

Zum Einfluss der Saponine aus  
*Hedera helix* L. auf die homologe  
Desensitivierung des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors  
und das Relaxationsverhalten  
der glatten Bronchialmuskulatur

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von  
Anne Katrin Wolf  
aus  
Wetzlar

Bonn 2009

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Hanns Häberlein

2. Gutachter: Prof. Dr. Klaus Mohr

Tag der Promotion: 04.Mai 2010

Erscheinungsjahr 2010

*Eine Investition in Wissen birgt immer noch die besten Zinsen.*

**Benjamin Franklin**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>v</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>viii</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>ix</b>
<b>I Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1 Bronchitis</b>	<b>2</b>
1.1 Allgemein . . . . .	2
1.2 Krankheitsbild . . . . .	4
1.3 Therapie . . . . .	6
<b>2 Asthma bronchiale</b>	<b>8</b>
2.1 Krankheitsbild . . . . .	8
2.2 Medikamente zur Behandlung von Asthma . . . . .	13
2.2.1 Therapieschema . . . . .	13
2.2.2 $\beta_2$ -Sympathomimetika . . . . .	14
2.2.3 Glucocorticoide . . . . .	17

2.2.4	Weitere Medikamente . . . . .	18
<b>3</b>	<b>Der <math>\beta_2</math>-adrenerge Rezeptor</b>	<b>19</b>
3.1	Aufbau . . . . .	19
3.2	Signaltransduktion . . . . .	21
<b>4</b>	<b>Efeu und seine Inhaltsstoffe</b>	<b>28</b>
<b>5</b>	<b>Ziel dieser Arbeit</b>	<b>32</b>
<b>II</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>33</b>
<b>6</b>	<b>Methoden</b>	<b>34</b>
6.1	Zellkulturmethoden . . . . .	34
6.1.1	Verwendete Zelllinie . . . . .	34
6.1.2	Passagieren von Zellen . . . . .	34
6.1.3	Auftauen von Zellen . . . . .	35
6.1.4	Einfrieren von Zellen . . . . .	36
6.1.5	Stabile Transfektion von HEK293-Zellen . . . . .	36
6.2	Studien zur Internalisierung des $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors . . . . .	37
6.2.1	An fixierten Zellen . . . . .	37
6.2.2	An lebenden Zellen . . . . .	38
6.2.3	Bildbearbeitung . . . . .	38
6.3	Messung der Phosphorylierung des $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors . . . . .	40
6.3.1	Westernblot . . . . .	40
6.3.2	In-Cell-Western-Methode . . . . .	41

## Inhaltsverzeichnis

---

6.4	Isometrische Kraftmessungen an der glatten Muskulatur der Rinderluftröhre . . . . .	42
6.4.1	Präparation der Muskelstreifen . . . . .	42
6.4.2	Vorbereitung der Muskelstreifen . . . . .	43
6.4.3	Kontraktionsversuche . . . . .	46
6.4.4	Relaxationsversuche . . . . .	46
<b>7</b>	<b>Verwendete Chemikalien</b>	<b>47</b>
7.1	Allgemein . . . . .	47
7.2	Verwendete Antikörper . . . . .	52
<b>III</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>53</b>
<b>8</b>	<b>Studien zur Internalisierung des <math>\beta_2</math>-adrenergen Rezeptors</b>	<b>54</b>
8.1	An fixierten Zellen . . . . .	54
8.2	An lebenden Zellen . . . . .	58
<b>9</b>	<b>Messung der Phosphorylierung des <math>\beta_2</math>-adrenergen Rezeptors</b>	<b>61</b>
<b>10</b>	<b>Isometrische Kraftmessungen an der glatten Muskulatur der Rinderluftröhre</b>	<b>66</b>
10.1	Kontraktionsversuche . . . . .	66
10.2	Relaxationsversuche . . . . .	70
<b>IV</b>	<b>Diskussion</b>	<b>77</b>
<b>11</b>	<b>Diskussion</b>	<b>78</b>
<b>12</b>	<b>Ausblick</b>	<b>87</b>

**13 Zusammenfassung**

**89**

**Literaturverzeichnis**

**91**

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Gliederung des Atemwegsystems . . . . .	3
2.1	Strukturformeln der wichtigsten $\beta_2$ -Sympathomimetika . . . . .	16
3.1	Aufbau des $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors . . . . .	20
3.2	Signaltransduktionswege des $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors . . . . .	23
3.3	Internalisierung und Recycling des $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors . . . . .	27
4.1	Strukturformeln der beiden wichtigsten Saponine aus Efeublättern, sowie deren Aglykon . . . . .	29
6.1	Bildbearbeitung . . . . .	39
6.2	Präparation von Muskelstreifen aus der Rinderluftröhre . . . . .	45
8.1	Internalisierung des $\beta_2$ AR-GFP in transfizierten HEK293-Zellen durch Salbutamol . . . . .	55
8.2	Internalisierung des $\beta_2$ AR-GFP in transfizierten HEK293-Zellen durch 1 $\mu$ M Salbutamol nach Vorbehandlung mit den Saponinen . . . . .	57
8.3	Internalisierung des $\beta_2$ AR-GFP in lebenden, transfizierten HEK293-Zellen durch 1 $\mu$ M Salbutamol nach Vorbehandlung mit $\alpha$ -Hederin . . . . .	59



## Abbildungsverzeichnis

---

8.4	Internalisierung des $\beta_2$ AR-GFP in lebenden, transfizierten HEK293-Zellen durch 1 $\mu$ M Salbutamol nach Vorbehandlung mit $\alpha$ -Hederin . . . . .	60
9.1	Westernblot auf $\beta_2$ AR-GFP und dessen phosphorylierte Form in HEK293- $\beta_2$ AR-GFP-Zellen . . . . .	62
9.2	Phosphorylierung des $\beta_2$ AR-GFP an Ser355/356 in HEK293- $\beta_2$ AR-GFP-Zellen durch Isoprenalin . . . . .	63
9.3	Optimierung der Isoprenalin-Konzentration für die homologe Desensitivierung des $\beta_2$ AR-GFP . . . . .	64
9.4	Phosphorylierung des $\beta_2$ AR-GFP an Ser355/356 durch Isoprenalin nach Vorbehandlung mit den Saponinen . . . . .	65
10.1	Einfluss der Saponine auf die Kontraktion von glatten Muskelstreifen aus der Rinderluftröhre . . . . .	67
10.2	pEC <sub>50</sub> -Werte der Saponine für die Histamin-induzierte Kontraktion glatter Muskulatur . . . . .	68
10.3	Vergleich der Histamin- und Methacholin-vermittelten Kontraktion nach Vorbehandlung der glatten Muskelstreifen mit den Saponinen . . . . .	69
10.4	Einfluss von $\alpha$ -Hederin auf die Relaxation von glatten Muskelstreifen mit Isoprenalin nach Vorkontraktion mit Methacholin . . . . .	71
10.5	Restkontraktion der glatten Muskelstreifen nach Methacholin-Vorkontraktion und Relaxation mit 100 $\mu$ M Isoprenalin unter dem Einfluss von $\alpha$ -Hederin . . . . .	72
10.6	Isoprenalin-vermittelte Relaxation von glatten Muskelstreifen nach Vorkontraktion mit 100 $\mu$ M Methacholin unter dem Einfluss von verschiedenen $\alpha$ -Hederin-Konzentrationen . . . . .	73

## Abbildungsverzeichnis

---

10.7 Restkontraktion der glatten Muskelstreifen nach Vorkontraktion mit 100 $\mu\text{M}$ Methacholin und Relaxation mit 100 $\mu\text{M}$ Isoprenalin unter dem Einfluss von verschiedenen $\alpha$ -Hederin-Konzentrationen . . . . .	74
10.8 Restkontraktion der glatten Muskelstreifen nach Vorkontraktion mit 100 $\mu\text{M}$ Methacholin und Relaxation mit 100 $\mu\text{M}$ Isoprenalin unter dem Einfluss der Saponine . . . . .	75
11.1 Vermuteter Wirkungsmechanismus von $\alpha$ -Hederin . . . . .	86

# Tabellenverzeichnis

1.1	Expektorantien und deren vermutete Wirkungsmechanismen . . . . .	6
2.1	Schweregrad-Einteilung des Asthma bronchiale . . . . .	11
6.1	Zellzahl für die Aussaat in Well-Platten . . . . .	35
10.1	Restkontraktion der glatten Muskulatur nach Vorkontraktion mit 100 $\mu$ M Methacholin und Relaxation mit 100 $\mu$ M Isoprenalin . . . . .	76

# Abkürzungsverzeichnis

<b><math>\beta_2</math>AR</b>	$\beta_2$ -adrenerger Rezeptor
<b>AC</b>	Adenylatcyclase
<b>AKAP</b>	A-Kinase Ankerprotein
<b>AP-2</b>	Adapterprotein-2
<b>APS</b>	Amoniumpersulfat
<b>BES</b>	N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure
<b>BRET</b>	Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>cAMP</b>	zyklisches Adenosinmonophosphat
<b>cGMP</b>	zyklisches Guanosinmonophosphat
<b>COPD</b>	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
<b>DMEM</b>	Dulbeco´s modifiziertes Eagle-Medium
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>EBP50</b>	Ezrin-Bindungsphosphoprotein, 50kDa
<b>EC<sub>50</sub></b>	halbmaximale effektive Konzentration

## Abkürzungsverzeichnis

---

<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>eGFP</b>	verbessertes Grün-fluoreszierendes Protein
<b>ERK</b>	extrazelluläre Signal-regulierte Kinase
<b>ES</b>	extrazelluläre Schleife
<b>et al.</b>	und andere
<b>FCS</b>	fötale Kälberserum
<b>FEV<sub>1</sub></b>	forciertes expiratorisches Volumen in einer Sekunde
<b>FRET</b>	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
<b>FBK</b>	forcierte Vitalkapazität
<b>G<sub>i</sub></b>	inhibitorisches G-Protein
<b>G<sub>s</sub></b>	stimulatorisches G-Protein
<b>GAR</b>	Ziegenantikörper gerichtet gegen Kaninchen IgG
<b>GDP</b>	Guanosindiphosphat
<b>GFP</b>	Grün-fluoreszierendes Protein
<b>GM-CSF</b>	Granulozyten/Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
<b>GPCR</b>	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
<b>GRE</b>	Glucocorticoid response Element
<b>GRK2</b>	G-Protein-gekoppelter Rezeptor Kinase 2
<b>GTP</b>	Guanosintriphosphat
<b>HASM</b>	humane glatte Muskulatur der Atemwege
<b>HEK</b>	humane embryonale Nierenzelle
<b>HEPES</b>	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>IL</b>	Interleukin
<b>IS</b>	intrazelluläre Schleife

## Abkürzungsverzeichnis

---

<b>KH</b>	Krebs-Henseleit
<b>L-Glut</b>	L-Glutamin
<b>MAPK</b>	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
<b>MCh</b>	Methacholin
<b>MLCK</b>	Myosin-Leichtkettenkinase
<b>MLCP</b>	Myosin-Leichtkettenphosphatase
<b>NEAA</b>	nicht-essentielle Aminosäuren
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Kernfaktor $\kappa$ B
<b>NHERF</b>	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> Austausch regulatorischer Faktor
<b>PBS/T</b>	0,1 % Tween-20 in PBS
<b>PDE</b>	Phosphodiesterase
<b>PDL</b>	Poly-D-Lysin
<b>pEC<sub>50</sub></b>	negativer dekadischer Logarithmus der EC <sub>50</sub>
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>PKA</b>	Proteinkinase A
<b>PKC</b>	Proteinkinase C
<b>PKG</b>	Proteinkinase G
<b>SARS</b>	schweres akutes Atemwegssyndrom
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>TBS/T</b>	0,1 % Tween-20 in TBS
<b>TEMED</b>	Tetramethylethylendiamin
<b>Th2</b>	T-Helferzellen Typ 2
<b>TM</b>	Transmembrandomäne
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumornekrosefaktor- $\alpha$

## Abkürzungsverzeichnis

---

**u.a.** unter anderem

**VK** Vitalkapazität

**WB** Westernblot

**z.B.** zum Beispiel

**z.T.** zum Teil

# **Teil I**

## **Einleitung**



# 1 Bronchitis

## 1.1 Allgemein

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Substanzen  $\alpha$ -Hederin, Hederacosid C und Hederagenin handelt es sich um Inhaltsstoffe aus Efeu (*Hedera helix L.*). Zubereitungen hieraus werden laut Monographie der Kommission E bei Katarrhen der Luftwege, sowie für die symptomatische Behandlung chronisch-entzündlicher Bronchialerkrankungen und laut ESCOP bei Husten, vor allem assoziiert mit Hypersekretion von viskösem Schleim eingesetzt [23, 111].

Das Atemwegsystem lässt sich in mehrere Teile gliedern: die Luftröhre (Trachea), mit ihren hufeisenförmigen Knorpelspangen, spaltet sich in Höhe des fünften Brustwirbels in die beiden Hauptbronchien, welche dann in die großen Bronchien (BR) und später in die Bronchiolen (BL) übergehen (Abbildung 1.1) [40]. Über die Terminalbronchiolen (TBL) geht es in die Bronchioli respiratorii (BLR), wo die ersten Alveolen auftreten und weiter in die Ductuli alveolares (DA) [106]. Diese münden in die Sacculi alveolares (SA) [106], die mit Alveolen ausgekleidet und der Ort des Austausches der Atemgase sind [103].

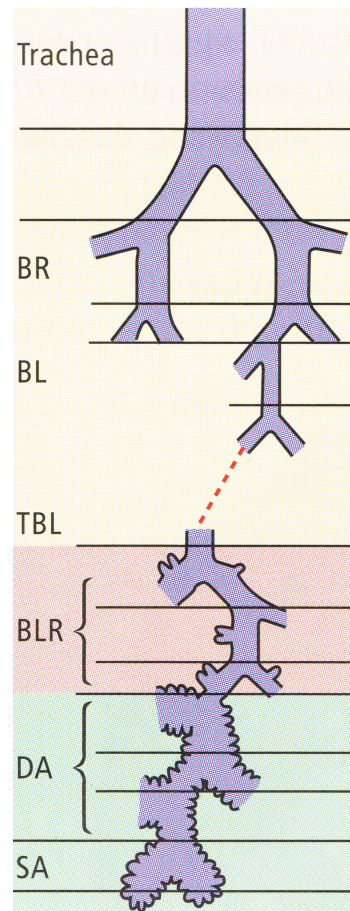


Abbildung 1.1: **Gliederung des Atemwegsystems**

BR Bronchien, BL Bronchiolen, TBL Terminalbronchiolen, BLR Bronchioli respiratorii, DA Ductuli alveolares, SA Sacculi alveolares; mit freundlicher Genehmigung der Wissenschaftlichen Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 2007 [103].

Die Schleimhaut der Luftröhre besteht aus dem sogenannten respiratorischen Epithel, das aus Flimmer-, Becher- und Basalzellen besteht. Es liegt dem subepithelialen Bindegewebe (Lamina propria) auf und ist durchsetzt mit seromukösen Trachealdrüsen [147]. Die Bronchialwand hat denselben Aufbau, wobei die seromukösen Trachealdrüsen durch seromuköse Bronchialdrüsen ersetzt werden und anstatt Knorpelspannen nur noch Knorpelstücke zu finden sind.

Die Bronchiolen besitzen keine subepithelialen Drüsen und Knorpelstücke mehr und sind aus einem einschichtigen, prismatischen Epithel mit Flimmer- und Clara-Zellen aufgebaut. In den Bronchioli respiratorii sind die vorhandenen Epithelzellen größtenteils zilienlos und zwischen ihnen findet man Clara-Zellen und Typ-II-Pneumozyten. Clara-Zellen sezernieren ein nicht-klebriges, glykoproteinreiches Produkt, das hilft, die engen Bronchiolen offen zu halten [147]. Die Alveolen sind mit flachen Typ-I-Pneumozyten ausgekleidet, die zusammen mit dem dahinter liegenden Kapillarendothel die Barriere für den Gasaustausch bilden [24]. Des Weiteren findet man in den Alveolen auch Typ-II-Pneumozyten, die Surfactant bilden, welches die Oberflächenspannung des Flüssigkeitsfilms zwischen Alveolen und Luft reduziert [24]. Die sowohl in der Trachea als auch in den Bronchien befindlichen Becherzellen sind, zusammen mit den seromukösen Drüsen, für die Produktion des Bronchialschleims zuständig. Die Tracheal- und Bronchialdrüsen bilden außer den Bestandteilen dieses Schleims noch antibakterielle Enzyme, wie Lysozym, und Defensine [147]. Dieser Bronchialschleim übernimmt eine wichtige Aufgabe bei der Abwehr, indem er Bakterien und andere Fremdpartikel bindet. Das die Bronchien und die Luftröhre auskleidende, zilienbesetzte Flimmerepithel fördert den Schleim über eine rhythmische Bewegung in Richtung Rachen, wo er verschluckt wird (mukoziliäre Clearance) [24].

## **1.2 Krankheitsbild**

Die akute Bronchitis ist eine Erkrankungsform mit dem plötzlichen Auftreten von trockenem bis produktivem Husten [49]. Die Intensität des Hustens nimmt meist innerhalb von wenigen Tagen, manchmal aber auch erst nach einigen Wochen ab, wobei die Bronchitis meist von selbst ausheilt [148]. Sie kann aber auch Vorläufer oder Teilerscheinung eines grippalen In-

fektes sein [24]. Die Ursachen für den Husten bei akuter Bronchitis sind Entzündungen mit Verletzung der Schleimhaut und/oder eine Zerstörung von bronchialen Epithelzellen durch Viren, sowie die Verdickung der bronchialen und trachealen Schleimhaut als Reaktion auf die Virusinfektion und die Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren [20, 148]. Je nach Patient kann eine akute Bronchitis auch mit einer Bronchialhyperaktivität (wie im Falle von Asthma) und einer bronchialen Obstruktion einhergehen [20].

In 85 bis 95 % der Fälle sind die Auslöser einer akuten Bronchitis in gesunden Erwachsenen Rhinoviren, Adenoviren, Parainfluenzaviren sowie Influenzaviren der Typen A und B [150]. Bei Patienten mit respiratorischen Vorerkrankungen sowie bei älteren Patienten und bei Patienten mit Immunschwäche sind z.T. auch Bakterien, wie *Mycoplasma pneumoniae* und *Chlamydia pneumoniae* [2, 148] die Ursache für eine akute Bronchitis [92, 151]. Weitere Symptome wie Brustschmerzen, leichtes Fieber, Heiserkeit und Rasselgeräusche beim Atmen können zusätzlich zum Husten auftreten [69].

Es gibt eine Reihe von Krankheiten mit ähnlichen Symptomen, die differenzialdiagnostisch erkannt werden müssen. Dazu zählen die „echte“ Influenza, das schwere akute Atemwegssyndrom (severe acute respiratory syndrome, SARS), Lungenentzündung und Keuchhusten.

Wenn Husten oder Auswurf über wenigstens drei Monate in mindestens zwei aufeinanderfolgenden Jahren auftritt, spricht man von einer chronischen Bronchitis [49]. Ursache der chronischen Bronchitis sind meist über längere Zeit inhalierte Noxen wie Zigarettenrauch oder industrielle Abgase, welche zu einer Schädigung des Flimmerepithels mit verminderter mukoziliärer Clearance und zu Entzündungsprozessen führen [24]. Im Fall einer akuten Verschlimmerung spielen häufig Bakterien eine Rolle und eine Therapie mit Antibiotika ist angezeigt [20]. Zusammen mit Lungenemphysemen bildet die chronische Bronchitis die Hauptkomponente der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung [21].

## 1.3 Therapie

Für die Therapie der akuten Bronchitis sind nach der Empfehlung der Deutschen Atemwegsliga Antibiotika generell nicht angezeigt [151]. Ausnahmen sind Patientengruppen wie Säuglinge, Kinder mit Vorerkrankungen, ältere Patienten, Patienten mit gleichzeitigen bakteriellen Infekten wie Mittelohrentzündung oder Mandelentzündung und Patienten mit Immunschwäche [20]. Obgleich eine Förderung der Zilientätigkeit und eine Hemmung der Mediatorfreisetzung durch  $\beta_2$ -Sympathomimetika erreicht werden kann, wird deren klinische Relevanz bei Bronchitis eher kritisch bewertet [102, 127, 148].

Eine weitere Möglichkeit, die Symptomatik der Bronchitis zu verbessern, ist die Behandlung mit Expektorantien. Tabelle 1.1 zeigt eine Auswahl von Expektorantien und deren teilweise vermuteten Wirkungsmechanismen.

Tabelle 1.1: **Expektorantien und deren vermutete Wirkungsmechanismen [102].**

Substanz	Wirkung
Efeublätter-Trockenextrakt	Indirekter $\beta_2$ -adrenerger Effekt [124]
Thymianfluidextrakt	Spasmolyse und Steigerung der mukoziliären Clearance [149]
Myrtol	Verbesserte mukoziliäre Clearance [37]
Pelargonium-Extrakt	Steigerung des Zilienschlags und moderate antiinfektive Wirkung [107, 134]
Bromhexin	Anregung seromuköser Drüsenzellen zur Schleimbildung
Ambroxol	Wie Bromhexin, zusätzlich Stimulation der Bildung von Surfactant
Acetylcystein	Senkung der Viskosität des Bronchialschleims durch Spaltung von Disulfidbrücken
Carbocistein	Vermutlich Förderung der Bildung von nieder-viskösem Schleim

## *Einleitung*

---

Auf dem deutschen Arzneimittelmarkt gibt es fast 100, überwiegend freiverkäufliche Präparate, die einen oder mehrere der oben genannten Inhaltsstoffe enthalten und bei welchen als Indikation Atemwegserkrankungen benannt sind [1]. Außerdem existieren Präparate mit Inhaltsstoffen, die in der oben genannten Liste nicht vorkommen, wie Primelwurzel-Extrakt, Anisöl, Eukalyptusöl und Guaifenesin [1].

## 2 Asthma bronchiale

### 2.1 Krankheitsbild

Asthma bronchiale gehört, wie auch die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) zu den obstruktiven Ventilationsstörungen, die durch eine Einengung der Atemwege und eine Erhöhung des Strömungswiderstandes gekennzeichnet sind [24, 102]. Im Gegensatz dazu stehen die restriktiven Ventilationsstörungen, wie Lungenfibrose und Atelektasen, bei denen weniger Lungenvolumen zum Gasaustausch bereit steht [102]. Schätzungen nach sind weltweit 300 Millionen Menschen an Asthma bronchiale erkrankt [41].

Beim Asthma bronchiale handelt es sich um eine chronisch entzündliche Atemwegserkrankung mit anfallsweise auftretender Atemnot, die durch eine reversible Obstruktion der Atemwege und eine Hyperreaktivität des Bronchialsystems gekennzeichnet wird. Die Atemwegsobstruktion ist begründet in einer ödematösen Schwellung der Bronchialwand, einer erhöhten Bronchokonstriktion sowie einer gesteigerten Sekretion (Hyperkrinie) eines Schleims zäher Konsistenz (Dyskrinie) [102]. In späteren Stadien kommt das sogenannte „Remodelling“ hinzu, welches eine strukturelle Änderung der Atemwege, bedingt durch die chronische Entzündung, darstellt. Im Gegensatz zum Asthma bronchiale liegt bei der COPD eine nicht mehr vollständig reversible Obstruktion der Atemwege durch chronische Bronchitis und Lungen-

emphysem vor [102].

Die Einteilung des Asthma bronchiale erfolgt aufgrund der Auslöser in allergisches (extrinsisches) Asthma und nicht-allergisches (intrinsisches) Asthma oder nach dem Schweregrad [22]. Im Falle des allergischen Asthmas führt der Kontakt mit Aeroallergenen, wie Pollen, Tierhaaren oder Kot von Hausstaubmilben, zu einer IgE-vermittelten allergischen Reaktion [102]. Die Bindung der Allergene an IgE und nachfolgend an Mastzellen und basophile Granulozyten führt zu deren Degranulation mit Freisetzung von großen Mengen gespeicherten Histamins und anderer Entzündungsmediatoren, wie  $\text{TNF-}\alpha$  [131]. Histamin führt nach Bindung an den  $\text{H}_1$ -Histamin-Rezeptor zu einer Steigerung der intrazellulären Calcium-Konzentration und Kontraktion der Bronchialmuskulatur [83, 102], während die Entzündungsmediatoren Leukozyten rekrutieren [24]. Die eingewanderten Leukozyten sind für die Spätphase der Allergie verantwortlich, in der noch weitere Entzündungsmediatoren, wie Interleukine und RANTES [56], freigesetzt werden, welche die bronchiale Hyperreaktivität steigern und Epithelzellen schädigen [24]. Durch die Schädigung der Epithelschicht können Mastzellen und andere, entzündungsassoziierte Zellen in tiefere Gewebeschichten eindringen und führen zur Bildung ödematöser Schwellungen und zur Stimulation der Schleimproduktion durch Becherzellen [71]. Auch die Allergene können durch die geschädigte Epithelschicht tiefer ins Gewebe eindringen und treffen dort auf Makrophagen, die sie internalisieren und darauf zu Antigen-präsentierenden Zellen werden. Die Antigen-Präsentation gegenüber CD4-positiven T-Lymphozyten führt bei ihnen zur Freisetzung von Interleukin-2 (IL-2), welches sie autokrin zur Proliferation anregt [108]. In Anwesenheit von IL-4 und den beiden Transkriptionsfaktoren GATA-3 und STAT6 werden aus den proliferierten T-Lymphozyten T-Helferzellen Typ 2 (Th2) [102, 108]. Diese Th2-Zellen stimulieren die IgE-Produktion in B-Zellen über IL-4 und setzen weitere Mediatoren frei [13, 102, 108, 125]. Zusammen bedingen diese Vorgänge die Konstriktion der glatten Muskelzellen, Hyperkrinie und Dyskrinie [102].



Nicht-allergisches Asthma tritt oft erst später im Leben auf und ist häufig schwergradiger und schwieriger medikamentös zu kontrollieren [10]. Definiert wird es durch einen negativen Pricktest auf die häufigsten Allergene und ein Fehlen von Allergen-spezifischen zirkulierenden IgE-Antikörpern [10]. Eine Hyperreaktivität des Bronchialsystems durch Schäden nicht geklärter Ursache führt über unbekannte Wege zu den auch beim allergischen Asthma vorhandenen Änderungen in der Lunge, wie z.B. erhöhte Konzentration an IL-5, IL-4 und Eosinophilie [31, 102]. Wie es zu dieser Hyperreaktivität des Bronchialsystems kommt, wird seit langem kontrovers diskutiert. Eine Vermutung ist, dass virale Infekte das Bronchialepithel schädigen und so zur Hyperreaktivität beitragen. Eine andere These setzt eine genetische Prädisposition voraus, bei der schon eine Schädigung der Epithelschicht besteht, welche dann zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber viralen Infekten führt. Die sogenannte „two-hit“-Hypothese basiert auf beiden Thesen und besagt, dass virale Infekte in genetisch prädisponierten Kindern die Entstehung von Asthma fördert [47]. Die Tatsache, dass sich bei etwa 30 bis 50 % der Kinder mit wiederauftretenden Virusinfekten später Asthma bronchiale entwickelt, befürwortet diese Theorie [47].

Die Einteilung des Asthmas bronchiale nach Schweregraden erfolgt in der Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit Asthma der Deutschen Atemwegsliga, beginnend mit der Stufe I, dem intermittierenden Asthma [22]. Stufe II ist das geringgradig persistierende Asthma, gefolgt vom mittelgradig persistierenden Asthma (Stufe III) und der schlimmsten Form, dem schwergradig persistierenden Asthma bronchiale (Stufe IV). Die Einteilung nach Schweregraden ist die Grundlage für die Art der Asthmatherapie, auf die in Kapitel 2.2 eingegangen wird. Tabelle 2.1 zeigt die Einteilung des Asthmas in Abhängigkeit der Symptomatik und des forcierten expiratorischen Volumens in einer Sekunde ( $FEV_1$ ) für Erwachsene [22].

Tabelle 2.1: **Schweregrad-Einteilung des Asthma bronchiale**

nach der Leitlinie der Deutschen Atemwegsliga e.V. zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit Asthma, 2006 [22].

