285-293.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M and Roberts R (2008) *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, New York, USA.
- Albina JE, Abate JA and Mastrofrancesco B (1993) Role of Ornithine As a Proline Precursor in Healing Wounds. *J Surg Res* 55:97-102.
- Albina JE, Mills CD, Barbul A, Thirkill CE, Henry WL, Jr., Mastrofrancesco B and Caldwell MD (1988) Arginine Metabolism in Wounds. *Am J Physiol* 254:E459-E467.
- Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT and Saltiel AR (1995) PD 098059 Is a Specific Inhibitor of the Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase in Vitro and in Vivo. *J Biol Chem* 270:27489-27494.
- Anzueto A, Tashkin D, Menjoge S and Kesten S (2005) One-Year Analysis of Longitudinal Changes in Spirometry in Patients With COPD Receiving Tiotropium. *Pulm Pharmacol Ther* 18:75-81.
- Aronoff DM, Canetti C, Serezani CH, Luo M and Peters-Golden M (2005) Cutting Edge: Macrophage Inhibition by Cyclic AMP (cAMP): Differential Roles of Protein Kinase A and Exchange Protein Directly Activated by cAMP-1. *J Immunol* 174:595-599.
- Ash DE (2004) Structure and Function of Arginases. *J Nutr* 134:2760S-2764S.
- Barnes PJ (2000a) Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med* 343:269-280.
- Barnes PJ (2000b) Mechanisms in COPD: Differences From Asthma. *Chest* 117:10S-14S.
- Barnes PJ (2004) Distribution of Receptor Targets in the Lung. *Proc Am Thorac Soc* 1:345-351.
- Bartram U and Speer CP (2004) The Role of Transforming Growth Factor Beta in Lung Development and Disease. *Chest* 125:754-765.

- Baum BJ, Moss J, Breul SD, Berg RA and Crystal RG (1980) Effect of Cyclic AMP on the Intracellular Degradation of Newly Synthesized Collagen. *J Biol Chem* 255:2843-2847.
- Beavo JA and Brunton LL (2002) Cyclic Nucleotide Research -- Still Expanding After Half a Century. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:710-718.
- Belmonte KE (2005) Cholinergic Pathways in the Lungs and Anticholinergic Therapy for Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proc Am Thorac Soc* 2:297-304.
- Benayoun L, Druilhe A, Dombret MC, Aubier M and Pretolani M (2003) Airway Structural Alterations Selectively Associated With Severe Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 167:1360-1368.
- Bergeron C and Boulet LP (2006) Structural Changes in Airway Diseases: Characteristics, Mechanisms, Consequences, and Pharmacologic Modulation. *Chest* 129:1068-1087.
- Bergeron C, Boulet LP, Page N, Laviolette M, Zimmermann N, Rothenberg ME and Hamid Q (2007) Influence of Cigarette Smoke on the Arginine Pathway in Asthmatic Airways: Increased Expression of Arginase I. *J Allergy Clin Immunol* 119:391-397.
- Bodey KJ, Semper AE, Redington AE, Madden J, Teran LM, Holgate ST and Frew AJ (1999) Cytokine Profiles of BAL T Cells and T-Cell Clones Obtained From Human Asthmatic Airways After Local Allergen Challenge. *Allergy* 54:1083-1093.
- Boie Y, Stocco R, Sawyer N, Slipetz DM, Ungrin MD, Neuschäfer-Rube F, Puschel GP, Metters KM and Abramovitz M (1997) Molecular Cloning and Characterization of the Four Rat Prostaglandin E2 Prostanoid Receptor Subtypes. *Eur J Pharmacol* 340:227-241.
- Bokoch GM, Katada T, Northup JK, Hewlett EL and Gilman AG (1983) Identification of the Predominant Substrate for ADP-Ribosylation by Islet Activating Protein. *J Biol Chem* 258:2072-2075.
- Bonner JC (2004) Regulation of PDGF and Its Receptors in Fibrotic Diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 15:255-273.
- Borok Z, Gillissen A, Buhl R, Hoyt RF, Hubbard RC, Ozaki T, Rennard SI and Crystal RG (1991) Augmentation of Functional Prostaglandin E Levels on the Respiratory Epithelial Surface by Aerosol Administration of Prostaglandin E. *Am Rev Respir Dis* 144:1080-1084.
- Bos IS, Gosens R, Zuidhof AB, Schaafsma D, Halayko AJ, Meurs H and Zaagsma J (2007) Inhibition of Allergen-Induced Airway Remodelling by Tiotropium and Budesonide: a Comparison. *Eur Respir J* 30:653-661.
- Bos JL (2006) Epac Proteins: Multi-Purpose cAMP Targets. *Trends Biochem Sci* 31:680-686.
- Bos JL, de Rooij J and Reedquist KA (2001) Rap1 Signalling: Adhering to New Models. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:369-377.
- Boulet LP, Laviolette M, Turcotte H, Cartier A, Dugas M, Malo JL and Boutet M (1997) Bronchial Subepithelial Fibrosis Correlates With Airway Responsiveness to Methacholine. *Chest* 112:45-52.
- Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M and Vignola AM (2000) Asthma. From Bronchoconstriction to Airways Inflammation and Remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 161:1720-1745.

- Brewster CE, Howarth PH, Djukanovic R, Wilson J, Holgate ST and Roche WR (1990) Myofibroblasts and Subepithelial Fibrosis in Bronchial Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 3:507-511.
- Bryn T, Mahic M, Enserink JM, Schwede F, Aandahl EM and Tasken K (2006) The Cyclic AMP-Epac1-Rap1 Pathway Is Dissociated From Regulation of Effector Functions in Monocytes but Acquires Immunoregulatory Function in Mature Macrophages. *J Immunol* 176:7361-7370.
- Buga GM, Wei LH, Bauer PM, Fukuto JM and Ignarro LJ (1998) NG-Hydroxy-L-Arginine and Nitric Oxide Inhibit Caco-2 Tumor Cell Proliferation by Distinct Mechanisms. *Am J Physiol* 275:R1256-R1264.
- Buhl R, Berdel D, Criece CP, Gillissen A, Kardos P, Kroegel C, Leupold W, Lindemann H, Magnussen H, Nowak D, Pfeiffer-Kascha D, Rabe K, Rolke M, Schultze-Werninghaus G, Sitter H, Ukena D, Vogelmeier C, Welte T, Wettengel R and Worth H (2006) [Guidelines for Diagnosis and Treatment of Asthma Patients]. *Pneumologie* 60:139-177.
- Buhling F, Lieder N, Kuhlmann UC, Waldburg N and Welte T (2007) Tiotropium Suppresses Acetylcholine-Induced Release of Chemotactic Mediators in Vitro. *Respir Med* 101:2386-2394.
- Burgess JK (2009) The Role of the Extracellular Matrix and Specific Growth Factors in the Regulation of Inflammation and Remodelling in Asthma. *Pharmacol Ther* 122:19-29.
- Busse WW and Lemanske RF, Jr. (2001) Asthma. *N Engl J Med* 344:350-362.
- Carlisle DL, Hopkins TM, Gaither-Davis A, Silhanek MJ, Luketich JD, Christie NA and Siegfried JM (2004) Nicotine Signals Through Muscle-Type and Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors in Both Human Bronchial Epithelial Cells and Airway Fibroblasts. *Respir Res* 5:27.
- Casaburi R, Mahler DA, Jones PW, Wanner A, San PG, ZuWallack RL, Menjoge SS, Serby CW and Witek T, Jr. (2002) A Long-Term Evaluation of Once-Daily Inhaled Tiotropium in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Eur Respir J* 19:217-224.
- Casale TB and Ecklund P (1988) Characterization of Muscarinic Receptor Subtypes on Human Peripheral Lung. *J Appl Physiol* 65:594-600.
- Caulfield MP and Birdsall NJ (1998) International Union of Pharmacology. XVII. Classification of Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Pharmacol Rev* 50:279-290.
- Chambers LS, Black JL, Ge Q, Carlin SM, Au WW, Poniris M, Thompson J, Johnson PR and Burgess JK (2003) PAR-2 Activation, PGE₂, and COX-2 in Human Asthmatic and Nonasthmatic Airway Smooth Muscle Cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285:L619-L627.
- Charbeneau RP and Peters-Golden M (2005) Eicosanoids: Mediators and Therapeutic Targets in Fibrotic Lung Disease. *Clin Sci (Lond)* 108:479-491.
- Chen TC, Hinton DR, Zidovetzki R and Hofman FM (1998) Up-Regulation of the cAMP/PKA Pathway Inhibits Proliferation, Induces Differentiation, and Leads to Apoptosis in Malignant Gliomas. *Lab Invest* 78:165-174.
- Chetta A, Foresi A, Del DM, Bertorelli G, Pesci A and Olivieri D (1997) Airways Remodeling Is a Distinctive Feature of Asthma and Is Related to Severity of Disease. *Chest* 111:852-857.

