

**Regulation der Expression von β_2 -Adrenozeptoren
in Lungenfibroblasten**

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

Nora Milena Kämpfer
aus Frankfurt am Main

2014

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Kurt Racké
2. Gutachter: Prof. Dr. Dirk Skowasch

Tag der Mündlichen Prüfung: 26.08.2014

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. Alexander Pfeifer

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung	9
1.1 Asthma bronchiale und Chronisch Obstruktive Lungenkrankheit	9
1.1.1 Epidemiologie	9
1.1.2 Ätiologie und Pathogenese	9
1.1.3 Klinik und Diagnostik	11
1.1.4 Therapie	12
1.2 β_2 -Adrenozeptoragonisten	13
1.2.1 Geschichte der β_2 -Adrenozeptoragonisten	13
1.2.2 β_2 -Adrenozeptoren	15
1.2.3 Wirkung von β_2 -Adrenozeptoragonisten	16
1.2.3.1 Signaltransduktion	16
1.2.3.2 Effekte am glatten Muskel	19
1.2.3.3 Effekte an anderen Zellen	19
1.2.4 Risiken der β_2 -Adrenozeptoragonisten	21
1.2.5 Anpassungs- und Regulationsmechanismen	22
1.2.5.1 Desensibilisierung	22
1.2.5.2 Wechselwirkende Signalwege	24
1.2.5.3 Transkriptionelle Regulation	24
1.3 Zielsetzung dieser Arbeit	26
2. Materialien und Methoden	27
2.1 Materialien	27
2.1.1 Chemikalien und Enzyme	27
2.1.2 Testsubstanzen	28
2.1.3 Puffer, Lösungen und feindisperse Systeme	30
2.1.4 Primer	32
2.1.5 Zelllinie und Nährmedium	32

2.1.6	Software	33
2.2	Methoden	34
2.2.1	Zellversorgung	34
2.2.2	Zellyse	36
2.2.3	RNA-Präparation	36
2.2.4	Photometermessung	37
2.2.5	Reverse Transkription	38
2.2.6	Konventionelle PCR	38
2.2.7	Gelelektrophorese	39
2.2.8	Real-Time PCR	41
2.2.9	Auswertung	43
3.	Ergebnisse	44
3.1	Wirkung von β_2 -Adrenozeptoragonisten auf die β_2 -mRNA-Expression	44
3.2	Wirkung von Adenylatzyklasestimulatoren auf die β_2 -mRNA-Expression	45
3.3	Wirkung von Phosphodiesteraseinhibitoren auf die β_2 -mRNA-Expression	47
3.4	Wirkung des Adenylatzyklaseinhibitors SQ 22,536 auf die β_2 -mRNA-Expression	49
3.5	Wirkung von Translations- und Transkriptionshemmer auf die β_2 -mRNA-Expression	51
3.6	Wirkung von Kombinationen mit Cycloheximid auf die β_2 -mRNA-Expression	52
3.6.1	Wirkung von Cycloheximid und Olodaterol auf die β_2 -mRNA-Expression	52
3.6.2	Wirkung von Cycloheximid und Forskolin auf die β_2 -mRNA-Expression	53
3.6.3	Wirkung von Cycloheximid und EPAC- bzw. PKA-Agonist auf die β_2 -mRNA-Expression	55
3.7	Wirkung von PKA-Inhibitoren auf die β_2 -mRNA-Expression	56

3.8	Wirkung des AKAP-Inhibitors St-Ht31 auf die β_2 -mRNA-Expression	60
4.	Diskussion	62
4.1	β_2 -Agonisten induzierte, duale Regulation des β_2 -Rezeptortranskripts	62
4.1.1	Stimulatorischer Effekt bei Kurzzeitexposition	62
4.1.2	Inhibitorischer Effekt bei Langzeitexposition	64
4.2	Kompartimentalisierungsmodell	65
4.3	cAMP-Überflutung durch Phosphodiesterasen	66
4.4	Basale Inhibition der β_2 -Rezeptortranskription durch kurzlebige Proteine	67
4.5	Induktion inhibitorischer Proteine bei Langzeitexposition mit β_2 -Agonisten	68
4.6	Beteiligung der PKA an der β_2 -Agonisten induzierten Regulation des β_2 -Rezeptortranskripts	69
4.6.1	Stimulatorische und inhibitorische Komponente der PKA	69
4.6.2	Gegenteilige Effekte durch Proteinkinaseinhibitoren	72
4.6.2.1	Qualitative Unterschiede im Wirkprofil von Kt 5720 und H89	73
4.6.2.2	Quantitative Unterschiede im Wirkprofil von Kt 5720 und H89	75
4.6.2.3	Unspezifische Effekte von Kt 5720 und H89	76
4.6.3	Rolle von AKAP für Effekte der β_2 -Agonisten	77
4.7	Schlussfolgerung	80
5.	Zusammenfassung	81
6.	Literaturverzeichnis	83
7.	Danksagung	94

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosintriphosphat
AKAP	<i>A-kinase anchoring proteins</i> , A-Kinase ankernde Proteine
AP2	<i>activator protein 2</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bidest	bidestilliert
bp	Basenpaare
CaMK II	Calmodulinkinase II
cAMP	<i>cyclic adenosine monophosphate</i> , zyklisches Adenosinmonophosphat
CBP	<i>CREB-binding protein</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
CK I	<i>casein kinase I</i> , Kaseinkinase I
CNG	<i>cyclic nucleotide gated</i> , zyklisch Nukleotid-gesteuert
CO ₂	<i>carbon dioxide</i> , Kohlenstoffdioxid
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i> , chronisch obstructive Lungenerkrankung
CRE	<i>cAMP response element</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
Ct	<i>cycle treshold</i> , Schwellenwert-Zyklus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	<i>deoxyribonucleotide triphosphate</i> , Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPAC	<i>exchange protein directly activated by cAMP</i>
FEV ₁	forciertes expiratorisches Volumen in einer Sekunde

FKS	fetales Kälberserum
<i>g</i>	Gravitationsbeschleunigung auf der Erdoberfläche
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GIP	GPCR-interagierende Proteine
GPCR	G-protein gekoppelte Rezeptoren
GRK	G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen
HCAM-1	<i>homing cell adhesion molecule-1</i>
IBMX	Isobutylmethylxanthin
IC ₅₀	<i>half maximal inhibitory concentration</i> , mittlere inhibitorische Konzentration
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
IP ₃	Inositol 1,4,5-Triphosphat
K _i	Inhibitorkonstante
LABA	<i>long acting beta agonists</i> , langwirkende Betaagonisten
MABA	<i>muscarinic antagonists-beta agonists</i> , Muskarinrezeptorantagonist-β ₂ -Rezeptoragonisten
MAP2	<i>microtubule associated protein 2</i>
MDB	<i>membrane desalting buffer</i>
MEK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MEM	<i>Minimal Essential Medium Eagle</i>
MLCK	<i>myosin light chain kinase</i> , Myosin-leichte-Ketten-Kinase
MRC-5	<i>Medical Research Council-5</i>
mRNA	<i>messenger-RNA</i> , Boten-RNA
MSK1	<i>mitogen- and stress-activated protein kinase 1</i>
NEEA	<i>non-essential amino acids</i> , nicht-essentielle Aminosäuren
NF-IL6	<i>nuclear factor interleukin-6</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>

PCR	<i>polymerase chain reaction,</i> Polymerasekettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PDK1	<i>3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1</i>
PHK	Phosphorylasekinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
RNA	<i>ribonucleic acid,</i> Ribonukleinsäure
ROCK	<i>rho-associated protein kinase</i>
rpm	<i>rotations per minute,</i> Rotationen pro Minute
RSG2	<i>regulator of G-protein signaling 2</i>
S6K1	<i>p70 ribosomal protein S6 kinase 1</i>
SEM	<i>standard error of the mean,</i> Standardfehler des Mittelwerts
Taq	<i>thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
UV	ultraviolett
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>

1. Einleitung

1.1 Asthma bronchiale und Chronisch Obstruktive Lungenkrankheit

1.1.1 Epidemiologie

Asthma bronchiale und Chronisch Obstruktive Lungenkrankheit (COPD) zählen in Deutschland zu den häufigsten Atemwegserkrankungen. Asthma bronchiale manifestiert sich schwerpunktmäßig in frühen Lebensabschnitten mit einer Prävalenz von 10 % im Kindesalter und 5 % im Erwachsenenalter, wohingegen die COPD mit einer geschätzten Prävalenz von 10 % der über 40-jährigen vorwiegend bei Erwachsenen auftritt (Bundesärztekammer et al., 2011, 2012). Die Entwicklung der letzten Jahre und Zukunftsprognosen zeigen für beide Erkrankungen eine Häufigkeitszunahme, die bei der COPD weltweit, bei Asthma hingegen vor allem in den westlichen Industrienationen beobachtet werden kann (Kroegel, 2002a; Rabe et al., 2007).

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Beide Erkrankungen zeichnen sich durch ein chronisch-entzündliches Geschehen mit Atemwegsobstruktion aus. Hinsichtlich Ätiologie und Pathogenese finden sich jedoch wichtige Unterschiede.

Für die Entstehung von Asthma ist das Zusammenspiel von genetischer Disposition und verschiedenen Umweltfaktoren entscheidend (Rigoli et al., 2011). Zu den relevanten Umweltfaktoren, die diskutiert werden, zählen beispielsweise Allergenexposition, Ernährung, Medikamenteneinnahme sowie häufige Infekte während der frühen Kindheit und Fetalzeit (Kroegel, 2002a). Auch psychosoziale Faktoren können Einfluss auf den Krankheitsverlauf nehmen (Bundesärztekammer et al., 2011). Neben verschiedenen Unter- und Mischformen unterscheidet man zwei Hauptformen des Asthma bronchiale: die extrinsische und die intrinsische Form (Kroegel, 2002b). Bei der extrinsischen bzw. allergischen Form kommt es nach einer Allergensensibilisierung zu einer Soforttyp-1-vermittelten Reaktion auf das entsprechende Allergen. Diese geht mit Mastzell-

aktivierung, Mediator-induzierter Bronchokonstriktion und einem Lumen verengenden Schleimhautödem einher (Frühreaktion). Im Verlauf kommt es zu einer von eosinophilen Granulozyten dominierten Entzündungsreaktion, die sich durch Bronchokonstriktion, Epithelzerstörung und Hemmung der Flimmerepithelfunktion auszeichnet (Spätreaktion). Durch damit einhergehender Reduktion von Abwehr- und Barrierefunktionen und protektiven, dilatativen Mediatoren folgen eine Hyperreagibilität sowie eine erhöhte Anfälligkeit für respiratorische Infekte. Langfristig gesehen kommt es zu irreversiblen, strukturellen Veränderungen in der Lungenarchitektur, dem so genannten Remodeling (Kroegel und Förster, 2002). Dieses zeichnet sich durch eine in zentralen Lungenabschnitten betonte Basalmembranverdickung (Brewster et al., 1990; Lamyel et al., 2011; Roche et al., 1989), vermehrte Kollagensynthese durch aktivierte (Myo-) Fibroblasten und Hyperplasie von glatten Muskel- und Drüsenzellen aus (Kroegel und Förster, 2002). Zwar mündet die intrinsische Asthmaform in der gleichen pathogenetischen Endstrecke (eosinophile Spätreaktion und Remodeling), die Auslöser sind jedoch nichtallergischen Ursprungs. Es wird vermutet, dass autoimmun-vermittelte Prozesse die eosinophile Entzündungsreaktion induzieren, wobei beispielsweise Medikamente oder Infekte als Trigger in Betracht gezogen werden (Kroegel, 2002b).

Die Entstehung der COPD ist bei bestehender genetischer Prädisposition insbesondere mit langjährigem Tabakkonsum assoziiert (Taylor, 2010). Daneben finden sich Risikofaktoren wie Chemikalien- und Feinstaubexposition sowie Atemwegsinfektionen inklusive Tuberkulose (Broekhuizen et al., 2012). Vor allem in Entwicklungsländern scheint eine Tabak-unabhängige, vielmehr auf die Schadstoffexposition aus Verbrennungsprozessen von Biomasse zurückzuführende Pathogenese zunehmend verantwortlich zu sein (Salvi und Barnes, 2009). Darüber hinaus können auch endogene Faktoren wie der autosomal-rezessiv vererbte α_1 -Antitrypsinmangel mit einer europäischen Prävalenz von 0,01-0,02 % die Krankheitsentstehung bedingen (Biedermann und Köhnlein, 2006). Solche endogenen Faktoren oder die Inhalation exogener Noxen bedingen eine chronische Bronchitis mit mukoziliärer Dysfunktion und führen durch Inaktivierung von antiproteolytischen Faktoren zu einem verschobenen Gleichgewicht zwischen Proteasen und Proteaseinhibitoren. Auch das Gleichgewicht zwischen oxidativen und antioxidativen Komponenten gerät in Schieflage und interne Reperaturmechanismen funktionieren nicht mehr regelrecht (Bartal, 2005). Konsequenz ist unter

anderem die Destruktion des Lungenparenchyms, welche zu einem Lungenemphysem, also einer irreversiblen Erweiterung der Lufträume distal der Bronchioli terminales, führen kann. Die strukturellen Umbauprozesse, die sich insbesondere in den peripheren Lungenabschnitten manifestieren, korrelieren mit der Schwere des Krankheitsbilds (Hogg et al., 2004; Jeffery, 2004; Lamyel et al., 2011; Molfino und Jeffery, 2007).

1.1.3 Klinik und Diagnostik

Klinisch manifestiert sich Asthma bronchiale in Form einer reizinduzierten, anfallsartigen Atemwegobstruktion mit einhergehender Atemnot sowie verlängertem Expirium mit Giemen. Die Symptomatik von COPD-Patienten zeichnet sich durch chronischen Husten mit Auswurf und eine vorrangig belastungsinduzierte Atemnot aus. Oft geht einer manifesten COPD eine mehrjährige Phase rezidivierender nicht-obstruktiver Bronchitiden voraus.

Diagnostisch wird die pulmonale Obstruktion der Asthma- und COPD-Patienten in der Lungenfunktionsdiagnostik sichtbar: typischerweise sind die absolute (FEV_1) und die relative Einsekundenkapazität reduziert. Außerdem bietet sich der Parameter des expiratorischen Spitzenflusses insbesondere bei Asthma-Patienten zur Verlaufsbeobachtung an (Bundesärztekammer et al., 2011, 2012). Bei Asthma-Patienten findet sich häufig nur eine situationsabhängige Obstruktion, während die Obstruktion bei COPD-Patienten permanent mit progredientem Verlauf zu beobachtet ist. Ein weiterer Unterschied besteht in der Reaktion der Patienten auf die Gabe eines schnell bronchodilatativ wirkenden β_2 -Sympathomimetikums (Bronchospasmodolysetest). Bei Asthma Patienten erweist sich die Obstruktion meist als reversibel: ein Anstieg der FEV_1 um 15 % bzw. 200 ml gegenüber dem Ausgangswert ist typisch für ein behandlungsbedürftiges Asthma (Buhl et al., 2006). Eine entsprechende Veränderung der Einsekundenkapazität ist bei COPD-Patienten aufgrund der irreversiblen Obstruktion nicht zu beobachten.

Im Krankheitsverlauf von Asthma- und COPD-Patienten kann es je nach Schweregrad zu gehäuften Exazerbationen kommen. Hierbei handelt es sich um oftmals Infektgetriggerte Krankheitsepisoden, die mit einer forcierten, möglicherweise lebens-

bedrohlichen Symptomatik einhergehen und eine stationäre Behandlung erfordern können.

1.1.4 Therapie

Die Therapiemöglichkeiten umfassen sowohl bei Asthma- als auch bei COPD-Patienten nicht-medikamentöse Maßnahmen sowie eine individuell angepasste Pharmakotherapie. Hierbei finden sich Überschneidungen und Unterschiede.

Sowohl für Asthma- als auch COPD-Patienten können Patientenschulung, körperliches Training, Atemphysiotherapie, Rehabilitationsmaßnahmen sowie reichliche Flüssigkeitszufuhr zur Sekretolyse und Schutzimpfungen zur Prophylaxe von Atemwegsinfektionen den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen. Für Asthma-Patienten vom extrinsisch-allergischen Typ ist zusätzlich eine konsequente Allergenkenz wichtig und in einigen Fällen kann eine allergenspezifische, subkutane Immuntherapie zur Hyposensibilisierung indiziert sein (Bundesärztekammer et al., 2011). Für Asthma-Erkrankte, aber insbesondere für COPD-Patienten, ist darüber hinaus eine konsequente Vermeidung von Tabakrauch und anderen Schadstoffen essentiell. Bei Patienten mit hochgradiger COPD kann außerdem eine Langzeitsauerstofftherapie und im Falle von ausgeprägten, emphysematösen Lungenveränderungen eine operative Intervention nötig sein.

Neben diesen Maßnahmen gilt es, eine an die individuelle Symptomatik des Patienten angepasste Pharmakotherapie zu erstellen. Neben gegebenenfalls notwendiger antibiotischer Therapie bei akuter Atemwegsinfektion gehören verschiedene Medikamente mit antientzündlichen und/oder antiobstruktiven Eigenschaften zu den Standardpharmaka. Eingesetzte Arzneistoffe werden bevorzugt inhalativ verabreicht, um eine gezielte Wirkung im Lungengewebe bei möglichst geringen Medikamentendosen zu erreichen. Prinzipiell unterscheidet man Dauermedikamente zur längerfristigen, regelmäßigen Einnahme von Bedarfsmedikamenten zur Akuttherapie.

Die bei Asthma-Patienten eingesetzten Dauermedikamente wirken antientzündlich (inhalative/orale Kortikosteroide, Anti-IgE-Antikörper), atemwegserweiternd (langwirksame β_2 -Sympathomimetika) oder weisen sowohl antientzündliche als auch atemwegserweiternde Eigenschaften auf (Leukotrienrezeptorantagonisten, Theophyllin). Aufgrund der ausgeprägten antientzündlichen Eigenschaften kommen zur Dauer-

medikation am häufigsten inhalative Kortikosteroide (z.B. Budesonid, Fluticason, Beclometason) zum Einsatz, gegebenenfalls in Kombination mit langwirksamen β_2 -Sympathomimetika (z.B. Salmeterol, Formoterol). Zur Bedarfsmedikation werden bronchodilatierende, kurzwirksame β_2 -Sympathomimetika eingesetzt (z.B. Salbutamol). Asthma-Patienten werden aufgrund ihrer Symptomatik, Lungenfunktionsparameter, Exazerbationshäufigkeit und ihres Gebrauchs von Notfallmedikamenten in die Gruppen „kontrolliertes Asthma“, „teilweise kontrolliertes Asthma“ und „unkontrolliertes Asthma“ eingeteilt. Ist die Asthmaerkrankung eines Patienten nicht kontrolliert, so wird anhand eines Stufenschemas die Dauermedikation so lange erhöht beziehungsweise um andere Pharmaka erweitert, bis ein kontrollierter Status erreicht wird (Bundesärztekammer et al., 2011).

Die Dauermedikation bei COPD-Patienten umfasst neben langwirksamen β_2 -Sympathomimetika und langwirksamen Anticholinergika (z.B. Tiotropium) gegebenenfalls inhalative Glucocorticosteroide und als Mittel der dritten Wahl Theophyllin. Zur Bedarfsmedikation zählen wie beim Asthma kurz-wirksame β_2 -Sympathomimetika, alternativ kommen schnellwirksame Anticholinergika (z.B. Ipratropium) zum Einsatz, die ebenfalls über bronchodilatierende Eigenschaften verfügen. Verglichen mit Asthma-Patienten profitieren COPD-Patienten stärker von anticholinergischer Medikation, da deren Acetylcholin-vermittelte Komponente der pathologischen Obstruktion ausgeprägter zu sein scheint (Barnes, 2006). Die medikamentöse Therapie der COPD richtet sich ebenfalls nach einem Stufenschema, wobei die Lungenfunktionsparameter des Patienten den Schweregrad der Erkrankung und damit die Medikationsstufe festlegen (Bundesärztekammer et al., 2012).

1.2 β_2 -Adrenozeptoragonisten

1.2.1 Geschichte der β_2 -Adrenozeptoragonisten

Wie bereits erläutert, stellen β_2 -Adrenozeptoragonisten sowohl bei der Asthma- als auch bei der COPD-Therapie einen wichtigen Bestandteil der Dauer- und Akuttherapie dar. Sie ahmen über eine Aktivierung von β_2 -Rezeptoren die Wirkung von körpereigenen Katecholaminen nach.

Der therapeutische Einsatz von Sympathomimetika bei Atemwegkrankungen hat bei genauer Betrachtung eine jahrtausendlange Tradition. So wurde das aus Pflanzen der Gattung Ephedra gewonnene Alkaloid Ephedrin schon lange vor genauer Kenntnis der Wirkmechanismen bei pulmonalen Beschwerden praktisch angewendet. Die wissenschaftliche Erforschung von sympathomimetischen Substanzen und ihren Effekten begann hingegen erst Anfang des 20. Jahrhunderts (Barnes, 2006). Nachdem Kahn 1907 die bronchodilatierende Wirkung von Adrenalin *in vitro* nachgewiesen hatte, wurde die subkutane Adrenalininjektion bei Asthma-Patienten zu einem wichtigen therapeutischen Instrument (Waldeck, 2002). 1940 gelang es durch die Synthese von Isoprenalin, einen spezifischeren Effekt mit weniger kardiovaskulären Nebenwirkungen zu erzielen. Die Erklärung hierfür lieferte Ahlquist 1948 durch die Unterscheidung von α - und β -Adrenozeptoren und der damit einhergehenden Klassifikation von Isoprenalin als β -selektiven Agonisten (Ahlquist, 1948). Nachdem eine weitere Unterteilung in β_1 - und β_2 -Adrenozeptoren (Lands et al., 1967) gelungen war, wurde Isoetherin als spezifischer am Lungengewebe wirkender β_2 -Adrenozeptoragonist identifiziert. Durch diese Entwicklung und die Durchsetzung der inhalativen Applikation wurde die Therapie zwar verbessert, ein weiterhin bestehendes Problem blieb jedoch die kurze Wirkdauer der Medikamente. Erst durch die Einführung von Salbutamol Ende der 60er Jahre (Brittain et al., 1968; Cullum et al., 1969) wurde eine Kombination aus potenter, β_2 -spezifischer Wirkung und geeigneterer Wirkdauer erzielt und somit ein Pharmakon entwickelt, das bis heute Anwendung in der antiasthmatischen und COPD-Therapie findet. Auch die β_1 -vermittelten Restwirkungen, die sich in Form von Schwitzen, Herzrasen und Unruhe bei Isoetherin noch gezeigt hatten, waren bei Salbutamol schwächer ausgeprägt. Nach diesem Erfolg entwickelte man auf der Suche nach weiteren, klinisch erfolgreichen Pharmaka eine Reihe von Salbutamol-Derivaten, die so genannten β_2 -Agonisten der zweiten Generation. Diese zeigten jedoch gegenüber Salbutamol keine klinischen Vorteile. Erst die Suche nach noch längerwirksamen β_2 -Agonisten zur Dauertherapie bei schwerem, persistierendem Asthma, ermöglichte erneut die Entwicklung eines Medikaments, das sich klinisch durchsetzen konnte. Die Idee, durch lipophile Seitenketten eine Substanzverankerung an der Zellmembran und somit eine verlängerte Wirkdauer zu erzielen (Gaviraghi, 2010), führte somit nach Berücksichtigung der β_2 -Aktivierungspotenz zur Synthese von Salmeterol. Hierbei

handelt es sich um einen langwirksamen β_2 -Agonisten (LABA) mit über 12 Stunden Wirkdauer, der ab 1990 Einzug in die klinische Praxis fand (Barnes, 2006). Neben Salmeterol, einem LABA mit verzögertem Wirkeintritt, spielt auch Formoterol als LABA mit raschem Wirkeintritt für die heutige Dauermedikation bei Asthma und COPD eine wichtige Rolle.

Aktuelle Entwicklungen zielen darauf ab, β_2 -Agonisten mit noch längerer Wirkdauer zu entwickeln, und dadurch eine einmalige Inhalation am Tag zu ermöglichen. Seit Ende 2010 ist Indacaterol als β_2 -Agonist mit über 24-stündiger Wirkung zur Therapie der COPD zugelassen. Andere Substanzen – wie beispielsweise Olodaterol – werden getestet. Olodaterol zeigte beispielsweise im Tiermodell (Bouyssou et al., 2010a, b) und in ersten klinischen Studien (O'Byrne et al., 2009) ein vielversprechendes Wirkprofil mit bis zu 32-stündigem bronchoprotektivem Effekt.

Ein weiteres, zukünftiges Forschungsfeld bietet die Untersuchung der Wirkung von bifunktionalen Muscarinrezeptorantagonisten- β_2 -Rezeptoragonisten (MABA) (Gaviraghi, 2010; Hughes und Jones, 2011), deren antiobstruktive Wirkung sowohl auf katecholaminergen als auch auf anticholinergen Effekten beruht.

1.2.2 β_2 -Adrenozeptoren

Der β_2 -Adrenozeptor gehört ebenso wie die α_1 -, α_2 -, β_1 - und β_3 -Rezeptoren zur Familie der Adrenozeptoren, bei denen es sich um metabotrope, G-Protein gekoppelte 7-Transmembranrezeptoren handelt (Heinrich et al., 2007). Wie bereits erwähnt, gelang eine erstmalige Unterteilung in α - und β -Adrenozeptoren 1948 (Ahlquist, 1948) und konnte im Laufe der Zeit um genauere Unterscheidungen erweitert werden (Lands et al., 1967). Die einzelnen Adrenozeptoren, die alle durch eigene, auf verschiedenen Chromosomen lokalisierte Gene kodiert werden (Staiger et al., 2007), unterscheiden sich hinsichtlich Struktur, Signalkaskade und Vorkommen.

Durch Agonistenbindung im Bereich der extrazellulären Bindungstasche kommt es durch Konformationsänderungen zu einer Aktivierung von rezeptorgebundenen G-Proteinen. Die heterotrimeren G-Proteine unterteilen sich in α -, β - und γ -Untereinheit, wobei an die α -Untereinheit GDP gebunden ist. Bei Aktivierung kommt es an der α -Untereinheit zum Austausch von GDP durch GTP, das G-Protein löst sich vom Rezeptor

und die α -Untereinheit dissoziiert von der β - und γ -Untereinheit ab. Sowohl die α - als auch die β -/ γ -Untereinheit können nun über Effektormoleküle weitere Schritte in der Signalkaskade auslösen (Heinrich et al., 2007). Zu den wichtigsten G-Proteinen zählen die G_s -, G_i - und G_q -Proteine. Prinzipiell sind die verschiedenen Adrenozeptoren bevorzugt an einen dieser G-Proteintypen gekoppelt, auch wenn eine Kopplung an unterschiedliche G-Proteine möglich ist. β -Rezeptoren vermitteln in der Regel über G_s -Proteine die Aktivierung der Adenylatzyklase, welche wiederum die Bildung von cAMP fördert (Heinrich et al., 2007).

Die verschiedenen Adrenozeptortypen unterliegen einem zellspezifischen Verteilungsmuster. So finden sich β_2 -Adrenozeptoren insbesondere im glatten Muskelgewebe von Bronchien, Uterus, und Sphinkterapparaten, wo ihre Aktivierung zur Relaxation führt. Außerdem wird über β_2 -Rezeptoren die Glykogenolyse in Leber und Skelettmuskel sowie die Insulinfreisetzung aus Pankreasgewebe vermittelt.

Oft findet man in bestimmten Geweben sowohl α - als auch β -Rezeptoren, die hier gewöhnlich gegenteilige Wirkungen vermitteln (Jänig, 2005). Für den letztendlichen Effekt ist das Verteilungsmuster entscheidend. Zusätzlich gilt zu berücksichtigen, dass die verschiedenen Adrenozeptortypen unterschiedliche Affinitätsmuster bezüglich ihrer Aktivierung durch körpereigene und körperfremde Agonisten aufweisen. So hat beispielsweise Noradrenalin verglichen mit Adrenalin eine stärkere Wirkung auf β_1 -Adrenozeptoren; α_2 - und β_2 -Adrenozeptoren reagieren hingegen stärker auf Adrenalin (Jänig, 2005). Zellphysiologisch bedeutet dies, dass β_1 -Rezeptoren eher auf nerval freigesetztes Noradrenalin und β_2 -Rezeptoren eher auf zirkulierendes Adrenalin reagieren (Nijkamp et al., 1992).

1.2.3 Wirkung von β_2 -Adrenozeptoragonisten

1.2.3.1 Signaltransduktion

Um die Rolle der β_2 -Sympathikomimetika in der Behandlung von Asthma und COPD besser zu verstehen, werden im Folgenden die zellulären Prozesse der Signaltransduktion des β_2 -Adrenozeptors näher beleuchtet.

Wie bereits erläutert, vermittelt der β_2 -Rezeptor nach Agonistenbindung über ein stimulatorisches G-Protein eine Aktivierung der membranständigen Adenylatzyklase. Bei

diesem Enzym handelt es sich um ein 12-Transmembranprotein, das die Synthese von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) aus Adenosintriphosphat (ATP) katalysiert. Bislang sind neun verschiedene Genorte bekannt, die unterschiedliche Isoformen der transmembranen Adenylatzyklase kodieren. Die Isoformen unterscheiden sich beispielsweise aufgrund ihres Vorkommens in verschiedenen Geweben und Zellkompartimenten, ihrer Aktivierung beziehungsweise Inaktivierung durch G-Proteine und ihrer Regulation durch verschiedene Kinasen (Heinrich et al., 2007; Tresguerres et al., 2011). In glatten Bronchialmuskelzellen finden sich vor allem die Isoenzyme 2, 4 und 6 jeweils in unterschiedlichen Zellmikrodomänen (Bogard et al., 2011).

Die enzymatischen Gegenspieler der Adenylatzyklasen stellen die Phosphodiesterasen (PDEs) dar, durch deren Aktivität cAMP in Adenosinmonophosphat hydrolysiert wird und es damit zu einer Inhibierung beziehungsweise Beendigung des cAMP-Signals kommt. Bislang konnten 11 verschiedene Phosphodiesterase-Familien beschrieben werden (Francis et al., 2011). Auch die Phosphodiesterasen unterscheiden sich hinsichtlich ihres Vorkommens, ihrer Spezifität und Affinität gegenüber cAMP und anderer zyklischer Nukleotidverbindungen wie cGMP (zyklisches Guanosinmonophosphat) sowie ihrer Beeinflussung durch endogene und exogene Regulatoren. Im Lungengewebe scheinen insbesondere PDE-3 und PDE-4 eine besondere Rolle zu spielen (Torphy, 1998).

