

Charakterisierung der Expression und proliferativen Wirkung von muscarinischen Rezeptoren in Lungenfibroblasten

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

Susanne Michaela Kempkens
aus Linz am Rhein

2008

Angefertigt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. K. Racké
2. Gutachter: PD Dr. med. D. Skowasch

Tag der Mündlichen Prüfung: 05. August 2008

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Bonn
Direktor Prof. Dr. med. A. Pfeifer

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

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	8
1 EINLEITUNG.....	9
1.1 Cholinozeptoren.....	9
1.1.1 Nicotinische Rezeptoren.....	9
1.1.2 Die muscarinischen Rezeptoren M ₁ bis M ₅	10
1.2 Expression von muscarinischen Rezeptoren im Respirationstrakt und Remodelling der Atemwege.....	13
1.2.1 Muscarinische Rezeptoren im Respirationstrakt.....	13
1.2.2 Remodelling der Atemwege bei chronischen inflammatorischen und obstruktiven Atemwegserkrankungen.....	15
1.3 Neuronales und nicht-neuronales Acetylcholin.....	17
1.4 Pharmakologische Substanzen mit agonistischer und antagonistischer Wirkung an muscarinischen Rezeptoren.....	18
1.4.1 Struktur und Wirkung der muscarinischen Agonisten Carbachol und Oxotremorin und des muscarinischen Antagonisten Atropin.....	18
1.4.1.1 Carbachol.....	18
1.4.1.2 Oxotremorin.....	19
1.4.1.3 Atropin.....	19
1.4.2 Struktur und Wirkung des muscarinischen Antagonisten Tiotropium.....	20
1.5 Die humanen Fibroblasten-Zelllinien MRC-5, IMR-90 und HEL-299.....	21
1.6 Zielsetzung.....	21
2 MATERIALIEN UND METHODEN.....	23
2.1 Materialien.....	23
2.1.1 Allgemeine Chemikalien, Enzyme und Reaktionskits.....	23
2.1.2 Lösungen und Puffer.....	26
2.1.3 Testsubstanzen.....	31
2.1.4 Humane Fibroblasten-Zelllinien.....	32
2.2 Methoden.....	33

2.2.1 Präparation und Kultur der primären Fibroblasten aus der Trachea der Ratte.....	33
2.2.2 Kultur der humanen Fibroblasten-Zelllinien.....	34
2.2.3 Untersuchung der proliferativen Wirkung muscarinischer Agonisten und Antagonisten.....	35
2.2.4 Proteinbestimmung.....	36
2.2.5 RNS-Präparation, RT-PCR und Gelelektrophorese.....	37
2.2.5.1 RNS-Präparation.....	37
2.2.5.2 Reverse Transkription.....	38
2.2.5.3 Polymerase-Kettenreaktion und Gelelektrophorese.....	39
2.2.6 DNS-Präparation.....	41
2.2.7 Statistik und Berechnung.....	42
3 ERGEBNISSE.....	43
3.1 Untersuchungsergebnisse an primären Fibroblasten aus der Trachea der Ratte.....	43
3.1.1 mRNA-Expression muscarinischer Rezeptoren in primären Fibroblasten aus der Trachea der Ratte.....	43
3.1.2 Muscarinische Stimulation der Proliferation der primären Fibroblasten aus der Trachea der Ratte.....	48
3.1.3 Proliferative Effekte durch muscarinische Stimulation in Anwesenheit der wachstumsfördernden Faktoren IGF-1 und PDGF.....	51
3.1.3.1 Die proliferationsfördernde Wirkung durch muscarinische Agonisten in Anwesenheit von IGF-1.....	51
3.1.3.2 Der proliferative Effekt durch muscarinische Agonisten in Anwesenheit von PDGF.....	54
3.2 Untersuchungsergebnisse an den humanen Fibroblasten-Zelllinien.....	56
3.2.1 mRNA-Expression muscarinischer Rezeptoren in den humanen Fibroblasten-Zelllinien MRC-5, IMR-90 und HEL-299.....	56
3.2.1.1 Muscarinische Rezeptoren in der Zelllinie MRC-5.....	56
3.2.1.2 Muscarinische Rezeptoren in der Zelllinie IMR-90.....	58

3.2.1.3 Muscarinische Rezeptoren in der Zelllinie HEL-299.....	60
3.2.2 Muscarinische Stimulation der Proliferation der humanen Fibroblasten-Zelllinie MRC-5.....	63
4 DISKUSSION.....	67
4.1 Muscarinische Rezeptoren in primären Lungenfibroblasten aus der Trachea der Ratte und in den humanen Fibroblasten-Zelllinien MRC-5, IMR-90 und HEL-299.....	67
4.2 Stimulation der Proliferation der primären Fibroblasten der Ratte.....	71
4.2.1 Muscarinische Agonisten.....	71
4.2.2 Muscarinische Agonisten in Anwesenheit der Wachstumsfaktoren IGF-1 und PDGF.....	72
4.3 Muscarinische Stimulation der Proliferation der humanen Fibroblasten.....	72
4.4 Klinische Bedeutung.....	75
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	77
6 LITERATURVERZEICHNIS.....	79

Abkürzungsverzeichnis

bidest.	bidestilliert
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNS	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNS	Desoxyribonucleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FKS	fetales Kälberserum
gDNS	genomische Desoxyribonucleinsäure
IGF-1	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-1
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinasen
mRNS	Boten-Ribonucleinsäure
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	aus Blutplättchen gewonnener Wachstumsfaktor = platelet derived growth factor
RNS	Ribonucleinsäure
RT	Reverse Transkription
sm-MHC	schwere Kette des glatten Muskel-Myosin = smooth muscle-myosin heavy chain
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TGF- β	transformierender Wachstumsfaktor- β

1 EINLEITUNG

In der Entwicklung und im Verlauf chronischer inflammatorischer und obstruktiver Atemwegserkrankungen wie Asthma und chronisch obstruktiver Lungenkrankheit (COPD) spielen Umbau- oder Remodelling-Prozesse eine wesentliche Rolle. Fibrotische Umbauvorgänge haben dabei besonders bei COPD einen wesentlichen Anteil am Remodelling der Atemwege (Jeffery *et al.*, 2001). Zum Krankheitsfortschritt bei chronisch obstruktiver Lungenkrankheit trägt insbesondere eine Verdickung der Wände der kleinen Atemwege mit einem Durchmesser von unter 2 mm bei (Hogg *et al.*, 2004). Anticholinergika sind Mittel der Wahl in der Therapie obstruktiver Atemwegserkrankungen, besonders der muscarinische Antagonist Tiotropium scheint die Abnahme der Lungenfunktion bei COPD-Patienten zu verzögern (Barnes, 2001, Casaburi *et al.*, 2004, Vincken *et al.*, 2002). Dieses lässt darauf schließen, dass cholinerge Mechanismen an den strukturellen Veränderungen beteiligt sind.

Acetylcholin ist der klassische Neurotransmitter des parasympathischen vegetativen Nervensystems. In der ganglionären Erregungsweiterleitung bindet Acetylcholin an postsynaptische nicotinsche Rezeptoren, wohingegen auf den Effektorzellen des Gewebes muscarinische Rezeptoren exprimiert werden. Nach neueren Erkenntnissen dient Acetylcholin auch als parakriner Mediator, der von nicht-neuronalen Zellen wie Epithel, Endothel, Immunzellen oder glatten Muskelzellen freigesetzt wird (Wessler *et al.*, 1999).

1.1 Cholinozeptoren

1.1.1 Nicotinsche Rezeptoren

Nicotinsche Rezeptoren sind ligandenabhängige Ionenkanäle, die durch fünf Untereinheiten gebildet werden (Conti-Tronconi *et al.*, 1994). Es existieren verschiedene Isotypen dieser Rezeptoren, die sich durch die Kombination der Untereinheiten unterscheiden und charakteristische Aktivierungsmuster und pharmakologische Eigenschaften aufweisen (Gotti *et al.*, 2004). Nicotinsche Rezeptoren an der

motorischen Endplatte setzen sich aus zwei α -, einer β -, einer γ - oder ε - und einer δ -Untereinheit zusammen (Lukas *et al.*, 1999). Neuronale nicotinsche Rezeptoren werden durch fünf α -Untereinheiten oder einer Kombination aus α - und β -Untereinheiten (α_2 - α_{10} , β_2 - β_4) gebildet (Gotti *et al.*, 2004). Die Aktivierung der nicotinschen Rezeptoren bewirkt einen Einstrom von Kationen, der zu einer Depolarisation der postsynaptischen Membran führt.

In den Atemwegen finden sich nicotinsche Rezeptoren auf den autonomen Ganglienzellen, aber auch auf fast allen nicht-neuronalen Zelltypen, so auf Fibroblasten, Epithelzellen, Endothelzellen oder glatten Muskelzellen. (Carlisle *et al.*, 2004, Racké und Matthiesen, 2004). Die Aktivierung nicotinscher Rezeptoren auf diesen nicht-neuronalen Zellen beeinflusst die Zellproliferation und -differenzierung. Die toxischen Effekte des Nicotins, welches beim Rauchen inhaliert wird, sind ebenfalls auf die Nicotinsensitivität dieser Zellen zurückzuführen (Conti-Fine *et al.*, 2000). In Lungenfibroblasten wird zudem die Kollagen-Gen-Expression und die Fibronectin-Synthese durch Aktivierung dieser Rezeptoren gefördert (Roman *et al.*, 2004, Sekhon *et al.*, 2002).

1.1.2 Die muscarinischen Rezeptoren M_1 bis M_5

Bisher sind fünf verschiedene Typen von muscarinischen Rezeptoren durch molekularbiologische Methoden identifiziert und charakterisiert worden (Caulfield und Birdsall, 1998). Diese Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die aus 7 Transmembrandomänen gebildet werden. G-Proteine sind intrazelluläre membranständige Heterotrimere, die sich aus einer α -, einer β - und einer γ -Untereinheit zusammensetzen. Obwohl mehr als 20 α -, 5 β - und 10 γ -Untereinheiten bekannt sind, werden die G-Proteine aufgrund der homologen Sequenzen der α -Untereinheiten in die vier Gruppen $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_q$ und $G\alpha_{12}$ eingeteilt (Gudermann *et al.*, 1996). Die verschiedenen muscarinischen Rezeptoren sind an unterschiedliche G-Proteine gekoppelt. So interagieren die Rezeptoren mit gerader Nummerierung (M_2 und M_4) bevorzugt mit G-Proteinen der Untergruppe $G_{i/o}$, wohingegen die ungeraden Rezeptoren (M_1 , M_3 und M_5) G_q -Protein-assoziiert sind.

Die Aktivierung der muscarinischen Rezeptoren durch Agonisten wie Acetylcholin führt zu einer Dissoziation der α -Untereinheit von der β/γ -Untereinheit. Die α -Untereinheit bewirkt bei einer Aktivierung der G_q -gekoppelten Rezeptoren M_1 , M_3 und M_5 die Hydrolyse des Membranlipids Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat durch das Enzym Phospholipase C, wodurch die beiden Endprodukte Diacylglycerin und Inositol-1,4,5-Triphosphat entstehen. Diese Produkte bewirken ihrerseits die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern oder die Aktivierung der Proteinkinase C, die daraufhin weitere Funktionsproteine phosphorylieren kann (Abb. 1).

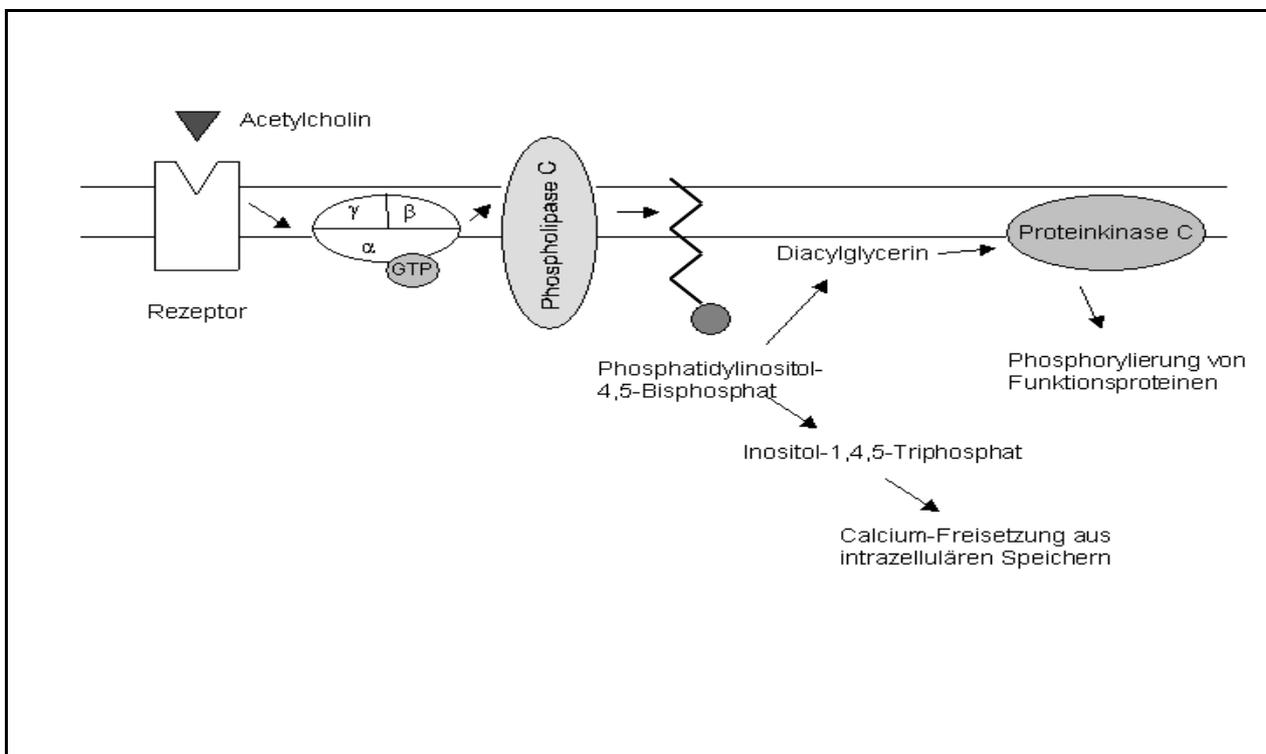


Abb. 1: Die Aktivierung der G_q -gekoppelten Rezeptoren M_1 , M_3 oder M_5 durch Acetylcholin oder muscarinische Agonisten führt zu einer Dissoziation der α -Untereinheit von der β/γ -Untereinheit. Das Effektorprotein Phospholipase C hydrolysiert daraufhin das Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat in die beiden Endprodukte Diacylglycerin und Inositol-1,4,5-Triphosphat. Diese bewirken die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern oder die Aktivierung der Proteinkinase C, die weitere Funktionsproteine phosphorylieren kann (Lüllmann und Mohr, 1999).

Die Aktivierung $G_{i/o}$ -gekoppelter Rezeptoren wie M_2 und M_4 führt zu einer Hemmung der Adenylatcyclase und damit zu einer verminderten Bildung von cAMP und einer

verringerten Aktivität der Proteinkinase A (Abb. 2). Außerdem können diese Rezeptoren an Kalium-Kanäle oder nicht-selektive Ionenkanäle gekoppelt vorliegen und eine Kanalöffnung bewirken (Caulfield, 1993, Felder, 1995).

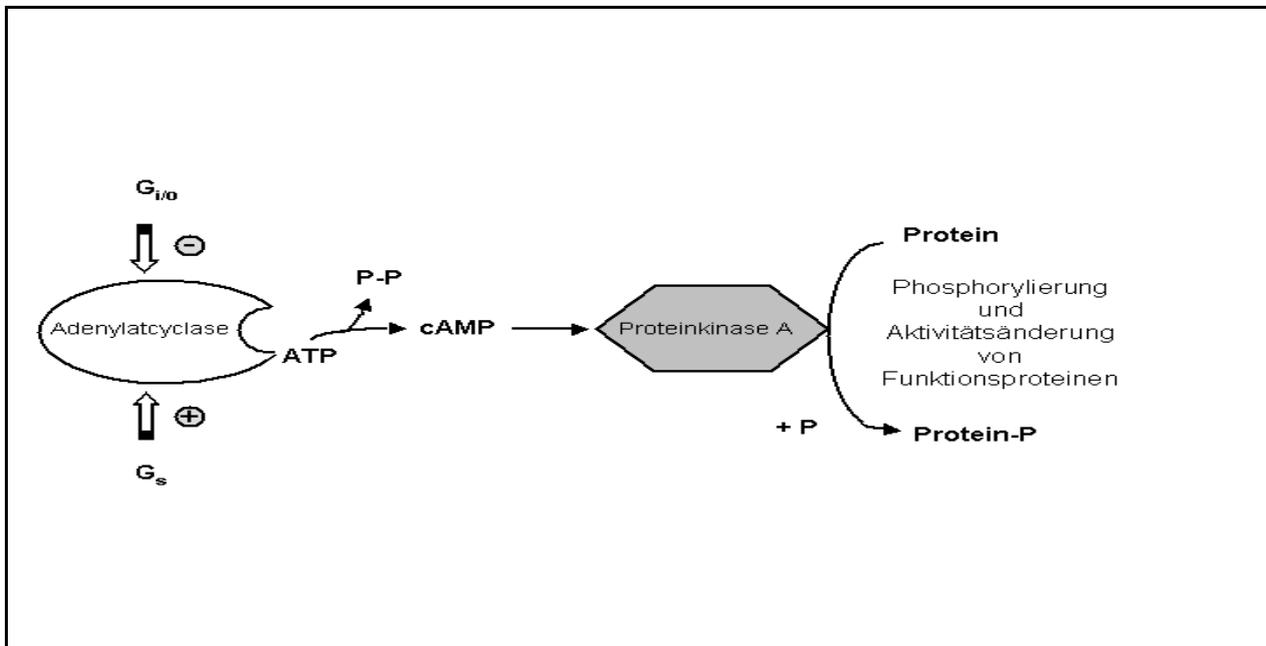


Abb. 2: Die Aktivierung G_{i/o}-gekoppelter Rezeptoren wie M₂ und M₄ bewirkt -entgegengesetzt der Wirkung stimulatorischer G_s-Proteine- durch eine Hemmung der Adenylatcyclase eine verminderte Bildung von cAMP und damit eine verringerte Aktivität der Proteinkinase A. Diese Rezeptoren können auch an Kalium-Kanäle oder nicht-selektive Ionenkanäle gekoppelt vorliegen (in der Abbildung nicht dargestellt) und eine Kanalöffnung bewirken (Lüllmann und Mohr, 1999).

Weitere Zielproteine nach einer Aktivierung G-Protein-gekoppelter muscarinischer Rezeptoren sind die Phospholipasen A₂ und D oder die cGMP-Synthese durch das Enzym Guanylatcyclase (Hosey *et al.*, 1992). Darüber hinaus ist für M₂- und M₃-Rezeptoren beschrieben, dass sie über G_i und in Ras- und Raf-abhängiger Weise zur Aktivierung der mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) führen (Budd *et al.*, 2001, Winitz *et al.*, 1993). Eine G-Protein-gekoppelte Aktivierung der MAPK ist zudem auch über eine Aktivierung der Phosphoinositol-3-Kinase oder der Proteinkinase C durch die β/γ-Untereinheit der Rezeptoren beschrieben (Luttrell, 2002, Marinissen und Gutkind, 2001).

1.2 Expression muscarinischer Rezeptoren im Respirationstrakt und Remodelling der Atemwege

1.2.1 Muscarinische Rezeptoren im Respirationstrakt

Nahezu alle Zelltypen im Bereich der Luftwege und der Lunge exprimieren muscarinische Rezeptoren, dazu gehören glatte Muskelzellen der Atemwege und der Gefäße, Fibroblasten, Endothelzellen, Epithelzellen, Drüsenzellen und inflammatorische Zellen (Racké und Matthiesen, 2004).

Der M_1 -Rezeptor erleichtert die Erregungsweiterleitung in parasymphatischen Ganglien, indem er über eine Hemmung von Kaliumkanälen eine leichte Membrandepolarisation bewirkt (Marrion *et al.*, 1989), die bei gleichzeitiger Aktivierung nicotinischer Rezeptoren zur Ausbildung eines Aktionspotentials führt. Diese muscarinische Erleichterung der Neurotransmission ist auch für parasymphatische Ganglien der humanen Lunge beschrieben (Barnes, 1993). M_1 -Rezeptoren sind beim Menschen auch in Alveolarwänden und auf dem Endothel von Lungenvenen lokalisiert, wo sie möglicherweise die Relaxation der Gefäße vermitteln (Walch *et al.*, 2000). Für das Schwein ist zudem ein Nachweis in glatten Muskelzellen der Blutgefäße und der Atemwege erbracht worden (Hislop *et al.*, 1998).

Während M_1 -Rezeptoren hauptsächlich im peripheren Lungengewebe vorkommen, exprimieren die Zellen der großen Luftwege insbesondere M_2 - und M_3 -Rezeptoren. Der M_2 -Rezeptor befindet sich auf der Zellmembran glatter Muskelzellen ebenso wie als präsynaptischer inhibitorischer Autorezeptor auf parasymphatischen cholinergen Nervenendigungen (Zaagsma *et al.*, 1997). Auch die Noradrenalin-Freisetzung aus sympathischen Nervenendigungen wird über präsynaptische M_2 -Rezeptoren gehemmt (Hey *et al.*, 1994). Ein Nachweis des Rezeptors wurde zudem für die humane embryonale Lungenfibroblasten-Zelllinie HEL-299 erbracht (Koman *et al.*, 1990; Haddad *et al.*, 1995).

M_3 -Rezeptoren spielen eine wesentliche Rolle bei der Kontraktion glatter Muskelzellen der großen Atemwege. Wie oben bereits beschrieben, bewirken sie die Aktivierung der Phospholipase C über G_q , daraufhin verursacht Inositol-1,4,5-Triphosphat die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern. Die ansteigende cytosolische

Calciumkonzentration aktiviert über Calcium-Calmodulin die Myosin-Leichte-Ketten-Kinase (MLCK), wodurch es zur kontraktile Reaktion zwischen Actin und Myosin kommt. Diacylglycerin aktiviert die Proteinkinase C und verstärkt die kontraktile Antwort über eine Unterstützung des Calcium-Einstroms aus intrazellulären Speichern und aus dem Extrazellulärraum (Racké und Matthiesen, 2004). M₃-Rezeptoren sind außerdem die vorherrschenden muscarinischen Rezeptoren auf den submukösen Drüsen und dem Gefäßendothel der Atemwege (Barnes, 1993).

In menschlichem Lungengewebe ist bisher noch kein Vorkommen von M₄- Rezeptoren beschrieben worden, in der Kaninchenlunge hingegen werden Rezeptoren des M₄-Subtyps auf den Alveolarwänden und auf glatten Muskelzellen exprimiert (Barnes, 1993). Bindungsstudien mit ³H-Quinuclidinyl-Benzilat zeigten außerdem, dass muscarinische Rezeptoren mit M₄-Subtyp-ähnlichen Bindungsstellen auch im Lungenparenchym von Schweinen vorkommen (Chelala *et al.*, 1998). Vermutlich sind M₄-Rezeptoren, ebenso wie der M₃-Rezeptor, an der Regulation der Drüsensekretion beteiligt.

Die Dilatation von Hirngefäßen wird u. a. durch M₅-Rezeptoren vermittelt, wie Experimente an Knock-Out-Mäusen für M₅ gezeigt haben; auch die Regulation der Dopamin-Freisetzung im Striatum findet über diesen Rezeptor-Subtyp statt. (Yamada *et al.*, 2003). Von M₅-Rezeptoren im Lungengewebe hingegen ist lediglich bekannt, dass sie ebenso wie die anderen Rezeptor-Subtypen von inflammatorischen Zellen exprimiert werden. Dieses ist ein Hinweis darauf, dass Acetylcholin inflammatorische Prozesse über parakrine oder autokrine Mechanismen beeinflussen könnte (Gosens *et al.*, 2006).

Chronische inflammatorische und obstruktive Atemwegserkrankungen gehen mit den typischen Veränderungen wie Bronchokonstriktion, erhöhter Schleimsekretion und bronchialer Hyperreaktivität gegenüber kontraktile wirkenden Faktoren einher. Die Ursache hierfür ist eine Hypersensibilität aufseiten des glatten Muskelgewebes. Bei allergischem Asthma scheint die Zahl und Funktion der postsynaptischen muscarinischen Rezeptoren konstant zu bleiben. Vielmehr erleichtert eine Dysfunktion präsynaptischer M₂-Autorezeptoren die Freisetzung von Acetylcholin, welches postsynaptisch seine Wirkung entfalten kann. Die M₂-Dysfunktion ist abhängig vom Einstrom eosinophiler Leukozyten, welche Myelin-basisches-Protein (MBP) freisetzen.