Schweregrad	Kennzeichen	Lungenfunktion
I intermittierend	<1x/Woche Symptome am Tag, ≤2x/Monat nächtl. Symptome, kurze Exazerbationen	FEV <sub>1</sub> ≥ 80% des Sollwertes
II geringgradig persistierend	>1x/Woche Symptome am Tag, >2x/Monat nächtl. Symptome, Beeinträchtigung bei körperlicher Aktivität	FEV <sub>1</sub> ≥ 80% des Sollwertes
III mittelgradig persistierend	tägliche Symptome, >1x/Woche nächtl. Symptome, Beeinträchtigung bei körperlicher Aktivität	60% < FEV <sub>1</sub> < 80% des Sollwertes
IV schwergradig persistierend	anhaltende Symptomatik hoher Intensität, häufige nächtl. Symptome, Einschränkung der körperlichen Aktivität	FEV <sub>1</sub> ≤ 60% des Sollwertes

Bei Untersuchungen von asthmatischen Gewebeproben aus der Lunge zeigte sich ein Überschuss an Eosinophilen (die auch im Sputum zu finden sind), Mastzellen und aktivierten Th2-Lymphozyten [56]. Diese setzen Mediatoren (Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren und Histamin) frei, welche zu Bronchokonstriktion, vermehrter Mukusproduktion und Remodelling führen [56]. Mastzellen sind bei Asthmapatienten nicht nur in der Lamina propria nahe der Blutgefäße zu finden, sondern auch im Bronchialepithel, im Bereich der Becherzellen und Drüsen sowie in der glatten Bronchialmuskulatur, wo sie über IgE und IgE-Rezeptoren Antigene prozessieren. Die von den entzündungsassoziierten Zellen freigesetzten Interleukine (IL) haben überlappende Funktionen bei der Asthmapathogenese. IL-4 fördert die IgE-Produktion in B-Zellen [12, 13, 56, 57, 84]. IL-13 wird mit der Allergen-induzierten bronchialen Hyperreaktivität in Verbindung gebracht [12, 56] und IL-5, das von Th2-Lymphozyten freigesetzt wird, reguliert Reifung, Wachstum und Differenzierung von eosinophilen Granulozyten [13, 56, 57]. Eosinophile setzen cytotoxische Proteine wie das „eosinophil cationic

protein“ und andere Mediatoren, wie Interleukine, frei, die an der Zerstörung der Epithelzellen beteiligt sind [56]. Die Konzentration der von entzündungsassoziierten Zellen und Epithelzellen freigesetzten Chemokine Eotaxin und RANTES sind in der Lunge von Asthmapatienten ebenfalls erhöht und führen zur Rekrutierung von Eosinophilen [56, 131]. Der von Epithelzellen sekretierte Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (granulocyte macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) fördert das Überleben von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten [131]. Neben Histamin kontrahieren auch Cysteinyl-Leukotriene ausgeschüttet von Eosinophilen, Mastzellen und Makrophagen die glatten Muskelzellen der Bronchien.

An den strukturellen Veränderungen in der Lunge von Patienten mit Asthma, dem Remodeling, sind mehrere Vorgänge beteiligt. Durch Schädigung der Epithelzellen kommt es zu einem Austausch von zilienbesetzten Epithelzellen durch Becherzellen, was zur Mukusüberproduktion beiträgt [14, 141]. Vermehrte Produktion von Mukus führt, zusammen mit mangelhafter mukoziliärer Clearance, zur Verstopfung der Bronchien und zu vermehrten Infektionen [141]. Durch Ablagerungen von Proteinen der extrazellulären Matrix, wie Kollagen und Fibronectin, kommt es zu einer Verdickung der Basalmembran und Fibrose. Es gibt Hypothesen, wonach die Verstärkung der Bronchialwand durch derartige Ablagerung kein pathogener Prozess ist, sondern dass sie als Schutz vor einer zu starken Kontraktion der Bronchien dient [14]. Während man bei Asthma eine Massenzunahme der glatten Muskelzellen durch Hyperplasie um 25 bis 150 % identifizierte, wurde bei tödlichem Ausgang sogar eine Zunahme um 50 bis 200 % gefunden [65]. Kontraktile Agonisten wie Histamin und Acetylcholin induzieren eine Proliferation der glatten Muskelzellen, welche durch Gabe von  $\beta_2$ -adrenergen Agonisten gehemmt werden kann [112]. In schweren Fällen von Asthma führt eine Differenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten zu einer weiteren Zunahme der Muskelmasse [56]. Außer den genannten strukturellen Veränderungen kommt es auch zu einer Vergrößerung der Bron-

chialwandvenen und einem Wachstum von neuen Kapillaren durch Sprossung (Angiogenese), was zur Bildung von Ödemen führt [14].

## **2.2 Medikamente zur Behandlung von Asthma**

### **2.2.1 Therapieschema**

Auf Grundlage der Schweregrad-Einteilung werden die Therapiemaßnahmen ebenfalls in Stufen eingeteilt. Prinzipiell unterscheidet man zwischen der Anfallstherapie, die nach Bedarf verwendet wird, und einer Dauertherapie zur Suppression der asthmatischen Entzündung mit Vermeidung von Anfällen [24]. Bei intermittierendem Asthma (Stufe I) entfällt normalerweise eine Dauertherapie. Es wird lediglich ein kurzwirksames  $\beta_2$ -Sympathomimetikum per Inhalationem gegeben. In Stufe II kommt zur Anfallstherapie mit inhalativen  $\beta_2$ -Sympathomimetika noch eine Dauertherapie mit inhalativen Glucocorticoiden in niedriger Dosierung hinzu. Beim mittelgradig persistierenden Asthma (Stufe III) wird eine Vermeidung von Exazerbationen meist mit einer Kombination aus inhalativen Glucocorticoiden plus langwirksamen  $\beta_2$ -Agonisten erreicht. Zur Kontrolle des schwergradig persistierenden Asthmas (Stufe IV) kommen Kombinationen aus hohen Dosen inhalativer Glucocorticoide mit langwirksamen  $\beta_2$ -Sympathomimetika zur Anwendung. Bei Unverträglichkeit des  $\beta_2$ -Agonisten können auch Leukotrien-Antagonisten wie Montelukast oder retardiertes Theophyllin mit inhalativen Glucocorticoiden kombiniert werden. Bei unzureichender Asthmakontrolle werden systemische Glucocorticoide und retardiertes Theophyllin zusätzlich eingesetzt und die IgE-vermittelten Reaktionen mit einem Antikörper gegen IgE, Omalizumab, unterdrückt [22].

### 2.2.2 $\beta_2$ -Sympathomimetika

Bei der Gruppe der  $\beta_2$ -Sympathomimetika handelt es sich um Stoffe, die den  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor ( $\beta_2$ AR) agonistisch stimulieren [102]. Der  $\beta_2$ AR gehört zur Gruppe der G-Proteingekoppelten Rezeptoren und führt nach Stimulation zur Aktivierung der  $G_s\alpha$ -Untereinheit des stimulatorischen G-Proteins ( $G_s$ ), welche in der Folge die Adenylatcyclase (AC) aktiviert und die intrazelluläre Konzentration an zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) erhöht. Die gesteigerte cAMP-Konzentration führt u. a. über eine Erniedrigung der intrazellulären Calcium-Konzentration zur Erschlaffung der glatten Muskulatur [102].

Das zur Zeit wichtigste kurzwirksame  $\beta_2$ -Sympathomimetikum ist Salbutamol (Abbildung 2.1 B) [41]. Es hat mit 5 min einen schnellen Wirkungseintritt, eine Wirkungsspitze nach ca. 30 bis 60 min und eine Wirkungsdauer von 4 bis 6 Stunden und wird im Anfall durch Inhalation verabreicht. Aufgrund der relativ kurzen Wirkdauer ist es nicht für die Dauertherapie geeignet. Dasselbe gilt für andere kurzwirksame  $\beta_2$ -Agonisten wie Fenoterol und Terbutalin (Abbildung 2.1 C und D). Salmeterol und Formoterol sind langwirksame  $\beta_2$ -Sympathomimetika, die für die Dauertherapie des Asthma bronchiale in Kombination mit einem Glucocorticoid eingesetzt werden (Abbildung 2.1 E und F). Eine Dauertherapie mit einem langwirksamen  $\beta_2$ -Agonisten alleine wird nicht mehr empfohlen, da es zur Toleranzentwicklung kommen kann und klinische Studien eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für schwere Asthmaanfälle gezeigt haben [41]. Meistens erfolgt die Gabe des  $\beta_2$ -Sympathomimetikums per inhalationem (für Salbutamol, Fenoterol, Formoterol oder Salmeterol), z.T. ist jedoch auch eine orale Gabe wie bei Terbutalin möglich. Der Vorteil der Inhalation liegt in einem schnellen Wirkungseintritt, da keine Resorption im Darm und Verteilung über die Blutbahn vonstatten gehen muss. Außerdem werden systemische Nebenwirkungen vermindert.

Die Struktur der verschiedenen  $\beta_2$ -Agonisten bestimmt, wie sie mit dem  $\beta_2$ AR und der um-

liegenden Zellmembran interagieren. Die hydrophilen Agonisten Salbutamol, Fenoterol und Terbutalin binden direkt vom extrazellulären Raum aus an die Ligandenbindungsstelle des Rezeptors [68]. Formoterol ist schwach lipophil und wird in Form eines Depots in die Zellmembran eingelagert. Hieraus wird der Agonist kontinuierlich freigesetzt und kann dann über den extrazellulären Raum am Rezeptor binden. Die Größe des Membran-gebundenen Depots ist dabei abhängig von der Gesamtmenge an Formoterol und bestimmt die Wirkungsdauer. Salmeterol ist stark lipophil und wird schnell in den äußeren Monolayer der Plasmamembran aufgenommen. Vor dort kann es lateral zum Rezeptor diffundieren und sich der Bindungsstelle nähern. Studien haben gezeigt, dass die Salmeterolbindung nur sehr langsam durch  $\beta_2$ -adrenerge Liganden verdrängt werden kann, was zur Entwicklung der „exo-site“ Hypothese geführt hat [8, 68]. Hiernach geht die lange Seitenkette von Salmeterol eine starke Wechselwirkung mit einem unpolaren Bereich des Rezeptors ein. Der hydrophile Saligenin-Kopf kann dann immer wieder mit der Ligandenbindungsstelle assoziieren, den Rezeptor aktivieren und wieder dissoziieren [68].

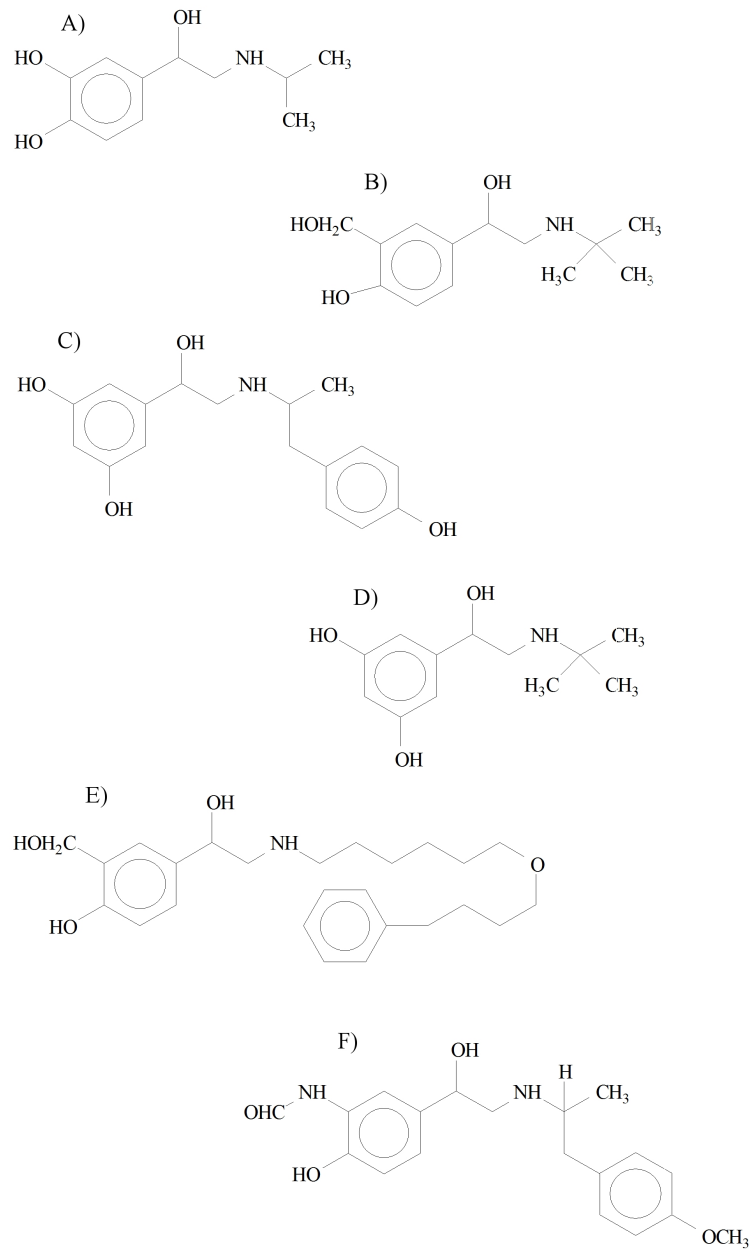


Abbildung 2.1: **Strukturformeln der wichtigsten  $\beta_2$ -Sympathomimetika**  
A) Isoprenalin, B) Salbutamol, C) Fenoterol, D) Terbutalin, E) Salmeterol und  
F) Formoterol.

### 2.2.3 Glucocorticoide

Neben den  $\beta_2$ -Sympathomimetika werden Glucocorticoide bei der Dauertherapie des Asthma bronchiale eingesetzt. Sie vermindern die entzündlichen Reaktionen und reduzieren die Schleimbildung, die Bildung von Bronchialödemen und die Zerstörung der Epithelzellen durch Transkriptionsregulation. Dies geschieht durch Anlagerung an zytosolische Glucocorticoid-Rezeptoren, die dann in den Zellkern translozieren und dort als Homodimere an die sogenannten „glucocorticoid response“-Elemente (GRE) binden. Ein Gen mit GRE-Region ist beispielsweise das NF- $\kappa$ B-inhibitorische Protein, I $\kappa$ B- $\alpha$ , dessen Synthese durch Glucocorticoide hochreguliert wird [102]. Eine weitere Möglichkeit der Beeinflussung ist die Bindung der Homodimere an negative GRE, was die Transkription proinflammatorischer Proteine senkt oder die direkte Inaktivierung von NF- $\kappa$ B durch Bindung des Komplexes aus Glucocorticoid und Rezeptor an NF- $\kappa$ B [102].

Die beiden Cortisol-Derivate Budesonid und Beclomethason sind topisch wirksam und können deshalb durch Inhalation verabreicht werden. Dies verhindert größtenteils das Auftreten systemischer Nebenwirkungen, wie die „Stammfettsucht“ und die Abnahme der Skelettmuskulatur, die normalerweise unter Glucocorticoid-Dauermedikation auftreten [83]. Bei der Kombination von Glucocorticoiden mit  $\beta_2$ -Agonisten kommt es zu gegenseitigen Wechselwirkungen. Glucocorticoide unterstützen die Signaltransduktion des  $\beta_2$ AR [41] und mindern den Prozess der Toleranzentwicklung, der unter Langzeittherapie mit  $\beta_2$ -Sympathomimetika auftreten kann [30]. Als Nebenwirkungen bei der inhalativen Gabe von Glucocorticoiden treten Mundsoor und Halsschmerzen auf, die sich aber durch einfache Maßnahmen wie die Verwendung eines Spacers und Inhalation vor der Einnahme von Mahlzeiten verhindern lassen.



## 2.2.4 Weitere Medikamente

Antagonisten am muskarinischen Acetylcholin-Rezeptor und Theophyllin bewirken ebenso wie die  $\beta_2$ -Sympathomimetika eine Dilatation der Bronchialmuskulatur. Ipratropiumbromid ist das einzige zur Zeit in der Therapie von Asthma angewendete Parasympatholytikum, findet jedoch nur bei schweren Asthmaanfällen und Intoleranz gegen  $\beta_2$ -Agonisten Verwendung [41]. Wegen seiner geringen therapeutischen Breite und der vielen Nebenwirkungen wird auch Theophyllin nicht standardmäßig in der Therapie eingesetzt. Ihm wird in niedrigen Dosen eine antiinflammatorische, in höheren Dosen eine dilatierende Wirkung zugesprochen [9]. Die Relaxation der glatten Muskulatur beruht auf einer Hemmung von Phosphodiesterasen, was den Abbau von cAMP senkt [9].

Montelukast und Zafirlukast sind Antagonisten des Leukotrien-Rezeptors und verhindern u.a. die Bronchokonstriktion durch Leukotriene [41]. Sie werden vor allem als Zusatztherapie bei gering- bis mittelgradig persistierendem Asthma eingesetzt [1] und haben ein günstiges Nebenwirkungsprofil [9]. Zileutin senkt die Leukotriensynthese über eine Hemmung der Lipoxygenase [41].

Da bei allergischem Asthma vermehrt Immunglobuline des Typs E (IgE) auftreten, wurde ein monoklonaler Antikörper entwickelt, der spezifisch IgE bindet. Omalizumab ist ein humanisierter IgE-Antikörper, der gegen ein Epitop im Fc-Teil von humanem IgE gerichtet ist [41]. Außerdem vermutet man, dass unter Langzeitgabe von Omalizumab auch die Dichte an IgE-Rezeptoren auf Mastzellen abnimmt [102]. Verwendet wird es als Zusatzbehandlung bei schwergradig persistierendem, allergischem Asthma in Patienten über 12 Jahren. In klinischen Studien werden zur Zeit noch weitere mögliche Therapieansätze, wie z.B. Antikörper gegen humanes Interleukin-5 (Mepozilumab), ein Antikörper gegen humanes Interleukin-13 (IMA-638) und ein Interleukin-9 spezifischer Antikörper (MEDI-528) getestet [34].

# 3 Der $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor

## 3.1 Aufbau

Der  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor ( $\beta_2$ AR) gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Insgesamt werden fünf Klassen von humanen GPCRs unterschieden: die Rhodopsin-Familie, zu der auch der  $\beta_2$ AR gehört, die Glutamat-Familie, die Adhäsions-Familie, die Secretin-Familie und die Frizzled/Taste2-Familie [4, 70, 116]. Alle GPCRs haben eine gemeinsame Struktur mit sieben  $\alpha$ -helikalen Transmembrandomänen (TMI-TMVII), verbunden mit drei extrazellulären (ES1-ES3) und drei intrazellulären Schleifen (IS1-IS3), einem extrazellulären N-Terminus und einem intrazellulären C-Terminus (Abbildung 3.1) [83]. Die sieben Transmembrandomänen sind kreisförmig in der Membran angeordnet und in ihrer Mitte befindet sich die Ligandenbindungsstelle. Nach Bindung eines Liganden kommt es zu einer Konformationsänderung mit Verschiebung der relativen Positionen der Transmembrandomänen III und VI zueinander, was eine Reorientierung der dritten intrazellulären Schleife nach sich zieht [110, 135]. Die Reorientierung der IS3 ermöglicht die Kopplung an die  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins [39]. Es gibt vier verschiedene G-Proteine,  $G_s$ ,  $G_i$ ,  $G_q$  und  $G_{12/13}$ , die jeweils aus drei Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) bestehen [102]. Die Stimulation eines GPCRs kann die Aktivierung mehrerer G-Proteine nach sich ziehen [86].

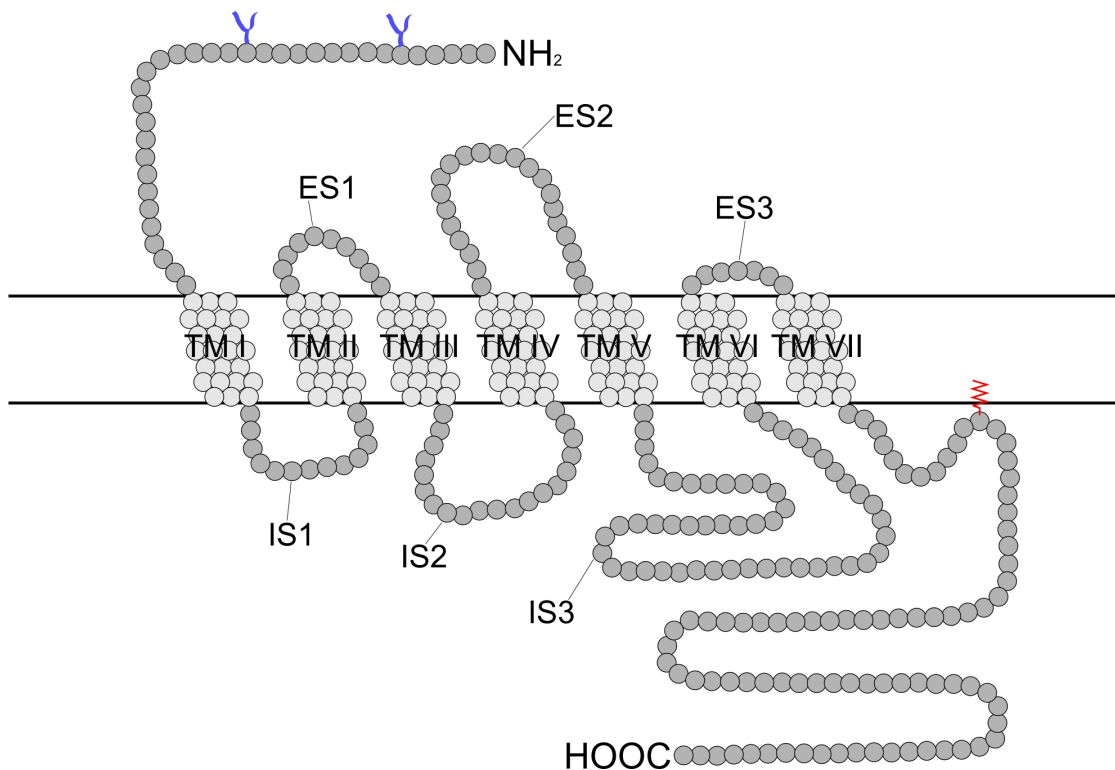


Abbildung 3.1: **Aufbau des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors**

TM = Transmembrandomäne, IS = Intrazelluläre Schleife, ES = Extrazelluläre Schleife, Palmitinsäure zur Befestigung des C-Terminus (rot) und zwei Zuckerreste am N-Terminus (blau) [67].

Der  $\beta_2$ AR gehört zu den adrenergen Rezeptoren, deren physiologische Liganden Adrenalin und Noradrenalin sind. Unterschieden werden sie in  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren, und innerhalb dieser Klassen noch mal in  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  sowie  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  und  $\beta_3$  [102]. Der  $\beta_2$ AR wird überwiegend in der glatten Muskulatur der Bronchien, der Harnblase und des Uterus exprimiert [40], ist aber auch auf Typ-II-Pneumozyten, Epithel- und Endothelzellen sowie immunmodulatorischen Zellen, wie Mastzellen, zu finden [67, 68].

Es gibt Hinweise darauf, dass der  $\beta_2$ AR als Homo- oder Heterodimer vorkommen kann, für

die generelle Funktion scheint dies jedoch keine Voraussetzung zu sein [128]. Der  $\beta_2$ AR zeigt eine konstitutive Aktivität, ein Teil der Rezeptoren nimmt also die aktive Konformation ohne Ligandbindung ein [116].

## 3.2 Signaltransduktion

Die Bindung von Adrenalin mit anschließender Konformationsänderung des  $\beta_2$ AR führt zur Dissoziation der  $\alpha$ -Untereinheit des stimulatorischen G-Proteins von der  $\beta\gamma$ -Untereinheit nach Austausch des gebundenen GDPs durch GTP [102]. Die GTP-gebundene  $G_s\alpha$ -Untereinheit stimuliert dann die Adenylatcyclase (AC) zur Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP). Die Akkumulation von cAMP steigert wiederum die Aktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) (Abbildung 3.2) [93]. Gleichzeitig spaltet die intrinsische GTPase-Funktion der  $\alpha$ -Untereinheit das gebundene GTP in GDP, was zur Beendigung der Signaltransduktion durch das  $G_s$ -Protein mit Trennung von Rezeptor und  $G_s\alpha$  und Reassoziierung mit der  $\beta\gamma$ -Untereinheit führt [102]. Die aktivierte PKA phosphoryliert Proteine, die an der Kontraktion der glatten Muskelzellen beteiligt sind, wie z.B. die Myosin-Leichtkettenkinase (MLCK), was ihre Sensitivität gegenüber Calcium vermindert [48]. Außerdem inhibiert cAMP die Freisetzung von Calcium-Ionen aus intrazellulären Speichern und reduziert den Calcium-Einstrom in die Zelle [68]. Hohe Konzentrationen an cAMP können auch zu einer Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase G (PKG) mit nachfolgender Stimulation der Myosin-Leichtkettenphosphatase (MLCP) führen (Abbildung 3.2), welche die leichte Kette des Myosinmoleküls dephosphoryliert [48, 109].

Neben der klassischen Stimulation der Adenylatcyclase über die  $\alpha$ -Untereinheit des  $G_s$ -Proteins scheint es noch weitere Signaltransduktionswege zu geben, die nach Bindung eines

Agonisten durch den  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor ausgelöst werden. Die Phosphorylierung des Rezeptors durch PKA, vor allem bei niedrigen Agonist-Konzentrationen [146], verhindert eine weitere Aktivierung des  $G_s$  und wird heterologe Desensitivierung genannt. Daraufhin kommt es vermutlich zur Kopplung und Aktivierung von inhibitorischen G-Proteinen ( $G_i$ ) durch den  $\beta_2$ AR (Abbildung 3.2) [27, 48, 50, 81, 122, 130, 135, 146]. Die Aktivierung der  $\alpha$ -Untereinheit des  $G_i$ -Proteins hemmt die AC, was den stimulierenden Effekt des  $G_s$ -Proteins antagonisiert [7, 146]. Außerdem wird z.T. von einer Stimulation der MAPK-Kaskade (mitogen activated protein kinase) mit anschließender Transkriptionsregulation über die  $G_i$ -Kopplung [27, 48], aber auch über  $G\alpha_s$  [130], berichtet.

Weitere Möglichkeiten der Stimulation der MAPK-Kaskade auf G-Protein unabhängigem Weg durch den  $\beta_2$ AR sind in der Literatur beschrieben. Die Phosphorylierung des Rezeptors durch die G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase 2 (GRK2) führt zur Rekrutierung von  $\beta$ -Arrestin-2. Arrestine wiederum können die Tyrosinkinase Src binden und so den MAPK-Signaltransduktionsweg stimulieren (Abbildung 3.2) [5, 74, 121, 122, 135].

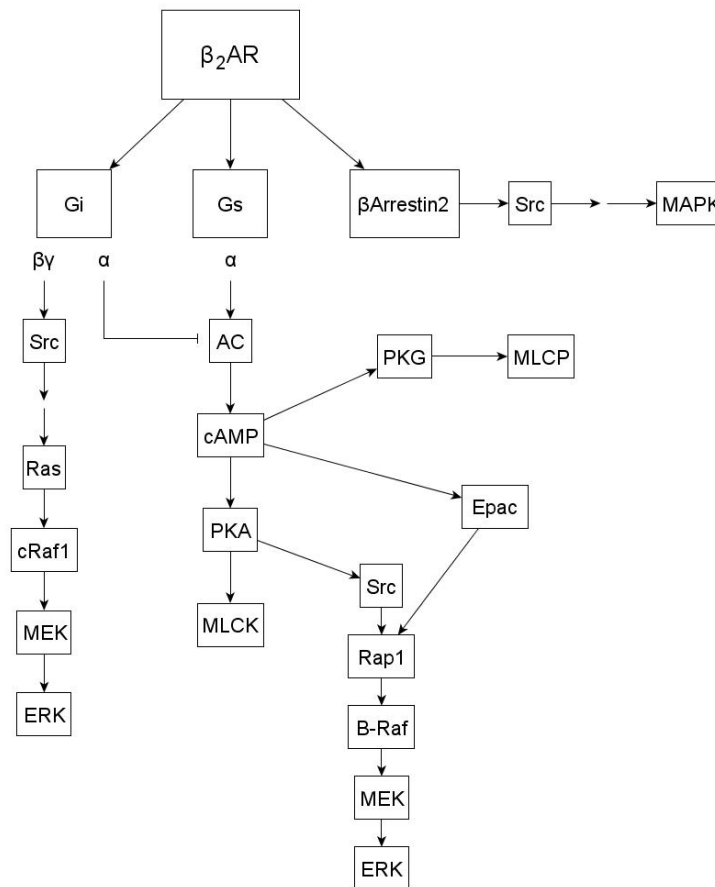


Abbildung 3.2: **Signaltransduktionswege des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors**  
Erläuterungen siehe Text [146, 36, 79, 32].

Um die Zellen vor einer übermäßigen Stimulation zu schützen, wird der Rezeptor nach Stimulation mit hohen Agonist-Konzentrationen durch die GRK2-vermittelte Phosphorylierung im C-Terminus sterisch an einer weiteren Aktivierung des G-Proteins gehindert (Abbildung 3.3 (2) und (3)) [82, 146]. Die Phosphorylierung von Serin 355/356 durch die GRK2 führt zur Bindung von  $\beta$ -Arrestin-2 ( $\beta$ Arr2) und einer vollständigen Lösung des Rezeptors vom G-Protein (Abbildung 3.3 (4) und (5)) [76, 82, 146]. Diese innerhalb von Sekunden nach Stimulation einsetzenden Schritte leiten die Rezeptor-Internalisierung ein (homologe Desensiti-

vierung) [105]. Die Rekrutierung der GRK2 zur Plasmamembran geschieht unter dem Einfluss der  $\beta\gamma$ -Untereinheit von  $G_s$  und Phospholipiden [77, 113] über die in der GRK2 vorhandene Pleckstrin-homologe Domäne [44]. Nach Phosphorylierung der GRK2 durch Proteinkinase C (PKC), PKA und c-Src wird sie vermehrt an die Plasmamembran transloziert [18, 28, 29, 44]. Bei niedrigen  $\beta_2$ -Agonist-Konzentrationen erfolgt eine Phosphorylierung des  $\beta_2$ AR durch PKA an Serin 261/262 in der IS3 und Serin 345/346 im C-Terminus [146], die heterologe, Agonist-abhängige Desensitivierung des Rezeptors. Vermutlich ist der hierfür verantwortliche PKA-Subtyp permanent über ein A-Kinase Ankerprotein, AKAP5 (auch AKAP79 oder AKAP150 genannt) in der Nähe des  $\beta_2$ AR lokalisiert [27]. Nach der Stimulation kommt es zur weiteren Bindung von AKAP12 (auch AKAP150 oder Gravin genannt) an den Rezeptor, was vermutlich eine Rolle bei der Resensitivierung und dem Recycling des Rezeptors nach Internalisierung spielt [27]. Außerdem besteht die Möglichkeit der  $\beta_2$ -Agonist unabhängigen Phosphorylierung des  $\beta_2$ AR durch PKA oder PKC, was dann ebenfalls heterologe Desensitivierung genannt wird.