Das in den 50er Jahren entdeckte cAMP (Sutherland et al., 1958) ist ein ubiquitär vorkommender, intrazellulärer, sekundärer Botenstoff, der vielfältige Wirkungen vermitteln kann, indem verschiedene Effektormoleküle diverser Signalkaskaden beeinflusst werden. Zu den bisher bekannten, wichtigen Zielstrukturen von cAMP gehören die Proteinkinase A (PKA) das *exchange protein directly activated by cAMP* (EPAC) sowie *cyclic nucleotide gated* (CNG)-Kationenkanäle. Die Proteinkinase A, bestehend aus zwei regulatorischen Untereinheiten mit insgesamt vier Bindungsstellen für cAMP und zwei katalytischen Untereinheiten mit Bindungsstelle für ATP und das zu phosphorylierende Substrat, gehört zu der Gruppe der Serin/Threonin-Kinasen (Heinrich et al., 2007). Sie führt durch Phosphorylierung zur Aktivierung beziehungsweise Deaktivierung von verschiedensten Effektormolekülen und beeinflusst dadurch unter anderem Stoffwechselforgänge und Gentranskription. Typische Zielstrukturen der PKA sind unter anderem Ionenkanäle, Transkriptionsfaktoren wie CREB (*cAMP response-element*

binding protein) und diverse Stoffwechsellzyme (Heinrich et al., 2007; Skalhegg und Tasken, 2000).

Die Funktionen des in den 90er Jahren entdeckten EPAC sind noch nicht umfassend erforscht. Bekannt ist, dass EPAC die Aktivität von kleinen G-Proteinen durch Vermittlung des Austauschs von Guanosindiphosphat durch Guanosintriphosphat beeinflusst (Breckler et al., 2011; de Rooij et al., 1998). Die beiden Unterformen EPAC-1 und EPAC-2 scheinen an einer Vielzahl von Zellfunktionen wie zum Beispiel Differenzierung, Proliferation und Apoptose unter anderem in Form von Genregulation beteiligt zu sein (Borland et al., 2009; Cheng et al., 2008; Roscioni et al., 2008).

Abbildung 1 gibt einen Überblick über die β_2 -Rezeptor-vermittelte Signalkaskade.

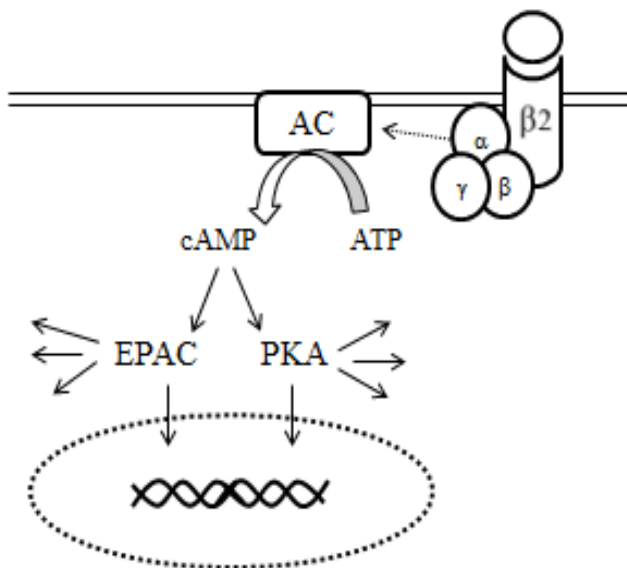


Abb.1: Signalkaskade des β_2 -Rezeptors

Nach Agonistenbindung an den β_2 -Rezeptor (β_2) wird durch die α -Untereinheit des G-Proteins die Adenylatzyklase (AC) aktiviert. Diese synthetisiert vermehrt cAMP aus ATP. Von cAMP werden die Zielstrukturen Proteinkinase A (PKA) und exchange proteine activated by cAMP (EPAC) angesteuert. PKA und EPAC vermitteln daraufhin zahlreiche zelluläre Signale, darunter auch transkriptionelle Regulation.

1.2.3.2 Effekte am glatten Muskel: Bronchodilatation und Bronchoprotektion

Für den bronchodilatierenden Effekt der β_2 -Adrenozeptoragonisten an der glatten Bronchialmuskulatur sind verschiedene cAMP-vermittelte Mechanismen verantwortlich. Beteiligt sind unter anderem die Proteinkinase A, die Myosin-leichte-Ketten-Kinase, sarkoplasmatische Ca^{2+} -Pumpen, K^+ -Kanäle sowie EPAC (Linke und Pfitzer, 2005; Roscioni et al., 2011a). Außerdem scheinen β_2 -Adrenozeptoragonisten zusätzlich auch über direkte Effekte auf Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanäle zu verfügen, und somit auch cAMP-unabhängig relaxierend zu wirken (Fenech und Hall, 2002).

Beim klinischen Einsatz der β_2 -Rezeptoragonisten spielt neben der erläuterten Bronchodilatation ein weiterer Effekt eine wichtige Rolle. So können die β_2 -Agonisten zusätzlich eine exogen-induzierte Konstriktion vermindern. Dieser als Bronchoprotektion bezeichnete Mechanismus ist insbesondere für den Einsatz von langwirksamen β_2 -Agonisten im Rahmen der Dauermedikation bedeutsam. Bronchokonstriktive Anfälle, die beispielsweise durch Allergene, Anstrengung oder Kälte induziert werden können (Abisheganaden und Boushey, 1998), werden durch inhibitorische beziehungsweise präventive Wirkungen der β_2 -Agonisten abgeschwächt. Die hierfür verantwortlichen komplexen, zellulären Mechanismen sind bislang nicht umfassend geklärt. Unter anderem scheint eine Expressionsmodulation bestimmter Gene beteiligt zu sein. So wird beispielsweise eine β_2 -Agonisten induzierte Expressionssteigerung von RGS2 (*regulator of G-protein signaling 2*) beschrieben, die zu einer Inhibition des bronchokonstriktiv wirkenden G_q -Signalwegs führt (Holden et al., 2011).

1.2.3.3 Effekte an anderen Zellen

Neben den beschriebenen antiobstruktiven Eigenschaften in Form von direkten bronchodilatierenden Effekten einerseits und indirekten, antikonstriktiven Effekten andererseits, gibt es zusätzlich Hinweise für weitere β_2 -Agonisten-vermittelte Wirkungen.

Für solche zusätzlichen Effekte ist entscheidend, dass β_2 -Adrenozeptoren nicht nur von glatten Bronchialmuskelzellen, sondern auch von anderen Zelltypen des Lungengewebes exprimiert werden (Barnes, 1999). So finden sich β_2 -Adrenozeptoren an Alveolarwand- bzw. Bronchialepithel, am Gefäßendothel, an cholinergen Nerven-

ganglien, an diversen Immunzellen wie Mastzellen, Monozyten, Eosinophilen, Neutrophilen und T-Lymphozyten sowie an Lungenfibroblasten (Barnes, 1992; Fenech und Hall, 2002; Hamid et al., 1991; Johnson, 2002; Lamyel et al., 2011). Die Aktivierung von β_2 -Rezeptoren an verschiedenen Zelltypen kann zur Modifikation von Transmitterfreisetzung, zur gesteigerten mukoziliären Funktion, zur Verringerung der Gefäßpermeabilität und zu diversen antientzündlichen Effekten führen (Barnes, 1999; Fenech und Hall, 2002; Nijkamp et al., 1992).

Solche durch β_2 -Agonisten-induzierte, antientzündliche Effekte konnten insbesondere bei Patienten, die bereits Glucocorticosteroide inhalieren, beobachtet werden. Sie umfassen die Inhibition der Mastzelldegranulation sowie die Reduktion von Zelladhäsionsmolekülen und proinflammatorischen Zellen (Barnes, 1999; Walters et al., 2000). Beispielsweise wurde eine verminderte Infiltration durch eosinophile Granulozyten beobachtet (Li et al., 1999; Vanacker et al., 2002) und gezeigt, dass Toll-like-Rezeptor-vermittelte Funktionen der Eosinophilen inhibiert werden (Hiraguchi et al., 2011). Es gibt darüber hinaus auch Hinweise, dass die Kombination aus Glucocorticoiden und β_2 -Agonisten einen systemischen antientzündlichen Effekt erzeugt, der sich in Form erniedrigter Konzentrationen an C-reaktivem Protein zeigt (Tang et al., 2010). Ein möglicher Mechanismus für den additiven antientzündlichen Effekt der β_2 -Agonisten bei Glucocorticoidtherapie könnte die Aktivierung des Glucocorticoidrezeptors durch β_2 -Agonisten in Form vermehrter Translokation des Rezeptors in den Zellkern darstellen (Eickelberg et al., 1999; Walters et al., 2005).

Es bleibt zu berücksichtigen, dass es auch Studien gibt, die den β_2 -Agonisten einen anti-entzündlichen Effekt absprechen oder gar einen proinflammatorischen Effekt beschreiben. So zeigte sich beispielsweise unter Albuterol- und Formoterolexposition eine erhöhte Interleukin-2-stimulierte Akkumulation von Interleukin-13-positiven-T-Zellen (Loza et al., 2008). Verschiedene andere proinflammatorische Effekte wurden von Taylor resümiert (Taylor, 2009), darunter erhöhte Zahlen inflammatorischer Zellen im Sputum und diverse Beeinflussung von Interleukinen. Aufgrund der Komplexität des Immunsystems ist es nicht verwunderlich, dass widersprüchlich anmutende Effekte von β_2 -Agonisten beschrieben werden. Um eine Aussage darüber zu treffen, ob letztendlich pro- oder antiinflammatorische Effekte im menschlichen Organismus überwiegen, bedarf es offensichtlich noch genauerer Forschung.

Wie bereits erwähnt, konnte die Expression von β_2 -Adrenozeptoren auch an humanen Lungenfibroblasten nachgewiesen werden, während β_1 - und β_3 -Rezeptoren hier nicht exprimiert werden (Lamyel et al., 2011). Es wurde gezeigt, dass die Aktivierung des β_2 -Adrenozeptors durch die Agonisten Formoterol und Olodaterol die Proliferation der Fibroblasten und ihre Kollagensynthese hemmt. Zusätzlich wurde ein Marker für Myofibroblastendifferenzierung (α -smooth muscle actin) auf mRNA- und Proteinebene herunterreguliert (Lamyel et al., 2011). Des Weiteren wurde beobachtet, dass unter Einfluss von β_2 -Agonisten die zytokin-vermittelte Expression von Zelladhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1, H-CAM) in Fibroblasten reduziert wird (Racké et al., 2008; Silvestri et al., 2001; Spoelstra et al., 2000). Auch andere Studien beschreiben einen cAMP-vermittelten antifibrotischen Effekt in Lungenfibroblasten (Liu et al., 2004).

In einer weiteren Studie wurde ein cAMP- bzw. PKA- und EPAC-vermittelter, anti-proliferativer Effekt in glatten Bronchialmuskeln beschrieben (Roscioni et al., 2011b), welcher bei β_2 -Agonisten-Therapie möglicherweise induziert werden könnte. All diese Effekte weisen darauf hin, dass β_2 -Agonisten eine hemmende Wirkung auf profibrotische Eigenschaften ausüben und damit möglicherweise strukturellen Veränderungen im Rahmen des Remodeling bei Asthma und COPD entgegenwirken. Zu berücksichtigen bleibt jedoch, dass auch Studien vorliegen, die im Tiermodell die beschriebenen antifibrotischen Eigenschaften nicht reproduzieren konnten. So konnte die durch das Allergen Ovalbumin induzierte Kollagen- und Fibronectinsynthese durch den β_2 -Agonisten Salmeterol nicht aufgehoben werden (Vanacker et al., 2002). In einer weiteren Untersuchung wurde die pulmonale Produktion des profibrotischen Glykosaminoglykans Hyaluronsäure, das auch an der Kollagenregulation beteiligt ist, durch Albutamol sogar verstärkt (Lin et al., 2012). Diese inkonsistent erscheinenden Erkenntnisse machen weiterführende Experimente bezüglich genauer Wirkmechanismen und möglicher spezies- und zellspezifischer Unterschiede notwendig.

1.2.4 Risiken der β_2 -Adrenozeptoragonisten

Die guten antiobstruktiven Eigenschaften der β_2 -Agonisten und die Aussicht, mögliche antiinflammatorische und antifibrotische Effekte in Zukunft therapeutisch gezielt zu nutzen, machen ihren Einsatz attraktiv. Dennoch verfügen die β_2 -Agonisten auch über

langbekannte Nebenwirkungen wie Tachykardie, vermehrtes Schwitzen und Tremor (Lulich et al., 1986). Prinzipiell wird der dauerhafte Einsatz der β_2 -Agonisten zunehmend kontrovers diskutiert. Einerseits betonen verschiedene Studien die Sicherheit von kurzwirksamen (Dennis et al., 2000) beziehungsweise langwirksamen β_2 -Agonisten (Bateman et al., 2008) im Rahmen von Langzeittherapie und weisen beispielsweise auf geringere Exazerbationshäufigkeit unter β_2 -Agonistentherapie hin. Andererseits häufen sich in der Vergangenheit Studien, die darauf hindeuten, dass die Langzeittherapie mit β_2 -Agonisten Risiken birgt (Lin et al., 2012). So werden vermehrte Hospitalisierungen, Intubationen, Exazerbationsepisoden und sogar Todesfälle im Rahmen der β_2 -Agonistentherapie bei Asthma- und COPD-Patienten beschrieben (Cockcroft, 2006; Salpeter und Buckley, 2006; Salpeter et al., 2006, 2010). Es konnte beobachtet werden, dass sich insbesondere die bronchoprotektiven Eigenschaften der β_2 -Agonisten bei längerer Einnahme abschwächen, während die direkten, bronchodilatierenden Effekte weitgehend erhalten bleiben (Abisheganaden und Boushey, 1998; McGraw und Liggett, 2005). Ein aktueller Übersichtsartikel kommt nach Durchsicht von verschiedenen Studien zu dem Schluss, dass die Monotherapie mit langwirksamen β_2 -Adrenozeptoragonisten das Nebenwirkungsrisiko von Asthma-Patienten signifikant erhöht, eine Kombinationstherapie aus inhalativen Kortikosteroiden und langwirksamen β_2 -Agonisten hingegen Hospitalisierungen, sowie Asthma assoziierte lebensbedrohliche Ereignisse und Todesfälle vermindert (Rodrigo und Castro-Rodríguez, 2012). Deswegen wird für Asthma-Patienten eine Kombinationstherapie empfohlen (Rodrigo et al., 2009); für COPD-Patienten hingegen sollten Anticholingerika als Mittel der ersten Wahl dem Einsatz von langwirksamen β_2 -Agonisten vorgezogen werden (Salpeter, 2007).

1.2.5 Anpassungs- und Regulationsmechanismen

1.2.5.1 Desensibilisierung

Um die beobachteten klinischen Komplikationen zu verstehen, ist eine genauere Betrachtung der zellulären Mechanismen hilfreich. Oftmals wird auf die Relevanz von Toleranzentwicklung und damit einhergehendem Wirkungsverlust der β_2 -Agonisten hingewiesen. Die hierfür verantwortlichen zellulären Mechanismen bezeichnet man als homologe und heterologe Desensibilisierung. Definitionsgemäß wird die homologe

Desensibilisierung durch rezeptorbindende Agonisten ausgelöst, während die heterologe Desensibilisierung Agonisten unabhängig ist.

Im Rahmen der homologen Desensibilisierung kommt es nach Bindung eines Agonisten zur Konformationsänderung des Rezeptorproteins, woraufhin dieses verstärkt durch G-Protein-gekoppelte-Rezeptor-Kinasen (GRKs) an Serin- und Threoninresten phosphoryliert wird. Dadurch wird die Rezeptoraffinität für β -Arrestin erhöht. Durch Bindung des β -Arrestins wird der Rezeptor von seinem G-Protein entkoppelt und für die Internalisierung markiert (Krupnick und Benovic, 1998; McGraw und Liggett, 2005). Im Rahmen der Internalisierung wird der Rezeptor von der Plasmamembran ins Zellinnere abgeschnürt und kann später durch Resensibilisierung erneut mobilisiert oder durch Degradation abgebaut werden. Durch β -Arrestin werden außerdem verschiedene Proteine in die Mikrodomäne des Rezeptors rekrutiert (Benovic, 2002; McGraw und Liggett, 2005). Im Falle des β_2 -Adrenozeptors ist die Rekrutierung der Phosphodiesterase-4 relevant, welche durch cAMP-Abbau die β_2 -Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion reduziert (McGraw und Liggett, 2005; Perry et al., 2002).

Bei der heterologen Desensibilisierung wird der betroffene Rezeptor durch second-messenger-abhängige Proteinkinasen wie Proteinkinase A, und Proteinkinase C (PKC) phosphoryliert. Hierdurch wiederum wird eine reduzierte Kopplung von G-Protein und Rezeptor mit einhergehendem Wirkungsverlust induziert (Deshpande und Penn, 2006). Verschiedenste Substanzen, die zur Proteinkinasestimulation führen, können potentiell an der heterologen Desensibilisierung beteiligt sein. So können auch Mediatoren (z.B. Zytokine), die im Rahmen des entzündlichen Geschehens bei Asthma- und COPD-Patienten im Lungengewebe verstärkt präsent sind, den β_2 -Adrenozeptor desensibilisieren (Deshpande und Penn, 2006; Guo et al., 2005). Auch Rezeptoragonisten selbst können zusätzlich zur homologen Desensibilisierung über *second messenger* und Aktivierung der PKA/PKC heterologe Desensibilisierung fördern.

Welcher Desensibilisierungsmechanismus für einen bestimmten Rezeptor überwiegt, ist unter anderem zellspezifisch (Penn et al., 1998; Shih und Malbon, 1994). Für den β_2 -Rezeptor in glatten Muskelzellen der Lunge konnte gezeigt werden, dass sowohl homologe als auch PKA-vermittelte heterologe Desensibilisierung vorkommt (Penn et al., 1998).

1.2.5.2 Wechselwirkende Signalwege

Eine andere, ergänzende Theorie zielt darauf ab, dass Komplikationen in der Langzeittherapie mit β_2 -Agonisten nicht nur auf veränderte Rezeptorfunktion zurückzuführen sind, sondern auch die veränderten, nachgeschalteten Signalkaskaden Einfluss ausüben (McGraw und Liggett, 2005). In einer Studie wurden *knockout*-Mäuse ohne β -Adrenozeptor und Mäuse mit einer β_2 -Adrenozeptorüberexpression untersucht. Während die β -Adrenozeptor-*knockout*-Mäuse einen geringeren Methacholin-induzierten bronchokonstriktiven Effekt und eine geringere Expression von konstriktionsfördernden Elementen wie Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP3) und Phospholipase C- β 1 (PLC- β 1) aufwiesen, zeigten die Mäuse mit β_2 -Adrenozeptorüberexpression ein gesteigertes IP3- und PLC- β 1-Vorkommen.

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass durch β_2 -Agonisten-Therapie das Gleichgewicht zwischen bronchokonstriktionshemmenden und bronchokonstriktionsfördernden Elementen zu Gunsten der hemmenden Faktoren in Schiefelage gerät. Bei dauerhafter β_2 -Agonistentherapie komme es deswegen kompensatorisch zu einer Heraufregulierung bronchokonstriktiver Elemente (IP3, PLC- β 1). Häufigere klinische Dekompensationen bei Asthma- und COPD-Patienten könnten die Folge sein (McGraw und Liggett, 2005).

Auch wenn die genauen Mechanismen der Interaktionen zwischen β_2 -Adrenozeptoren und PLC-Signalweg noch nicht geklärt sind, bietet die Erkenntnis über bestehende Wechselwirkungen möglicherweise neue therapieoptimierende Ansätze. So könnte die β_2 -Agonistentherapie durch zusätzliche Verabreichung einer PLC- β 1-antagonisierender Substanz nebenwirkungsärmer werden.

1.2.5.3 Transkriptionelle Regulation

Wenn man die komplexe Regulation des Rezeptors und seiner Funktion betrachtet, spielen neben den erläuterten Desensibilisierungsprozessen auch weitere Mechanismen eine Rolle. So kann beispielsweise die Transkription des Rezeptorgens oder die Stabilität des mRNA-Produkts beeinflusst werden. Für die transkriptionelle Beeinflussung spielen unter anderem verschiedene, regulatorische Elemente in der Promoterregion des β_2 -Rezeptorgens eine entscheidende Rolle. In der 5' flankierenden

Region des β_2 -Rezeptorgens wurden Motive für CRE (*cAMP response element*), NF-IL6 (*nuclear factor interleukin-6*), AP2 (*activator protein-2*) und ein Steroid-bindendes Hexamer ausfindig gemacht (Fenech und Hall, 2002). Konkrete Aussagen über die transkriptionelle Beeinflussung des β_2 -Rezeptors liefern Studien, in denen eine Glucocorticoid-vermittelte Expressionssteigerung des β_2 -Rezeptors belegt wird (Mak et al., 1995; Nijkamp et al., 1992). Auch Schilddrüsenhormone können Einfluss auf die β_2 -Rezeptor-mRNA nehmen: es konnte gezeigt werden, dass gewebsabhängig die β_2 -mRNA-Level sowohl herauf- als auch herunterreguliert werden können (Lazar-Wesley et al., 1991). Darüber hinaus können auch β_2 -Agonisten selbst Einfluss auf die Expression des β_2 -Rezeptors nehmen. Es konnte beispielsweise an Vas deferens-Zellen des Hamsters eine durch den Agonisten Isoprenalin-vermittelte Reduktion der β_2 -Rezeptor-mRNA beobachtet werden (Hadcock und Malbon, 1988). Collins et al. hingegen zeigten mit Experimenten an glatten Muskelzellen des Hamsters erstmalig, dass die β_2 -Rezeptorexpression durch β -Rezeptoragonisten gesteigert werden kann (Collins et al., 1989). Es wurde ein zeitabhängiger Effekt von Epinephrin auf die β_2 -Adrenozeptorexpression beobachtet: bei einer Agonistenexposition von 30-120 Minuten ergab sich ein drei- bis vierfacher Anstieg der β_2 -mRNA-Menge. Längere Exposition (24 Stunden) führte jedoch zu einem Abfall um 50 % vom Ausgangswert. Da der β_2 -Adrenozeptorantagonist Propranolol die Epinephrin-Effekte blockierte, ein α_1 -Antagonist jedoch nicht, kann von einem β_2 -Rezeptor vermitteltem Effekt ausgegangen werden. Da das cAMP-Analogon Bt2-cAMP und der Adenylatzyklaseaktivator Forskolin zu vergleichbaren Effekten wie Epinephrin führten, lässt die Beteiligung des Botenstoffs cAMP an dem Regulationsmechanismus vermuten. Später wurde auch gezeigt, dass die cAMP-vermittelte, transkriptionelle Regulation mit dem Vorkommen einer CRE-Sequenz im Promoter des β_2 -Adrenozeptorgens verknüpft ist (Collins et al., 1990). Von Collins wurde außerdem beobachtet, dass die abfallende β_2 -Rezeptor-mRNA-Menge im Rahmen längerer Epinephrinexposition mit einer korrespondierenden Abnahme der β_2 -Rezeptorzahl in der Plasmamembran einhergeht. Die erhöhte β_2 -Rezeptor-mRNA-Menge bei kürzerer Agonistenexposition korrelierte jedoch nicht mit einem Anstieg der β_2 -Rezeptorzahl in der Plasmamembran. Diese Beobachtung wurde so gedeutet, dass sich bei kurzzeitiger Agonistenexposition Desensibilisierungsvorgänge (Rezeptorinternalisierung und ggf. Rezeptordegradation im Rahmen von homologer Desensi-

bilisierung) und expressionssteigernde Mechanismen netto die Waagschale halten und daher die verfügbaren Rezeptoren in der Plasmamembran annähernd konstant bleiben. Dieser Mechanismus würde physiologisch gesehen garantieren, dass Zellen auf katecholaminerge Stimulation wiederholt reagieren können (Collins et al., 1989). Mechanismen zur transkriptionellen Heraufregulation des β_2 -Rezeptors in Lungenzellen könnten damit wichtige Faktoren sein, die möglicherweise auch für einen langzeitigen Therapieerfolg bei Asthma- und COPD-Patienten von Bedeutung sind. Es fehlt jedoch bislang ein umfassendes Verständnis über die Regulationsprozesse der β_2 -Rezeptor-expression.

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Einer solchen, genaueren Untersuchung der Regulationsmechanismen der β_2 -Rezeptor-expression widmet sich die Forschungsgruppe um Racké. Aufgrund ihrer guten Kultivierbarkeit und ihrer Bedeutung für Remodelingvorgänge bei Asthma- und COPD-Patienten werden humane Lungenfibroblasten untersucht. Wie bereits erläutert konnten die Expression von β_2 -Adrenozeptoren auf diesem Zelltyp und hierüber vermittelte antifibrotische Eigenschaften schon im Vorfeld gezeigt werden (Laymel et al., 2011). Bisherige Untersuchungen des hiesigen Labors deuten darauf hin, dass die Expression von β_2 -Adrenozeptoren in humanen Lungenfibroblasten stark auf Transkriptionsebene reguliert wird: es wurde eine relativ kurze Halbwertszeit der β_2 -Rezeptor-mRNA von unter 25 Minuten beobachtet (Racké et al., 2011). Es ist davon auszugehen, dass diese kurze Halbwertszeit eine schnelle Veränderung der mRNA-Menge im Rahmen von transkriptioneller Regulation ermöglicht. Weiterhin wurde durch Experimente unseres Labors gezeigt, dass die β_2 -Rezeptor-mRNA durch Kurzzeitexposition mit β_2 -Agonisten heraufreguliert wird. Auch zeigte sich, dass der Adenylatzyklaseaktivator Forskolin diesen Effekt nachahmt, was eine Beteiligung des Botenstoffs cAMP an der Regulation vermuten lässt. Der Phosphodiesterase-Inhibitor IBMX (3-Isobutyl-1-Methylxanthin) hingegen zeigte bislang keinen Effekt auf die β_2 -Rezeptor-mRNA-Menge. Anknüpfend an diese bisherigen Ergebnisse soll die weitere Untersuchung der Expressionsregulation des β_2 -Adrenozeptors in humanen Lungenfibroblasten Gegenstand dieser Arbeit sein.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

<i>Agarose NEEO Roti®</i> Garose	Roth
Beta-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Beta-Actin Primer	MWG
Borsäure	Roth
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich
Buffer RT, 10x (Omniscript® RT Kit)	Qiagen
Destilliertes Wasser (RNase/ DNase frei) GIBCO®	Invitrogen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
<i>DNA Ladder Ready-Load 100 bp</i>	Invitrogen
dNTP-Mix, 10 mM	Fermentas
dNTP-Mix, 5 mM (Omniscript® RT Kit)	Qiagen
Ethanol, Rotipuran® ≥ 99,8 %, p.a.	Roth
Ethidiumbromid (1 %ig in Wasser)	Sigma-Aldrich
Etylendiamintetraacetat (EDTA), Na-Salz	Sigma-Aldrich
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom
<i>Ficoll 400®</i>	Sigma-Aldrich
<i>Frekanol Freka-NOL AF</i>	Dr. Schumacher
GAPDH-Primer	MWG
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck
MDB (<i>Membrane Desalting Buffer</i>) (<i>Nucleo Spin® RNA II</i>)	Macherey-Nagel
MEM-Basismedium	PAA
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck
<i>Non-essential amino acids</i> (NEAA, 100x)	PAA

Oligonukleotide (dT ₁₈)	MWG
<i>Omniscript RT (Omniscript[®] RT Kit)</i>	Qiagen
Penicillin/Streptomycin-Lösung (10000 U/ml, 10 mg/ml)	Sigma-Aldrich
Qhbeta2- Primer	MWG
<i>RA1 Lysis Buffer (Nucleo Spin[®] RNA II)</i>	Macherey-Nagel
<i>RA2 Wash Buffer (Nucleo Spin[®] RNA II)</i>	Macherey-Nagel
<i>RA3 Wash Buffer (Nucleo Spin[®] RNA II)</i>	Macherey-Nagel
<i>rDNase (Nucleo Spin[®] RNA II)</i>	Macherey-Nagel
<i>Reaction Buffer for rDNase (Nucleo Spin[®] RNA II)</i>	Macherey-Nagel
<i>RNase Inhibitor (Ribo Lock[®] 40 U/μl)</i>	Fermentas
<i>RNase free H₂O (Nucleo Spin[®] RNA II)</i>	Macherey-Nagel
<i>RNase free H₂O (Omniscript[®] RT Kit)</i>	Qiagen
Salzsäure (konz. HCl)	Merck
<i>Power SYBR[®] Green (Real Time PCR)</i>	Applied Biosystems
<i>Sodium Pyruvat Solution (SPS) 100 mM</i>	PAA
Taq DNA Polymerase	Invitrogen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth
Trypanblau (0,4 %)	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA Lösung (10x)	Sigma-Aldrich

2.1.2 Testsubstanzen

Actinomycin D	Sigma-Aldrich
3 mM Stocklösung in Methanol gelöst	
Choleratoxin	Sigma-Aldrich
Stocklösung von 1 mg/ml in H ₂ O gelöst	
Cycloheximid	Sigma-Aldrich
30 mM Stocklösung in Ethanol gelöst	

EPAC-Agonist*8-CPT-2'-O-Me-cAMP*5 mM Stocklösung in H₂O gelöst

Biolog

FormoterolFrisch eingewogen in H₂O gelöst

Astra Zeneca

Forskolin10 mM Stocklösung in H₂O gelöst

Sigma-Aldrich

H89*N-[2-(p-Bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide dihydrochloride*10 mM Stocklösung in H₂O gelöst

Sigma-Aldrich

IBMX*3-Isobutyl-1-methylxanthine*

100 mM Stocklösung in DMSO gelöst

Sigma Aldrich

Kt 5720*(9S,10S,12R)-2,3,9,10,11,12-Hexahydro-10-hydroxy-9-methyl-1-oxo-9,12-epoxy-1H-diindolo**[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]pyrrolo[3,4-i][1,6]**benzodiazocine-10-carboxylic acid hexyl ester*

300 mM Stocklösung in DMSO gelöst

Calbiochem

Olodaterol

10 mM Stocklösung in DMSO gelöst

Boehringer Ingelheim

PKA- Agonist*6-Bnz-cAMP*10 mM Stocklösung in H₂O gelöst

Biolog

SQ 22,536

Sigma-Aldrich

*9-(Tetrahydro-2-furanyl)-9H-purin-6-amine*10 mM Stocklösung in H₂O gelöst**St-Ht31**

Promega Corporation

InCELLect AKAP St-Ht31 Inhibitor Peptide

500 µM und 5 mM Stocklösung in Zellmedium verdünnt

St-Ht31 P

Promega Corporation

InCELLect St-Ht31P Control Peptide

500 µM und 5 mM Stocklösung in Zellmedium verdünnt

Zardaverine

Tocris Bioscience

10 mM Stocklösung in DMSO gelöst

2.1.3 Puffer, Lösungen, feindisperse Systeme

Agarosegel (klein; groß)

1,2 g; 1,8 g *Agarose NEEO* in
 100 ml; 150 ml TBE (0,5x)
 +3,33 µl; 5,0 µl
 Ethidiumbromidlösung (1 %ig in
 Wasser)

DNA-Probenpuffer (PCR)

15 % (m/V) *Ficoll 400*[®] in
 TBE (0,5x)
 0,25 % (m/V) Bromphenolblau

PBS (10x)	1,37 M NaCl 26,8 mM KCl 81 mM Na ₂ HPO ₄ 14,7 mM KH ₂ PO ₄ → auf 1000 ml mit H ₂ O auffüllen
PBS (1x)	1 Teil PBS (10x) 9 Teile H ₂ O
Penicillin/Streptomycin-Lösung	10000 U/ml Penicillin G 10 mg/ml Streptomycin
TBE (5x)	0,45 M Tris (54,9 g) 0,45 M Borsäure (27,5 g) 0,012 M EDTA (4,65 g) → auf 1000 ml mit H ₂ O auffüllen
TBE (0,5x)	1 Teil TBE (5x) 9 Teile H ₂ O
Trypanblau-Lösung (0,15 %)	3 Teile 0,4 % Trypanblau 5 Teile PBS (1x)
Trypsin-EDTA (1x)	1 Teil Trypsin-EDTA (10x) 9 Teile PBS (1x)

2.1.4 Primer

- Primer für die konventionelle PCR

Housekeeper β -Actin

r- β -Actin-sense Sequenz: 5'-TTC TAC AAT GAG CTG CGT GTG GC-3'

h- β -Actin-antisense Sequenz: 5'-CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCT GC-3'

Annealing-Temperatur: 56°C

Zyklusanzahl für Amplifizierung: 23-25

- Primer für die Real-Time PCR

Housekeeper GAPDH

GAPDH-sense Sequenz: 5'-CTG CAC CAC CAA CTG CTT AGC-3'

GAPDH-antisense Sequenz: 5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG-3'

Annealing-Temperatur: 54°C

Zyklusanzahl für Amplifizierung: 35-40

Zielgen β_2 -Adrenozeptor (qhbeta2)

qhbeta2-sense Sequenz: 5'-GAT TTC AGG ATT GCC TTC CAG-3'

qhebta2-antisense Sequenz: 5'-GTG ATA TCC ACT CTG CTC CCC-3'

Annealing-Temperatur: 59°C

Zyklusanzahl für Amplifizierung: 35-40

2.1.5 Zelllinie und Nährmedium

- **Fibroblastenlinie MRC-5**

Bei der Zelllinie MRC-5 (*Medical Research Council- 5*) handelt es sich um humane Lungenfibroblasten aus einem männlichen, kaukasischen Fetus. Die Zelllinie wurde 1966 initiiert (Charge: 57851676; CCL-171, LGC Standards) und für den *Medical Research Council* in Großbritannien produziert.