- Chijiwa T, Mishima A, Hagiwara M, Sano M, Hayashi K, Inoue T, Naito K, Toshioka T and Hidaka H (1990) Inhibition of Forskolin-Induced Neurite Outgrowth and Protein Phosphorylation by a Newly Synthesized Selective Inhibitor of Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase, N-[2-(p-Bromocinnamylamino)Ethyl]-5-Isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D Pheochromocytoma Cells. *J Biol Chem* 265:5267-5272.
- Christensen AE, Selheim F, de Rooij J, Dremier S, Schwede F, Dao KK, Martinez A, Maenhaut C, Bos JL, Genieser HG and Doskeland SO (2003) cAMP Analog Mapping of Epac1 and cAMP Kinase. Discriminating Analogs Demonstrate That Epac and cAMP Kinase Act Synergistically to Promote PC-12 Cell Neurite Extension. *J Biol Chem* 278:35394-35402.
- Clapham DE and Neer EJ (1997) G Protein Beta Gamma Subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:167-203.
- Clark JG, Kostal KM and Marino BA (1983) Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Hamsters. An Alveolar Macrophage Product Increases Fibroblast Prostaglandin E2 and Cyclic Adenosine Monophosphate and Suppresses Fibroblast Proliferation and Collagen Production. *J Clin Invest* 72:2082-2091.
- Coker RK, Laurent GJ, Shahzeidi S, Lympny PA, du Bois RM, Jeffery PK and McAnulty RJ (1997) Transforming Growth Factors-Beta 1, -Beta 2, and -Beta 3 Stimulate Fibroblast Procollagen Production in Vitro but Are Differentially Expressed During Bleomycin-Induced Lung Fibrosis. *Am J Pathol* 150:981-991.
- Cook AK, Carty M, Singer CA, Yamboliev IA and Gerthoffer WT (2000) Coupling of M(2) Muscarinic Receptors to ERK MAP Kinases and Caldesmon Phosphorylation in Colonic Smooth Muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278:G429-G437.
- Cook SJ and McCormick F (1993) Inhibition by cAMP of Ras-Dependent Activation of Raf. *Science* 262:1069-1072.
- Cooper DM (2003) Regulation and Organization of Adenylyl Cyclases and cAMP. *Biochem J* 375:517-529.
- Corraliza IM, Soler G, Eichmann K and Modolell M (1995) Arginase Induction by Suppressors of Nitric Oxide Synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in Murine Bone-Marrow-Derived Macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 206:667-673.
- Corrin B, Butcher D, McAnulty BJ, Dubois RM, Black CM, Laurent GJ and Harrison NK (1994) Immunohistochemical Localization of Transforming Growth Factor-Beta 1 in the Lungs of Patients With Systemic Sclerosis, Cryptogenic Fibrosing Alveolitis and Other Lung Disorders. *Histopathology* 24:145-150.
- Cospedal R, Lobo M and Zachary I (1999) Differential Regulation of Extracellular Signal-Regulated Protein Kinases (ERKs) 1 and 2 by cAMP and Dissociation of ERK Inhibition From Anti-Mitogenic Effects in Rabbit Vascular Smooth Muscle Cells. *Biochem J* 342 (Pt 2):407-414.
- Custot J, Moali C, Brollo M, Boucher JL, Delaforge M, Mansuy D, Tenu JP and Zimmermann JL (1997) A New α -Amino Acid N^o-Hydroxy-nor-L-Arginine: a High-Affinity Inhibitor of Arginase Well Adapted To Bind to Its Manganese Cluster. *J Am Chem Soc* 119:4086-4087.
- D'hoedt D and Bertrand D (2009) Nicotinic Acetylcholine Receptors: an Overview on Drug Discovery. *Expert Opin Ther Targets* 13:395-411.

- Dalton GD and Dewey WL (2006) Protein Kinase Inhibitor Peptide (PKI): a Family of Endogenous Neuropeptides That Modulate Neuronal cAMP-Dependent Protein Kinase Function. *Neuropeptides* 40:23-34.
- Davies SP, Reddy H, Caivano M and Cohen P (2000) Specificity and Mechanism of Action of Some Commonly Used Protein Kinase Inhibitors. *Biochem J* 351:95-105.
- de Rooij J, Rehmann H, van Triest M, Cool RH, Wittinghofer A and Bos JL (2000) Mechanism of Regulation of the Epac Family of cAMP-Dependent RapGEFs. *J Biol Chem* 275:20829-20836.
- de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A and Bos JL (1998) Epac Is a Rap1 Guanine-Nucleotide-Exchange Factor Directly Activated by Cyclic AMP. *Nature* 396:474-477.
- Deignan JL, Livesay JC, Shantz LM, Pegg AE, O'Brien WE, Iyer RK, Cederbaum SD and Grody WW (2007) Polyamine Homeostasis in Arginase Knockout Mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 293:C1296-C1301.
- Descalzi D, Folli C, Nicolini G, Riccio AM, Gamalero C, Scordamaglia F and Canonica GW (2008) Anti-Proliferative and Anti-Remodelling Effect of Beclomethasone Dipropionate, Formoterol and Salbutamol Alone or in Combination in Primary Human Bronchial Fibroblasts. *Allergy* 63:432-437.
- Desmouliere A, Redard M, Darby I and Gabbiani G (1995) Apoptosis Mediates the Decrease in Cellularity During the Transition Between Granulation Tissue and Scar. *Am J Pathol* 146:56-66.
- Di Stefano A, Capelli A, Lusuardi M, Balbo P, Vecchio C, Maestrelli P, Mapp CE, Fabbri LM, Donner CF and Saetta M (1998) Severity of Airflow Limitation Is Associated With Severity of Airway Inflammation in Smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 158:1277-1285.
- Disse B (2001) Antimuscarinic Treatment for Lung Diseases From Research to Clinical Practice. *Life Sci* 68:2557-2564.
- Disse B, Speck GA, Rominger KL, Witek TJ, Jr. and Hammer R (1999) Tiotropium (Spiriva): Mechanistical Considerations and Clinical Profile in Obstructive Lung Disease. *Life Sci* 64:457-464.
- Dodge-Kafka KL, Soughayer J, Pare GC, Carlisle Michel JJ, Langeberg LK, Kapiloff MS and Scott JD (2005) The Protein Kinase A Anchoring Protein MAKAP Coordinates Two Integrated cAMP Effector Pathways. *Nature* 437:574-578.
- Doucet C, Brouty-Boye D, Pottin-Clemenceau C, Canonica GW, Jasmin C and Azzarone B (1998) Interleukin (IL) 4 and IL-13 Act on Human Lung Fibroblasts. Implication in Asthma. *J Clin Invest* 101:2129-2139.
- Dremier S, Kopperud R, Doskeland SO, Dumont JE and Maenhaut C (2003) Search for New Cyclic AMP-Binding Proteins. *FEBS Lett* 546:103-107.
- Dumaz N and Marais R (2005) Integrating Signals Between cAMP and the RAS/RAF/MEK/ERK Signalling Pathways. Based on the Anniversary Prize of the Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie Lecture Delivered on 5 July 2003 at the Special FEBS Meeting in Brussels. *FEBS J* 272:3491-3504.