Die Bindung von  $\beta$ -Arrestin-2 hat neben der G-Protein-unabhängigen Signaltransduktion zwei weitere Folgen: erstens die Translokation von Phosphodiesterase 4D5 (PDE4D5) [80, 135], welche vermutlich schon an  $\beta$ -Arrestin-2 gebunden vorliegt [87], und zweitens die Internalisierung des Rezeptors über Clathrin-ummantelte Einstülpungen (Clathrin-coated pits). Phosphodiesterasen stellen die einzige Möglichkeit der Zelle dar, das entstandene cAMP wieder abzubauen [7]. Die Rekrutierung der PDE4D5 zusammen mit  $\beta$ -Arrestin-2 zum Rezeptor führt zum cAMP-Abbau und dadurch zu einer Beendigung der Signaltransduktion des  $\beta_2$ AR über die AC.

Der nächste Schritt bei der Internalisierung, die nach wenigen Minuten Stimulation einsetzt, ist die Bindung der  $\beta_2$ -Adaptin-Untereinheit des Adapterprotein-2 (AP-2) an den Rezeptor- $\beta$ -Arrestin-2-Komplex [45]. Die anschließende Bindung von Clathrin führt zur Bildung der

Clathrin-coated pits (Abbildung 3.3 (6) und (8)), die dann mit Hilfe der großen GTPase Dynamin von der Zellmembran abgeschnürt werden (Abbildung 3.3 (9) und (10)) [16, 44].

Die Familie der Arrestine umfasst vier Mitglieder, Arrestin-1 und -4 sowie  $\beta$ -Arrestin-1 und -2. Arrestin-1 kommt in den Stäbchen und Zapfen des Auges, Arrestin-4 nur in den Zapfen vor [74].  $\beta$ -Arrestin-1 und -2 dagegen kommen ubiquitär vor und regulieren die Endozytose vieler GPCRs [3, 74]. Anhand der Bindung der  $\beta$ -Arrestine werden die Rezeptoren in zwei Klassen unterteilt. Klasse-A-Rezeptoren, zu welchen auch der  $\beta_2$ AR gehört, binden  $\beta$ -Arrestin-2 transient, werden aber ohne  $\beta$ -Arrestin-2 internalisiert [36, 55]. Klasse-B-Rezeptoren haben keine Präferenz für eine der beiden Subtypen und werden an  $\beta$ -Arrestin-1/2 gebunden internalisiert [36, 55]. Die vorübergehende Ubiquitinierung von  $\beta$ -Arrestin-2 spielt bei der Regulation der transienten Bindung an den Rezeptor eine wichtige Rolle. Mdm2 ist eine Typ-E3-Ligase [121], die eventuell sogar permanent an  $\beta$ -Arrestin-2 gebunden vorliegt und die Rezeptor-stimulierte Ubiquitinierung von  $\beta$ -Arrestin-2 katalysiert (Abbildung 3.3 (6)) [36, 74]. Die Ubiquitinierung erhöht die Affinität von  $\beta$ -Arrestin-2 gegenüber Clathrin und AP-2 [74] und stabilisiert den Rezeptor- $\beta$ -Arrestin-2-Komplex [123]. Die Bindung von  $\beta$ -Arrestin-2 an die GRK2-phosphorylierte Form des Rezeptors führt zu einer Konformationsänderung im  $\beta$ -Arrestin-2-Molekül, was erst dann die Ubiquitinierung zulässt [123]. Es wird außerdem vermutet, dass die Ubiquitinierung Voraussetzung für die G-Protein-unabhängige Aktivierung der MAPK-Kaskade ist [121]. Erst kürzlich wurde publiziert, dass auch die PDE4D5 durch die Mdm2 ubiquitiniert werden kann, was dann ihre Affinität gegenüber  $\beta$ -Arrestin-2 erhöht [80]. Die Ubiquitinierung von  $\beta$ -Arrestin-2 führt neben der Bindung von Clathrin und AP-2 auch zur Bindung der USP33-Deubiquitinase (Abbildung 3.3 (7)) [123], was zur Lösung des Rezeptor- $\beta$ -Arrestin-2-Komplexes führt (Abbildung 3.3 (8)) [123].

Nach Internalisierung des  $\beta_2$ AR (Abbildung 3.3 (10)) fusionieren die endozytotischen Vesikel mit Rab5-positiven frühen Endosomen (Abbildung 3.3 (11)) [6, 44, 64, 98]. Für die schnelle



Rückkehr an die Zellmembran wird der Rezeptor, gebunden an EBP50 [16, 130, 135, 140] im sauren Milieu der frühen Endosomen dephosphoryliert (Abbildung 3.3 (12)) und Rab4-abhängig an die Zellmembran recycled (Abbildung 3.3 (12) und (1)) [44, 119]. Bei starker Stimulation über längere Zeit kommt es zur sogenannten Downregulation der Rezeptordichte durch Abbau internalisierter Rezeptoren und verminderter Neusynthese [44]. Die Ubiquitinierung des  $\beta_2$ AR durch eine andere Typ-E3-Ligase, Nedd4, fördert seinen Abbau [15]. Die ubiquitinierte Form wird von den frühen Endosomen Rab7-abhängig in späte Endosome und anschließend in Lysosome transferiert (Abbildung 3.3 (11)), wo der Rezeptor degradiert wird [6, 100]. Eine weitere Möglichkeit, die Rückkehr des  $\beta_2$ AR an die Zelloberfläche zu verzögern, ist der Rab11-abhängige langsame Recyclingweg [98, 100]. Hierbei ist der Rezeptor länger internalisiert, ohne abgebaut zu werden [100].

Unter bestimmten Umständen kann es auch zu einer Aktivierung des  $\beta_2$ AR ohne Agonist kommen. Der Insulin-Rezeptor hat eine intrinsische Tyrosin-Kinase-Aktivität und kann nach Insulin-Stimulation den  $\beta_2$ AR am Tyrosin350 phosphorylieren [135]. Durch die Phosphorylierung entsteht im  $\beta_2$ AR ein SH2-Motiv, was zur Assoziation des Rezeptors mit c-Src, Grb2 und Dynamamin sowie zur Agonist-unabhängigen Stimulation der MAPK-Kaskade führt [145].

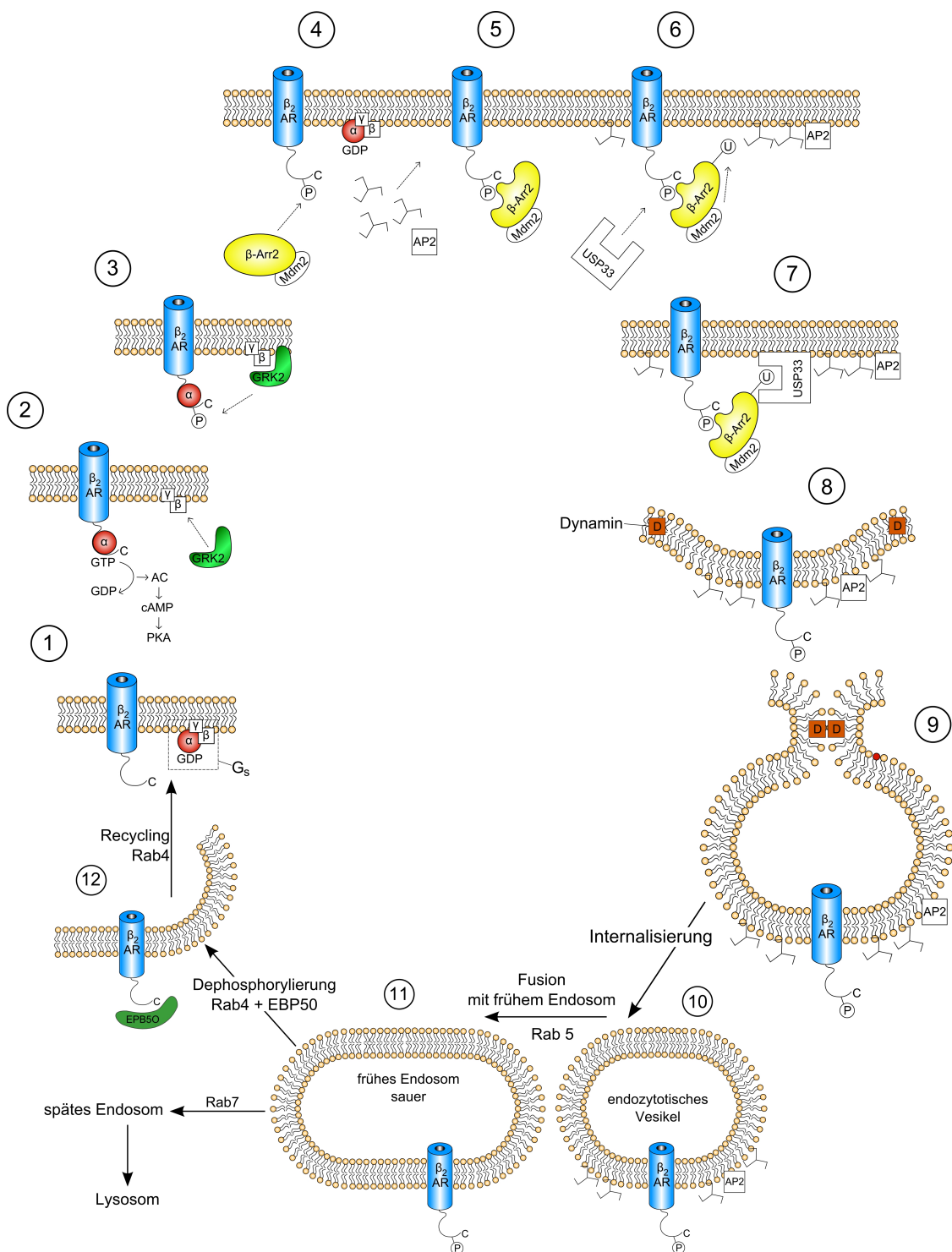


Abbildung 3.3: Internalisierung und Recycling des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors  
Erläuterungen siehe Text.

## 4 Efeu und seine Inhaltsstoffe

Der gemeine Efeu, lateinisch *Hedera helix* L., ist eine immergrüne Kletterpflanze aus der Familie der *Araliaceae* [53]. Die in der Therapie verwendeten Efeublätter-Trockenextrakte werden aus im Frühjahr geernteten, getrockneten Blättern hergestellt, welche Triterpensaponine, vor allem Hederacosid C sowie  $\alpha$ -Hederin und deren Aglycon Hederagenin enthalten. Weitere Bestandteile sind Flavonoidglykoside, z.B. Quercetin, Kämpferol und Rutin, Phenolcarbonsäuren, Polyacetylene, ätherisches Öl, Sterole und Cumarine [61]. Saponine sind in der Natur häufig vorkommende sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, die aus einem Steroid- oder Triterpengerüst mit einer oder mehreren Zuckerketten aufgebaut sind [46]. Man unterscheidet Monodesmoside mit einer Zuckerkette, wie  $\alpha$ -Hederin, von Bidesmosiden mit zwei Zuckerketten, wie Hederacosid C, und Tridesmosiden mit drei Zuckerketten [61]. Saponine haben aufgrund ihrer amphiphilen Struktur mit hydrophilen Zuckerketten und einem hydrophoben Grundgerüst Tensid-Eigenschaften, Membranaktivität und zeigen z.T. hämolytische Wirkung [61]. Im Efeublätter-Trockenextrakt werden die Saponine Hederacosid C und  $\alpha$ -Hederin als wirksamkeitsmitbestimmend angesehen (Abbildung 4.1) [124].

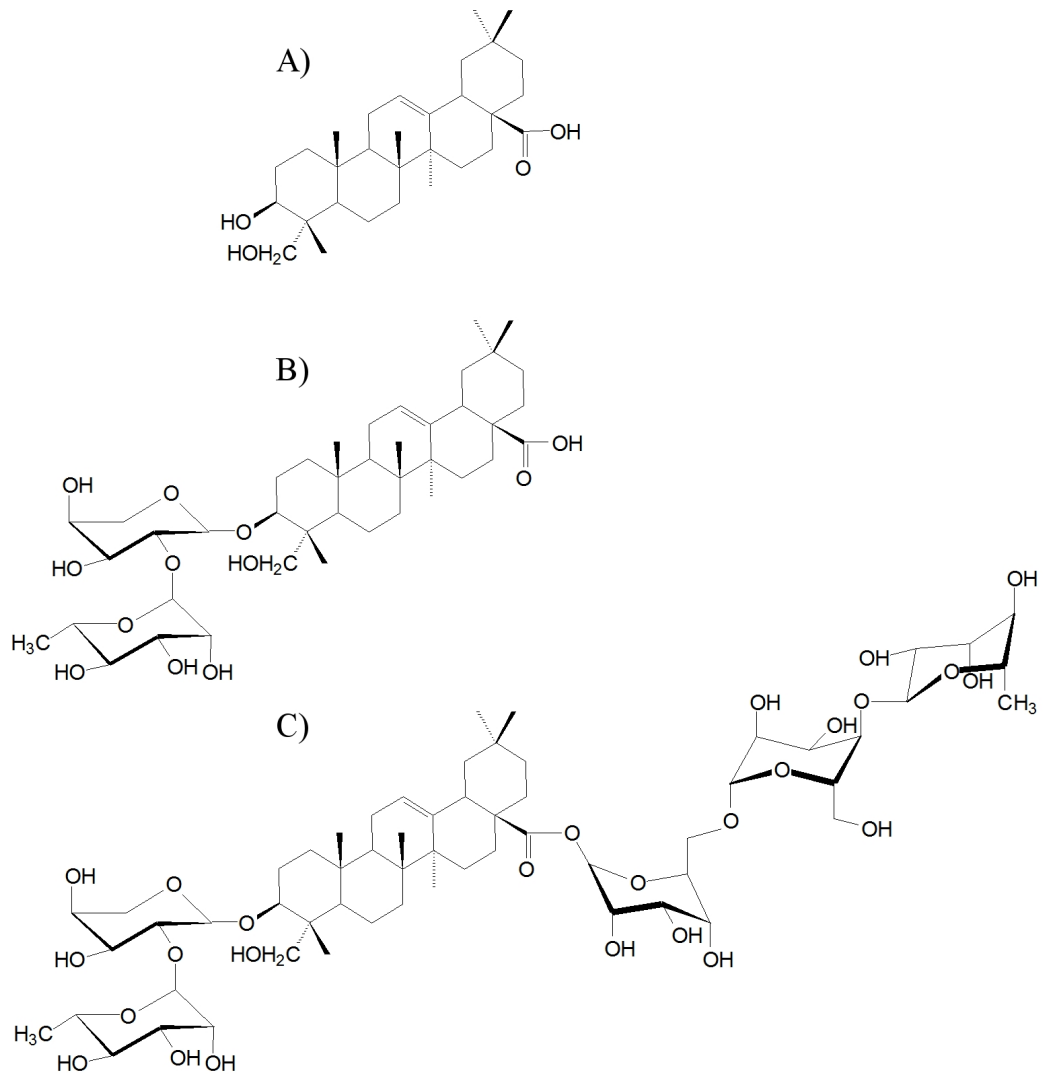


Abbildung 4.1: **Strukturformeln der beiden wichtigsten Saponine aus Efeublättern, sowie deren Aglykon**  
A) Hederagenin, B)  $\alpha$ -Hederin und C) Hederacosid C.

Das Hauptanwendungsgebiet für Extrakte aus Efeublättern sind akute und chronische obstruktive Lungenerkrankungen mit viskösem Schleim und Husten, was in der sekretolytischen und broncholytischen Wirkung von Efeu begründet liegt [61]. Vier kontrollierte klinische Studien und vier Anwendungsbeobachtungen zwischen 1992 und heute haben die klinische Wirksamkeit von Efeu bestätigt. In einer randomisierten, doppelblinden, cross-over, Placebo-kontrollierten Studie zeigten Mansfeld et al. 1998 die Überlegenheit eines ethanolischen Extraktes aus Efeublättern (DEV 5-7,5:1) gegenüber Placebo bei Kindern mit Asthma bronchiale [89]. Die untersuchten Lungenfunktionsparameter Vitalkapazität (VK), forcierte Vitalkapazität (FVK) und forciertes, expiratorisches Volumen in einer Sekunde ( $FEV_1$ ) zeigten eine signifikante Verbesserung nach dreitägiger Therapie. Der bronchodilatierende Effekt drei Stunden nach Einnahme schien dabei dem eines inhalativen  $\beta_2$ -Sympathomimetikums nahezu vergleichbar [89]. In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass Efeublätter-Trockenextrakt (DEV 5-7,5:1) dem synthetischen Expektorans Ambroxol, bei besserem Nebenwirkungsprofil, nicht unterlegen ist [96]. Die Ethanol-freien Darreichungsformen Zäpfchen und Kindersaft müssen höher dosiert werden, sind dann jedoch ebenso wirksam wie der ethanolische Extrakt [54, 88]. Durch das große Patientenkollektiv in den Anwendungsbeobachtungen konnte die Wirksamkeit und das günstige Nebenwirkungsprofil, mit dem seltenen Auftreten von milden und reversiblen Nebenwirkungen, bestätigt werden [42, 58, 59, 85].

Hinweise auf den genauen Wirkungsmechanismus von Efeublätter-Trockenextrakt ergaben Studien an A549-Zellen (Typ-II-Pneumozyten) und HEK293-Zellen, die den  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor ( $\beta_2AR$ ) als GFP-Fusionsprotein überexprimierten [124]. Die Internalisierung von  $\beta_2AR$ -GFP in HEK293-Zellen nach Stimulation mit dem  $\beta_2$ -Agonisten Terbutalin wurde durch  $\alpha$ -Hederin-Vorbehandlung, nicht aber durch Hederacosid C und das Agylcon Hederagenin gehemmt [124]. Durch Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie wurde der Einfluss von  $\alpha$ -Hederin, Hederacosid C und Hederagenin auf die  $\beta_2AR$ -Bindung an A549 Zellen unter-

sucht. Hierbei zeigte sich, dass  $\alpha$ -Hederin die Affinität der Bindung von Alexa-Noradrenalin zum  $\beta_2$ AR bei gleichbleibender Rezeptordichte in der Plasmamembran erhöhte [60, 124]. In der Folge konnte eine Zunahme der intrazellulären cAMP-Konzentration festgestellt werden, woraus sich insgesamt eine gesteigerte  $\beta_2$ -adrenerge Ansprechbarkeit der Zellen ergibt [124]. Diese Untersuchungen weisen darauf hin, dass  $\alpha$ -Hederin sowohl für die broncholytische als auch für die sekretolytische Wirkung von Efeublätter-Trockenextrakt eine wesentliche Komponente ist [124].

## 5 Ziel dieser Arbeit

Klinische Studien haben belegt, dass Efeublätter-Trockenextrakt (DEV 5-7,5:1) nicht nur sekretolytisch, sondern auch broncholytisch wirkt [54, 88, 89, 96]. Bisher gewonnene Daten zum Wirkungsmechanismus des Efeublätter-Trockenextrakts haben eine verbesserte Affinität der  $\beta_2$ AR-Bindung, einen gesteigerten cAMP-Spiegel und eine gehemmte Internalisierung des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors unter stimulierenden Bedingungen nach Vorbehandlung mit  $\alpha$ -Hederin, einem Saponin aus Efeu, gezeigt [60, 124].

Die vorliegende Arbeit soll einerseits helfen den biochemischen Prozess zu identifizieren, der durch  $\alpha$ -Hederin beeinflusst wird und zu einer Hemmung der Internalisierung des  $\beta_2$ AR führt. Andererseits soll anhand von isometrischen Kraftmessungen an isolierter Muskulatur aus Rinderluftröhren der Effekt der durch  $\alpha$ -Hederin-vermittelten Erhöhung der  $\beta_2$ -adrenergen Ansprechbarkeit auf das Kontraktions- und Relaxationsverhalten der glatten Muskulatur untersucht werden.

## **Teil II**

# **Material und Methoden**



# 6 Methoden

## 6.1 Zellkulturmethoden

### 6.1.1 Verwendete Zelllinie

Die seit Ende der 1970er-Jahre bestehende Zelllinie HEK293 (Human Embryo Kidney, DMSZ Nr. ACC 305) ist entstanden durch die Transformation einer menschlichen embryonalen Nierenzelle mit Teilen des Adenovirus5 [51]. HEK293-Zellen werden in der Literatur häufig als Zellsystem für die Überexpression des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors verwendet [6, 64, 91, 98, 143]. Die HEK293-Zellen wurden in DMEM/F-12 mit 5 % fötalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 10  $\mu\text{g/ml}$  Streptomycin gehalten.

### 6.1.2 Passagieren von Zellen

Die Zellen wurden auf 10 cm-Schalen bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach dem Erreichen einer Konfluenz von 80 bis 90 % wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml frischem Medium in ein Zentrifugationsröhrchen überführt. Nach Zentrifugation für 3 min bei

250 g wurde das Zellpellet in einem Milliliter frischem Medium resuspendiert und ein Viertel hiervon in einer neuen 10 cm-Schale mit frischem Medium in Kultur gehalten. Für die Versuche wurde die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Zellen entsprechend den Werten in Tabelle 6.1 ausgesät.

Tabelle 6.1: **Zellzahlen für die Aussaat in Well-Platten.**

<b>Zellart</b>	<b>Well-Platte</b>	<b>Zellzahl</b>
HEK293	6-Well	200 000 Zellen/Well
	12-Well	100 000 Zellen/Well
	24-Well	50 000 Zellen/Well
	96-Well	10 000 Zellen/Well

Für das Aussäen der HEK293-Zellen auf Deckgläsern für die Untersuchung der Internalisierung des  $\beta_2$ AR und auf 96-Well-Platten für die In-Cell-Western-Untersuchungen wurden diese Oberflächen vorher mit 100  $\mu$ g Poly-D-Lysin (PDL) pro Milliliter PBS für eine Stunde bei 37°C beschichtet. Nach dreimaligem Waschen mit PBS waren die Deckgläser bzw. Well-Platten gebrauchsfertig.

### **6.1.3 Auftauen von Zellen**

Für das Auftauen von HEK293-Zellen wurden die Kryoröhrchen dem Stickstoff-Tank entnommen und in ein 37°C warmes Wasserbad überführt. Unmittelbar nach dem Auftauen wurde die Zellsuspension unter sterilen Bedingungen in 5 ml frisches, raumtemperiertes Medium gegeben. Nach Zentrifugation für 3 min bei 250 g wurde das Zellpellet in 5 ml frischem Medium resuspendiert und die Zellen in einer 10 cm-Schale mit 10 ml frischem Medium ausgesät.

### 6.1.4 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren der HEK293-Zellen wurden die Zellen nach Erreichen einer Konfluenz von 80 bis 100 % mit frischem Medium von der 10 cm-Schale abgelöst und bei 250 g für 3 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Kryomedium, bestehend aus dem Medium für die Kultivierung mit doppeltem Gehalt an fötalem Kälberserum und 10 % DMSO resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Zum Einfrieren wurden die Kryoröhrchen zunächst für 10 min bei 4°C gelagert, um ein Diffundieren des DMSO in die Zellen sicherzustellen. Nach weiteren zwei Stunden bei -20°C wurden die Kryoröhrchen eine Nacht bei -80°C gelagert und dann in den Stickstofftank überführt.

### 6.1.5 Stabile Transfektion von HEK293-Zellen

Ein Konstrukt aus der DNA des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors und des eGFP (enhanced green fluorescence protein) in einem pcDNA3-Vektor wurde mit der Calciumphosphatpräzipitationsmethode in HEK293-Zellen transfiziert. Dieses Konstrukt war eine freundliche Gabe von Prof. Dr. Martin Lohse (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Würzburg). Die Klonierungsstrategie dieses Vektors wurde in Krasel et al. 2004 beschrieben [75].

Die Transfektion wurde bei einer Konfluenz von etwa 80 % einen Tag nach der Aussaat in 10 cm-Schalen durchgeführt. Hierfür wurden 10  $\mu$ g Plamid mit 250  $\mu$ l 1 M Calciumchlorid-Lösung, 750  $\mu$ l Wasser und 1000  $\mu$ l 2fach BBS-Puffer 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 8 ml Kulturmedium mit 10 % FCS wurde die gesamte Lösung auf die Zellen pipettiert. Nach Inkubation für fünf Stunden bei 37°C und 3 % CO<sub>2</sub> wurde das Medium mit der Plasmid-Lösung abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und 10 ml frisches Kulturmedium mit 5 % FCS zugegeben. Die Selektion der Zellen mit Expression des  $\beta_2$ AR-GFP

erfolgte durch Zugabe von 500  $\mu\text{g/ml}$  Geneticin (G418) 48 Stunden nach Transfektion. Nach sieben bis zehn Tagen entstanden einzelne Klone, die mit einer Pipettenspitze gepickt und in einem Well einer 12-Well-Platte resuspendiert wurden. Nach dem Erreichen einer Konfluenz von etwa 80 % wurde ein Teil der Zellen auf PDL-beschichteten Deckgläsern ausgesät und mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert, um die Transfektion mittels Fluoreszenz-Mikroskopie zu bestätigen. Die positiven Klone wurden bis zur weiteren Verwendung in 10 cm-Schalen kultiviert.

Die transfizierten Zellen werden im Folgenden als HEK293- $\beta_2$ AR-GFP-Zellen bezeichnet.

## 6.2 Studien zur Internalisierung des $\beta_2$ -adrenergen

### Rezeptors

#### 6.2.1 An fixierten Zellen

Das Internalisierungsverhalten des  $\beta_2$ AR wurde an HEK293- $\beta_2$ AR-GFP-Zellen untersucht. Die Stimulation der Zellen erfolgte auf PDL-beschichteten Deckgläsern bei einer Konfluenz von 70 bis 80 % mit 1 bzw. 10  $\mu\text{M}$  des  $\beta_2$ -Agonisten Salbutamol für 15, 30 und 60 min. Anschließend wurden die Zellen mit 4 % PFA und 15 % Succrose für 15 min bei 37°C fixiert. Nach dem Eindeckeln mit Mowiol-Lösung über Nacht wurden die Zellen am Laser Scanning Mikroskop (Zeiss LSM 510 Meta, Programm Zeiss LSM 510 Version 4.0) untersucht. Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder wurden wie folgt aufgenommen: Argon-Laser (28 % Leistung), Strahlenteiler HFT 488/543, Objektiv Plan-Apochromat<sup>®</sup> 63x/1.4 Oil DIC, Bandpassfilter BP 505-530, Lochblende 96  $\mu\text{m}$  und Auflösung 1024x1024 Pixel.

### 6.2.2 An lebenden Zellen

Die zeitabhängige Internalisierung von  $\beta_2$ AR wurde an lebenden HEK293- $\beta_2$ AR-GFP-Zellen untersucht. Hierfür wurden die Zellen auf PDL-beschichtete Deckgläser ausgesät. Nach Erreichen einer Konfluenz von 70 bis 80 % wurden die Deckgläser in eine spezielle Halterung (Eigenbau) eingespannt und mit 300  $\mu$ l Locke-Lösung, aufgewärmt auf 37°C, überdeckt. Das Laser Scanning Mikroskop verfügt über eine Inkubationskammer (Zeiss XL-LSM Prototyp 2), die für diesen Zweck auf 30°C erhitzt wurde (Heating Unit und Tempcontrol 37-2 digital von Pecon). Auf eine Begasung mit CO<sub>2</sub> wurde aufgrund der relativ kurzen Messzeit und der vorhandenen Pufferlösung verzichtet. Nach Auswahl geeigneter Zellen wurde 1  $\mu$ M Salbutamol zugesetzt und die Aufnahme von 50 Bildern, mit einer Auflösung von 512x512 Pixeln und einer Wartezeit von 10 sec zwischen den Bildern, gestartet. Alle anderen Meßbedingungen wurden wie bei der Aufnahme von fixierten Zellen gewählt.

### 6.2.3 Bildbearbeitung

Die Bildbearbeitung erfolgte mit den beiden Programmen LSM Image Browser 4.2 von Zeiss und GIMP 2.6.7 (GNU Image Manipulation Programm). Im ersten Schritt wurden die Bilder aus dem LSM Image Browser im jpeg-Format exportiert und in GIMP geöffnet. Repräsentative Teilbereiche der Bilder wurden invertiert und hinsichtlich Kontrast und Helligkeit verbessert. Zuletzt wurden die Konturen der Bilder mit einem GIMP-implementierten Filter geschärft (Abbildung 5.1).