Die Verdopplungszeit der Zellen liegt bei 19 Stunden, wobei die Seneszenz nach 44 Verdopplungszeiten (entspricht 30 Tagen) eintritt.

Die Zellen wurden in *Minimal Essential Medium Eagle (MEM) with Earle's Salt* (siehe unten) kultiviert.

- **Zellmedium: MEM with Earle's Salt**

Zur Kultivierung der MRC-5 Zellen wurde das Zellmedium *Minimal Essential Medium Eagle (MEM) with Earle's Salt* von PAA verwendet. Das Medium enthält anorganische Salze, Aminosäuren (L-Glutamin-Anteil erhöht), Vitamine, D-Glukose und Phenolrot.

Je 500 ml Medium wurde folgendes zugegeben:

- 5 ml SPS (*Pyruvat Solution*) 100 mM
- 5 ml NEAA (*Non-essential amino acids*) (100x)
- 5 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung (10000 U/ml, 10 mg/ml)

Für das + 10 % FKS-Medium zusätzlich:

- 50 ml FKS (fetales Kälberserum)

2.1.6 Software

- *Remote Capture 2.7* (Canon): Fotoaufnahmesystem für Gelelektrophorese
- *Irfanview 3.99*: Bildformatkonvertierung und Bilddarstellung
- Software von *Mx300PTM Real-Time PCR-System* (Stratagene): Real-Time PCR
- *StepOne Software v2.2* (Applied Biosystems): Real-Time PCR
- *Microsoft Excel 2003 bzw. 2010* (Microsoft): Auswertung der Ergebnisse
- *Microsoft Word 2003 bzw. 2010* (Microsoft): Textverarbeitung
- *Graph Pad Prism V 5.0* (Graph Pad Software): statistische Auswertung und graphische Darstellungen
- *JChemPaint 3.3-1207* (Freeware): Strukturformel-Editor
- *Citavi 3.2.0* (Swiss Academic Software GmbH): Zitierprogramm

2.2 Methoden

2.2.1 Zellversorgung

Die verwendeten MRC-5 Lungenfibroblasten wurden in MEM-Medium mit Zusatz von 10 % FKS (fetales Kälberserum), Antibiotikallösung (Penicillin-Streptomycin-Lösung), nicht-essentiellen Aminosäuren (NEEA) und Natriumpyrosulfat (SPS) im Brutschrank (*Hera Cell 150*, Thermo Scientific) bei 37°C, 5 % CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Die Versorgung der Zellen erfolgte stets an einer Sicherheitswerkbank (*MSC 1.2 Advantage*, Thermo Scientific), wobei alle verwendeten Materialien vor Gebrauch sterilisiert/ autoklaviert und desinfiziert wurden.

Neu gelieferte MRC-5 Zellchargen wurden entweder kryokonserviert oder direkt für den Gebrauch in eine 175 mm² Zellkulturflasche gegeben, die bereits 25 ml Nährmedium (MEM + 10 % FKS) enthielt und im Brutschrank vorinkubiert wurde. Die Zellen entsprachen zu diesem Zeitpunkt der Passage 0 (noch nie trypsinisiert). Nach ca. 5-7 Tagen Wachstumsphase lag die Zellkonfluenz in der Flasche bei 90-100 %. Die adhärent wachsenden Zellen wurden durch Trypsinierung wieder in Suspension gebracht. Die Zellen entsprachen dann der Passage 1 (einmal trypsinisiert). Die Zellen wurden nun entweder tiefgekühlt konserviert, indem man die Zellen im Einfrierröhrchen nach Frostschutzmittelzugabe in Form von 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid) zunächst für 24 Stunden bei -80°C und schließlich zur endgültigen Lagerung bei -196°C im Flüssigstickstofftiefkühler lagerte, oder die Zellen wurden direkt für die Aussaat in Experimentierschalen verwendet. Die Zellen wurden maximal bis zur Passage 10 verwendet (entspricht insgesamt 10 Trypsinierungen).

Vor der Trypsinierung der konfluenten Zellkulturflasche wurden Medium, Trypsinlösung und PBS im Wasserbad (37°C) vortemperiert. Das Medium wurde aus der Zellkulturflasche entnommen und die Flasche zweifach mit 1 %iger PBS-Lösung steril gespült. Zum Ablösen der adhärent wachsenden Zellen wurden für 10 Sekunden 10 ml Trypsin (5 ml 1x Trypsin-EDTA + 5 ml PBS oder 2 ml 1x Trypsin-EDTA + 8 ml PBS) zugegeben und direkt wieder abgenommen. Unter dem Mikroskop konnte der Ablösungsvorgang beobachtet werden: die Fibroblasten rundeten sich ab und verloren ihre Adhärenz. Gegebenenfalls konnte der Ablösungsvorgang durch Klopfen auf die

Kulturflasche unterstützt werden. Durch Zugabe von 10 ml Medium (MEM + 10 % FKS) wurde die Trypsinwirkung aufgehoben. Der Flaschenboden wurde durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit der Mediumflüssigkeit gespült, damit möglichst viele Zellen in die Zellsuspension überführt wurden. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 13 ml-Kunststoffröhrchen pipettiert und 5 Minuten bei 1000 rpm (*rotations per minute*) beziehungsweise 201 *g* (*g* = Gravitationsbeschleunigung auf der Erdoberfläche) zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgegossen und das entstandene Zellpellet mit 1-3 ml Medium (MEM + 10 % FKS) resuspendiert. Aus dieser Zellsuspension wurde eine 1:5-Verdünnung mit Trypanblau (0,15 %) hergestellt (20 µl Zellsuspension + 80 µl Trypanblau) und in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Durch das Anfärben mit Trypanblau können vitale von abgestorbenen Zellen unterschieden werden, da nur Zellen mit beschädigter Zellmembran den Farbstoff aufnehmen. Die vitalen Zellen wurden unter dem Mikroskop ausgezählt, um anschließend die Zellkonzentration zu errechnen.

Zu Kultivierung einer neuen 175 mm² Zellkulturflasche wurden 0,5-1,0 Millionen Zellen ausgesät und 25 ml Medium (MEM + 10 % FKS) zugegeben. Um eine Zellkonfluenz von ca. 90-100 % zu erreichen, mussten die Zellen wieder etwa eine Woche im Brutschrank wachsen.

Für die Versuche wurden 35 mm-Einzelschalen oder 6-Well-Platten verwendet. Es wurden 0,3 Millionen Zellen pro Schale ausgesät, mit 2 ml Medium (MEM + 10 % FKS) versetzt und in den Brutschrank überführt. Nach 24 Stunden wurde das Medium abpipettiert und durch 2 ml wachstumsfaktorfreies Medium (MEM – FKS) ersetzt. Diese so genannte Hungerphase dauerte weitere 24 Stunden.

Im nächsten Schritt wurden die jeweiligen Testsubstanzen zum Medium in den Probeschalen gegeben und für die entsprechenden Zeiten inkubiert. Wurden die Testsubstanzen in Lösungsmitteln mit möglichem Eigeneffekt (z.B. DMSO, Ethanol, Methanol) gelöst, so wurde der Kontrolle eine äquivalente Menge des entsprechenden Lösungsmittels zugefügt. Ansonsten wurde der Kontrolle lediglich destilliertes Wasser zugefügt.

2.2.2 Zellyse

Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurden die Probeschalen aus dem Brutschrank entnommen und das Medium-Substanzgemisch abgesaugt.

Für Pipettierarbeiten während der Zellyse, RNA-Präparation sowie der Reversen Transkription wurden Pipettenspitzen mit Filtereinsatz verwendet, um Verunreinigungen zu vermeiden, da die einzelsträngige RNA sehr anfällig für enzymatischen Abbau durch ubiquitäre RNasen ist.

Durch Zugabe von 350 µl Lysispuffer-Mix (bestehend aus einem Teil β -Mercaptoethanol und 100 Teilen Lysispuffer RA1), mehrfaches Auf- und Abpipettieren und Spülen der Probeschalen wurden die Zellen lysiert. Der Lysispuffer inaktiviert RNasen und ermöglicht optimale Bedingungen, damit die RNA während der RNA-Präparation an die Membran der RNA-Säule binden kann.

Die lysierten Zellen wurden nun entweder direkt für die RNA-Präparation verwendet oder zunächst bei -80°C eingefroren.

2.2.3 RNA-Präparation

Die Methode zur Isolierung der Zell-RNA beruht darauf, dass die RNA an eine Silicagel-Membran gebunden wird, durch einen DNase-Verdau von DNA-Kontaminationen und durch verschiedene Waschschriffe von Salzen, Metaboliten und zellulären Komponenten befreit wird und schließlich mittels RNase freiem-Wasser von der Membran eluiert werden kann. Die verwendeten Materialien, Lösungen und Enzyme zur Isolierung der Zell-mRNA stammten aus dem RNA-Präparationskit *Nucleo Spin[®]RNA II* von Macherey-Nagel.

Das Zellysate der einzelnen Proben wurde jeweils in eine Schreddersäule überführt und in einem Sammelgefäß für zwei Minuten bei 14000 rpm beziehungsweise 19941 g zentrifugiert. Die Schreddersäulen wurden verworfen und zu den Zellysaten in den Sammelgefäßen wurden je 350 µl Ethanol (70 %) zugegeben. Das Ethanol-Zellysategemisch jeder Probe wurde jeweils in eine RNA-Säule pipettiert, woraufhin für eine Minute bei 10398 rpm beziehungsweise 11000 g zentrifugiert wurde. Zur RNA-Säule wurden nach Platzierung in ein neues Sammelgefäß 350 µl MDB (*membran desalting*

buffer) zugegeben und es wurde ein weiteres Mal bei 11000 *g* für eine Minute zentrifugiert. Die RNA-Säule kam wiederum in ein neues Sammelgefäß und es wurde ein rDNase-Mix, bestehend aus einem Teil rDNase und neun Teilen *Buffer br DNase*, angesetzt, wovon jeweils 95 µl direkt über die Membran der RNA-Säulen pipettiert wurden. Nach 15-minütiger Inkubationszeit für den DNA-Verdau wurden 200 µl RA2 Waschpuffer zu den RNA-Säulen zugegeben und die RNA-Säulen für eine Minute bei 11000 *g* zentrifugiert. Die RNA-Säulen wurden erneut in neue Sammelgefäße überführt, es wurden 600 µl RA3 Waschpuffer hinzugefügt und die Proben eine Minute bei 11000 *g* zentrifugiert. Die Filtrate wurden verworfen, man fügte 250 µl RA3 Waschpuffer zu den RNA-Säulen hinzu und zentrifugierte sie zwei Minuten bei 11000 *g*. Es folgte ein Trocknungsschritt, bei dem die RNA-Säulen in Reagiergefäße platziert wurden und die RNA-Säulen anschließend bei 19941 *g* eine Minute zentrifugiert wurden. Die RNA-Säulen wurden nun in mit den Probenmerkmalen beschriftete Reagiergefäße gesetzt und es wurden 30-50 µl RNase-freies Wasser auf die Membran der RNA-Säulen pipettiert, um die RNA zu eluieren. Die Proben wurden eine Minute bei 11000 *g* zentrifugiert und anschließend bei -80°C eingefroren.

2.2.4 Photometermessung

Es wurden 1:10-Verdünnungen der RNA-Proben hergestellt (8 µl RNA + 72 µl RNase-freies Wasser). Die RNA-Konzentrationen wurden durch Messung der Absorption bei 260 nm mit dem *Photometer SmartSpect™ Plus* von Biorad ermittelt.

Das Photometer wurde dafür zunächst mittels des verwendeten Verdünnungswassers kalibriert (Referenzabsorption). Anschließend wurden die RNA-Konzentrationen der Proben gemessen, wobei die Messküvette nach jeder Probenmessung mit RNase-freiem Wasser gespült wurde.

Das Photometer gibt neben den Absorptionswerten (Absorption 260 nm) und den berechneten Konzentrationen zusätzlich den Quotient aus Absorption bei 260 nm und 280 nm an. Dieser Wert sollte etwa zwischen 1,7 und 1,9 liegen. Liegt der Wert unter 1,7 kann dies Hinweis für eine Proteinverunreinigung sein, liegt er über 1,9 kann dies auf eine DNA-Verunreinigung hindeuten.

2.2.5 Reverse Transkription

Ziel der Reversen Transkription ist es, aus den einzelsträngigen RNA-Molekülen enzymatisch doppelsträngige DNA zu synthetisieren. Die so gewonnene artifizielle DNA wird auch cDNA (*complementary DNA*) genannt. Die Materialien, Lösungen und Enzyme für die Reverse Transkription stammten aus dem *Omniscript[®]RT Kit* von Qiagen. Mithilfe der photometrisch bestimmten RNA-Konzentrationen wurde für jede Probe das Volumen ermittelt, das einer RNA Menge von 1 µg entspricht. Dieses jeweilige Volumen wurde auf Eis in ein 0,5er-Reagiergefäß pipettiert; der Rest der RNA-Proben wurde bei -80°C aufbewahrt. Durch Zufügen einer entsprechenden Volumenmenge RNase-freien Wassers wurde ein Gesamtvolumen von 12,5 µl erreicht. Pro 12,5 µl Probenverdünnung wurden 7,5 µl Mastermix (2 µl RT-10x Puffer, 2 µl 5 mM dNTPs, 2 µl Oligo-dT₁₈-Primer, 0,375 µl RT-1x Puffer, 0,125 µl *RiboLock RNase-Inhibitor* und 1 µl *Omniscript Enzym*) beigefügt. Die Proben wurden für 60 Minuten bei 37°C im Thermocycler (*Thermomixer compact 5350*, Eppendorf; *Thermocycler Hybaid TR1*, MWG) inkubiert. Es folgte eine fünfminütige Inkubation bei 93°C im Thermocycler oder im Wasserbad, woraufhin die Proben zunächst auf Eis gestellt wurden. Die Proben wurden anschließend kurz zentrifugiert und es wurden jeweils 80 µl H₂O-bidest zugegeben. Da die Proben fortan doppelsträngige cDNA enthielten, konnten fortan herkömmliche, nicht-gestopfte Pipettenspitzen verwendet werden. Die cDNA-Proben wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.2.6 Konventionelle PCR

Die von Mullis und Kollegen entwickelte Methode der PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ermöglicht die Amplifikation eines DNA-Abschnitts (Mullis et al., 1986). Die verwendeten Primer markieren hierbei den Anfang und das Ende der zu amplifizierenden Sequenz auf den komplementären Strängen. Bei der eingesetzten Taq-Polymerase handelt es sich um ein Enzym aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*, das auch bei hohen Temperaturen (Optimum bei etwa 70°C) zuverlässig arbeitet. Durch ein zyklisches Temperaturprotokoll werden die DNA-Stränge zunächst getrennt (Denaturierungsphase), dann lagern sich die Primer an (*annealing- bzw.* Hybridisierungs-Phase), worauf hin mittels Taq-Polymerase komplementäre Stränge synthetisiert werden (Elongationsphase). Dieser Zyklus wird einige Male wiederholt (siehe Temperaturprotokoll unten).

Der Amplifizierungsprozess folgt dabei dem Gesetz: $f(x) = n * 2^x$, wobei n die Ausgangszahl der DNA-Stränge und x die Anzahl der Zyklen darstellt. Durch die konventionelle PCR und anschließende Gelelektrophorese können bestimmte DNA-Sequenzen qualitativ und semi-quantitativ nachgewiesen werden.

Bei der vorliegenden Arbeit wurde das *housekeeper*-Gen β -Actin amplifiziert. *housekeeper*-Gene werden per definitionem von allen Zellen annähernd gleich stark exprimiert. Durch Amplifikation und anschließende Gelelektrophorese mit Visualisierung homogener β -Actin-Banden konnte daher kontrolliert werden, ob alle Proben über eine gleich starke Expression des *housekeeper*-Gens verfügen und ob somit in jeder Probe äquivalente Mengen RNA in cDNA umgesetzt wurden (entspricht einer quantitativ erfolgreichen RNA-Präparation und Reversen Transkription).

Mittels Versuchsprotokoll wurden die Volumina für den Mastermix berechnet und pipettiert, wobei die Taq-Polymerase als letztes zugefügt wurde. Pro 5 μ l Probe wurden 32,2 μ l H₂O-bidest, 5 μ l 10x *PCR buffer*, 1,5 μ l MgCl₂, 1 μ l 10 mM dNTPs, 2,5 μ l β -Actin-sense, 2,5 μ l β -Actin-antisense und 0,3 μ l Taq DNA Polymerase in 8er-Reihenreagiergefäße zugefügt. Die Reihenreagiergefäße wurden mit Deckeln verschlossen, woraufhin die Proben kurz zentrifugiert und anschließend im *Thermal Cycler 580 BR* von BioRad nach folgendem Protokoll inkubiert wurden:

• Erste Denaturierung	94°C	3 Minuten	
• Denaturierung	94°C	45 Sekunden	} 23 oder 25 Zyklen
• Primer-Anlagerung	56°C	30 Sekunden	
• Elongation	72°C	1 Minute	
• Abschließende Elongation	72°C	10 Minuten	
• Endtemperatur	4°C		

2.2.7 Gelelektrophorese

Um die Amplifikation des *housekeeper*-Gens β -Actin nach der konventionellen PCR zu visualisieren, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt.

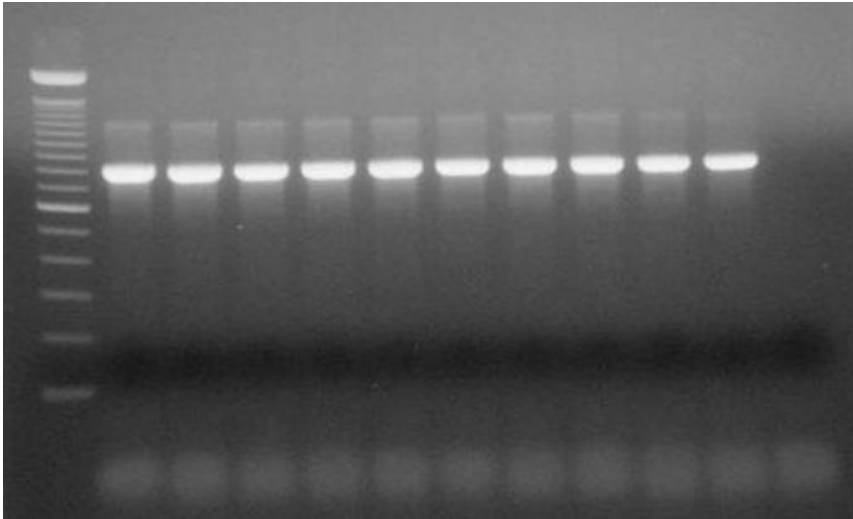
Bei diesem Verfahren wird die amplifizierte DNA in die Taschen eines Agarosegels pipettiert, welches im Wasserbad einem Stromfeld ausgesetzt wird. Die negativ-

geladenen DNA-Moleküle wandern entlang des Stromfelds Richtung positiv geladener Anode, wobei die Strecke, welche von der DNA zurückgelegt wird, von der Molekülgröße abhängt: DNA-Moleküle mit vielen Basenpaaren wandern eine kürzere Strecke als DNA-Moleküle mit wenig Basenpaaren.

Die Wandergeschwindigkeit ist dabei abhängig von der Stärke des elektrischen Feldes, der Nettoladung, Größe und Konformation der Moleküle, sowie der Ionenstärke, der Porengröße und der Temperatur der verwendeten Gelmatrix. Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid ist positiv geladen und wandert im Stromfeld entgegengesetzt zur DNA, wobei das Ethidiumbromid bei Kontakt mit den DNA-Doppelsträngen mit diesen interkaliert. Die fluoreszierenden Eigenschaften von Ethidiumbromid ermöglichen bei der späteren Betrachtung unter UV-Licht somit die Sichtbarmachung der DNA-Banden. Durch die Bandendicke kann eine semi-quantitative Aussage über das amplifizierte DNA-Produkt (β -Actin) gemacht werden.

In eine der Geltaschen wurde ein Basenpaar-Marker (*100 bp-ladder*) pipettiert, der Fragmente verschiedener Basenpaaranzahl in 100 bp-Schritten enthielt und so zur Orientierung diente. Die β -Actin-Bande erschien auf Höhe von 812 Basenpaaren. Zur Herstellung des Gels wurden 1,2 g (kleines Gel, bis zu 12 Proben) bzw. 1,8 g (großes Gel, bis zu 24 Proben) Agarose in einem Glaskolben abgewogen, mit 100 ml bzw. 150 ml 0,5x TBE Puffer versetzt und in der Mikrowelle erwärmt bis sich die Agarose vollständig gelöst hat. Es wurden 3,3 μ l bzw. 5,0 μ l Ethidiumbromidlösung hinzugefügt und durch Schwenken des Kolbens vermischt. Nachdem die Gelkammer und der 12er-Gelkamm (bzw. zwei Gelkämme beim großen Gel) in einem Metallgestell fixiert wurden, wurde das Gelgemisch hineingegossen. Vor Verwendung ruhte das Gel etwa für eine Stunde zur Erkaltung. Der Gelkamm wurde dann vorsichtig entfernt, die Gelkammer mit dem Gel aus dem Metallgestell gelöst und in das Gelelektrophoresebad gesetzt. Das Bad wurde mit 0,5x TBE Puffer so hoch gefüllt, dass die Geloberfläche gut benetzt war. In eine der Geltaschen wurde zur Orientierung 15 μ l Basenpaar-Marker (*100 bp ladder*) pipettiert. Zu den PCR-Proben wurden jeweils 5 μ l PCR-Puffer zugefügt, um deren Dichte zu erhöhen und damit ein Absinken der Proben in die Geltasche zu ermöglichen. Nach Mischen wurden jeweils 30 μ l der Proben vorsichtig in die Geltaschen pipettiert.

Die Gelelektrophorese wurde nun bei einer Stromstärke von 60-70 mA durchgeführt. Anschließend wurde unter UV-Licht mithilfe des Programms *Remote Capture 2.7* (Canon) ein Foto der Banden aufgenommen (Abb. 2).



Marker 1 2 3 4 5 6 7 8 9 + -

Abb.2: β -Actin Banden

Foto der β -Actin Banden von neun Proben (1-9) sowie einer Positivkontrolle (+) und einer Negativkontrolle (-) nach qualitativer/ semi-quantitativer PCR und Gelelektrophorese. Zur Orientierung ist ein Basenpaar-Marker aufgetragen (Marker).

2.2.8 Real-Time PCR

Durch die Real-Time PCR (Echtzeit-Polymerasekettenreaktion) ist im Vergleich zur konventionellen PCR eine Quantifizierung der amplifizierten DNA-Sequenzen möglich.

Neben dem Zielgen des β_2 -Adrenozeptors (*qhbeta-2*) wurde auch das *housekeeper*-Gen GAPDH (3-Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) amplifiziert. Durch die zusätzliche Quantifizierung des *housekeeper*-Gens ist es möglich die Zielgenmenge auf den *housekeeper* zu beziehen; somit können probenspezifische cDNA-Schwankungen herausgerechnet und eine relative Zielgenmenge ermittelt werden.

Bei der vorliegenden Arbeit kam die *SYBR[®]Green*-Methode zum Einsatz. Bei dieser Methode binden fluoreszierende Bestandteile des *SYBR[®]Green* nach Anlagerung der Primer und Synthese komplementärer DNA-Stränge an die entstehenden doppelsträngige DNA. Die Fluoreszenzstärke wird am Ende jedes Amplifikationszyklus

gemessen und erlaubt durch Proportionalität zur Menge des gebildeten PCR-Produkts eine quantitative Aussage.

Es wurde ein *housekeeper*-Mastermix (enthält H₂O-bidest, GAPDH-s, GAPDH-as, *Power SYBR[®]Green*) sowie ein Zielgen-Mastermix (enthält H₂O-bidest, qhbeta2-s, qhbeta2-as, *Power SYBR[®]Green*) hergestellt. Die cDNA-Proben wurden 1:3 verdünnt (14 µl cDNA, 28 µl H₂O-bidest) und gründlich gemischt. Ein Teil jeder verdünnten cDNA-Probe wurde mit dem GAPDH-Mastermix, der andere Teil mit dem qhbeta2-Mastermix versetzt, wobei pro 5 µl verdünnter cDNA-Probe der Mastermix aus 7,5 µl *SYBR[®]Green*, 0,45 µl Primer-sense, 0,45 µl Primer-antisense und 1,6 µl H₂O-bidest bestand. Es erfolgten Dreifachbestimmungen von jedem Mastermix-Probengemisch. Dafür wurden in je drei Vertiefungen einer 96er-PCR-Platte 15 µl eines Probengemischs pipettiert. Für den PCR-Lauf mit dem PCR-Gerät *MX 3000P* (Stratagene) bzw. *StepOne Plus* (Applied Biosystems) galt folgendes Temperaturprofil:

- | | | | |
|-------------------------|----------------------------------|-------------|----------------|
| • Initiale Aktivierung | 95°C | 10 Minuten | |
| • Denaturierung | 95°C | 30 Sekunden | } 35-40 Zyklen |
| • Annealing | 59°C | 30 Sekunden | |
| • Elongation | 72°C | 30 Sekunden | |
| • Schmelzkurvenanalytik | 59°C in 0,3°C Schritten bis 95°C | | |

Die Schmelzkurvenanalytik ist wichtig, um Aussagen über die Spezifität des Amplifizierungsprozesses zu treffen. Die Schmelzkurve zeigt die temperaturabhängige Denaturierung des doppelsträngigen Amplifizierungsprodukts, welche durch Freisetzung des *SYBR[®]Green* Farbstoffs mit einer Fluoreszenzabnahme einhergeht und damit detektiert werden kann. Da die Schmelztemperatur aufgrund von Fragmentlänge und Anteil an Guanin und Cytosin spezifisch für ein Amplifizierungsprodukt ist, konnte durch Analyse der Schmelzkurve überprüft werden, ob neben dem gewünschten Produkt zusätzliche Produkte, insbesondere Primerdimere, in relevanter Menge synthetisiert wurden.