- Durante W, Liao L, Reyna SV, Peyton KJ and Schafer AI (2000) Physiological Cyclic Stretch Directs L-Arginine Transport and Metabolism to Collagen Synthesis in Vascular Smooth Muscle. *FASEB J* 14:1775-1783.
- Durante W, Liao L, Reyna SV, Peyton KJ and Schafer AI (2001) Transforming Growth Factor-Beta(1) Stimulates L-Arginine Transport and Metabolism in Vascular Smooth Muscle Cells: Role in Polyamine and Collagen Synthesis. *Circulation* 103:1121-1127.
- Eickelberg O, Kohler E, Reichenberger F, Bertschin S, Woodtli T, Erne P, Perruchoud AP and Roth M (1999) Extracellular Matrix Deposition by Primary Human Lung Fibroblasts in Response to TGF-Beta1 and TGF-Beta3. *Am J Physiol* 276:L814-L824.
- Emura M, Nagai S, Takeuchi M, Kitaichi M and Izumi T (1990) In Vitro Production of B Cell Growth Factor and B Cell Differentiation Factor by Peripheral Blood Mononuclear Cells and Bronchoalveolar Lavage T Lymphocytes From Patients With Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Clin Exp Immunol* 82:133-139.
- Endo M, Oyadomari S, Terasaki Y, Takeya M, Suga M, Mori M and Gotoh T (2003) Induction of Arginase I and II in Bleomycin-Induced Fibrosis of Mouse Lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285:L313-L321.
- Enserink JM, Christensen AE, de Rooij J, van Triest M, Schwede F, Genieser HG, Doskeland SO, Blank JL and Bos JL (2002) A Novel Epac-Specific cAMP Analogue Demonstrates Independent Regulation of Rap1 and ERK. *Nat Cell Biol* 4:901-906.
- Fajardo I, Svensson L, Bucht A and Pejler G (2004) Increased Levels of Hypoxia-Sensitive Proteins in Allergic Airway Inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 170:477-484.
- Fernandes DJ, Bonacci JV and Stewart AG (2006) Extracellular Matrix, Integrins, and Mesenchymal Cell Function in the Airways. *Curr Drug Targets* 7:567-577.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE and Mello CC (1998) Potent and Specific Genetic Interference by Double-Stranded RNA in *Caenorhabditis Elegans*. *Nature* 391:806-811.
- Fries KM, Blieden T, Looney RJ, Sempowski GD, Silvera MR, Willis RA and Phipps RP (1994) Evidence of Fibroblast Heterogeneity and the Role of Fibroblast Subpopulations in Fibrosis. *Clin Immunol Immunopathol* 72:283-292.
- Gauvreau GM, Watson RM and O'Byrne PM (1999) Protective Effects of Inhaled PGE2 on Allergen-Induced Airway Responses and Airway Inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 159:31-36.
- Gazit A, App H, McMahon G, Chen J, Levitzki A and Bohmer FD (1996) Tyrphostins. 5. Potent Inhibitors of Platelet-Derived Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase: Structure-Activity Relationships in Quinoxalines, Quinolines, and Indole Tyrphostins. *J Med Chem* 39:2170-2177.
- Gebel S, Gerstmayer B, Kuhl P, Borlak J, Meurrens K and Müller T (2006) The Kinetics of Transcriptomic Changes Induced by Cigarette Smoke in Rat Lungs Reveals a Specific Program of Defense, Inflammation, and Circadian Clock Gene Expression. *Toxicol Sci* 93:422-431.
- Giri SN (2003) Novel Pharmacological Approaches to Manage Interstitial Lung Fibrosis in the Twenty-First Century. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43:73-95.

- Gjertsen BT, Mellgren G, Otten A, Maronde E, Genieser HG, Jastorff B, Vintermyr OK, McKnight GS and Doskeland SO (1995) Novel (Rp)-cAMPS Analogs As Tools for Inhibition of cAMP-Kinase in Cell Culture. Basal cAMP-Kinase Activity Modulates Interleukin-1 Beta Action. *J Biol Chem* 270:20599-20607.
- Glass DB, Feller MJ, Levin LR and Walsh DA (1992) Structural Basis for the Low Affinities of Yeast cAMP-Dependent and Mammalian cGMP-Dependent Protein Kinases for Protein Kinase Inhibitor Peptides. *Biochemistry* 31:1728-1734.
- Gomperts BN and Strieter RM (2007) Fibrocytes in Lung Disease. *J Leukoc Biol* 82:449-456.
- Gosens R, Bos IS, Zaagsma J and Meurs H (2005) Protective Effects of Tiotropium Bromide in the Progression of Airway Smooth Muscle Remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 171:1096-1102.
- Gosens R, Nelemans SA, Grootte Bromhaar MM, McKay S, Zaagsma J and Meurs H (2003) Muscarinic M3-Receptors Mediate Cholinergic Synergism of Mitogenesis in Airway Smooth Muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28:257-262.
- Gosens R, Zaagsma J, Meurs H and Halayko AJ (2006) Muscarinic Receptor Signaling in the Pathophysiology of Asthma and COPD. *Respir Res* 7:73.
- Gotti C and Clementi F (2004) Neuronal Nicotinic Receptors: From Structure to Pathology. *Prog Neurobiol* 74:363-396.
- Goulding EH, Ngai J, Kramer RH, Colicos S, Axel R, Siegelbaum SA and Chess A (1992) Molecular Cloning and Single-Channel Properties of the Cyclic Nucleotide-Gated Channel From Catfish Olfactory Neurons. *Neuron* 8:45-58.
- Goulet S, Bihl MP, Gambazzi F, Tamm M and Roth M (2007) Opposite Effect of Corticosteroids and Long-Acting Beta(2)-Agonists on Serum- and TGF-Beta(1)-Induced Extracellular Matrix Deposition by Primary Human Lung Fibroblasts. *J Cell Physiol* 210:167-176.
- Grasemann H, Schwiertz R, Matthiesen S, Rackè K and Ratjen F (2005) Increased Arginase Activity in Cystic Fibrosis Airways. *Am J Respir Crit Care Med* 172:1523-1528.
- Gudermann T, Kalkbrenner F and Schultz G (1996) Diversity and Selectivity of Receptor-G Protein Interaction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36:429-459.
- Gupta M and Yarwood SJ (2005) MAP1A Light Chain 2 Interacts With Exchange Protein Activated by Cyclic AMP 1 (EPAC1) to Enhance Rap1 GTPase Activity and Cell Adhesion. *J Biol Chem* 280:8109-8116.
- Haddad EB, Mak JC, Belvisi MG, Nishikawa M, Rousell J and Barnes PJ (1996) Muscarinic and Beta-Adrenergic Receptor Expression in Peripheral Lung From Normal and Asthmatic Patients. *Am J Physiol* 270:L947-L953.
- Hartert TV, Dworski RT, Mellen BG, Oates JA, Murray JJ and Sheller JR (2000) Prostaglandin E(2) Decreases Allergen-Stimulated Release of Prostaglandin D(2) in Airways of Subjects With Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 162:637-640.
- Hedges JC, Oxhorn BC, Carty M, Adam LP, Yamboliev IA and Gerthoffer WT (2000) Phosphorylation of Caldesmon by ERK MAP Kinases in Smooth Muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 278:C718-C726.