Dieses wirkt am Autorezeptor als allosterischer Antagonist (Fryer *et al.*, 1998). Bei COPD-Patienten hingegen ist im Vergleich zu gesunden Menschen der Anteil der M₂-Rezeptoren an der Gesamtzahl der muscarinischen Rezeptoren im Lungengewebe vermindert. Außerdem ist das Verhältnis von M₁ und M₃ zur Gesamtzahl der Rezeptoren erhöht (Shen *et al.*, 2001).

1.2.2 Remodelling der Atemwege bei chronischen inflammatorischen und obstruktiven Atemwegserkrankungen

Im Rahmen des Remodelling-Prozesses bei chronischen inflammatorischen und obstruktiven Atemwegserkrankungen wie Asthma und COPD kommt es zu Veränderungen des Epithels, der Blutgefäße, der Drüsen, des glatten Muskelgewebes und des Bindegewebes (Jeffery *et al.*, 2001). Diese Veränderungen sind bei beiden Krankheitsbildern teilweise ähnlich, es existieren aber auch krankheitsspezifische Unterschiede. So kommt es sowohl im Verlauf von Asthma wie auch von COPD zu einer Zunahme der glatten Muskelzellmasse, fibrotische Umbauvorgänge hingegen spielen eher bei chronisch obstruktiver Lungenkrankheit eine Rolle. Der Krankheitsprogress bei COPD scheint besonders durch eine Verdickung der Wände der kleinen Atemwege mit einem Durchmesser von unter 2 mm beeinflusst zu werden (Hogg *et al.*, 2004).

Ursache für diese Gewebeeränderungen sind die Wirkung verschiedener Mediatoren wie TGF- β , Chemokine, verschiedener Wachstumsfaktoren und Lipidmediatoren, die von inflammatorischen Zellen, aber auch von glatten Muskelzellen, Epithelzellen und Fibroblasten freigesetzt werden (Duvernelle *et al.*, 2003). Nach neueren klinischen Studien scheint insbesondere auch endogen freigesetztes Acetylcholin für den Krankheitsfortschritt mit verantwortlich zu sein. So konnte gezeigt werden, dass der langwirkende muscarinische Antagonist Tiotropium den Krankheitsverlauf bei COPD-Patienten positiv beeinflusst (Casaburi *et al.*, 2004; Vincken *et al.*, 2002; Koumis *et al.*, 2005). Experimente an Meerschweinchen, die nach wiederholter Exposition gegenüber Allergenen ein allergisches Asthma entwickelten, demonstrierten außerdem, dass bei Tieren, die mit Tiotropium behandelt wurden, eine Zunahme der glatten Muskelzellmasse wie auch der Kontraktilität in den Luftwegen reduziert werden konnte.

Auch der Anstieg der kontraktilen Proteine, besonders von sm-MHC, wurde durch eine Vorbehandlung mit Tiotropium reduziert (Gosens *et al.*, 2005).

Umgekehrt bewirkt eine Stimulation muscarinischer Rezeptoren eine Verstärkung der proliferativen Antwort glatter Muskelzellen auf Wachstumsfaktoren. So kann der proliferative Effekt des Thrombozyten-Wachstumsfaktors PDGF auf bovine glatte Muskelzellen aus der Trachea durch parallele Aktivierung G_q-gekoppelter M₃-Rezeptoren gesteigert werden. (Gosens *et al.*, 2003). Auch die mitogene Reaktion humaner glatter Muskelzellen der Luftwege auf den epidermalen Wachstumsfaktor EGF kann durch gleichzeitige muscarinische Stimulation verstärkt werden. (Krymskaya *et al.*, 2000). Für eine gegenseitige Verstärkung von muscarinischen Mechanismen und der Wirkung von Wachstumsfaktoren spricht auch, dass die Expression muscarinischer Rezeptoren auf glatten Muskelzellen der Hundetrachea durch niedrige Konzentrationen von fetalem Kälberserum allein oder in Anwesenheit von IGF-1, Insulin oder Transferrin gefördert wird (Yang, 1990). Auf der anderen Seite bewirkt der Wachstumsfaktor PDGF eine zeitabhängige Verringerung der mRNA-Expression für den M₂-Rezeptor in der humanen Lungenfibroblasten-Zelllinie CCL 137. Auch die Bindungskapazität des Rezeptors für Liganden wird vermindert (Koman *et al.*, 1990).

Neben den glatten Muskelzellen haben auch Fibroblasten einen wesentlichen Anteil an den Remodelling-Prozessen in den Atemwegen (Sacco *et al.*, 2004; Chiappara *et al.*, 2001). Sie produzieren eine Reihe an Substanzen, darunter Cytokine, Oberflächenmoleküle und extrazelluläre Matrixbestandteile wie Kollagen, Laminin oder Fibronectin. Auf diese Weise können sie u. a. inflammatorische Zellen stimulieren (Dziedziczko *et al.*, 2003). Auf der anderen Seite werden Fibroblasten ihrerseits durch Mediatoren aktiviert. So führt der transformierende Wachstumsfaktor- β (TGF- β) zu einer Differenzierung der Zellen zu Myofibroblasten. Die Proliferation der Zellen kann durch den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) und den Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) stimuliert werden. (Beckett *et al.*, 2003; Chung *et al.*, 2001). Inwieweit cholinerge Mechanismen das Verhalten der Fibroblasten im Remodelling-Prozess beeinflussen, ist jedoch noch nicht näher bekannt.

1.3 Neuronales und nicht-neuronales Acetylcholin

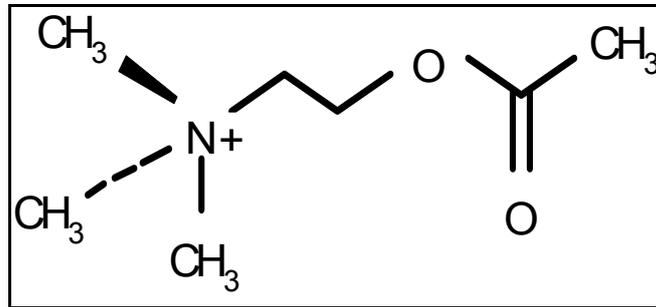


Abb. 3: Acetylcholin

Acetylcholin ist der Neurotransmitter des parasympathischen Nervensystems. Er dient sowohl auf prä- wie auch auf postganglionärer Ebene der Signalübertragung. Gebildet wird Acetylcholin in den Axonenden der Neurone durch das Enzym Acetylcholintransferase, welches Acetyl-CoA und Cholin als Substrate nutzt. Die synthetisierten Moleküle werden in synaptischen Vesikeln gespeichert und bei Depolarisation der Nervenendigung durch Exocytose in den synaptischen Spalt freigesetzt. Das ausgeschüttete Acetylcholin kann nun mit prä- und postsynaptischen Rezeptoren interagieren und so zum einen die Zielzelle in gewünschter Weise beeinflussen und zum anderen die Freisetzung weiterer Transmittermoleküle hemmen. Das Enzym Acetylcholinesterase hydrolysiert Acetylcholin zu Acetat und Cholin und entfernt es damit aus dem synaptischen Spalt (Racké und Matthiesen, 2004).

Nach neueren Erkenntnissen weisen auch nicht-neuronale Zellen wie Epithel, Endothel, Immunzellen und glatte Muskelzellen das Enzym Acetylcholintransferase auf, was darauf schließen lässt, dass auch diese Zellen Acetylcholin freisetzen. Allerdings dient es hier nicht als Neurotransmitter, sondern als parakriner Mediator. Es gibt Hinweise darauf, dass nicht-neuronales Acetylcholin auch in inflammatorischen Erkrankungen eine Rolle spielt. (Wessler *et al.*, 1999).

1.4 Pharmakologische Substanzen mit agonistischer und antagonistischer Wirkung an muscarinischen Rezeptoren

Neben dem natürlich vorkommenden Neurotransmitter Acetylcholin existieren eine Vielzahl pharmakologischer Substanzen mit agonistischer oder antagonistischer Wirkung an den muscarinischen Rezeptoren.

1.4.1 Struktur und Wirkung der muscarinischen Agonisten Carbachol und Oxotremorin und des muscarinischen Antagonisten Atropin

1.4.1.1 Carbachol

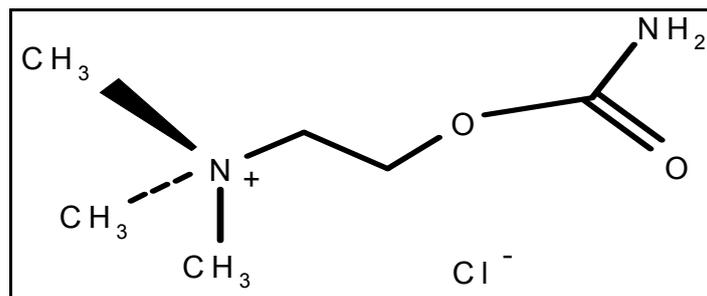


Abb. 4: Carbachol = Carbamylcholin

Carbachol, ein Ester des Cholins mit Carbaminsäure, ist ein synthetisch hergestelltes direktes Parasympathomimetikum, welches sowohl muscarinische als auch nicotinische agonistische Aktivität aufweist. Im Vergleich zu Acetylcholin hat Carbachol eine längere Wirkungsdauer, weil es beständiger gegen die Hydrolyse durch Cholinesterasen ist (Lüllmann und Mohr, 1999).

1.4.1.2 Oxotremorin

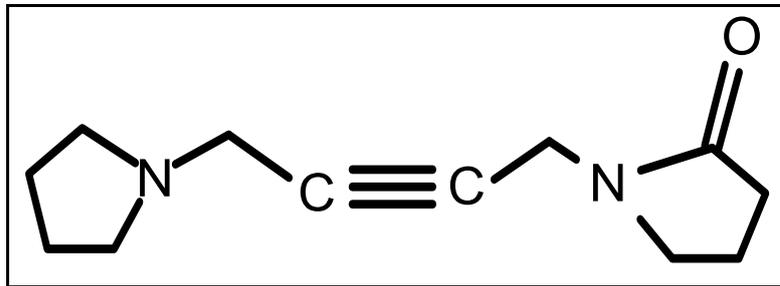


Abb. 5: Oxotremorin

Auch Oxotremorin ist ein synthetisch hergestelltes direktes Parasympathomimetikum. Oxotremorin weist keine Aktivität an nicotinischen Rezeptoren auf und ist beständig gegen die Hydrolyse durch Cholinesterasen (Ringdahl und Jenden, 1983).

1.4.1.3 Atropin

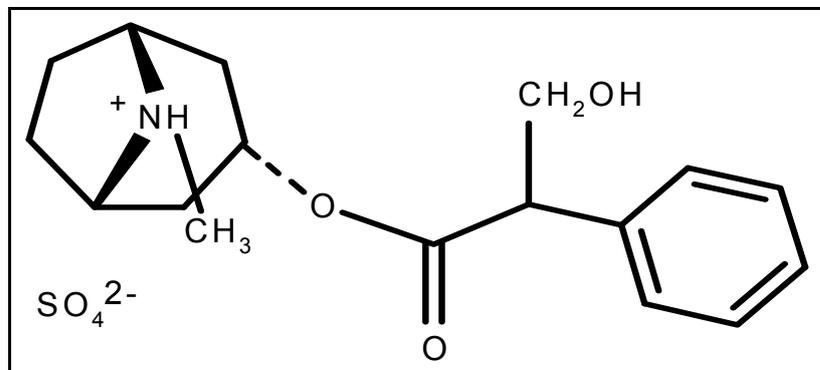


Abb. 6: Atropin

Der muscarinische Antagonist Atropin gehört zur Substanzklasse der Alkaloide. Das Enantiomer l-Hyoscyamin der Racematmischung wirkt anticholinerg, indem es an muscarinische Rezeptoren der postsynaptischen Membran in den parasymphathischen postganglionären Nervenendigungen bindet. In hohen Dosen blockiert Atropin auch die nicotinischen Rezeptoren an den Ganglien des autonomen Nervensystems und an den motorischen Endplatten (Lüllmann und Mohr, 1999).

1.4.2 Struktur und Wirkung des muscarinischen Antagonisten Tiotropium

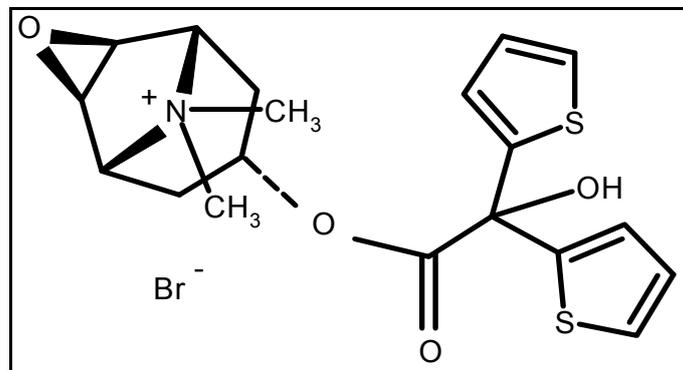


Abb. 7: Tiotropium

Tiotropium ist eine langwirkende, anticholinerge Substanz mit hoher Affinität zu allen muscarinischen Rezeptoren. Durch die langsame Dissoziation von M_1 - bzw. von M_3 -Rezeptoren entsteht seine kinetische Selektivität für diese Rezeptor-Subtypen (Koumis *et al.*, 2005). Die Halbwertszeit der Bindung an den M_3 -Rezeptor beträgt *in vitro* 36 Stunden, wohingegen die Halbwertszeit der bronchodilatatorischen Wirkung *in vivo* 24 Stunden beträgt (Seale, 2003). Bei Patienten mit Asthma oder chronisch obstruktiver Lungenerkrankung zeigt das quaternäre Ammoniumderivat einen bronchodilatatorischen und bronchoprotektiven Effekt. In klinischen Studien konnte bei den Patienten, die an COPD leiden und mit Tiotropium behandelt wurden, eine Verbesserung der Lungenfunktion und ein Rückgang der Exacerbationen nachgewiesen werden (Barnes, 2001, Casaburi *et al.*, 2004, Vincken *et al.*, 2002).

Diese positive Auswirkung auf den Krankheitsverlauf lässt sich vermutlich mit der antagonistischen Wirkung des Tiotropiums an muscarinischen Rezeptoren und hier insbesondere am M_3 -Rezeptor erklären. Tiotropium antagonisiert die Effekte des Acetylcholins, welches im Remodelling der Atemwege bei obstruktiven Lungenerkrankungen eine wichtige Rolle spielt. So wird die Proliferation glatter Muskelzellen durch Stimulation des M_3 -Rezeptors und durch Wachstumsfaktoren verstärkt (Gosens *et al.*, 2004, Gosens *et al.*, 2005). Ferner bewirkt Acetylcholin eine vermehrte Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren und fördert die Einwanderung von Entzündungszellen. Neben der Inhibition dieser Wirkungen des Acetylcholins ist vermutlich auch die Reduktion der Schleimsekretion der submukösen Drüsen der

Atemwege auf die antimuscarinische Aktivität des Tiotropiums zurückzuführen (Disse, 2001).

1.5 Die humanen Fibroblasten-Zelllinien MRC-5, IMR-90 und HEL-299

Die humanen Fibroblasten der Zelllinien MRC-5, IMR-90 und HEL-299 sind in ihren Eigenschaften hinsichtlich der Entwicklung der Seneszenz, der Empfänglichkeit für eine Transfektion mit Viren und ihrer Cytogenetik genau charakterisiert. Die Zelllinie MRC-5 wurde 1966 von J. P. Jacobs aus der Lunge eines 14 Wochen alten, männlichen Feten gewonnen. Die Seneszenz dieser Zellen wird nach 42 bis 46 Verdopplungszeiten erreicht (Jacobs *et al.*, 1970). Die Fibroblasten der Zelllinie IMR-90 erreichen die Seneszenz nach 58 Verdopplungszeiten. Sie stammen aus der Lunge eines 16 Wochen alten, weiblichen Feten (Nichols *et al.*, 1977). Die Zelllinie HEL-299 ist aus der Lunge eines männlichen Feten gewonnen, die Seneszenz wird bei diesen Fibroblasten bereits nach 18 Verdopplungszeiten erreicht. Für die Zellen dieser Linie ist beschrieben, dass sie M₂-Rezeptoren exprimieren, welche durch Stimulation der Proteinkinase C runterreguliert werden können (Rousell *et al.*, 1995).

1.6 Zielsetzung

Eine gerichtete Charakterisierung der fünf muscarinischen Rezeptor-Subtypen in Fibroblasten der Lunge ist bislang weder beim Menschen noch für die Ratte durchgeführt worden. Das Ziel dieses Projekts ist daher, die cholinergen Wirkungen auf Lungenfibroblasten genauer zu untersuchen. Hierzu soll die mRNS-Expression muscarinischer Rezeptoren in primären Lungenfibroblasten der Ratte und in den humanen Fibroblasten-Zelllinien MRC-5, IMR-90 und HEL-299 ermittelt werden. Um auch eine mögliche Veränderung der Expression der muscarinischen Rezeptoren zu erfassen, werden Fibroblasten unterschiedlicher Zellpassagen betrachtet. Die funktionelle Bedeutung dieser Rezeptoren wird untersucht, indem die Wirkung von cholinergen Agonisten und Antagonisten auf die Proliferation der Fibroblasten geprüft

wird. Da der proliferative Effekt der muscarinischen Agonisten möglicherweise die Anwesenheit von Wachstumsfaktoren erfordert, wird die Wirkung der Cholinomimetika auch in Kombination mit IGF-1 oder PDGF untersucht. Da der natürliche Agonist Acetylcholin unter den Versuchsbedingungen durch im Zellkulturmedium vorhandene Acetylcholinesterasen nur eine geringe Halbwertszeit aufweist, werden als agonistisch wirkende Substanzen das Acetylcholin-Struktur analogon Carbachol und Oxotremorin genutzt. Als muscarinische Antagonisten dienen Atropin und Tiotropium.

2 MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Allgemeine Chemikalien, Enzyme und Reaktionskits

Amphotericin B	Sigma-Aldrich, München
Atropiniumsulfat krist.	Merck, Darmstadt
Basismedium DMEM/HAM'S F-12	PAA, Cölbe
Basismedium EARLE'S MEM	PAA, Cölbe
Borsäure	Roth, Karlsruhe
bovines Serumalbumin = BSA	Sigma-Aldrich, München
Bromophenol Blau	Amersham Biosciences, Freiburg
Carbachol = Carbamylcholin Chlorid	Sigma-Aldrich, München
Deoxynucleotide Mix, 10 mM	Sigma-Aldrich, München
Diethylpyrocarbonat = DEPC	Sigma-Aldrich, München
Dimethylsulfoxid = DMSO	Sigma-Aldrich, München
DNA Ladder Ready-Load 100 bp	Invitrogen, Carlsbad
DNeasy Tissue Kit	Qiagen, Hilden
D _c -Protein Assay mit Reagenzien A, B, S	Bio-Rad, Hercules, USA
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München
Ethylendiamintetraacetat = EDTA	Sigma-Aldrich, München
fetales Kälberserum = FKS	Biochrom, Berlin
Ficoll 400, Type 400	Sigma-Aldrich, München
Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-1 = IGF-1	Sigma-Aldrich, München
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt

Lumasafe Szintillationsflüssigkeit	Lumac LSC, Groningen, Niederlande
MEM Non Essential Amino Acids (100 x) = NEAA	PAA, Cölbe
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
(Methyl- ³ H)-Thymidine 37 mBq/ml	Perkin Elmer, Rodgau
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid-Plätzchen (NaOH)	Merck, Darmstadt
Oligo dT-Primer	MWG-Biotech, Ebersberg

Oligonucleotide für die PCR

Mit Ausnahme des Oligonucleotidpaares rβactin-s und rβactin-as (Sigma-Aldrich, München) wurden alle Oligonucleotide von der Firma MWG Biotech, Ebersberg bezogen.

Ratte:

rβactin-s 5'-TTC TAC AAT GAG CTG CGT GTG GC-3'

rβactin-as 5'-AGA GGT CTT TAC GGA TGT CAA CG-3'

rM₁-s 5'-CTG GTT TCC TTC GTT CTC TG-3'

rM₁-as 5'-GCT GTG CCA AAA GTG ATG ATG-3'

rM₂-s 5'-GGC AAG CAA GAG TAG AAT AAA-3'

rM₂-as 5'-GCC AAC AGG ATA GCC AAG ATT-3'

rM₃-s 5'-CTG GTG TGA TGA TTG GTC TG-3'

rM₃-as 5'-TCT GCC GAG GAG TTG GTG TC-3'

rM₄-s 5'-TGG AGA CAG TGG AGA TGG TG-3'

rM₄-as 5'-AGG CTG AAG AGG AAG TAG TTG-3'

rM₅-s 5'-CAA CTA CTA CCT GCT CAG CTT G-3'
 rM₅-as 5'-CTG CCA CAG AAT CAG AAC CTT G-3'

Mensch:

hβactin-s 5'-CAC TCT TCC AGC CTT CCT TC-3'
 hβactin-as 5'-CTC GTC ATA CTC CTG CTT GC-3'

hM₁-s 5'-CAG GCA ACC TGC TGG TAC TC-3'
 hM₁-as 5'-CGT GCT CGG TTC TCT GTC TC-3'

hM₂-s 5'-CTC CTC TAA CAA TAG CCT GG-3'
 hM₂-as 5'-GGC TCC TTC TTG TCC TTC TT-3'

hM₃-s 5'-GGA CAG AGG CAG AGA CAG AA-3'
 hM₃-as 5'-GAA GGA CAG AGG TAG AGT GG-3'

hM₄-s 5'-ATC GCT ATG AGA CGG TGG AA-3'
 hM₄-as 5'-GTT GGA CAG GAA CTG GAT GA-3'

hM₅-s 5'-ACC ACA ATG CAA CCA CCG TC-3'
 hM₅-as 5'-ACA GCG CAA GCA GGA TCT GA-3'

Omniscript RT Kit:

Oxotremorin-sesquifumarat

Penicillin / Streptomycin-Lösung

(10000 U/ml / 10 mg/ml)

platelet derived growth factor = PDGF

Protease

RNase-Free DNase Set

Qiagen, Hilden

Sigma-Aldrich, München

Sigma-Aldrich, München

Sigma-Aldrich, München

Sigma-Aldrich, München

Qiagen, Hilden

RNase Inhibitor RNasin Plus 40 U/μl	Promega, Madison, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Tissue Kit	Qiagen, Hilden
Sodium Pyrovate Solution = SPS (100mM)	PAA, Cölbe
TaqDNA Polymerase 5 U/μl	Invitrogen, Carlsbad
Tiotropiumbromid-Monohydrat	Boehringer Ingelheim, Biberach
Trichloressigsäure krist.	Merck, Darmstadt
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan- hydrochlorid)	Boehringer Ingelheim, Biberach
Triton x-100	Pharmacia Biotech,
Uppsala, Schweden	
Trypan Blau (0,4 %)	Sigma-Aldrich, München
Trypsin EDTA 10x	Sigma-Aldrich, München

2.1.2 Lösungen und Puffer

Lösungen für die Zellkultur

Kulturmedium für die humanen Fibroblasten ohne FKS

Basismedium EARLE`S MEM	
Penicillin/Streptomycin	100 U/ml / 100 μg/ml
Non Essential Amino Acids = NEAA	1x
Sodium Pyrovate Solution = SPS	1 mM

Kulturmedium für die humanen Fibroblasten mit 10% FKS

Basismedium EARLE`S MEM	
FKS	10% (v/v)
Penicillin/Streptomycin	100 U/ml / 100 μg/ml
Non Essential Amino Acids = NEAA	1x

Sodium Pyrovate Solution = SPS 1 mM

Kulturmedium für die Ratten-Fibroblasten ohne FKS

Basismedium DMEM/HAM'S F12

Penicillin/Streptomycin 100 U/ml / 100 µg/ml

Amphotericin B 5 µg/ml

Kulturmedium für die Ratten-Fibroblasten mit 1% FKS

Basismedium DMEM/HAM'S F12

FKS 1% (v/v)

Penicillin/Streptomycin 100 U/ml / 100 µg/ml

Amphotericin B 5 µg/ml

Kulturmedium für die Ratten-Fibroblasten mit 10% FKS

Basismedium DMEM/HAM'S F12

FKS 10% (v/v)

Penicillin/Streptomycin 100 U/ml / 100 µg/ml

Amphotericin B 5 µg/ml

Kulturmedium für die Ratten-Fibroblasten mit 15% FKS

Basismedium DMEM/HAM'S F12

FKS 15% (v/v)

Penicillin/Streptomycin 100 U/ml / 100 µg/ml

Amphotericin B 5 µg/ml

10x PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung) pH 7,4-7,5

KCl 27 mM

KH₂PO₄ 15 mM

NaCl 1,38 M

Na₂HPO₄ x H₂O 81 mM

bidest. Wasser

1x PBS-Puffer pH 7,4-7,5

10x PBS, 1:10 verdünnt mit sterilem, bidest. Wasser 1x

Pronase-Lösung

Protease 1 mg/ml

steriles Basismedium DMEM/HAM'S F12

1x Trypsin-EDTA-Lösung

10x Trypsin-EDTA, 1:10 verdünnt mit sterilem 1x PBS-Puffer 1x

0,15% Trypanblau-Färbelösung

0,4% Trypan Blue Stain, 3:8 verdünnt mit 1x PBS-Puffer 0,15% (w/v)

Lösungen für die Untersuchung der proliferativen Effekte10% Trichloressigsäure

Trichloressigsäure krist. 10% (w/v)

bidest. Wasser

0,1 N Natriumhydroxidlösung

Natriumhydroxid-Plätzchen 0,1 N

bidest. Wasser

1 M Tris-HCl pH 7,4

Tris-HCl 1 M

bidest. Wasser

-mit HCl auf pH 7,4 einstellen

Lösungen für die Proteinbestimmung nach Lowry

BSA-Standardlösung

BSA	4 mg/ml
0,1% Tris-Triton-Lösung	

1% Tris-Triton-Löung

1 M Tris-HCl-Lösung pH 7,4	100 mM
Triton x-100	1% (v/v)
bidest. Wasser	

Reagenz A'

Reagenz S	1% (v/v)
Lösungs-Reagenz A	99% (v/v)

Lösungen für RNS-Präparation, RT-PCR und Gelelektrophorese

Zellyse und RNS-Präparation:

DEPC-Wasser

DEPC	0,2% (v/v)
steriles bidest. Wasser	

RT-Master-Mix

Die nachfolgenden Mengenangaben beziehen sich auf eine Probe (8 µl), der Master-Mix wird dann entsprechend für (n+1) Proben angesetzt:

10 µM Oligo dT-Primer	2 µl
5 mM dNTP-Mix	2 µl
10x RT-Puffer	2 µl
10 U/µl RNase Inhibitor RNasin Plus (1:4 verdünnt mit 1x RT-Puffer)	1 µl
Omniscript RT	1 µl

PCR-Master-Mix

Die nachfolgenden Mengenangaben beziehen sich ebenfalls auf eine Probe (8µl), der Master-Mix wird dann entsprechend für (n+1) Proben angesetzt:

10X PCR Reaktionspuffer	5 µl
50 mM MgCl ₂	1,5 µl
10 mM Desoxynucleotid-Mix	1 µl
5 U/µl TaqDNA Polymerase	0,5 µl

Oligonucleotide

Die Oligonucleotide werden nach Herstellerangabe in DEPC-Wasser gelöst (100 µM) und anschließend mit sterilem Wasser 1:10 verdünnt (10 µM).