Die Fluoreszenzstärke wurde jeweils beim Elongationsschritt in jedem Zyklus gemessen. Für die nach jedem Amplifikationszyklus gemessene Fluoreszenzstärke wurde eine Schwelle festgelegt. Die Schwelle wurde dabei so festgelegt, dass sie

einerseits über den Hintergrundschwankungen – hervorgerufen durch unspezifische Fluoreszenz – lag, andererseits aber auch weit unter dem Plateau des Amplifizierungsgraphen. Die Zyklenanzahl, bei der diese Schwelle erreicht wurde, wurde ermittelt und als Ct-Wert (*threshold cycle*) benannt. Aufgrund der Dreifachmessung ergaben sich für jede Probe drei Ct-Werte für das *housekeeper*-Gen (GAPDH) und drei Ct-Werte für das Zielgen (β_2 -Adrenozeptor), aus denen jeweils der Mittelwert gebildet wurde. Es wurde die Differenz aus dem β_2 -Adrenozeptor-Ct-Mittelwert und dem GAPDH-Ct-Mittelwert errechnet ($\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\beta_2\text{-Adrenozeptor}} - \text{Ct}_{\text{GAPDH}}$). Für jede Probe wurde anschließend die Differenz aus ΔCt -Wert der Probe und ΔCt -Wert der Kontrolle berechnet ($\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{Probe}} - \Delta\text{Ct}_{\text{Kontrolle}}$). Die Zielgenexpression jeder Probe in % bezogen auf die Kontrolle wurde mit folgender Formel errechnet: $\text{Expression (\%)} = (2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}) * 100$.

2.2.9 Auswertung

Die Expressionswerte für das β_2 -Adrenozeptor-Amplifikat unter Einfluss der verschiedenen Substanzen (Substanz(en) X in Konzentration Y und Inkubationszeit Z) wurden in mehreren unabhängigen Versuchen bestimmt. Aus diesen Expressionswerten wurde der Mittelwert durch Bildung des arithmetischen Mittels errechnet. Als Maß für die beobachtete Streuung fand der Standardfehler des Mittelwerts (SEM) Anwendung.

Um statistisch signifikante Mittelwertunterschieden zu detektieren, wurde ein gepaarter zweiseitiger t-Test verwendet. Hierbei wurden die Expressionsmittelwerte gegen die Kontrolle (= 100 %) und/oder gegeneinander getestet.

Es wurden drei Niveaus statistischer Signifikanz festgelegt, wobei Ergebnisse mit α -Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ als signifikant (*), mit $p < 0,01$ als sehr signifikant (**) und mit $p < 0,001$ als extrem signifikant (***) bezeichnet wurden. Signifikante Mittelwertunterschiede untereinander wurden gekennzeichnet mit + für $p < 0,05$, ++ für $p < 0,01$ und +++ für $p < 0,001$. Nicht signifikante Ergebnisse wurden mit ns oder nicht weiter gekennzeichnet. Die statistische Auswertung und graphische Darstellung erfolgte mit *Graph Pad Prism 5.0* (Graph Pad Software).

3. Ergebnisse

3.1 Wirkung von β_2 -Adrenozeptoragonisten auf die β_2 -mRNA-Expression

In vorangegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass eine Kurzzeitexposition mit den β_2 -Rezeptoragonisten Formoterol und Olodaterol zu einer Expressionssteigerung der β_2 -mRNA führt (Racké et al., 2011, 2012a; Warnken-Uhlich et al., 2011). Der hochregulierende Effekt bei einer Stunde Inkubationszeit konnte reproduziert werden; es ergab sich für Formoterol eine Steigerung der β_2 -Adrenozeptor-mRNA um 99 % und für Olodaterol um 113 %. Zusätzlich konnte neu beobachtet werden, dass die β_2 -Rezeptoragonisten bei einer längeren Inkubationszeit von vier Stunden zu einer Herunterregulierung der β_2 -Rezeptor-mRNA führen: Formoterol bewirkte eine Expressionsverminderung um 59 %, Olodaterol um 54 % (Abb. 3).

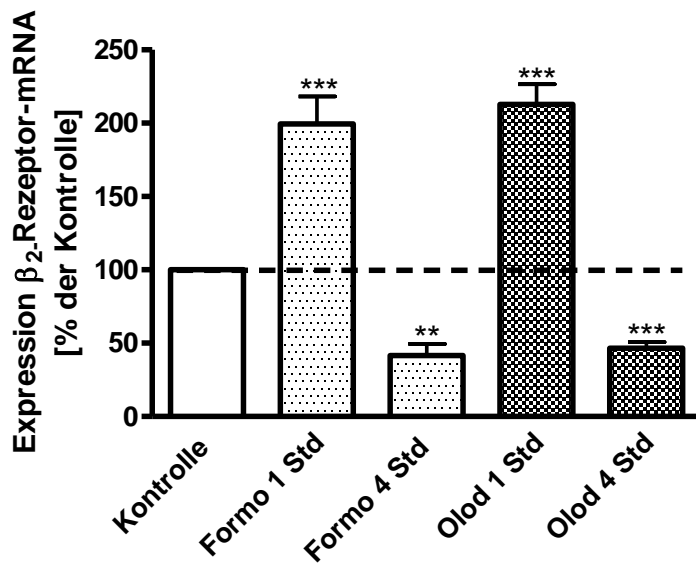


Abb.3: Wirkung von β_2 -Adrenozeptoragonisten auf die β_2 -mRNA-Expression

Es wurden humane Lungenfibroblasten der Zelllinie MRC-5 ausgesät und nach 24 Stunden Wachstumsphase mit MEM + 10 % FKS und anschließend 24 Stunden Wachstumsphase mit MEM - FKS für 1 bzw. 4 Stunden mit 10 nM Formoterol (Formo) bzw. 10 nM Olodaterol (Olod) inkubiert. Nach Zellyse erfolgten RNA-Präparation, Reverse Transkription und Real-Time PCR mit SYBR[®]Green. Mithilfe der $\Delta\Delta$ CT-Methode wurden Expressionswerte in % bezogen auf die Kontrolle ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit dem Streuungsmaß SEM von n=5 (Formo 4 Std.), n=13 (Formo 1 Std., Olod 4 Std.) bzw. n=30 (Olod 1 Std.) Versuchen. Signifikanz der Mittelwertunterschiede bezogen auf die Kontrolle: ***p<0,001 bzw. **p<0,01.

3.2 Wirkung von Adenylatzyklasestimulatoren auf die β_2 -mRNA-Expression

Die Vermutung liegt nahe, dass die β_2 -Agonisten-induzierte Expressionssteigerung über eine Aktivierung der Adenylatzyklase, an die β_2 -Rezeptoren typischerweise koppeln, vermittelt wird.

Um den Einfluss des Adenylatzyklase-cAMP-Signalswegs auf die β_2 -Rezeptor-Expression zu untersuchen, wurde bereits in vorangegangenen Experimenten gezeigt, dass Kurzzeitexposition (1 Stunde) mit dem Adenylatzyklasestimulator Forskolin einen hochregulierenden Effekt auf die β_2 -Rezeptorexpression hat (Racké et al., 2012b). Dieser Befund wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigt: eine einstündige Exposition mit Forskolin bewirkte eine Expressionssteigerung um 142 % (Abb. 4). Zusätzlich wurde der Effekt bei vierstündiger Exposition geprüft. Hier wurde ähnlich wie bei den β_2 -Agonisten ein inhibitorischer Effekt um 42 % beobachtet (Abb. 4).

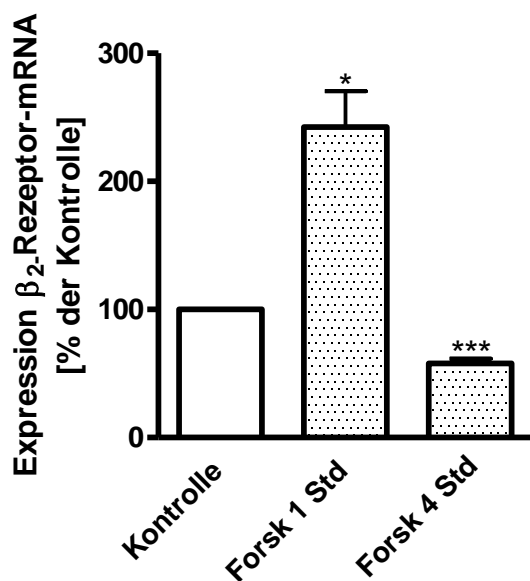


Abb.4: Wirkung von Forskolin auf die β_2 -mRNA-Expression

Es wurden humane Lungenfibroblasten der Zelllinie MRC-5 ausgesät und nach 24 Stunden Wachstumsphase mit MEM + 10 % FKS und anschließend 24 Stunden Wachstumsphase mit MEM – FKS für 1 bzw. 4 Stunden mit 10 μ M Forskolin (Forsk) inkubiert. Nach Zellyse erfolgten RNA-Präparation, Reverse Transkription und Real-Time PCR mit SYBR[®]Green. Mithilfe der $\Delta\Delta$ CT-Methode wurden Expressionswerte in % bezogen auf die Kontrolle ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit dem Streuungsmaß SEM von n=3 (Forsk 1 Std.) bzw. n=7 (Forsk 4 Std.) Versuchen. Signifikanz der Mittelwertunterschiede bezogen auf die Kontrolle: ***p<0,001 bzw. *p<0,05.

Der Einfluss der Adenylatzyklase auf die β_2 -mRNA-Expression sollte durch die Untersuchung eines weiteren Adenylatzyklasestimulators untermauert werden. Hierzu wurden die Effekte von Cholera toxin näher beleuchtet.

Cholera toxin zeigte ebenfalls eine zeitabhängige Wirkung auf die β_2 -mRNA-Expression: nach einer Stunde Inkubationszeit ergab sich eine Steigerung der β_2 -Expression um 66 %. Nach zwei Stunden war diese Wirkung nicht mehr nachweisbar und bei vierstündiger Inkubation konnte eine Expressionsminderung um 67 % beobachtet werden (Abb. 5).

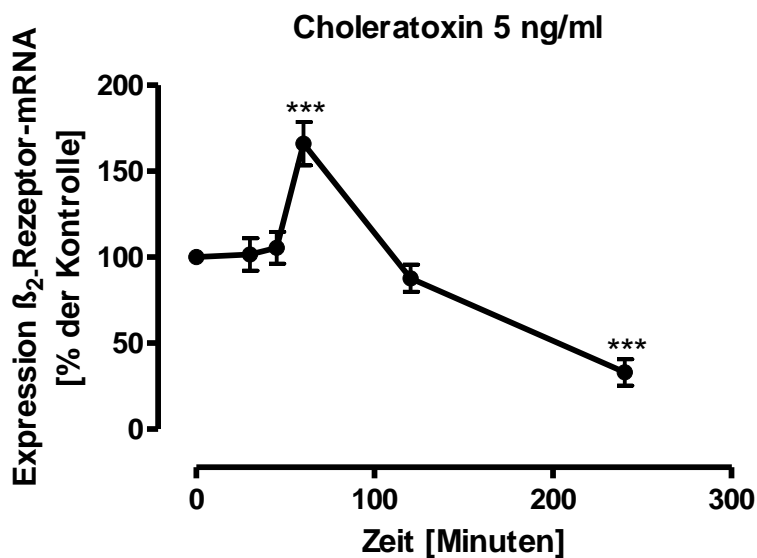


Abb.5: Wirkung von Cholera toxin auf die β_2 -mRNA-Expression

Es wurden humane Lungenfibroblasten der Zelllinie MRC-5 ausgesät und nach 24 Stunden Wachstumsphase mit MEM + 10 % FKS und anschließend 24 Stunden Wachstumsphase mit MEM – FKS für 30, 45, 60, 120 bzw. 240 Minuten mit 5 ng/ml Cholera toxin inkubiert. Nach Zellyse erfolgten RNA-Präparation, Reverse Transkription und Real-Time PCR mit SYBR[®]Green. Mithilfe der $\Delta\Delta CT$ -Methode wurden Expressionswerte in % bezogen auf die Kontrolle ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit dem Streuungsmaß SEM von n=4 (Cholera toxin 30 Min., 45 Min.), n=10 (Cholera toxin 60 Min.) bzw. n=6 (Cholera toxin 120 Min., 240 Min.) Versuchen. Signifikanz der Mittelwertunterschiede bezogen auf die Kontrolle: ***p<0,001.

Abbildung 6 gibt eine Übersicht über die zeitabhängigen Effekte der β_2 -Rezeptoragonisten und Adenylatzyklasestimulatoren.

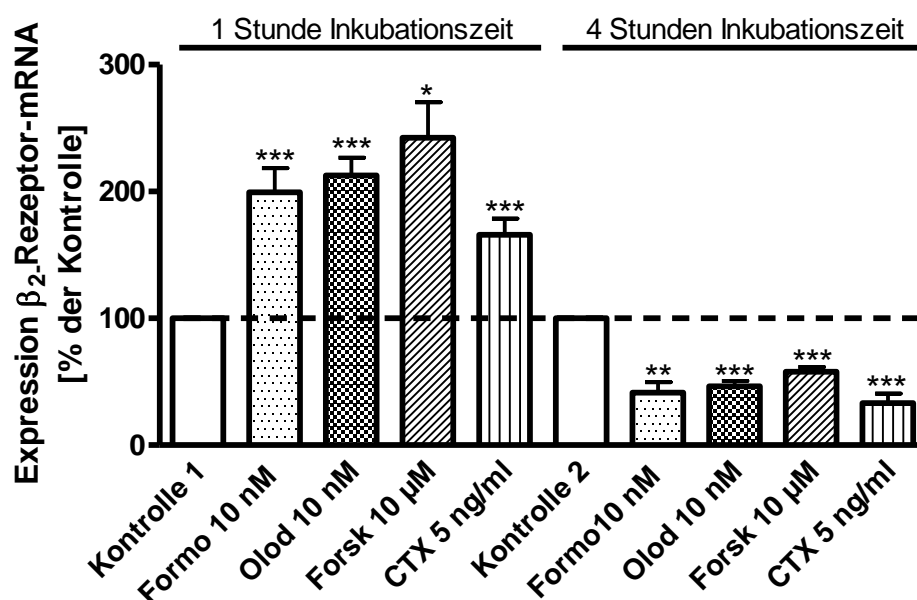


Abb.6: Wirkung von β_2 -Adrenozeptoragonisten und Adenylatzyklasestimulatoren auf die β_2 -mRNA-Expression

Es wurden humane Lungenfibroblasten der Zelllinie MRC-5 ausgesät und nach 24 Stunden Wachstumsphase mit MEM + 10 % FKS und anschließend 24 Stunden Wachstumsphase mit MEM – FKS für 1 bzw. 4 Stunden mit 10 nM Formoterol (Formo), 10 nM Olodaterol (Olod), 10 μ M Forskolin (Forsk) bzw. 5 ng/ml Choleratoxin (CTX) inkubiert. Nach Zellyse erfolgten RNA-Präparation, Reverse Transkription und Real-Time PCR mit SYBR[®]Green. Mithilfe der $\Delta\Delta$ CT-Methode wurden Expressionswerte in % bezogen auf die Kontrolle ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit dem Streuungsmaß SEM von $n > 3$ Versuchen. Signifikanz der Mittelwertunterschiede bezogen auf die jeweilige Kontrolle: *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ und * $p < 0,05$.

3.3 Wirkung von Phosphodiesteraseinhibitoren auf die β_2 -mRNA-Expression

Weiterhin wurde untersucht, inwiefern eine durch Inhibition von Phosphodiesterasen vermittelte cAMP-Anhäufung Einfluss auf die β_2 -mRNA-Expression ausübt.

Wie auch schon in vorherigen Experimenten mit dem nicht-selektiven Phosphodiesteraseinhibitor IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin) konnte bei einstündiger Inkubationszeit kein Effekt gezeigt werden (Lamyel et al., 2012; Schütz, Dissertation in

Bearbeitung). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigte IBMX allerdings bei längerer Inkubationszeit (4 Stunden) einen herunterregulierenden Effekt um 46 % (Abb. 7).

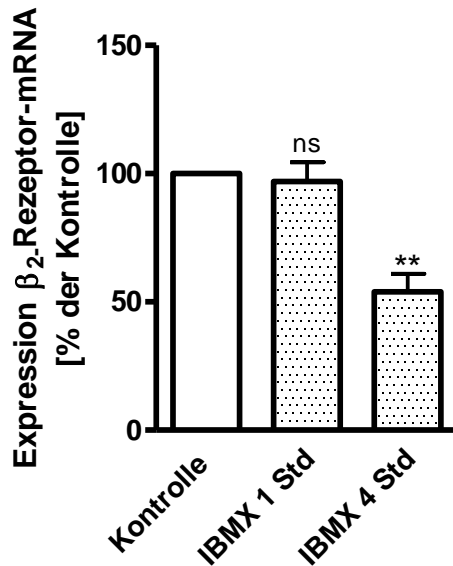


Abb.7: Wirkung von IBMX auf die β_2 -mRNA-Expression

Es wurden humane Lungenfibroblasten der Zelllinie MRC-5 ausgesät und nach 24 Stunden Wachstumsphase mit MEM + 10 % FKS und anschließend 24 Stunden Wachstumsphase mit MEM – FKS für 1 bzw. 4 Stunden mit 100 μ M 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) inkubiert. Nach Zellyse erfolgten RNA-Präparation, Reverse Transkription und Real-Time PCR mit SYBR[®]Green. Mithilfe der $\Delta\Delta$ CT-Methode wurden Expressionswerte in % bezogen auf die Kontrolle ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit dem Streuungsmaß SEM von n=4 (IBMX 4 Std.) bzw. n=22 (IBMX 1 Std.) Versuchen. Signifikanz der Mittelwertunterschiede bezogen auf die Kontrolle: **p<0,01 bzw. ns=nicht signifikant.

Es wurde zusätzlich die Wirkung des selektiven Phosphodiesterase-3/4-Inhibitors Zardaverine untersucht, da es Hinweise darauf gibt, dass diese Isoenzyme im Lungengewebe eine besondere Stellung einnehmen (Torphy, 1998; Dent et al., 1998).

Sowohl verschiedene Konzentrationen (10 μ M, 30 μ M, 100 μ M) bei einstündiger Exposition (Daten nicht gezeigt), als auch variable Inkubationszeiten von 30 bis 240 Minuten mit 100 μ M Zardaverine zeigten keinen signifikanten Effekt (Abb. 8).

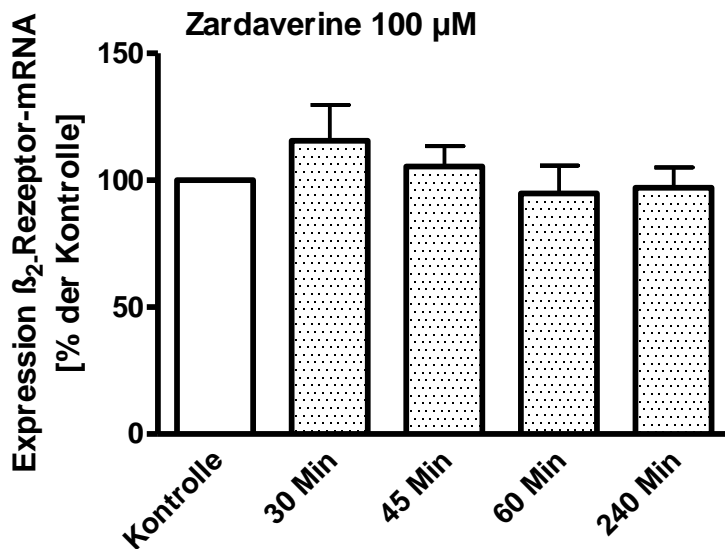


Abb. 8: Wirkung von Zardaverine auf die β_2 -mRNA-Expression

Es wurden humane Lungenfibroblasten der Zelllinie MRC-5 ausgesät und nach 24 Stunden Wachstumsphase mit MEM + 10 % FKS und anschließend 24 Stunden Wachstumsphase mit MEM – FKS für 30, 45, 60 bzw. 240 Minuten mit 100 μ M Zardaverine inkubiert. Nach Zellyse erfolgten RNA-Präparation, Reverse Transkription und Real-Time PCR mit *SYBR[®]Green*. Mithilfe der $\Delta\Delta$ CT-Methode wurden Expressionswerte in % bezogen auf die Kontrolle ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit dem Streuungsmaß SEM von n=3 (Zardaverine 30 Min., 45 Min.), n=4 (Zardaverine 240 Min.) bzw. n=8 (Zardaverine 60 Min.) Versuchen. Alle Mittelwertunterschiede bezogen auf die Kontrolle sind nicht signifikant.

3.4 Wirkung des Adenylatzyklasesinhibitors SQ 22,536 auf die β_2 -mRNA Expression

Um die Rolle der Adenylatzyklase bei der Expressionsregulation des β_2 -Rezeptors von einer anderen Seite zu beleuchten, wurde der Effekt des Adenylatzyklasesinhibitors SQ 22,536 untersucht. Hierbei wurde getestet, ob der durch β_2 -Agonisten (Formoterol 10 nM, Olodaterol 10 nM) hervorgerufene, stimulierende Effekt durch den Adenylatzyklasesinhibitor SQ 22,536 aufgehoben wird. Weder bei einer Konzentration von 100 μ M noch von 300 μ M konnte SQ 22,536 die stimulierenden Effekte signifikant antagonisieren (Abb. 9).

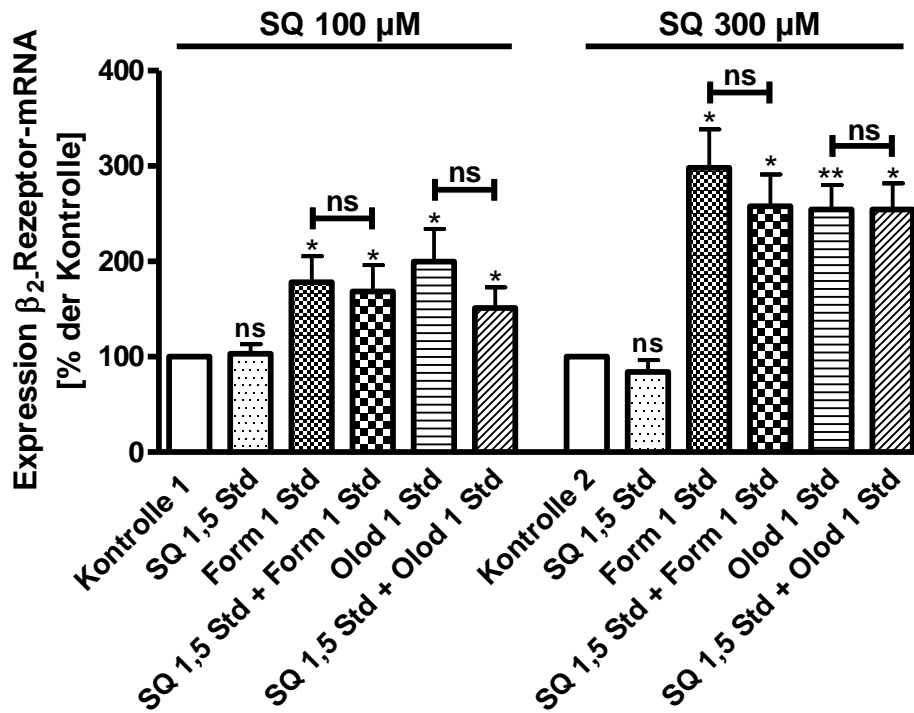


Abb. 9: Wirkung von SQ 22,536 auf die β_2 -mRNA-Expression

Es wurden humane Lungenfibroblasten der Zelllinie MRC-5 ausgesät und nach 24 Stunden Wachstumsphase mit MEM + 10 % FKS und anschließend 24 Stunden Wachstumsphase mit MEM – FKS für 1 Stunde mit 10 nM Formoterol (Formo) bzw. 10 nM Olodaterol (Olod), für 1,5 Stunden mit 100 μM bzw. 300 μM SQ 22,536 (SQ) oder mit der Kombination aus 100 μM bzw. 300 μM SQ 22,536 (1,5 Std.) und 10 nM Formoterol (1 Std.) bzw. Olodaterol (1 Std.) inkubiert. Nach Zelllyse erfolgten RNA-Präparation, Reverse Transkription und Real-Time PCR mit SYBR[®]Green. Mithilfe der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode wurden Expressionswerte in % bezogen auf die Kontrolle ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit dem Streuungsmaß SEM von n=11 (SQ 22,536 100 μM , Olod 10 nM, SQ 22,536 100 μM + Olod 10 nM), n=9 (Formo 10 nM, SQ 22,536 100 μM + Formo 10 nM) bzw. n=4 (alle anderen Proben) Versuchen. Signifikanz der Mittelwertunterschiede bezogen auf die jeweilige Kontrolle: **p<0,01, *p<0,05 bzw. ns=nicht signifikant. Mittelwertunterschiede zwischen Formo bzw. Olod und SQ 22,536 + Formo bzw. SQ 22,536 + Olod: ns=nicht signifikant.

3.5 Wirkung von Translations- und Transkriptionshemmer auf die β_2 -mRNA-Expression

Der Translationshemmer Cycloheximid wurde eingesetzt, um Rückschlüsse über den Nettoeinfluss von (kurzlebigen) Proteinen auf die β_2 -Expression zu ziehen. Es zeigte sich bei Cycloheximidexposition ein stimulatorischer Effekt auf die β_2 -mRNA-Expression (siehe auch: Racké et al., 2011, 2012a, 2012b; Kämpfer et al., 2011). So wurde bei 1,5-stündiger Inkubationszeit eine Steigerung der Expression um 144 %, bei 4,5-stündiger Inkubationszeit um 443 % beobachtet (Abb. 10). Um zu bestätigen, dass es sich bei der durch Cycloheximid vermittelten β_2 -mRNA-Steigerung um einen Effekt handelt, der durch eine Transkriptionssteigerung zu Stande kommt, wurde der Einfluss des Transkriptionshemmers Actinomycin D beleuchtet. Bei 100-minütiger Inkubation mit Actinomycin D konnte eine Reduktion der β_2 -mRNA-Menge um 54 % beobachtet werden. Außerdem verhinderte Actinomycin D weitgehend die stimulierende Wirkung von Cycloheximid. Bei Exposition mit Actinomycin D und Cycloheximid wurde die Expression im Vergleich zur Kontrolle um 30 % gemindert (Abb. 10).

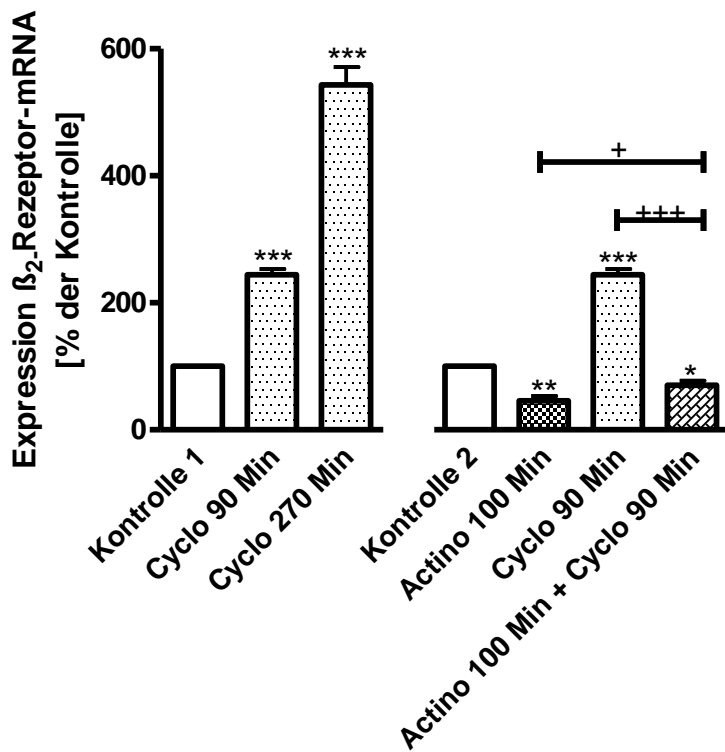


Abb.10: Wirkung von Cycloheximid und Actinomycin D auf die β_2 -mRNA-Expression
 Es wurden humane Lungenfibroblasten der Zelllinie MRC-5 ausgesät und nach 24 Stunden Wachstumsphase mit MEM + 10 % FKS und anschließend 24 Stunden Wachstumsphase mit MEM – FKS für 90 bzw. 270 Minuten mit 30 μ M Cycloheximid (Cyclo), für 100 Minuten mit 30 μ M Actinomycin D (Actino) oder mit der Kombination aus 30 μ M Actino (100 Min.) und 30 μ M Cyclo (90 Min.) inkubiert. Nach Zellyse erfolgten RNA-Präparation, Reverse Transkription und Real-Time PCR mit SYBR[®]Green. Mithilfe der $\Delta\Delta$ CT-Methode wurden Expressionswerte in % bezogen auf die Kontrolle ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit dem Streuungsmaß SEM von n=25 (Cyclo 270 Min.), n=5 (Cyclo 90 Min., Actino 100 Min., Actino 100 Min. + Cyclo 90 Min.) Versuchen. Signifikanz der Mittelwertunterschiede bezogen auf die jeweilige Kontrolle: ***p<0,001, **p<0,01 und *p<0,05. Signifikanz der Mittelwertunterschiede zwischen Actino + Cyclo und Actino bzw. Cyclo: +++p<0,001, +p<0,05.

3.6 Wirkung von Kombinationen mit Cycloheximid auf die β_2 -mRNA-Expression

3.6.1 Wirkung von Cycloheximid und Olodaterol auf die β_2 -mRNA-Expression

Es konnte gezeigt werden, dass der Eigeneffekt von Cycloheximid durch die Zugabe von Olodaterol hochsignifikant gesteigert wird. Während Cycloheximid allein eine Expressionssteigerung um 400 % bewirkte, erreichte die Kombination aus Cycloheximid

und Olodaterol eine Expressionssteigerung um 1160 %. Der beobachtete inhibitorische Effekt von Olodaterol bei vierstündiger Inkubationszeit kehrte sich durch Zusammenarbeit mit Cycloheximid demnach in einen stark expressionssteigernden Effekt um (Abb. 11).