- Heldin CH, Backstrom G, Ostman A, Hammacher A, Ronnstrand L, Rubin K, Nister M and Westermark B (1988) Binding of Different Dimeric Forms of PDGF to Human Fibroblasts: Evidence for Two Separate Receptor Types. *EMBO J* 7:1387-1393.
- Heldin CH and Westermark B (1990) Platelet-Derived Growth Factor: Mechanism of Action and Possible in Vivo Function. *Cell Regul* 1:555-566.
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS and Griffith R (1992) Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences. *Biotechnology (N Y)* 10:413-417.
- Hill AT, Bayley D and Stockley RA (1999) The Interrelationship of Sputum Inflammatory Markers in Patients With Chronic Bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 160:893-898.
- Hinz B (2007) Formation and Function of the Myofibroblast During Tissue Repair. *J Invest Dermatol* 127:526-537.
- Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G and Chaponnier C (2001) Alpha-Smooth Muscle Actin Expression Upregulates Fibroblast Contractile Activity. *Mol Biol Cell* 12:2730-2741.
- Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML and Gabbiani G (2007) The Myofibroblast: One Function, Multiple Origins. *Am J Pathol* 170:1807-1816.
- Holland PM, Abramson RD, Watson R and Gelfand DH (1991) Detection of Specific Polymerase Chain Reaction Product by Utilizing the 5'-3' Exonuclease Activity of *Thermus Aquaticus* DNA Polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7276-7280.
- Hölttä E and Pohjanpelto P (1982) Polyamine Dependence of Chinese Hamster Ovary Cells in Serum-Free Culture Is Due to Deficient Arginase Activity. *Biochim Biophys Acta* 721:321-327.
- Holz GG, Chepurny OG and Schwede F (2008) Epac-Selective cAMP Analogs: New Tools With Which to Evaluate the Signal Transduction Properties of cAMP-Regulated Guanine Nucleotide Exchange Factors. *Cell Signal* 20:10-20.
- Holz GG, Kang G, Harbeck M, Roe MW and Chepurny OG (2006) Cell Physiology of cAMP Sensor Epac. *J Physiol* 577:5-15.
- Huang S, Wettlaufer SH, Hogaboam C, Aronoff DM and Peters-Golden M (2007) Prostaglandin E(2) Inhibits Collagen Expression and Proliferation in Patient-Derived Normal Lung Fibroblasts Via E Prostanoid 2 Receptor and cAMP Signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292:L405-L413.
- Huang SK, Wettlaufer SH, Chung J and Peters-Golden M (2008) Prostaglandin E2 Inhibits Specific Lung Fibroblast Functions Via Selective Actions of PKA and Epac-1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 39:482-489.
- Ignarro LJ, Buga GM, Wei LH, Bauer PM, Wu G and del Soldato P (2001) Role of the Arginine-Nitric Oxide Pathway in the Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:4202-4208.
- Iyer RK, Bando JM, Jenkinson CP, Vockley JG, Kim PS, Kern RM, Cederbaum SD and Grody WW (1998) Cloning and Characterization of the Mouse and Rat Type II Arginase Genes. *Mol Genet Metab* 63:168-175.

- Iyer RK, Yoo PK, Kern RM, Rozengurt N, Tsoa R, O'Brien WE, Yu H, Grody WW and Cederbaum SD (2002) Mouse Model for Human Arginase Deficiency. *Mol Cell Biol* 22:4491-4498.
- Jeffery PK (2001) Remodeling in Asthma and Chronic Obstructive Lung Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 164:S28-S38.
- Jenkinson CP, Grody WW and Cederbaum SD (1996) Comparative Properties of Arginases. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 114:107-132.
- Jimenez E and Montiel M (2005) Activation of MAP Kinase by Muscarinic Cholinergic Receptors Induces Cell Proliferation and Protein Synthesis in Human Breast Cancer Cells. *J Cell Physiol* 204:678-686.
- Johnson PR and Burgess JK (2004) Airway Smooth Muscle and Fibroblasts in the Pathogenesis of Asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 4:102-108.
- Kadler KE, Baldock C, Bella J and Boot-Handford RP (2007) Collagens at a Glance. *J Cell Sci* 120:1955-1958.
- Kalamida D, Poulas K, Avramopoulou V, Fostieri E, Lagoumintzis G, Lazaridis K, Sideri A, Zouridakis M and Tzartos SJ (2007) Muscle and Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. Structure, Function and Pathogenicity. *FEBS J* 274:3799-3845.
- Kase H, Iwahashi K, Nakanishi S, Matsuda Y, Yamada K, Takahashi M, Murakata C, Sato A and Kaneko M (1987) K-252 Compounds, Novel and Potent Inhibitors of Protein Kinase C and Cyclic Nucleotide-Dependent Protein Kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 142:436-440.
- Kassel KM, Wyatt TA, Panettieri RA, Jr. and Toews ML (2008) Inhibition of Human Airway Smooth Muscle Cell Proliferation by Beta 2-Adrenergic Receptors and cAMP Is PKA Independent: Evidence for EPAC Involvement. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294:L131-L138.
- Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, Housman DE and Graybiel AM (1998) A Family of cAMP-Binding Proteins That Directly Activate Rap1. *Science* 282:2275-2279.
- Kawashima K and Fujii T (2000) Extraneuronal Cholinergic System in Lymphocytes. *Pharmacol Ther* 86:29-48.
- Keatings VM, Collins PD, Scott DM and Barnes PJ (1996) Differences in Interleukin-8 and Tumor Necrosis Factor-Alpha in Induced Sputum From Patients With Chronic Obstructive Pulmonary Disease or Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 153:530-534.
- Keerthisingam CB, Jenkins RG, Harrison NK, Hernandez-Rodriguez NA, Booth H, Laurent GJ, Hart SL, Foster ML and McAnulty RJ (2001) Cyclooxygenase-2 Deficiency Results in a Loss of the Anti-Proliferative Response to Transforming Growth Factor-Beta in Human Fibrotic Lung Fibroblasts and Promotes Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice. *Am J Pathol* 158:1411-1422.
- Kershenovich D, Fierro FJ and Rojkind M (1970) The Relationship Between the Free Pool of Proline and Collagen Content in Human Liver Cirrhosis. *J Clin Invest* 49:2246-2249.
- Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ, Robillard L, Galvez MG, Brumwell AN, Sheppard D and Chapman HA (2006) Alveolar Epithelial Cell Mesenchymal Transition Develops in Vivo

- During Pulmonary Fibrosis and Is Regulated by the Extracellular Matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:13180-13185.
- Kim NN, Cox JD, Baggio RF, Emig FA, Mistry SK, Harper SL, Speicher DW, Morris SM, Jr., Ash DE, Traish A and Christianson DW (2001) Probing Erectile Function: S-(2-Boronoethyl)-L-Cysteine Binds to Arginase As a Transition State Analogue and Enhances Smooth Muscle Relaxation in Human Penile Corpus Cavernosum. *Biochemistry* 40:2678-2688.
- Kitayama H, Sugimoto Y, Matsuzaki T, Ikawa Y and Noda M (1989) A Ras-Related Gene With Transformation Suppressor Activity. *Cell* 56:77-84.
- Kitowska K, Zakrzewicz D, Konigshoff M, Chrobak I, Grimminger F, Seeger W, Bulau P and Eickelberg O (2008) Functional Role and Species-Specific Contribution of Arginases in Pulmonary Fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294:L34-L45.
- Klapproth H, Reinheimer T, Metzen J, Münch M, Bittinger F, Kirkpatrick CJ, Hohle KD, Schemann M, Racké K and Wessler I (1997) Non-Neuronal Acetylcholine, a Signalling Molecule Synthesized by Surface Cells of Rat and Man. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 355:515-523.
- Klasen S, Hammermann R, Fuhrmann M, Lindemann D, Beck KF, Pfeilschifter J and Racké K (2001) Glucocorticoids Inhibit Lipopolysaccharide-Induced Up-Regulation of Arginase in Rat Alveolar Macrophages. *Br J Pharmacol* 132:1349-1357.
- Kohyama T, Ertl RF, Valenti V, Spurzem J, Kawamoto M, Nakamura Y, Veys T, Allegra L, Romberger D and Rennard SI (2001) Prostaglandin E(2) Inhibits Fibroblast Chemotaxis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281:L1257-L1263.
- Kolodsick JE, Peters-Golden M, Larios J, Toews GB, Thannickal VJ and Moore BB (2003) Prostaglandin E2 Inhibits Fibroblast to Myofibroblast Transition Via E. Prostanoid Receptor 2 Signaling and Cyclic Adenosine Monophosphate Elevation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 29:537-544.
- Kooistra MR, Corada M, Dejana E and Bos JL (2005) Epc1 Regulates Integrity of Endothelial Cell Junctions Through VE-Cadherin. *FEBS Lett* 579:4966-4972.
- Kopperud R, Krakstad C, Selheim F and Doskeland SO (2003) cAMP Effector Mechanisms. Novel Twists for an 'Old' Signaling System. *FEBS Lett* 546:121-126.
- Kotaru C, Schoonover KJ, Trudeau JB, Huynh ML, Zhou X, Hu H and Wenzel SE (2006) Regional Fibroblast Heterogeneity in the Lung: Implications for Remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 173:1208-1215.
- Krauss G (2003) *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*, 4. Edition, Wiley-VCH.
- Kurosawa M, Shimizu Y, Tsukagoshi H and Ueki M (1992) Elevated Levels of Peripheral-Blood, Naturally Occurring Aliphatic Polyamines in Bronchial Asthmatic Patients With Active Symptoms. *Allergy* 47:638-643.
- Kwon G, Pappan KL, Marshall CA, Schaffer JE and McDaniel ML (2004) cAMP Dose-Dependently Prevents Palmitate-Induced Apoptosis by Both Protein Kinase A- and cAMP-Guanine Nucleotide Exchange Factor-Dependent Pathways in Beta-Cells. *J Biol Chem* 279:8938-8945.
- Lambert RK, Codd SL, Alley MR and Pack RJ (1994) Physical Determinants of Bronchial Mucosal Folding. *J Appl Physiol* 77:1206-1216.