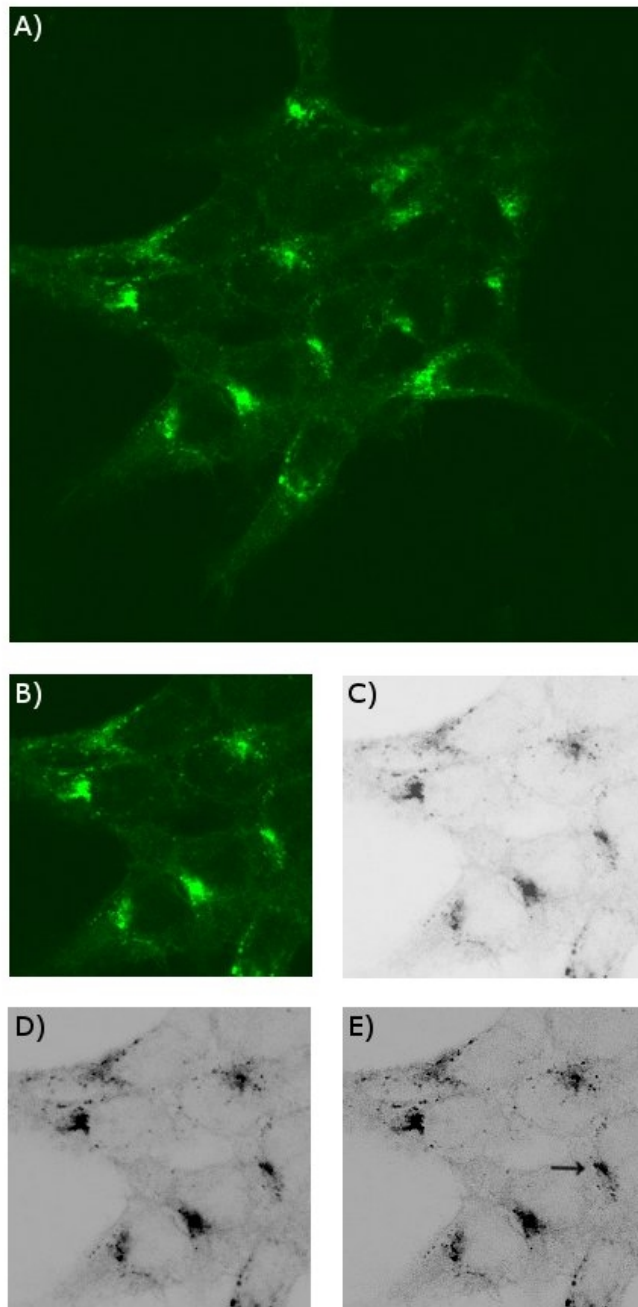


Abbildung 6.1: **Bildbearbeitung**

A) Bild vor Bearbeitung, B) Bildausschnitt zur Weiterbearbeitung, C) Bildausschnitt invertiert, D) Bild nach Verbesserung von Kontrast und Helligkeit, E) Bild nach Konturverbesserung.

## 6.3 Messung der Phosphorylierung des $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors

### 6.3.1 Westernblot

Die Aufarbeitung der Zellen für den Westernblot wurde in Anlehnung an das von Tran et al. veröffentlichte Protokoll durchgeführt [136]. Die in einer 10 cm-Schale nahezu konfluent gewachsenen HEK293- $\beta_2$ AR-GFP-Zellen wurden, nach Inkubation mit Serum-freiem Medium über Nacht und Stimulation mit 1  $\mu$ M Isoprenalin, einmal mit eiskaltem HE-Puffer gewaschen und mittels Zellschaber in 1 ml Solubilisierungspuffer resuspendiert und für 30 min bei 4°C in Bewegung gehalten. Anschließend wurden Zelltrümmer durch Zentrifugation mit 20 000 g für 15 min bei 4°C abgetrennt. Ein Teil des Überstandes wurde für eine Proteinbestimmung nach Bradford verwendet [19]. Der verbleibende Rest wurde mit dem gleichen Volumen Probenpuffer versetzt, für 15 min auf 65°C erhitzt und etwa 75  $\mu$ g Protein auf ein SDS-Gel (8 % Acrylamid) aufgetragen. Die Proteine wurden bei 100 V für 1,5 Stunden aufgetrennt. Nachfolgend wurden die Proteine im Semi-Dry-Verfahren mit 0,5 mA/cm<sup>2</sup> auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Die Nitrocellulosemembran wurde mit Ponceau-Lösung gefärbt und eingescannt, um eine etwa gleiche Proteinbeladung zu dokumentieren. Daraufhin wurde die Membran mit destilliertem Wasser gewaschen und über Nacht bei 4°C mit 5 % Milchpulver in TBS/T geblockt. Anschließend wurde der Erstantikörper in Blockpuffer gelöst (1:200) und die Membran eine Stunde bei Raumtemperatur darin inkubiert. Zur Messung der Phosphorylierung diente ein Kaninchen-Antikörper gegen die Phosphorylierungsstelle Serin355/356 des humanen  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors (anti-p $\beta_2$ AR). Zur Bestimmung des Gesamtgehaltes an  $\beta_2$ -adrenergem Rezeptor ( $\beta_2$ AR) wurde ein Kaninchen-Antikörper gegen den C-Terminus des humanen  $\beta_2$ AR (anti- $\beta_2$ AR) eingesetzt. Nach fünfmaligem Waschen mit 0,1 % Tween-

20 in TBS (TBS/T) wurde eine Stunde mit einem Peroxidase-gekoppelten Anti-Kaninchen Zweitantikörper (Peroxidase-GAR) inkubiert. Die Detektion erfolgte unter Verwendung des Super Signal West Pico Chemilumineszenz Kit der Firma Pierce, anschließendem Auflegen auf einen Röntgenfilm (Super RX von Fuji) für eine definierte Zeit (Belichtungszeit) und Entwickeln des Films.

### **6.3.2 In-Cell-Western-Methode**

Für die In-Cell-Western-Methode wurden HEK293- $\beta_2$ AR-GFP-Zellen in einer Dichte von 15 000 bis 20 000 Zellen pro Well und PDL-Beschichtung in einer 96-Well-Platte ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80 % kultiviert. Am Tag vor der Versuchsdurchführung wurde das Kulturmedium gewechselt und die Zellen über Nacht in Serum-freiem Medium gehalten. Die Vorbehandlung mit jeweils 1  $\mu$ M  $\alpha$ -Hederin, Hederacosid C oder Hederagenin fand zeitgleich mit der Inkubation in Serum-freiem Medium für 18 Stunden mit einer maximalen Ethanol-Konzentration von 0,01 % im Medium statt. Die Stimulation der Zellen erfolgte konzentrationsabhängig mit 10 bis 10 000 nM Isoprenalin für 10 min bei 37°C. Im Anschluss wurden die Zellen direkt mit 4 % PFA-Lösung und 15 % Succrose fixiert. Als Negativkontrolle wurden Zellen vor der Stimulation für 20 min mit 1  $\mu$ M GRK2-Inhibitor (5-[2-(5-Nitro-2-furyl)-ethylen]-furan-2-carbonsäuremethylester) inkubiert, der auch während der Stimulation anwesend war. Alle weiteren Schritte wurden bei Raumtemperatur und unter leichter Bewegung durchgeführt. Nach fünfmaligem Permeabilisieren mit 0,1 % Triton X-100 in TBS für jeweils 5 min wurden die freien Stellen mit 150  $\mu$ l Odyssey Blocking Puffer (Blocklösung) für eine Stunde geblockt. Die Inkubation mit dem Erstantikörper anti-p $\beta_2$ AR (1:200 in Blocklösung) fand für 2,5 Stunden im Dunkeln statt. Nachfolgend wurden fünf Waschschrte mit 0,1 % Tween-20 in PBS (PBS/T) durchgeführt. Der Kaninchen-Zweitantikörper gekop-



pelt an IRDye800 (IRDye800-GAR) wurde 1:800 in Blocklösung verdünnt und zusammen mit den Farbstoffen Draq5 und Sapphire700 für eine Stunde im Dunkeln mit den Zellen inkubiert. Die Messung erfolgte nach weiteren fünf Waschschritten mit PBS/T mit dem Odyssey<sup>®</sup> Imager (LI-COR Biosciences) und der dazugehörigen Software Odyssey<sup>®</sup> Application Software (Version 3.0.21) bei 700 und 800 nm und einer Intensität von 5,0. Die Daten wurden mit dem In-Cell-Western Plugin von LI-COR und Excel (Microsoft<sup>®</sup> Office 2003) ausgewertet, wobei das Signal im 700 nm Kanal (Zellzahl) als Basis für die Berechnung der Phosphorylierung (Signal bei 800 nm) genutzt wurde. Das verwendete Plugin integriert die Intensität des Signals über die Fläche des Wells. Für die Auswertung der konzentrationsabhängigen Phosphorylierung durch Isoprenalin wurden die Werte auf die Zellzahl normiert und als solche dargestellt (integrierte Intensität bei 800 nm). Der Einfluss der Saponine auf die Phosphorylierung wurde als prozentualer Anteil der Phosphorylierung mit 500 nM Isoprenalin für 10 min (% der 500 nM Isoprenalin-Antwort) berechnet und abgebildet.

## **6.4 Isometrische Kraftmessungen an der glatten**

### **Muskulatur der Rinderluftröhre**

#### **6.4.1 Präparation der Muskelstreifen**

Für die Präparation der Muskelstreifen<sup>1</sup> wurden Rinderluftröhren (Abbildung 5.1 A) verwendet, welche vom Schlachthaus zur Verfügung gestellt wurden. Während des Transports wurden die Luftröhren in Krebs-Henseleit-Lösung (KH-Lösung) gehalten. Zu Beginn der Präparation wurde ein Stück der Luftröhre abgetrennt, das drei Knorpelringe umfasste (Abbildung

---

<sup>1</sup>Die Experimente wurden am Institut für Molekulare Pharmakologie der Universität Groningen, Niederlande, unter der Leitung von Prof. Dr. Herman Meurs und Dr. Reinoud Gosens durchgeführt.

5.1 B). Alle nachfolgenden Schritte der Präparation erfolgten bei 37°C in KH-Lösung, die mit 95 % O<sub>2</sub>/5 % CO<sub>2</sub> ständig begast wurde. Zunächst wurde die dem Muskel gegenüberliegende Rundung der Knorpelspange entfernt. Nach Öffnen der Knorpelspange konnte seitlich eingeschnitten werden und von dort der Muskel mit angrenzendem Fettgewebe und Endothelschicht zur Mitte hin frei präpariert werden (Abbildung 5.1 C). Zuletzt wurde die Endothelschicht und der größte Teil des Fettgewebes entfernt (Abbildung 5.1 D). Der so präparierte Muskel (Abbildung 5.1 E) wurde quer in etwa 1 bis 2 mm dicke Streifen geschnitten. Die Streifen wurden zweimal mit DMEM mit 10 % fötalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 1,5 µg/ml Amphotericin B, 1 mM Natriumpyruvat, nicht-essentiellen Aminosäuren und 50 µg/ml Gentamicin gewaschen und bis zur Verwendung darin im Schüttelinkubator bei 37°C aufbewahrt. 24 Stunden vor den Versuchen wurde das Medium der Muskelstreifen gewechselt und dem frischen Medium 0,1 % Ethanol, 1 µM α-Hederin, 1 µM Hederacosid C oder 1 µM Hederagenin zugesetzt.

#### **6.4.2 Vorbereitung der Muskelstreifen**

Vor dem eigentlichen Versuch wurden die Muskelstreifen bereits mehrfach mechanisch vorgespannt und zur Überprüfung der Vitalität mit Kaliumchlorid vorkontrahiert. Hierzu wurden die Muskelstreifen an beiden Seiten mit einer Schlinge aus chirurgischem Faden versehen und in die mit 20 ml KH-Lösung gefüllten Organbäder gehängt (Abbildung 5.2 F). Die Lösung in den Organbädern wurde während des gesamten Versuches kontinuierlich mit 95 % O<sub>2</sub>/5 % CO<sub>2</sub> begast und auf 37°C gehalten. Die Kraftaufnehmer (Force Displacement Transducer Modell FT03, Grass Technology verbunden mit Polygraph Model 79D, Grass Technology) der Messstände wurden täglich vor dem Einhängen der Muskelstreifen mit Hilfe unterschiedlicher Gewichte hinsichtlich der gemessenen Schreibersignale kalibriert. Nach Befestigung der

Muskelstreifen unten an einem fixierten Haken und oben an einem beweglichen Kraftmesser wurden sie auf 1 g mechanisch vorgespannt und für 30 min einer Relaxation überlassen. Diese Prozedur wurde zwei Mal wiederholt, wobei der Muskel erst auf 2, dann auf 3 g gespannt wurde. Zwischen den Prozeduren wurde die KH-Lösung in den Bädern gewechselt. Nach Relaxation des mit 3 g mechanisch vorgespannten Muskelstreifens wurde dessen Vitalität durch Zugabe von Kaliumchlorid-Lösung in den Konzentrationen 20 und 40 mM getestet. Das Kaliumchlorid wurde anschließend durch dreifaches Waschen mit KH-Lösung entfernt und die Streifen ein letztes Mal auf 3 g mechanisch vorgespannt und für eine Stunde einer Relaxation überlassen. Die so vorbereiteten Muskelstreifen wurden sowohl für die Kontraktions- als auch Relaxationsversuche verwendet. Für die Normierung der Messdaten auf 1 mg Muskelgewebe wurden am Ende der Versuche die einzelnen Muskelstreifen direkt unterhalb der Schlingen abgeschnitten und ausgewogen.

Die Auswertung der Experimente erfolgte über die Höhen der Schreibersignale mit Hilfe einer linearen Regression der Kalibrierdaten. Das Anpassen von Kurvenfunktionen an Messdaten (Funktion:  $\log(\text{agonist})$  vs. response und  $\log(\text{inhibitor})$  vs. response), die Bestimmung der halbmaximalen effektiven Konzentration ( $EC_{50}$ ) und die Berechnungen zur statistischen Signifikanz mittels T-Test erfolgte mit Graphpad Prism (Version 5.02 GraphPad Software, San Diego, USA). Die halbmaximale effektive Konzentration ( $EC_{50}$ ) wird im Folgenden angegeben als negativer dekadischer Logarithmus der  $EC_{50}$  ( $pEC_{50}$ ).

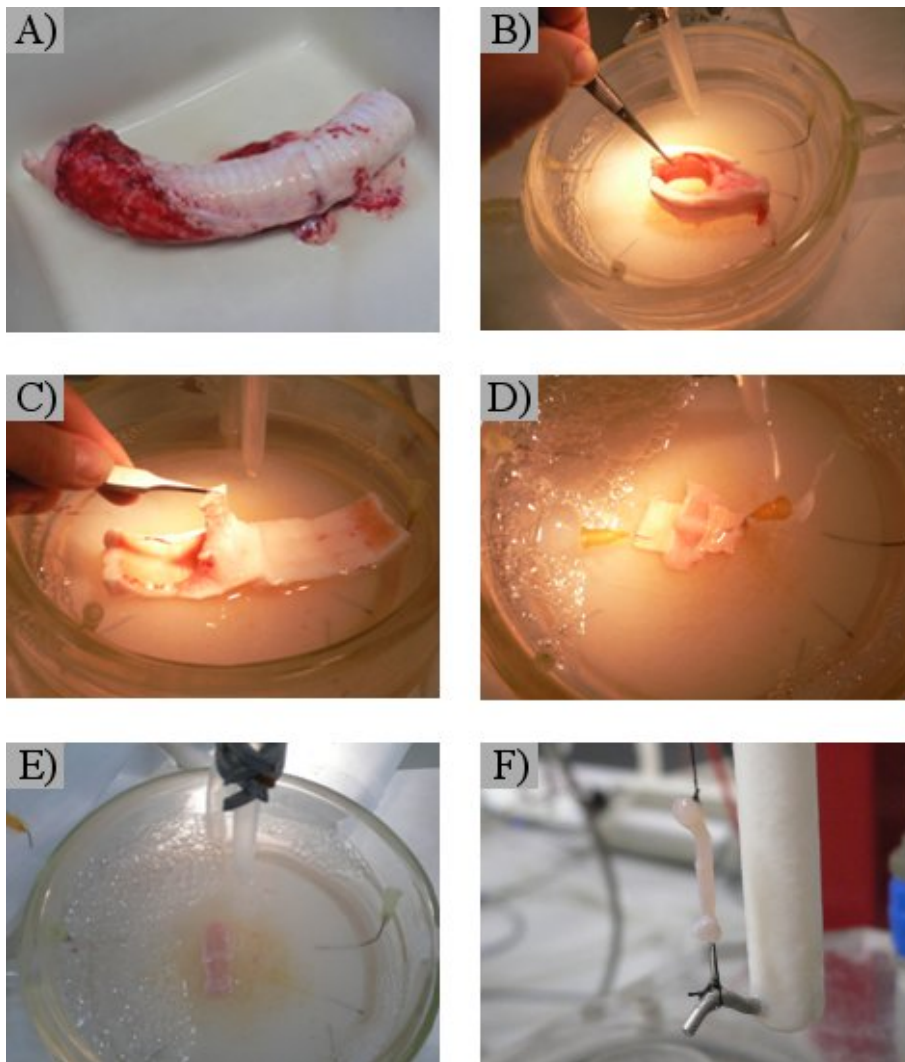


Abbildung 6.2: **Präparation von Muskelstreifen aus der Rinderluftröhre**

(A) Rinderluftröhre vor Beginn der Präparation; (B) Teil der Luftröhre bestehend aus 3 Knorpelringen, nachdem der dem Muskel gegenüberliegende Knorpelteil entfernt wurde; (C) Luftröhren-Abschnitt beim Ablösen der Knorpelspannen; (D) Muskel vor Ablösen des Fettgewebes und der Endothelschicht; (E) Muskel, bevor er in 1 bis 2 mm dicke Streifen geschnitten wurde; (F) eingespannter Muskelstreifen.

### 6.4.3 Kontraktionsversuche

Bei den Kontraktionsversuchen wurde nach Stabilisierung der Saponin-vorbehandelten Muskelstreifen mit steigenden Konzentrationen an Histamin (1 nM bis 100  $\mu$ M) eine Dosis-abhängige Kontraktion gemessen. Die Zugabe der nächsthöheren Histaminkonzentration erfolgte dabei nach dem Erreichen eines Plateaus im Signal. Als Positivkontrolle wurde 10  $\mu$ M Fenoterol 15 min vor Beginn des Kontraktionsversuches in die entsprechenden Organbäder gegeben. Für die Bestimmung des Einflusses der Saponine auf die Kontraktion wurde 0,1 % Ethanol, 1  $\mu$ M  $\alpha$ -Hederin, 1  $\mu$ M Hederacosid C oder 1  $\mu$ M Hederagenin während des kompletten Versuches zur KH-Lösung in den Organbädern hinzugefügt. Nach Erreichen der maximalen Kontraktion durch Zugabe der höchsten Dosis an Histamin wurden die Muskelstreifen durch wiederholtes Waschen vollständig relaxiert. Für den Einfluß der Saponine auf die Methacholin-vermittelte Kontraktion wurden Muskelstreifen mit 1 und 100  $\mu$ M Methacholin in Anwesenheit der Saponine oder Ethanol kontrahiert.

### 6.4.4 Relaxationsversuche

Für die Relaxationsversuche wurden die Saponin-vorbehandelten Muskelstreifen nach der letzten Relaxationsphase mit 100  $\mu$ M Histamin oder 1, 10 oder 100  $\mu$ M Methacholin vor-kontrahiert und eine Stabilisierung des Signals innerhalb von 30 bis 60 min abgewartet. Die anschließende Relaxation wurde nach kumulativer Zugabe von Isoprenalin-Konzentrationen von 1 nM bis 100  $\mu$ M gemessen. Auch hier wurde mit der weiteren Zugabe der Isoprenalin-Lösung abgewartet, bis sich ein stabiles Signal eingestellt hatte. Am Ende der Versuchsreihe wurden die Muskelstreifen gewaschen und ausgewogen.

# 7 Verwendete Chemikalien

## 7.1 Allgemein

Chemikalien	Abkürzung/Formel	Hersteller	Konzentration
4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure	HEPES	EMD Chemicals	
Acrylamid		Roth	
$\alpha$ -Hederin		Roth	
Amoniumpersulfat	APS	Roth	
Amphotericin B	Fungizone <sup>©</sup>	Invitrogen	250 $\mu$ g/ml
Ascorbinsäure		Merck	
Bradford-Reagenz	BioRad Protein Assay	BioRad	
Bromphenolblau		Sigma	
Calciumchlorid	CaCl <sub>2</sub>	Merck	
D-Glucose		Sigma	

## Material und Methoden

Chemikalien	Abkürzung/Formel	Hersteller	Konzentration
Dimethylsulfoxid	DMSO	Sigma	
Dithiothreitol	DTT	Sigma	
Dulbecco's Modified Eagle Medium	DMEM	Invitrogen	
DMEM/F-12 (1:1)		Invitrogen	
Dodecyl- $\beta$ -maltosid		Sigma	
Ethanol		Roth	99,8 %
Ethylendiamintetra-essigsäure	EDTA	Sigma	
Fenoterol		Sigma	
Fötale Kälberserum	FCS	Invitrogen	
Geneticin	G418	Invitrogen	
Gentamicin		Invitrogen	10 mg/ml
Glycerol		Fluka	87 %
GRK2 Inhibitor (5-[2-(5-Nitro-2-furyl)-ethenyl]-furan-2-carbonsäuremethylester)	$C_{12}H_9NO_6$	EMD Chemicals	
Hederacosid C		Extrasynthèse	
Hederagenin		Extrasynthèse	
Histamin		Fluka	
Isoprenalin		Sigma	

*Material und Methoden*

Chemikalien	Abkürzung/Formel	Hersteller	Konzentration
Kaliumchlorid	KCl	Merck	
Kaliumdihydrogenphosphat	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck	
L-Glutamin	L-Glut	Invitrogen	200 mM
Leupeptin		Sigma	
Magnesiumchlorid	MgCl <sub>2</sub>	Roth	
Magnesiumsulfat	MgSO <sub>4</sub>	Roth	
Methacholin	MCh	MP Biomedicals	
Methanol		Merck	
Milchpulver		Sucofin (Reformhaus)	
N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure	BES	Sigma	
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO <sub>3</sub>	Merck	
Natriumchlorid	NaCl	Merck	
Natriumdodecylsulfat	SDS	Sigma	
Natriumfluorid	NaF	Fluka	
di-Natriumhydrogenphosphat	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck	
Natriumpyrophosphat tetrabasisch		Riedel-de Haën	



*Material und Methoden*

Chemikalien	Abkürzung/Formel	Hersteller	Konzentration
Natriumpyruvat		Invitrogen	100 mM
Natronlauge	NaOH	Merck	1 M
nicht-essentielle Aminosäuren	NEAA	Invitrogen	100fach Stammlösung
Nitrocellulose	PROTRAN	Whatman	
Okadasäure		Sigma	
Odyssey Blocking Puffer		LI-COR	
Paraformaldehyd	PFA	Sigma	
Penicillin/Streptomycin	Pen/Strep	Invitrogen	
Phosphatase Inhibitor Cocktail 1		Sigma	
Protease Inhibitor Cocktail		Roche	
Poly-D-Lysin	PDL	Sigma	
Ponceau-Lösung		Roth	2 %
Salbutamol		Sigma	
Salzsäure	HCl	Roth	37 %
Sucrose		Sigma	
Super Signal West Pico Chemilumineszenz Kit		Thermo Scientific	
Tetramethylethylen-diamin	TEMED	Roth	

## Material und Methoden

Chemikalien	Abkürzung/Formel	Hersteller	Konzentration
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan		Merck	
Triton X-100		Merck	
Trypsin Inhibitor		Sigma	
Trypsin/EDTA		Invitrogen	0,05 %
Tween-20		Sigma	

Bei den genannten Firmen handelt es sich um die Folgenden:

Bio-Rad Laboratories, Inc. mit Sitz in Hercules, CA, USA

Extrasynthèse mit Sitz in Genay Cedex, Frankreich

Invitrogen Corporation mit Sitz in Carlsbad, CA, USA

LI-COR Biosciences, Inc. mit Sitz in Lincoln, NE, USA

Merck KGaA mit Sitz in Darmstadt, Deutschland mit der Tochtergesellschaft EMD Chemicals Inc.

MP Biomedicals (ehemals ICN Biomedicals) mit Sitz in Irvine, CA, USA

Hoffmann-La Roche, Ltd. mit Sitz in Basel, Schweiz

Carl Roth GmbH + Co.KG mit Sitz in Karlsruhe, Deutschland

Sigma-Aldrich Corporation mit Sitz in St.Louis, MO, USA mit den Tochtergesellschaften Fluka und Riedel-de Haën

Thermo Fisher Scientific mit Sitz in Waltham, MA, USA

und Whatman plc mit Sitz in Maidstone, UK.

## **7.2 Verwendete Antikörper**

Bei dem Antikörper gegen die Phosphorylierungsstelle Serin 355/356 des humanen  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors (anti-p $\beta_2$ AR) handelt es sich um den Kaninchen-Antikörper sc-16719-R der Firma Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Der Kaninchen-Antikörper sc-9042 gegen den C-Terminus des humanen  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors (anti- $\beta_2$ AR) wurde ebenfalls von der Firma Santa Cruz Biotechnology erworben. Der Ziegen-Sekundärantikörper (IRDye800-GAR) der Firma LI-COR Biosciences (Katalognummer 926-32211) gegen Kaninchen-IgG ist gekoppelt mit IRDye800, einem Farbstoff der bei 800 nm im Infrarot-Bereich angeregt wird. Außerdem wurde ein Ziegen-Sekundärantikörper (Peroxidase-GAR) gegen Kaninchen-IgG der Firma Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA) verwendet, der mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist (Katalognummer 170-6515).

## **Teil III**

# **Ergebnisse**

# 8 Studien zur Internalisierung des $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors

## 8.1 An fixierten Zellen

Aus vorangegangenen Versuchen ist bekannt, dass  $\alpha$ -Hederin die Internalisierung des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors ( $\beta_2$ AR) nach Terbutalin Stimulation verlangsamt, dessen Bindung von Alexa-Noradrenalin steigert und die cAMP-Produktion unter stimulierenden Bedingungen erhöht [124]. Die Kinetik der von Sieben et al. 2009 veröffentlichten Hemmung der Rezeptor-Internalisierung wurde hier unter Verwendung von Salbutamol untersucht. Die HEK293-Zellen, die das  $\beta_2$ AR-GFP-Konstrukt stabil exprimieren, wurden auf Poly-D-Lysin-behandelten Deckgläsern kultiviert.

In einem ersten Schritt wurde die Funktion des verwendeten  $\beta_2$ AR-GFP-Konstruktes durch Internalisierung mit zwei Salbutamol-Konzentrationen untersucht. Hierfür wurden die Zellen nach der Stimulation fixiert, eingedeckelt und Aufnahmen mit einem Laser Scanning Mikroskop gemacht. Abbildung 8.1 zeigt beispielhaft jeweils ein Bild pro Konzentration zu drei Zeitpunkten nach Zugabe des Salbutamols.

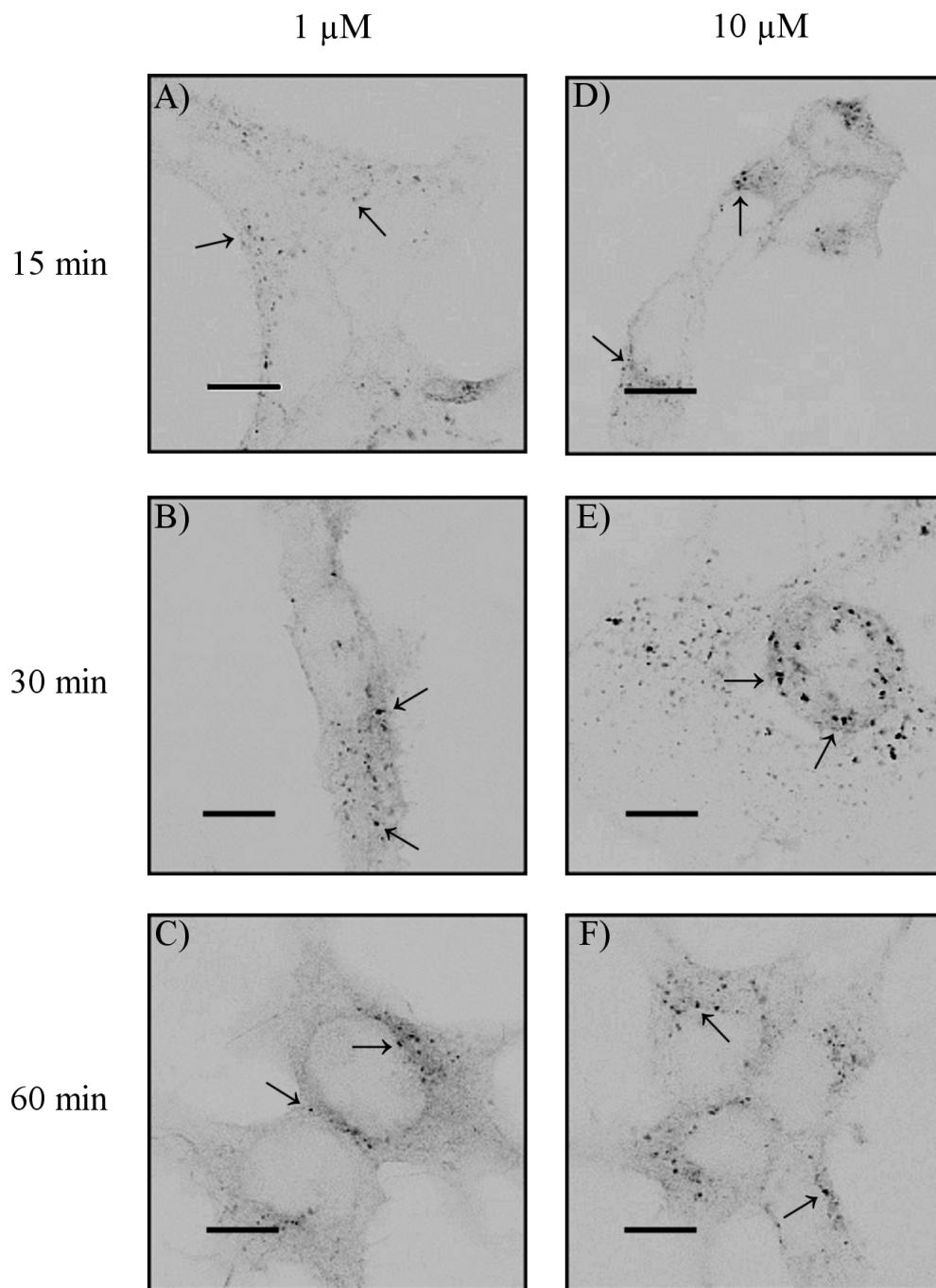


Abbildung 8.1: **Internalisierung des  $\beta_2\text{AR-GFP}$  in transfizierten HEK293-Zellen durch Salbutamol**

Stimulation mit 1  $\mu\text{M}$  (A-C) und 10  $\mu\text{M}$  (D-F) Salbutamol für 15 min (A, D), 30 min (B, E) oder 60 min (C, F), Pfeile markieren den internalisierten Rezeptor, Maßstabsbalken 10  $\mu\text{m}$ .