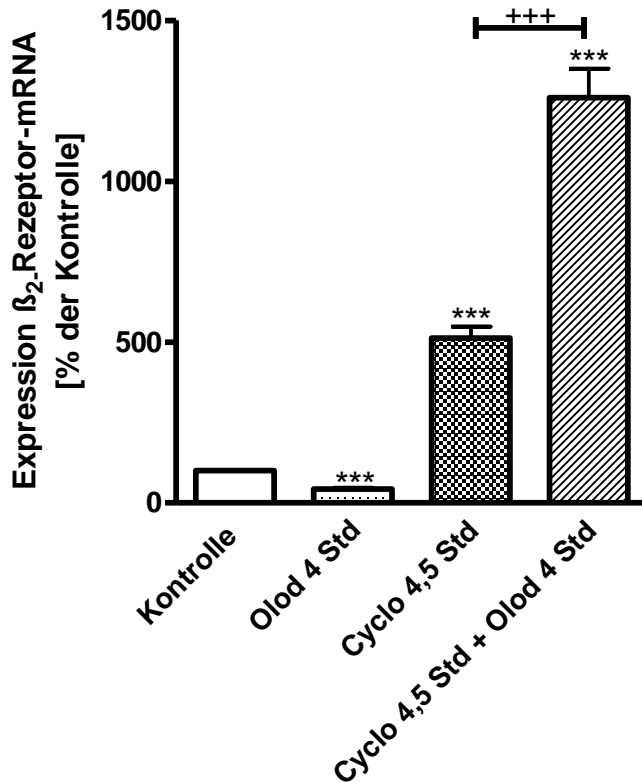


Abb.11: Wirkung von Cycloheximid und Olodaterol auf die β_2 -mRNA-Expression

Es wurden humane Lungenfibroblasten der Zelllinie MRC-5 ausgesät und nach 24 Stunden Wachstumsphase mit MEM + 10 % FKS und anschließend 24 Stunden Wachstumsphase mit MEM – FKS für 4 Stunden mit 10 nM Olodaterol (Olod), für 4,5 Stunden mit 30 μ M Cycloheximid (Cyclo) oder mit der Kombination aus 30 μ M Cyclo (4,5 Std.) und 10 nM Olod (4 Std.) inkubiert. Nach Zellyse erfolgten RNA-Präparation, Reverse Transkription und Real-Time PCR mit SYBR[®]Green. Mithilfe der $\Delta\Delta$ CT-Methode wurden Expressionswerte in % bezogen auf die Kontrolle ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit dem Streuungsmaß SEM von n=13 Versuchen. Signifikanz der Mittelwertunterschiede bezogen auf die Kontrolle: ***p<0,001. Signifikanz des Mittelwertunterschieds zwischen Cyclo und Cyclo + Olod: +++p<0,001.

3.6.2 Wirkung von Cycloheximid und Forskolin auf die β_2 -mRNA-Expression

Desweiteren wurde der Effekt der Kombination aus Cycloheximid und Forskolin näher beleuchtet. Ähnlich der additiven Wirkung bei Cycloheximid mit Olodaterol ergab sich

auch bei der Kombination aus Cycloheximid mit Forskolin ein starker, expressionssteigernder Effekt. Hierbei erreichte Cycloheximid allein eine Steigerung von 435 %, während Cycloheximid in Kombination mit Forskolin eine Steigerung von 1175 % bewirkte (Abb. 12).

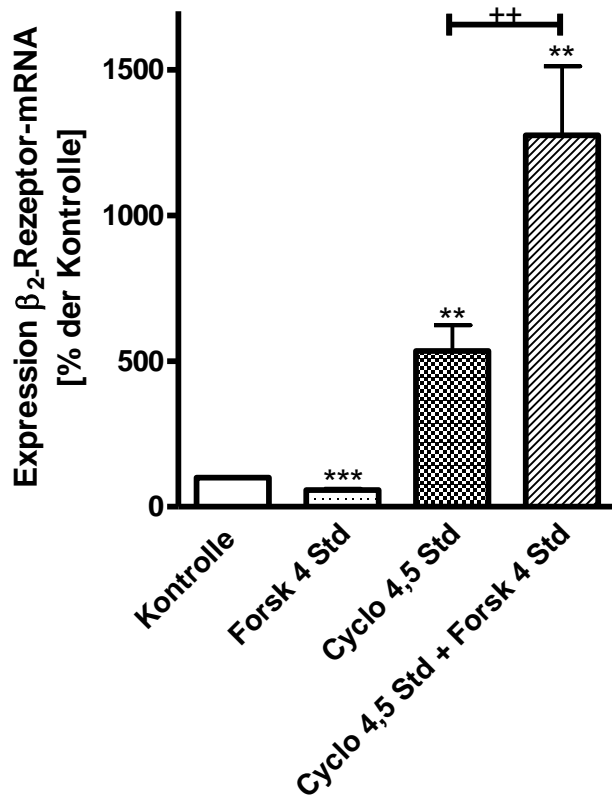


Abb.12: Wirkung von Cycloheximid und Forskolin auf die β_2 -mRNA-Expression

Es wurden humane Lungenfibroblasten der Zelllinie MRC-5 ausgesät und nach 24 Stunden Wachstumsphase mit MEM + 10 % FKS und anschließend 24 Stunden Wachstumsphase mit MEM – FKS für 4 Stunden mit 10 μ M Forskolin (Forsk), für 4,5 Stunden mit 30 μ M Cycloheximid (Cyclo) oder mit der Kombination aus 30 μ M Cyclo (4,5 Std.) und 10 μ M Forsk (4 Std.) inkubiert. Nach Zellyse erfolgten RNA-Präparation, Reverse Transkription und Real-Time PCR mit SYBR[®]Green. Mithilfe der $\Delta\Delta$ CT-Methode wurden Expressionswerte in % bezogen auf die Kontrolle ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit dem Streuungsmaß SEM von n=5 (Cyclo, Cyclo + Forsk) bzw. n=7 (Forsk) Versuchen. Signifikanz der Mittelwertunterschiede bezogen auf die jeweilige Kontrolle: ***p<0,001 bzw. **p<0,01. Signifikanz des Mittelwertunterschieds zwischen Cyclo und Cyclo + Forsk: ++p<0,01.

3.6.3 Wirkung von Cycloheximid und EPAC- und PKA-Agonist auf die β_2 -mRNA-Expression

EPAC-Agonist (*8-CPT-2'O-Me-cAMP*) und PKA-Agonist (*6-Bnz-cAMP*) zeigten bei alleiniger Gabe weder bei ein- noch bei vierstündiger Exposition einen signifikanten Effekt auf die β_2 -mRNA-Expression (Daten nicht gezeigt). Bei der Kombination aus Cycloheximid und PKA-Agonist zeigte sich jedoch bei längerer Exposition (4 bzw. 4,5 Stunden) eine signifikante Steigerung der β_2 -mRNA-Expression im Vergleich zur alleinigen Gabe von Cycloheximid. Es ergab sich für Cycloheximid eine Steigerung um 470 % und für die Kombination Cycloheximid mit PKA-Agonist eine Steigerung um 740 % (Abb. 13). Die Kombination aus Cycloheximid und EPAC-Agonist hingegen zeigte keine signifikante Expressionssteigerung bezogen auf Cycloheximid allein (Abb. 13).

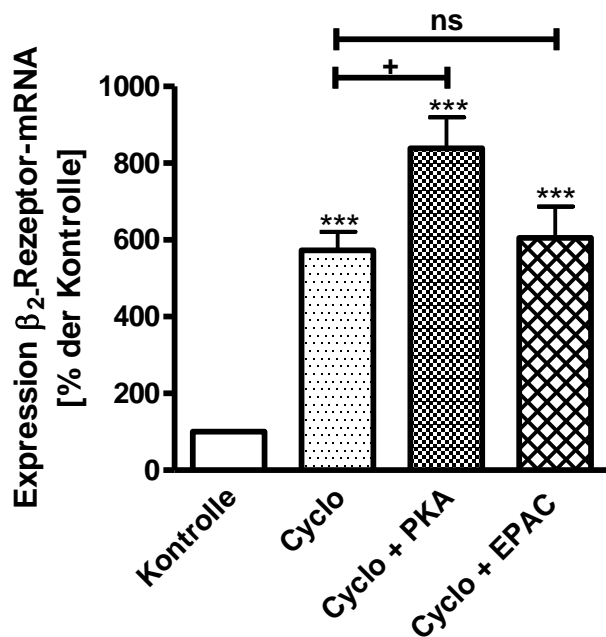


Abb.13: Wirkung von Cycloheximid, PKA-Agonist (*6-Bnz-cAMP*) und EPAC-Agonist (*8-CPT-2'-O-Me-cAMP*) auf die β_2 -mRNA-Expression

Es wurden humane Lungenfibroblasten der Zelllinie MRC-5 ausgesät und nach 24 Stunden Wachstumsphase mit MEM + 10 % FKS und anschließend 24 Stunden Wachstumsphase mit MEM – FKS für 4 Stunden mit 4,5 Stunden mit 30 μ M Cycloheximid (Cyclo) oder mit der Kombination aus 30 μ M Cyclo (4,5 Std.) und 500 μ M PKA-Agonist (PKA) (4 Std.) bzw. 100 μ M EPAC-Agonist (EPAC) (4 Std.) inkubiert. Nach Zellyse erfolgten RNA-Präparation, Reverse Transkription und Real-Time PCR mit SYBR[®]Green. Mithilfe der $\Delta\Delta$ CT-Methode wurden Expressionswerte in % bezogen auf die Kontrolle ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit dem Streuungsmaß SEM von n=8 Versuchen. Signifikanz der Mittelwertunterschiede bezogen auf die Kontrolle: ***p<0,001. Signifikanz des Mittelwertunterschieds zwischen Cyclo und Cyclo + PKA bzw. Cycloheximid + EPAC: +p<0,05 bzw. ns=nicht signifikant.

3.7 Wirkung von PKA-Inhibitoren auf die β_2 -mRNA-Expression

Um eine mögliche Beteiligung der Proteinkinase A an der β_2 -mRNA-Expression weiter zu untersuchen, kamen die Proteinkinaseinhibitoren Kt 5720 und H89 zum Einsatz. Zunächst wurde untersucht, ob die expressionssteigernden Wirkungen von Olodaterol (1 Stunde) bzw. der Kombination aus Cycloheximid (4,5 Stunden) und Olodaterol (4 Stunden) durch die Anwesenheit eines PKA-Inhibitors beeinflusst werden. Dazu wurde Kt 5720 in verschiedenen Konzentrationen (100 nM, 1 μ M) eingesetzt. Kt 5720 zeigte

jedoch weder einen Eigeneffekt noch beeinflusste Kt 5720 die stimulatorische Wirkung von Olodaterol oder Cycloheximid (Abb. 14).

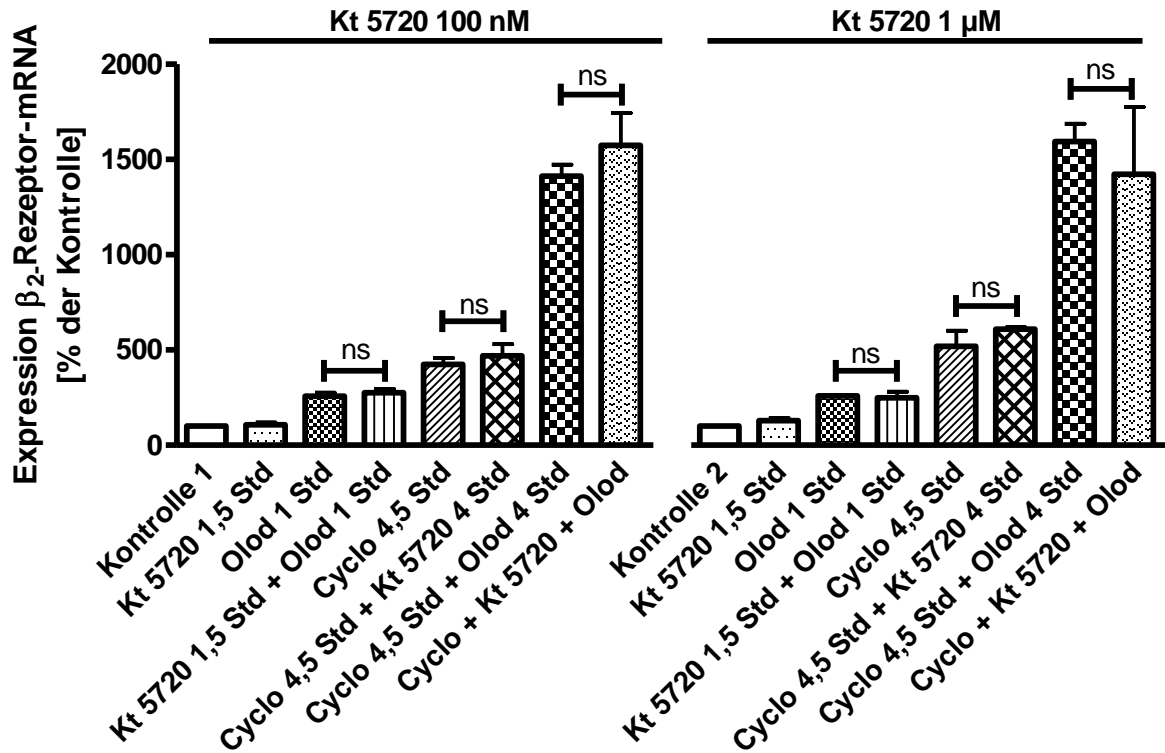


Abb.14: Wirkung von Kt 5720, Olodaterol und Cycloheximid auf die β_2 -mRNA-Expression

Es wurden humane Lungenfibroblasten der Zelllinie MRC-5 ausgesät und nach 24 Stunden Wachstumsphase mit MEM + 10 % FKS und anschließend 24 Stunden Wachstumsphase mit MEM – FKS für 1 Stunde mit 10 nM Olodaterol (Olod), für 1,5 Stunden mit 100 nM bzw. 1 μ M Kt 5720, für 4,5 Stunden mit 30 μ M Cycloheximid (Cyclo) oder mit der Kombination aus 100 nM bzw. 1 μ M Kt 5720 (1,5 Std.) + 10 nM Olod (1 Std.) oder 30 μ M Cyclo (4,5 Std.) + 10 nM bzw. 1 μ M Kt 5720 (4 Std.) oder 30 μ M Cyclo (4,5 Std.) + 10 nM Olod (4 Std.) oder 30 μ M Cyclo (4,5 Std.) + 10 nM bzw. 1 μ M Kt 5720 (4,5 Std.) + 10 nM Olod (4 Std.) inkubiert. Nach Zellyse erfolgten RNA-Präparation, Reverse Transkription und Real-Time PCR mit *SYBR[®]Green*. Mithilfe der $\Delta\Delta$ CT-Methode wurden Expressionswerte in % bezogen auf die Kontrolle ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit dem Streuungsmaß SEM von n=3 Versuchen. Nicht-signifikante Mittelwertunterschiede: ns=nicht signifikant.

Der Effekt von H89 wurde hierzu ebenfalls bei zwei Konzentrationen (1 μ M, 10 μ M) untersucht, wobei sich bei der höheren Konzentration signifikante Abschwächungen der expressionssteigernden Wirkungen von Olodaterol, Cycloheximid und Cycloheximid mit Olodaterol zeigten (Abb. 15).

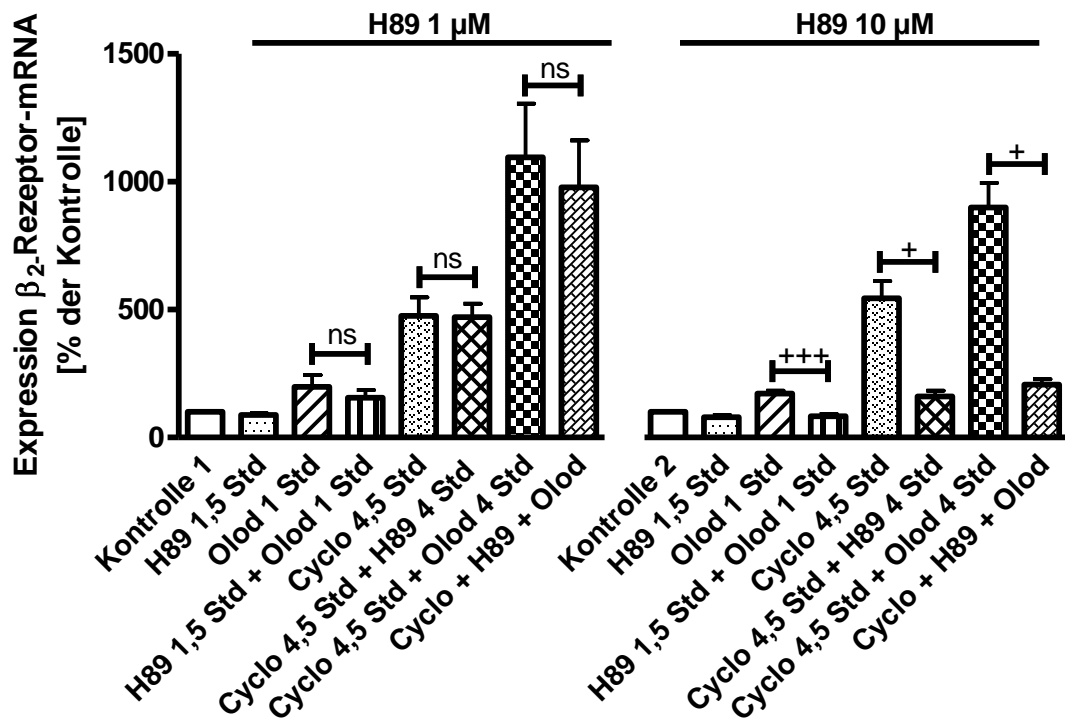


Abb.15: Wirkung von H89, Olodaterol und Cycloheximid auf die β_2 -mRNA-Expression. Es wurden humane Lungenfibroblasten der Zelllinie MRC-5 ausgesät und nach 24 Stunden Wachstumsphase mit MEM + 10 % FKS und anschließend 24 Stunden Wachstumsphase mit MEM – FKS für 1 Stunde mit 10 nM Olodaterol (Olod), für 1,5 Stunden mit 1 μ M bzw. 10 μ M H89, für 4,5 Stunden mit 30 μ M Cycloheximid (Cyclo) oder mit der Kombination aus 1 μ M bzw. 10 μ M H89 (1,5 Std.) + 10 nM Olod (1 Std.) oder 30 μ M Cyclo (4,5 Std.) + 1 μ M bzw. 10 μ M H89 (4 Std.) oder 30 μ M Cyclo (4,5 Std.) + 10 nM Olod (4 Std.) oder 30 μ M Cyclo (4,5 Std.) + 1 μ M bzw. 10 μ M H89 (4,5 Std.) + 10 nM Olod (4 Std.) inkubiert. Nach Zellyse erfolgten RNA-Präparation, Reverse Transkription und Real-Time PCR mit SYBR[®]Green. Mithilfe der $\Delta\Delta$ CT-Methode wurden Expressionswerte in % bezogen auf die Kontrolle ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit dem Streuungsmaß SEM von n=4 (H89 10 μ M, Olod 10 nM, H89 10 μ M + Olod 10 nM) bzw. n=3 (alle anderen Proben) Versuchen. Signifikanz der Mittelwertunterschiede zwischen Olod und H89 + Olod, Cyclo und Cyclo + H89 sowie Cyclo + Olod und Cyclo + H89 + Olod: +++p<0,001, +p<0,05 bzw. ns=nicht signifikant.

Weiterhin wurde untersucht, ob der hemmende Effekt von Olodaterol (4 Stunden) auf die β_2 -mRNA-Expression durch Proteinkinase-A-Inhibitoren beeinflusst wird. Kt 5720 wurde hierzu in verschiedenen Konzentrationen (100 nM, 300 nM und 1 μ M) getestet. Während Olodaterol (4 Stunden) allein eine Expressionsminderung um 45 % erzielte, lag die Hemmung bei der Kombination Kt 5720 (300 nM) mit Olodaterol nur noch um

22 %, und bei der Kombination Kt 5720 (1 μ M) mit Olodaterol um 20 % unter der Kontrolle. Lediglich bei einer Kt 5720-Konzentration von 1 μ M wurde der Olodateroleffekt signifikant abgeschwächt. Hierbei gilt zu berücksichtigen, dass Kt 5720 einen expressionssteigernden Eigeneffekt zeigte (Abb. 16).

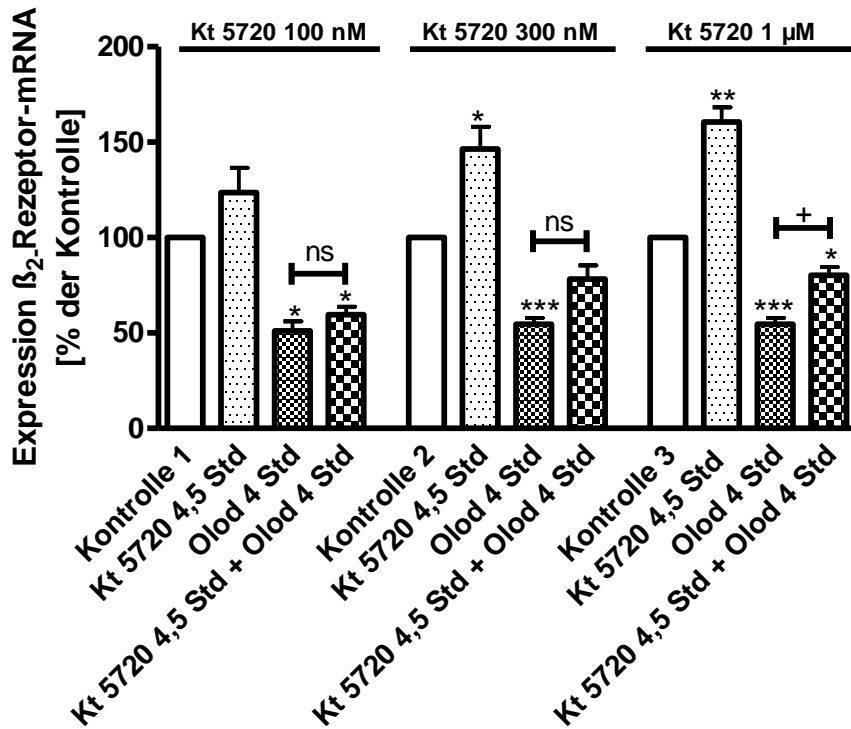


Abb.16: Wirkung von Kt 5720 und Olodaterol auf die β_2 -mRNA-Expression

Es wurden humane Lungenfibroblasten der Zelllinie MRC-5 ausgesät und nach 24 Stunden Wachstumsphase mit MEM + 10 % FKS und anschließend 24 Stunden Wachstumsphase mit MEM – FKS für 4,5 Stunden mit 100 nM, 300 nM bzw. 1 μ M Kt 5720, für 4 Stunden mit 10 nM Olodaterol (Olod) oder mit der Kombination aus 100 nM, 300 nM bzw. 1 μ M Kt 5720 (4,5 Std.) + 10 nM Olod (4 Std.) inkubiert. Nach Zelllyse erfolgten RNA-Präparation, Reverse Transkription und Real-Time PCR mit SYBR[®]Green. Mithilfe der $\Delta\Delta$ CT-Methode wurden Expressionswerte in % bezogen auf die Kontrolle ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit dem Streuungsmaß SEM von n=3 (Kt 5720 100 nM, Olod 10 nM, Kt 5720 100 nM + Olod 10 nM) bzw. n=4 (alle anderen Proben) Versuchen. Signifikanz der Mittelwertunterschiede bezogen auf die jeweilige Kontrolle: ***p<0,001, **p<0,01 bzw. *p<0,05. Signifikanz der Mittelwertunterschiede zwischen Kt 5720 + Olod und Olod: +p<0,05 bzw. ns=nicht signifikant.

Auch H89 wurde hinsichtlich einer möglichen antagonisierenden Wirkung auf den expressionsmindernden Olodateroleffekt getestet. Hierbei zeigte H89 bei einer Konzentration von 10 μ M und viereinhalbstündiger Exposition einen β_2 -mRNA-herunter-

regulierenden Eigeneffekt um 43 %. Die Wirkung von Olodaterol wurde durch H89 nicht signifikant beeinflusst. Tendenziell ergab sich ein additiver, herunterregulierender Effekt auf die β_2 -mRNA-Expression (Abb. 17).

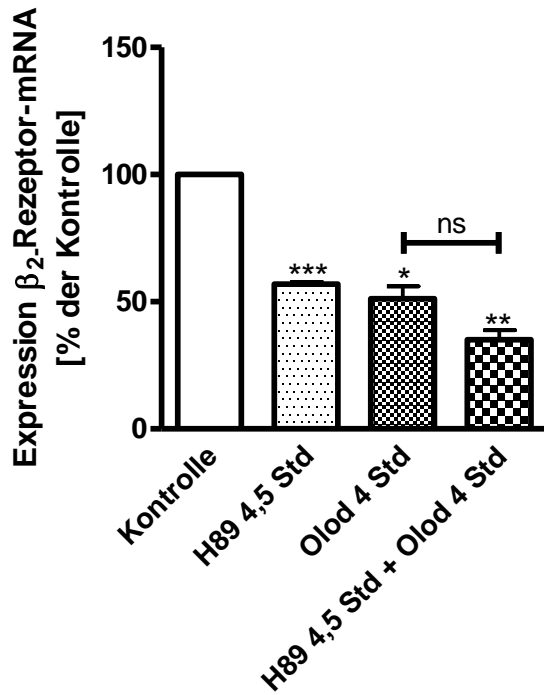


Abb.17: Wirkung von H89 und Olodaterol auf die β_2 -mRNA-Expression

Es wurden humane Lungenfibroblasten der Zelllinie MRC-5 ausgesät und nach 24 Stunden Wachstumsphase mit MEM + 10 % FKS und anschließend 24 Stunden Wachstumsphase mit MEM – FKS für 4,5 Stunden mit 10 μ M H89, für 4 Stunden mit 10 nM Olodaterol (Olod) oder mit der Kombination aus 10 μ M H89 (4,5 Std.) + 10 nM Olod (4 Std.) inkubiert. Nach Zellyse erfolgten RNA-Präparation, Reverse Transkription und Real-Time PCR mit *SYBR[®]Green*. Mithilfe der $\Delta\Delta$ CT-Methode wurden Expressionswerte in % bezogen auf die Kontrolle ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit dem Streuungsmaß SEM von n=3 Versuchen. Signifikanz der Mittelwertunterschiede bezogen auf die Kontrolle: ***p<0,001, **p<0,01 bzw. *p<0,05. Der Mittelwertunterschied zwischen H89 + Olod und Olod ist gekennzeichnet mit ns=nicht signifikant.

3.8 Wirkung des AKAP-Inhibitors St-Ht31 auf die β_2 -mRNA-Expression

Um eine mögliche Beteiligung der Proteinkinase-A an der β_2 -mRNA-Expressionsregulation zu untersuchen, wurde weiterhin der Effekt des A-Kinase-Ankerprotein (AKAP)-Inhibitors St-Ht31 beleuchtet. Es wurde getestet, ob der stimulatorische Eigen-

effekt von Olodaterol und Forskolin bei einstündiger Inkubationszeit durch die Kombination mit St-Ht31 (1,5 Stunden) in einer Konzentration von 10 μ M bzw. 50 μ M aufgehoben werden kann. Als versuchsinterne Kontrolle wurde die inaktivierte Form von St-Ht31 (= St-Ht31P) verwendet. Es zeigte sich jedoch kein signifikanter Effekt durch St-Ht31: die Expressionswerte der Kombinationen aus St-Ht31 mit Olodaterol bzw. St-Ht31 mit Forskolin lagen im selben Bereich wie die Expressionswerte von Olodaterol bzw. Forskolin allein. Die Effekte von St-Ht31 und der inaktiven Form St-Ht31P wiesen keine erkennbaren Unterschiede auf (Abb. 18).

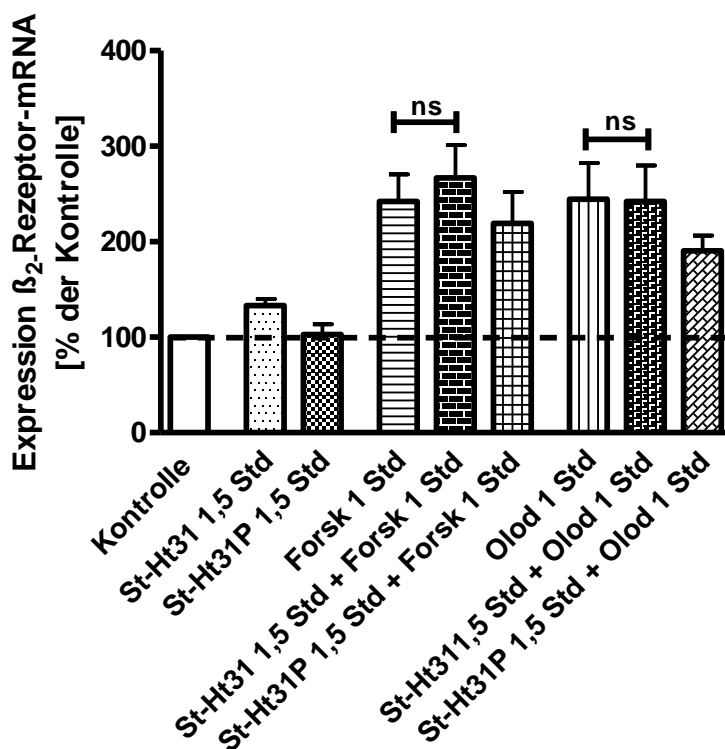


Abb.18: Wirkung von St-Ht31, St-Ht31P, Forskolin und Olodaterol auf die β_2 -mRNA-Expression

Es wurden humane Lungenfibroblasten der Zelllinie MRC-5 ausgesät und nach 24 Stunden Wachstumsphase mit MEM + 10 % FKS und anschließend 24 Stunden Wachstumsphase mit MEM – FKS für 1 Stunde mit 10 μ M Forskolin (Forsk), 1 Stunde mit 10 nM Olodaterol (Olod), 1,5 Stunden mit 10-50 μ M St-Ht31 bzw. St-Ht31P oder mit der Kombination aus 10-50 μ M St-Ht31 bzw. St-Ht31P (1,5 Std.) + 10 μ M Forsk (1 Std.) bzw. 10 nM Olod (1 Std.) inkubiert. Nach Zellyse erfolgten RNA-Präparation, Reverse Transkription und Real-Time PCR mit SYBR[®]Green. Mithilfe der $\Delta\Delta$ CT-Methode wurden Expressionswerte in % bezogen auf die Kontrolle ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit dem Streuungsmaß SEM von n=3 Versuchen. Nicht signifikante Mittelwertunterschiede zwischen Forsk und St-Ht31 + Forsk sowie Olod und St-Ht31 + Olod sind gekennzeichnet mit ns=nicht signifikant.