Gelelektrophorese:5x TBE-Puffer

Tris	0,45 M
Borsäure	0,44 M
EDTA	0,012 M
bidest. Wasser	

0,5x TBE-Puffer

5x TBE-Puffer, 1:10 verdünnt mit bidest. Wasser

Agarose-Gel 1,2%

Agarose	1,2%
0,5x TBE-Puffer	
Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml)	10 µl

Ethidiumbromid-Lösung 1%

Ethidiumbromid	1%
bidest. Wasser	

Probenpuffer

Ficoll 400	15% (w/v)
1% Bromphenolblau-Lösung	0,25% (w/v)
5x TBE-Puffer	0,5x
bidest. Wasser	

2.1.3 TestsubstanzenAtropin

100 mM Stocklösung, jeweils frisch hergestellt	
Atropin	100 mM
steriles, bidest. Wasser	

Carbachol

100 mM Stocklösung, jeweils frisch hergestellt	
Carbachol	100 mM
steriles, bidest. Wasser	

Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-1 = IGF-1

Stocklösung mit 500 ng/ml, gelöst in steriler PBS, bei -20°C gelagert	500 ng/ml
--	-----------

Oxotremorin

100 mM Stocklösung, jeweils frisch hergestellt	
Oxotremorin	100 mM
steriles, bidest. Wasser	

platelet derived growth factor = PDGF

Stocklösung mit 10 ng/µl, gelöst in 4 mM HCl mit 0,1% BSA	10 ng/µl
---	----------

Tiotropium

10 mM Stocklösung, jeweils frisch hergestellt, pH 3

Tiotropium

10 mM

steriles, bidest. Wasser

-mit HCl auf pH 3 einstellen

2.1.4 Humane Fibroblasten-Zelllinien

Für die Versuche mit humanen Fibroblasten wurden drei verschiedene Zelllinien verwendet:

- MRC-5: aus der Lunge eines 14 Wochen alten, männlichen Feten, nach 42 bis 46 Verdopplungszeiten ist die Seneszenz erreicht, ATCC-Nummer CCL-171, LGC Promochem, Wesel
- IMR-90: aus der Lunge eines 16 Wochen alten, weiblichen Feten, 58 Verdopplungszeiten bis zur Seneszenz, ATCC-Nummer CCL-186, LGC Promochem, Wesel
- HEL-299: aus der Lunge eines männlichen Feten, Seneszenz nach 18 Verdopplungszeiten, ATCC-Nummer CL-137, LGC Promochem, Wesel

2.2. Methoden

2.2.1 Präparation und Kultur der primären Fibroblasten aus der Trachea der Ratte

Sowohl männliche wie auch weibliche Sprague-Dawley-Ratten, geboren im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Bonn, werden im Alter von zwei bis drei Monaten durch cervicale Dislokation getötet. Nach Öffnung des Thorax wird die Trachea freipräpariert und knapp unterhalb des Larynx und oberhalb der Bifurcatio tracheae entfernt. Die Tracheen werden in Röhrchen mit steriler und kalter 1-facher PBS-Lösung überführt und bis zur weiteren Präparation auf Eis gekühlt.

Unter sterilen Bedingungen folgt dann eine zweifache Spülung in 1-facher PBS-Lösung, verbliebene Gewebereste werden mit einer Pinzette entfernt. Danach werden die Tracheen mit einer feinen Schere der Länge nach aufgeschnitten und für 20 bis 30 Minuten in einer Pronaselösung (1 mg/ml) bei 37°C inkubiert. Durch enzymatischen Abbau der membranständigen und extrazellulären Proteine wird so eine Gewebedissoziation erreicht. Es werden zwei weitere Waschschrte mit 1-facher PBS-Lösung durchgeführt, hierzu werden die Präparate in ein neues steriles Röhrchen überführt. Nachdem mit einem Wattestäbchen die Epithelzellschicht entfernt wurde, werden die Tracheen mit einem Skalpell in acht bis zehn kleine Stücke zerteilt und auf je zwei Löcher einer 6-Loch-Platte verteilt. Zur Beschwerung werden Metallnetze aufgelegt. Pro Loch werden ca. 3 ml 15%iges Fibroblasten-Medium zugegeben und die Präparate dann bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank (Incubator Infrared CO₂, Forma Scientific) inkubiert.

Der erste Mediumwechsel erfolgt nach 24 h, die weiteren alle zwei bis drei Tage. Nach maximal zwei Wochen sind die Fibroblasten zu Zellfoci ausgewachsen, so dass sowohl die Metallnetze als auch die Gewebestückchen entfernt werden können.

Bei einer Konfluenz der Zellen von 80% kann dann eine Weiterpassage der Fibroblasten erfolgen.

Hierzu wird nach der Entfernung des Mediums mit steriler und warmer 1-facher PBS-Lösung zweimal gewaschen. Es folgt die Zugabe von 2 ml steriler 1-facher Trypsin-EDTA-Lösung, mit der die Fibroblasten ca. 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert

werden. Die Trypsin-EDTA-Lösung wird abgesaugt und die Dissoziation so lange fortgesetzt, bis die Zellen sich zusammenziehen und einkugeln. Der vorhandene Trypsin-EDTA-Rest wird durch die Zugabe von Kulturmedium (10% FKS) inaktiviert. Die nun im Medium vorhandenen Zellen werden in einem sterilen Röhrchen 5 Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die nun als Sediment vorliegenden Zellen in einer definierten Menge Medium resuspendiert.

Die Zellzahl wird in einer Neubauer-Zählkammer bei gleichzeitiger Bestimmung der Zellvitalität mittels Trypanblau-Ausschlussfärbung bestimmt. Die Kammer wird mit einem Teilvolumen der Suspension gefüllt (20 µl Zellsuspension und 80 µl Färbemittel Trypanblau) und die Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt. Die im vollständigen Volumen der Zellsuspension vorliegende Zellzahl kann nun mit Hilfe des Kammerfaktors rechnerisch bestimmt werden.

Die Aussaat erfolgt in 75 oder 175 cm² fassende Kulturflaschen, wobei die ausgesäte Zellmenge pro Flasche so festgelegt wird, dass die Fibroblasten zu einem gewünschten Zeitpunkt konfluent sind.

Für die Untersuchung proliferativer Effekte durch muscarinische Agonisten und Antagonisten werden die Fibroblasten auf 12-Loch-Platten mit einer Zelldichte von 200.000 pro Loch ausgesät. Pro Loch wird 1 ml Medium zugegeben.

Für die Zellkultur ab Passage 2 wird grundsätzlich Nährmedium mit 10% FKS verwendet.

2.2.2 Kultur der humanen Fibroblasten-Zelllinien

Die in Kryo-Röhrchen eingefrorenen Fibroblasten werden zunächst 1 min bei Raumtemperatur und dann in 37°C warmem Wasserbad zügig aufgetaut, um die Zerstörung der Zellmembranen durch den Auftauvorgang möglichst gering zu halten. Das Kryo-Röhrchen wird unmittelbar vor dem Öffnen mit einem in 70%igem Ethanol getränkten Papiertuch abgewischt und der Inhalt in eine 75 cm²-Kulturflasche überführt. In der Zellkulturflasche befindet sich bereits auf 37°C vorgewärmtes Kulturmedium (10% FKS), das durch kurze Lagerung im Brutschrank den erforderlichen CO₂-Gehalt von 5% aufweist. Nach 24 h Inkubation im Brutschrank wird der erste Mediumwechsel

durchgeführt, um noch vorhandenes DMSO aus dem Einfriermedium zu entfernen. Nach weiteren 24 bis 48 h können die Fibroblasten expandiert werden. Dazu werden die nun vorhandenen Zellen (wie bereits in Abschnitt 2.2.1 für die Ratten-Fibroblasten beschrieben) zweimal mit PBS gewaschen, trypsiniert, in Medium resuspendiert und in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Dann kann eine definierte Zellzahl weiterkultiviert, die andere wieder eingefroren werden.

Bei den weiterkultivierten Fibroblasten wird zweimal pro Woche das Kulturmedium erneuert, die Weiterpassage folgt dem gleichen Protokoll wie bereits in Abschnitt 2.2.1 beschrieben.

Für ein erneutes Einfrieren der Zellen werden diese in Einfriermedium resuspendiert (pro Kryo-Röhrchen 1,8 ml mit 95% Kulturmedium (10% FKS) und 5% DMSO). In einer Kryo-Box werden die Zellen dann bei -80°C eingefroren, es erfolgt ein langsames Runterkühlen um 1°C pro Minute. Sind die -80°C erreicht, werden die Fibroblasten in den Kryo-Röhrchen im Stickstofftank bei -196°C weiter gelagert.

Die Aussaat der humanen Fibroblasten für den Proliferationsversuch erfolgt ebenso wie die der Fibroblasten der Ratte (Abschnitt 2.2.1), allerdings beträgt die Zelldichte 75.000 pro Loch der 12-Loch-Platte.

2.2.3 Untersuchung der proliferativen Wirkung muscarinischer Agonisten und Antagonisten

Die Fibroblasten der Ratte wie auch die humanen Fibroblasten werden wie unter Abschnitt 2.2.1 bzw. 2.2.2 beschrieben präpariert, kultiviert und in 12-Loch-Platten mit einer Dichte von 200.000 (Ratte) bzw. 75.000 (human) Zellen pro Loch ausgesät. Nach einem festen Zeitschema, welches im Verlauf der Experimente variiert wurde, werden dann Kulturmedium mit 0%, 1% oder 10% FKS, die Testsubstanzen und (Methyl- ^3H)-Thymidin zugefügt. Die proliferierenden Zellen können (Methyl- ^3H)-Thymidin in ihre DNS einbauen.

Nach 48 bzw. 72 h wird die DNS-Extraktion durchgeführt:

Unter nicht-sterilen Bedingungen wird das überschüssige Medium abgesaugt, die Zellen werden dann mit kalter 1-facher PBS-Lösung (1 ml pro Loch) gewaschen. Es folgt die

Zugabe von 1 ml 10%iger Trichloressigsäure, mit der die Fibroblasten 10 Minuten bei 37°C inkubiert werden. Hierdurch werden alle vorhandenen Proteine ausgefällt. Der Überstand wird erneut abgenommen und verworfen, danach wird ein zweites Mal mit 1-facher PBS-Lösung gewaschen. Nun inkubieren die Zellen mit 1 ml 0,1 N NaOH bei 37°C für die Dauer einer Stunde, wodurch sie lysiert werden. Danach werden zur Neutralisation pro Loch 200 µl Tris-HCl (pH 7,4) zugefügt und gemischt. 300 µl der Proben werden in Polyethylen-Röhrchen überführt und mit 3 ml Lumasafe Szintillationsflüssigkeit versetzt. Im Szintillationszähler (Packard) wird in jeder Probe die Anzahl der β -Zerfälle pro Minute in der Einheit d.p.m. (disintegration per minute) gemessen, wobei die Zähleffizienz durch einen externen Standard ermittelt wird. Die Anzahl der β -Zerfälle pro Minute korreliert positiv mit dem Einbau von (Methyl- ^3H)-Thymidin in die proliferierenden Fibroblasten.

Für die Proteinbestimmung werden jeweils 50 µl der Proben abgenommen.

2.2.4 Proteinbestimmung

Protokoll nach Firmenangaben zum D_c Protein Assay Kit (Bio-Rad), basierend auf der Proteinbestimmung nach Lowry et al., 1951.

50 µl des Zelllysates aus dem Proliferationsversuch werden, wie bereits in Abschnitt 2.2.3 erwähnt, einer Proteinbestimmung unterzogen, um eine gleichmäßige Verteilung der Fibroblasten bei der Aussaat in die 12-Loch-Platten zu belegen. Dazu werden zunächst 100 µl frisch hergestelltes Reagenz A' (aus den Komponenten A und S) und im direkten Anschluss 800 µl Reagenz B den Proben hinzugegeben, gemischt und dann für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Entsprechend wird auch mit je 50 µl der Standardlösungen aus bovinem Serumalbumin verfahren. Diese werden in den Konzentrationen 50, 100, 300, 700, 1100 und 1500 µg/ml in 0,1%iger Tris-Triton-Lösung gelöst und zum regelmäßigen Einsatz in der Proteinbestimmung bei -20°C gelagert. Nach Ende der Reduktionszeit wird die Absorption der Standards und der Proben gegen einen identisch vorbereiteten Leerwert, also mit 50 µl 1:6 verdünnter Tris-HCl-/ NaOH-Lösung, in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 750 nm vermessen. Die Verwendung unterschiedlicher Lösungsmittel für Standards und Proben hatte

keinerlei Einfluss auf die erhaltenen Ergebnisse. Die Erstellung einer Regressionsgeraden mit den Extinktionswerten der Standards ermöglicht die Auswertung der Proben.

2.2.5 RNS-Präparation, RT-PCR und Gelelektrophorese

2.2.5.1 RNS-Präparation

Die RNS-Isolation erfolgt mit Hilfe des RNeasy Tissue Kits der Firma Qiagen nach Herstellerangabe.

Hierzu wird das Medium aus den Zellkulturflaschen entfernt. Nachdem die Zellen mit 1-facher PBS-Lösung benetzt sind, können sie mit einem Zellschaber abgekratzt werden. In einem Reaktionsgefäß werden sie kurz zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Lysis-Puffer zugegeben (1 ml für die Zellmenge einer 175 cm²-Kulturflasche, bei Originalgewebe 600 µl Lysis-Puffer pro 20 bis 30 mg Gewebe). Für die RNS-Gewinnung des Originalgewebes wie Herzvorhof, Basalganglien, Plexus myentericus und Aorta der Ratte wird dieses nach Zugabe des Lysis-Puffers mithilfe des Ultra-Turrax zerkleinert. Das Zelllysat kann jetzt direkt weiterverarbeitet oder alternativ bei -80°C gelagert werden.

Im folgenden Schritt wird das Zelllysat 2 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Der Überstand, der die RNS enthält, wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nun wird eine mit dem Volumen des Lysis-Puffers identische Menge 70%igem Ethanol zugesetzt und gemischt. Jeweils 700 µl der Probe werden dann auf eine Kieselsäurematrix aus dem Kit gegeben und diese bei 10000 U/min 15 s zentrifugiert. Nachdem das Filtrat verworfen worden ist, werden pro Säule 700 µl RW1-Waschpuffer zugesetzt und erneut für 15 s bei 10000 U/min zentrifugiert. Das Filtrat wird abermals verworfen.

Es wird erneut, diesmal aber 350 µl, RW1-Waschpuffer zugegeben, bei gleicher Geschwindigkeit und Dauer zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Um eventuell kontaminierende genomische DNS abzubauen, werden 80 µl mit RDD-Puffer versetzte DNase I auf die Säule gegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf

folgend wird nochmals mit 350 µl RW1-Waschpuffer gewaschen und nach gleichem Vorgehen wie oben zentrifugiert.

Nun werden 500 µl RPE-Puffer auf die Matrix pipettiert und bei 10000 U/min für 15 s zentrifugiert. Dieser Schritt wird wiederholt, allerdings wird beim zweiten Mal über eine Zeitdauer von 2 min zentrifugiert. Um eine optimale Trocknung der RNeasy-Membran zu erreichen, kann zusätzlich noch für 1 min bei 13000 U/min zentrifugiert werden, das Filtrat wird dann verworfen und die Säule in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Für die Elution der RNS wird zweimal RNase-freies Wasser zugegeben, optimalerweise im ersten Schritt 40 µl, im zweiten dann 30 µl. Nach jeder der Wasserzugaben wird ein letztes Mal während einer Dauer von 1 min bei 10000 U/min zentrifugiert.

Die Konzentration der RNS wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm vermessen. Dazu wird die Probe vorher mit RNase-freiem Wasser 1:40 verdünnt. Die gelöste RNS kann nun bei -80°C tiefgefroren und gelagert werden.

2.2.5.2 Reverse Transkription

Während der Reversen Transkription werden die in der Probe enthaltenen RNS-Stränge durch das Enzym Reverse Transkriptase in die zur Sequenz komplementäre cDNS umgeschrieben.

Aufgrund der hohen Instabilität der RNS ist es bei allen nachfolgenden Schritten wichtig, dass alle Reaktionsgefäße, die RNS enthalten, auf Eis gestellt werden und für die Pipettiervorgänge nur RNase-freie Plastikware gebraucht wird.

Nach photometrischer Absorptionsmessung bei 260 nm wird die RNS-Konzentration nach folgender Formel errechnet:

$$A_{260 \text{ nm}} \times 40 \times \text{Faktor der Verdünnung} = \text{RNS-Konzentration in } \mu\text{g/ml}$$

Das Volumen, welches 1 µg Gesamt-RNS entspricht, wird entnommen und in einem 0,5 ml-Reaktionsgefäß mit DEPC-Wasser auf 12 µl aufgefüllt. Dann werden 8 µl des unter Abschnitt 2.1.2 aufgeführten Master-Mixes zugegeben, so dass sich ein Gesamtvolumen von 20 µl pro Probe ergibt. Die RT-Reaktion findet nun während der

60minütigen Inkubation bei 37°C statt. An diese Phase schließt sich zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase eine 5minütige Inkubation bei 93°C an. Die Proben werden kurz zentrifugiert, um eventuell am Deckel haftende Kondenströpfchen wieder in Lösung zu bringen. Pro Reaktionsgefäß werden 80 µl steriles Wasser zugegeben und die bei der RT-Reaktion synthetisierte cDNS bei -20°C eingefroren.

2.2.5.3 Polymerase-Kettenreaktion und Gelelektrophorese

Während der Polymerase-Kettenreaktion findet die Amplifikation eines bestimmten cDNS-Abschnittes statt. In einem dreischrittigen Zyklus wird die cDNS zunächst bei 94°C denaturiert, um eventuell vorliegende Schleifen aufzulösen. In der Hybridisierungsphase binden die Oligonucleotide bei ihrer jeweiligen optimierten Hybridisierungstemperatur an den cDNS-Strang und in der folgenden Elongation findet durch das Enzym TaqDNA Polymerase eine Verlängerung des neusynthetisierten DNS-Stranges statt.

Für alle nachfolgenden Pipettierschritte werden autoklavierte Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße benutzt.

Für die PCR werden für jede Probe 32 µl steriles Wasser und 5 µl cDNS-Lösung in ein Reaktionsgefäß gegeben. Auch 5 µl des entsprechenden Oligonucleotid-Paares werden hinzugefügt. Dann wird der PCR-Master-Mix hergestellt (siehe Abschnitt 2.1.2), jeweils 8 µl pro Probe zugegeben und gut durchmischt. Um eine Verdunstung und Kondensation der Lösung zu verhindern, wird jeder Reaktionsansatz mit 60 µl Mineralöl überschichtet. Die Proben werden in den PCR-Thermal Reactor überführt und folgendes Programm durchgeführt:

Denaturierung	94°C	3 min einmalig
---------------	------	----------------

23 Zyklen (für die PCR-Produkte von β -Actin) bzw. 35 Zyklen (für die PCR-Produkte aller muscarinischen Rezeptoren):

-Denaturierung	94°C	45 s
-Hybridisierung	53°C bis 60°C	30 s
-Elongation	72°C	1 min
Elongation	72°C	10 min einmalig

Die optimierten Hybridisierungstemperaturen der Oligonucleotidpaare betragen bei der Untersuchung der mRNA-Expression der muscarinischen Rezeptoren der Ratte 53°C für rM₂-s und rM₂-as, 57°C für rM₅-s und rM₅-as, 58°C für rM₁-s und rM₁-as sowie rM₄-s und rM₄-as und 59°C für rM₃-s und rM₃-as. Bei den humanen Fibroblasten wurden 53°C für das Oligonucleotidpaar hM₂-s und hM₂-as, 56°C für hM₁-s und hM₁-as, hM₄-s und hM₄-as sowie hM₅-s und hM₅-as und 60°C für hM₃-s und hM₃-as als Hybridisierungstemperaturen eingesetzt.

Die erstellten PCR-Proben können nun zur späteren Weiterverarbeitung bei -20°C eingefroren oder gleich auf ein Agarose-Gel aufgetragen werden.

Das 1,2%ige Agarose-Gel wird gemäß Abschnitt 2.2.1 hergestellt und benötigt ca. 45 Minuten zur Polymerisation. Das Mineralöl der PCR-Proben wird mit Hilfe einer Pipette entnommen und verworfen. 40 µl der PCR-Lösung werden dann in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 4 µl Probenpuffer gemischt. Jeweils 20 µl der Proben werden dann in eine Tasche des Agarose-Gels pipettiert. Außerdem werden 5 µl der 100 bp-DNS-Leiter als Marker aufgetragen. Die Elektrophorese läuft nun bei konstanter Stromstärke von 73 mA so lange, bis der farbige Teil des PCR-Probenpuffers die Unterkante des Gels erreicht (ca. 2 h). Durch Interkalation des Ethidiumbromids in die DNS-Stränge können die aufgetrennten Produkte nach Anregung durch UV-Licht detektiert und fotografisch dokumentiert werden. Die PCR-Produkte für die jeweiligen muscarinischen Rezeptoren haben hierbei spezifische Größen: Bei der Ratte betragen sie 127 bp für M₁, 552 bp für M₂, 790 bp für M₃, 141 bp für M₄ und 517 bp für M₅. Die Produktgrößen der humanen Zellen liegen bei 538 bp für M₁, 654 bp für M₂, 560 bp für M₃, 498 bp für M₄ und 751 bp für M₅.

Die semiquantitative Auswertung erfolgt mit dem Computerprogramm RFLPscan. Hierbei werden Quotienten aus den optischen Dichten der Probenbande und der β-Actin-Kontrollbande gebildet.

2.2.6 DNS-Präparation

Die DNS-Isolation wird mit Hilfe des DNeasy Tissue Kits der Firma Qiagen nach Herstellerangaben durchgeführt.