Die Stimulation des  $\beta_2$ AR mit 1  $\mu$ M Salbutamol, einem Agonisten mit moderater intrinsischer Aktivität [68], führt nach 15 min zu dessen Internalisierung in Form von vesikulären Strukturen (Abbildung 8.1 A), deren Anzahl und Größe zu späteren Zeitpunkten (30, 60 min) weiter steigt (Abbildung 8.1 A-C). Vergleichbare Befunde findet man auch bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M Salbutamol, wobei die Internalisierung hier deutlicher zu beobachten ist (Abbildung 8.1 D-F).

Der Einfluss der Saponine,  $\alpha$ -Hederin, Hederacosid C und Hederagenin auf die Internalisierung von  $\beta_2$ AR wurde darauf in einer Konzentration von 1  $\mu$ M nach Vorinkubation für 24 Stunden untersucht. Eine Konzentration von 1  $\mu$ M wurde gewählt, da die Zellen diese Konzentration gut tolerieren und Bioverfügbarkeitsstudien gezeigt haben, dass diese Konzentration erreicht werden kann [129]. Außerdem wurden auch bei Sieben et al. 2009 statistisch signifikante Effekte mit 1  $\mu$ M  $\alpha$ -Hederin erreicht [124]. Als Kontrolle dienten Zellen, welche 24 Stunden mit Vehikel (0,1 % Ethanol) vorinkubiert wurden. Eigene Voruntersuchungen haben gezeigt, dass der hemmende Einfluß von  $\alpha$ -Hederin auf die Internalisierung von  $\beta_2$ AR durch starke, agonistische Stimulation, z.B. 10  $\mu$ M Fenoterol, unerkant bleibt. Für die folgenden Studien wurde daher Salbutamol in einer Konzentration von 1  $\mu$ M zur Stimulation eingesetzt.

Abbildung 8.2 zeigt den zeitlichen Verlauf der Internalisierung unter dem Einfluss der Saponine zwischen 5 und 60 min. Die Vorbehandlung der Zellen mit 1  $\mu$ M der Saponine hat keinen Einfluss auf deren Morphologie (Abbildung 8.2 A, F, K, P). Im Vergleich zur Kontrolle verlangsamt die Vorinkubation mit  $\alpha$ -Hederin die Internalisierung des  $\beta_2$ AR (Abbildung 8.2 B, C, G, H). Hier treten nach 15 min die ersten vesikuläre Strukturen auf, deren Größe und Anzahl im weiteren Verlauf zunehmen (Abbildung 8.2 H-J). Spätestens nach 60 min ist der Zustand der Zellen in der Kontrolle und unter  $\alpha$ -Hederin Einfluss derselbe. Demgegenüber hemmen Hederacosid C und Hederagenin die Internalisierung nicht wesentlich. Erste

vesikuläre Strukturen sind bereits nach 5 min sichtbar und werden im Verlauf ausgeprägter (Abbildung 8.2 K-T).

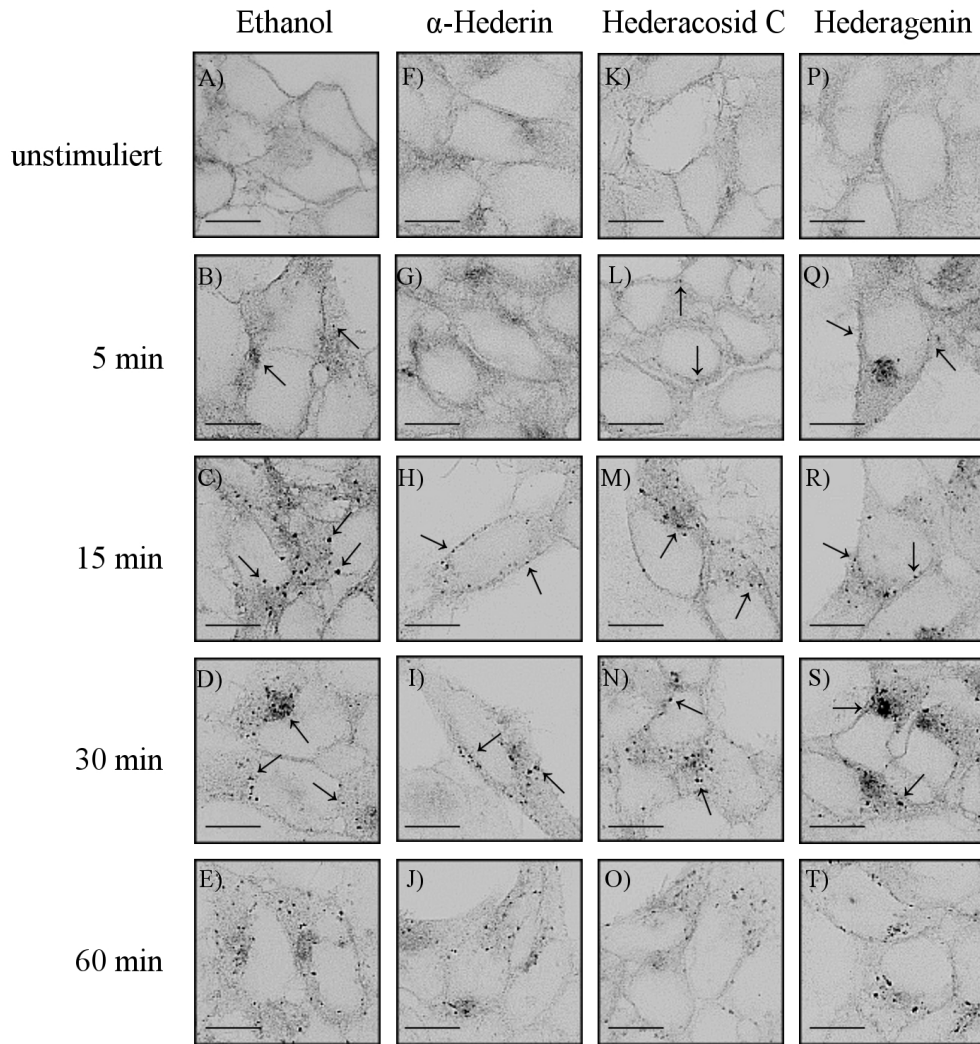


Abbildung 8.2: **Internalisierung des  $\beta_2$ AR-GFP in transfizierten HEK293-Zellen durch 1  $\mu$ M Salbutamol nach Vorbehandlung mit den Saponinen 0,1 % Ethanol (A-E), 1  $\mu$ M  $\alpha$ -Hederin (F-J), 1  $\mu$ M Hederacosid C (K-O) oder 1  $\mu$ M Hederagenin (P-T) vor Stimulation (A, F, K, P), nach 5 min (B, G, L, Q), nach 15 min (C, H, M, R), nach 30 min (D, I, N, S) und nach 60 min Stimulation (E, J, O, T), Pfeile markieren den internalisierten Rezeptor, Maßstabsbalken 10  $\mu$ m.**



## 8.2 An lebenden Zellen

Um den Vorgang der Internalisierung noch genauer untersuchen zu können, wurden Internalisierungsversuche an lebenden HEK293- $\beta_2$ AR-GFP-Zellen durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen auf Deckgläsern ausgesät und nach dem Anwachsen mit 0,1 % Ethanol oder 1  $\mu$ M  $\alpha$ -Hederin für 24 Stunden vorbehandelt. Die Deckgläser wurden anschließend in eine spezielle Halterung eingesetzt, mit Locke-Lösung überdeckt und im Mikroskop während der Stimulation beobachtet. Direkt nach Zugabe von 1  $\mu$ M Salbutamol wurde die Aufnahme von 50 Bildern, mit einem zeitlichen Abstand von 18 sec zwischen den Bildern, gestartet.

Abbildung 8.3 und die Fortsetzung 8.4 zeigen den hemmenden Effekt von  $\alpha$ -Hederin auf die Internalisierung an lebenden Zellen unter stimulierenden Bedingungen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. In Abbildung 8.3 C (Bild 10) ist zu erkennen, dass in Kontrollzellen die Internalisierung schon nach wenigen Minuten beginnt. Hier sind erste dunkler gefärbte Aggregate auf der Zellmembran zu erkennen. Nach weiteren 10 Bildern (340 sec) steigt die Anzahl der membranären Aggregate an und erste Vesikel werden von der Zellmembran abgeschnürt und wandern ins Zellinnere (Abbildung 8.4 E). Die mit  $\alpha$ -Hederin vorinkubierten Zellen hingegen zeigen nach 690 sec (Bild 40) keine Aggregate auf der Zellmembran oder internalisierte Rezeptoren (Abbildung 8.4 J).

Im weiteren Verlauf der Stimulation der Kontrollzellen ist erkennbar, dass der Rezeptor immer stärker in Form von vesikulären Strukturen internalisiert wird und die Größe und Anzahl der intrazellulären Vesikel ansteigt (Abbildung 8.4 G, I, K). Eine mit den Kontrollzellen vergleichbare, deutliche Internalisierung des  $\beta_2$ AR unter  $\alpha$ -Hederin Einfluss ist bis Bild 50 (870 sec) nicht erreicht und tritt offenkundig erst verzögert ein (Abbildung 8.4 L).

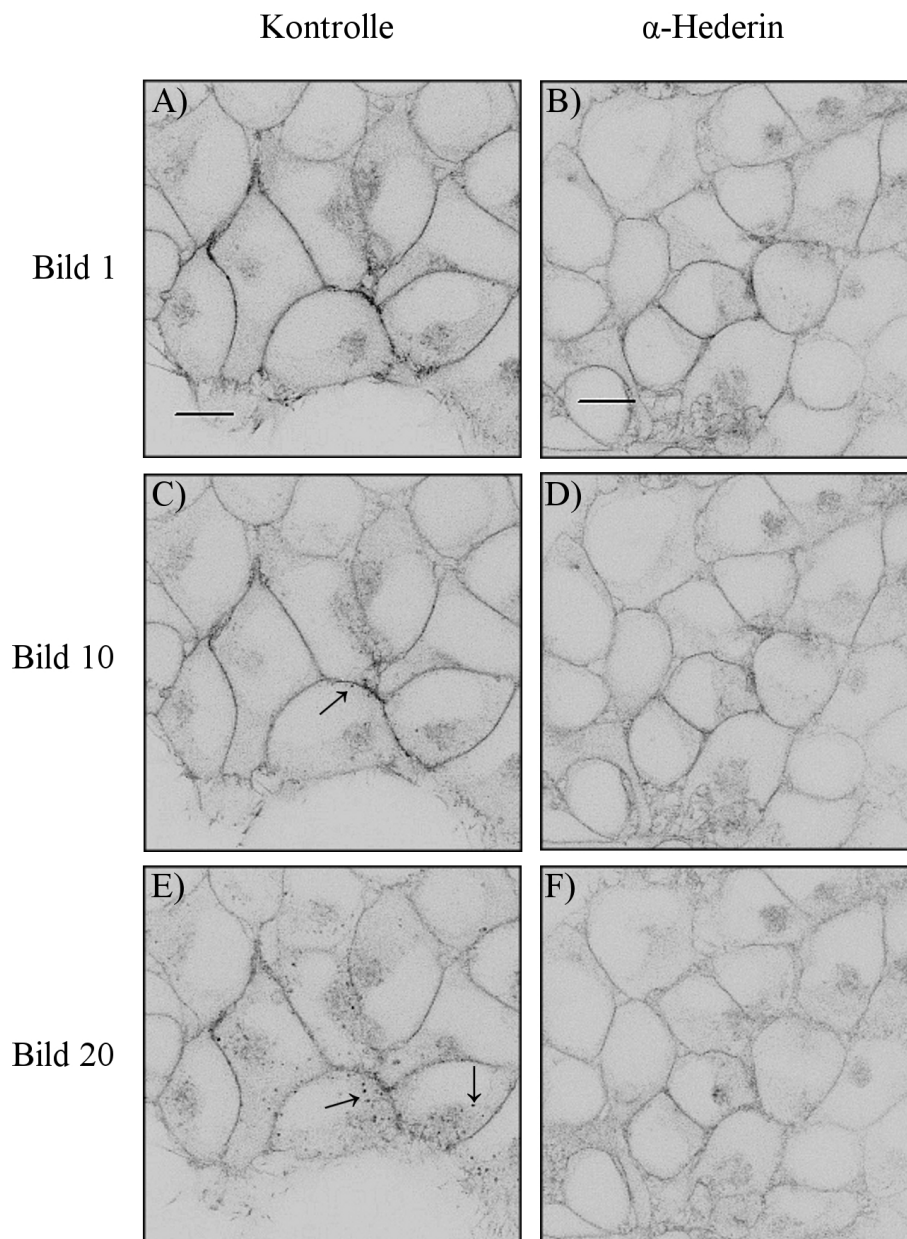
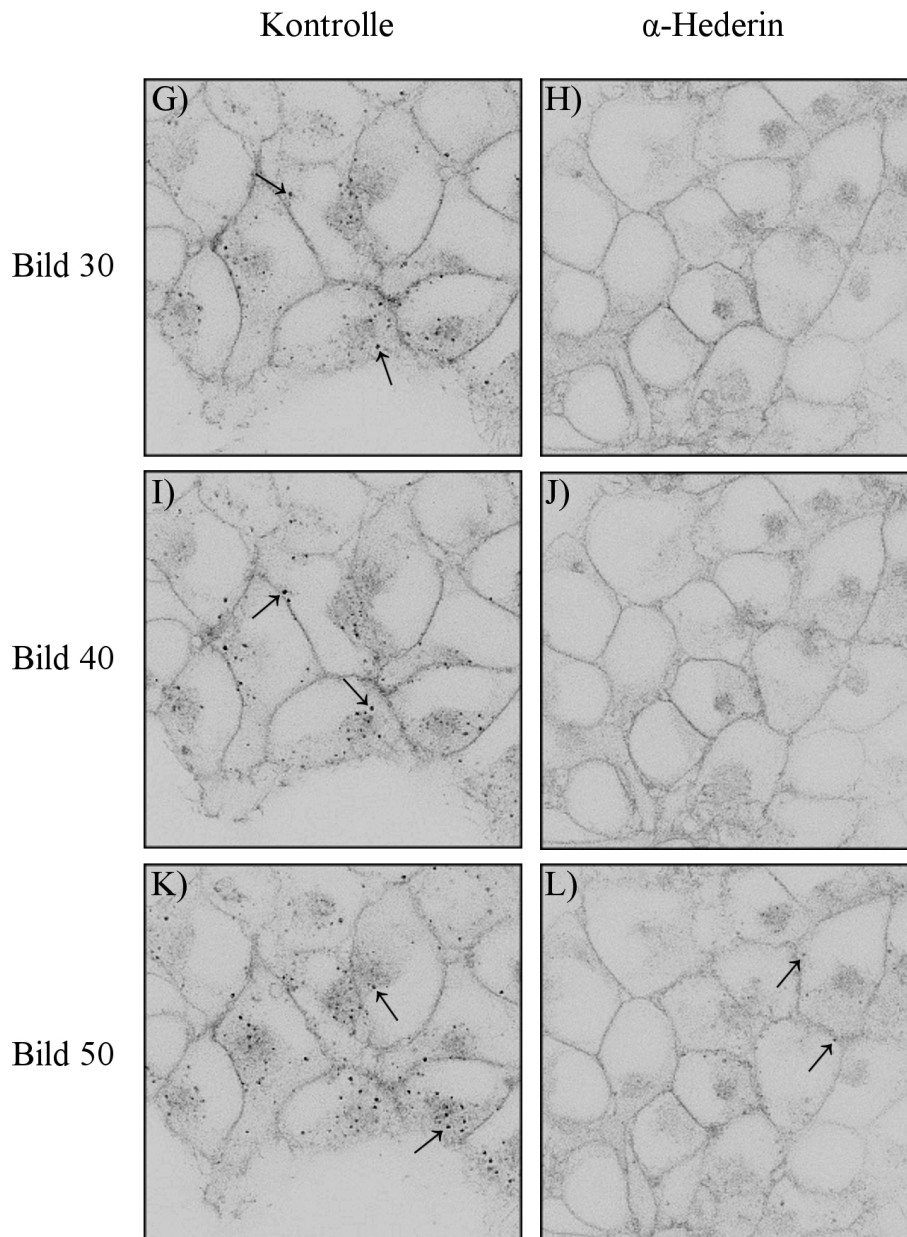


Abbildung 8.3: **Internalisierung des  $\beta_2$ AR-GFP in lebenden, transfizierten HEK293-Zellen durch 1  $\mu$ M Salbutamol nach Vorbehandlung mit  $\alpha$ -Hederin**  
Fortsetzung Abbildung 8.4.



Forts. zu 8.3 Abb. 8.4: **Internalisierung des  $\beta_2$ AR-GFP in lebenden, transfizierten HEK293-Zellen durch 1  $\mu$ M Salbutamol nach Vorbehandlung mit  $\alpha$ -Hederin**

Stimulation mit 1  $\mu$ M Salbutamol nach Vorinkubation für 24 Stunden mit 0,1 % Ethanol (A, C, E, G, I, K) oder 1  $\mu$ M  $\alpha$ -Hederin (B, D, F, H, J, L), direkt nach Zugabe (A, B), 160 sec (C, D), 340 sec (E, F), 520 sec (G, H), 690 sec (I, J) und 870 sec (K, L), Pfeile markieren den internalisierten Rezeptor, Maßstabsbalken 10  $\mu$ m.

## 9 Messung der Phosphorylierung des $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors

Im Verlauf regulatorischer Prozesse führt eine Stimulation des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors mit einem  $\beta_2$ -Agonisten dazu, dass der Ligand-besetzte Rezeptor durch die G-Protein-gekoppelte Rezeptor Kinase 2 (GRK2) phosphoryliert wird (homologe Desensitivierung). Diese Phosphorylierung hemmt eine weitere Stimulation mit anschließender Aktivierung der G-Proteine und führt zur Bindung von  $\beta$ -Arrestin-2. Die Bindung von  $\beta$ -Arrestin-2 bewirkt eine Rekrutierung weiterer Proteine wie Clathrin und Adapterprotein-2 (AP-2), was dann über Clathrinummantelte Einstülpungen (clathrin-coated pits) zur Internalisierung des Rezeptors führt. Ein möglicher Grund für die gehemmte Internalisierung des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors nach  $\alpha$ -Hederin-Vorinkubation könnte seine verminderte GRK2-vermittelte Phosphorylierung nach Stimulation sein.

Die Identifizierung des  $\beta_2$ AR-GFP-Proteins wurde mit Hilfe eines anti- $\beta_2$ AR-Antikörpers im Westernblot (WB) durchgeführt. Ein weiterer Blot zur Detektion der phosphorylierte Form des Rezeptors mit einem Antikörper gegen die Phosphorylierungsstelle Serin355/Serin356 des humanen  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors weist die Funktionalität des verwendeten Antikörpers nach und zeigt gleichzeitig, dass die GRK2 das Fusionsprotein unter stimulierenden Bedingungen

phosphoryliert (Abbildung 9.1).

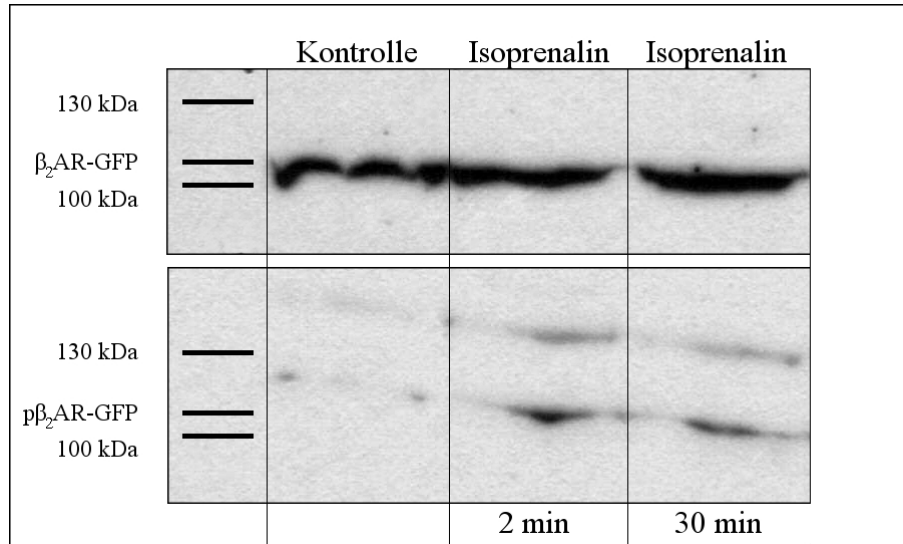


Abbildung 9.1: **Westernblot auf  $\beta_2$ AR-GFP und dessen phosphorylierte Form in HEK293- $\beta_2$ AR-GFP-Zellen**

$\beta_2$ AR-GFP (oben) und p $\beta_2$ AR-GFP (unten) nach Stimulation mit 1  $\mu$ M Isoprenalin für 2 min und 30 min, sowie die unstimulierte Kontrolle, Erstantikörper (oben) anti- $\beta_2$ AR 1:500, Erstantikörper (unten) anti-p $\beta_2$ AR 1:200, Zweitantikörper Peroxidase-GAR 1:2500, Belichtungszeit 15 min.

Zur Quantifizierung der Phosphorylierung des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors wurde die sogenannte In-Cell-Western-Methode verwendet. Bei dieser Methode werden die Zellen direkt nach Stimulation mit Paraformaldehyd (PFA) fixiert, was eine Dephosphorylierung verhindert. Im Anschluss werden die Zellen mit Triton X-100 permeabilisiert, mit Blockpuffer geblockt und mit dem Erstantikörper inkubiert. Während der nachfolgenden Inkubation mit dem Zweitantikörper (IRDye800-GAR) findet auch die Färbung mit den beiden Zellkernfarbstoffen Draq5 und Sapphire700 statt, welche bei der Auswertung zur Quantifizierung der Zellzahl dient.

In Kontrollexperimenten vermittelte Isoprenalin eine dosisabhängige Phosphorylierung des  $\beta_2$ AR in einem Konzentrationsbereich von 100 bis 10 000 nM bei einer Inkubationszeit von

10 min. Bei Stimulationen  $\leq 100$  nM Isoprenalin war kein Unterschied zur unstimulierten Kontrolle sichtbar, während oberhalb von 1000 nM keine weitere Zunahme der Phosphorylierung detektierbar war (Abbildung 9.2).

Um eine geeignete Isoprenalin-Konzentration zu finden, bei der sowohl eine Steigerung als auch eine Hemmung der Phosphorylierung durch die Testsubstanzen beobachtet werden kann, wurde der Bereich zwischen 100 und 750 nM Isoprenalin genauer untersucht (Abbildung 9.3).

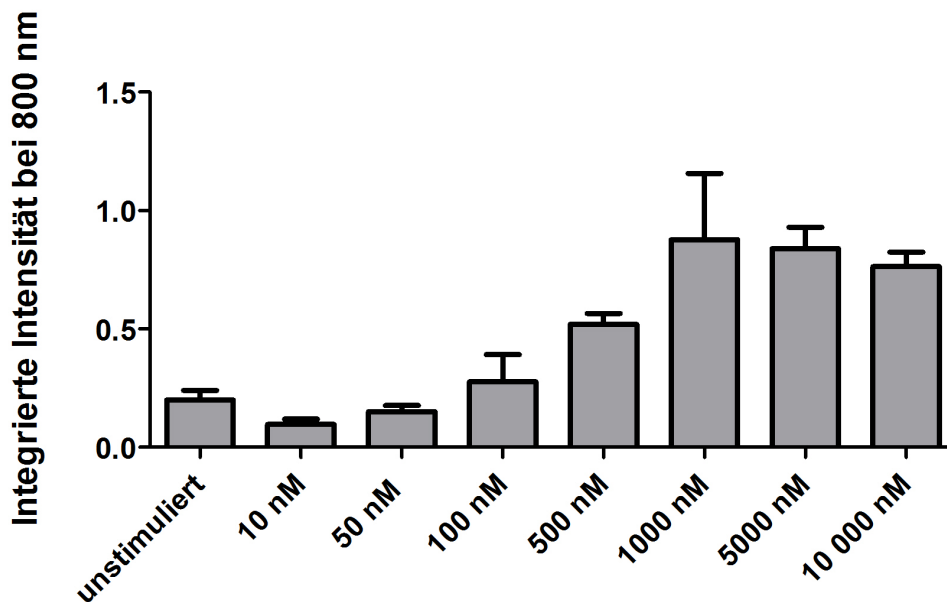


Abbildung 9.2: **Phosphorylierung des  $\beta_2$ AR-GFP an Ser355/356 in HEK293- $\beta_2$ AR-GFP-Zellen durch Isoprenalin**

Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen an Isoprenalin für 10 min, dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $n = 3$ .

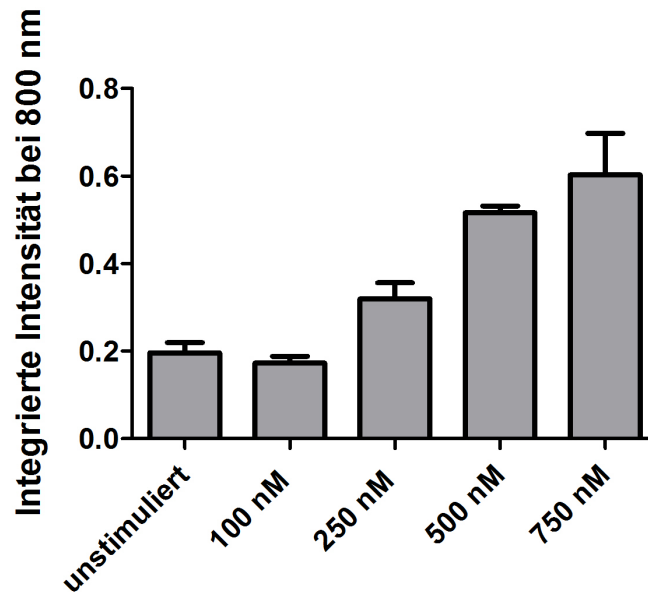


Abbildung 9.3: **Optimierung der Isoprenalin-Konzentration für die homologe Desensitivierung des  $\beta_2$ AR-GFP**

Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen an Isoprenalin für 10 min, dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, n = 3.

Für die Versuche zum Einfluss der Vorbehandlung von HEK293- $\beta_2$ AR-GFP-Zellen mit jeweils 1  $\mu$ M  $\alpha$ -Hederin, Hederacosid C und Hederagenin für 24 Stunden auf die GRK2-vermittelte homologe Desensitivierung des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors wurde 500 nM Isoprenalin für 10 min als geeignete Stimulation gewählt. Als Kontrolle wurden Zellen vor der Stimulation mit einem GRK2-Inhibitor (5-[2-(5-Nitro-2-furyl)-ethenyl]-furan-2-carbonsäuremethylester) inkubiert.

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle findet man bei den mit  $\alpha$ -Hederin vorbehandelten Zellen nur noch 45 % der Isoprenalin-Antwort. Demgegenüber wurde eine vergleichbare Hemmung von 60 % auf eine Restphosphorylierung von 40 % beim GRK2-Inhibitor gefunden. Hederacosid C und Hederagenin senken ebenfalls die Phosphorylierung um 50 % und 45 %

vom Ausgangswert. Die Hemmung der Phosphorylierung sowohl für den GRK2-Inhibitor als auch für die Saponine ist höchst signifikant (\*\*p<0,0001).