4. Diskussion

4.1 β_2 -Agonisten induzierte, duale Regulation des β_2 -Rezeptortranskripts

4.1.1 Stimulatorischer Effekt bei Kurzzeitexposition

In vorangegangenen Experimenten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die β_2 -mRNA in den Lungenfibroblasten einem hohen Umsatz unterliegt. Die kurze Halbwertszeit des β_2 -Rezeptortranskripts ermöglicht eine effektive und flexible transkriptionelle Regulation in Antwort auf diverse Stimuli (Racké et al., 2011). Gerade β_2 -Agonisten beeinflussen offenbar die β_2 -Adrenozeptortranskription in ausgeprägter Weise. So wurde sowohl in vorangegangenen Experimenten des hiesigen Labors (Lamyel et al., 2012; Racké et al., 2011, 2012a; Warnken-Uhlich et al., 2011) als auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachtet, dass durch die β_2 -Agonisten Formoterol und Olodaterol bei einstündiger Exposition die β_2 -mRNA-Level deutlich gesteigert werden. Da der selektive β_2 -Rezeptorantagonist ICI 118551 (Baker, 2005) diesen stimulierenden Effekt aufhob (Lamyel et al., 2012), ist von einem rezeptorvermitteltem Mechanismus auszugehen. Um zu zeigen, dass die veränderte mRNA-Menge auf einen transkriptionellen Prozess zurückzuführen ist und nicht etwa auf veränderter mRNA-Stabilität beruht, wurde Actinomycin D eingesetzt. Der Transkriptionsshemmer Actinomycin D verhindert durch Interkalierung mit dem DNA-Strang die RNA-Synthese (Bensaude, 2011). Da bei zusätzlicher Gabe von Actinomycin D der stimulatorische Effekt der β_2 -Agonisten auf die β_2 -mRNA-Expression ausblieb, ist bei dem Effekt von einem direkten, transkriptionsregulierenden Mechanismus auszugehen (Racké et al., 2011). Die Vermutung liegt nahe, dass der Effekt der β_2 -Agonisten über die nachgeschaltete Signalkaskade des β_2 -Rezeptors vermittelt wird. Zwar ist bekannt, dass der β_2 -Adrenozeptor nicht ausschließlich an G_s -Proteine koppelt, sondern beispielsweise auch eine Assoziation mit G_i -Proteinen möglich ist (z.B. Xiao et al., 1999) oder sogar G-Protein-unabhängige Signale vermittelt werden können (Bockaert et al., 2004a; Stallaert et al., 2012), dennoch gilt der G_s -Protein-vermittelte Signalweg des β_2 -Rezeptors nach wie vor als typisch.

Vorangegangene Experimente der Arbeitsgruppe mittels dynamischer Massenverteilung wiesen bereits darauf hin, dass β_2 -Adrenozeptoren in MRC-5-Zellen an G_s -Proteine

koppeln (Lamyel et al., 2011). Das heterotrimere G_s -Protein kann sowohl über die β -/ γ -Untereinheit als auch über die α -Untereinheit nachgeschaltete, zelluläre Signale vermitteln. Klassischerweise wird über die α -Untereinheit die membranständige Adenylatzyklase stimuliert. Durch den Einsatz von Adenylatzyklasestimulatoren (Forskolin und Cholera toxin) sollte die Beteiligung der Adenylatzyklase an der Heraufregulation des β_2 -Rezeptortranskripts untersucht werden. Forskolin stimuliert die Adenylatzyklase durch direkte Interaktion mit ihrer katalytischen Untereinheit (Seamon und Daly, 1986), während Cholera toxin indirekt durch Adenosindiphosphat (ADP)-Ribosylierung der α -Untereinheit des G-Proteins zur irreversibel vermehrten Adenylatzyklaseaktivierung führt (Gill und Meren, 1978; Vanden Broeck et al., 2007). Sowohl Forskolin als auch Cholera toxin ahmten den stimulierenden Effekt der β_2 -Agonisten nach, was die Annahme unterstützt, dass der β_2 -Agonisten-vermittelte, transkriptionelle Regulationsmechanismus über einen Adenylatzyklase-vermittelten cAMP-Anstieg und damit über den klassischen G_s - α -Weg transduziert wird.

Hierbei bleibt allerdings zu berücksichtigen, dass das zellpermeable ADP-Analogon SQ 22,536, welches zu einer nicht kompetitiven Inhibition der Adenylatzyklase führt (Fabbri et al., 1991), den β_2 -Agonisten-vermittelten Effekt nicht antagonisieren konnte. SQ 22,536 bewirkte weder bei einer Konzentration von 100 μ M noch 300 μ M eine signifikante Abschwächung der stimulatorischen Effekte von Formoterol und Olodaterol. Dies erweckt den Anschein, dass der β_2 -Agonisten-induzierte Effekt nicht über die Adenylatzyklase vermittelt wird. Die Möglichkeit, dass die heraufregulierenden Effekte von β_2 -Agonisten und Adenylatzyklasestimulatoren demzufolge unabhängig voneinander sind, wäre zwar denkbar, scheint aber eher unwahrscheinlich. Hierfür müsste davon ausgegangen werden, dass der Effekt der β_2 -Agonisten G_s -Protein-unabhängig, G_s - β / γ -vermittelt oder durch andere, bisher nicht bekannte Kaskaden erfolgt. Zudem weisen β_2 -Agonisten und Adenylatzyklasen nicht nur einen vergleichbaren stimulatorischen Effekt bei einstündiger Inkubationszeit auf, sondern zeigen auch die gleiche inhibitorische Wirkung bei längerer Exposition (siehe unten) und machen daher einen übereinstimmenden, transkriptionsbeeinflussenden Mechanismus viel wahrscheinlicher.

Eine Erklärung für die ausbleibende Wirkung von SQ 22,536 könnte sein, dass keine umfassende Inhibition der Adenylatzyklase erfolgt ist. Entweder SQ 22,536 erreichte

intrazellulär – trotz beschriebener Zellpermeabilität – keine ausreichende Konzentration oder die Substanz hemmt nicht alle Isoenzyme der Adenylatzyklase. In einem aktuellen Übersichtsartikel (Seifert et al., 2012) wird darauf hingewiesen, dass SQ 22,536 die neun Isoformen der Adenylatzyklase unterschiedlich stark inhibiert. Während sich beispielsweise für die Adenylatzyklase-5 eine mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) von 2,2 μ M ergab, lag die IC_{50} der Adenylatzyklase-6 bei 360 μ M und der Adenylatzyklase-2 bei 670 μ M (Johnson et al., 1997; Onda et al., 2001; Seifert et al., 2012). Im Lungengewebe kommen insbesondere die Adenylatzyklaseisoformen 2, 4, 6, 7, 8 und 9 vor (Defer et al., 2000). Denkbar wäre, dass die Isoform der Adenylatzyklase, die den β_2 -Agonisten-Effekt in Lungenfibroblasten (MRC-5) vermittelt, durch SQ 22,536 nicht ausreichend inhibiert wurde. Noch höhere Konzentrationen von SQ 22,536 zu verwenden, würde jedoch das Auftreten von unspezifischen Effekten weiter forcieren (Seifert et al., 2012).

4.1.2 Inhibitorischer Effekt bei Langzeitexposition

Neben dem heraufregulierendem Effekt der β_2 -Agonisten und Adenylatzyklase-stimulatoren bei Kurzzeitexposition konnte bei längerer Exposition (4 Stunden) dieser Substanzen ein herunterregulierender Effekt auf die β_2 -mRNA-Expression beobachtet werden. Wie in der Einleitung erläutert, wurden ähnliche β_2 -Agonisten induzierte, biphasische Effekte auf die β_2 -Rezeptorexpression an glatten Muskelzellen des Hamsters beschrieben (Collins et al., 1989).

Die Befunde implizieren, dass die nachgeschaltete Signalkaskade des β_2 -Rezeptors in der Lage ist, sowohl stimulatorische als auch inhibitorische, genregulierende Faktoren zu aktivieren. Einen Erklärungsansatz für dieses Phänomen bietet die Vorstellung, dass bestimmte Signalkaskaden durch subzelluläre Kompartimentierung räumlich getrennt gesteuert werden. Möglicherweise breitet sich die initial noch räumlich begrenzte cAMP-Anhäufung nach längerer Expositionszeit der Testsubstanzen auf benachbarte Zellkompartimente aus. Dabei gehen nur die initial räumlich begrenzten cAMP-vermittelten Regulationsmechanismen mit einer Expressionssteigerung der β_2 -mRNA einher. Breitet sich das cAMP-Signal hingegen räumlich weiter aus, scheinen inhibitorische Regulationsmechanismen induziert zu werden und zu überwiegen.

4.2 Kompartimentalisierungsmodell

Zum Verständnis dieser Hypothese sollte man berücksichtigen, dass erstens die cAMP-Signalstärke in einer bestimmten Zellregion, welche von der Synthese durch Adenylatzyklen und dem Abbau durch Phosphodiesterasen abhängt, an unterschiedliche Verteilungsmuster dieser Enzyme innerhalb der Zelle gekoppelt ist (Billington und Hall, 2012). Zweitens kann der wasserlösliche Botenstoff cAMP zwar theoretisch frei im Zytosol diffundieren, seine Ausbreitung ist jedoch durch physikalische Barrieren wie etwa Membraneinstülpungen und Zellorganellen – zumindest bedingt – lokal begrenzt (Rich et al., 2000). Und drittens sollte man bedenken, dass cAMP durch das Vorkommen verschiedener Effektmoleküle in den jeweiligen subzellulären Kompartimenten, unterschiedliche Wirkungen induzieren kann.

An der Organisation von subzellulären Kompartimenten sind unterschiedliche Mechanismen beteiligt. Zunächst gilt zu beachten, dass die Verteilung von Rezeptoren auf der Zellmembran nicht zufällig ist. So kommen bestimmte Rezeptortypen – darunter auch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) – in der Zellmembran gehäuft in cholesterin- und sphingolipidreichen Domänen (*lipid rafts*, *membrane rafts*) vor und sind gezielt mit nachgeschalteten Signalkomplexen assoziiert (Becher et al., 2005). GPCRs können dabei durch GPCR-interagierende Proteine (GIPs) unter anderem mit Proteinkinasen, bestimmten Ionenkanälen, Zytoskelettproteinen, kleinen G-Proteinen und Adhäsionsmolekülen verknüpft sein (Bockaert et al., 2004b, c). Eine wichtige Proteinfamilie zur Organisation solcher Multisignalkomplexe stellen die so genannten AKAPs (*A-kinase-anchoring proteins*) dar. Sie sind insbesondere an der Rekrutierung und Direktion der PKA beteiligt. Die Komplexe aus den verschiedenen Signalelementen assemblieren oft erst in Antwort auf bestimmte Signale (z.B. Rezeptoraktivierung) und können unter Umständen wieder schnell zerfallen (Alberts et al., 2008). Dadurch kann eine flexible Interaktion gewährleistet werden. Insgesamt schaffen die räumlich und zeitlich abgestimmten Verteilungsmuster von Signalmolekülen die Grundlage für einen koordinierten Ablauf von Signalkaskaden und ermöglichen, dass dasselbe Signalmolekül (z.B. cAMP) verschiedene, spezifische Wirkungen vermitteln kann. Auch konkret für den β_2 -Rezeptor finden sich in der Literatur Hinweise auf die Relevanz von in Mikrodomänen organisierten Signalprozessen (Davare et al., 2001; DiPilato et al., 2009;

Macdougall et al., 2012). Bezüglich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wäre es also denkbar, dass die cAMP-Akkumulation initial nur auf eine dem Rezeptor nahe Mikrodomäne beschränkt ist, sich nach längerer Exposition der Testsubstanzen aber ausbreitet und deswegen zu unterschiedlicher Genregulation führen kann. Durch diesen Mechanismus kann erklärt werden, wie der gleiche Stimulus zu unterschiedlichen cAMP-vermittelten Wirkungen führen kann.

4.3 cAMP- Überflutung der Zellkompartimente durch Phosphodiesteraseinhibitoren

Im nächsten Schritt wurde durch den Einsatz von Phosphodiesteraseinhibitoren untersucht, ob der verminderte Abbau von cAMP mit einhergehender cAMP-Anhäufung ebenfalls zu einer β_2 -mRNA-Expressionsteigerung führt. Der Phosphodiesteraseinhibitor Zardaverine zeigte jedoch bei verschiedenen Konzentrationen und Expositionsdauern keinerlei signifikante Effekte auf die β_2 -Adrenozeptorexpression. Zardaverine gilt als selektiver Inhibitor für PDE-3 und PDE-4 (Schudt et al., 1991). Trotz verschiedener Hinweise darauf, dass PDE-3 und PDE-4 im Lungengewebe eine besondere Rolle spielen (Torphy, 1998), scheint eine Inhibition dieser Enzyme in Lungenfibroblasten auf die β_2 -Rezeptorregulation keinen Einfluss zu haben. Der nicht-selektive Phosphodiesterase-inhibitor IBMX (Kramer et al., 1977) zeigte bei einstündiger Exposition ebenfalls keinen Effekt. Dies wirft zunächst die Frage auf, ob die alleinige Erhöhung von cAMP für die transkriptionelle Heraufregulation des β_2 -Rezeptors nicht ausreicht. Da aber zwei verschiedene Adenylatzyklasestimulatoren eine Heraufregulation induziert haben, scheint es wahrscheinlicher, dass die Art der cAMP-Anhäufung für die unterschiedlichen Effekte verantwortlich ist. Die Lokalisation von Phosphodiesterasen ist weniger restriktiv auf subzelluläre Areale beschränkt. So liegen die meisten PDE-Isoformen im Gegensatz zu Adenylatzyklasen nicht membran- oder organellen-assoziiert, sondern frei im Zytosol vor (Bender und Beavo, 2006). Daher geht eine PDE-Inhibition mit einer bereits initial weiträumigen Erhöhung des cAMP-Spiegels einher. Das entstehende Signal ist zeitlich und räumlich weniger spezifisch. Mit der vorgestellten Hypothese, dass ein β_2 -Rezeptor nahes cAMP-Signal stimulatorische Transkriptions-

regulatoren induziert, ein überregionales cAMP-Signal hingegen mit der Induktion von inhibitorischen Transkriptionsregulatoren einhergeht, ließe sich erklären, warum IBMX bei kurzer Inkubationszeit netto zu keinem Effekt führt. IBMX würde diesem Modell zufolge bei einstündiger Exposition sowohl β_2 -Rezeptor-heraufregulierende und -herunterregulierende Effekte induzieren. Bei längerer Exposition mit IBMX (4 Stunden) konnte ähnlich zu den β_2 -Agonisten und den Adenylatzyklasestimulatoren eine signifikante Verminderung der β_2 -mRNA-Expression beobachtet werden. Offensichtlich scheinen die induzierten, inhibitorischen Transkriptionsregulatoren zu diesem Zeitpunkt zu überwiegen.

4.4 Basale Inhibition der β_2 -Rezeptortranskription durch kurzlebige Proteine

Zur weiteren Untersuchung der Genregulation des β_2 -Rezeptors wurde der Effekt des Translationshemmers Cycloheximid betrachtet. Cycloheximid hemmt die Proteinbiosynthese (Bennett et al., 1965) und gibt daher Aufschluss darüber, welchen Nettoeinfluss kurzlebige Proteine auf die β_2 -mRNA-Expression haben. Cycloheximid zeigte einen heraufregulierenden Effekt auf die β_2 -mRNA-Expression, der mit der Expositionsdauer zunahm. Translationshemmung und damit einhergehendes Ausbleiben der Wirkung kurzlebiger Proteine resultierte also in einer starken Zunahme des β_2 -Rezeptortranskripts. Dies lässt annehmen, dass unter Ruhebedingungen und regulärer Proteinsynthese kurzlebige, inhibitorische Proteine dominieren und die Transkription des β_2 -Rezeptors dämpfen. Die Transkription des β_2 -Rezeptors unterliegt demnach in Lungenfibroblasten einer basalen, inhibitorischen Regulation. Interessanterweise trifft dies auf andere untersuchte Zelltypen nicht zu: so konnte in Versuchen unserer Arbeitsgruppe bei Epithelzellen (H292), deren basale Expression des β_2 -Rezeptors etwa hundertfach über dem der Fibroblasten liegt, kein Cycloheximideffekt beobachtet werden (Schütz, Dissertation in Bearbeitung).

Um zu zeigen, dass das erhöhte β_2 -mRNA-Level bei Gabe von Cycloheximid tatsächlich auf eine Transkriptionsänderung zurückzuführen ist und nicht durch die Cycloheximid-induzierte Translationsblockade im Sinne einer Akkumulation von mRNA zu Stande kam, wurde die Wirkung des Transkriptionshemmers Actinomycin D untersucht. Der

Effekt von Cycloheximid wurde durch Actinomycin D weitgehend blockiert, weswegen davon ausgegangen werden kann, dass Cycloheximid über einen transkriptionellen Mechanismus die β_2 -mRNA beeinflusst. Der β_2 -mRNA-Expressionswert von Actinomycin D + Cycloheximid lag jedoch schwach signifikant über dem Expressionswert von Actinomycin D allein. Möglicherweise wurde die zelluläre Transkription durch Actinomycin D nicht komplett gehemmt, weswegen Cycloheximid dem inhibitorischen Effekt von Actinomycin D dezent entgegenwirken konnte. Alternativ wäre denkbar, dass der größte Teil des Cycloheximideffekts zwar transkriptioneller Natur ist, ein Teil des Effekts jedoch auch auf die Akkumulation von mRNA zurückzuführen ist.

4.5 Induktion inhibitorischer Proteine bei β_2 -Agonisten Langzeitexposition

Weiterhin wurde der Effekt der Kombinationen aus Cycloheximid mit Olodaterol bzw. Forskolin untersucht. Hierbei zeigten sich bei kombinierter Langzeitexposition mit Cycloheximid und Olodaterol bzw. Forskolin höhere β_2 -mRNA-Expressionswerte als bei alleiniger Exposition mit Cycloheximid. Die zusätzliche Gabe von Cycloheximid wandelte den inhibitorischen Effekt bei Langzeitexposition mit Olodaterol bzw. Forskolin in einen ausgeprägten, stimulatorischen Effekt um.

Wenn man weiterhin davon ausgeht, dass β_2 -Agonisten und Adenylatzyklasestimulatoren aufgrund eines ortsabhängigen cAMP-Signals sowohl inhibitorische als auch stimulatorische Regulatoren induzieren, könnte dieser Befund so gedeutet werden, dass es sich bei den inhibitorischen Regulatoren um kurzlebige Proteine handelt, deren Neusynthese durch Cycloheximid blockiert wird. Das stimulatorische Signal der β_2 -Agonisten und Adenylatzyklasestimulatoren scheint bei vierstündiger Exposition immer noch vorhanden zu sein, wird allerdings erst durch den Zusatz von Cycloheximid demaskiert. Ohne Zusatz von Cycloheximid wird das stimulatorische Signal der β_2 -Agonisten und Adenylatzyklasestimulatoren bei längerer Exposition durch das Überwiegen von inhibitorischen, kurzlebigen Proteinen überschattet. Die Versuche zeigen, dass durch Wegfall dieser inhibitorischen Regulatoren die stimulatorischen Komponenten von Olodaterol und Forskolin wieder zum Tragen kommen. Die stimulatorischen Regulatoren müssten diesem Modell zufolge langlebigerer Natur sein

und dürften nicht auf *de novo*-Proteinsynthese angewiesen sein. Nur bei der stimulatorischen Komponente der β_2 -Agonisten induzierten Expressionsregulation handelt es sich offenbar um eine direkte Beeinflussung des β_2 -Rezeptorgens, während die inhibitorische Komponente indirekt durch Neusynthese von Proteinen vermittelt wird. Offen bleibt, ob hierbei die gleichen Proteine neusynthetisiert werden, die bereits basal aktiv sind, oder ob andere kurzlebige Inhibitorproteine induziert werden.

Abbildung 19 veranschaulicht modellhaft die Regulation der β_2 -Rezeptortranskription durch basal aktive inhibitorische Proteine sowie durch β_2 -Agonisten induzierte Effekte.

4.6 Beteiligung der PKA an der β_2 -Agonisten induzierten Regulation des β_2 -Rezeptortranskripts

4.6.1 Stimulatorische und inhibitorische Komponente der PKA

Aufgrund der Frage, wie die Regulation der β_2 -mRNA-Expression nach Synthese von cAMP weiter abläuft, wurde die Wirkung der cAMP-Analoga EPAC-Agonist (*8-CPT-2'O-Me-cAMP*) und PKA-Agonist (*6-Bnz-cAMP*) untersucht. EPAC-Agonist führt zu einer selektiven Aktivierung von EPAC, während PKA-Agonist zu einer selektiven Aktivierung der PKA führt. Die alleinige Gabe der cAMP-Analoga ging mit keiner Wirkung auf die β_2 -mRNA-Menge einher, was zunächst vermuten ließ, dass keines der beiden Effektor-moleküle an der Transkriptionsregulation beteiligt ist. Dieser Befund wäre insofern erstaunlich, da PKA und EPAC zu den bisher bekannten Hauptzielstrukturen für cAMP zählen und offen wäre, über welche andere Signalkaskade das cAMP-Signal zur Expressionsregulation führt. Weitere Versuche zeigten jedoch, dass der PKA-Agonist bei gleichzeitiger Gabe von Cycloheximid zu einer signifikanten Steigerung der β_2 -mRNA-Menge im Vergleich zur Exposition mit Cycloheximid alleine führt. EPAC-Agonist hingegen zeigte auch hier keine Wirkung. Dieser Befund spricht für eine Beteiligung der Proteinkinase A.

Es wäre denkbar, dass die PKA in zweierlei Weise an der β_2 -Rezeptorgenregulation beteiligt ist und sowohl inhibitorische als auch stimulatorische Regulationsprozesse vermitteln kann. Bei Stimulation der PKA durch PKA-Agonist gleichen sich die stimula-

torischen und inhibitorischen Effekte aus. Schaltet man durch Verabreichung von Cycloheximid hingegen kurzlebige Proteine aus, so überwiegt insgesamt eine PKA-Agonist-induzierte Erhöhung des β_2 -mRNA-Levels. Man könnte daraus ableiten, dass die PKA einerseits kurzlebige inhibitorische Proteine aktiviert bzw. deren Synthese induziert und andererseits über langlebigere Proteine bzw. Transkriptionsfaktoren auch stimulatorisch auf die β_2 -mRNA-Expression wirkt.

Zu diskutieren bleibt, inwiefern sich die PKA-vermittelten stimulatorischen und inhibitorischen Signale mit denen der β_2 -Agonisten decken. Es scheint jedoch plausibel, dass die PKA die transkriptionelle Regulation der β_2 -Agonisten vermittelt. Zumal in der Literatur bereits beschrieben wurde, dass die Promotorregion des β_2 -Adrenozeptors über ein CRE-Motiv verfügt und dieses an β_2 -Agonisten-vermittelter Heraufregulation der β_2 -mRNA-Expression beteiligt ist (Collins et al., 1990). Es wäre also vorstellbar, dass die PKA nach Stimulation durch cAMP den Transkriptionsfaktor CREB phosphoryliert, welcher dann nach Assoziation mit CBP (*CREB-binding protein*) am CRE-Motiv des β_2 -Adrenozeptorgens bindet und die Transkriptionsrate des Gens erhöht. Insbesondere die stimulatorische Komponente der β_2 -Agonisten könnte somit PKA-vermittelt sein (siehe Abb.19).

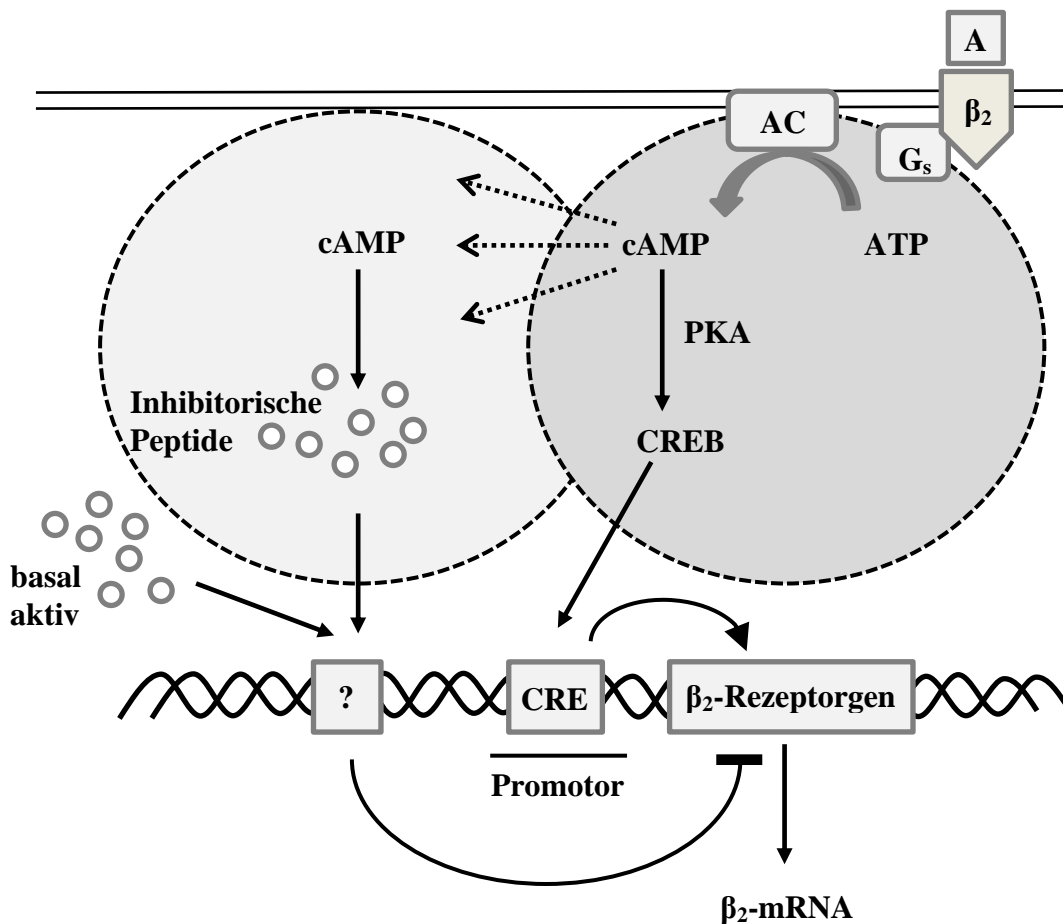


Abb.19: Modell zur β_2 -Agonisten induzierten Regulation der β_2 -Rezeptortranskription. Nach Agonistenbindung (A) am β_2 -Rezeptor (β_2) wird über ein G_s -Protein (G_s) die Adenylatzyklase (AC) aktiviert und damit die cAMP-Synthese gesteigert. cAMP vermittelt initial innerhalb einer rezeptornahen Mikrodomäne eine Heraufregulation der β_2 -Rezeptortranskription durch nachgeschaltete, direkte Interaktion mit dem β_2 -Rezeptorgen: dies erfolgte über eine PKA-vermittelte CREB-Aktivierung und sich anschließender Interaktion mit CRE in der Promotorregion. Breitet sich das cAMP-Signal in weiträumigere Zellkompartimente aus, werden kurzlebige Proteine (○) induziert, die durch bislang ungeklärte Interaktion zu einer Herabregulation der β_2 -Rezeptortranskription führen. Bei diesen kurzlebigen Proteinen handelt es sich entweder um die gleichen, die schon basal aktiv sind, oder um zusätzliche Faktoren.

Es sollte allerdings berücksichtigt werden, dass Cycloheximid in Kombination mit Olodaterol bzw. Forskolin zu einem weitaus höheren Level der β_2 -mRNA (1160 % bzw. 1175 %) führte als die Kombination aus Cycloheximid mit PKA-Agonist (739 %). Dieser Befund könnte dafür sprechen, dass der stimulatorische Effekt der β_2 -Agonisten und Adenylatzyklasestimulatoren nicht vollständig über die PKA transduziert wird.

4.6.2 Gegenteilige Effekte durch Proteinkinaseinhibitoren

Um weiter zu untersuchen, ob die PKA für die stimulatorischen und/oder inhibitorischen Effekte der β_2 -Agonisten auf die β_2 -mRNA-Expression (mit-)verantwortlich ist, kamen die Proteinkinaseinhibitoren Kt 5720 (Kase et al., 1987) und H89 (Hidaka et al., 1990; Lochner und Moolman, 2006) zum Einsatz. Es handelt sich um Proteinkinaseinhibitoren, welche durch kompetitive Inhibition die Bindungsstelle für ATP an der katalytischen Untereinheit der PKA blockieren (Murray, 2008). Es wurde getestet, inwiefern sich der heraufregulierende Eigeneffekt von Olodaterol (1 Stunde), Cycloheximid bzw. Cycloheximid und Olodaterol und der herunterregulierende Effekt von Olodaterol (4 Stunden) durch die Proteinkinaseinhibitoren antagonisieren lassen. Auch der Eigeneffekt der Proteinkinaseinhibitoren wurde untersucht. Die Interpretation der Ergebnisse ist jedoch insofern nicht trivial, als dass die beiden Proteinkinaseinhibitoren unterschiedliche Effekte induziert haben. Schon die Eigeneffekte der Proteinkinaseinhibitoren zeigten gegenteilige Wirkungen. So konnte man bei eineinhalbstündiger Exposition zwar weder bei Kt 5720 noch bei H89 einen Eigeneffekt beobachten, bei viereinhalbstündiger Exposition führte Kt 5720 jedoch zu einer signifikanten Heraufregulation der β_2 -mRNA, während H89 eine signifikante Herabregulation nach sich zog. Weiterhin bewirkte H89 (10 μ M) eine signifikante Antagonisierung der stimulatorischen Effekte von Olodaterol (1 Stunde), Cycloheximid und Cycloheximid mit Olodaterol, Kt 5720 hingegen veränderte deren Effekte weder bei einer Konzentration von 100 nM noch von 1 μ M. Die herabregulierende Wirkung von Olodaterol (4 Stunden) auf die β_2 -mRNA wurde durch H89 verstärkt (nicht signifikant), während Kt 5720 eine Abschwächung des Olodateroleffekts bedingte. Allerdings ist bei letztgenannten Befunden vermutlich davon auszugehen, dass die erwähnten Eigeneffekte von H89 und Kt 5720 eine additive Verstärkung (H89) bzw. eine scheinbare Antagonisierung (Kt 5720) der durch Olodaterol induzierten Herabregulation bedingt haben.