Um für die Polymerase-Kettenreaktionen der humanen Fibroblasten eine Positivkontrolle zu erhalten, wird die genomische DNS aus der Zelllinie MRC-5 gewonnen. Nachdem das Kulturmedium verworfen ist, werden die Zellen bei 1750 U/min während einer Dauer von 5 min zentrifugiert und in 200 µl 1-facher PBS-Lösung resuspendiert. Nun werden 20 µl Proteinase K und 200 µl AL-Puffer zugegeben, gemischt und in einem Wasserbad bei 70°C für 10 min inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl 96-100%igem Ethanol ist die Zellyse abgeschlossen. Diese Lösung wird nun auf die im Kit enthaltene Kieselsäurematrix gegeben, hierbei sollte die maximale Zahl der lysierten Zellen pro Säule 5 Millionen nicht überschreiten. Die Säule wird dann 1 min bei 8000 U/min zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und 500 µl AW1-Puffer auf die Matrix gegeben. Eine erneute einminütige Zentrifugation bei 8000 U/min folgt. Nach einem weiteren Waschschrift mit 500 µl AW2-Puffer wird für 3 min mit 13000 U/min zentrifugiert. Die Membran der Säule sollte nun komplett getrocknet und frei von Ethanol sein, der Durchfluss einschließlich des Auffanggefäßes wird verworfen. Um die DNS zu eluieren, wird die Kieselsäurematrix in ein neues Auffanggefäß überführt, 200 µl AE-Puffer zugegeben und für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgt eine erneute Zentrifugation (1 min mit 8000 U/min). Dieser Elutionsschrift kann einmal wiederholt werden. Die Konzentration der DNS-Lösung kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm erfasst werden. Hierfür wird die Probe vorher mit sterilem Wasser 1:40 verdünnt.

2.2.7 Statistik und Berechnung

GraphPad Software

Das Programm GraphPad InStat 3.01 wurde für die statistische Auswertung und die Bestimmung der Signifikanz (ANOVA und Bonferroni-Test) genutzt. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM von n Experimenten. $P < 0,05$ wurde als signifikant akzeptiert. Sämtliche Diagramme wurden mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 4.00 erstellt.

IrfanView

Die Bearbeitung der PCR-Bilder erfolgte mit diesem Programm.

MDL ISIS Draw 2.5

Dieses Zeichenprogramm wurde für die Erstellung der chemischen Strukturformeln eingesetzt.

Microsoft Excel 5.0 und Excel 97

Sämtliche Auswertungen der Versuchsergebnisse wurden mit diesen Programmen unter Erstellung von Tabellen der Einzelergebnisse und deren Verwendung für Mittelwerttabellen durchgeführt. Auch die Erstellung von Eichgeraden für die Proteinbestimmung erfolgte mit Excel 5.0 bzw. 97.

RFLPscan 2.01

Dieses Programm der Firma MWG Biotech wurde zur semiquantitativen Berechnung der optischen Dichten der PCR-Banden auf den Agarose-Gelen verwendet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Untersuchungsergebnisse an primären Fibroblasten aus der Trachea der Ratte

3.1.1 mRNA-Expression muscarinischer Rezeptoren in primären Fibroblasten aus der Trachea der Ratte

Mittels Polymerase-Kettenreaktion wurde die mRNA-Expression der muscarinischen Rezeptoren M_1 bis M_5 in primären Fibroblasten der Ratte ermittelt. Untersucht wurde die mRNA-Expression sowohl bei primären unpassagierten Zellkulturen ($n=3$ entsprechend 3 Ratten) als auch bei Zellpassage 3 ($n=3$). Als Positivkontrolle diente in Abhängigkeit des zu untersuchenden Rezeptors Gewebe aus dem Plexus myentericus (für M_1), aus dem Vorhof des Herzens (für M_2 , M_5), aus der Aorta (für M_3) und aus den Basalganglien (für M_4).

Für die Rezeptoren M_1 , M_4 und M_5 konnte weder für die unpassagierten Fibroblasten noch für die Fibroblasten der Passage 3 in der Gelelektrophorese ein Produkt der PCR nachgewiesen werden. Die Positivkontrollen zeigten in jedem Fall eine deutliche Bande auf der dem jeweiligen PCR-Produkt entsprechenden Höhe.

mRNA des M_2 -Rezeptors konnte bei allen 3 Proben sowohl der Fibroblasten der Passage 0 als auch derjenigen der Passage 3 lediglich in Spuren nachgewiesen werden. Das Gewebe aus dem Vorhof des Herzens zeigte als Positivkontrolle auch hier wieder eine deutliche Bande.

Die mRNA-Expression von M_3 zeigte ein variables Muster. Das Gewebe aus der Aorta zeigte eine deutliche Bande. Die drei Proben aus der unpassagierten Zellkultur waren alle positiv, dennoch variierte die mRNA-Expression zwischen 1,4 und 32,1 relativen Einheiten. Der erste Zellpool der Passage 3 zeigte kein spezifisches PCR-Produkt, die beiden anderen waren recht deutlich mit 8,8 und 34,0 relativen Einheiten vertreten.

Somit ergibt sich für die muscarinischen Rezeptoren folgendes Expressionsmuster (Abb. 8-11): mRNA von M_1 , M_4 und M_5 konnte weder bei den Zellen der Passage 0 noch bei den Fibroblasten Passage 3 nachgewiesen werden. Durch das eindeutig positive

Ergebnis bei den Kontrollen kann ein falsch negativer Befund der Proben ausgeschlossen werden. M_2 -mRNS ist in Spuren bei allen Proben, also sowohl bei den unpassagierten Fibroblasten als auch bei der Passage 3, vorhanden. Die Expression von M_3 ist variabel: in den Kulturen der Passage 0 wurde mRNS bei allen Proben nachgewiesen, allerdings zeigten die Banden unterschiedliche Dichten. Bei den Fibroblasten der Passage 3 ist ein Zellpool negativ, die anderen beiden weisen das für M_3 spezifische PCR-Produkt auf.

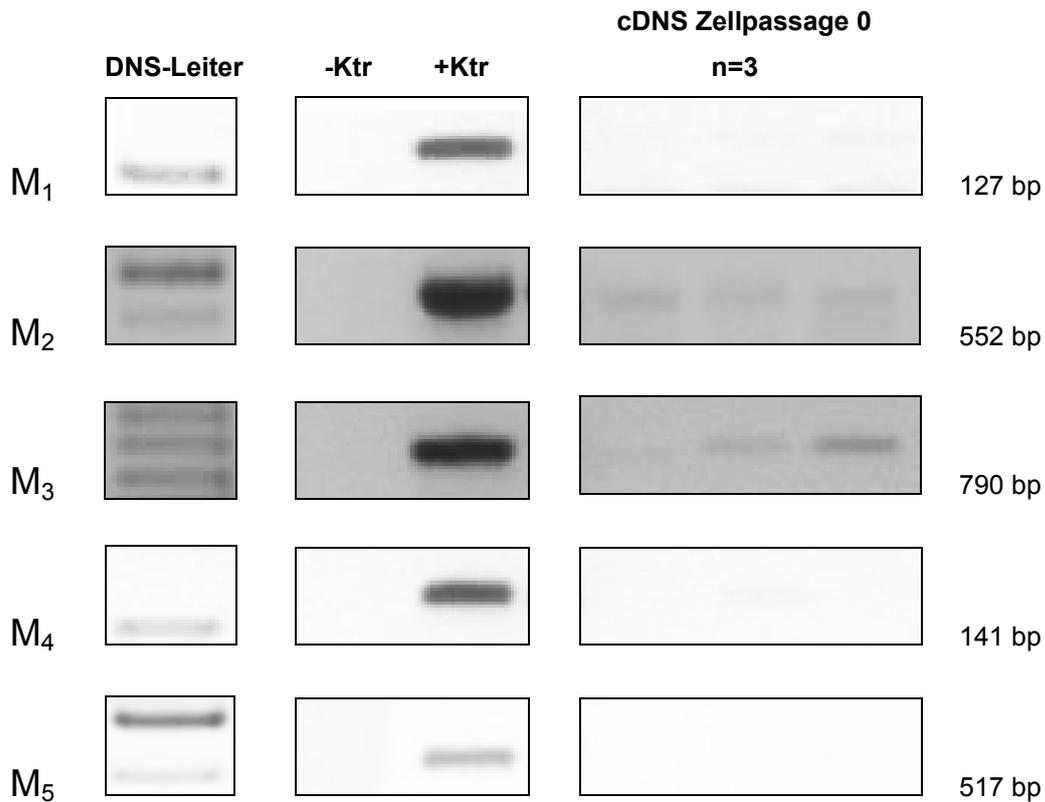


Abb. 8: Die mRNA-Expression muscarinischer Rezeptoren an unpassagierten primären Fibroblasten aus der Trachea der Ratte. Die mRNA wurde aus Zellen, die bis zur Konfluenz kultiviert wurden, isoliert und mit DNase behandelt. Dann wurde eine RT-PCR mit spezifischen Oligonucleotiden für die muscarinischen Rezeptoren M₁ bis M₅ oder für β -Actin durchgeführt. Als Positivkontrolle (+Ktr) diente für M₁ Gewebe aus dem Plexus myentericus, für M₂ und M₅ aus dem Vorhof des Herzens, für M₃ aus der Aorta und für M₄ aus den Basalganglien. Um eine Kontamination der Proben auszuschließen, wurde eine PCR ohne Probe durchgeführt (Negativkontrolle, -Ktr). Die PCR-Produkte wurden auf 1,2%igem Agarose-Gel aufgetrennt. Invers-Darstellung der PCR-Bilder.

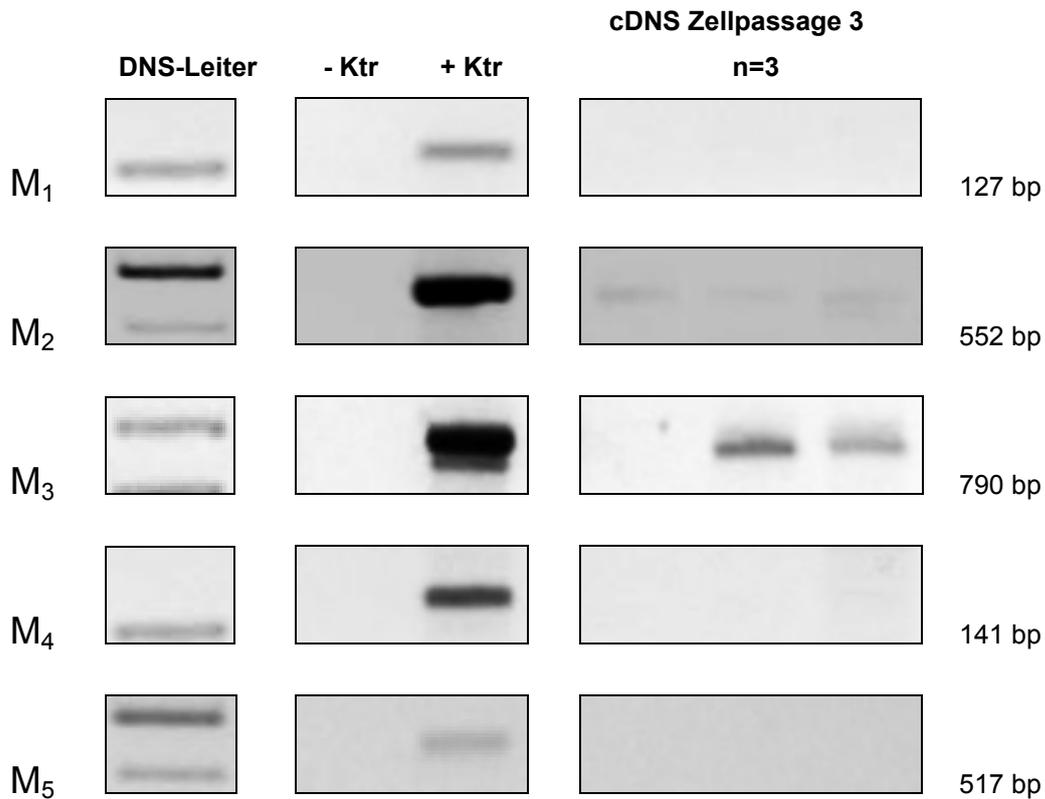


Abb. 9: Die mRNA-Expression muscarinischer Rezeptoren an primären Fibroblasten der Passage 3 aus der Trachea der Ratte. Die mRNA wurde aus Zellen, die bis zur Konfluenz kultiviert wurden, isoliert und mit DNase behandelt. Dann wurde eine RT-PCR mit spezifischen Oligonucleotiden für die muscarinischen Rezeptoren M₁ bis M₅ oder für β -Actin durchgeführt. Als Positivkontrolle (+Ktr) diente für M₁ Gewebe aus dem Plexus myentericus, für M₂ und M₅ aus dem Vorhof des Herzens, für M₃ aus der Aorta und für M₄ aus den Basalganglien. Um eine Kontamination der Proben auszuschließen, wurde eine PCR ohne Probe durchgeführt (Negativkontrolle, -Ktr). Die PCR-Produkte wurden auf 1,2%igem Agarose-Gel aufgetrennt. Invers-Darstellung der PCR-Bilder.

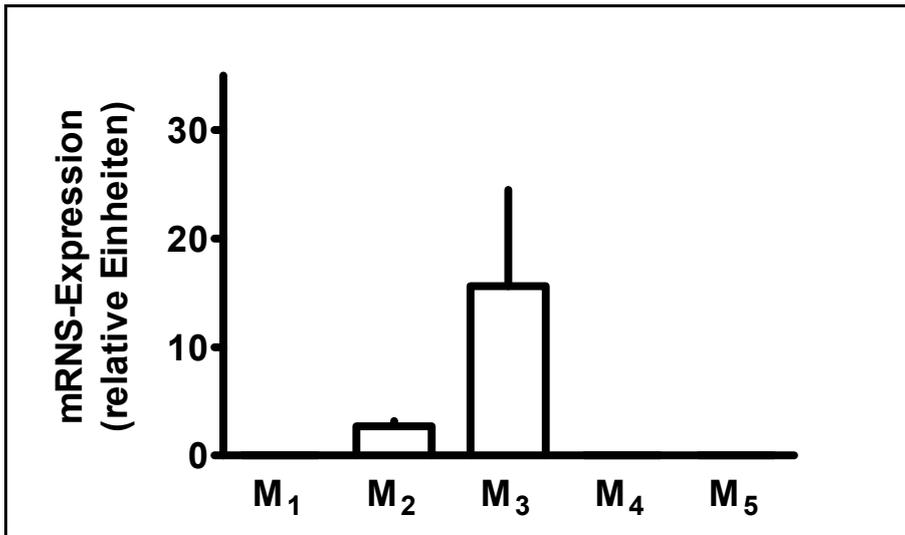


Abb. 10: Densitometrische Auswertung der mRNS-Expression muscarinischer Rezeptoren an unpassagierten primären Fibroblasten aus der Trachea der Ratte. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM (jeweils n=3). Die Werte wurden sowohl über β -Actin normalisiert, um die eventuell schwankende Qualität der cDNS-Synthese auszugleichen, als auch über das jeweilige PCR-Produkt der Positivkontrolle normalisiert, um die eventuell variable Effektivität der Oligonucleotidpaare zu berücksichtigen.

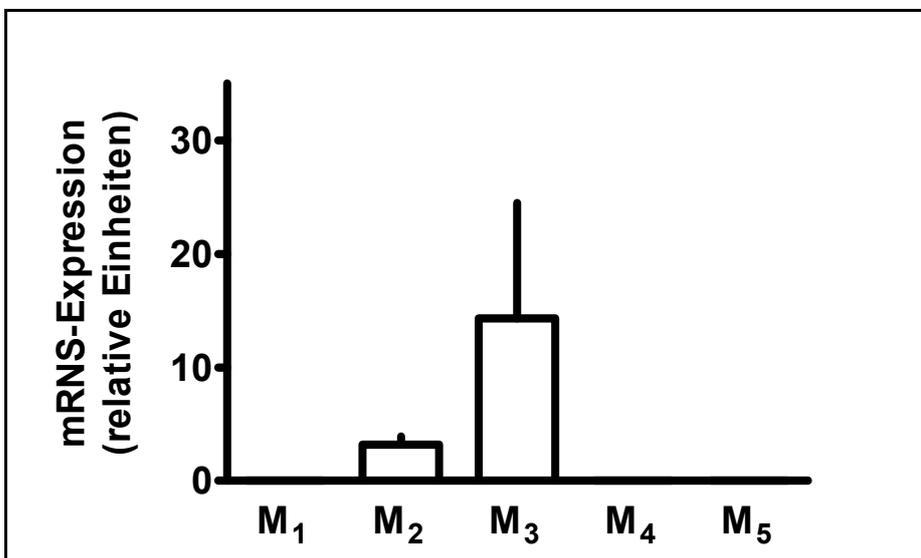


Abb. 11: Densitometrische Auswertung der mRNS-Expression muscarinischer Rezeptoren an primären Fibroblasten der Passage 3 aus der Trachea der Ratte. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM (jeweils n=3). Die Werte wurden sowohl über β -Actin normalisiert, um die eventuell schwankende Qualität der cDNS-Synthese auszugleichen, als auch über das jeweilige PCR-Produkt der Positivkontrolle normalisiert, um die eventuell variable Effektivität der Oligonucleotidpaare zu berücksichtigen.

3.1.2 Muscarinische Stimulation der Proliferation der primären Fibroblasten aus der Trachea der Ratte

Die Wirkung muscarinischer Agonisten auf die Proliferation der Fibroblasten der Ratte wurde unter verschiedenen Versuchsbedingungen untersucht.

In einer ersten Reihe von Experimenten (Abb. 12) wurden die Fibroblasten nach der Aussaat für 24 h mit 10% FKS kultiviert. Daran schloss sich eine 48-stündige Versuchsphase mit FKS-freiem Kulturmedium an. Zu Beginn der zweiten Hälfte dieser 48-stündigen Versuchsphase wurde dem Kulturmedium für 24 h 1 $\mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Thymidin und die Testsubstanz Carbachol in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben. Unter Kontrollbedingungen lag die Inkorporation von ^3H -Thymidin bei 3.818 ± 413 d.p.m. ($n=62$). Carbachol wurde in den Konzentrationen von 10 nM bis zu 100 μM eingesetzt ($n=6-30$). Eine proliferationsstimulierende Wirkung auf die Fibroblasten durch Carbachol konnte unter diesen Versuchsbedingungen nicht nachgewiesen werden.

Das experimentelle Vorgehen wurde in einer zweiten Versuchsreihe (Abb. 13) variiert, um unter den veränderten Bedingungen möglicherweise eine proliferative Wirkung auf die Zellen nachzuweisen. Die Fibroblasten der Ratte wurden nach der Aussaat ebenfalls während einer Zeitdauer von 24 h mit 10% FKS kultiviert, in den darauf folgenden 24 h wurde dem Kulturmedium 1% FKS zugesetzt. In der dritten und ebenfalls 24 h dauernden Versuchsphase wurde dem 1% FKS enthaltenden Kulturmedium 1 $\mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Thymidin zugegeben. In dieser Zeitperiode wirkten auch die Testsubstanzen Carbachol oder Oxotremorin in ansteigenden Konzentrationen auf die Zellen ein. In Abwesenheit der Testsubstanzen, d. h. unter Kontrollbedingungen, betrug die Inkorporation von ^3H -Thymidin 39.147 ± 3.029 d.p.m. ($n=39$). Der muscarinische Agonist Carbachol wurde im Konzentrationsbereich von 0,01 nM bis zu 100 μM eingesetzt ($n=3-12$). Auch in dieser Reihe von Experimenten konnte keine proliferationsfördernde Wirkung durch Carbachol festgestellt werden. Der muscarinische Agonist Oxotremorin wurde in ansteigenden Konzentrationen von 0,01 nM bis zu 1 μM zugegeben ($n=3-6$). Auch durch Oxotremorin konnte kein proliferationssteigernder Effekt auf die Fibroblasten der Ratte gezeigt werden.

In einer dritten Reihe von Versuchen (Abb. 14) wurde die Kultur der Fibroblasten der Ratte nach der Aussaat ebenfalls mit Kulturmedium begonnen, welches 10% FKS

enthielt. Nach 24 h wurde dieses durch FKS-freies Medium ersetzt, worauf sich ein Zeitintervall von 24 h anschloss, in dem die Zellen in Anwesenheit von 1% FKS kultiviert wurden. In diesen letzten 24 h wurden dem Kulturmedium außerdem wieder 1 $\mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Thymidin und die Testsubstanzen zugegeben. Ohne Zugabe von Testsubstanzen betrug die Inkorporation von ^3H -Thymidin 24.285 ± 2.921 d.p.m. ($n=48$). Auch in dieser Reihe von Experimenten wurde Carbachol in einem Konzentrationsbereich von 0,01 nM bis zu 100 μM zugegeben ($n=3-27$, meist ≥ 6). Ein proliferationsstimulierender Effekt durch Carbachol konnte um bis zu 14% beobachtet werden, allerdings war diese Wirkung konzentrationsunabhängig und nicht signifikant. Oxotremorin wurde in den Konzentrationen 10 nM, 100 nM und 1 μM eingesetzt (jeweils $n=6$). Es kam zu einem Anstieg der ^3H -Thymidin-Inkorporation um $18\% \pm 12\%$ bei einer Oxotremorin-Konzentration von 1 μM . Diese proliferationsstimulierende Wirkung war signifikant ($P < 0,01$ gegen die Kontrolle ohne Testsubstanzen).

Eine gleichmäßige Verteilung der Zellen bei der Aussaat auf die Löcher der 12-Loch-Platten wurde durch eine Proteinbestimmung nach Lowry bestätigt.

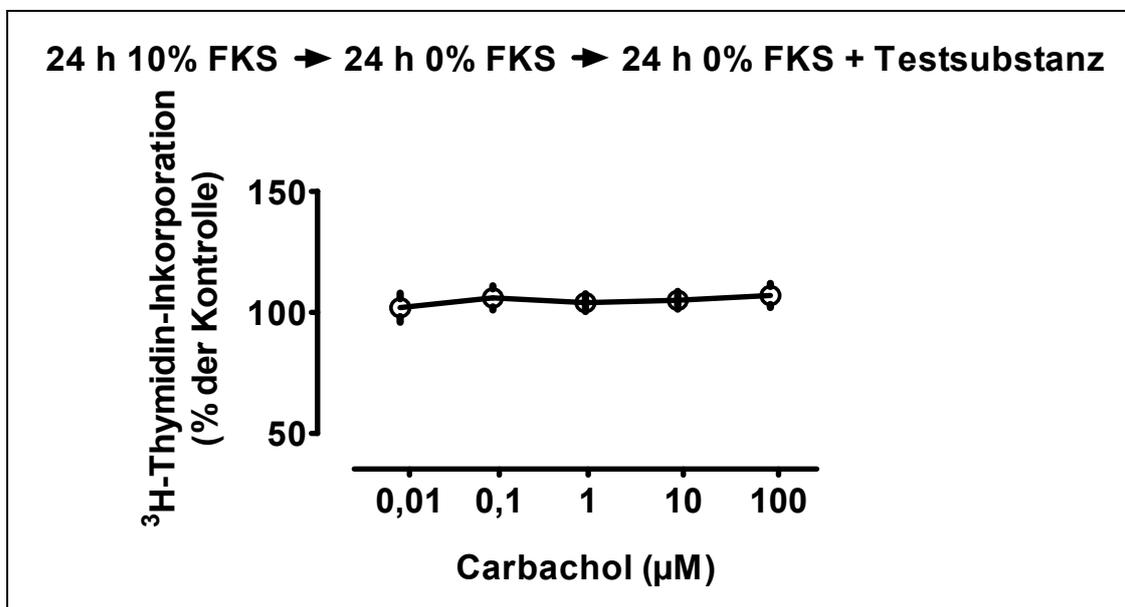


Abb. 12: Der Effekt des muscarinischen Agonisten Carbachol (\circ) auf die ^3H -Thymidin-Inkorporation in Fibroblasten aus der Trachea der Ratte. Je 200.000 Zellen wurden in 12-Loch-Platten für 24 h mit 10% FKS kultiviert. Es folgte eine 48-stündige Versuchsphase mit FKS-freiem Kulturmedium. In den letzten 24 h wurde dem Medium Carbachol in steigenden Konzentrationen (Abszisse) zusammen mit ^3H -Thymidin zugegeben. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM ($n=6-30$).