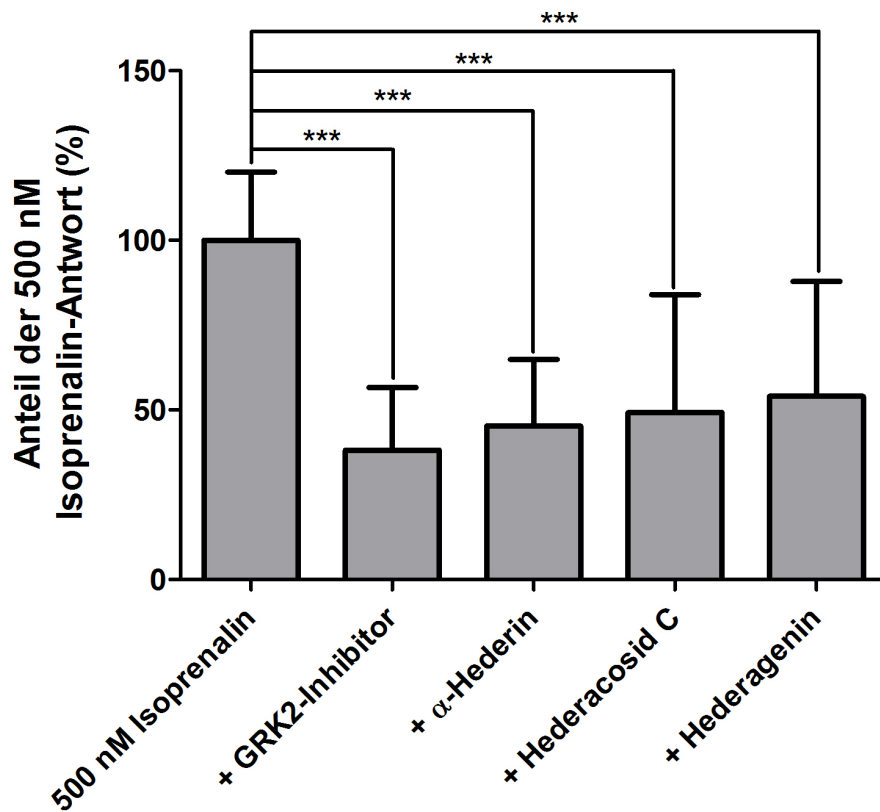


Abbildung 9.4: **Phosphorylierung des  $\beta_2$ AR-GFP an Ser355/356 durch Isoprenalin nach Vorbehandlung mit den Saponinen**

Stimulation mit 500 nM Isoprenalin für 10 min nach Vorinkubation mit 0,01 % Ethanol (Kontrolle), 1  $\mu$ M  $\alpha$ -Hederin, 1  $\mu$ M Hederacosid C und 1  $\mu$ M Hederagenin für 24 Stunden oder 20 min 1  $\mu$ M GRK2-Inhibitor, dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, n = 15 an 4 unabhängigen Versuchstagen, \*\*\*p<0,0001.



# **10 Isometrische Kraftmessungen an der glatten Muskulatur der Rinderluftröhre**

## **10.1 Kontraktionsversuche**

Präparate mit Efeublätter-Trockenextrakt werden bei chronisch-entzündlichen Bronchialerkrankungen und akuten Entzündungen der Atemwege mit produktivem Husten eingesetzt. Der Einfluss von  $\alpha$ -Hederin, Hederacosid C und Hederagenin auf die Histamin- oder Methacholinvermittelte Kontraktion der glatten Muskulatur der Lunge wurde an isolierten Muskelstreifen der glatten Muskulatur der Rinderluftröhre als Model untersucht.

Die Muskelstreifen wurden nach der Präparation 24 Stunden mit den Saponinen in einer Konzentration von  $1 \mu\text{M}$  vorbehandelt und anschließend mit steigenden Histamin-Konzentrationen kontrahiert. Wie in Abbildung 10.1 anhand der nah bei der Kontrolle liegenden Kurven erkennbar, haben die Saponine keinen Einfluss auf die Histamin-induzierte Kontraktion der glatten Muskulatur aus der Rinderluftröhre. Dies ist auch im Vergleich der Werte für den negativen, dekadischen Logarithmus der  $\text{EC}_{50}$ -Werte ( $\text{pEC}_{50}$ ) erkennbar (Abbildung 10.2). Als Positiv-

kontrolle diente die Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Fenoterol, welches 15 min vor Beginn der Kontraktion zugegeben wurde und während des gesamten Versuches anwesend war. Fenoterol als  $\beta_2$ -Agonist vermittelt nach Aktivierung des  $\beta_2\text{AR}$  die Relaxation der glatten Muskulatur. Dieser Effekt zeigt sich durch eine Verlagerung der Kurve zu höheren Histamin-Konzentrationen (Abbildung 10.1) und damit einhergehend einer Erniedrigung der  $\text{pEC}_{50}$  (Abbildung 10.2).

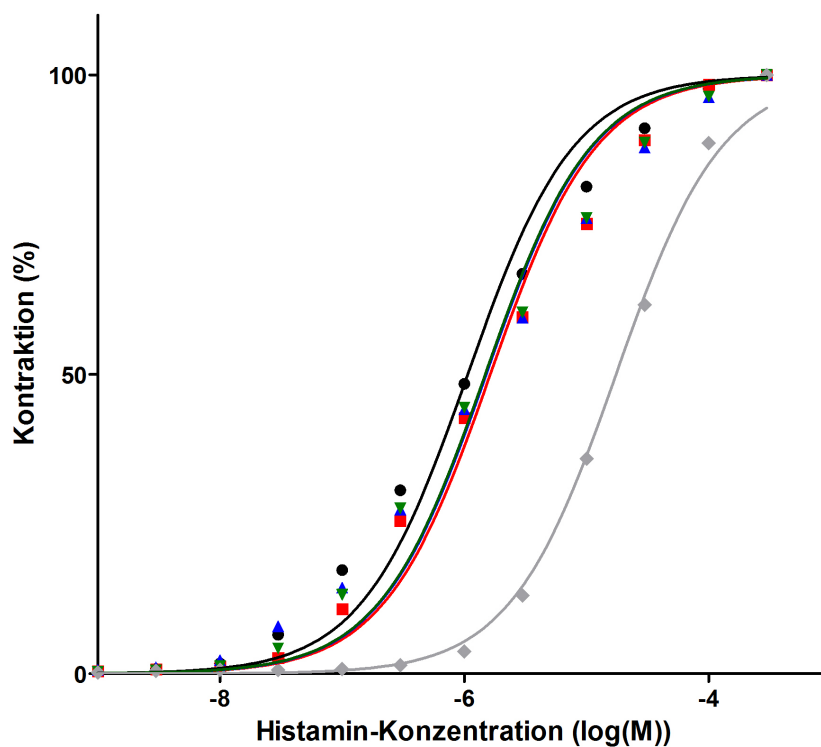


Abbildung 10.1: **Einfluss der Saponine auf die Kontraktion von glatten Muskelstreifen aus der Rinderluftröhre**

0,1 % Ethanol als Kontrolle = schwarze Kreise, 1  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Hederin = rote Quadrate, 1  $\mu\text{M}$  Hederacosid C = blaue Dreiecke nach oben, 1  $\mu\text{M}$  Hederagenin = grüne Dreiecke nach unten, je 24 h Vorbehandlung und 10  $\mu\text{M}$  Fenoterol für 15 min = graue Rauten, dargestellt als Mittelwerte,  $n = 8$ .

Auf die Darstellung der Standardabweichung wurde der besseren Übersichtlichkeit wegen verzichtet.

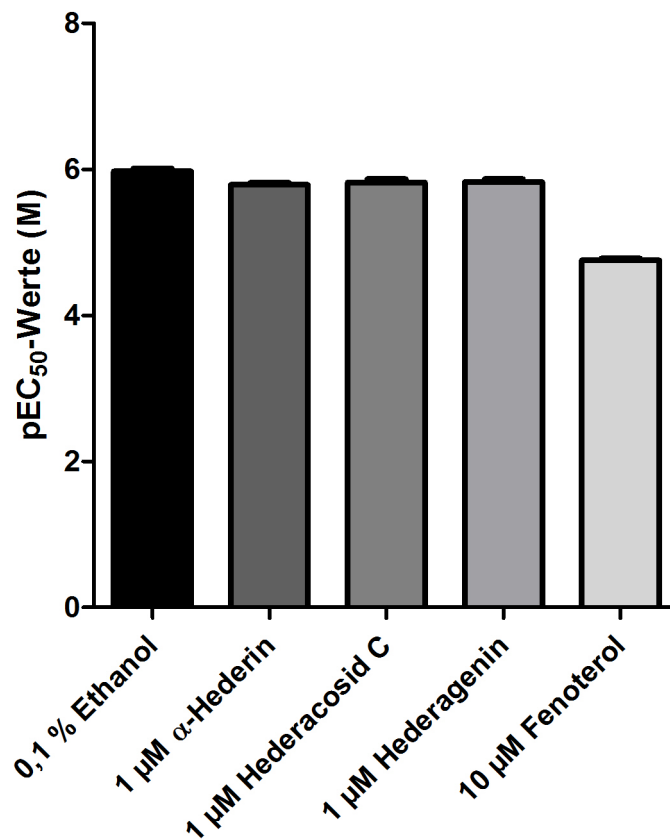


Abbildung 10.2: **pEC<sub>50</sub>-Werte der Saponine für die Histamin-induzierte Kontraktion glatter Muskulatur**  
Abgebildet als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung mit  $n = 8$ .

Der Einfluss der Saponine auf die durch muskarinische Acetylcholinrezeptoren-vermittelte Kontraktion der glatten Muskulatur der Rindertrachea wurde mit Methacholin (MCh) bei Konzentrationen von 1 und 100  $\mu\text{M}$  untersucht und entsprechend mit Histamin verglichen (Abbildung 10.3). Dabei zeigte sich, dass die Saponine auch auf die MCh-vermittelte Kontraktion, die im Vergleich zu Histamin deutlich stärker ausfällt, keinen Einfluss haben.

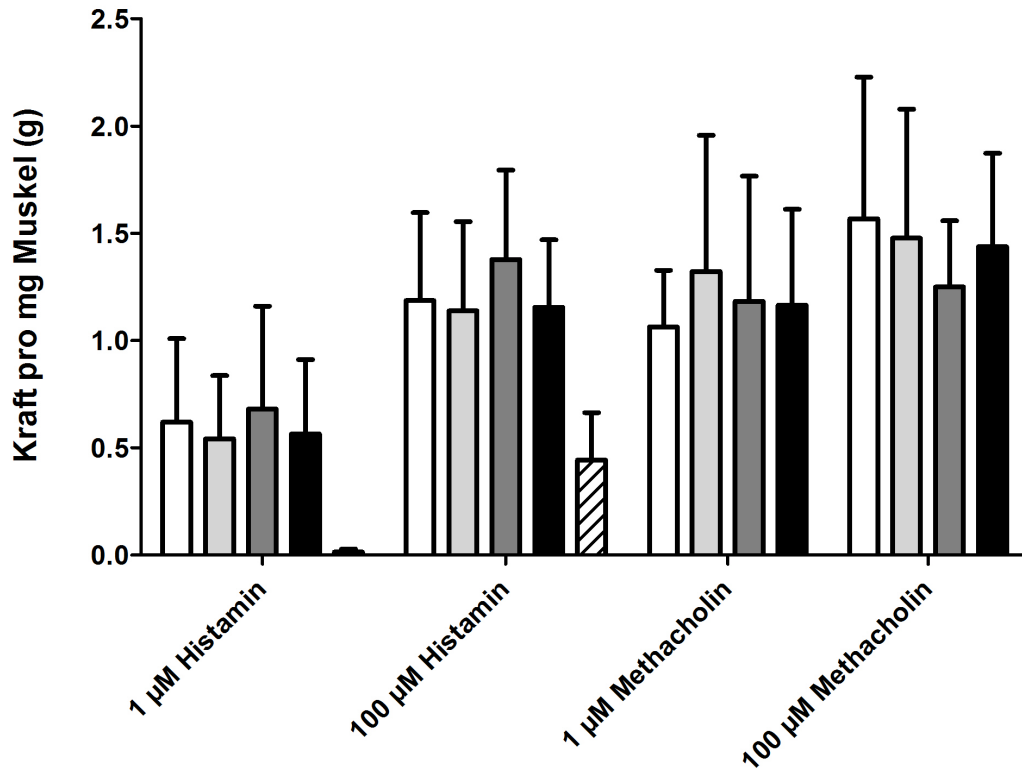


Abbildung 10.3: **Vergleich der Histamin- und Methacholin-vermittelten Kontraktion nach Vorbehandlung der glatten Muskelstreifen mit den Saponinen**

Kraft pro Milligramm Muskelgewebe nach Stimulation mit 1  $\mu$ M Histamin, 100  $\mu$ M Histamin, 1  $\mu$ M Methacholin und 100  $\mu$ M Methacholin und Vorinkubation mit 0,1 % Ethanol (weiße Balken), 1  $\mu$ M  $\alpha$ -Hederin (hellgraue Balken), 1  $\mu$ M Hederacosid C (graue Balken) und 1  $\mu$ M Hederagenin (schwarze Balken) für 24 Stunden oder 10  $\mu$ M Fenoterol (schraffierte Balken) für 15 min, dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung mit n = mindestens 4.

## 10.2 Relaxationsversuche

Aus klinischen Studien ist bekannt, dass Efeublätter-Trockenextrakt (DEV 5-7,5:1) die Lungenfunktionsparameter, wie z.B. das forcierte expiratorische Volumen der ersten Sekunde (FEV<sub>1</sub>) oder die Vitalkapazität (VK) bei Patienten mit obstruktiven Atemwegserkrankungen verbessert [89]. Aus den vorher gezeigten isometrischen Kontraktionsmessungen wird klar, dass diese Verbesserung nicht durch eine Hemmung der Kontraktion zustande kommt. Eine weitere Möglichkeit könnte in einer verbesserten Relaxation des kontrahierten Muskels durch körpereigenes Adrenalin und Nutzung der  $\alpha$ -Hederin-vermittelten Erhöhung der  $\beta_2$ -adrenerge Ansprechbarkeit liegen.

Zunächst wurde der Einfluss einer 24-stündigen Vorbehandlung mit  $\alpha$ -Hederin, Hederacosid C oder Hederagenin auf die Relaxation von mit 100  $\mu$ M Histamin vorkontrahierten Muskelstreifen durch Zugabe steigender Isoprenalin-Konzentrationen untersucht. Eine Änderung der Relaxation konnte nicht festgestellt werden. Daraufhin wurde der Einfluss auf die Isoprenalin-vermittelte Relaxation von stärker vorkontrahierten Muskelstreifen am Beispiel von 1, 10 und 100  $\mu$ M Methacholin (MCh) beleuchtet. Die Vorbehandlung mit 1  $\mu$ M  $\alpha$ -Hederin führte bei einer Vorkontraktion mit 100  $\mu$ M MCh zu einer signifikanten Verbesserung der Relaxation mit einer verbleibenden Restkontraktion von  $64,9 \pm 5,8$  % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle mit  $73,7 \pm 5,5$  %. Bei Vorkontraktion mit 10  $\mu$ M MCh ist tendenziell dieselbe Wirkung zu sehen. Die Restkontraktion nach  $\alpha$ -Hederin-Vorinkubation mit  $48,6 \pm 18,9$  % unterscheidet sich jedoch nicht signifikant von der Kontrolle mit  $56,9 \pm 11,0$  %. Bei Vorkontraktion mit 1  $\mu$ M ist kein Unterschied zwischen der  $\alpha$ -Hederin-Vorbehandlung und der Kontrolle erkennbar (Abbildung 10.4 und 10.5).

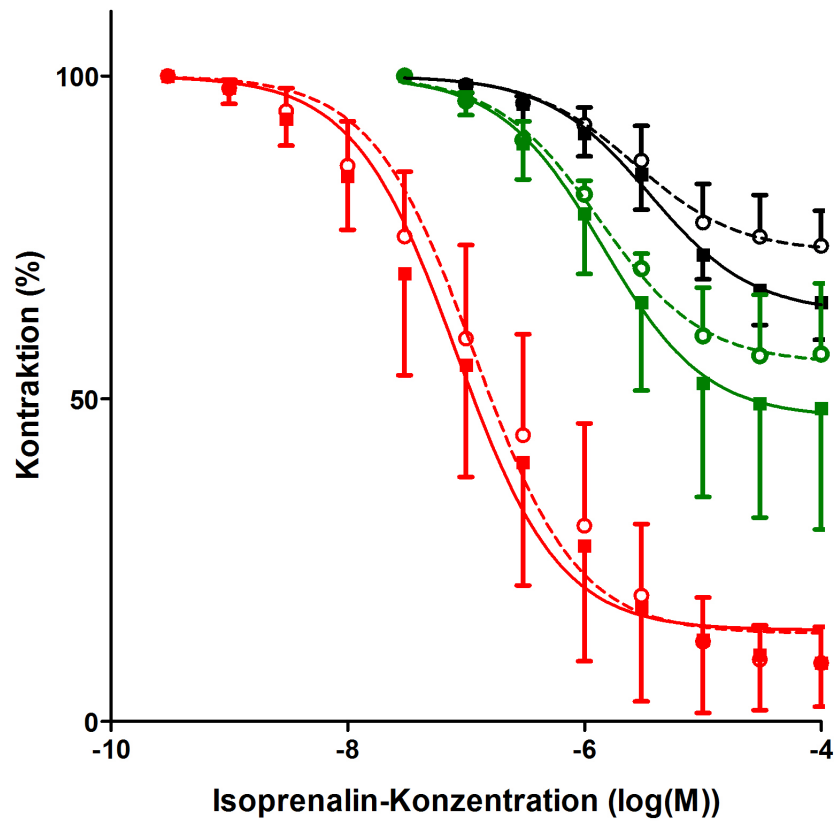


Abbildung 10.4: **Einfluss von  $\alpha$ -Hederin auf die Relaxation von glatten Muskelstreifen mit Isoprenalin nach Vorkontraktion mit Methacholin**

Vorinkubation für 24 Stunden mit 0,1 % Ethanol (Kontrolle, offene Kreise) und  $1\mu\text{M}$   $\alpha$ -Hederin (Quadrate) und Vorkontraktion mit  $1\mu\text{M}$  MCh (rot),  $10\mu\text{M}$  MCh (grün) und  $100\mu\text{M}$  MCh (schwarz), dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $n = 6$  an mindestens zwei unabhängigen Versuchstagen.

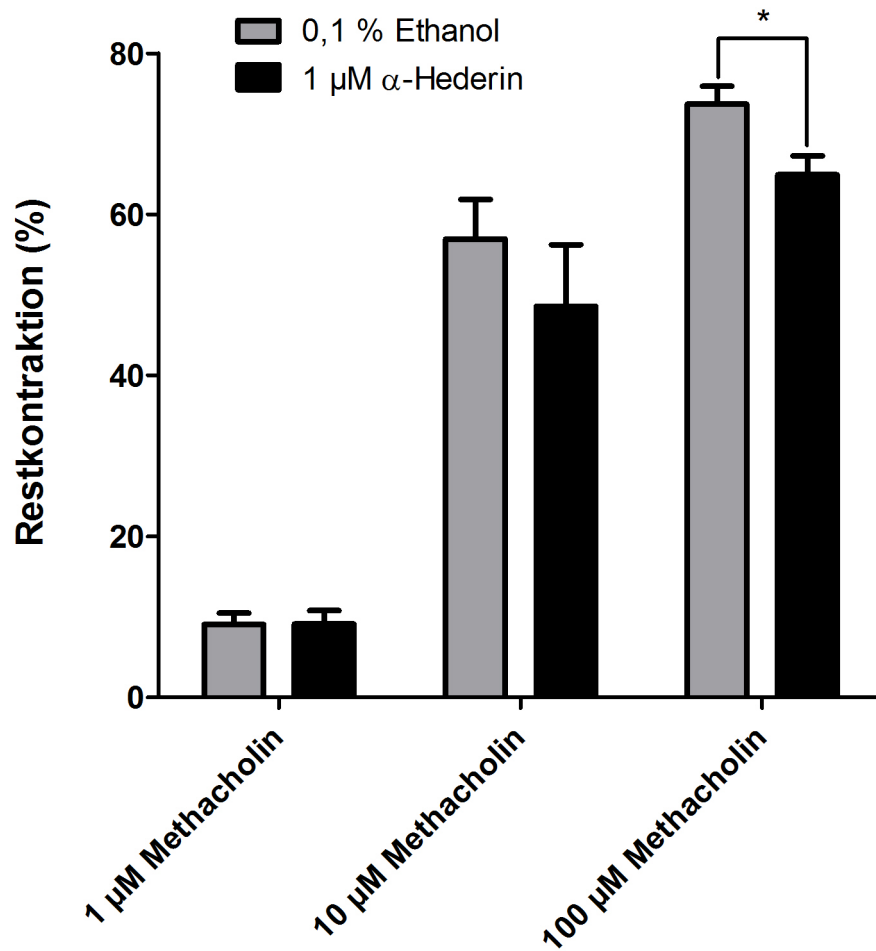


Abbildung 10.5: **Restkontraktion der glatten Muskelstreifen nach Methacholin-Vorkontraktion und Relaxation mit 100  $\mu$ M Isoprenalin unter dem Einfluss von  $\alpha$ -Hederin**

Dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, n = 6 an mindestens zwei unabhängigen Versuchstagen, \*p<0.05.

Die Dosis-Abhängigkeit dieses Effektes wurde durch Vorbehandlung mit 1, 0,5 und 0,1  $\mu$ M  $\alpha$ -Hederin bei einer Vorkontraktion der Muskelstreifen mit 100  $\mu$ M MCh gezeigt (Abbildung 10.6).

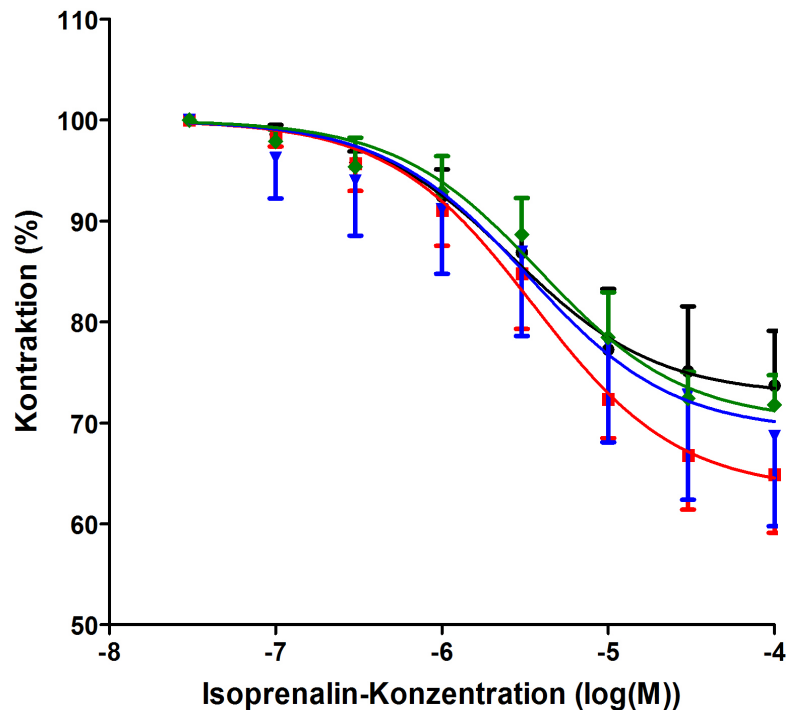


Abbildung 10.6: **Isoprenalin-vermittelte Relaxation von glatten Muskelstreifen nach Vor-  
kontraktion mit 100  $\mu\text{M}$  Methacholin unter dem Einfluss von verschie-  
denen  $\alpha$ -Hederin-Konzentrationen**

Vorinkubation mit 0,1% Ethanol (schwarz), 1  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Hederin (rot), 0,5  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Hederin (blau) und 0,1  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Hederin (grün), dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung mit  $n = 5$  an mindestens zwei unabhängigen Versuchstagen.

Die Kurvenverläufe zeigen deutlich, dass mit sinkender Konzentration an  $\alpha$ -Hederin die Wirkung auf die Isoprenalin-vermittelte Relaxation abnimmt. Vergleicht man die Restkontraktion nach Gabe von 100  $\mu\text{M}$  Isoprenalin, so findet man eine signifikante Verbesserung der Relaxation nur nach Vorbehandlung mit 1  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Hederin (Abbildung 10.7 und Tabelle 10.1).



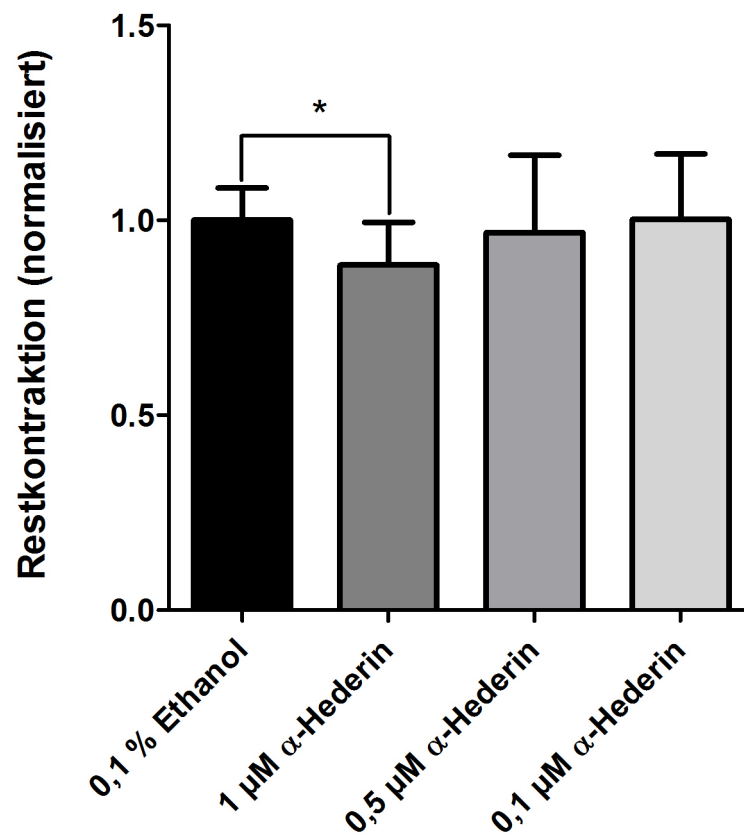


Abbildung 10.7: **Restkontraktion der glatten Muskelstreifen nach Vorkontraktion mit 100 µM Methacholin und Relaxation mit 100 µM Isoprenalin unter dem Einfluss von verschiedenen α-Hederin-Konzentrationen**  
 Vorinkubation mit 0,1 % Ethanol, 1, 0,5 und 0,1 µM α-Hederin für 24 Stunden, dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung mit n = 5 an mindestens zwei unabhängigen Versuchstagen, \*p<0,05.

Demgegenüber zeigten Hederacosid C und Hederagenin in einer Konzentration von 1 µM keinen Einfluss auf die Isoprenalin-vermittelte Relaxation von MCh-vorkontrahierten Muskelstreifen (Abbildung 10.8 und Tabelle 10.1).

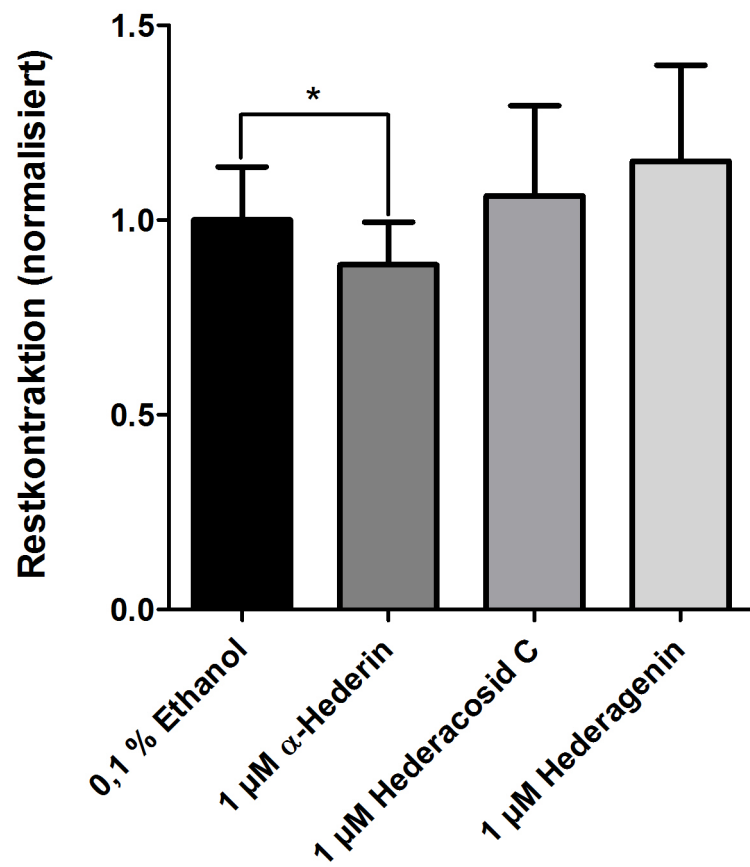


Abbildung 10.8: **Restkontraktion der glatten Muskelstreifen nach Vorkontraktion mit 100 µM Methacholin und Relaxation mit 100 µM Isoprenalin unter dem Einfluss der Saponine**

Vorinkubation mit 0,1 % Ethanol, 1 µM α-Hederin, 1 µM Hederacosid C und 1 µM Hederagenin für 24 Stunden, dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung mit n = 5 an mindestens zwei unabhängigen Versuchstagen, \*p<0,05.