Die Effekte von Kt 5720 auf die β_2 -mRNA-Expression lassen vermuten, dass die Proteinkinase A langfristig eher inhibitorische Elemente begünstigt, eventuell an der inhibitorischen Wirkung von β_2 -Agonisten beteiligt ist, jedoch nicht die stimulatorische Wirkung von β_2 -Agonisten vermittelt. Die β_2 -mRNA-Expressionswerte der H89-Versuche hingegen deuten entgegengesetzt darauf hin, dass die Proteinkinase A eher stimula-

torische Effekte auf die β_2 -mRNA-Expression vermittelt und den stimulatorischen, jedoch nicht den inhibitorischen Effekt der β_2 -Agonisten transduziert.

Diese gegenteiligen Befunde von Kt 5720 und H89 werfen die Frage auf, welche Unterschiede im Wirkungsprofil der Inhibitoren bestehen.

Wie erwähnt, wirken die beiden Inhibitoren prinzipiell über denselben Mechanismus: sie konkurrieren mit ATP um die ATP-Bindungsstelle der katalytischen Untereinheit der durch cAMP bereits aktivierten Proteinkinase A. Durch ausbleibende ATP-Bindung kann die PKA ihre Zielstrukturen nicht mehr phosphorylieren und wird in ihrer Wirkung blockiert (Murray et al., 2008).

Im Folgenden sollen potentielle Wirkunterschiede der PKA-Inhibitoren diskutiert werden.

4.6.2.1 Qualitative Unterschiede im Wirkprofil von Kt 5720 und H89

Zunächst wäre es denkbar, dass das unterschiedliche Wirkprofil der Inhibitoren durch eine Präferenz für verschiedene PKA-Isoenzyme zu Stande kommt. Die katalytische Untereinheit der Proteinkinase A, welche Ziel der Inhibitoren ist, verfügt über die Varianten C α , C β , C γ sowie PrKX (Skalhegg und Tasken, 2000; Vetter et al., 2011) und deren katalytisch inaktive Isoform PrKY (Schiebel et al., 1997a, b). Darüber hinaus können weitere Unterformen unterschieden werden, die insbesondere durch alternatives Splicen bedingt sind (Tabish et al., 2010). Während die C α -Untereinheit ubiquitär vorkommt, und die C β -, und PrKX-Isoformen ebenfalls in zahlreichen Geweben – darunter auch in der Lunge – exprimiert werden (Badel, 2011; Li et al., 2005; Uhler et al., 1986), findet sich die C γ -Isoform lediglich im Hoden (Beebe et al., 1990).

Prinzipiell wäre es vorstellbar, dass H89 und Kt 5720 die Isoformen der PKA unterschiedlich hemmen; auch da sich die Inhibitoren in ihren molekularen Strukturen erheblich unterscheiden (Abb. 20, 21).

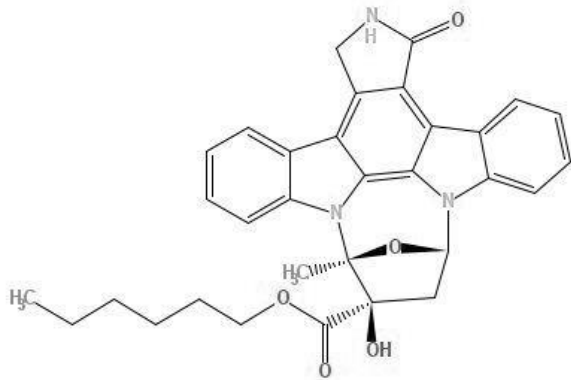


Abb. 20: Strukturformel Kt 5720

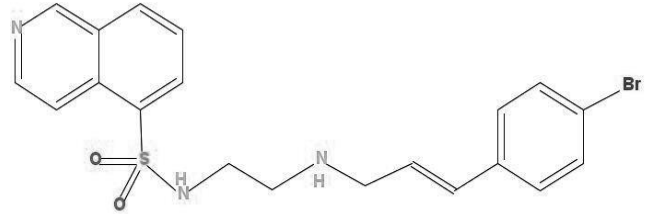


Abb. 21: Strukturformel H89

Für eine mögliche Isoform-Präferenz sind neben den unterschiedlichen Strukturen der Inhibitoren zusätzlich auch strukturelle Unterschiede an der Inhibitor-Bindungsstelle der katalytischen Untereinheiten nötig. Betrachtet man die strukturellen Unterschiede der Isoformen der katalytischen PKA-Untereinheiten auf Aminosäureebene, so ergibt sich zwischen C α und C β eine Übereinstimmung der Aminosäuresequenz von 92 %, zwischen C α und PrKX jedoch von nur 57 % (Badel, 2012). Die PrKX unterscheidet sich damit relativ stark von den anderen Varianten. Allerdings ist die Kernregion der einzelnen Varianten hoch konserviert (Hanks et al., 1991; Moll, 2007). Das heißt die Struktur der ATP-Tasche, an die die Inhibitoren binden, ist insgesamt nicht sehr variabel. Diese Tatsache macht eine Isoformpräferenz seitens der PKA-Inhibitoren zunächst eher unwahrscheinlich. Jedoch weist die Adenosinbindungsstelle innerhalb der ATP-Bindetasche verglichen mit der Triphosphatbindungsstelle eine relativ hohe Variabilität auf (Breitenlechner et al., 2005; Lochner und Moolman, 2006). Aus Kristallstrukturanalysen weiß man, dass Isoquinolinesulfonamide wie H89 an diese Adenosinregion binden (Engh et al., 1996). Dies könnte möglicherweise ein Hinweis darauf sein, dass H89 PKA-Isoformen mit bestimmten Strukturbesonderheiten in der Adenosinbindungsregion bevorzugt. Allerdings bleibt es fraglich, ob bei den eingesetzten, recht hohen Konzentrationen von H89 eine dezente Isoformpriorisierung die gegensätzlichen Effekte von Kt 5720 und H89 ausreichend begründen kann. Soweit bekannt fehlen in der Literatur bislang konkrete Hinweise darauf, dass Kt 5720 und H89 über Isoenzympräferenzen verfügen.

4.6.2.2 Quantitative Unterschiede im Wirkprofil von Kt 5720 und H89

Neben der Möglichkeit eines qualitativen Unterschieds in der Wirkung der Proteinkinase-Inhibitoren wäre es möglich, dass die Proteinkinase A durch H89 und Kt 5720 quantitativ nicht im gleichen Ausmaß blockiert wurde. Die Inhibitionskonstante K_i (Verhältnis zwischen dem Konzentrationsprodukt von freiem Enzym und Inhibitor zur Inhibitor-Enzymkomplexkonzentration) von H89 liegt *in vitro* bei 50 nM (Chijiwa et al., 1990), die von Kt 5720 bei 60 nM (Kase et al., 1987). Aufgrund des kompetitiven Inhibitionsmechanismus ist die benötigte Inhibitorkonzentration zur Hemmung der PKA jedoch vom ATP-Spiegel der Zelle abhängig und kann somit *in vivo* stärker als erwartet von *in vitro* Werten abweichen. So liegt der IC_{50} -Wert (Konzentration bei halbmaximaler Inhibition) von Kt 5720 bei niedrigem ATP-Spiegel (5 μ M) laut dem Hersteller Calbiochem bei 56 nM, bei einem physiologischeren, höheren ATP-Spiegel (0,1 mM) jedoch bei 3 μ M (Davies et al., 2000). Für H89 ergab sich bei 0,1 mM ATP-Konzentration ein IC_{50} von 135 nM (Davies et al., 2000). Den Befunden dieser Studie zufolge müsste die verwendete Konzentration von H89 (10 μ M) zur PKA-Inhibition ausreichend gewesen sein, die von Kt 5720 (1 μ M) jedoch möglicherweise nicht. In einer Studie unserer Arbeitsgruppe (Haag, 2009), in der die Beteiligung der PKA bei antiproliferativen Signalwegen an derselben Fibroblastenzelllinie (MRC-5) wie in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, konnte gezeigt werden, dass Kt 5720 (100 nM) eine Butaprost-induzierte, PKA-vermittelte CREB-Phosphorylierung nicht antagonisieren konnte. Dies lässt vermuten, dass bei dieser Konzentration keine (ausreichende) PKA-Inhibition in den Fibroblasten zu Stande kam. H89 hingegen schwächte die CREB-Phosphorylierung ab und führte bei einer Konzentration von 10 μ M zu einer kompletten Unterdrückung der CREB-Phosphorylierung (Haag, 2009). Diese Befunde deuten darauf hin, dass H89 in MRC-5 Zellen bei den verwendeten Konzentrationen tatsächlich eine Inhibition der PKA verursacht, Kt 5720 jedoch offensichtlich nicht. Für die Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit wäre es also denkbar, dass Kt 5720 einen potentiellen PKA-Effekt nicht (vollständig) antagonisiert hat. Diese Annahme würde die Hypothese unterstützen, dass die PKA den stimulatorischen Effekt von β_2 -Agonisten (zum Teil) transduziert und dieser Effekt durch PKA-Inhibition mit H89 aufgehoben wird.

4.6.2.3 Unspezifische Effekte von Kt 5720 und H89

Weiterhin gilt zu berücksichtigen, dass obwohl die verwendeten Inhibitoren laut Hersteller als PKA-spezifisch gelten, verschiedene Studien ein breites Spektrum an zusätzlichen Nebeneffekten beschreiben (Murray et al., 2008). Dies impliziert, dass die unterschiedlichen Effekte der Proteinkinaseinhibitoren möglicherweise durch unspezifische Wirkungen auf diverse Signalmoleküle zu erklären sind. Kt 5720 führt beispielsweise zur Inhibition der PHK (Phosphorylasekinase), PDK1 (3-Phosphoinositide-abhängige-Kinase-1), MSK1 (*mitogen- and stress- activated protein kinase-1*) und MEK (*mitogen-activated protein kinase kinase*). Wobei die K_i -Werte der PHK (11 nM) und PDK1 (330 nM) sogar weitaus unter dem K_i -Wert für die Proteinkinase A liegen (Davies et al., 2000). Es gibt auch Hinweise darauf, dass Kt 5720 PKA-unabhängigen Einfluss auf die Transkription nimmt (Murray et al., 2008). So zeigte sich in einer Studie an Ovarialzellen des Hamsters, dass die Gabe von Kt 5720 bereits bei 10 μ M jegliche detektierbare RNA-Synthese inhibiert (Keezer und Gilbert, 2002).

Auch H89 weist diverse unspezifische Effekte auf. Neben Interaktionen mit Enzymen wie CaMK II (Calmodulinkinase II), CK I (Caseinkinase I) und MLCK (Myosin-leichte-Ketten-Kinase), die der Hersteller Calbiochem bereits angibt, zeigte eine Studie, dass H89 mindestens acht weitere Kinasen hemmt, darunter MSK1, S6K1 (*p 70 ribosomal protein S6 kinase-1*) und ROCK-II (*Rho-associated protein kinase II*) (Davies et al., 2000). Dabei fanden sich für MSK1 und S6K1 sogar niedrigere IC_{50} -Werte als für die PKA. Für ROCK II ergab sich mit einem $IC_{50}=270$ nM eine vergleichbar potente Inhibition wie für die PKA. Da die Proteinkinase A selbst auch eine Inhibition von ROCK bedingt, muss man davon ausgehen, dass sowohl PKA als auch H89 den gleichen Effekt auf dieses Molekül ausüben können (Murray, 2008). Dies zeigt, wie komplex das Wirkspektrum der Substanzen ist und wie vorsichtig die Interpretation von Ergebnissen erfolgen muss. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass H89 direkte, inhibitorische Effekte auf die K^+ -Kanäle K_{ATP} und K_{ir} ausübt (Sun Park et al., 2006). Darüber hinaus gibt es auch Hinweise darauf, dass H89 mit dem β_2 -Adrenozeptor interagieren kann, was für die Ergebnisinterpretation der vorliegenden Arbeit besonders wichtige Konsequenzen haben könnte. So zeigte sich in einer Studie an glatten Bronchialmuskulzellen, dass H89 als β_1 - und β_2 -Rezeptorantagonist wirkt und somit die Wirkung von β_2 -Agonisten abschwächen kann (Penn et al., 1999). In der Studie ergab sich für

H89 für die Inhibition der Bindung am β_2 -Rezeptor eine K_i von 180 nM und für den Antagonismus am β_2 -Rezeptor eine konzentrationsabhängige K_i von 0,2-1,3 μ M. Diese K_i -Werte liegen unter dem in vivo K_i -Wert der PKA-Inhibition durch H89 (Penn et al., 1999). Vor diesem Hintergrund wäre es denkbar, dass die Antagonisierung des Effekts durch Olodaterol bzw. Cycloheximid und Olodaterol bei H89-Gabe nicht durch Inhibition der Proteinkinase A zu Stande kam, sondern durch direkten Antagonismus am β_2 -Rezeptor. Allerdings könnte diese Hypothese nicht erklären, warum H89 den inhibitorischen 4-Stunden Effekt von Olodaterol nicht antagonisiert. Wäre der Effekt von H89 tatsächlich und ausschließlich auf einen β_2 -Antagonismus zurückzuführen, müsste man davon ausgehen, dass auch der inhibitorische Effekt von Olodaterol durch H89 unterbunden wird.

Die vorgestellten Erklärungsmodelle für die unterschiedlichen Effekte der beiden Proteinkinaseinhibitoren und daraus resultierende mögliche Interpretationen erlauben insgesamt keine definitive Aussage über die Rolle der PKA an der Signaltransduktion der β_2 -Transkriptionsregulation. Im Nachhinein lässt sich feststellen, dass die verwendeten Proteinkinaseinhibitoren keine ausreichende Eignung aufweisen, um eine Beteiligung der PKA sicher zu belegen oder auszuschließen, da bei den notwendigen Konzentrationen mit diversen Nebeneffekten zu rechnen ist. Eventuell könnte der Einsatz von Proteinkinaseinhibitoren mit anderem Wirkprofil weitere Rückschlüsse erlauben. Kompetitive cAMP-Antagonisten blockieren die PKA beispielsweise einen Schritt früher, sodass die katalytischen Untereinheiten der PKA erst gar nicht freigesetzt werden. Letztendlich wird die genaue Rolle der PKA erst durch *knockdown*-Experimente mit selektiver Ausschaltung von PKA-Enzymen geklärt werden können.

4.6.3 Rolle von AKAP für Effekte der β_2 -Agonisten

Zur weiteren Untersuchung einer potentiellen Beteiligung der PKA am expressionsregulierenden Effekt der β_2 -Agonisten, kam der AKAP (*A-Kinase-Anchoring-Protein*)-Inhibitor St-Ht31 zum Einsatz, der die Interaktion zwischen AKAP und PKA blockiert (Carr et al., 1992; Vijayaraghavan et al., 1997). Wie bereits erwähnt gehören AKAPs zu einer wichtigen Proteinfamilie, die an der räumlichen Organisation von verschiedenen

Signalmolekülen – insbesondere der PKA – beteiligt ist. Als so genannte *scaffold*-Proteine binden sie einerseits mit dem *anchoring motif* an Enzyme wie die PKA und andererseits mit dem *targeting motif* an Zellstrukturen wie Strukturproteine, Membranen oder Organellen (Dell'Acqua und Scott, 1997). AKAPs können diverse Enzyme binden, jedoch gilt die Direktion der PKA als Hauptaufgabe der AKAPs. AKAP-Moleküle binden dabei über eine amphipathische Helix-Struktur an die regulatorische Untereinheit der PKA (Carr et al., 1991). Dabei werden insbesondere die Isoformen der regulatorischen Untereinheit RII α und RII β von AKAPs gebunden, während die Isoformen RI α und RI β vorwiegend ungebunden im Zytoplasma vorkommen (Dell'Acqua und Scott, 1997). Die RII-Untereinheiten der PKA gelten damit als die typischen Bindungspartner für AKAPs, auch wenn eine Interaktion zwischen AKAP und RI-Isoform prinzipiell ebenfalls möglich ist (z.B. Huang et al., 1997). Da die Isoformen der regulatorischen Untereinheiten der PKA (v.a. RII α und RII β) über unterschiedliche Affinitäten zu verschiedenen AKAPs verfügen und die Unterformen der AKAPs wiederum an unterschiedliche Zellstrukturen und weitere Signalmoleküle binden, wird eine PKA-Isoform-abhängige räumliche Assemblierung von Signalkomplexen gewährleistet.

Durch das zellpermeable, inhibitorische Peptid St-Ht31 (Stearat-gekoppeltes Ht31) wird die Interaktion zwischen AKAP und PKA blockiert. Das Peptid enthält die Bindungsdomäne von AKAP Ht31 und konkurriert somit mit AKAP-Molekülen um die Bindungsstelle der regulatorischen PKA-Untereinheit. Durch den Einsatz des Peptids im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte demnach getestet werden, inwiefern das intakte Zusammenspiel von AKAP und PKA für den Effekt der β_2 -Agonisten auf die β_2 -mRNA-Expression nötig ist bzw. ob eine Blockade der Interaktion den β_2 -Agonisteneffekt aufhebt. Als interne Versuchskontrolle kam das inaktivierte Peptid St-Ht31P zum Einsatz. Es konnte jedoch weder bei einer St-Ht31-Konzentration von 10 μ M (n=1) noch von 50 μ M (n=2) ein Effekt beobachtet werden. Zwar ist aufgrund der geringen Versuchszahl nicht auszuschließen, dass ein potentieller Effekt übersehen wurde; da sich jedoch nicht mal eine richtungsweisende Tendenz in den drei Versuchen abzeichnete, ist es wahrscheinlicher, dass St-Ht31 tatsächlich keine antagonisierende Wirkung auf den β_2 -Agonisteneffekt aufweist. Dieses Versuchsergebnis lässt sich verschieden interpretieren.

Zunächst liegt die Vermutung am nächsten, dass die PKA den β_2 -Agonisteneffekt nicht vermittelt und daher St-Ht31 keinen Effekt zeigt. Dies würde implizieren, dass für den β_2 -Agonisteneffekt ein anderes Signalmolekül verantwortlich sein müsste. Der beobachtete PKA-Effekt auf die β_2 -mRNA-Expression, der sich im Versuch mit Cycloheximid und PKA-Agonist zeigte, müsste dann als unabhängig von dem β_2 -Agonisteneffekt beurteilt werden.

Die nächste Möglichkeit besteht darin, dass die PKA am β_2 -Agonisteneffekt beteiligt ist, die Hemmung der Interaktion zwischen PKA und AKAP jedoch nicht zu einem Wirkungsverlust der PKA führte. Die gesamten Versuchsergebnisse lieferten jedoch bisher viele Hinweise darauf, dass das Vorhandensein von subzellulären Signalkomplexen für die β_2 -Agonisten induzierte β_2 -mRNA-Expressionsregulation entscheidend ist. Ginge man daher davon aus, dass AKAPs im vorliegenden Fall nicht für die Rekrutierung der PKA verantwortlich sind, müssten andere Mechanismen für die Direktion der PKA in β_2 -rezeptornahe Mikrodomänen verantwortlich sein. Andernfalls wäre das Konzept über die bedeutende Rolle von subzellulärer Organisation für die Signalkaskade nicht aufrechtzuerhalten.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass die PKA den β_2 -Agonisteneffekt vermittelt und auch eine PKA-AKAP-Interaktion nötig ist, St-Ht31 jedoch die Interaktion zwischen PKA und AKAP nicht hemmen konnte und somit der β_2 -Agonisteneffekt nicht antagonisiert wurde. Grund könnte das Vorkommen von zellspezifischen AKAP-Isoformen sein, die durch St-Ht31 qualitativ oder quantitativ unterschiedlich gehemmt werden. Es wird berichtet, dass Ht31 die Bindung verschiedener AKAPs an die regulatorischen PKA-Untereinheiten RII α , RII β (EC_{50} 6-360 nM) und sogar auch RI α (EC_{50} 355 nM) kompetitiv hemmt (Herberg et al., 2000). Es lassen sich demnach zwar Unterschiede bezüglich der Affinität zu verschiedenen AKAPs feststellen, ob diese bei den verwendeten Konzentrationen von St-Ht31 (10 μ M, 50 μ M) relevant sind, bleibt fraglich. Generell gilt Ht31 eher als ein globaler PKA-AKAP-Inhibitor. Die nicht-selektive Inhibition von PKA-AKAP-Interaktionen hat zur Konsequenz, dass zahlreiche PKA-Wirkungen der Zelle verändert werden. Möglicherweise kam es daher neben einer erfolgreichen Blockade der Agonisten-induzierten PKA zu weiteren Effekten, welche die Antagonisierung überlagerten.

Insgesamt können die Versuche mit St-Ht31 die Beteiligung der PKA weder untermauern noch überzeugend widerlegen.

4.7 Schlussfolgerung und Ausblick

Auch wenn β_2 -Agonisten oftmals aufgrund von Langzeitriskien und Wirkungsverlust kritisch betrachtet werden, gehören sie unabdinglich zur Therapie von Asthma und COPD. Die komplexen β_2 -Agonisten induzierten Regulationsprozesse des β_2 -Adrenozeptors, welche potentiell mit klinischen Wirkveränderungen einhergehen, beschränken sich jedoch nicht nur auf Desensibilisierung und Downregulation. Vielmehr scheinen die Agonisten auf transkriptioneller Ebene auch Mechanismen zu induzieren, welche mit einer Erhaltung der zur Verfügung stehenden β_2 -Rezeptoren einhergehen. Der β_2 -Agonisten induzierte, stimulierende Effekt auf die β_2 -Adrenozeptor-mRNA erwies sich dabei zwar als transient und kehrte sich in einen inhibitorischen Effekt bei Langzeitexposition um, jedoch zeigte sich, dass das stimulierende Signal weiterhin vorhanden ist und nur durch zusätzliche, inhibitorische Effekte überlagert wird. Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei den stimulatorischen und inhibitorischen Regulationen um cAMP-vermittelte Signalwege handelt. Die Signalmoleküle, die an der weiteren Transduktion beteiligt sind, konnten bislang nicht eindeutig indentifiziert werden. Die bisherigen Erkenntnisse deuten jedoch stark auf die Beteiligung der Proteinkinase A – insbesondere bezüglich der stimulatorischen Komponente – hin. Eine detaillierte Aufschlüsselung der nachgeschalteten Signalwege wird Gegenstand weiterführender Studien sein.

In einem weiteren Schritt wäre es von Interesse, die Korrelation zwischen den in der vorliegenden Arbeit erhobenen mRNA-Level des β_2 -Adrenozeptors und den translatierten Rezeptorproteinen zu untersuchen. Darüber hinaus wird sich auch die Aufdeckung der Regulationsprozesse des β_2 -Rezeptors in anderen Zellgruppen interessant gestalten: in wie weit sind die Erkenntnisse der Regulationsprozesse in Lungenfibroblasten auf andere Zelltypen übertragbar? Besonders Erkenntnisse über die Mechanismen in glatten Muskelzellen könnten hierbei Einfluss auf die pharmakologische Therapiestrategien bei Atemwegserkrankungen haben.

5. Zusammenfassung

Bei Asthma bronchiale und COPD gelten β_2 -Agonisten als wichtige Medikamente für Dauer- und Bedarfsmedikation. Zusätzlich zu ihrer bronchodilatativen und broncho-
protektiven Wirkung scheinen sie auch über antiinflammatorische und antifibrotische
Eigenschaften zu verfügen. Dennoch wird ihr Einsatz auch kritisch hinterfragt, da die
Langzeittherapie einigen Studien zufolge Risiken birgt und mit gewissen Wirkungs-
verlusten einhergeht. Unsere Kenntnisse über kurz- und langfristige Regulations-
mechanismen des β_2 -Adrenozeptors zu erweitern, ist daher von besonderem Interesse.
Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit die Regulation der β_2 -Adreno-
zeptortranskription in humanen Lungenfibroblasten der Zelllinie MRC-5 untersucht.
Insbesondere die durch β_2 -Agonisten ausgelösten Mechanismen zur Beeinflussung der
 β_2 -Adrenozeptortranskription wurden beleuchtet. Die Zellen wurden hierfür mit ver-
schiedenen Testsubstanzen exponiert, woraufhin nach RNA-Präparation und Reverser
Transkription die β_2 -Adrenozeptorexpression mittels Real-Time PCR quantitativ be-
stimmt wurde.

Es zeigte sich, dass die Expression des β_2 -Rezeptors in MRC-5 Zellen einer
ausgeprägten, transkriptionellen Regulierung unterliegt. Kurzlebige, inhibitorische
Proteine drosseln unter Ruhebedingungen die Transkription des Rezeptorgens. β_2 -
Agonisten üben einen zeitabhängigen Einfluss auf die β_2 -Rezeptortranskription in Form
einer schnellen Heraufregulation und einer zeitlich verzögerten Herabregulation aus.
Diese Effekte werden von Adenylatzyklasestimulatoren nachgeahmt, weswegen von
einem cAMP-vermittelten Signalweg ausgegangen werden kann. Im Wirkprofil von
Phosphodiesterase-Inhibitoren fehlt ein initial stimulierendes Signal ähnlich dem der β_2 -
Agonisten und Adenylatzyklasestimulatoren, da die Zellen hier offensichtlich rasch mit
cAMP überflutet werden. Bei längerer Exposition zeigt sich ein Überwiegen der
inhibitorischen Komponente.

Die biphasische Transkriptionsregulation der β_2 -Agonisten ist vermutlich auf das
Vorkommen von subzellulär organisierten Signalprozessen zurückzuführen. So führt
eine räumlich begrenzte Erhöhung des Botenstoffs cAMP zunächst zur Stimulation der

β_2 -Rezeptorexpression, während eine Ausbreitung des cAMP-Signals zusätzlich kurzlebige, inhibitorische Elemente induziert. Das stimulatorische Signal ist bei längerer Agonistenexposition bzw. Ausbreitung des cAMP-Signals jedoch weiterhin vorhanden. Nach Ausschalten der kurzlebigen Proteine führen die β_2 -Agonisten somit auch bei längerer Exposition zur Heraufregulation des β_2 -Transkripts. Nur die stimulatorische Komponente der β_2 -Agonisten induzierten Expressionsregulation scheint einer direkten Regulation des β_2 -Rezeptorgens zu entsprechen, während die inhibitorische Komponente indirekt durch Neusynthese von Proteinen vermittelt wird.

Welche cAMP-nachgeschalteten Signalwege für die Transkriptionsregulation verantwortlich sind, ist bisher nicht sicher darzulegen. Es zeigen sich keine Hinweise für die Beteiligung von EPAC an der Regulation. Die Beteiligung der PKA hingegen ist vor allem für die stimulatorische Komponente der β_2 -Agonisten anzunehmen. Unter Ruhebedingungen führte die Aktivierung der PKA mittels PKA-Agonist zu keiner Änderung der β_2 -Transkription. Die Aktivierung der PKA bei gleichzeitig ausgeschalteten, kurzlebigen Proteinen führte hingegen zu einer Heraufregulation des β_2 -Transkripts. Die PKA scheint somit sowohl stimulatorische als auch inhibitorische Effekte bezüglich der β_2 -Adrenozeptorexpression zu vermitteln. Versuche mit Proteinkinaseinhibitoren und Ankerproteininhibitoren konnten jedoch keine definitiven Erkenntnisse über die Beteiligung der PKA liefern.

Die detaillierte Untersuchung der verschiedenen Akteure im Regulationsmechanismus des β_2 -Adrenozeptors wird Gegenstand weiterer Studien sein. Daraus resultierende Erkenntnisse werden möglicherweise zu künftigen Weiterentwicklungen der Therapiekonzepte bei Atemwegserkrankungen beitragen können.