- Lamyel F, Racké K, Juergens UR and Warnken M (2009) Characterization of expression and functional role of beta₂ adrenoceptors in human lung fibroblasts. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology* 379 [Suppl.1], 16.
- Lanzafame AA, Christopoulos A and Mitchelson F (2003) Cellular Signaling Mechanisms for Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Receptors Channels* 9:241-260.
- Larsen GL, Fame TM, Renz H, Loader JE, Graves J, Hill M and Gelfand EW (1994) Increased Acetylcholine Release in Tracheas From Allergen-Exposed IgE-Immune Mice. *Am J Physiol* 266:L263-L270.
- Laurent GJ, Chambers RC, Hill MR and McAnulty RJ (2007) Regulation of Matrix Turnover: Fibroblasts, Forces, Factors and Fibrosis. *Biochem Soc Trans* 35:647-651.
- Laxman S, Riechers A, Sadilek M, Schwede F and Beavo JA (2006) Hydrolysis Products of cAMP Analogs Cause Transformation of *Trypanosoma Brucei* From Slender to Stumpy-Like Forms. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:19194-19199.
- Lehninger AL, Nelson DL and Cox MM (2001) *Lehninger Biochemie*, 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- Li H, Meininger CJ, Kelly KA, Hawker JR, Jr., Morris SM, Jr. and Wu G (2002) Activities of Arginase I and II Are Limiting for Endothelial Cell Proliferation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282:R64-R69.
- Li Y, Asuri S, Rebhun JF, Castro AF, Parnavitana NC and Quilliam LA (2006) The RAP1 Guanine Nucleotide Exchange Factor Epac2 Couples Cyclic AMP and Ras Signals at the Plasma Membrane. *J Biol Chem* 281:2506-2514.
- Lindemann D and Racké K (2003) Glucocorticoid Inhibition of Interleukin-4 (IL-4) and Interleukin-13 (IL-13) Induced Up-Regulation of Arginase in Rat Airway Fibroblasts. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 368:546-550.
- Liu X, Ostrom RS and Insel PA (2004) cAMP-Elevating Agents and Adenylyl Cyclase Overexpression Promote an Antifibrotic Phenotype in Pulmonary Fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 286:C1089-C1099.
- Liu X, Sun SQ, Hassid A and Ostrom RS (2006) cAMP Inhibits Transforming Growth Factor-Beta-Stimulated Collagen Synthesis Via Inhibition of Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 and Smad Signaling in Cardiac Fibroblasts. *Mol Pharmacol* 70:1992-2003.
- Lopez De Jesus M, Stope MB, Oude Weernink PA, Mahlke Y, Borgermann C, Ananaba VN, Rimmbach C, Roskopf D, Michel MC, Jakobs KH and Schmidt M (2006) Cyclic AMP-Dependent and Epac-Mediated Activation of R-Ras by G Protein-Coupled Receptors Leads to Phospholipase D Stimulation. *J Biol Chem* 281:21837-21847.
- Lotfi S, Li Z, Sun J, Zuo Y, Lam PP, Kang Y, Rahimi M, Islam D, Wang P, Gaisano HY and Jin T (2006) Role of the Exchange Protein Directly Activated by Cyclic Adenosine 5'-Monophosphate (Epac) Pathway in Regulating Proglucagon Gene Expression in Intestinal Endocrine L Cells. *Endocrinology* 147:3727-3736.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951) Protein Measurement With the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.

- Maarsingh H, Zuidhof AB, Bos IS, van DM, Boucher JL, Zaagsma J and Meurs H (2008) Arginase Inhibition Protects Against Allergen-Induced Airway Obstruction, Hyperresponsiveness, and Inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 178:565-573.
- Mak JC, Baraniuk JN and Barnes PJ (1992) Localization of Muscarinic Receptor Subtype MRNAs in Human Lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7:344-348.
- Martinet Y, Rom WN, Grotendorst GR, Martin GR and Crystal RG (1987) Exaggerated Spontaneous Release of Platelet-Derived Growth Factor by Alveolar Macrophages From Patients With Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *N Engl J Med* 317:202-209.
- Martini CN, Plaza MV and Vila MD (2009) PKA-Dependent and Independent cAMP Signaling in 3T3-L1 Fibroblasts Differentiation. *Mol Cell Endocrinol* 298:42-7.
- Matthiesen S, Bahulayan A, Holz O and Racké K (2007) MAPK Pathway Mediates Muscarinic Receptor-Induced Human Lung Fibroblast Proliferation. *Life Sci* 80:2259-2262.
- Matthiesen S, Bahulayan A, Kempkens S, Haag S, Fuhrmann M, Stichnote C, Juergens UR and Racké K (2006) Muscarinic Receptors Mediate Stimulation of Human Lung Fibroblast Proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35:621-627.
- Maurice DH, Palmer D, Tilley DG, Dunkerley HA, Netherton SJ, Raymond DR, Elbatarny HS and Jimmo SL (2003) Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase Activity, Expression, and Targeting in Cells of the Cardiovascular System. *Mol Pharmacol* 64:533-546.
- Mayr B and Montminy M (2001) Transcriptional Regulation by the Phosphorylation-Dependent Factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:599-609.
- McAnulty RJ, Staple LH, Guerreiro D and Laurent GJ (1988) Extensive Changes in Collagen Synthesis and Degradation During Compensatory Lung Growth. *Am J Physiol* 255:C754-C759.
- Meurs H, Maarsingh H and Zaagsma J (2003) Arginase and Asthma: Novel Insights into Nitric Oxide Homeostasis and Airway Hyperresponsiveness. *Trends Pharmacol Sci* 24:450-455.
- Meurs H, McKay S, Maarsingh H, Hamer MA, Macic L, Molendijk N and Zaagsma J (2002) Increased Arginase Activity Underlies Allergen-Induced Deficiency of cNOS-Derived Nitric Oxide and Airway Hyperresponsiveness. *Br J Pharmacol* 136:391-398.
- Milanese M, Crimi E, Scordamaglia A, Riccio A, Pellegrino R, Canonica GW and Brusasco V (2001) On the Functional Consequences of Bronchial Basement Membrane Thickening. *J Appl Physiol* 91:1035-1040.
- Mora AL, Torres-Gonzalez E, Rojas M, Corredor C, Ritzenthaler J, Xu J, Roman J, Brigham K and Stecenko A (2006) Activation of Alveolar Macrophages Via the Alternative Pathway in Herpesvirus-Induced Lung Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35:466-473.
- Morris CR, Poljakovic M, Lavrisha L, Machado L, Kuypers FA and Morris SM, Jr. (2004) Decreased Arginine Bioavailability and Increased Serum Arginase Activity in Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 170:148-153.
- Morris SM, Jr., Bhamidipati D and Kepka-Lenhart D (1997) Human Type II Arginase: Sequence Analysis and Tissue-Specific Expression. *Gene* 193:157-161.
- Mullis KB and Faloona FA (1987) Specific Synthesis of DNA in Vitro Via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. *Methods Enzymol* 155:335-350.