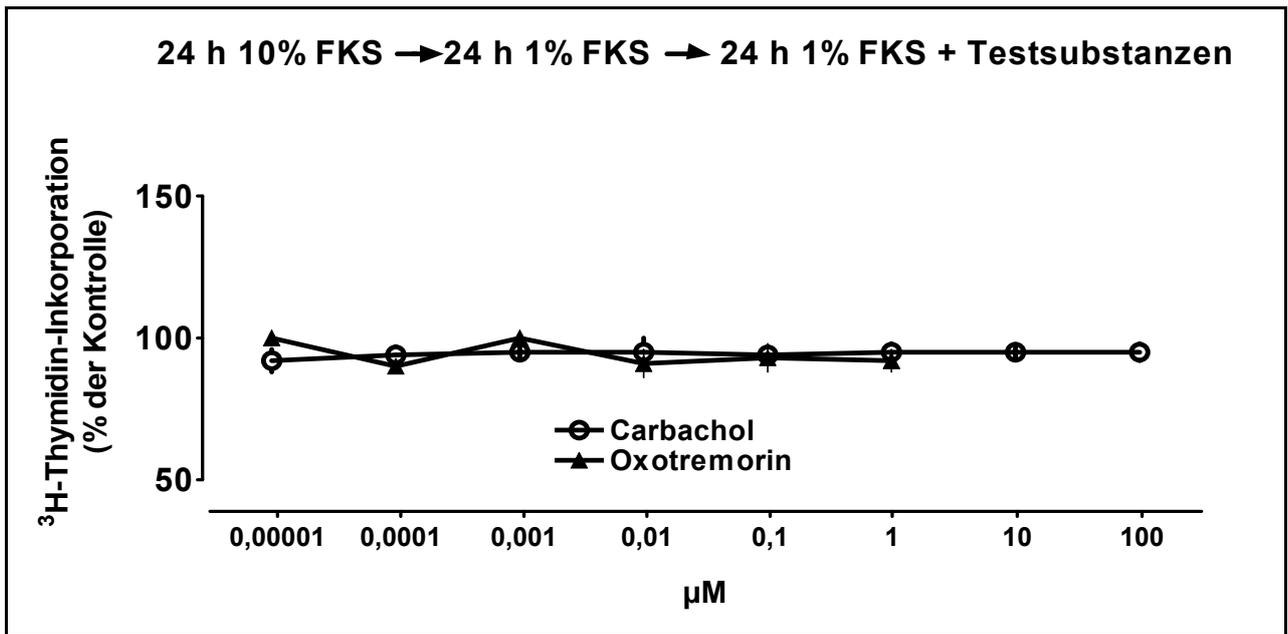


Abb. 13

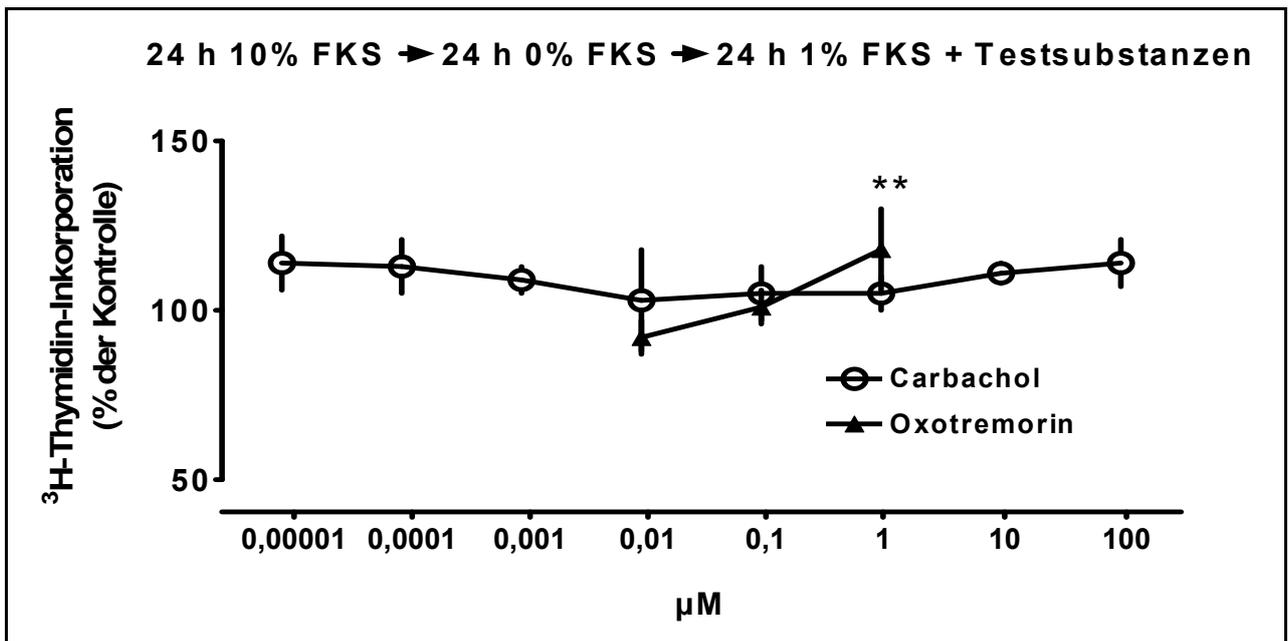


Abb. 14

Abb. 13 und 14: Der Effekt der muscarinischen Agonisten Carbachol (○) und Oxotremorin (▲) auf die ³H-Thymidin-Inkorporation in Fibroblasten aus der Trachea der Ratte. Je 200.000 Zellen wurden in 12-Loch-Platten in Anwesenheit von FKS wie in den beiden Abbildungen angegeben kultiviert. In den letzten 24 h wurden die Testsubstanzen in steigenden Konzentrationen (Abszisse) zusammen mit ³H-Thymidin zugegeben. Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM (n=3-27). Signifikanzniveau: ** P<0,01 gegen die Kontrolle ohne Testsubstanzen.

3.1.3 Proliferative Effekte durch muscarinische Stimulation in Anwesenheit der wachstumsfördernden Faktoren IGF-1 und PDGF

Da es Hinweise auf eine proliferative Wirkung auf glatte Muskelzellen durch muscarinische Agonisten in Anwesenheit von wachstumsstimulierenden Faktoren gibt, wurde der Effekt der Cholinomimetika in Anwesenheit von IGF-1 und PDGF untersucht. In dieser Versuchsreihe wurden die Fibroblasten der Ratte nach der Aussaat zunächst für 24 h in Kulturmedium, welches 10% FKS enthielt, kultiviert. Daran schloss sich eine Periode von 48 h an, in der das Kulturmedium FKS-frei war. Zu Beginn der zweiten Hälfte dieses 48 h-Zeitraums, d. h. nach 24 h, wurden dem Medium zudem 1 $\mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Thymidin und die Testsubstanzen Carbachol oder Oxotremorin und/oder die Wachstumsfaktoren IGF-1 oder PDGF in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Unter Kontrollbedingungen, d. h. in Abwesenheit der Testsubstanzen und der wachstumsfördernden Faktoren, lag die ^3H -Thymidin-Inkorporation bei 3.818 ± 413 d.p.m. (n=62).

Auch in dieser Versuchsreihe wurde eine gleichmäßige Verteilung der Zellen bei der Aussaat auf die Löcher der 12-Loch-Platten durch eine Proteinbestimmung belegt.

3.1.3.1 Die proliferationsfördernde Wirkung durch muscarinische Agonisten in Anwesenheit von IGF-1

Im ersten Experiment wurde zunächst die proliferative Wirkung von IGF-1 in ansteigenden Konzentrationen auf die Fibroblasten ermittelt. IGF-1 wurde hierbei in Konzentrationen von 1, 10 und 30 ng/ml (n=6, 18 und 6) eingesetzt. Es zeigte sich wie erwartet eine konzentrationsabhängige Steigerung der Proliferation der Fibroblasten, die bei 1 ng/ml IGF-1 $17\% \pm 4\%$ ($P < 0,05$ gegen die Kontrolle ohne IGF-1), bei 10 ng/ml $32\% \pm 4\%$ ($P < 0,001$) und bei 30 ng/ml $47\% \pm 4\%$ ($P < 0,001$) betrug (Abb. 15).

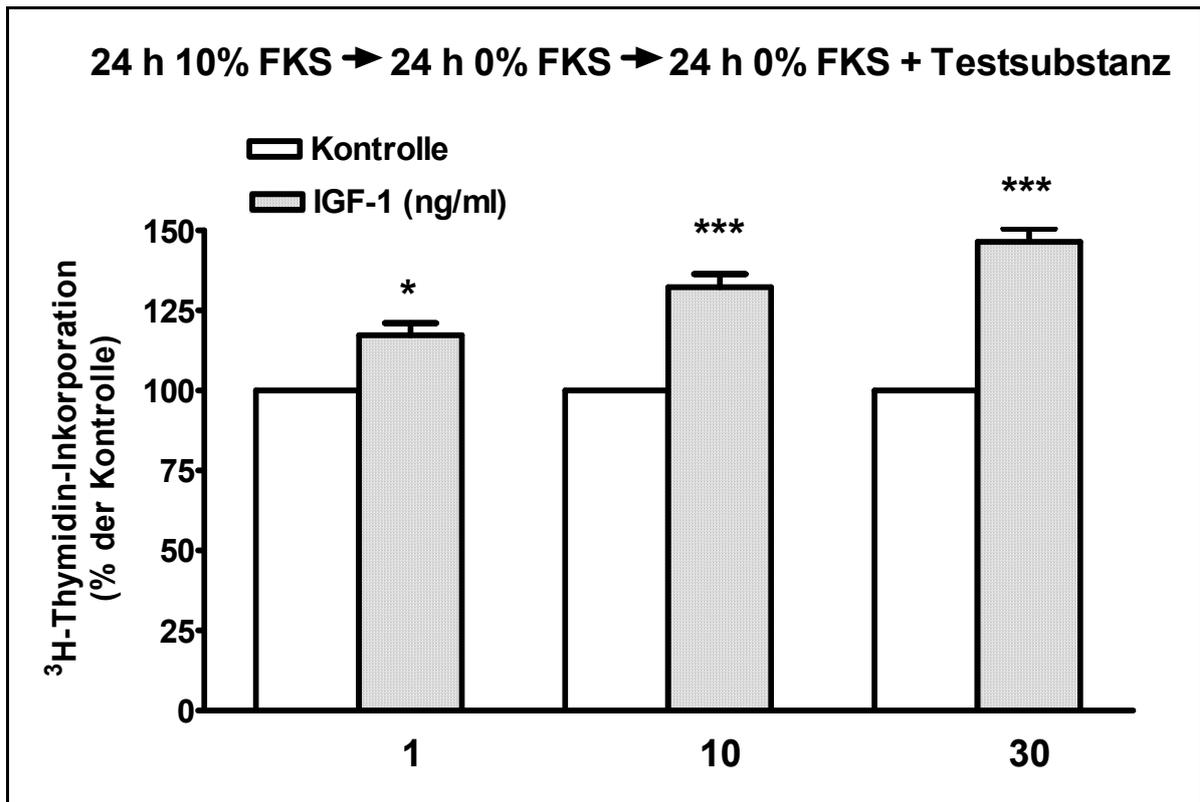


Abb. 15: Der Effekt des Wachstumsfaktors IGF-1 auf die ³H-Thymidin-Inkorporation in Fibroblasten aus der Trachea der Ratte. Angegeben sind die Mittelwerte±SEM (n=6-18). Signifikanzniveau: * P<0,05; *** P<0,001 gegen die Kontrolle ohne IGF-1.

In einem weiteren Experiment (Abb. 16) wurden dem Kulturmedium sowohl 10 ng/ml IGF-1 als auch ansteigende Konzentrationen des muscarinischen Agonisten Carbachol beigefügt. Carbachol wurde im Konzentrationsbereich von 1 nM bis zu 10 µM eingesetzt (n=3-9, meist n≥6). Die Werte der ³H-Thymidin-Inkorporation der Zellen, die mit IGF-1 und Carbachol behandelt wurden, wurden dann mit den Werten der ³H-Thymidin-Inkorporation der Fibroblasten, die nur mit 10 ng/ml IGF-1 kultiviert wurden (n=30), verglichen. Auf diese Weise sollte eine mögliche, zusätzlich zu der durch IGF-1 ohnehin bewirkten Proliferationssteigerung durch Carbachol nachgewiesen werden. Eine konzentrationsabhängige Stimulation der Proliferation konnte bei den höheren Konzentrationen von Carbachol festgestellt werden; so betrug sie bei 100 nM 10%±6%, bei 1 µM 21%±12% und bei 10 µM 20%±13%. Dieser stimulierende Effekt blieb in

Anwesenheit des muscarinischen Antagonisten Atropin aus, während Atropin allein keine proliferative Wirkung hatte. Diese Ergebnisse waren nicht signifikant.

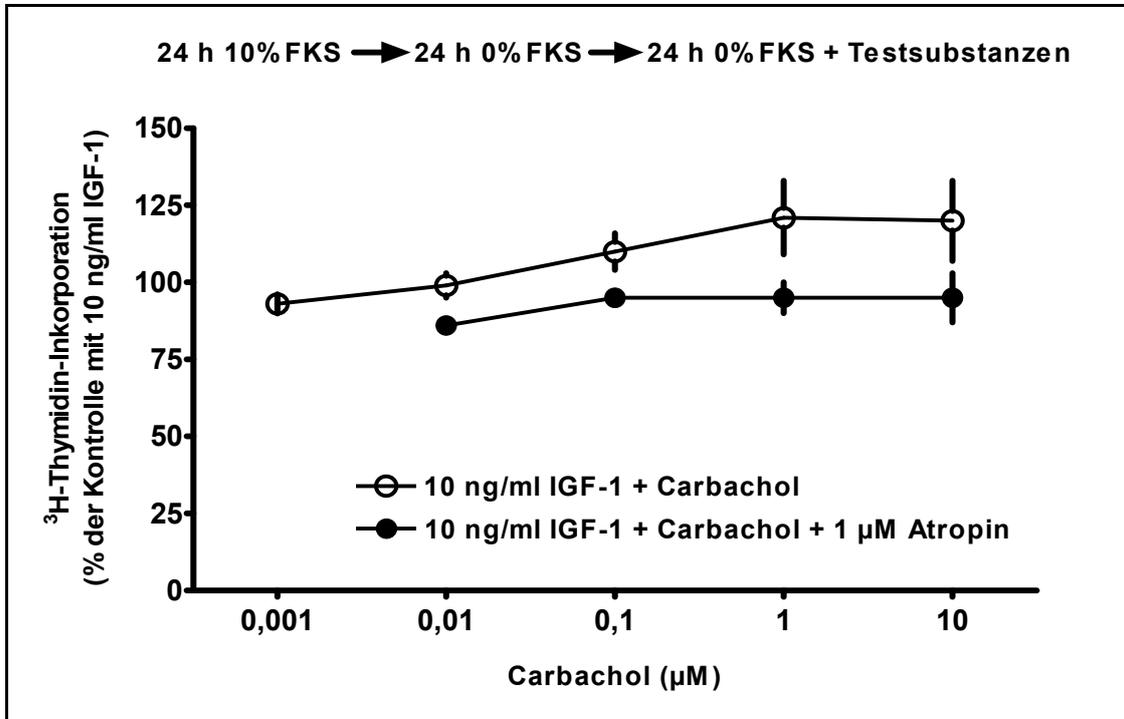


Abb. 16: Der Effekt des muscarinischen Agonisten Carbachol auf die ^3H -Thymidin-Inkorporation in Fibroblasten aus der Trachea der Ratte in Anwesenheit des Wachstumsfaktors IGF-1. 200.000 Zellen wurden in 12-Loch-Platten für 24 h mit 10% FKS kultiviert. Es folgte eine 48-stündige Versuchsphase mit FKS-freiem Kulturmedium. Zu Beginn der zweiten Hälfte dieser Versuchsphase wurde dem Medium für 24 h ^3H -Thymidin, 10 ng/ml IGF-1 und Carbachol in steigenden Konzentrationen allein (○) oder in Anwesenheit (●) von 1 µM des muscarinischen Antagonisten Atropin zugesetzt. Atropin allein hatte keinen Effekt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM (n=3-9). Die Werte waren nicht signifikant.

Auch der proliferative Effekt durch Oxotremorin wurde in Anwesenheit von 10 ng/ml IGF-1 geprüft. Oxotremorin wurde in den Konzentrationen 10 nM (n=3), 100 nM (n=3) und 1 µM (n=6) eingesetzt. Die ermittelten Werte der Inkorporation von ^3H -Thymidin wurden ebenfalls auf die Werte der Zellen, die nur mit 10 ng/ml IGF-1 behandelt wurden, bezogen. Ein proliferativer Effekt durch Oxotremorin in Anwesenheit von IGF-1 konnte in diesem Experiment nicht gezeigt werden.

3.1.3.2 Der proliferative Effekt durch muscarinische Agonisten in Anwesenheit von PDGF

Die proliferative Wirkung von PDGF allein sollte in einer ersten Reihe von Versuchen (Abb. 17) gezeigt werden. Hierbei wurde PDGF in den Konzentrationen von 0,1; 0,3; 1; 3 und 10 ng/ml eingesetzt (n=3-23). Es wurde ein stimulativer Effekt auf die Proliferation der Fibroblasten beobachtet, der konzentrationsabhängig bis auf 357%±36% bei einer PDGF-Konzentration von 10 ng/ml anstieg. Bei einer PDGF-Konzentration von 3 ng/ml bzw. 10 ng/ml war dieser proliferative Effekt signifikant (P<0,001 gegen die Kontrolle ohne Zugabe der Testsubstanz).

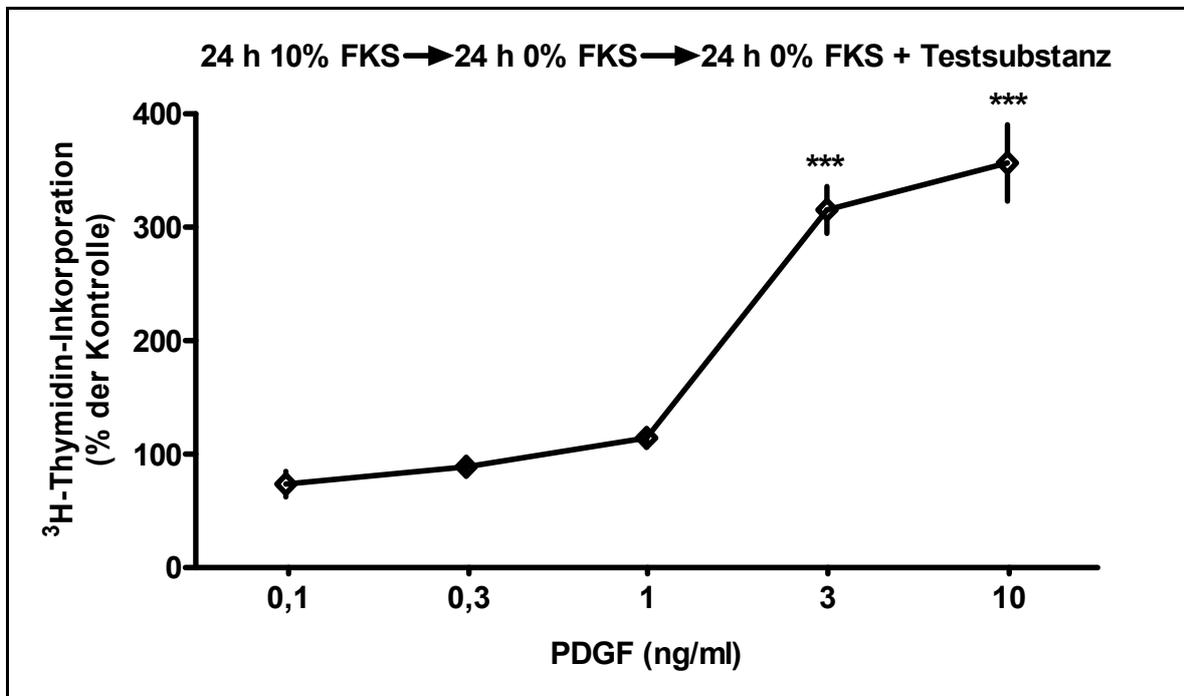


Abb. 17: Der Effekt des Wachstumsfaktors PDGF auf die ³H-Thymidin-Inkorporation in Fibroblasten aus der Trachea der Ratte. Angegeben sind die Mittelwerte±SEM (n=3-23). Signifikanzniveau: *** P<0,001 gegen die Kontrolle ohne Zugabe von PDGF.

Im darauf folgenden Experiment wurden dem Kulturmedium 10 ng/ml PDGF und steigende Konzentrationen der Testsubstanz Carbachol beigefügt (Abb. 18). Carbachol wurde im Konzentrationsbereich von 0,01 µM bis zu 1 µM eingesetzt (n=5-6). Auch hier wurden die ermittelten Werte der ³H-Thymidin-Inkorporation wieder mit den Werten der

Fibroblasten, die lediglich unter dem Einfluss von 10 ng/ml PDGF standen (n=23), verglichen. Eine konzentrationsabhängige Steigerung der Proliferation konnte in diesem Konzentrationsbereich von Carbachol festgestellt werden. Sie betrug bei 0,01 μM $35\% \pm 14\%$, bei 0,1 μM $43\% \pm 26\%$ und bei 1 μM $73\% \pm 38\%$. Bei einer Konzentration von 1 μM waren die ermittelten Werte signifikant ($P < 0,01$). Der proliferative Effekt auf die Fibroblasten der Ratte war Atropin-sensitiv, d. h. er blieb in Anwesenheit des muscarinischen Antagonisten Atropin aus. Atropin allein zeigte keine Wirkung.

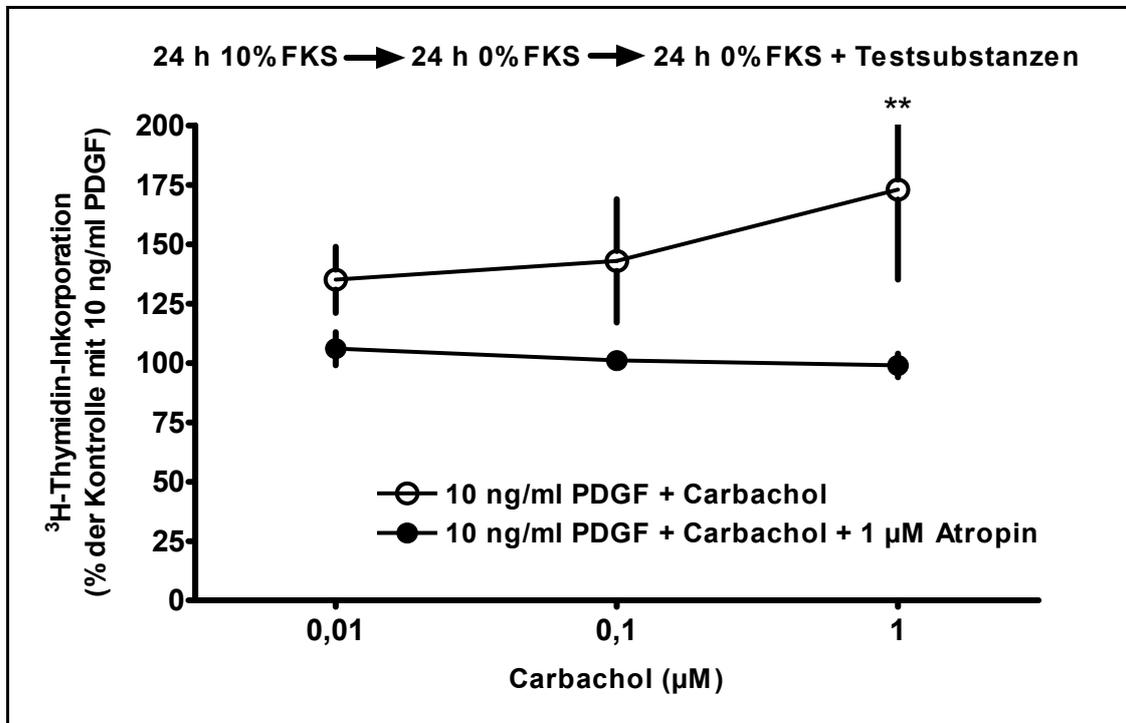


Abb. 18: Der Effekt des muscarinischen Agonisten Carbachol auf die ^3H -Thymidin-Inkorporation in Fibroblasten aus der Trachea der Ratte in Anwesenheit des Wachstumsfaktors PDGF. Die Fibroblasten (je 200.000 in 12-Loch-Platten) wurden nach der Aussaat für 24 h mit 10% FKS kultiviert. Nach weiteren 24 h der Zellkultur mit FKS-freiem Kulturmedium wurden für ebenfalls 24 h ^3H -Thymidin, 10 ng/ml PDGF und die Testsubstanz Carbachol allein (\circ) oder in Anwesenheit (\bullet) von 1 μM des muscarinischen Antagonisten Atropin zugegeben. Atropin allein hatte keinen Effekt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM (n=5-6). Signifikanzniveau: ** $P < 0,01$ gegen die Kontrolle mit 10 ng/ml PDGF.

3.2 Untersuchungsergebnisse an den humanen Fibroblasten-Zelllinien

3.2.1 mRNA-Expression muscarinischer Rezeptoren in den humanen Fibroblasten-Zelllinien MRC-5, IMR-90 und HEL-299

Auch die mRNA-Expression der muscarinischen Rezeptoren M_1 bis M_5 in den humanen Fibroblasten-Zelllinien wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion untersucht.

Aus jeder der drei Zelllinien wurden drei verschiedene Zellpassagen ($n=3$) hinsichtlich ihrer Expression untersucht. Für die Zelllinie MRC-5 wurden die Passagen 1, 8 und 12 genutzt, für die Linie IMR-90 die Passagen 1, 7 und 13 und für die HEL-299-Zellen 2, 2 und 6. Bei den HEL-299-Fibroblasten wurden die Passagen insgesamt am niedrigsten gehalten, weil bei dieser Zelllinie die Seneszenz bereits nach 18 Verdopplungszeiten erreicht wird. Als Positivkontrolle für die Untersuchung der muscarinischen Rezeptoren diente genomische DNA, die wie in Abschnitt 2.2.6 beschrieben aus MRC-5-Zellen isoliert wurde.