**Tabelle 10.1: Restkontraktion der glatten Muskulatur nach Vorkontraktion mit 100  $\mu$ M Methacholin und Relaxation mit 100  $\mu$ M Isoprenalin**

Normiert auf die Ethanol-Kontrolle, dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung mit  $n = 5$  an mindestens zwei unabhängigen Versuchstagen, \* $p < 0,05$ .

<b>Substanz</b>	<b>Restkontraktion</b>
0,1 % Ethanol	1,00 $\pm$ 0,14
1 $\mu$ M $\alpha$ -Hederin	0,89 $\pm$ 0,11*
0,5 $\mu$ M $\alpha$ -Hederin	0,97 $\pm$ 0,20
0,1 $\mu$ M $\alpha$ -Hederin	1,00 $\pm$ 0,17
1 $\mu$ M Hederacosid C	1,06 $\pm$ 0,23
1 $\mu$ M Hederagenin	1,15 $\pm$ 0,25

## **Teil IV**

# **Diskussion**

# 11 Diskussion

Voraussetzung für die Zulassung eines Arzneimittels ist der Nachweis der pharmazeutischen Qualität, der therapeutischen Wirksamkeit und der Unbedenklichkeit. Die Kenntnis über den genauen Wirkungsmechanismus ist daher von entscheidender Bedeutung und notwendig, um z.B. potentielle Nebenwirkungen und Wechselwirkungen mit anderen Arzneimitteln vorherzusagen bzw. abzuschätzen.

Erste Hinweise auf den Wirkungsmechanismus von Efeublätter-Trockenextrakt ergaben Studien mit den drei Inhaltsstoffen  $\alpha$ -Hederin, Hederacosid C und Hederagenin [60, 124]. Dabei konnten Sieben et al. 2009 zeigen, dass die Vorinkubation von HEK293-Zellen, die den  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor ( $\beta_2$ AR) als GFP-Konstrukt überexprimieren, mit  $\alpha$ -Hederin zu einer gehemmten Internalisierung des Rezeptors, einer erhöhten  $\beta_2$ AR-Bindung und einer vermehrten cAMP-Produktion führt. Im Gegensatz dazu zeigten Hederacosid C und Hederagenin keinerlei Beeinflussung der untersuchten Mechanismen.

In der vorliegenden Arbeit wurde im ersten Schritt die Funktionalität des verwendeten  $\beta_2$ AR-GFP-Konstruktes und dessen zelluläre Regulation in HEK293-Zellen durch Internalisierung nach Stimulation mit 1  $\mu$ M Salbutamol, einem therapeutisch wichtigen Agonisten, nachgewiesen (Abbildung 8.1 A). Diese Internalisierung lässt sich sowohl durch längere Stimulationszeiten als auch durch eine höhere Konzentration des Agonisten steigern (Abbildung 8.1

B-F) und ist vergleichbar mit der bei Moore et al. 2007 gefundenen Internalisierung eines  $\beta_2$ AR-Konstruktes mit Hämagglutinin-Tag nach Stimulation mit 6  $\mu$ M Salbutamol [101].

Anschließend wurde die Stimulation der HEK293- $\beta_2$ AR-GFP-Zellen mit 1  $\mu$ M Salbutamol nach Vorinkubation mit  $\alpha$ -Hederin, Hederacosid C und Hederagenin wiederholt und die Kinetik dieser Internalisierung genauer beleuchtet. Die dargestellten Untersuchungen zeigen, dass in Kontrollzellen und nach Vorinkubation mit Hederacosid C und Hederagenin schon nach fünfminütiger Stimulation mit 1  $\mu$ M Salbutamol erste membranäre Aggregate des  $\beta_2$ AR entstehen (Abbildung 8.2 B, L, Q). Die Vorinkubation mit  $\alpha$ -Hederin verzögert dieses Auftreten um einige Minuten, da erst nach 15 min Rezeptor-Aggregate auf der Plasmamembran erkennbar sind. Dies bestätigt die von Sieben et al. veröffentlichten Befunde [124]. Eine noch bessere zeitliche Auflösung ermöglicht die Messung an lebenden Zellen. Der direkte Vergleich der Internalisierung von Kontrollzellen und  $\alpha$ -Hederin-behandelten Zellen zeigt, dass unter Kontrollbedingungen schon nach 160 sec erste Rezeptor-Aggregate auf der Zellmembran entstehen und diese innerhalb von weiteren 160 sec in Form von intrazellulären Vesikeln internalisiert werden (Abbildung 8.3. C und E). Mit fortschreitender Zeit werden in der Kontrolle weitere Rezeptoren in Form von vesikulären Strukturen im Zytosol sichtbar (Abbildung 8.4 G, I, K). Durch die Vorinkubation mit  $\alpha$ -Hederin verzögert sich das Auftreten erster intrazellulärer Vesikel um mehr als 500 sec (Abbildung 8.4 L), was den Befund von Sieben et al. 2009 weiter unterstreicht.

Eine mögliche Ursache für das gehemmte Internalisierungsverhalten des  $\beta_2$ AR ist dessen verminderte Phosphorylierung durch die G-Protein-gekoppelter Rezeptor Kinase 2 (GRK2). In der Literatur wird die GRK2-vermittelte Phosphorylierung des  $\beta_2$ AR überwiegend durch eine Kombination aus Immunpräzipitation oder Affinitätschromatografie mit einem nachfolgenden Westernblot ermittelt [15, 66, 81, 82, 97, 101, 122, 137]. Auch Westernblots auf die phospho-

rylierte Form des  $\beta_2$ AR ohne vorherige Aufreinigung sind zu finden, kommen jedoch deutlich seltener vor [64, 136, 138, 142]. Die Quantifizierung der Phosphorylierung des  $\beta_2$ AR über Westernblot und anschließende Peroxidase-Reaktion hat sich als schwer reproduzierbar dargestellt. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Methode des In-Cell-Westerns (ICW) für die Messung der Phosphorylierung des  $\beta_2$ AR erstmals etabliert.

Ein ICW ist ein quantitativer Immunfluoreszenz-Test, der die Detektion und Quantifizierung zweier Signale im Infrarot-Bereich in fixierten Zellen in einer 96-Well-Platte ermöglicht. In der Literatur findet man Beispiele für die Messung der Phosphorylierung der extrazellulären Signal-regulierten Kinase (extracellular signal-regulated kinase, ERK) [38, 73, 95], der Myosin-Leichtkettenkinase (myosin light chain kinase, MLCK) [78] und der endothelialen Stickstoffmonoxid Synthetase (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) [43] mittels ICW. Die Phosphorylierung des  $\beta_2$ AR wurde nach Stimulation mit 500 nM Isoprenalin für 10 min unter Verwendung eines entsprechenden Antikörpers untersucht, wobei die Quantifizierung über Zellkernfarbstoffe, die bei 700 nm angeregt werden, in Relation zur Zellzahl stattfand.

Im Westernblot konnte gezeigt werden, dass der verwendete Antikörper die phosphorylierte Form des  $\beta_2$ AR-GFP-Konstruktes nach Stimulation mit 1  $\mu$ M Isoprenalin erkennt. Dies weist sowohl die Funktionalität des Antikörpers nach als auch die Fähigkeit des verwendeten Konstruktes, durch die GRK2 phosphoryliert zu werden. Der ICW ermöglichte es anschließend, den unterschiedlichen Phosphorylierungsgrad des Rezeptors durch verschiedene Stimulationen zu zeigen. Die reproduzierbare Quantifizierung dieser Phosphorylierung zeigt mit einer integrierten Intensität von 0,10 bis 0,87 eine deutliche Dosis-Abhängigkeit im Bereich von 100 bis 1000 nM Isoprenalin (Abbildung 9.2). Oberhalb von 1000 nM ist die Sättigung der Phosphorylierung erreicht. Die Vorinkubation mit einem GRK2-Inhibitor, 5-[2-(5-Nitro-2-furyl)-ethenyl]-furan-2-carbonsäuremethylester, führte zu einer gehemmten Phosphorylierung des  $\beta_2$ AR und wurde als Positivkontrolle verwendet. Der verwendete GRK2-Inhibitor wurde

zum ersten Mal bei Iino et al. 2002 beschrieben und in Capra et al. 2005 zur Hemmung der homologen Desensitivierung des Cysteinyl-Leukotrien-Rezeptors 1 verwendet [25, 63]. Weitere Möglichkeiten der Hemmung der GRK2 sind Heparin und Zink<sup>2+</sup>-Ionen [90, 120, 126], welche allerdings unspezifisch alle Isoformen der GRK hemmen. In dieser Arbeit wurde der Fokus auf die GRK2-vermittelte Phosphorylierung als Marker für die homologe Desensitivierung gelegt und daher ein GRK2-spezifischer Inhibitor verwendet. Trotz Einsatzes dieses spezifischen GRK2-Inhibitors wurde eine Restphosphorylierung von 38 % detektiert. Mögliche Erklärungen hierfür sind eine nicht vollständige Inhibition der GRK2 oder die Phosphorylierung des Rezeptors durch eine andere GRK-Isoform. Grundsätzlich überschneiden sich die Wirkungen der GRK-Isoformen. Pitcher, Freedman und Lefkowitz haben 1998 gezeigt, dass alle sechs Isoformen in aufgereinigter Form fähig sind, den  $\beta_2$ AR zu phosphorylieren [115]. Tran, Jorgensen und Clark haben 2007 außerdem zeigen können, dass die GRK5 in der Lage ist, den  $\beta_2$ AR in Abwesenheit von GRK2 an Serin 355/356 zu phosphorylieren [138]. Hierbei handelt es sich um die Stelle im C-Terminus, die der in der vorliegenden Arbeit verwendete Antikörper erkennt.

Die  $\beta_2$ AR-Phosphorylierung der mit  $\alpha$ -Hederin, Hederacosid C und Hederagenin vorbehandelten Zellen wurde nach Stimulation mit 500 nM Isoprenalin für 10 min untersucht (Abbildung 9.4). Die abgestimmte Wahl aus Zellzahl und Agonist-Konzentration führte in diesem Versuch dazu, dass nicht alle Rezeptoren phosphoryliert vorlagen. Durch Zugabe der Testsubstanzen war dann sowohl eine Steigerung als auch eine Senkung der Anzahl phosphorylierter Rezeptoren möglich.  $\alpha$ -Hederin, Hederacosid C und Hederagenin zeigen mit 45 %, 49 % und 54 % Restphosphorylierung eine erstaunliche Hemmung der  $\beta_2$ AR-Phosphorylierung, die nur etwas geringer ausfällt als nach Inkubation mit dem GRK2-Inhibitor (38 %). Im Kontext der Internalisierungsstudien an HEK293- $\beta_2$ AR-GFP-Zellen ist dieses Ergebnis überraschend, da dort nur  $\alpha$ -Hederin eine Hemmung der Internalisierung des  $\beta_2$ AR gezeigt hat. Dies lässt ver-



muten, dass die verzögerte Internalisierung des Rezeptors nicht alleine durch eine Hemmung der GRK2-vermittelten Phosphorylierung zustande kommt (Abbildung 12.1). Mögliche Kandidaten für eine Beeinflussung durch  $\alpha$ -Hederin müssen demnach an den Prozessen zwischen der Phosphorylierung des Rezeptors durch die GRK2 und der endgültigen Internalisierung beteiligt sein.  $\beta$ -Arrestin-2, aber auch Clathrin, AP-2 oder Dynamin kommen hierfür in Frage (Abbildung 12.1).

Wie bei Deshpande et al. 2008 gezeigt, hat die Hemmung der homologen Desensitivierung des  $\beta_2$ AR auch eine Relevanz für das  $\beta_2$ -Agonist-vermittelte Relaxationsverhalten der glatten Bronchialmuskulatur [35]. Dort wurde das Isoprenalin-vermittelte Relaxationsverhalten von murinen Luftröhren nach Knockout von  $\beta$ -Arrestin-2 und Vorkontraktion mit 10  $\mu$ M Methacholin untersucht. Es zeigte sich, dass durch die fehlende  $\beta$ -Arrestin-2-Bindung die vollständige Abschaltung des Rezeptors ausbleibt, was eine verbesserte Relaxation zur Folge hat.

Durch die verzögerte Internalisierung des  $\beta_2$ AR und die Hemmung der GRK2-vermittelten homologen Desensitivierung war davon auszugehen, dass  $\alpha$ -Hederin einen Einfluss auf das Kontraktions- und Relaxationsverhalten der glatten Bronchialmuskulatur hat. Ein etabliertes System zur Untersuchung der glatten Bronchialmuskulatur sind isometrische Kontraktionsmessungen an isolierten Muskelstreifen aus der Rinderluftröhre [17, 18, 33, 104]. Weitere in der Literatur häufig zu findende Modelle sind Präparationen aus der Meerschweinchenluftröhre [8, 109, 117, 118, 132, 133], aus der Luftröhre z.T. transgener Mäuse [35, 94, 144, 146], aus Rattenluftröhren [72, 149] sowie seltener Trachealringe aus Kaninchen [62] und Bronchialringe aus humanem Gewebe [8, 30, 99].

Die untersuchten Saponine,  $\alpha$ -Hederin, Hederacosid C und Hederagenin zeigen keinen Einfluss auf die Histamin- und Methacholin-vermittelte Kontraktion der Muskelstreifen (Abbildung 10.1 und 10.2). Währenddessen hat der direkte  $\beta_2$ -adrenerge Effekt von Fenote-

rol erwartungsgemäß zu einem Rechtsshift der Kontraktionskurve hin zu höheren Histamin-Konzentrationen und einer Senkung der pEC<sub>50</sub> geführt (Abbildung 10.1 und 10.2). Somit konnte der von Trute et al. 1997 publizierte direkte relaxierende Effekt von  $\alpha$ -Hederin auf die Acetylcholin-vermittelte Kontraktion von Meerschweinchen-Ileum am Model der glatten Muskulatur der Rinderluftröhre nicht gezeigt werden [139]. Die von Trute et al. eingesetzten hohen  $\alpha$ -Hederin-Konzentrationen (circa 50 bis 500  $\mu$ M) sind physiologisch auch nicht zu erwarten. Des Weiteren ist aus Voruntersuchungen an verschiedenen Zelllinien (A549, HASM, HEK293) bekannt, dass  $\alpha$ -Hederin-Konzentrationen über 10  $\mu$ M die Zellen schädigen können. Die bei Trute et al. gefundene relaxierende Wirkung könnte also auch durch eine Schädigung des Muskels mitbedingt sein. Die in klinischen Studien gefundene Verbesserung der Lungenfunktionsparameter lassen sich nach den dargestellten Ergebnissen nicht durch eine verminderte Kontraktion der Bronchialmuskulatur erklären.

Bei der Analyse der Isoprenalin-vermittelten Relaxation nach Vorkontraktion mit verschiedenen Konzentrationen an Methacholin konnte eine Verbesserung der Relaxation durch Vorbehandlung der Muskelstreifen mit 1  $\mu$ M  $\alpha$ -Hederin über 24 Stunden gezeigt werden (Abbildung 10.4). Dieser Effekt ist mit zunehmender Konzentration an Methacholin deutlicher und bei 100  $\mu$ M Methacholin mit einer Verbesserung der Restkontraktion von 74 % auf 65 % signifikant (Abbildung 10.5), allerdings nur bei einer  $\alpha$ -Hederin-Konzentration von 1  $\mu$ M. Konzentrationen unterhalb von 1  $\mu$ M sind weniger wirksam bzw. ohne Effekt, was die Dosis-Wirkungs-Beziehung belegt (Abbildung 10.6 und 10.7). Hederacosid C und Hederagenin zeigen keine Beeinflussung des Relaxationsverhaltens (Abbildung 10.8).

Die gesteigerte Aktivierung des muskarinischen Acetylcholin-Rezeptors (M<sub>3</sub>) oder des Histamin-Rezeptors (H<sub>1</sub>) mit nachgeschalteter Steigerung der PKC-Aktivität kann zur heterologen Desensitivierung des  $\beta_2$ AR führen [17, 52, 114]. Bei  $\beta_2$ -Stimulation stehen anschließend weniger Rezeptoren zur Aktivierung bereit. Durch die Vorbehandlung mit  $\alpha$ -Hederin wird

wahrscheinlich diese heterologe Desensitivierung gehemmt (Abbildung 12.1). Die Hemmung führt in der Folge zu mehr aktivierbaren  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren auf der Zelloberfläche der glatten Bronchialmuskulatur, was wiederum die verbesserte Relaxation über eine gesteigerte  $\beta_2$ -adrenerge Ansprechbarkeit erklärt.

Demgegenüber scheint die durch  $\alpha$ -Hederin-vermittelte Hemmung der homologen Desensitivierung nicht wesentlich zum verbesserten Relaxationsverhalten der glatten Muskulatur beizutragen. Andernfalls ist nicht zu erklären, warum die Verbesserung in der Relaxation nicht schon bei geringeren Methacholin-Konzentrationen, d.h. bei schwacher Vorkontraktion, sondern erst bei hohen Methacholin-Konzentrationen, d.h. bei starker Vorkontraktion, zum Tragen kommt. Zudem zeigen Hederacosid C und Hederagenin trotz Hemmung der homologen Desensitivierung keine Verbesserung der Isoprenalin-vermittelten Relaxation von Methacholin-vorkontrahierten Muskelstreifen.

$\alpha$ -Hederin beeinflusst die Prozesse der Desensitivierung vermutlich durch eine Wechselwirkung mit dem Rezeptor mit anschließender Konformationsänderung, die eine Phosphorylierung durch PKA, PKC und GRK2 behindern könnte. Unklar ist, ob  $\alpha$ -Hederin die Plasmamembran überwinden kann. Somit ist eine direkte Beeinflussung der PKA und/oder PKC durch  $\alpha$ -Hederin nicht auszuschließen. PKA und PKC sind beide in der Lage, die GRK2 zu phosphorylieren und so deren Translokation zur Membran zu fördern [18, 28, 29]. Bei einer direkten Hemmung der PKA oder PKC durch  $\alpha$ -Hederin würde vermutlich auch weniger GRK2 phosphoryliert. Bei Stimulation der homologen Desensitivierung wird dann weniger GRK2 zur Membran rekrutiert und die GRK2-vermittelte Phosphorylierung des Rezeptors geschwächt. Diese Hemmung müsste wenigstens im Falle der PKA Subtyp-spezifisch ablaufen. Eine generelle Hemmung der PKA würde zu einer verminderten Phosphorylierung und damit einer gesteigerten Calcium-Sensitivität der MLCK führen, was die glatte Muskulatur eher kontrahieren lässt. Da für  $\alpha$ -Hederin eine verbesserte Relaxation der glatten Muskulatur

gefunden wird, kann eine generalisierte Hemmung der PKA nicht angenommen werden.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse ergänzen das aus bisherigen präklinischen Befunden gewonnene Bild der Wirkungsweise von Efeublätter-Trockenextrakt und untermauern dessen, in klinischen Studien gefundene, sekretolytische und broncholytische Effekte.

Aufgrund des häufigen Einsatzes von  $\beta_2$ -Sympathomimetika bei Asthma wäre auch hier eine Verbesserung der  $\beta_2$ -adrenergen Ansprechbarkeit von Vorteil. Die Gabe von Efeublätter-Trockenextrakt könnte bei intermittierendem Asthma zu einer selteneren Anwendung der kurzwirksamen  $\beta_2$ -Agonisten und zu schwächeren Anfällen führen. Auch bei den persistierenden Asthmastufen könnte die gleichzeitige Gabe von Efeublätter-Trockenextrakt eine positive Wirkung haben, z.B. durch eine Verminderung der homologen Desensitivierung, die bei längerer Anwendung von  $\beta_2$ -Agonisten auftritt. Des Weiteren spielt wahrscheinlich bei den schweren Formen des Asthmas auch die  $\beta_2$ -Agonist-unabhängige, heterologe Desensitivierung des  $\beta_2$ AR eine wichtige Rolle und bewirkt eine Schwächung der Wirkung von  $\beta_2$ -Agonisten [11]. Ob in diesem Zusammenhang eine Hemmung der heterologen Desensitivierung durch  $\alpha$ -Hederin eine therapeutische Rolle spielen könnte ist fraglich.

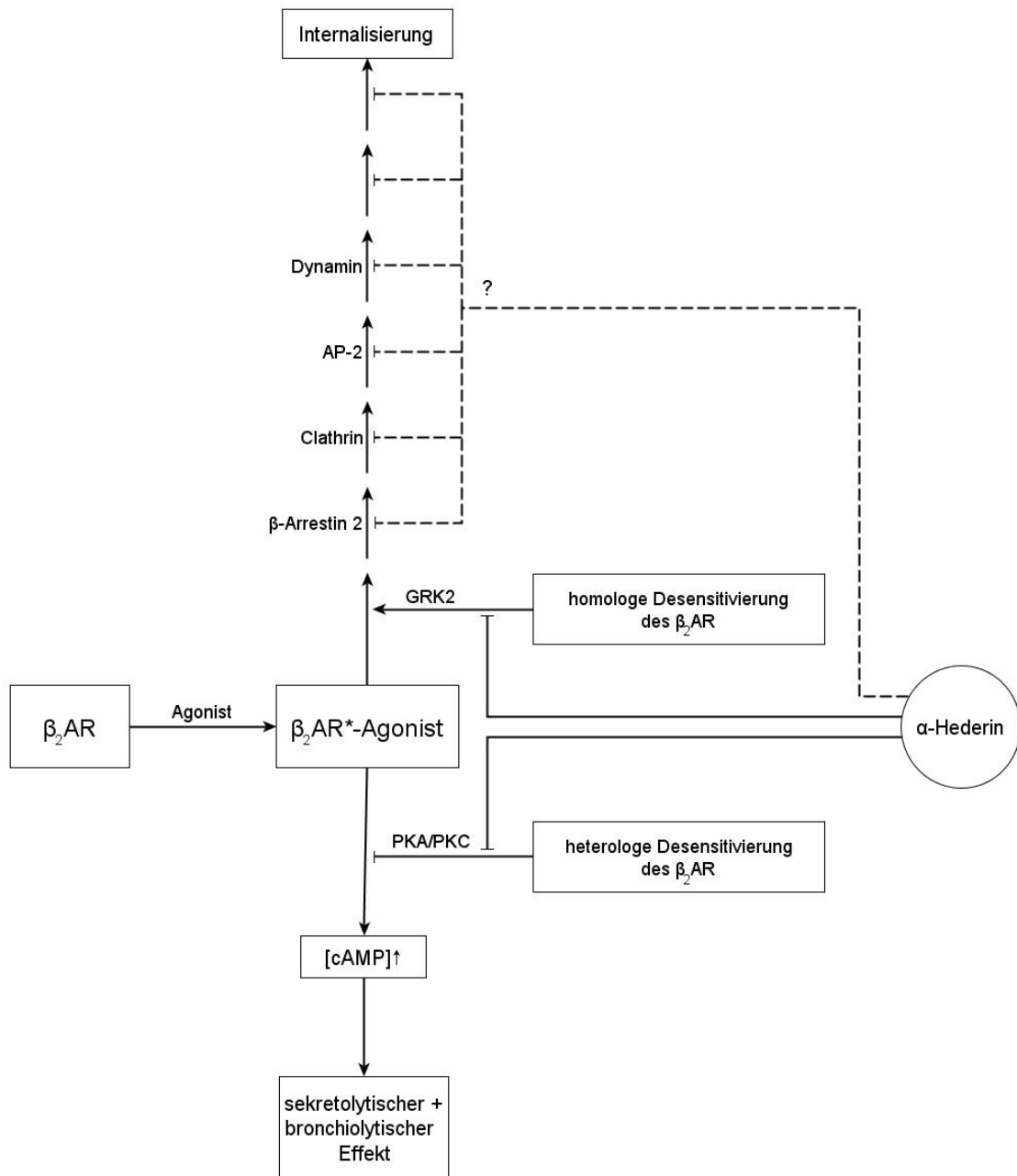


Abbildung 11.1: **Vermuteter Wirkungsmechanismus von  $\alpha$ -Hederin**  
Erläuterungen siehe Text.

## 12 Ausblick

Verschiedene Versuche können zur weiteren Aufklärung der Wirkungsweise von  $\alpha$ -Hederin beitragen. Die von den Relaxationsdaten abgeleitete Hemmung der heterologen Desensitivierung ist ein wichtiger Bestandteil der in dieser Arbeit postulierten Wirkungsweise von  $\alpha$ -Hederin. Eine Abnahme der Phosphorylierung des  $\beta_2$ AR an Serin 261/262 und Serin 345/346 durch die Proteinkinase C oder die Proteinkinase A könnte z.B. über einen In-Cell-Western mit den entsprechenden Antikörpern untersucht werden.

Eine Überprüfung der Internalisierungsdaten mit Quantifizierung der  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren auf der Oberfläche wäre, wie bei Ahn et al. 2003 gezeigt, mittels Durchflusszytometrie möglich [3]. In den dort gezeigten Versuchen wurde der  $\beta_2$ AR mithilfe eines FLAG-Tags und eines Fluoreszenz-markierten Antikörpers gegen diesen Tag in der Durchflusszytometrie erkannt. Auch die Detektion mithilfe eines Antikörpers gegen den N-Terminus des  $\beta_2$ AR wäre möglich.

Die radioaktive Markierung von  $\alpha$ -Hederin würde die Möglichkeit bieten, eine Einlagerung in die Plasmamembran und ein Eindringen ins Zytosol zu untersuchen. Die gleichzeitige Fluoreszenz-Markierung des  $\beta_2$ AR und von  $\beta$ -Arrestin-2, Clathrin, AP-2 oder Dynamin würde Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer- (FRET) oder Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer- (BRET) Untersuchungen ermöglichen. Dadurch könnte geklärt werden, ob unter  $\alpha$ -Hederin-

Einfluss weniger  $\beta$ -Arrestin-2, Clathrin, AP-2 oder Dynamin mit dem Rezeptor interagieren. Die Untersuchung der G-Protein-unabhängigen,  $\beta$ -Arrestin-2-abhängigen Stimulation des MAPK-Weges, zum Beispiel durch Messung der phosphorylierten Form der extrazellulären Signal-regulierten Kinase (ERK) wie bei DeWire et al. 2007 und Certo et al. 2008 [26, 36], ist eine weitere Möglichkeit um zu prüfen ob die Interaktion zwischen Rezeptor und  $\beta$ -Arrestin-2 unter  $\alpha$ -Hederin Einfluss geändert ist.

## 13 Zusammenfassung

Präparate mit Efeublätter-Trockenextrakt sind zugelassen für die Therapie von akuten und chronischen Krankheiten der Atemwege, die durch eine vermehrte Schleimsekretion und Husten charakterisiert sind. Der Wirkungsmechanismus von Efeu ist noch nicht vollständig geklärt.

Aus Voruntersuchungen ist bekannt, dass  $\alpha$ -Hederin die Internalisierung des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors unter stimulierenden Bedingungen hemmt, die  $\beta_2$ -adrenerge Bindung steigert und die Bildung von cAMP fördert. Dies führt in der Folge zu einer erhöhten  $\beta_2$ -adrenergen Ansprechbarkeit, weshalb  $\alpha$ -Hederin als wirksamkeitsmitbestimmender Inhaltsstoff von Efeublätter-Trockenextrakt gilt.

Die Änderung des Internalisierungsverhalten des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors durch Vorinkubation mit  $\alpha$ -Hederin, Hederacosid C und Hederagenin wurde Zeit-abhängig an lebenden, den Rezeptor als GFP-Fusionsprotein überexprimierenden Zellen analysiert. Außerdem wurde in dieser Arbeit der Einfluss der Saponine aus Efeu auf die homologe, G-Protein gekoppelter Rezeptor Kinase 2 (GRK2)-vermittelte Desensitivierung des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor untersucht. Unter stimulierenden Bedingungen konnte gezeigt werden, dass  $\alpha$ -Hederin, aber auch Hederacosid C und Hederagenin, die Phosphorylierung am C-Terminus des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors ähnlich stark hemmen. Da nur  $\alpha$ -Hederin die Internalisierung des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors



## Zusammenfassung

---

hemmt, scheint die Hemmung der homologen Desensitivierung hierfür alleine nicht ausreichend zu sein. Durch isometrische Kraftmessungen wurde untersucht, welche Wirkung eine Vorbehandlung mit  $\alpha$ -Hederin, Hederacosid C oder Hederagenin auf das Kontraktions- und Relaxationsverhalten von isolierter glatter Muskulatur aus der Rinderluftröhre hat. Die durch Histamin- und Methacholin-vermittelte Kontraktion der Muskelstreifen wurde durch die Saponine nicht beeinflusst. Die Isoprenalin-vermittelte Relaxation von Methacholin-vorkontrahierten Muskelstreifen wurde nur von  $\alpha$ -Hederin verbessert. Dieser Effekt zeigte eine Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit und erwies sich nur bei einer hohen Methacholin-Konzentration von  $100 \mu\text{M}$  als statistisch signifikant.