- Murray AJ (2008) Pharmacological PKA Inhibition: All May Not Be What It Seems. *Sci Signal* 1(22):re4.
- Myklebust JH, Josefsen D, Blomhoff HK, Levy FO, Naderi S, Reed JC and Smeland EB (1999) Activation of the cAMP Signaling Pathway Increases Apoptosis in Human B-Precursor Cells and Is Associated With Downregulation of Mcl-1 Expression. *J Cell Physiol* 180:71-80.
- Naderi S, Gutzkow KB, Christoffersen J, Smeland EB and Blomhoff HK (2000) cAMP-Mediated Growth Inhibition of Lymphoid Cells in G1: Rapid Down-Regulation of Cyclin D3 at the Level of Translation. *Eur J Immunol* 30:1757-1768.
- Naderi S, Wang JY, Chen TT, Gutzkow KB and Blomhoff HK (2005) cAMP-Mediated Inhibition of DNA Replication and S Phase Progression: Involvement of Rb, P21Cip1, and PCNA. *Mol Biol Cell* 16:1527-1542.
- Naito K, Skog S, Tribukait B, Andersson L and Hisazumi H (1987) Cell Cycle Related [³H]Thymidine Uptake and Its Significance for the Incorporation into DNA. *Cell Tissue Kinet* 20:447-457.
- Narumiya S, Sugimoto Y and Ushikubi F (1999) Prostanoid Receptors: Structures, Properties, and Functions. *Physiol Rev* 79:1193-1226.
- Nelin LD, Chicoine LG, Reber KM, English BK, Young TL and Liu Y (2005) Cytokine-Induced Endothelial Arginase Expression Is Dependent on Epidermal Growth Factor Receptor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33:394-401.
- Niewoehner DE, Rice K, Cote C, Paulson D, Cooper JA, Jr., Korducki L, Cassino C and Kesten S (2005) Prevention of Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease With Tiotropium, a Once-Daily Inhaled Anticholinergic Bronchodilator: a Randomized Trial. *Ann Intern Med* 143:317-326.
- Ogreid D, Doskeland SO and Miller JP (1983) Evidence That Cyclic Nucleotides Activating Rabbit Muscle Protein Kinase I Interact With Both Types of cAMP Binding Sites Associated With the Enzyme. *J Biol Chem* 258:1041-1049.
- Olsen MK, Reszka AA and Abraham I (1998) KT5720 and U-98017 Inhibit MAPK and Alter the Cytoskeleton and Cell Morphology. *J Cell Physiol* 176:525-536.
- Ottani V, Martini D, Franchi M, Ruggeri A and Raspanti M (2002) Hierarchical Structures in Fibrillar Collagens. *Micron* 33:587-596.
- Ozaki N, Shibasaki T, Kashima Y, Miki T, Takahashi K, Ueno H, Sunaga Y, Yano H, Matsuura Y, Iwanaga T, Takai Y and Seino S (2000) cAMP-GEFII Is a Direct Target of cAMP in Regulated Exocytosis. *Nat Cell Biol* 2:805-811.
- Page-McCaw A, Ewald AJ and Werb Z (2007) Matrix Metalloproteinases and the Regulation of Tissue Remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:221-233.
- Pepe C, Foley S, Shannon J, Lemiere C, Olivenstein R, Ernst P, Ludwig MS, Martin JG and Hamid Q (2005) Differences in Airway Remodeling Between Subjects With Severe and Moderate Asthma. *J Allergy Clin Immunol* 116:544-549.
- Pesci A, Balbi B, Majori M, Cacciani G, Bertacco S, Alciato P and Donner CF (1998) Inflammatory Cells and Mediators in Bronchial Lavage of Patients With Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Eur Respir J* 12:380-386.

- Peterkofsky B and Diegelmann R (1971) Use of a Mixture of Proteinase-Free Collagenases for the Specific Assay of Radioactive Collagen in the Presence of Other Proteins. *Biochemistry* 10:988-994.
- Peters-Golden M (2003) When Defenses Against Fibroproliferation Fail: Spotlight on an Axis of Prophylaxis. *Am J Respir Crit Care Med* 168:1141-1142.
- Pfaffl MW (2001) A New Mathematical Model for Relative Quantification in Real-Time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45.
- Phan SH (2008) Biology of Fibroblasts and Myofibroblasts. *Proc Am Thorac Soc* 5:334-337.
- Pieper MP, Chaudhary NI and Park JE (2007) Acetylcholine-Induced Proliferation of Fibroblasts and Myofibroblasts in Vitro Is Inhibited by Tiotropium Bromide. *Life Sci* 80:2270-2273.
- Pohjanpelto P (1976) Putrescine Transport Is Greatly Increased in Human Fibroblasts Initiated to Proliferate. *J Cell Biol* 68:512-520.
- Price LS, Hajdo-Milasinovic A, Zhao J, Zwartkruis FJ, Collard JG and Bos JL (2004) Rap1 Regulates E-Cadherin-Mediated Cell-Cell Adhesion. *J Biol Chem* 279:35127-35132.
- Prockop DJ and Kivirikko KI (1995) Collagens: Molecular Biology, Diseases, and Potentials for Therapy. *Annu Rev Biochem* 64:403-434.
- Profita M, Bonanno A, Siena L, Bruno A, Ferraro M, Montalbano AM, Albano GD, Riccobono L, Casarosa P, Pieper MP and Gjomarkaj M (2009) Smoke, Choline-Acetyl-Transferase, Muscarinic Receptors and Fibroblast Proliferation in COPD. *J Pharmacol Exp Ther* 329(2):753-63.
- Profita M, Giorgi R D, Sala A, Bonanno A, Riccobono L, Mirabella F, Gjomarkaj M, Bonsignore G, Bousquet J and Vignola AM (2005) Muscarinic Receptors, Leukotriene B4 Production and Neutrophilic Inflammation in COPD Patients. *Allergy* 60:1361-1369.
- Qiao J, Mei FC, Popov VL, Vergara LA and Cheng X (2002) Cell Cycle-Dependent Subcellular Localization of Exchange Factor Directly Activated by cAMP. *J Biol Chem* 277:26581-26586.
- Que LG, Kantrow SP, Jenkinson CP, Piantadosi CA and Huang YC (1998) Induction of Arginase Isoforms in the Lung During Hyperoxia. *Am J Physiol* 275:L96-102.
- Raaijmakers JA, Terpstra GK, Van Rozen AJ, Witter A and Kreukniet J (1984) Muscarinic Cholinergic Receptors in Peripheral Lung Tissue of Normal Subjects and of Patients With Chronic Obstructive Lung Disease. *Clin Sci (Lond)* 66:585-590.
- Racké K, Juergens UR and Matthiesen S (2006) Control by Cholinergic Mechanisms. *Eur J Pharmacol* 533:57-68.
- Racké K and Matthiesen S (2004) The Airway Cholinergic System: Physiology and Pharmacology. *Pulm Pharmacol Ther* 17:181-198.
- Rangarajan S, Enserink JM, Kuiperij HB, de Rooij J, Price LS, Schwede F and Bos JL (2003) Cyclic AMP Induces Integrin-Mediated Cell Adhesion Through Epac and Rap1 Upon Stimulation of the Beta 2-Adrenergic Receptor. *J Cell Biol* 160:487-493.
- Regan JW, Bailey TJ, Pepperl DJ, Pierce KL, Bogardus AM, Donello JE, Fairbairn CE, Kedzie KM, Woodward DF and Gil DW (1994) Cloning of a Novel Human Prostaglandin