3.2.1.1 Muscarinische Rezeptoren in der Zelllinie MRC-5

Wie die Abbildungen 19 und 20 zeigen, exprimieren die Fibroblasten MRC-5 mRNA für verschiedene muscarinische Rezeptoren. Die stärkste mRNA-Expression wurde für M_2 nachgewiesen, gefolgt von Transkripten des M_3 -Rezeptors. Auch das PCR-Produkt für M_4 war als Bande erkennbar, allerdings mit niedrigerer Dichte als bei dem Produkt von M_3 . Für M_5 kodierende mRNA war lediglich in Spuren nachzuweisen. Spezifische Produkte für M_1 waren nicht erkennbar. Die mRNA-Expression für muscarinische Rezeptoren scheint unter Kulturbedingungen stabil zu bleiben, da ein ähnliches Expressionsmuster in den verschiedenen Passagen 1 bis 13 gefunden wurde.

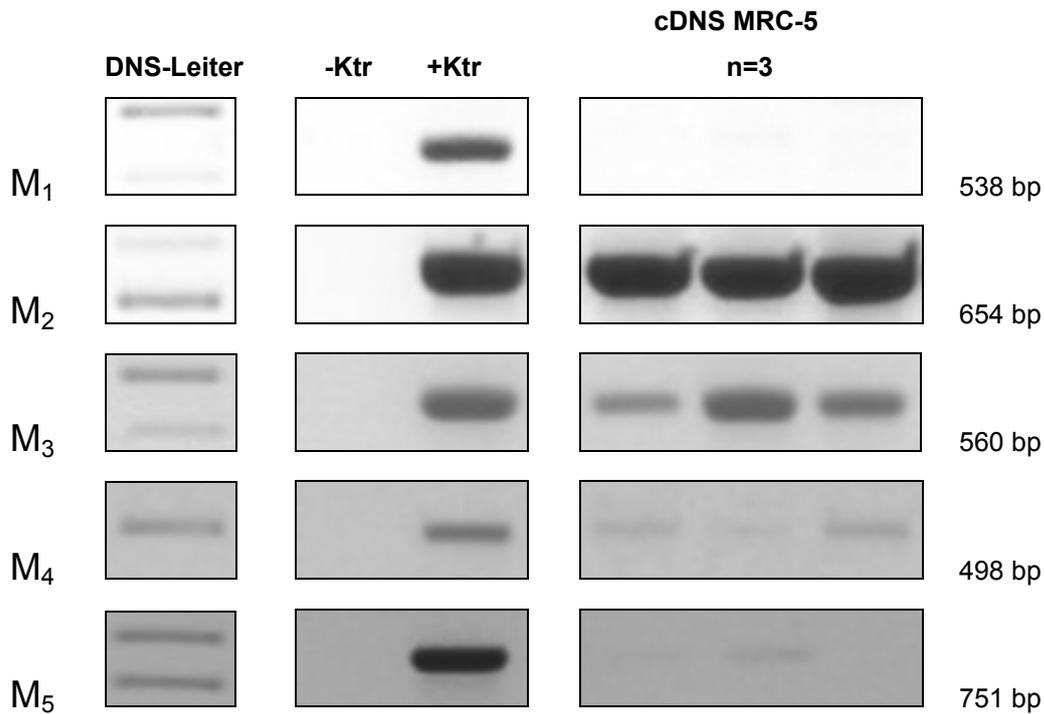


Abb. 19: Die mRNS-Expression muscarinischer Rezeptoren in den humanen Fibroblasten der Zelllinie MRC-5. Die Fibroblasten wurden kultiviert, bis sie konfluent waren. Nach der Zellyse wurde ihre mRNS extrahiert, mit DNase behandelt und dann für eine RT-PCR mit spezifischen Oligonucleotiden für die humanen muscarinischen Rezeptoren M₁ bis M₅ oder für β -Actin genutzt. Als Positivkontrolle (+Ktr) diente genomische DNS (gDNS), die aus MRC-5-Fibroblasten gewonnen wurde. Um eine Kontamination der Proben auszuschließen, wurde zudem eine PCR ohne Probe durchgeführt (Negativkontrolle, -Ktr). Die Produkte der PCR wurden auf 1,2%igem Agarose-Gel aufgetrennt. Invers-Darstellung der PCR-Bilder

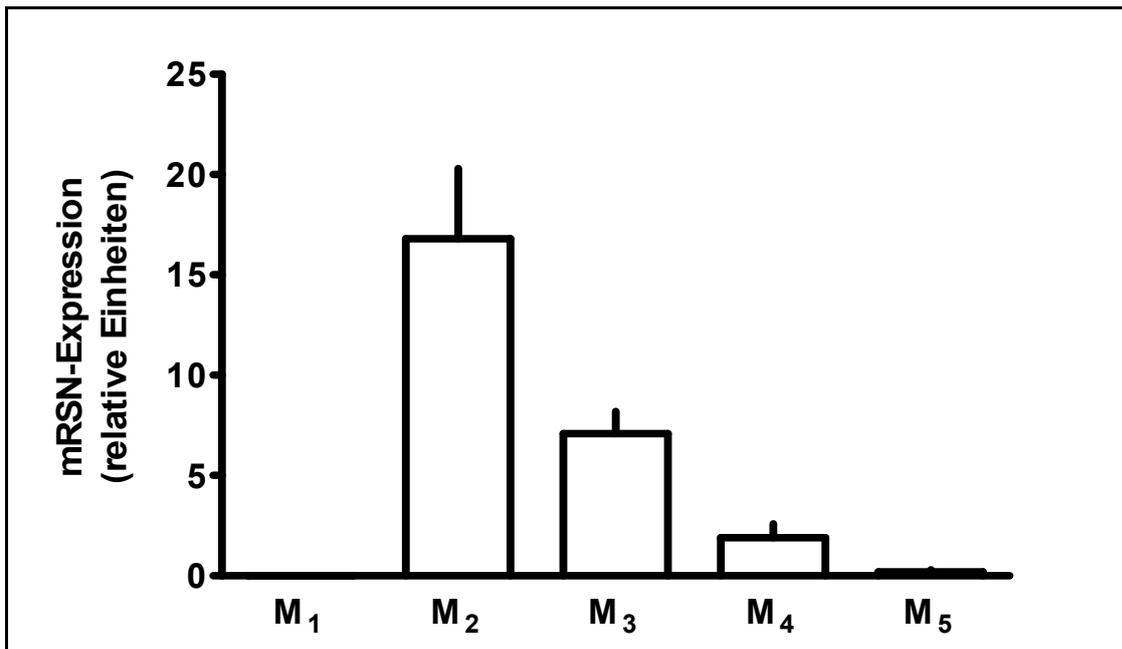


Abb. 20: Densitometrische Auswertung der mRNS-Expression muscarinischer Rezeptoren in den humanen Fibroblasten der Zelllinie MRC-5. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM ($n=3$, entsprechend der Zellpassagen 1-12). Die Werte wurden sowohl über β -Actin normalisiert, um die eventuell schwankende Qualität der cDNS-Synthese auszugleichen, als auch über das jeweilige PCR-Produkt der genomischen DNS normalisiert, um die eventuell variable Effektivität der Oligonucleotidpaare zu berücksichtigen.

3.2.1.2 Muscarinische Rezeptoren in der Zelllinie IMR-90

Auch die Zelllinie IMR-90 (Abb. 21 und 22) zeigte am stärksten für M₂ kodierende mRNS. Spezifische Produkte für M₄ waren zwar nachweisbar, aber die Bandendichte war bei den einzelnen Passagen 1 bis 13 mit 0,6 bis zu 8,7 relativen Einheiten sehr inkonstant. M₅-Transkripte ließen sich lediglich in Passage 7 nachweisen, deren Bande war zudem weniger dicht als diejenigen der M₄-Produkte. mRNS für den M₃-Rezeptor war im Gegensatz zu den MRC-5-Zellen nur in Spuren nachzuweisen, M₁-Transkripte waren nicht vorhanden.

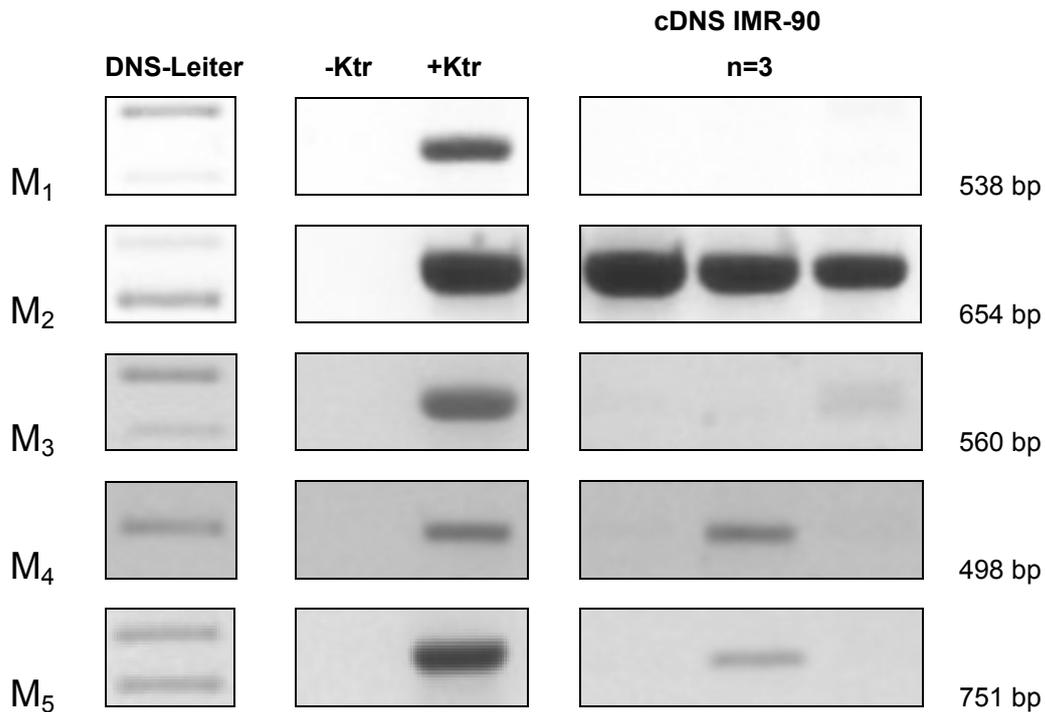


Abb. 21: Die mRNS-Expression muscarinischer Rezeptoren in den humanen Fibroblasten der Zelllinie IMR-90. Die Fibroblasten wurden kultiviert, bis sie konfluent waren. Nach der Zellyse wurde ihre mRNA extrahiert, mit DNase behandelt und dann für eine RT-PCR mit spezifischen Oligonucleotiden für die humanen muscarinischen Rezeptoren M₁ bis M₅ oder für β -Actin genutzt. Als Positivkontrolle (+Ktr) diente genomische DNS (gDNS), die aus MRC-5-Fibroblasten gewonnen wurde. Um eine Kontamination der Proben auszuschließen, wurde zudem eine PCR ohne Probe durchgeführt (Negativkontrolle, -Ktr). Die Produkte der PCR wurden auf 1,2%igem Agarose-Gel aufgetrennt. Invers-Darstellung der PCR-Bilder.

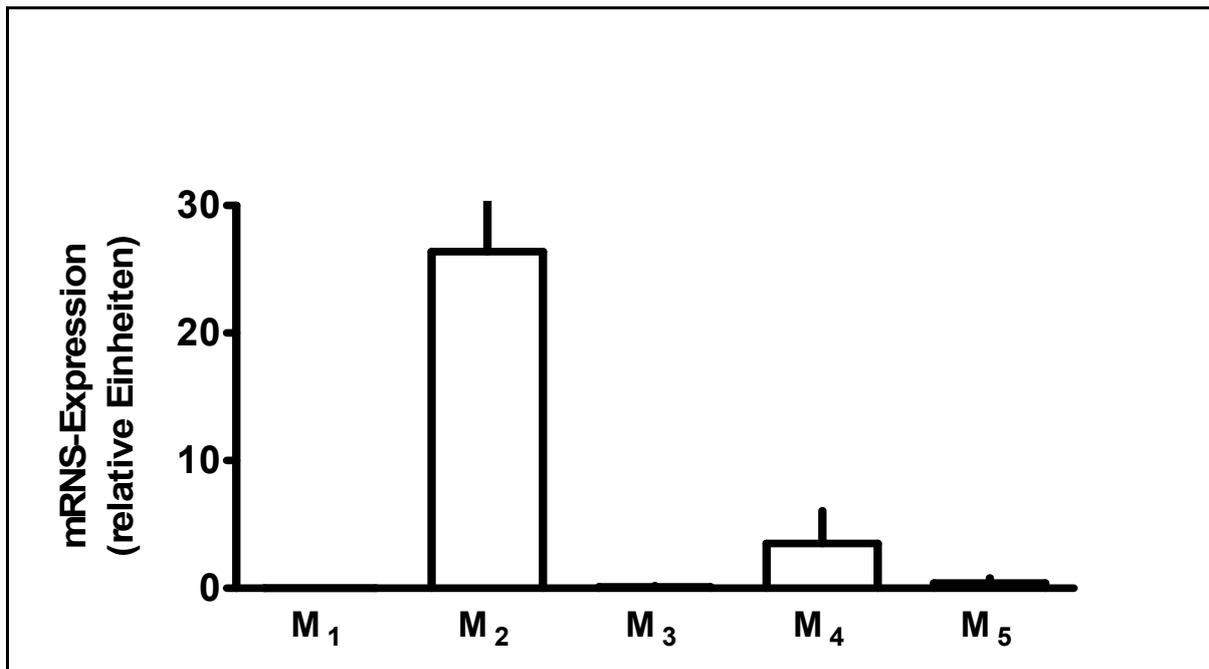


Abb. 22: Densitometrische Auswertung der mRNS-Expression muscarinischer Rezeptoren in den humanen Fibroblasten der Zelllinie IMR-90. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM (n=3, entsprechend der Zellpassagen 1-13). Die Werte wurden sowohl über β -Actin normalisiert, um die eventuell schwankende Qualität der cDNS-Synthese auszugleichen, als auch über das jeweilige PCR-Produkt der genomischen DNS normalisiert, um die eventuell variable Effektivität der Oligonucleotidpaare zu berücksichtigen.

3.2.1.3 Muscarinische Rezeptoren in der Zelllinie HEL-299

Die HEL-299-Fibroblasten (Abb. 23 und 24) zeigten die stärkste mRNS-Expression ebenfalls für M₂-Rezeptoren. PCR-Produkte für M₄ waren deutlich vorhanden, wohingegen sich Transkripte für M₃ und M₅ zwar nachweisen ließen, in ihrer Bandendichte aber gegenüber den M₄-Produkten deutlich abgestuft waren. Auch die HEL-299-Zellen exprimieren keine für M₁ kodierende mRNS.

Falsch negative Ergebnisse können auch bei den Expressionsmustern der humanen Fibroblasten-Zelllinien ausgeschlossen werden, weil die Positivkontrollen für jedes Oligonucleotidpaar M₁ bis M₅ eindeutige Banden ergaben.

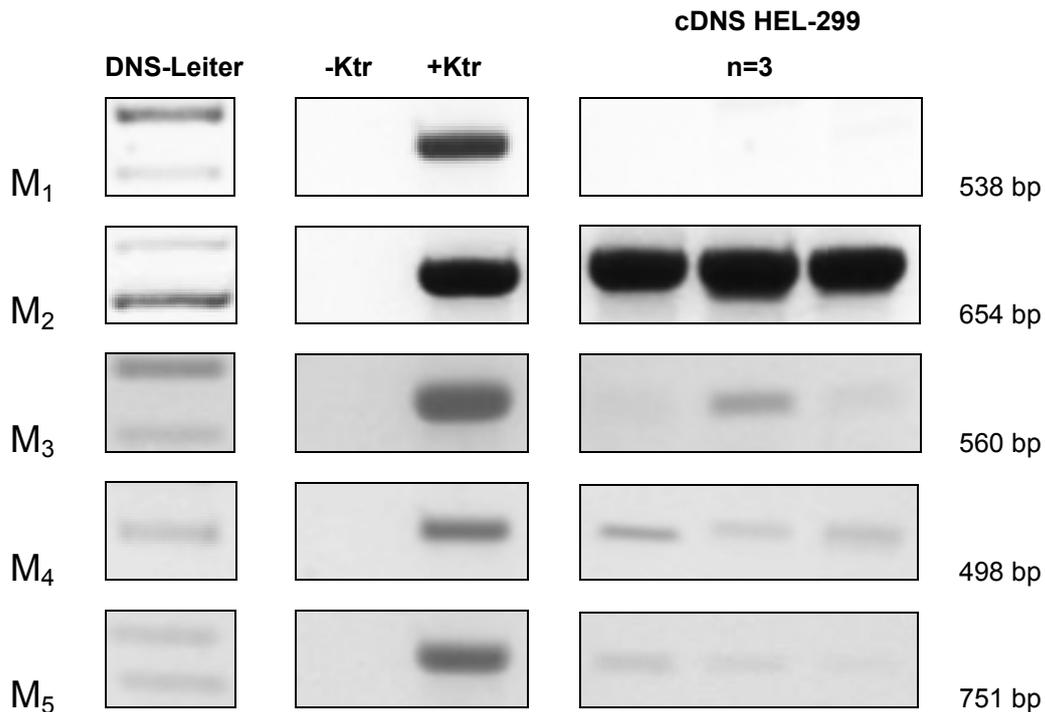


Abb. 23: Die mRNS-Expression muscarinischer Rezeptoren in den humanen Fibroblasten der Zelllinie HEL-299. Die Fibroblasten wurden kultiviert, bis sie konfluent waren. Nach der Zellyse wurde ihre mRNS extrahiert, mit DNase behandelt und dann für eine RT-PCR mit spezifischen Oligonucleotiden für die humanen muscarinischen Rezeptoren M₁ bis M₅ oder für β -Actin genutzt. Als Positivkontrolle (+Ktr) diente genomische DNS (gDNS), die aus MRC-5-Fibroblasten gewonnen wurde. Um eine Kontamination der Proben auszuschließen, wurde zudem eine PCR ohne Probe durchgeführt (Negativkontrolle, -Ktr). Die Produkte der PCR wurden auf 1,2%igem Agarose-Gel aufgetrennt. Invers-Darstellung der PCR-Bilder.

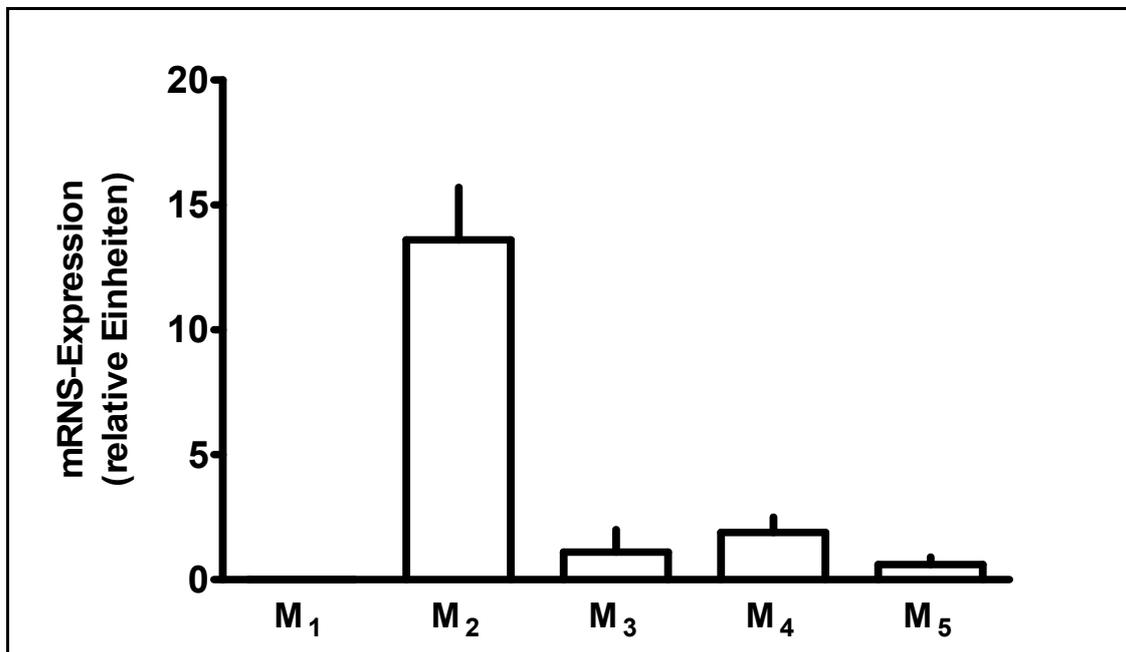


Abb. 24: Densitometrische Auswertung der mRNA-Expression muscarinischer Rezeptoren in den humanen Fibroblasten der Zelllinie HEL-299. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM ($n=3$, entsprechend der Zellpassagen 2-6). Die Werte wurden sowohl über β -Actin normalisiert, um die eventuell schwankende Qualität der cDNS-Synthese auszugleichen, als auch über das jeweilige PCR-Produkt der genomischen DNS normalisiert, um die eventuell variable Effektivität der Oligonucleotidpaare zu berücksichtigen.

3.2.2 Muscarinische Stimulation der Proliferation der humanen Fibroblasten-Zelllinie MRC-5

Die muscarinischen Effekte auf die Proliferation der humanen Fibroblasten wurden unter verschiedenen Versuchsbedingungen an der MRC-5-Zelllinie getestet. In einer ersten Reihe von Experimenten (Abb. 25) wurden die Zellen nach der Aussaat 24 h in Anwesenheit von 10% FKS kultiviert, gefolgt von einer FKS-freien Kulturphase von 24 h. In der folgenden ebenfalls 24 h dauernden Versuchsphase wurde dem weiterhin FKS-freien Kulturmedium 1 $\mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Thymidin zugegeben. Außerdem fand dieser Teil des Experiments in Anwesenheit von steigenden Konzentrationen des muscarinischen Agonisten Carbachol statt. Unter Kontrollbedingungen, d. h. in Abwesenheit der Testsubstanz, betrug die ^3H -Thymidin-Inkorporation 7.281 ± 548 d.p.m ($n=52$). Carbachol bewirkte einen konzentrationsabhängigen Anstieg der ^3H -Thymidin-Inkorporation um $38\% \pm 18\%$ bei 10 μM . Dieser proliferative Effekt war signifikant. In Anwesenheit des muscarinischen Antagonisten Atropin in einer Konzentration von 1 μM blieb dieser stimulierende Effekt aus, wobei Atropin allein keinen Effekt auf die Proliferation hatte. Die Höhe des proliferativen Effektes von Carbachol war sehr variabel, deshalb wurde die Dauer der Einwirkzeit der Testsubstanz verändert, um festzustellen, ob dies einen Einfluss auf die stimulierende Wirkung hat.

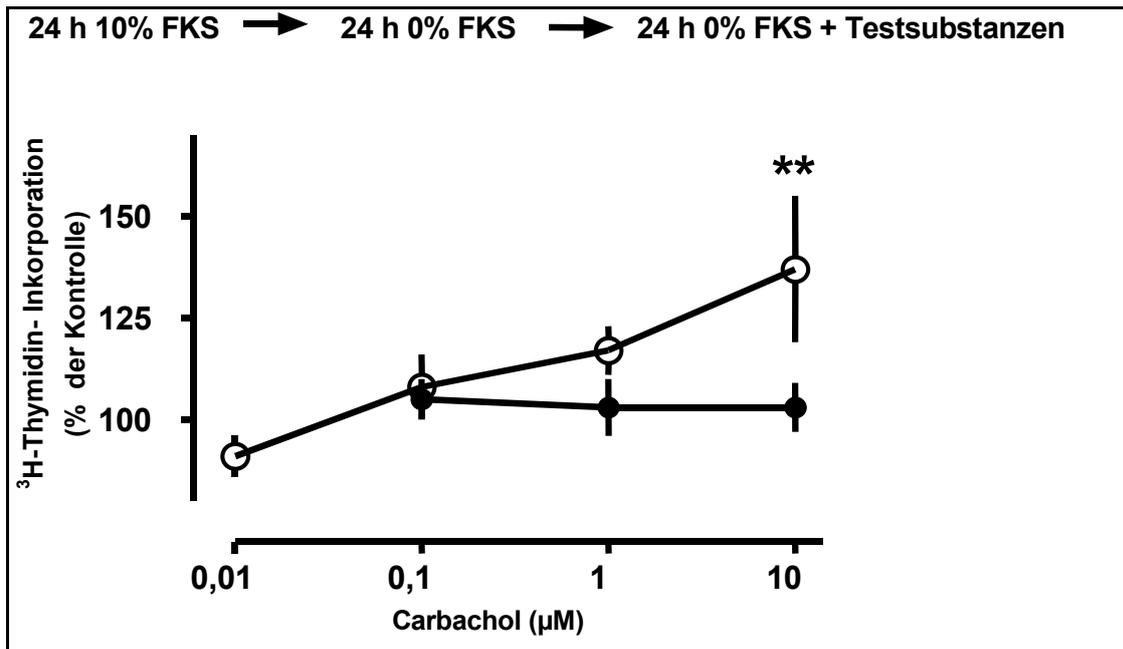


Abb. 25: Die Effekte muscarinischer Agonisten und Antagonisten auf die ³H-Thymidin-Inkorporation in humanen Fibroblasten der Zelllinie MRC-5. 75.000 Zellen wurden in 12-Loch-Platten zunächst für 24 h mit 10% FKS kultiviert. Darauf folgte eine 48-stündige Kulturphase mit FKS-freiem Medium. Zu Beginn der zweiten Hälfte dieser Versuchsphase wurde für 24 h ³H-Thymidin und der muscarinische Agonist Carbachol in steigenden Konzentrationen allein (○) oder in Anwesenheit (●) von 1 µM des muscarinischen Antagonisten Atropin zugegeben. Atropin allein hatte keinen Effekt. Angegeben sind die Mittelwerte±SEM (n=3-12, meist ≥6). Signifikanzniveau: ** P<0,01 gegenüber der Kontrolle ohne Zugabe der Testsubstanzen.