6. Literaturverzeichnis

- Abisheganaden J, Boushey HA. Long-acting inhaled beta 2-agonists and the loss of "bronchoprotective" efficacy. *Am J Med* 1998; 104: 494–497
- Ahlquist RP. A study of the adrenotropic receptors. *Am J Physiol* 1948; 153: 586–600
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Keith R, Walter P. Mechanisms of Cell Communication. In: Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Keith R, Walter P (Hrsg.). *Molecular biology of the cell*. 5. Auflage. New York: Garland Science, 2008: 879-964
- Badel A. Untersuchungen zur Rolle von Isoformen katalytischer Untereinheiten der PKA. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät – Universität Kassel, 2012
- Baker JG. The selectivity of beta-adrenoceptor antagonists at the human beta1, beta2 and beta3 adrenoceptors. *Br J Pharmacol* 2005; 144: 317–322
- Barnes PJ. Modulation of neurotransmission in airways. *Physiol Rev* 1992; 72: 699–729
- Barnes PJ. Effect of beta-agonists on inflammatory cells. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 10-17
- Barnes PJ. Drugs for asthma. *Br J Pharmacol* 2006; 147: 297-303
- Bartal M. COPD and tobacco smoke. *Monaldi Arch Chest Dis* 2005; 63: 213–225
- Bateman E, Nelson H, Bousquet J, Kral K, Sutton L, Ortega H, Yancey S. Meta-analysis: effects of adding salmeterol to inhaled corticosteroids on serious asthma-related events. *Ann Intern Med* 2008; 149: 33–42
- Becher A, McIlhinney RA. Consequences of lipid raft association on G-protein-coupled receptor function. *Biochem Soc Symp* 2005; 72: 151–164
- Beebe SJ, Oyen O, Sandberg M, Frøysa A, Hansson V, Jahnsen T. Molecular cloning of a tissue-specific protein kinase (C gamma) from human testis--representing a third isoform for the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Mol Endocrinol* 1990; 4: 465–475
- Bender AT, Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev* 2006; 58: 488–520
- Bennett LL, Ward VL, Brockman RW. Inhibition of protein synthesis in vitro by Cycloheximide and related glutarimide antibiotics. *Biochim Biophys Acta* 1965, 103: 478–485
- Benovic JL Novel beta2-adrenergic receptor signaling pathways. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 229-235
- Bensaude O. Inhibiting eukaryotic transcription: Which compound to choose? How to evaluate its activity?. *Transcription* 2011; 2: 103–108
- Biedermann A, Köhnlein T. Alpha-1-Antitrypsin-Mangel – eine versteckte Ursache der COPD: Überblick über Pathogenese, Diagnostik, Klinik und Therapie. *Dtsch Arztebl* 2006; 103: 1828–1832
- Billington CK, Hall IP. Novel cyclic AMP Signalling Paradigms: Therapeutic Implications for Airway Disease. *Br J Pharmacol* 2012; 166: 401-410

- Bockaert J, Fagni L, Dumuis A, Marin P. GPCR interacting proteins (GIP). *Pharmacol Ther* 2004a; 103: 203–221
- Bockaert J, Dumuis A, Fagni L, Marin P. GPCR-GIP networks: a first step in the discovery of new therapeutic drugs?. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2004b; 7: 649–657
- Bockaert J, Roussignol G, Bécamel C, Gavarini S, Joubert L, Dumuis A, Fagni L, Marin P. GPCR-interacting proteins (GIPs): nature and functions. *Biochem Soc Trans* 2004c; 32: 851–855
- Bogard AS, Xu C, Ostrom RS. Human bronchial smooth muscle cells express adenylyl cyclase isoforms 2, 4, and 6 in distinct membrane microdomains. *J Pharmacol Exp Ther* 2011; 337: 209–217
- Borland G, Smith BO, Yarwood SJ. EPAC proteins transduce diverse cellular actions of cAMP. *Br J Pharmacol* 2009; 158: 70–86
- Bouyssou T, Casarosa P, Naline E, Pestel S, Konetzki I, Devillier P, Schnapp A. Pharmacological characterization of olodaterol, a novel inhaled beta2-adrenoceptor agonist exerting a 24-hour-long duration of action in preclinical models. *J Pharmacol Exp Ther* 2010a; 334: 53–62
- Bouyssou T, Hoenke C, Rudolf K, Lustenberger P, Pestel S, Sieger P, Lotz R, Heine C, Büttner FH, Schnapp A, Konetzki I. Discovery of olodaterol, a novel inhaled beta2-adrenoceptor agonist with a 24 h bronchodilatory efficacy. *Bioorg Med Chem Lett* 2010b; 20: 1410–1414
- Breckler M, Berthouze M, Laurent A-C, Crozatier B, Morel E, Lezoualc'h F. Rap-linked cAMP signaling Epac proteins: compartmentation, functioning and disease implications. *Cell Signal* 2011; 23: 1257–1266
- Breitenlechner CB, Bossemeyer D, Engh RA. Crystallography for protein kinase drug design: PKA and SRC case studies. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1754: 38–49
- Brewster CE, Howarth PH, Djukanovic R, Wilson J, Holgate ST, Roche WR. Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990; 3: 507–511
- Brittain RT, Farmer JB, Jack D, Martin LE, Simpson WT. Alpha-[(t-Butylamino)methyl]-4-hydroxy-m-xylene-alpha 1,alpha 3-diol (AH.3365): a selective beta-adrenergic stimulant. *Nature* 1968; 219: 862–863
- Broekhuizen BDL, Sachs APE, Hoes AW, Verheij TJM, Moons KGM. Diagnostic management of chronic obstructive pulmonary disease. *Neth J Med* 2012; 70: 6–11
- Buhl R, Berdel D, Criée C-P, 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, Worth H. Guidelines for Diagnosis and Treatment of Asthma Patients. *Pneumologie* 2006; 60: 139-183
- Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). Nationale Versorgungsleitlinie Asthma – Langfassung, 2. Auflage. Version 1.3, 2011 <http://www.versorgungsleitlinien.de/themen/asthma> (08.08.2012)

- Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV) Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). Nationale Versorgungsleitlinie COPD-Langfassung, Version 1.9, 2012 http://www.versorgungsleitlinien.de/themen/copd/pdf/nvl_copd_lang.pdf (08.08.2012)
- Carr DW, Stofko-Hahn RE, Fraser ID, Bishop SM, Acott TS, Brennan RG, Scott JD. Interaction of the regulatory subunit (RII) of cAMP-dependent protein kinase with RII-anchoring proteins occurs through an amphipathic helix binding motif. *J Biol Chem* 1991; 266: 14188–14192
- Carr DW, Hausken ZE, Fraser ID, Stofko-Hahn RE, Scott JD. Association of the type II cAMP-dependent protein kinase with a human thyroid RII-anchoring protein. Cloning and characterization of the RII-binding domain. *J Biol Chem* 1992; 267: 13376–13382
- Cheng X, Ji Z, Tsalkova T, Mei F. Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors. *Acta Biochim Biophys Sin* 2008; 40: 651–662
- Chijiwa T, Mishima A, Hagiwara M, Sano M, Hayashi K, Inoue T, Naito K, Toshioka T, Hidaka H. 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* 1990; 265: 5267–5272
- Cockcroft DW. Clinical concerns with inhaled beta2-agonists: adult asthma. *Clin Rev Allergy Immunol* 2006; 31: 197–208
- Collins S, Bouvier M, Bolanowski MA, Caron MG, Lefkowitz RJ. cAMP stimulates transcription of the beta 2-adrenergic receptor gene in response to short-term agonist exposure. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1989; 86: 4853–4857
- Collins S, Altschmied J, Herbsman O, Caron MG, Mellon PL, Lefkowitz RJ. A cAMP response element in the beta 2-adrenergic receptor gene confers transcriptional autoregulation by cAMP. *J Biol Chem* 1990; 265: 19330–19335
- Cullum VA, Farmer JB, Jack D, Levy GP. Salbutamol: a new, selective beta-adrenoceptive receptor stimulant. *Br J Pharmacol* 1969; 35: 141–151
- Davare MA, Avdonin V, Hall DD, Peden EM, Burette A, Weinberg RJ, Horne MC, Hoshi T, Hell JW. A beta2 adrenergic receptor signaling complex assembled with the Ca²⁺ channel Cav1.2. *Science* 2001; 293: 98–101
- Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 2000; 351: 95–105
- Defer N, Best-Belpomme M, Hanoune J. Tissue specificity and physiological relevance of various isoforms of adenylyl cyclase. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000, 279: F400–416
- Dell'Acqua ML, Scott JD. Protein kinase A anchoring. *J Biol Chem* 1997; 272: 12881–12884
- Dennis SM, Sharp SJ, Vickers MR, Frost CD, Crompton GK, Barnes PJ, Lee TH. Regular inhaled salbutamol and asthma control: the TRUST randomised trial. Therapy Working Group of the National Asthma Task Force and the MRC General Practice Research Framework. *Lancet* 2000; 355: 1675–1679

- Dent G, White SR, Tenor H, Bodtke K, Schudt C, Leff AR, Magnussen H, Rabe KF. Cyclic nucleotide phosphodiesterase in human bronchial epithelial cells: characterization of isoenzymes and functional effects of PDE inhibitors. *Pulm Pharmacol Ther* 1998; 11: 47–56
- de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A, Bos JL. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* 1998; 396: 474–477
- Deshpande DA, Penn RB. Targeting G protein-coupled receptor signaling in asthma. *Cell Signal* 2006; 18: 2105–2120
- DiPilato LM, Zhang J. The role of membrane microdomains in shaping beta2-adrenergic receptor-mediated cAMP dynamics. *Mol Biosyst* 2009; 5: 832–837
- Eickelberg O, Roth M, Lörx R, Bruce V, Rüdiger J, Johnson M, Block LH. Ligand-independent activation of the glucocorticoid receptor by beta2-adrenergic receptor agonists in primary human lung fibroblasts and vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1999; 274: 1005–1010
- Engh RA, Girod A, Kinzel V, Huber R, Bossemeyer D. Crystal structures of catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in complex with isoquinolinesulfonyl protein kinase inhibitors H7, H8, and H89. Structural implications for selectivity. *J Biol Chem* 1996; 271: 26157–26164
- Fabbri E, Brighenti L, Ottolenghi C. Inhibition of adenylate cyclase of catfish and rat hepatocyte membranes by 9-(tetrahydro-2-furyl)adenine (SQ 22536). *J Enzym Inhib* 1991; 5: 87–98
- Fenech A, Hall IP. Pharmacogenetics of asthma. *Br J Clin Pharmacol* 2002; 53: 3–15
- Francis SH, Blount MA, Corbin JD. Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanisms and physiological functions. *Physiol Rev* 2011; 91: 651–690
- Gaviraghi G. β -Adrenoceptor Agonists and Asthma. In: Fischer J, Ganellin CR (Hrsg.). *Analogue-based drug discovery II*. Weinheim: John Wiley & Sons, 2010: 319–331
- Gill DM, Meren R. ADP-ribosylation of membrane proteins catalyzed by cholera toxin: basis of the activation of adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1978; 75: 3050–3054
- Guo M, Pascual RM, Wang S, Fontana MF, Valancius CA, Panettieri RA, Tilley SL, Penn RB. Cytokines regulate beta-2-adrenergic receptor responsiveness in airway smooth muscle via multiple PKA- and EP2 receptor-dependent mechanisms. *Biochemistry* 2005; 44: 13771–13782
- Haag SD. Charakterisierung unterschiedlicher Signal- und Stoffwechselwege in humanen Atemwegsfibroblasten im Hinblick auf ihre Beteiligung an der Regulation der Proliferation und der Kollagensynthese. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät – Universität Bonn, 2009
- Hadcock JR, Malbon CC. Down-regulation of beta-adrenergic receptors: agonist-induced reduction in receptor mRNA levels. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1988; 85: 5021–5025

- Hamid QA, Mak JC, Sheppard MN, Corrin B, Venter JC, Barnes PJ. Localization of beta 2-adrenoceptor messenger RNA in human and rat lung using in situ hybridization: correlation with receptor autoradiography. *Eur J Pharmacol* 1991; 206: 133–138
- Hanks SK, Quinn AM. Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Meth Enzymol* 1991; 200: 38–62
- Heinrich PC, Haan S, Hermanns HM, Löffler G, Müller-Newen G, Schaper F. Kommunikation zwischen Zellen: Extrazelluläre Signalmoleküle, Rezeptoren und Signaltransduktion. In: Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC (Hrsg.). *Biochemie und Pathobiochemie*. 8. Auflage. Heidelberg: Springer, 2007: 755–808
- Herberg FW, Maleszka A, Eide T, Vossebein L, Tasken K. Analysis of A-kinase anchoring protein (AKAP) interaction with protein kinase A (PKA) regulatory subunits: PKA isoform specificity in AKAP binding. *J Mol Biol* 2000; 298: 329–339
- Hidaka H, Hagiwara M, Chijiwa T. Molecular pharmacology of protein kinases. *Neurochem Res* 1990; 15: 431–434
- Hiraguchi Y, Tanida H, Hosoki K, Nagao M, Tokuda R, Fujisawa T. Inhibition of eosinophil activation mediated by a Toll-like receptor 7 ligand with a combination of procaterol and budesonide. *Int Arch Allergy Immunol* 2011; 155: 85–89
- Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Paré PD. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004; 350: 2645–2653
- Holden NS, Bell MJ, Rider CF, King EM, Gaunt DD, Leigh R, Johnson M, Siderovski DP, Heximer SP, Giembycz MA, Newton R. β_2 -Adrenoceptor agonist-induced RGS2 expression is a genomic mechanism of bronchoprotection that is enhanced by glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2011; 108: 19713–19718
- Huang LJ, Durick K, Weiner JA, Chun J, Taylor SS. D-AKAP2, a novel protein kinase A anchoring protein with a putative RGS domain. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1997; 94: 11184–11189
- Hughes AD, Jones LH. Dual-pharmacology muscarinic antagonist and β_2 agonist molecules for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Future Med Chem* 2011; 3: 1585–1605
- Jänig W. Vegetatives Nervensystem. In: Lang F, Thews G, Schmidt RF (Hrsg.). *Physiologie des Menschen*. 29. Auflage. Berlin - Heidelberg: Springer, 2005: 425–458
- Jeffery PK. Remodeling and inflammation of bronchi in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2004; 1: 176–183
- Johnson M. Effects of beta2-agonists on resident and infiltrating inflammatory cells. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 282-290
- Johnson RA, Désaubry L, Bianchi G, Shoshani I, Lyons E, Taussig R, Watson PA, Cali JJ, Krupinski J, Pieroni JP, Iyengar R. Isozyme-dependent sensitivity of adenylyl cyclases to P-site-mediated inhibition by adenine nucleosides and nucleoside 3'-polyphosphates. *J Biol Chem* 1997; 272: 8962–8966

- Kämpfer N, Lamyel F, Schütz I, Warnken M, Pieper M, Racké K. β 2-Adrenoceptor – cAMP signaling exerts dual effects on β 2-adrenoceptor expression in human lung fibroblasts, delayed up-regulated inhibitory factors oppose a rapid in onset, direct stimulation of gene expression. Proc Brit Pharmacol Soc. BPS Winter Meeting 2011. London. <http://www.pa2online.org/abstracts/vol9issue3abst077p.pdf> (08.05.2013)
- Kase H, Iwahashi K, Nakanishi S, Matsuda Y, Yamada K, Takahashi M, Murakata C, Sato A, Kaneko M. K-252 compounds, novel and potent inhibitors of protein kinase C and cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 142: 436–440
- Keezer SM, Gilbert DM. Sensitivity of the origin decision point to specific inhibitors of cellular signaling and metabolism. *Exp Cell Res* 2002; 273: 54–64
- Kramer GL, Garst JE, Mitchel SS, Wells JN. Selective inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterases by analogues of 1-methyl-3-isobutylxanthine. *Biochemistry* 1977; 16: 3316–3321
- Kroegel C. Epidemiologie und Ursachen allergischer Erkrankungen. In: Kroegel C, Barnes NC (Hrsg.). *Asthma bronchiale*. 2. Auflage. Stuttgart: Thieme, 2002a: 15–32
- Kroegel C. Definition, Einteilung und begriffliche Abgrenzung des Asthma bronchiale. In: Kroegel C, Barnes NC (Hrsg.). *Asthma bronchiale*. 2. Auflage. Stuttgart: Thieme, 2002b: 2–14
- Kroegel C, Förster M. Pathogenetische Grundlagen des Asthma bronchiale. In: Kroegel C, Barnes NC (Hrsg.). *Asthma bronchiale*. 2. Auflage. Stuttgart: Thieme, 2002: 33–75
- Krupnick JG, Benovic JL. The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998; 38: 289–319
- Lamyel F, Warnken-Uhlich M, Seemann WK, Mohr K, Kostenis E, Ahmedat AS, Smit M, Gosens R, Meurs H, Miller-Larsson A, Racké K. The β 2-subtype of adrenoceptors mediates inhibition of pro-fibrotic events in human lung fibroblasts. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2011; 384: 133–145
- Lands AM, Arnold A, McAuliff JP, Luduena FP, Brown TG. Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature* 1967; 214: 597–598
- Lazar-Wesley E, Hadcock JR, Malbon CC, Kunos G, Ishac EJ. Tissue-specific regulation of alpha 1B, beta 1, and beta 2-adrenergic receptor mRNAs by thyroid state in the rat. *Endocrinology* 1991; 129: 1116–1118
- Leiser M, Rubin CS, Erlichman J. Differential binding of the regulatory subunits (RII) of cAMP-dependent protein kinase II from bovine brain and muscle to RII-binding proteins. *J Biol Chem* 1986; 261: 1904–1908
- Li W, Yu Z-X, Kotin RM. Profiles of PrKX expression in developmental mouse embryo and human tissues. *J Histochem Cytochem* 2005; 53: 1003–1009
- Li X, Ward C, Thien F, Bish R, Bamford T, Bao X, Bailey M, Wilson JW, Haydn Walters E. An antiinflammatory effect of salmeterol, a long-acting beta(2) agonist, assessed in airway biopsies and bronchoalveolar lavage in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 1493–1499

- Lin R, Degan S, Theriot BS, Fischer BM, Strachan RT, Liang J, Pierce RA, Sunday ME, Noble PW, Kraft M, Brody AR, Walker JK. Chronic treatment in vivo with β -adrenoceptor agonists induces dysfunction of airway $\beta(2)$ -adrenoceptors and exacerbates lung inflammation in mice. *Br J Pharmacol* 2012; 165: 2365–2377
- Linke WA, Pfitzer G. Kontraktionsmechanismen. In: Lang F, Thews G, Schmidt RF (Hrsg.). *Physiologie des Menschen*. 29. Auflage. Berlin - Heidelberg: Springer, 2005: 116–143
- Liu X, Ostrom RS, Insel PA. cAMP-elevating agents and adenylyl cyclase over-expression promote an antifibrotic phenotype in pulmonary fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 286: C1089-1099
- Lochner A, Moolman JA. The many faces of H89: a review. *Cardiovasc Drug Rev* 2006; 24: 261–274
- Loza MJ, Foster S, Peters SP, Penn RB. Interactive effects of steroids and beta-agonists on accumulation of type 2 T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121: 750.e1-5.e3
- Lulich KM, Goldie RG, Ryan G, Paterson JW. Adverse reactions to beta 2-agonist bronchodilators. *Med Toxicol* 1986; 1: 286–299
- Macdougall DA, Agarwal SR, Stopford EA, Chu H, Collins JA, Longster AL, Colyer J, Harvey RD, Calaghan S. Caveolae compartmentalise β 2-adrenoceptor signals by curtailing cAMP production and maintaining phosphatase activity in the sarcoplasmic reticulum of the adult ventricular myocyte. *J Mol Cell Cardiol* 2012; 52: 388–400
- Mak JC, Nishikawa M, Barnes PJ. Glucocorticosteroids increase beta 2-adrenergic receptor transcription in human lung. *Am J Physiol* 1995; 268: L41-46
- McGraw DW, Liggett SB. Molecular mechanisms of beta2-adrenergic receptor function and regulation. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2: 292-296
- Molfino NA, Jeffery PK. Chronic obstructive pulmonary disease: histopathology, inflammation and potential therapies. *Pulm Pharmacol Ther* 2007; 20: 462–472
- Moll D. Molekulare Mechanismen der cAMP-vermittelten Signaltransduktion. Dissertation, Naturwissenschaftliche Fakultät – Universität Kassel, 2007
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; 51: 263–273
- Murray AJ. Pharmacological PKA inhibition: all may not be what it seems. *Sci Signal* 2008; 1: re4
- Nijkamp FP, Engels F, Henricks PA, van Oosterhout AJ. Mechanisms of beta-adrenergic receptor regulation in lungs and its implications for physiological responses. *Physiol Rev* 1992; 72: 323–367
- O'Byrne PM, van der Linde J, Cockcroft DW, Gauvreau GM, Brannan JD, Fitzgerald M, Watson RM, Milot J, Davis B, O'Connor M, Hart L, Korducki L, Hamilton AL, Boulet L-P. Prolonged bronchoprotection against inhaled methacholine by inhaled BI 1744, a long-acting beta(2)-agonist, in patients with mild asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124: 1217–1221

Onda T, Hashimoto Y, Nagai M, Kuramochi H, Saito S, Yamazaki H, Toya Y, Sakai I, Homcy CJ, Nishikawa K, Ishikawa Y. Type-specific regulation of adenylyl cyclase. Selective pharmacological stimulation and inhibition of adenylyl cyclase isoforms. *J Biol Chem* 2001; 276: 47785–47793

Penn RB, Panettieri RA, Benovic JL. Mechanisms of acute desensitization of the beta2AR-adenylyl cyclase pathway in human airway smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 19: 338–348

Penn RB, Parent JL, Pronin AN, Panettieri RA, Benovic JL. Pharmacological inhibition of protein kinases in intact cells: antagonism of beta adrenergic receptor ligand binding by H-89 reveals limitations of usefulness. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 288: 428–437

Perry SJ, Baillie GS, Kohout TA, McPhee I, Magiera MM, Ang KL, Miller WE, McLean AJ, Conti M, Houslay MD, Lefkowitz RJ. Targeting of cyclic AMP degradation to beta 2-adrenergic receptors by beta-arrestins. *Science* 2002; 298: 834–836

Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, Fukuchi Y, Jenkins C, Rodriguez-Roisin R, van Weel C, Zielinski J. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176: 532–555

Racké K, Haag S, Bahulayan A, Warnken M. Pulmonary fibroblasts, an emerging target for anti-obstructive drugs. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2008; 378: 193–201

Racké K, Lamyel FB, Warnken M. β 2-Adrenoceptor mRNA expression in human lung fibroblasts is highly up-regulated by β 2-adrenoceptors and corticosteroids, but down-regulated by TGF- β . *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183: A2147

Racké K, Juergens LJ, Schütz I, Kämpfer N, Fuhrmann M, Warnken M. Endothelin-1 enhances β (2)-adrenoceptor gene transcription in human lung fibroblasts. *Life Sci* 2012a; 91: 540-543

Racké K, Lamyel FB, Kämpfer N, Schütz I, Warnken M. A β 2-adrenoceptor – cAMP mediated immediate stimulation of β 2-adrenoceptor gene expression in human lung fibroblasts is opposed by delayed up-regulation of inhibitory factors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2012b; 385: 71-72

Rich TC, Fagan KA, Nakata H, Schaack J, Cooper DM, Karpen JW. Cyclic nucleotide-gated channels colocalize with adenylyl cyclase in regions of restricted cAMP diffusion. *J Gen Physiol* 2000; 116: 147–161

Rigoli L, Briuglia S, Caimmi S, Ferrau V, Gallizzi R, Leonardi S, La Rosa M, Salpietro C. Gene-environment interaction in childhood asthma. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2011; 24: 41–47

Roche WR, Beasley R, Williams JH, Holgate ST. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet* 1989; 1: 520–524

Rodrigo GJ, Moral VP, Marcos LG, Castro-Rodriguez JA. Safety of regular use of long-acting beta agonists as monotherapy or added to inhaled corticosteroids in asthma. A systematic review. *Pulm Pharmacol Ther* 2009; 22: 9–19

Rodrigo GJ, Castro-Rodríguez JA. Safety of long-acting β agonists for the treatment of asthma: clearing the air. *Thorax* 2012; 67: 342–349

- Roscioni SS, Elzinga CRS, Schmidt M. Epac: effectors and biological functions. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2008; 377: 345–357
- Roscioni SS, Maarsingh H, Elzinga CRS, Schuur J, Menzen M, Halayko AJ, Meurs H, Schmidt M. Epac as a novel effector of airway smooth muscle relaxation. *J Cell Mol Med* 2011a; 15: 1551–1563
- Roscioni SS, Dekkers BGJ, Prins AG, Menzen MH, Meurs H, Schmidt M, Maarsingh H. cAMP inhibits modulation of airway smooth muscle phenotype via the exchange protein activated by cAMP (Epac) and protein kinase A. *Br J Pharmacol* 2011b; 162: 193–209
- Salpeter SR. Bronchodilators in COPD: impact of beta-agonists and anticholinergics on severe exacerbations and mortality. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2007; 2: 11–18
- Salpeter SR, Buckley NS. Systematic review of clinical outcomes in chronic obstructive pulmonary disease: beta-agonist use compared with anticholinergics and inhaled corticosteroids. *Clin Rev Allergy Immunol* 2006; 31: 219–230
- Salpeter SR, Buckley NS, Ormiston TM, Salpeter EE. Meta-analysis: effect of long-acting beta-agonists on severe asthma exacerbations and asthma-related deaths. *Ann Intern Med* 2006; 144: 904–912
- Salpeter SR, Wall AJ, Buckley NS. Long-acting beta-agonists with and without inhaled corticosteroids and catastrophic asthma events. *Am J Med* 2010; 123: 322-8.e2
- Salvi SS, Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers. *Lancet* 2009; 374: 733–743
- Schiebel K, Mertz A, Winkelmann M, Gläser B, Schempp W, Rappold G. FISH localization of the human Y-homolog of protein kinase PRKX (PRKY) to Yp11.2 and two pseudogenes to 15q26 and Xq12--q13. *Cytogenet Cell Genet* 1997a; 76: 49–52
- Schiebel K, Winkelmann M, Mertz A, Xu X, Page DC, Weil D, Petit C, Rappold GA. Abnormal XY interchange between a novel isolated protein kinase gene, PRKY, and its homologue, PRKX, accounts for one third of all (Y+)XX males and (Y-)XY females. *Hum Mol Genet* 1997b; 6: 1985–1989
- Schudt C, Winder S, Eltze M, Kilian U, Beume R. Zardaverine: a cyclic AMP specific PDE III/IV inhibitor. *Agents Actions Suppl* 1991; 34: 379–402
- Seamon KB, Daly JW. Forskolin: its biological and chemical properties. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res* 1986; 20: 1–150
- Seifert R, Lushington GH, Mou TC, Gille A, Sprang SR. Inhibitors of membranous adenylyl cyclases. *Trends Pharmacol Sci* 2012; 33: 64–78
- Shih M, Malbon CC. Oligodeoxynucleotides antisense to mRNA encoding protein kinase A, protein kinase C, and beta-adrenergic receptor kinase reveal distinctive cell-type-specific roles in agonist-induced desensitization. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1994; 91: 12193–12197
- Silvestri M, Fregonese L, Sabatini F, Dasic G, Rossi GA. Fluticasone and salmeterol downregulate in vitro, fibroblast proliferation and ICAM-1 or H-CAM expression. *Eur Respir J* 2001; 18: 139–145

- Skalhegg BS, Tasken K. Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front Biosci* 2000; 5: D678-93
- Spoelstra FM, Postma DS, Hovenga H, Noordhoek JA, Kauffman HF. Budesonide and formoterol inhibit ICAM-1 and VCAM-1 expression of human lung fibroblasts. *Eur Respir J* 2000; 15: 68–74
- Staiger H, Stefan N, Kellerer M, Häring HU. Die schnelle Stoffwechsellreaktion. In: Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC (Hrsg.). *Biochemie und Pathobiochemie*. 8. Auflage. Heidelberg: Springer, 2007: 809–839
- Stallaert W, Dorn JF, van der Westhuizen E, Audet M, Bouvier M. Impedance responses reveal β_2 -adrenergic receptor signaling pluridimensionality and allow classification of ligands with distinct signaling profiles. *PLoS One* 2012; 7: e29420
- Sun Park W, Kyoung Son Y, Kim N, Boum Youm J, Joo H, Warda M, Ko J-H, Earm YE, Han J. The protein kinase A inhibitor, H-89, directly inhibits KATP and Kir channels in rabbit coronary arterial smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 340: 1104–1110
- Sutherland EW, Rall TW. Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *J Biol Chem* 1958; 232: 1077–1091
- Tabish M, Rodionov VI. Novel isoform of the *Xenopus tropicalis* PKA catalytic alpha subunit: An example of alternative splicing. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* 2010; 5: 151–156
- Tang Y-J, Wang K, Yuan T, Qiu T, Xiao J, Yi Q, Feng Y-L. Salmeterol/fluticasone treatment reduces circulating C-reactive protein level in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *Chin Med J* 2010; 123: 1652–1657
- Taylor DR. The beta-agonist saga and its clinical relevance: on and on it goes. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 179: 976–978
- Taylor JD. COPD and the response of the lung to tobacco smoke exposure. *Pulm Pharmacol Ther* 2010; 23: 376–383
- Torphy TJ. Phosphodiesterase isozymes: molecular targets for novel antiasthma agents. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 351–370
- Tresguerres M, Levin LR, Buck J. Intracellular cAMP signaling by soluble adenylyl cyclase. *Kidney Int* 2011; 79: 1277–1288
- Uhler MD, Chrivia JC, McKnight GS. Evidence for a second isoform of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 1986; 261: 15360–15363
- Vanacker NJ, Palmans E, Pauwels RA, Kips JC. Effect of combining salmeterol and fluticasone on the progression of airway remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 1128–1134
- Vanden Broeck D, Horvath C, de Wolf MJS. *Vibrio cholerae*: cholera toxin. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 1771-1775

Vetter MM, Zenn H-M, Méndez E, van den Boom H, Herberg FW, Skålhegg BS. The testis-specific Ca_2 subunit of PKA is kinetically indistinguishable from the common Ca_1 subunit of PKA. *BMC Biochem* 2011; 12: 40

Vijayaraghavan S, Goueli SA, Davey MP, Carr DW. Protein kinase A-anchoring inhibitor peptides arrest mammalian sperm motility. *J Biol Chem* 1997; 272: 4747–4752

Waldeck B. Beta-adrenoceptor agonists and asthma--100 years of development. *Eur J Pharmacol* 2002; 445: 1–12

Walters EH, Bjermer L, Faurschou P, Sandström T. The anti-inflammatory profile of inhaled corticosteroids combined with salmeterol in asthmatic patients. *Respir Med* 2000; 94: 26-31

Walters JAE, Wood-Baker R, Walters EH. Long-acting beta2-agonists in asthma: an overview of Cochrane systematic reviews. *Respir Med* 2005; 99: 384–395

Warnken-Uhlich M, Lamyel FB, Schütz I, Racké K. Autoreceptor-mediated up-regulation of β_2 -adrenoceptor mRNA expression in human lung fibroblasts. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2011; 383: 46-47

Xiao RP, Avdonin P, Zhou YY, Cheng H, Akhter SA, Eschenhagen T, Lefkowitz RJ, Koch WJ, Lakatta EG. Coupling of beta2-adrenoceptor to Gi proteins and its physiological relevance in murine cardiac myocytes. *Circ Res* 1999; 84: 43–52

7. Danksagung

Zu dem Gelingen dieser Dissertation haben viele Menschen beigetragen, weswegen ich ihnen an dieser Stelle meinen herzlichen Dank aussprechen möchte.

So möchte ich zuerst Herrn Prof. Kurt Racké für die interessante Fragestellung und die ausgezeichnete Betreuung während meiner Zeit im Labor und des gesamten Schreibprozesses danken. Ich habe stets von den konstruktiven Diskussionen und Ratschlägen profitieren können.

Bei Herrn Prof. Dirk Skowasch möchte ich mich für die Übernahme des Koreferats bedanken.

Weiterhin gilt mein großer Dank Rita Fuhrmann für die fundierte Einarbeitung in die experimentellen Methoden und die nette Unterstützung bei technischen Problemen. Danke auch an Caro Frisch, Aahmedat S. Aahmedat, Lisa Jürgens und Ulrich Reitzenstein für die freundliche Zusammenarbeit in Labor und Büro. Ich möchte mich ebenso bei Herrn Tobias Höller für die statistische Beratung bedanken. Desweiteren danke ich Boehringer Ingelheim, AstraZeneca und Bonfor (Universität Bonn) für die Unterstützung unseres Forschungsprojekts.

Meinen Eltern möchte ich dafür danken, dass sie mich während meines ganzen Studiums stets unterstützt und motiviert haben. Ihnen, meiner Schwester Laura und meinem Freund Christopher danke ich vielmals für das kritische Gegenlesen dieser Arbeit.