- Receptor With Characteristics of the Pharmacologically Defined EP2 Subtype. *Mol Pharmacol* 46:213-220.
- Rehmann H, Das J, Knipscheer P, Wittinghofer A and Bos JL (2006) Structure of the Cyclic-AMP-Responsive Exchange Factor Epac2 in Its Auto-Inhibited State. *Nature* 439:625-628.
- Rehmann H, Schwede F, Doskeland S O, Wittinghofer A and Bos JL (2003) Ligand-Mediated Activation of the cAMP-Responsive Guanine Nucleotide Exchange Factor Epac. *J Biol Chem* 278:38548-38556.
- Rennard SI, Serby CW, Ghafouri M, Johnson PA and Friedman M (1996) Extended Therapy With Ipratropium Is Associated With Improved Lung Function in Patients With COPD. A Retrospective Analysis of Data From Seven Clinical Trials. *Chest* 110:62-70.
- Ricciardolo FL, Zaagsma J and Meurs H (2005) The Therapeutic Potential of Drugs Targeting the Arginase Pathway in Asthma. *Expert Opin Investig Drugs* 14:1221-1231.
- Ringdahl B and Jenden DJ (1983) Pharmacological Properties of Oxotremorine and Its Analogs. *Life Sci* 32:2401-2413.
- Roffel AF, in't Hout WG, de Zeeuw RA and Zaagsma J (1987) The M2 Selective Antagonist AF-DX 116 Shows High Affinity for Muscarine Receptors in Bovine Tracheal Membranes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 335:593-595.
- Roscioni SS, Elzinga CR and Schmidt M (2008) Epac: Effectors and Biological Functions. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 377:345-357.
- Saltzman LE, Moss J, Berg RA, Hom B and Crystal RG (1982) Modulation of Collagen Production by Fibroblasts. Effects of Chronic Exposure to Agonists That Increase Intracellular Cyclic AMP. *Biochem J* 204:25-30.
- Santing RE, Pasma Y, Olymulder CG, Roffel AF, Meurs H and Zaagsma J (1995) Contribution of a Cholinergic Reflex Mechanism to Allergen-Induced Bronchial Hyperreactivity in Permanently Instrumented, Unrestrained Guinea-Pigs. *Br J Pharmacol* 114:414-418.
- Sato E, Koyama S, Okubo Y, Kubo K and Sekiguchi M (1998) Acetylcholine Stimulates Alveolar Macrophages to Release Inflammatory Cell Chemotactic Activity. *Am J Physiol* 274:L970-L979.
- Schmidt M, Evellin S, Weernink PA, von DF, Rehmann H, Lomasney JW and Jakobs KH (2001) A New Phospholipase-C-Calcium Signalling Pathway Mediated by Cyclic AMP and a Rap GTPase. *Nat Cell Biol* 3:1020-1024.
- Schmitt JM and Stork PJ (2001) Cyclic AMP-Mediated Inhibition of Cell Growth Requires the Small G Protein Rap1. *Mol Cell Biol* 21:3671-3683.
- Seino S and Shibasaki T (2005) PKA-Dependent and PKA-Independent Pathways for cAMP-Regulated Exocytosis. *Physiol Rev* 85:1303-1342.
- Sekhon HS, Keller JA, Proskocil BJ, Martin EL and Spindel ER (2002) Maternal Nicotine Exposure Upregulates Collagen Gene Expression in Fetal Monkey Lung. Association With Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26:31-41.
- Sheller JR, Mitchell D, Meyrick B, Oates J and Breyer R (2000) EP(2) Receptor Mediates Bronchodilation by PGE(2) in Mice. *J Appl Physiol* 88:2214-2218.

- Shen TF and Strecker HJ (1975) Synthesis of Proline and Hydroxyproline in Human Lung (WI-38) Fibroblasts. *Biochem J* 150:453-461.
- Shi GX, Rehmann H and Andres DA (2006) A Novel Cyclic AMP-Dependent Epac-Rit Signaling Pathway Contributes to PACAP38-Mediated Neuronal Differentiation. *Mol Cell Biol* 26:9136-9147.
- Shi O, Morris SM, Jr., Zoghbi H, Porter CW and O'Brien WE (2001) Generation of a Mouse Model for Arginase II Deficiency by Targeted Disruption of the Arginase II Gene. *Mol Cell Biol* 21:811-813.
- Singh R, Pervin S, Karimi A, Cederbaum S and Chaudhuri G (2000) Arginase Activity in Human Breast Cancer Cell Lines: N(Omega)-Hydroxy-L-Arginine Selectively Inhibits Cell Proliferation and Induces Apoptosis in MDA-MB-468 Cells. *Cancer Res* 60:3305-3312.
- Skalhegg BS and Tasken K (2000) Specificity in the cAMP/PKA Signaling Pathway. Differential Expression, Regulation, and Subcellular Localization of Subunits of PKA. *Front Biosci* 5:D678-D693.
- Smith RJ and Phang JM (1979) The Importance of Ornithine As a Precursor for Proline in Mammalian Cells. *J Cell Physiol* 98:475-481.
- Stone R, Barnes PJ and Fuller RW (1992) Contrasting Effects of Prostaglandins E2 and F2 Alpha on Sensitivity of the Human Cough Reflex. *J Appl Physiol* 73:649-653.
- Stork PJ and Schmitt JM (2002) Crosstalk Between cAMP and MAP Kinase Signaling in the Regulation of Cell Proliferation. *Trends Cell Biol* 12:258-266.
- Sugimoto Y and Narumiya S (2007) Prostaglandin E Receptors. *J Biol Chem* 282:11613-11617.
- Sutherland EW and Rall TW (1958) Fractionation and Characterization of a Cyclic Adenine Ribonucleotide Formed by Tissue Particles. *J Biol Chem* 232:1077-1091.
- Swaney JS, Roth DM, Olson ER, Naugle JE, Meszaros JG and Insel PA (2005) Inhibition of Cardiac Myofibroblast Formation and Collagen Synthesis by Activation and Overexpression of Adenylyl Cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:437-442.
- Tabor CW and Tabor H (1984) Polyamines. *Annu Rev Biochem* 53:749-790.
- Tashkin D and Kesten S (2003) Long-Term Treatment Benefits With Tiotropium in COPD Patients With and Without Short-Term Bronchodilator Responses. *Chest* 123:1441-1449.
- Tashkin DP, Celli B, Senn S, Burkhart D, Kesten S, Menjoge S and Decramer M (2008) A 4-Year Trial of Tiotropium in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med* 359:1543-1554.
- Tasken K and Aandahl EM (2004) Localized Effects of cAMP Mediated by Distinct Routes of Protein Kinase A. *Physiol Rev* 84:137-167.
- ten Berge RE, Santing RE, Hamstra J, Roffel AF and Zaagsma J (1995) Dysfunction of Muscarinic M2 Receptors After the Early Allergic Reaction: Possible Contribution to Bronchial Hyperresponsiveness in Allergic Guinea-Pigs. *Br J Pharmacol* 114:881-887.
- Thomas T and Thomas TJ (2001) Polyamines in Cell Growth and Cell Death: Molecular Mechanisms and Therapeutic Applications. *Cell Mol Life Sci* 58:244-258.

- Thyberg J and Fredholm BB (1987) Induction of Ornithine Decarboxylase Activity and Putrescine Synthesis in Arterial Smooth Muscle Cells Stimulated With Platelet-Derived Growth Factor. *Exp Cell Res* 170:160-169.
- Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C and Brown RA (2002) Myofibroblasts and Mechano-Regulation of Connective Tissue Remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:349-363.
- Trackman PC (2005) Diverse Biological Functions of Extracellular Collagen Processing Enzymes. *J Cell Biochem* 96:927-937.
- Trevisan R, Yip J, Sarika L, Li LK and Viberti G (1997) Enhanced Collagen Synthesis in Cultured Skin Fibroblasts From Insulin-Dependent Diabetic Patients With Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 8:1133-1139.
- Van Riper DA, Absher MP and Lenox RH (1985) Muscarinic Receptors on Intact Human Fibroblasts. Absence of Receptor Activity in Adult Skin Cells. *J Clin Invest* 76:882-886.
- Vancheri C, Mastruzzo C, Sortino MA and Crimi N (2004) The Lung As a Privileged Site for the Beneficial Actions of PGE₂. *Trends Immunol* 25:40-46.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, van Roy N, De Paepe A and Speleman F (2002) Accurate Normalization of Real-Time Quantitative RT-PCR Data by Geometric Averaging of Multiple Internal Control Genes. *Genome Biol* 3(7):RESEARCH0034.
- Vincken W, van Noord JA, Greefhorst AP, Bantje TA, Kesten S, Korducki L and Cornelissen PJ (2002) Improved Health Outcomes in Patients With COPD During 1 Yr's Treatment With Tiotropium. *Eur Respir J* 19:209-216.
- Vogelmeier C, Buhl R, Criege CP, Gillissen A, Kardos P, Kohler D, Magnussen H, Morr H, Nowak D, Pfeiffer-Kascha D, Petro W, Rabe K, Schultz K, Sitter H, Teschler H, Welte T, Wettengel R and Worth H (2007) [Guidelines for the Diagnosis and Therapy of COPD Issued by Deutsche Atemwegsliga and Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin]. *Pneumologie* 61:e1-40.
- Walsh DA, Perkins JP and Krebs EG (1968) An Adenosine 3',5'-Monophosphate-Dependant Protein Kinase From Rabbit Skeletal Muscle. *J Biol Chem* 243:3763-3765.
- Warnken M, Haag S, Matthiesen S and Racké K (2007) Arginase isoenzymes show differential expression and function in human and rat pulmonary fibroblasts. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 375 [Suppl. 1], 67.
- Wei LH, Jacobs AT, Morris SM, Jr. and Ignarro LJ (2000) IL-4 and IL-13 Upregulate Arginase I Expression by cAMP and JAK/STAT6 Pathways in Vascular Smooth Muscle Cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 279:C248-C256.
- Wei LH, Wu G, Morris SM, Jr. and Ignarro LJ (2001) Elevated Arginase I Expression in Rat Aortic Smooth Muscle Cells Increases Cell Proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:9260-9264.
- Wess J, Blin N, Mutschler E and Blüml K (1995) Muscarinic Acetylcholine Receptors: Structural Basis of Ligand Binding and G Protein Coupling. *Life Sci* 56:915-922.
- Wessler I and Kirkpatrick CJ (2008) Acetylcholine Beyond Neurons: the Non-Neuronal Cholinergic System in Humans. *Br J Pharmacol* 154:1558-1571.