In der zweiten Versuchsreihe (Abb. 26) wurden die humanen Fibroblasten ebenfalls für 24 h in Anwesenheit von 10% FKS kultiviert. Während der folgenden 48 h wirkte die Testsubstanz dann unter FKS-freien Bedingungen ein. Nach 24 h wurde allerdings noch einmal ein Mediumwechsel durchgeführt, um sicherzustellen, dass die Testsubstanzen noch in einer aktiven Form vorliegen. Zu diesem Zeitpunkt wurde auch ³H-Thymidin zugegeben. Hierbei bewirkte 10 µM Carbachol eine Steigerung der ³H-Thymidin-Inkorporation um 52%±10% (P<0,01). Dieser stimulierende Effekt konnte sowohl durch 1 µM Atropin als auch durch 0,1 µM des muscarinischen Antagonisten Tiotropium verhindert werden. Tiotropium oder Atropin allein hatten keinen Effekt auf die Proliferation der Fibroblasten. Ein ähnlich hoher proliferativer Effekt wie der durch Carbachol konnte auch durch Oxotremorin erreicht werden. Dieser führte bei einer

Konzentration von 10 μM zu einem Anstieg der ^3H -Thymidin-Inkorporation um 61%, ein ebenfalls durch Atropin antagonisierbarer Effekt. In einigen Experimenten wurde in den letzten 48 h anstelle der Testsubstanzen 1% bzw. 10% FCS zugegeben, dieses steigerte die ^3H -Thymidin-Inkorporation im Vergleich zu den Versuchen unter FKS-freien Bedingungen um $69\%\pm 17\%$ ($n=6$) bzw. $216\pm 30\%$ ($n=9$). Selbst in Anwesenheit von 1% FCS f"uhrt 10 μM Oxotremorin zu einer Proliferationssteigerung um $42\%\pm 15\%$ ($n=5$, $P<0,05$).

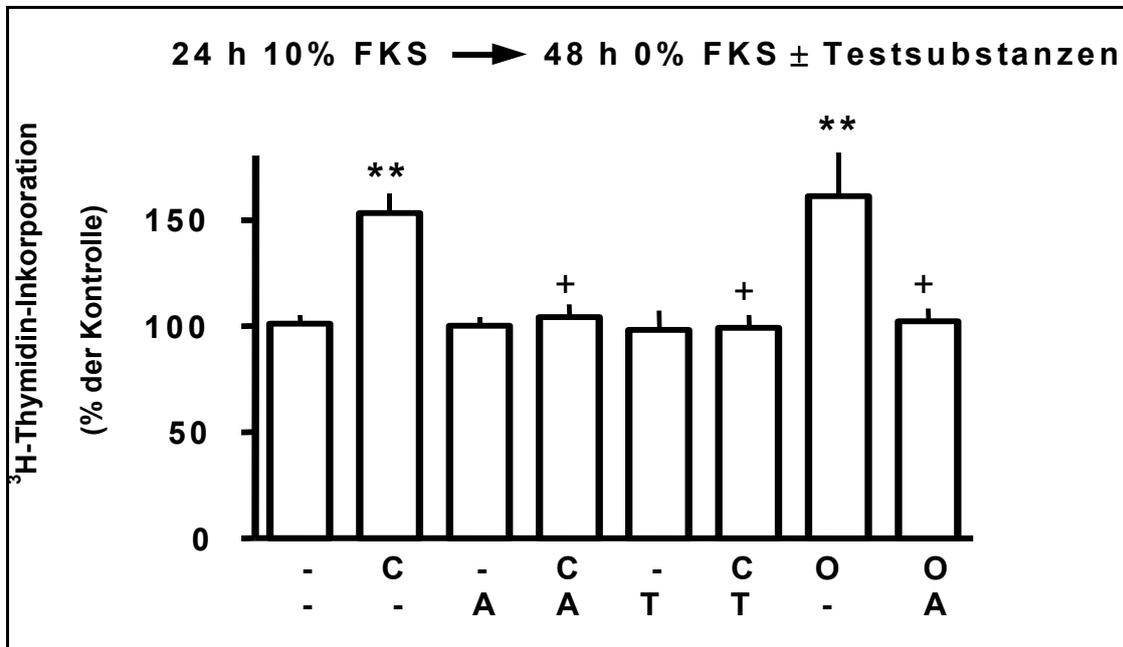


Abb. 26: Die Effekte muscarinischer Agonisten und Antagonisten auf die ^3H -Thymidin-Inkorporation in humanen Fibroblasten der Zelllinie MRC-5. 75.000 Zellen wurden in 12-Loch-Platten zun"achst f"ur 24 h mit 10% FKS kultiviert. In der folgenden Versuchsphase wurden dem FKS-freien Kulturmedium f"ur 48 h die muscarinischen Agonisten und Antagonisten zugef"ugt. Nach 24 h wurden die Testsubstanzen noch einmal erneuert, um sicherzustellen, dass sie noch in ihrer aktiven Form vorliegen. Zu diesem Zeitpunkt wurde auch ^3H -Thymidin zugegeben.

Konzentrationen der angegebenen Substanzen: Carbachol (C) 10 μM , Oxotremorin (O) 10 μM , Atropin (A) 1 μM , Tiotropium (T) 0,1 μM . Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM ($n=3-12$, meist ≥ 6). Signifikanzniveau:

** $P<0,01$ gegen die Kontrolle; + $P<0,05$ gegen den jeweiligen Wert in Abwesenheit des Antagonisten.

In der dritten Reihe von Experimenten (Abb. 27) wurden unmittelbar nach der Aussaat die Testsubstanzen zusammen mit dem FKS-freien Kulturmedium für 48 h zugegeben. Nach 24 h wurden Medium und Substanzen erneuert, außerdem wurde ^3H -Thymidin zugesetzt. Unter diesen Versuchsbedingungen war ein signifikanter proliferativer Effekt von $64\%\pm 8\%$ durch $10\ \mu\text{M}$ Carbachol und von $100\%\pm 26\%$ durch $10\ \mu\text{M}$ Oxotremorin nachzuweisen. Auch diese Proliferationssteigerung war Atropin-sensitiv.

Auch bei der Untersuchung der proliferativen Effekte muscarinischer Agonisten auf die MRC-5-Fibroblasten wurde eine gleichmäßige Aussaat der Zellen auf die Löcher der 12-Loch-Platten durch eine Proteinbestimmung bestätigt.

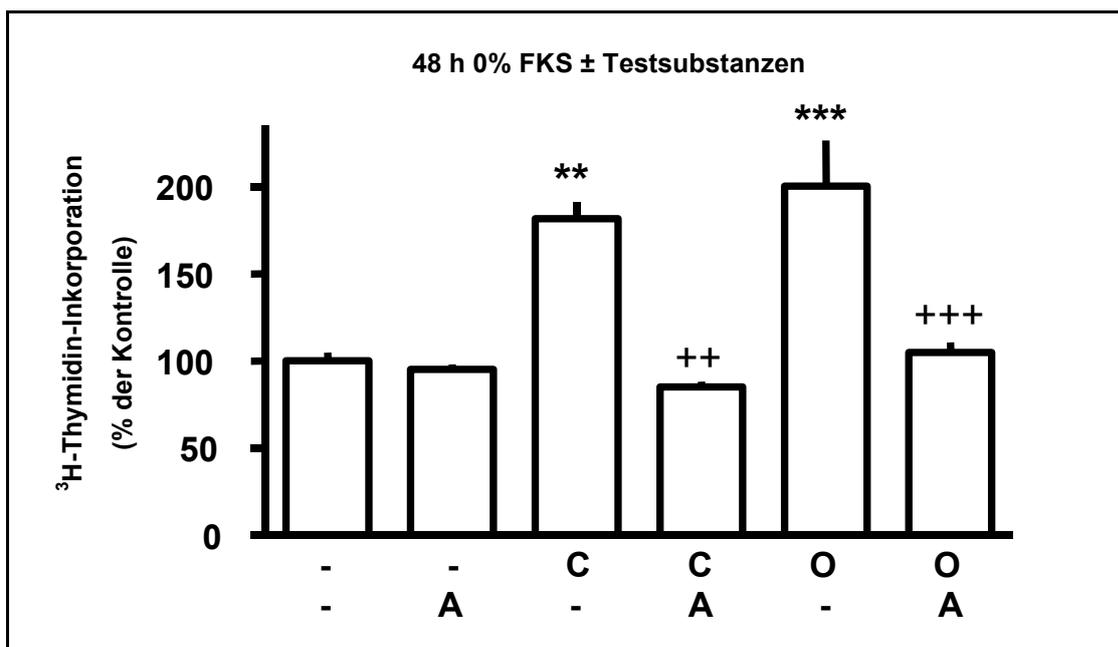


Abb. 27: Die Effekte muscarinischer Agonisten und Antagonisten auf die ^3H -Thymidin-Inkorporation in humanen Fibroblasten der Zelllinie MRC-5. 75.000 Zellen wurden in 12-Loch-Platten für 48 h in FKS-freiem Kulturmedium kultiviert. Nach 24 h wurden das Kulturmedium und die Testsubstanzen erneuert, außerdem wurde ^3H -Thymidin zugegeben. Konzentrationen der angegebenen Testsubstanzen: Carbachol (C) $10\ \mu\text{M}$, Oxotremorin (O) $10\ \mu\text{M}$, Atropin (A) $1\ \mu\text{M}$. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM (n=3-12, meist ≥ 6). Signifikanzniveau: ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ gegen die Kontrolle; ++ $P < 0,001$; +++ $P < 0,001$ gegen den jeweiligen Wert in Abwesenheit des Antagonisten.

4 DISKUSSION

4.1 Muscarinische Rezeptoren in primären Fibroblasten aus der Trachea der Ratte und in den humanen Fibroblasten-Zelllinien MRC-5, IMR-90 und HEL-299

Beinahe alle Zelltypen im Bereich der Luftwege und der Lunge exprimieren muscarinische Rezeptoren, so ist dieses zum Beispiel für glatte Muskelzellen der Atemwege und der Gefäße, Endothelzellen, Epithelzellen, Drüsenzellen und inflammatorische Zellen beschrieben (Racké und Matthiesen, 2004). Eine systematische Untersuchung der Expression muscarinischer Rezeptoren in Lungenfibroblasten der Ratte und des Menschen und deren funktionelle Bedeutung ist bisher noch nicht durchgeführt worden.

Gegenstand dieses Projekts war deshalb die Charakterisierung der muscarinischen Rezeptoren durch halb-quantitative RT-PCR. Durch den Einsatz der RT-PCR kann aus den Fibroblasten isolierte mRNA in cDNA umgeschrieben und amplifiziert werden. Mit Hilfe der für die jeweiligen Sequenzen spezifischen Oligonucleotide kann gezielt nach den Genprodukten für die verschiedenen muscarinischen Rezeptoren gesucht werden. Kann für einen bestimmten muscarinischen Rezeptor mRNA bzw. cDNA nachgewiesen werden, so ist davon auszugehen, dass diese in den Fibroblasten auch in Proteine, d. h. in die entsprechenden Rezeptoren, übersetzt wird. Umgekehrt lässt sich durch fehlenden Nachweis der mRNA auch darauf schließen, dass der entsprechende Rezeptor nicht exprimiert wird.

Die Auswertung der PCR erfolgte densitometrisch. Alle hierbei erhaltenen Werte der Proben wurden über β -Actin normalisiert, um eine möglicherweise schwankende Qualität der RNA-Präparation und der cDNA-Synthese auszugleichen. Um die eventuell variable Effektivität der Oligonucleotidpaare zu berücksichtigen, wurden die jeweiligen Werte zudem auch über das PCR-Produkt einer genomischen DNA-Präparation, die als Positivkontrolle diente, normalisiert. Da für die Amplifikation der jeweiligen cDNA-Abschnitte aller muscarinischen Rezeptoren die gleiche Zyklenzahl genutzt wurde, kann

die Stärke der Amplifikationsprodukte als ein semiquantitatives Maß für das Expressionsniveau der einzelnen muscarinischen Rezeptoren angesehen werden.

Die Expression der muscarinischen Rezeptoren in primären Fibroblasten aus der Trachea der Ratte wurde sowohl bei unpassagierten Zellen (n=3) als auch bei Zellen der Passage 3 (n=3) geprüft. Auf diese Weise sollte auch eine mögliche Änderung der Expression unter Kulturbedingungen erfasst werden. mRNA für den M₂-Rezeptor fand sich in Spuren bei allen Proben der unpassagierten Fibroblasten und der Zellen der Passage 3. Die Expression von M₃ erwies sich als variabel: Die Proben der Kulturen der Passage 0 enthielten alle mRNA für M₃, wohingegen die Proben der Fibroblasten der Passage 3 lediglich in zwei von drei Fällen das spezifische PCR-Produkt zeigten. mRNA für den M₁-, M₄- oder M₅-Rezeptor konnte weder bei den unpassagierten Zellen noch bei den Fibroblasten der Passage 3 nachgewiesen werden. Somit ergibt sich ein ähnliches Expressionsmuster für beide Passagen der primären Ratten-Fibroblasten, womit davon ausgegangen werden kann, dass unter Kulturbedingungen keine Veränderung der Expression der muscarinischen Rezeptoren eintritt.

Die Expression von muscarinischen Rezeptoren in humanen Fibroblasten wurde in den drei Zelllinien MRC-5, IMR-90 und HEL-299 untersucht. Es wurden verschiedene Zellpassagen auf die für die jeweiligen Rezeptoren spezifische mRNA getestet, um auch Veränderungen der Expression in den unterschiedlichen Passagen aufzuspüren. Für die Zelllinie MRC-5 waren dies die Passagen 1, 8 und 12, für die Fibroblasten IMR-90 die Passagen 1, 7 und 13 und für HEL-299 2, 2 und 6. Für die Fibroblasten HEL-299 wurden die Passagen insgesamt am niedrigsten gehalten, da diese Zellen die Seneszenz bereits nach 18 Verdopplungszeiten erreichen.

Die Zelllinie MRC-5 exprimiert am stärksten mRNA für den M₂-Rezeptor, gefolgt von Transkripten für M₃. Auch PCR-Produkte für M₄ konnten nachgewiesen werden, jedoch schwächer ausgeprägt als für M₃. Für den M₅-Rezeptor kodierende mRNA war lediglich in Spuren zu finden und mRNA für M₁ konnte nicht nachgewiesen werden.

Die Fibroblasten der Zelllinie IMR-90 zeigten ebenfalls die stärkste mRNA-Expression für M₂. PCR-Produkte für M₄ waren zwar nachweisbar, allerdings im Ausprägungsgrad sehr variabel. mRNA für den M₅-Rezeptor war lediglich in Passage 7 vorhanden, Transkripte für M₃ konnten nur in Spuren gefunden werden. Der M₁-Rezeptor wurde nicht exprimiert.

Auch bei den HEL-299-Fibroblasten zeigte sich die stärkste mRNA-Expression für den M₂-Rezeptor, gefolgt von PCR-Produkten für M₄. Hierzu deutlich abgestuft war die Expression für M₃ und M₅, mRNA für den M₁-Rezeptor wurde nicht nachgewiesen.

Auch bei den humanen Fibroblasten-Zelllinien kann davon ausgegangen werden, dass sich das Expressionsmuster für die muscarinischen Rezeptoren unter Kulturbedingungen nicht wesentlich ändert.

Bei der Untersuchung der Expression muscarinischer Rezeptoren in den Fibroblasten der Ratte und der humanen Zelllinien mittels RT-PCR können falsch negative Befunde ausgeschlossen werden, weil die Positivkontrollen, die bei jeder RT-PCR mitgeführt wurden, für alle Oligonucleotidpaare eindeutig positive Ergebnisse lieferten.

Die Gene der muscarinischen Rezeptoren enthalten keine Introns, deshalb würde eine Kontamination der mRNA bei der RNA-Präparation mit genomischer DNA zu falsch positiven Ergebnissen der PCR führen. Um möglicherweise vorhandene genomische DNA zu entfernen, wurden die Proben bei der RNA-Präparation mit DNase behandelt. Die Wirksamkeit dieser Behandlung kann dadurch belegt werden, dass in jeder der oben beschriebenen PCR-Versuchsreihen bestimmte spezifische mRNA-Transkripte (so zum Beispiel für den M₁-Rezeptor der Ratte wie auch des Menschen) nicht nachgewiesen werden konnten. Dies spricht gegen die Möglichkeit falsch positiver Ergebnisse aufgrund eines methodischen Artefakts.

Es wäre von Interesse zu erfahren, ob die muscarinischen Rezeptoren, deren mRNA-Expression bereits belegt ist, auch auf Proteinebene nachzuweisen sind. In weiteren Experimenten, die nicht mehr Gegenstand dieses Projekts waren, wurde in einer Western Blot-Analyse sowohl in Fibroblasten der Ratte als auch in Fibroblasten der Zelllinie MRC-5 die Expression der muscarinischen Rezeptoren M₂ und M₃ auch auf Proteinebene nachgewiesen (Matthiesen *et al.*, 2006). Weitere Studien an den Zelllinien IMR-90 und HEL-299 wurden aufgrund der fehlenden Expression des M₃-Rezeptors nicht durchgeführt.

Neuere Versuche zeigten zudem, dass sich das Expressionsmuster der muscarinischen Rezeptoren in der humanen Zelllinie MRC-5 mit dem in primären humanen Fibroblasten aus den Luftwegen ähnelt. In beiden Fällen konnte die stärkste mRNA-Expression für M₂ gezeigt werden. Die Expression von M₃ war bei den MRC-5-Fibroblasten höher als

bei den primären Zellen, allerdings konnten bei letzteren Transkripte für M_1 nachgewiesen werden (Matthiesen *et al.*, 2006).

4.2 Stimulation der Proliferation der primären Fibroblasten der Ratte

4.2.1 Muscarinische Agonisten

Die funktionelle Bedeutung der muscarinischen Rezeptoren wurde mit Hilfe der Untersuchung des proliferativen Effektes durch muscarinische Agonisten auf die Fibroblasten der Ratte ergründet. Hierzu wurde die stimulierende Wirkung des muscarinischen Agonisten Carbachol zunächst unter FKS-freien Kulturbedingungen getestet, da fetales Kälberserum bereits eine Vielzahl von Faktoren enthält, die das Wachstum von Fibroblasten fördern. Eine Steigerung der Proliferation unter diesen Bedingungen konnte nicht belegt werden. Für die wachstumsfördernde Wirkung muscarinischer Agonisten auf die glatte Muskulatur der Atemwege scheint die Anwesenheit weiterer mitogener Faktoren erforderlich zu sein (Gosens *et al.*, 2003, Krymskaya *et al.*, 2000). In der Annahme, dass der proliferative Effekt muscarinischer Agonisten auf die Fibroblasten der Ratte möglicherweise ebenfalls das Vorhandensein weiterer mitogener Faktoren erfordert, wurden Carbachol und Oxotremorin in einer zweiten Versuchsreihe in Anwesenheit von einer submaximalen FKS-Konzentration von 1% getestet. Aber auch hier blieb ein stimulierender Effekt auf das Zellwachstum aus. In einem dritten Versuchsprotokoll, in dem mit Zugabe der Testsubstanzen dem zunächst FKS-freien Kulturmedium nach 24 h 1% FKS beigefügt wurde, konnte eine Tendenz zur Steigerung der Proliferation durch Carbachol um bis zu 14% festgestellt werden, die allerdings konzentrationsunabhängig und nicht signifikant erfolgte. Oxotremorin führte zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung des Zellwachstums, die bei einer Konzentration von 1 μ M mit $18\% \pm 12\%$ signifikant war. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass gerade auch vor dem Hintergrund der geringen und variablen Expression muscarinischer Rezeptoren in den Fibroblasten der Ratte für eine Stimulation der Proliferation möglicherweise die Anwesenheit weiterer mitogener Faktoren, wie sie in fetalem Kälberserum vorhanden sind, erforderlich ist.

Um die proliferative Wirkung muscarinischer Agonisten in Anwesenheit weiterer mitogener Faktoren näher zu untersuchen, wurden Experimente durchgeführt, bei denen die Testsubstanzen gemeinsam mit PDGF oder IGF-1 zugegeben wurden.

4.2.2 Muscarinische Agonisten in Anwesenheit der Wachstumsfaktoren IGF-1 und PDGF

In den glatten Muskelzellen der Luftwege zeigten muscarinische Agonisten allein keine Wirkung auf die Proliferation, aber sie verstärkten die mitogene Reaktion der Zellen auf andere Wachstumsstimuli wie PDGF oder EGF (Gosens et al., 2003, Krymskaya et al., 2000). Deshalb wurde die proliferative Wirkung muscarinischer Agonisten auf die Fibroblasten der Ratte in Anwesenheit der Wachstumsfaktoren IGF-1 und PDGF untersucht. Sowohl IGF-1 wie auch PDGF allein bewirkten wie erwartet eine konzentrationsabhängige und signifikante Steigerung des Zellwachstums. Dieses belegt die proliferative Potenz der Fibroblasten unter den gegebenen Bedingungen. Carbachol führte in Anwesenheit von IGF-1 ($p > 0,05$) und in Anwesenheit von PDGF ($p < 0,01$ bei einer Carbachol-Konzentration von $1 \mu\text{M}$) zu einer Steigerung der Proliferation der Fibroblasten. Diese Beobachtungen unterstützen die Vermutung, dass die stimulierende Wirkung muscarinischer Agonisten auf die Proliferation der Fibroblasten der Ratte die Anwesenheit weiterer mitogener Faktoren wie Wachstumsfaktoren erfordert. Der proliferative Effekt in Anwesenheit von IGF-1 bzw. von PDGF war Atropin-sensitiv, d. h. die Zugabe des muscarinischen Antagonisten Atropin verhinderte eine Steigerung des Zellwachstums. Dieses bestätigt, dass es sich bei der stimulierenden Wirkung von Carbachol auf die Proliferation der Fibroblasten um einen spezifischen Effekt handelt, der auf die Aktivierung muscarinischer Rezeptoren zurückzuführen ist. Da Atropin allein keinen Effekt hatte, kann eine Proliferationssteigerung durch nicht-neuronales Acetylcholin, welches von Fibroblasten freigesetzt wird, ausgeschlossen werden (Wessler et al., 1998).

4.3 Muscarinische Stimulation der Proliferation der humanen Fibroblasten

Die Experimente, in denen der Einfluss muscarinischer Rezeptoren auf die Proliferation der humanen Fibroblasten untersucht werden sollte, wurden mit Fibroblasten der Zelllinie MRC-5 durchgeführt. Unter der Annahme, dass das Zellwachstum auch durch

die Stimulation des M₃-Rezeptors gefördert wird, wurden IMR-90- und HEL-299-Zellen bei diesen Experimenten nicht eingesetzt, da sie eine fehlende bzw. sehr schwache Expression dieses Rezeptors aufweisen. Neben der schwachen Expression von M₃-Rezeptoren ist für die HEL-299-Zellen zudem beschrieben, dass ihre M₂-Rezeptoren durch Aktivierung der Proteinkinase C runterreguliert werden können (Rousell *et al.*, 1995).

Der Einfluss muscarinischer Stimulation auf das Wachstum humaner Lungenfibroblasten der Zelllinie MRC-5 wurde analog den ersten Experimenten an den primären Fibroblasten der Ratte unter FKS-freien Versuchsbedingungen geprüft. Auf diese Weise konnte ein stimulierender Effekt durch mitogene Faktoren, die in fetalem Kälberserum enthalten sind, ausgeschlossen werden. Unter diesen Bedingungen bewirkten die muscarinischen Agonisten Carbachol und Oxotremorin beide einen Anstieg der ³H-Thymidin-Inkorporation. Der muscarinische Antagonist Atropin und der langwirkende Antagonist Tiotropium verhinderten diesen proliferativen Effekt in einer Konzentration, die 10- bzw. 100-fach niedriger war als diejenige der Agonisten. Dieses belegt einen spezifischen, durch muscarinische Rezeptoren vermittelten Effekt auf das Wachstum der Fibroblasten. Da beide Antagonisten allein zu keiner Veränderung der ³H-Thymidin-Inkorporation führten, kann eine signifikante proliferative Wirkung durch nicht-neuronales Acetylcholin ausgeschlossen werden.

Die Stimulation der Proliferation der MRC-5-Fibroblasten durch Carbachol konnte verstärkt werden, wenn die Testsubstanz bereits mit dem Wechsel zu FKS-freien Versuchsbedingungen über 48 h auf die Zellen einwirkte und nicht wie in der ersten Reihe von Experimenten lediglich über die letzten 24 h der Inkubationsperiode. Dieses lässt vermuten, dass sich der mitogene Effekt durch muscarinische Mechanismen erst langsam entwickelt, aber dann lange andauert.

Weitere mitogene Faktoren scheinen keinen verstärkenden Einfluss auf das Zellwachstum von humanen Lungenfibroblasten zu haben. So konnte der stimulierende Effekt durch Oxotremorin in Anwesenheit einer submaximalen FKS-Konzentration von 1% nicht gesteigert werden. Demgegenüber stehen neuere experimentelle Ergebnisse, die bei einer Inkubation der humanen MRC-5-Fibroblasten mit Carbachol oder Oxotremorin in An- oder Abwesenheit von 1% FKS über einen Zeitraum von 30 h

zeigten, dass die proliferative Wirkung, die durch die Aktivierung muscarinischer Rezeptoren vermittelt wird, durch andere mitogene Faktoren unterstützt werden kann.

Die vorhandenen Beobachtungen lassen die Frage aufkommen, welche Subtypen der muscarinischen Rezeptoren die proliferative Wirkung auf die Lungenfibroblasten vermitteln. In weiteren Studien, die nicht mehr Gegenstand dieser Arbeit waren, sollten diese Subtypen näher charakterisiert werden. Hierzu wurde der inhibitorische Effekt auf die Proliferation durch verschiedene muscarinische Antagonisten, die für bestimmte Rezeptoren präferentiell sind, untersucht. Eingesetzt wurden Antagonisten, die für die Rezeptoren M_1/M_4 , M_2/M_4 oder M_3/M_1 prävalent sind. Die Ergebnisse dieser Bindungsstudien an den MRC-5-Fibroblasten wurden mit denjenigen an geklonten humanen muscarinischen Rezeptoren verglichen. Die daraus gewonnenen Resultate legten die Vermutung nahe, dass M_2 -Rezeptoren wesentlichen Anteil an der Vermittlung des proliferativen Stimulus haben. Diese Beobachtung wird unterstützt durch die Tatsache, dass die mRNA-Expression für den M_2 -Rezeptor von allen Subtypen in MRC-5-Fibroblasten die stärkste ist.

Für eine mögliche Beteiligung von M_2 - und M_3 -Rezeptoren könnte sprechen, dass beide Subtypen die Aktivierung der mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK = mitogen-activated protein kinase/ extracellular signal-regulated kinase 1/2- pathway) vermitteln (Budd et al., 2001, Cook et al., 2000). Die Familie der mitogen-aktivierten Proteinkinasen ist wesentlich am Ablauf zellulärer Programme wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose beteiligt (Wylie et al., 1999, Zhang und Liu, 2002). Die MAPK können über Wachstumsfaktoren an Tyrosinkinase-Rezeptoren, über Hormone, Neurotransmitter und Chemokine an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und über proinflammatorische Zytokine oder andere Stressfaktoren aktiviert werden (Hauge und Frödin, 2006). Eine proliferative Antwort auf die Aktivierung der MAPK ist für Zellen des Kolonkarzinoms und für glatte Muskelzellen in den Atemwegen beschrieben (Fang und Richardson, 2005, Zhou und Hershenson, 2003). Von dieser proliferativen Aktivität kann angenommen werden, dass sie in Remodelling-Prozessen, wie sie bei chronischen inflammatorischen Erkrankungen beschrieben werden, eine Rolle spielt. Neuere Untersuchungen, die nicht mehr Gegenstand dieser Arbeit waren, zeigten auch, dass die Stimulation muscarinischer Rezeptoren in humanen Lungenfibroblasten zu einer

Aktivierung von p-42/44-MAPK führt. Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass die muscarinische Stimulation der Proliferation humaner Lungenfibroblasten über den klassischen MEK-ERK MAPK- Signalweg vermittelt wird (Matthiesen *et al.*, 2007).

4.4 Klinische Bedeutung

Anticholinergika wie der muscarinische Antagonist Tiotropium sind Mittel der Wahl in der Therapie obstruktiver Atemwegserkrankungen. Neben der bronchodilatatorischen Wirkung scheinen sie inflammatorische Vorgänge und den Remodelling-Prozess in den Atemwegen zu hemmen und auf diese Weise den Krankheitsverlauf bei Asthma und COPD positiv zu beeinflussen (Gosens *et al.*, 2006). Zu diesem Effekt kommt es auch durch die kompetitive Hemmung des M₃-Rezeptors.

Tiotropium ist eine langwirkende antimuscarinische Substanz, deren Präferenz für M₁- und M₃-Rezeptoren auf die langsame Dissoziation von diesen Rezeptor-Subtypen zurückzuführen ist (Koumis *et al.*, 2005). Unter den gegebenen Versuchsbedingungen ist diese kinetische Selektivität vermutlich zu vernachlässigen, da alle Experimente mit Tiotropium *im Equilibrium* durchgeführt wurden. Es stellt sich zudem die Frage, inwieweit die Subtyp-Selektivität von Tiotropium auch *in vivo*, d. h. unter klinischen Bedingungen, Bedeutung hat (Gosens *et al.*, 2006). *In vitro* beträgt die Halbwertszeit der Bindung an den M₃-Rezeptor zwar 36 h, wohingegen diejenige an den M₂-Rezeptor lediglich bei 3,6 h liegt, dennoch bindet Tiotropium damit auch an präsynaptische autoinhibitorische M₂-Rezeptoren (Disse, 2001). Über eine Blockade dieser Rezeptoren würde es auf diese Weise auch zu einer verstärkten Freisetzung von Acetylcholin führen. Auf der anderen Seite schwächt die Blockade postsynaptischer M₃-Rezeptoren die Wirkung des freigesetzten Acetylcholins ab; dieses korreliert gut mit dem klinischen Nutzen, von dem Patienten, die mit Tiotropium behandelt wurden, profitierten (Barnes, 2001, Casaburi *et al.*, 2004, Vincken *et al.*, 2002).

Alle wesentlichen Experimente dieser Arbeit wurden mit humanen Fibroblasten der Zelllinie MRC-5 durchgeführt. Inwieweit die gewonnenen Erkenntnisse auf klinische Bedingungen, also auf die Situation *in vivo*, übertragbar sind, lässt sich nicht abschließend beurteilen. Neuere Studien, die nicht mehr Teil dieser Arbeit waren,

zeigten allerdings, dass der M_2 - und M_4 -prävalente Antagonist Pertussis-Toxin die proliferative Wirkung durch Carbachol auch auf primäre humane Lungenfibroblasten verhinderte. Die mRNA-Expression von M_2 -Rezeptoren war wie bei den MRC-5-Fibroblasten auch in den primären Zellen die vorherrschende. Dieses legt nahe, dass M_2 -Rezeptoren auch in primären Lungenfibroblasten den proliferativen Stimulus vermitteln.

Die Beobachtungen dieses Projekts zeigen, dass Fibroblasten aus der Trachea der Ratte wie auch der humanen Zelllinien muscarinische Rezeptoren exprimieren, deren Stimulation die Proliferation dieser Zellen fördern kann. Bei den Fibroblasten der Ratte ist vermutlich die Co-Stimulation durch weitere Mediatoren wie Wachstumsfaktoren notwendig, um einen proliferativen Effekt durch Aktivierung von muscarinischen Rezeptoren nachzuweisen. In den Remodelling-Vorgängen bei chronischen inflammatorischen und obstruktiven Atemwegserkrankungen scheint diese proliferative Wirkung eine wesentliche Rolle zu spielen. Möglicherweise ist auch der positive Einfluss, den das langwirkende Tiotropium auf den Krankheitsverlauf hat, durch Antagonisierung des cholinerg vermittelten Wachstumsstimulus zu erklären.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Chronische inflammatorische und obstruktive Atemwegserkrankungen wie Asthma und COPD gehen in ihrer Entwicklung und in ihrem Verlauf mit Umbau- und Remodelling-Prozessen einher. In der Therapie dieser Erkrankungen sind Anticholinergika wie der muscarinische Antagonist Tiotropium Mittel der Wahl und haben durch ihre bronchodilatatorische Wirkung und durch die Hemmung von inflammatorischen Prozessen und von Umbau-Vorgängen einen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf. Dieses lässt darauf schließen, dass cholinerge Mechanismen an den strukturellen Veränderungen beteiligt sind. Neben endogen freigesetztem Acetylcholin spielen auch weitere Mediatoren wie z. B. Wachstumsfaktoren eine wesentliche Rolle. Die strukturellen Veränderungen im Rahmen des Remodelling-Prozess betreffen Epithel, Blutgefäße, Drüsen, glattes Muskelgewebe und Bindegewebe gleichermaßen. So haben auch Fibroblasten einen erheblichen Anteil an diesen Umbau-Vorgängen. Die Wirkung cholinergischer Mechanismen auf das Verhalten der Fibroblasten wurde noch nicht genauer untersucht.

In diesem Projekt sollte daher zunächst eine gerichtete Charakterisierung der fünf muscarinischen Rezeptoren M₁ bis M₅ in primären Fibroblasten aus der Trachea der Ratte und in den humanen Fibroblasten-Zelllinien MRC-5, IMR-90 und HEL-299 durchgeführt werden. Bei der Untersuchung der mRNA-Expression dieser Rezeptoren mittels semi-quantitativer RT-PCR ergab sich folgendes Expressionsmuster: mRNA für M₂-Rezeptoren war sowohl bei den unpassagierten als auch bei Passage 3 der Fibroblasten der Ratte in Spuren vorhanden, die mRNA-Expression für M₃ war bei den verschiedenen Proben sehr variabel und mRNA für M₁, M₄ und M₅ konnte nicht nachgewiesen werden. Die humanen MRC-5-Fibroblasten exprimieren am stärksten für M₂ kodierende mRNA, gefolgt von mRNA für M₃ und M₄. M₅-mRNA war lediglich in Spuren und M₁-mRNA nicht vorhanden. Auch die Fibroblasten der Zelllinien IMR-90 und HEL-299 zeigten die stärkste mRNA-Expression für den M₂-Rezeptor, gefolgt von Transkripten für M₄. Sehr deutlich abgestuft hierzu war die mRNA-Expression für M₃ und M₅, Transkripte für M₁ konnten nicht nachgewiesen werden.

Die funktionelle Bedeutung dieser Rezeptoren wurde bestimmt, indem der Effekt der cholinergen Agonisten Carbachol und Oxotremorin auf die ³H-Thymidin-Inkorporation

und damit auf die Proliferation der Fibroblasten geprüft wurde. Ein proliferationssteigernder Effekt durch muscarinische Stimulation konnte bei den Fibroblasten der Ratte lediglich in Anwesenheit einer submaximalen Konzentration (1%) von fetalem Kälberserum ($14\% \pm 7\%$ durch Carbachol, $P > 0,5$; $18\% \pm 12\%$ durch $1 \mu\text{M}$ Oxotremorin, $P < 0,01$) oder in Anwesenheit der Wachstumsfaktoren PDGF ($73\% \pm 38\%$ durch $1 \mu\text{M}$ Carbachol, $P < 0,01$) oder IGF-1 ($21\% \pm 12\%$ durch $1 \mu\text{M}$ Carbachol, $P > 0,05$) festgestellt werden.

Eine proliferationsstimulierende Wirkung muscarinischer Agonisten auf die humanen MRC-5-Fibroblasten konnte auch ohne den Einfluss weiterer mitogener Faktoren festgestellt werden. Bei einer Inkubationszeit der Fibroblasten mit den Testsubstanzen unter FKS-freien Bedingungen über 24 h betrug sie $38\% \pm 18\%$ bei $10 \mu\text{M}$ Carbachol ($P < 0,01$). Bei einer Einwirkzeit der Testsubstanzen über 48 h unter FKS-freien Versuchsbedingungen lag die Steigerung des Zellwachstums durch $10 \mu\text{M}$ Carbachol bei $52\% \pm 10\%$ ($P < 0,01$) und durch $10 \mu\text{M}$ Oxotremorin bei 61% ($P < 0,01$). Diese stimulierenden Effekte konnten durch die muscarinischen Antagonisten Atropin und Tiotropium verhindert werden. Wurden die Testsubstanzen unmittelbar nach der Zellaussaat unter FKS-freien Versuchsbedingungen über 48 h zugefügt, konnte eine Stimulation der Proliferation um $64\% \pm 8\%$ durch $10 \mu\text{M}$ Carbachol ($P < 0,01$) und um $100\% \pm 26\%$ durch $10 \mu\text{M}$ Oxotremorin ($P < 0,001$) beobachtet werden. Auch diese Steigerung der Proliferation war Atropin-sensitiv.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass Lungenfibroblasten der Ratte wie auch der humanen Zelllinien muscarinische Rezeptoren exprimieren, deren Aktivierung zu einer Steigerung der Proliferation dieser Zellen führt. Bei den Fibroblasten der Ratte ist für eine Stimulation des Zellwachstums vermutlich die Anwesenheit weiterer mitogener Faktoren wie z. B. von Wachstumsfaktoren notwendig. Dieser proliferative Effekt scheint Anteil an den strukturellen Veränderungen zu haben, die bei chronischen inflammatorischen und obstruktiven Atemwegserkrankungen eine Rolle spielen. Der positive Einfluss, den Anticholinergika wie Tiotropium auf den Verlauf dieser Erkrankungen haben, könnte durch eine langfristige Blockade der muscarinischen Rezeptoren erklärt werden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Barnes PJ. Muscarinic receptor subtypes in airways. *Life Sci* 1993; 52: 521-527
- Barnes PJ. Tiotropium bromide. *Expert Opin Investig Drugs* 2001; 10: 733-740
- Beckett PA, Howarth PH. Pharmacotherapy and airway remodelling in asthma? *Thorax* 2003; 58: 163-174
- Budd DC, Willars GB, McDonald JE, Tobin AB. Phosphorylation of the Gq/11-coupled m3-muscarinic receptor is involved in receptor activation of the ERK-1/2 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 2001; 276: 4581-4587
- Carlisle DL, Hopkins TM, Gaither-Davis A, Silhanek MJ, Luketich JD, Christie NA, Siegfried JM. Nicotine signals through muscle-type and neuronal nicotinic acetylcholine receptors in both human bronchial epithelial cells and airway fibroblasts. *Respir Res* 2004; 5: 27
- Casaburi R, Conoscenti CS. Lung function improvements with once-daily tiotropium in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Med* 2004; 117: 33-40
- Caulfield, MP. Muscarinic receptors--characterization, coupling and function. *Pharmacol Ther* 1993; 58: 319-379
- Caulfield MP, Birdsall NJM, International Union of Pharmacology. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* 1998; 50: 279-290
- Chelala JL, Kilani A, Miller MJ, Martin RJ, Ernsberger P. Muscarinic receptor binding sites of the M4 subtype in porcine lung parenchyma. *Pharmacol Toxicol* 1998; 83: 200-207
- Chiappara G, Gagliardo R, Siena A, Bonsignore MR, Bousquet J, Bonsignore G, Vignola AM. Airway remodelling in the pathogenesis of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2001; 1: 85-93
- Chung KF. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J Suppl* 2001; 34: 50-59
- Conti-Fine BM, Navaneetham D, Lei S, Maus AD. Neuronal nicotinic receptors in non-neuronal cells: new mediators of tobacco toxicity? *Eur J Pharmacol* 2000; 393: 279-294

- Conti-Tronconi BM, McLane KE, Raftery MA, Grando SA, Protti MP. The nicotinic acetylcholine receptor: structure and autoimmune pathology. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1994; 29: 69-123
- Cook AK, Carty M, Singer CA, Yamboliev IA, Gerthoffer WT. Coupling of M(2) muscarinic receptors to ERK MAP kinases and caldesmon phosphorylation in colonic smooth muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 278: 429-437
- Disse B. Antimuscarinic treatment for lung diseases: From research to clinical practice. *Life Sci* 2001; 68: 2557-2564
- Duvernelle C, Freund V, Frossard N. Transforming growth factor-beta and its role in asthma. *Pulm Pharmacol Ther* 2003; 16: 181-196
- Dziedziczko A, Palgan K. Role of fibroblasts in bronchial asthma. *Pol Merkur Lekarski* 2003; 79: 59-61
- Fang JY, Richardson BC. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *Lancet Oncol* 2005; 6: 322-327
- Felder, CC. Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. *FASEB J* 1995; 9: 619-625
- Fryer AD, Jacoby DB. Muscarinic receptors and control of airway smooth muscle. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 154-160
- Gosens I, Bos ST, Zaagsma J, Meurs H. Protective effects of tiotropium bromide in the progression of airway smooth muscle remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 1096-1102
- Gosens R, Nelemans SA, Grootte Bromhaar MM, McKay S, Zaagsma J, Meurs H. Muscarinic M3-receptors mediate cholinergic synergism of mitogenesis in airway smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 28: 257-262
- Gosens R, Zaagsma J, Grootte Bromhaar M, Nelemans A, Meurs H. Acetylcholine: a novel regulator of airway smooth muscle remodelling? *Eur J Pharmacol* 2004; 500: 193-201
- Gosens R, Zaagsma J, Meurs H, Halayko AJ. Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD. *Respir Res* 2006; 7: 73
- Gotti C, Clementi F. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol* 2004; 74: 363-396

- Gudermann T, Kalkbrenner F, Schultz G. Diversity and selectivity of receptor-G protein interaction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996; 36: 429-459
- Haddad EB, Rousell J, Mak JC, Barnes PJ. Long-term carbachol treatment-induced down-regulation of muscarinic M₂-receptors but not m₂ receptor mRNA in a human lung cell line. *Br J Pharmacol* 1995; 116: 2027-2032
- Hauge C, Frödin M. RSK and MSK in MAP kinase signalling. *J Cell Sci* 2006; 119: 3021-3023
- Hey C, Wessler I, Racké K. Muscarinic inhibition of endogenous noradrenaline release from rabbit isolated trachea: receptor subtype and receptor reserve. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1994; 350: 464-472
- Hislop AA, Mak JCW, Reader JA, Barnes PJ, Haworth SG. Muscarinic receptor subtypes in the porcine lung during postnatal development. *Eur J Pharmacol* 1998; 359: 211-221
- 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
- Hosey MM. Diversity of structure, signaling and regulation within the family of muscarinic cholinergic receptors. *Faseb J* 1992; 6: 845-852
- Jacobs JP, Jones CM, Baille JP. Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature* 1970; 227: 168-170
- Jeffery PK. Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 28-38
- Koman A, Durieu-Trautmann O, Couraud PO, Strosberg AD, Weksler BB. Modulation of muscarinic-receptor expression in human embryonic lung fibroblasts by platelet-derived growth factor. *Biochem J* 1990; 270: 409-412
- Koumis T, Samuel S. Tiotropium bromide: a new long-acting bronchodilator for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Ther* 2005; 27: 377-392
- Krymskaya VP, Orsini MJ, Eszterhas AJ, Brodbeck KC, Benovic JL, Panettieri RA Jr, Penn RB. Mechanisms of proliferation synergy by receptor tyrosine kinase and G protein-coupled receptor activation in human airway smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 23: 546-554

- Lowry OH, Rosebrough MJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275
- Lukas RJ, Changeux JP, Le Novere N, Albuquerque EX, Balfour DJ, Berg DK, Bertrand D, Chiappinelli VA, Clarke PB, Collins AC, Dani JA, Grady SR, Kellar KJ, Lindstrom JM, Marks MJ, Quik M, Taylor PW, Wonnacott S. International Union of Pharmacology. Current status of the nomenclature for nicotinic acetylcholine receptors and their subunits. *Pharmacol Rev* 1999; 51: 397-401
- Luttrell LM. Activation and targeting of mitogen-activated protein kinases by G-protein-coupled receptors. *Can J Physiol Pharmacol* 2002; 80: 375-382
- Lüllmann H, Mohr K, Wehling M. *Pharmakologie und Toxikologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1999
- Marinissen MJ, Gutkind JS. G-Protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci* 2001; 22: 368-376
- Marrion NV, Smart TG, Marsh SJ, Brown DA. Muscarinic suppression of the M-current in the rat sympathetic ganglion is mediated by receptors of the M1-subtype. *Br J Pharmacol* 1989; 98: 557-573
- Matthiesen S, Bahulayan A, Holz O, Racké K. MAPK pathway mediates muscarinic receptor-induced human lung fibroblast proliferation. *Life Sci* 2007; 80: 2259-2262.
- Matthiesen S, Bahulayan A, Kempkens S, Haag S, Fuhrmann M, Stichnote C, Juergens UR, Racké K. Muscarinic receptors mediate stimulation of human lung fibroblast proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006; 35: 621-627
- Nichols WW, Murphy DG, Cristofalo VJ, Toji LH, Greene AE, Dwight SA. Characterization of a new human diploid cell strain, IMR-90. *Science* 1977; 196: 60-63
- Racké K, Matthiesen S. The airway cholinergic system: Physiology and pharmacology. *Pulm Pharmacol Therp* 2004; 17: 181-198
- Ringdahl B, Jenden DJ. Pharmacological properties of oxotremorine and its analogs. *Life Sci* 1983; 32: 2401-2413
- Roman J, Ritzenthaler JD, Gil-Acosta A, Rivera HN, Roser-Page S. Nicotine and fibronectin expression in lung fibroblasts: implications for tobacco-related lung tissue remodeling. *FASEB J* 2004; 18: 1436-1438

- Rousell J, Haddad EB, Mak JC, Barnes PJ. Transcriptional down-regulation of m2 muscarinic receptor gene expression in human embryonic lung (HEL 299) cells by protein kinase C. *J Biol Chem* 1995; 270: 7213-7218
- Sacco O, Silvestri M, Sabatini F, Sale R, Defilippi AC, Rossi GA. Epithelial cells and fibroblasts: structural repair and remodelling in the airways. *Paediatr Respir Rev* 2004; 5: 35-40
- Seale JP. Anticholinergic bronchodilators. *Aust Prescr* 2003, 26: 33-35
- Sekhon HS, Keller JA, Proskocil BJ, Martin EL, Spindel ER. Maternal nicotine exposure upregulates collagen gene expression in fetal monkey lung. Association with alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 26: 31-41
- Shen N, Yao W, Zhu H. Study on the muscarinic receptor and its subtypes in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 2001; 24: 212-214
- Vincken W, van Noord JA, Greefhorst AP, Bantje TA, Kesten S, Korducki L, Cornelissen PJ. Improved health outcomes in patients with COPD during 1 yr's treatment with tiotropium. *Eur Respir J* 2002; 19: 209-216
- Walch L, Gascard JP, Dulmet E, Brink C, Norel X. Evidence for a M(1) muscarinic receptor on the endothelium of human pulmonary veins. *Br J Pharmacol* 2000; 130: 73-78
- Wessler I, Kirkpatrick CJ, Racké K. Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: Expression and function in man. *Pharmacol Ther* 1998; 77: 59-79
- Wessler I, Kirkpatrick CJ, Racké K. The cholinergic 'pitfall': acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999; 26: 198-205
- Winitz S, Russell M, Qian NX, Gardner A, Dwyer L, Johnson GL. Involvement of Ras and Raf in the G_i-coupled acetylcholine muscarinic M₂ receptor activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase and MAP kinase. *J Biol Chem* 1993; 268: 19196-19199

- Wylie PG, Challiss RA, Blank JL. Regulation of extracellular-signal regulated kinase and c-Jun N-terminal kinase by G-protein-linked muscarinic acetylcholine receptors. *Biochem J* 1999; 338: 619-628
- Yamada M, Basile AS, Fedorova I, Zhang W, Duttaroy A, Cui Y, Lamping KG, Faraci FM, Deng CX, Wess J. Novel insights into M5 muscarinic acetylcholine receptor function by the use of gene targeting technology. *Life Sci* 2003; 74: 345-353
- Yang CM. Muscarinic receptor expression in the primary culture of tracheal smooth muscle cells. *J Recept Res* 1990; 10: 235-247
- Zaagsma J, Roffel AF, Meurs H. Muscarinic control of airway function. *Life Sci* 1997; 60: 1061-1068
- Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* 2002; 12: 9-18
- Zhou L, Hershenson MB. Mitogenic signaling pathways in airway smooth muscle. *Respir Physiol Neurobiol* 2003; 137: 295-308