- Wessler I, Kirkpatrick CJ and Racké K (1998) Non-Neuronal Acetylcholine, a Locally Acting Molecule, Widely Distributed in Biological Systems: Expression and Function in Humans. *Pharmacol Ther* 77:59-79.
- Wessler I, Roth E, Deutsch C, Brockerhoff P, Bittinger F, Kirkpatrick CJ and Kilbinger H (2001) Release of Non-Neuronal Acetylcholine From the Isolated Human Placenta Is Mediated by Organic Cation Transporters. *Br J Pharmacol* 134:951-956.
- Wessler IK and Kirkpatrick CJ (2001) The Non-Neuronal Cholinergic System: an Emerging Drug Target in the Airways. *Pulm Pharmacol Ther* 14:423-434.
- White ES, Atrasz RG, Dickie EG, Aronoff DM, Stambolic V, Mak TW, Moore BB and Peters-Golden M (2005) Prostaglandin E(2) Inhibits Fibroblast Migration by E-Prostanoid 2 Receptor-Mediated Increase in PTEN Activity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 32:135-141.
- Wilborn J, Crofford LJ, Burdick MD, Kunkel SL, Strieter RM and Peters-Golden M (1995) Cultured Lung Fibroblasts Isolated From Patients With Idiopathic Pulmonary Fibrosis Have a Diminished Capacity to Synthesize Prostaglandin E2 and to Express Cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* 95:1861-1868.
- Wills-Karp M (1999) Immunologic Basis of Antigen-Induced Airway Hyperresponsiveness. *Annu Rev Immunol* 17:255-281.
- Wilson JW and Li X (1997) The Measurement of Reticular Basement Membrane and Submucosal Collagen in the Asthmatic Airway. *Clin Exp Allergy* 27:363-371.
- Winitz S, Russell M, Qian NX, Gardner A, Dwyer L and Johnson GL (1993) Involvement of Ras and Raf in the Gi-Coupled Acetylcholine Muscarinic M2 Receptor Activation of Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Kinase and MAP Kinase. *J Biol Chem* 268:19196-19199.
- Witte MB, Barbul A, Schick MA, Vogt N and Becker HD (2002) Upregulation of Arginase Expression in Wound-Derived Fibroblasts. *J Surg Res* 105:35-42.
- Wong W and Scott JD (2004) AKAP Signalling Complexes: Focal Points in Space and Time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:959-970.
- Woodward DF, Pepperl DJ, Burkey TH and Regan JW (1995) 6-Isopropoxy-9-Oxoxanthene-2-Carboxylic Acid (AH 6809), a Human EP2 Receptor Antagonist. *Biochem Pharmacol* 50:1731-1733.
- Wu G and Morris SM, Jr. (1998) Arginine Metabolism: Nitric Oxide and Beyond. *Biochem J* 336 (Pt 1):1-17.
- Xie S, Sukkar MB, Issa R, Khorasani NM and Chung KF (2007) Mechanisms of Induction of Airway Smooth Muscle Hyperplasia by Transforming Growth Factor-Beta. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293:L245-L253.
- Xu W, Kaneko FT, Zheng S, Comhair SA, Janocha AJ, Goggans T, Thunnissen FB, Farver C, Hazen SL, Jennings C, Dweik RA, Arroliga AC and Erzurum SC (2004) Increased Arginase II and Decreased NO Synthesis in Endothelial Cells of Patients With Pulmonary Arterial Hypertension. *FASEB J* 18:1746-1748.
- Yi ES, Lee H, Yin S, Piguet P, Sarosi I, Kaufmann S, Tarpley J, Wang NS and Ulich TR (1996) Platelet-Derived Growth Factor Causes Pulmonary Cell Proliferation and Collagen Deposition in Vivo. *Am J Pathol* 149:539-548.

- Yokoyama U, Patel HH, Lai NC, Aroonsakool N, Roth DM and Insel PA (2008) The Cyclic AMP Effector Epac Integrates Pro- and Anti-Fibrotic Signals. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:6386-6391.
- Zaagsma J, Roffel AF and Meurs H (1997) Muscarinic Control of Airway Function. *Life Sci* 60:1061-1068.
- Zaccolo M and Pozzan T (2002) Discrete Microdomains With High Concentration of cAMP in Stimulated Rat Neonatal Cardiac Myocytes. *Science* 295:1711-1715.
- Zimmermann N, King NE, Laporte J, Yang M, Mishra A, Pope SM, Muntel EE, Witte DP, Pegg AA, Foster PS, Hamid Q and Rothenberg ME (2003) Dissection of Experimental Asthma With DNA Microarray Analysis Identifies Arginase in Asthma Pathogenesis. *J Clin Invest* 111:1863-1874.

Publikationsliste

1 Wissenschaftliche Originalarbeiten

Matthiesen S, Bahulayan A, Kempkens S, Haag S, Fuhrmann M, Stichnote C, Juergens UR and Racké K (2006) Muscarinic Receptors Mediate Stimulation of Human Lung Fibroblast Proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35:621-627.

Racké K, Haag S, Bahulayan A and Warnken M (2008) Pulmonary Fibroblasts, an Emerging Target for Anti-Obstructive Drugs. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 378:193-201 (Übersichtsarbeit).

Haag S, Matthiesen S, Juergens UR and Racké K (2008) Muscarinic Receptors Mediate Stimulation of Collagen Synthesis in Human Lung Fibroblasts. *Eur Respir J.* 32(3):555-62.

Haag S, Warnken M, Juergens UR and Racké K (2008) Role of Epac1 in Mediating Anti-Proliferative Effects of Prostanoid EP(2) Receptors and cAMP in Human Lung Fibroblasts. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 378:617-630.

2 Poster und Kongressbeiträge

Warnken M, Haag S, Matthiesen S, Racké K (2007) Species Differences in Expression Pattern and Functional Role of Arginase Isoenzymes in Human and Rat Pulmonary Fibroblasts. *ATS International Conference 2007, San Francisco, 18.-23.Mai 2007.*

Haag S, Racké K, Matthiesen S, (2007) Arginase activity is not crucial for PDGF-induced proliferation in pHLFb, though PDGF up-regulates arginase II expression. ATS International Conference 2007, San Francisco, 18.-23.Mai 2007.

Racké K, Haag S, Matthiesen S (2007) Role of EPAC in transduction of anti-proliferative effects of cAMP elevating agents in human lung fibroblasts. 2nd Focused Meeting on Cell Signalling, Leicester, Frühjahr 2007.

Racké K, Haag S, Juergens UR, Warnken M (2008) Muscarinic receptors mediate stimulation of collagen synthesis in human lung fibroblasts. Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol 377:14 (Suppl. 1) Frühjahrstagung der DGPT, Mainz.

Haag S, Warnken M, Juergens UR, Racké K (2008) Anti-proliferative effects of prostanoid EP2 receptors and cAMP in human lung fibroblasts are mediated via Epac1. Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol 377:14 (Suppl. 1) Frühjahrstagung der DGPT, Mainz.

Racké K, Haag S, Juergens UR, Warnken M (2008) Collagen synthesis by human lung fibroblasts is stimulated via muscarinic receptors. ATS International Conference 2008, Toronto, 16.-21. Mai 2008.

Haag S, Warnken M, Juergens UR, Racké K (2008) Anti-proliferative effects of prostanoid EP2 receptors and cAMP in human lung fibroblasts are mediated via Epac1. ATS International Conference 2008, Toronto, 16.-21. Mai 2008.

Haag S, Warnken M, Racké K. (2008) Differential role of Epac and PKA as cAMP-effectors in human lung fibroblasts. DPhG-Jahrestagung 2008, Bonn, 8.-11.Oktober 2008.