Die vorliegenden Befunde belegen, dass  $\alpha$ -Hederin offensichtlich nicht nur die homologe Desensitivierung des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors hemmt, sondern auch eine über muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren vermittelte heterologe Desensitivierung vermindert.

Die in dieser Arbeit dargestellten Daten ergänzen das aus bisherigen präklinischen Befunden gewonnene Bild der Wirkungsweise von Efeublätter-Trockenextrakt und untermauern dessen in klinischen Studien gefundene sekretolytische und broncholytische Effekte.

# Literaturverzeichnis

- [1] *Rote Liste 2009*. Rote Liste Service GmbH, 2009.
- [2] E. Aagaard and R. Gonzales. Management of acute bronchitis in healthy adults. *Infect Dis Clin North Am*, 18(4):919–37, 2004.
- [3] S. Ahn, C. D. Nelson, T. R. Garrison, W. E. Miller, and R. J. Lefkowitz. Desensitization, internalization, and signaling functions of beta-arrestins demonstrated by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(4):1740–1744, 2003.
- [4] S. Ahuja and S. O. Smith. Multiple switches in G protein-coupled receptor activation. *Trends Pharmacol Sci*, 30(9):494–502, 2009.
- [5] M. Audet and M. Bouvier. Insights into signaling from the beta2-adrenergic receptor structure. *Nat Chem Biol*, 4(7):397–403, 2008.
- [6] H. O. Awwad, V. Iyer, J. L. Rosenfeld, E. E. Millman, E. Foster, R. H. Moore, and B. J. Knoll. Inhibitors of phosphoinositide 3-kinase cause defects in the postendocytic sorting of beta2-adrenergic receptors. *Exp Cell Res*, 313(12):2586–2596, 2007.
- [7] G. S. Baillie, A. Sood, I. McPhee, I. Gall, S. J. Perry, R. J. Lefkowitz, and M. D. Houslay. Beta-arrestin-mediated PDE4 cAMP phosphodiesterase recruitment regulates beta-

- adrenoceptor switching from Gs to Gi. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(3):940–945, 2003.
- [8] D. I. Ball, R. T. Brittain, R. A. Coleman, L. H. Denyer, D. Jack, M. Johnson, L. H. Lunts, A. T. Nials, K. E. Sheldrick, and I. F. Skidmore. Salmeterol, a novel, long-acting beta 2-adrenoceptor agonist: characterization of pharmacological activity in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol*, 104(3):665–671, 1991.
- [9] P. J. Barnes. Drugs for asthma. *Br J Pharmacol*, 147 Suppl 1:S297–S303, 2006.
- [10] P. J. Barnes. Intrinsic asthma: not so different from allergic asthma but driven by superantigens? *Clin Exp Allergy*, 39(8):1145–1151, 2009.
- [11] P. J. Barnes and N. B. Pride. Dose-response curves to inhaled beta-adrenoceptor agonists in normal and asthmatic subjects. *Br J Clin Pharmacol*, 15(6):677–682, 1983.
- [12] N. A. Barrett and K. F. Austen. Innate cells and T helper 2 cell immunity in airway inflammation. *Immunity*, 31(3):425–437, 2009.
- [13] J. H. Bates, M. Rincon, and C. G. Irvin. Animal models of asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 297(3):L401–L410, 2009.
- [14] C. Bergeron, W. Al-Ramli, and Q. Hamid. Remodeling in asthma. *Proc Am Thorac Soc*, 6(3):301–305, 2009.
- [15] M. Berthouze, V. Venkataramanan, Y. Li, and S. K. Shenoy. The deubiquitinases USP33 and USP20 coordinate beta2 adrenergic receptor recycling and resensitization. *EMBO J*, 28(12):1684–1696, 2009.
- [16] J. Bockaert, L. Fagni, A. Dumuis, and P. Marin. GPCR interacting proteins (GIP). *Pharmacol Ther*, 103(3):203–221, 2004.

- [17] M. Boterman, C. R. Elzinga, D. Wagemakers, P. B. Eppens, J. Zaagsma, and H. Meurs. Potentiation of beta-adrenoceptor function in bovine tracheal smooth muscle by inhibition of protein kinase c. *Eur J Pharmacol*, 516(1):85–92, 2005.
- [18] M. Boterman, S. R. Smits, H. Meurs, and J. Zaagsma. Protein kinase C potentiates homologous desensitization of the beta2-adrenoceptor in bovine tracheal smooth muscle. *Eur J Pharmacol*, 529(1-3):151–156, 2006.
- [19] M. M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248–254, 1976.
- [20] S. S. Braman. Chronic cough due to acute bronchitis: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*, 129(1 Suppl):95S–103S, 2006.
- [21] S. S. Braman. Chronic cough due to chronic bronchitis: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*, 129(1 Suppl):104S–115S, 2006.
- [22] R. Buhl, D. Berdel, C.-P. Criée, A. Gillissen, P. Kardos, C. Kroegel, W. Leupold, H. Lindemann, H. Magnussen, D. Nowak, D. Pfeiffer-Kascha, K. Rabe, M. Rolke, G. Schultze-Werninghaus, H. Sitter, D. Ukena, C. Vogelmeier, T. Welte, R. Wetten- gel, and H. Worth. Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit Asthma. *Pneumologie*, 60(3):139–177, 2006.
- [23] Bundesgesundheitsamt. Monographie Hedera helicis folium (Efeublätter). *Bundesanzeiger vom 6.7.1988*, 122.
- [24] U. Bungeroth. *BASICS Pulmologie*. Urban & Fischer Verlag, 2005.
- [25] V. Capra, S. Ravasi, M. R. Accomazzo, S. Citro, M. Grimoldi, M. P. Abbracchio, and

- G. E. Rovati. CysLT1 receptor is a target for extracellular nucleotide-induced heterologous desensitization: a possible feedback mechanism in inflammation. *J Cell Sci*, 118(Pt 23):5625–5636, 2005.
- [26] M. G. Di Certo, E. M. Batassa, I. Casella, A. Serafino, A. Floridi, C. Passananti, P. Molinari, and E. Mattei. Delayed internalization and lack of recycling in a beta2-adrenergic receptor fused to the G protein alpha-subunit. *BMC Cell Biol*, 9:56, 2008.
- [27] M.-H. Chen and C. C. Malbon. G-protein-coupled receptor-associated A-kinase anchoring proteins AKAP5 and AKAP12: differential trafficking and distribution. *Cell Signal*, 21(1):136–142, 2009.
- [28] T. T. Chuang, H. LeVine, and A. De Blasi. Phosphorylation and activation of beta-adrenergic receptor kinase by protein kinase C. *J Biol Chem*, 270(31):18660–18665, 1995.
- [29] M. Cong, S. J. Perry, F. T. Lin, I. D. Fraser, L. A. Hu, W. Chen, J. A. Pitcher, J. D. Scott, and R. J. Lefkowitz. Regulation of membrane targeting of the G protein-coupled receptor kinase 2 by protein kinase A and its anchoring protein AKAP79. *J Biol Chem*, 276(18):15192–15199, 2001.
- [30] P. R. Cooper and R. A. Panettieri. Steroids completely reverse albuterol-induced beta(2)-adrenergic receptor tolerance in human small airways. *J Allergy Clin Immunol*, 122(4):734–740, 2008.
- [31] C. Corrigan. Mechanisms of intrinsic asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 4(1):53–56, 2004.
- [32] Y. Daaka, L. M. Luttrell, and R. J. Lefkowitz. Switching of the coupling of the beta2-

- adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature*, 390(6655):88–91, 1997.
- [33] B. de Vries, H. Meurs, A. F. Roffel, C. R. Elzinga, B. H. Hoiting, M. M. de Vries, and J. Zaagsma. Beta-agonist-induced constitutive beta(2)-adrenergic receptor activity in bovine tracheal smooth muscle. *Br J Pharmacol*, 131(5):915–920, 2000.
- [34] D. Desai and C. Brightling. Cytokine and anti-cytokine therapy in asthma: ready for the clinic? *Clin Exp Immunol*, 158(1):10–19, 2009.
- [35] D. A. Deshpande, B. S. Theriot, R. B. Penn, and J. K. Walker. Beta-arrestins specifically constrain beta2-adrenergic receptor signaling and function in airway smooth muscle. *FASEB J*, 22(7):2134–2141, 2008.
- [36] S. M. DeWire, S. Ahn, R. J. Lefkowitz, and S. K. Shenoy. Beta-arrestins and cell signaling. *Annu Rev Physiol*, 69:483–510, 2007.
- [37] P. Dorow, T. Weiss, R. Felix, and H. Schmutzler. [effect of a secretolytic and a combination of pinene, limonene and cineole on mucociliary clearance in patients with chronic obstructive pulmonary disease]. *Arzneimittelforschung*, 37(12):1378–1381, 1987.
- [38] Y. Du, K. Danjo, P. A. Robinson, and J. E. Crabtree. In-cell western analysis of *Helicobacter pylori*-induced phosphorylation of extracellular-signal related kinase via the transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Microbes Infect*, 9(7):838–846, 2007.
- [39] M. T. Duvernay, C. Dong, X. Zhang, F. Zhou, C. D. Nichols, and G. Wu. Anterograde trafficking of G protein-coupled receptors: function of the C-terminal F(X)6LL motif in export from the endoplasmic reticulum. *Mol Pharmacol*, 75(4):751–761, 2009.

- [40] H.-G. Schaible E. Mutschler and P. Vaupel. *Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie des Menschen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 2007.
- [41] C. H. Fanta. Asthma. *N Engl J Med*, 360(10):1002–1014, 2009.
- [42] S. Fazio, J. Pouso, D. Dolinsky, A. Fernandez, M. Hernandez, G. Clavier, and M. Hecker. Tolerance, safety and efficacy of Hedera helix extract in inflammatory bronchial diseases under clinical practice conditions: a prospective, open, multicentre postmarketing study in 9657 patients. *Phytomedicine*, 16(1):17–24, 2009.
- [43] D. Feliers, X. Chen, N. Akis, G. G. Choudhury, M. Madaio, and B. S. Kasinath. VEGF regulation of endothelial nitric oxide synthase in glomerular endothelial cells. *Kidney Int*, 68(4):1648–1659, 2005.
- [44] S. S. Ferguson. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev*, 53(1):1–24, 2001.
- [45] D. Fessart, M. Simaan, B. Zimmerman, J. Comeau, F. F. Hamdan, P. W. Wiseman, M. Bouvier, and S. A. Laporte. Src-dependent phosphorylation of beta2-adaptin dissociates the beta-arrestin-AP-2 complex. *J Cell Sci*, 120(Pt 10):1723–1732, 2007.
- [46] O. Güçlü-Ustündağ and G. Mazza. Saponins: properties, applications and processing. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 47(3):231–258, 2007.
- [47] J. E. Gern. Rhinovirus and the initiation of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 9(1):73–78, 2009.
- [48] M. A. Giermycz and R. Newton. Beyond the dogma: novel beta2-adrenoceptor signaling in the airways. *Eur Respir J*, 27(6):1286–1306, 2006.
- [49] A. Gillissen. Akute, schwere Bronchitis. *MMW Fortschr Med*, 151(34-35):49–50, 2009.

- [50] K. Gong, Z. Li, M. Xu, J. Du, Z. Lv, and Y. Zhang. A novel protein kinase a-independent, beta-arrestin-1-dependent signaling pathway for p38 mitogen-activated protein kinase activation by beta2-adrenergic receptors. *J Biol Chem*, 283(43):29028–29036, 2008.
- [51] F. L. Graham, J. Smiley, W. C. Russell, and R. Nairn. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 36(1):59–74, 1977.
- [52] B. M. Grandordy, J. C. Mak, and P. J. Barnes. Modulation of airway smooth muscle beta-adrenoceptor function by a muscarinic agonist. *Life Sci*, 54(3):185–191, 1994.
- [53] D. Grivet and R. J. Petit. Phylogeography of the common ivy (*Hedera* sp.) in Europe: genetic differentiation through space and time. *Mol Ecol*, 11(8):1351–1362, 2002.
- [54] A. Gulyas, R. Repges, and U. Dethlefsen. Konsequente Therapie chronisch-obstruktiver Atemwegserkrankungen bei Kindern. *Atemwegs- und Lungenkrankheiten*, 23(5):291–294, 1997.
- [55] F. F. Hamdan, M. D. Rochdi, B. Breton, D. Fessart, D. E. Michaud, P. G. Charest, S. A. Laporte, and M. Bouvier. Unraveling G protein-coupled receptor endocytosis pathways using real-time monitoring of agonist-promoted interaction between beta-arrestins and AP-2. *J Biol Chem*, 282(40):29089–29100, 2007.
- [56] Q. Hamid and M. Tulic. Immunobiology of asthma. *Annu Rev Physiol*, 71:489–507, 2009.
- [57] D. Hartl, C. G. Lee, C. A. Da Silva, G. L. Chupp, and J. A. Elias. Novel biomarkers in asthma: chemokines and chitinase-like proteins. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 9(1):60–66, 2009.



- [58] M. Hecker. Wirksamkeit und Verträglichkeit von Efeuextrakten bei Patienten mit Atemwegserkrankungen. *NaturaMed*, 14:28–33, 1999.
- [59] M. Hecker, F. Runkel, and A. Voelp. Behandlung chronischer Bronchitis mit einem Spezialextrakt aus Efeublättern - multizentrische Anwendungsbeobachtung mit 1350 Patienten. *Forschende Komplementärmedizin und Klassische Naturheilkunde*, 9:77–84, 2002.
- [60] O. Hegener, L. Prenner, F. Runkel, S. L. Baader, J. Kappler, and H. Häberlein. Dynamics of beta2-adrenergic receptor-ligand complexes on living cells. *Biochemistry*, 43(20):6190–6199, 2004.
- [61] R. Hänsel and O. Sticher. *Pharmakognosie, Phytopharmazie*. Springer-Verlag, 2007.
- [62] A. Hu, G. Nino, J. S. Grunstein, S. Fatma, and M. M. Grunstein. Prolonged heterologous beta2-adrenoceptor desensitization promotes proasthmatic airway smooth muscle function via PKA/ERK1/2-mediated phosphodiesterase-4 induction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 294(6):L1055–L1067, 2008.
- [63] M. Iino, T. Furugori, T. Mori, S. Moriyama, A. Fukuzawa, and T. Shibano. Rational design and evaluation of new lead compound structures for selective betaark1 inhibitors. *J Med Chem*, 45(11):2150–2159, 2002.
- [64] V. Iyer, T. M. Tran, E. Foster, W. Dai, R. B. Clark, and B. J. Knoll. Differential phosphorylation and dephosphorylation of beta2-adrenoceptor sites Ser262 and Ser355,356. *Br J Pharmacol*, 147(3):249–259, 2006.
- [65] A. James. Airway remodeling in asthma. *Curr Opin Pulm Med*, 11(1):1–6, 2005.
- [66] B. January, A. Seibold, B. Whaley, R. W. Hipkin, D. Lin, A. Schonbrunn, R. Barber, and

- R. B. Clark. Beta2-adrenergic receptor desensitization, internalization, and phosphorylation in response to full and partial agonists. *J Biol Chem*, 272(38):23871–23879, 1997.
- [67] M. Johnson. The beta-adrenoceptor. *Am J Respir Crit Care Med*, 158(5 Pt 3):S146–S153, 1998.
- [68] M. Johnson. Beta2-adrenoceptors: mechanisms of action of beta2-agonists. *Paediatr Respir Rev*, 2(1):57–62, 2001.
- [69] D. Knutson and C. Braun. Diagnosis and management of acute bronchitis. *Am Fam Physician*, 65(10):2039–2044, 2002.
- [70] B. K. Kobilka. G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim Biophys Acta*, 1768(4):794–807, 2007.
- [71] B. Koletzko. *Kinder- und Jugendmedizin*. Springer-Verlag, 2007.
- [72] H. Koto, J. C. Mak, E. B. Haddad, W. B. Xu, M. Salmon, P. J. Barnes, and K. F. Chung. Mechanisms of impaired beta-adrenoceptor-induced airway relaxation by interleukin-1beta in vivo in the rat. *J Clin Invest*, 98(8):1780–1787, 1996.
- [73] R. El Kouhen, M. Hu, D. J. Anderson, J. Li, and M. Gopalakrishnan. Pharmacology of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor mediated extracellular signal-regulated kinase signalling in PC12 cells. *Br J Pharmacol*, 156(4):638–648, 2009.
- [74] J. J. Kovacs, M. R. Hara, C. L. Davenport, J. Kim, and R. J. Lefkowitz. Arrestin development: emerging roles for beta-arrestins in developmental signaling pathways. *Dev Cell*, 17(4):443–458, 2009.

- [75] C. Krasel, J.-P. Vilardaga, M. Bünemann, and M. J. Lohse. Kinetics of G-protein-coupled receptor signalling and desensitization. *Biochem Soc Trans*, 32(Pt 6):1029–1031, 2004.
- [76] C. Krasel, U. Zabel, K. Lorenz, S. Reiner, S. Al-Sabah, and M. J. Lohse. Dual role of the beta2-adrenergic receptor C terminus for the binding of beta-arrestin and receptor internalization. *J Biol Chem*, 283(46):31840–31848, 2008.
- [77] J. G. Krupnick and J. L. Benovic. The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 38:289–319, 1998.
- [78] C. R. Kuhlmann, M. Gerigk, B. Bender, D. Closhen, V. Lessmann, and H. J. Luhmann. Fluvastatin prevents glutamate-induced blood-brain-barrier disruption in vitro. *Life Sci*, 82(25-26):1281–1287, 2008.
- [79] R. J. Lefkowitz, K. L. Pierce, and L. M. Luttrell. Dancing with different partners: protein kinase a phosphorylation of seven membrane-spanning receptors regulates their G protein-coupling specificity. *Mol Pharmacol*, 62(5):971–974, 2002.
- [80] X. Li, G. S. Baillie, and M. D. Houslay. Mdm2 directs the ubiquitination of beta-arrestin-sequestered cAMP phosphodiesterase-4D5. *J Biol Chem*, 284(24):16170–16182, 2009.
- [81] X. Li, E. Huston, M. J. Lynch, M. D. Houslay, and G. S. Baillie. Phosphodiesterase-4 influences the PKA phosphorylation status and membrane translocation of G-protein receptor kinase 2 (GRK2) in HEK-293beta2 cells and cardiac myocytes. *Biochem J*, 394(Pt 2):427–435, 2006.
- [82] W. Liang, Q. Hoang, R. B. Clark, and P. H. Fishman. Accelerated dephosphorylation of the beta2-adrenergic receptor by mutation of the C-terminal lysines: effects on ubiqui-

- tion, intracellular trafficking, and degradation. *Biochemistry*, 47(45):11750–11762, 2008.
- [83] H. Lüllmann, K. Mohr, and M. Wehling. *Pharmakologie und Toxikologie*. Georg Thieme Verlag, 2006.
- [84] C. M. Lloyd and C. M. Hawrylowicz. Regulatory T cells in asthma. *Immunity*, 31(3):438–449, 2009.
- [85] W. Lässig, H. Generlich, F. Heydolph, and E. Paditz. Wirksamkeit und Verträglichkeit efeuhaltiger Hustenmittel. *ÄP Pädiatrie*, 9:489–491, 1996.
- [86] L. M. Luttrell, S. S. Ferguson, Y. Daaka, W. E. Miller, S. Maudsley, G. J. Della Rocca, F. Lin, H. Kawakatsu, K. Owada, D. K. Luttrell, M. G. Caron, and R. J. Lefkowitz. Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science*, 283(5402):655–661, 1999.
- [87] M. J. Lynch, G. S. Baillie, and M. D. Houslay. cAMP-specific phosphodiesterase-4D5 (PDE4D5) provides a paradigm for understanding the unique non-redundant roles that PDE4 isoforms play in shaping compartmentalized cAMP cell signalling. *Biochem Soc Trans*, 35(Pt 5):938–941, 2007.
- [88] H.J. Mansfeld, H. Höhre, R. Repges, and U. Dethlefsen. Sekretolyse und Bronchospasmodolyse. Klinische Studie: Behandlung von Kindern mit chronisch obstruktiven Atemwegserkrankungen mit Prospan. *TW Pädiatrie*, 8:155–157, 1997.
- [89] H.J. Mansfeld, H. Höhre, R. Repges, and U. Dethlefsen. Therapie des Asthma bronchiale mit Efeublätter-Trockenextrakt. *Münchener Medizinische Wochenschrift*, 3(Jahrgang 140):26–30, 1998.

- [90] N. Marie, B. Aguila, A. Hasbi, A. Davis, P. Jauzac, and S. Allouche. Different kinases desensitize the human delta-opioid receptor (hDOP-R) in the neuroblastoma cell line SK-N-BE upon peptidic and alkaloid agonists. *Cell Signal*, 20(6):1209–1220, 2008.
- [91] E. Martikkala, M. Lehmusto, M. Lilja, A. Rozwandowicz-Jansen, J. Lunden, T. Tomohiro, P. Hänninen, U. Petäjä-Repo, and H. Härmä. Cell-based beta2-adrenergic receptor-ligand binding assay using synthesized europium-labeled ligands and time-resolved fluorescence. *Anal Biochem*, 392(2):103–109, 2009.
- [92] F. J. Martinez. Acute bronchitis: state of the art diagnosis and therapy. *Compr Ther*, 30(1):55–69, 2004.
- [93] F. Mayor, P. Penela, and A. Ruiz-Gómez. Role of G protein-coupled receptor kinase 2 and arrestins in beta-adrenergic receptor internalization. *Trends Cardiovasc Med*, 8(5):234–240, 1998.
- [94] D. W. McGraw, K. F. Almoosa, R. J. Paul, B. K. Kobilka, and S. B. Liggett. Antithetic regulation by beta-adrenergic receptors of Gq receptor signaling via phospholipase C underlies the airway beta-agonist paradox. *J Clin Invest*, 112(4):619–626, 2003.
- [95] B. T. McIntosh, B. Hudson, S. Yegorova, C. A. Jollimore, and M. E. Kelly. Agonist-dependent cannabinoid receptor signalling in human trabecular meshwork cells. *Br J Pharmacol*, 152(7):1111–1120, 2007.
- [96] J. Meyer-Wegener, K. Liebscher, M. Hettich, and H.-G. Kastner. Efeu versus Ambroxol bei chronischer Bronchitis. *Zeitschrift für Allgemeinmedizin*, 69:61–66, 1993.
- [97] E. E. Millman, J. L. Rosenfeld, D. J. Vaughan, J. Nguyen, W. P. Dai, E. Alpizar-Foster, R. B. Clark, B. J. Knoll, and R. H. Moore. Endosome sorting of beta 2-adrenoceptors is GRK5 independent. *Br J Pharmacol*, 141(2):277–284, 2004.

- [98] E. E. Millman, H. Zhang, H. Zhang, V. Godines, A. J. Bean, B. J. Knoll, and R. H. Moore. Rapid recycling of beta-adrenergic receptors is dependent on the actin cytoskeleton and myosin Vb. *Traffic*, 9(11):1958–1971, 2008.
- [99] M. Molimard, E. Naline, Y. Zhang, V. Le Gros, B. Begaud, and C. Advenier. Long- and short-acting beta2 adrenoceptor agonists: interactions in human contracted bronchi. *Eur Respir J*, 11(3):583–588, 1998.
- [100] R. H. Moore, E. E. Millman, E. Alpizar-Foster, W. Dai, and B. J. Knoll. Rab11 regulates the recycling and lysosome targeting of beta2-adrenergic receptors. *J Cell Sci*, 117(Pt 15):3107–3117, 2004.
- [101] R. H. Moore, E. E. Millman, V. Godines, N. A. Hanania, T. M. Tran, H. Peng, B. F. Dickey, B. J. Knoll, and R. B. Clark. Salmeterol stimulation dissociates beta2-adrenergic receptor phosphorylation and internalization. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 36(2):254–261, 2007.
- [102] E. Mutschler, G. Geisslinger, H. K. Kroemer, P. Ruth, and M. Schäfer-Korting. *Mutschler Arzneimittelwirkungen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 2008.
- [103] E. Mutschler, H.-G. Schaible, and P. Vaupel. *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 2007.
- [104] T. Nakahara, H. Moriuchi, M. Yunoki, K. Sakamoto, and K. Ishii. Y-27632 potentiates relaxant effects of beta 2-adrenoceptor agonists in bovine tracheal smooth muscle. *Eur J Pharmacol*, 389(1):103–106, 2000.
- [105] C. D. Nelson, J. J. Kovacs, K. N. Nobles, E. J. Whalen, and R. J. Lefkowitz. Beta-arrestin scaffolding of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha promo-

- tes agonist-stimulated sequestration of the beta2-adrenergic receptor. *J Biol Chem*, 283(30):21093–21101, 2008.
- [106] F. H. Netter. *Atlas der Anatomie*. Urban & Fischer Verlag, 2008.
- [107] P. Neugebauer, A. Mickenhagen, O. Siefer, and M. Walger. A new approach to pharmacological effects on ciliary beat frequency in cell cultures—exemplary measurements under pelargonium sidoides extract (EPs 7630). *Phytomedicine*, 12(1-2):46–51, 2005.
- [108] J. Neumann. *Immunbiologie*. Springer-Verlag, 2008.
- [109] T. Oguma, H. Kume, S. Ito, N. Takeda, H. Honjo, I. Kodama, K. Shimokata, and K. Kamiya. Involvement of reduced sensitivity to Ca in beta-adrenergic action on airway smooth muscle. *Clin Exp Allergy*, 36(2):183–191, 2006.
- [110] W. M. Oldham and H. E. Hamm. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(1):60–71, 2008.
- [111] European Scientific Cooperation on Phytotherapy. *ESCOP Monographs*. Georg Thieme Verlag, 2003.
- [112] R. A. Panettieri. Asthma persistence versus progression: does airway smooth muscle function predict irreversible airflow obstruction? *Allergy Asthma Proc*, 30(2):103–108, 2009.
- [113] C. S. Pao, B. L. Barker, and J. L. Benovic. Role of the amino terminus of G protein-coupled receptor kinase 2 in receptor phosphorylation. *Biochemistry*, 48(30):7325–7333, 2009.
- [114] J. Pitcher, M. J. Lohse, J. Codina, M. G. Caron, and R. J. Lefkowitz. Desensitization of the isolated beta 2-adrenergic receptor by beta-adrenergic receptor kinase, cAMP-

- dependent protein kinase, and protein kinase C occurs via distinct molecular mechanisms. *Biochemistry*, 31(12):3193–3197, 1992.
- [115] J. A. Pitcher, N. J. Freedman, and R. J. Lefkowitz. G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem*, 67:653–692, 1998.
- [116] D. M. Rosenbaum, S. G. Rasmussen, and B. K. Kobilka. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*, 459(7245):356–363, 2009.
- [117] D. Schaafsma, R. Gosens, I. S. Bos, H. Meurs, J. Zaagsma, and S. A. Nelemans. Role of contractile prostaglandins and Rho-kinase in growth factor-induced airway smooth muscle contraction. *Respir Res*, 6:85, 2005.
- [118] D. Schaafsma, R. Gosens, J. M. Ris, J. Zaagsma, H. Meurs, and S. A. Nelemans. Insulin induces airway smooth muscle contraction. *Br J Pharmacol*, 150(2):136–142, 2007.
- [119] J. L. Seachrist, P. H. Anborgh, and S. S. Ferguson. Beta2-adrenergic receptor internalization, endosomal sorting, and plasma membrane recycling are regulated by rab GTPases. *J Biol Chem*, 275(35):27221–27228, 2000.
- [120] C. Shayo, N. Fernandez, B. L. Legnazzi, F. Monczor, A. Mladovan, A. Baldi, and C. Davio. Histamine H2 receptor desensitization: involvement of a select array of G protein-coupled receptor kinases. *Mol Pharmacol*, 60(5):1049–1056, 2001.
- [121] S. K. Shenoy, L. S. Barak, K. Xiao, S. Ahn, M. Berthouze, A. K. Shukla, L. M. Luttrell, and R. J. Lefkowitz. Ubiquitination of beta-arrestin links seven-transmembrane receptor endocytosis and ERK activation. *J Biol Chem*, 282(40):29549–29562, 2007.
- [122] S. K. Shenoy, M. T. Drake, C. D. Nelson, D. A. Houtz, K. Xiao, S. Madabushi, E. Reiter, R. T. Premont, O. Lichtarge, and R. J. Lefkowitz. Beta-arrestin-dependent, G



- protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor. *J Biol Chem*, 281(2):1261–1273, 2006.
- [123] S. K. Shenoy, A. S. Modi, A. K. Shukla, K. Xiao, M. Berthouze, S. Ahn, K. D. Wilkinson, W. E. Miller, and R. J. Lefkowitz. Beta-arrestin-dependent signaling and trafficking of 7-transmembrane receptors is reciprocally regulated by the deubiquitinase USP33 and the E3 ligase Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(16):6650–6655, 2009.
- [124] A. Sieben, L. Prenner, T. Sorkalla, A. Wolf, D. Jakobs, F. Runkel, and H. Häberlein. Alpha-hederin, but not Hederacoside C and Hederagenin from *Hedera helix*, affects the binding behavior, dynamics, and regulation of beta 2-adrenergic receptors. *Biochemistry*, 48(15):3477–3482, 2009.
- [125] W. Siegenthaler and H. E. Blum. *Klinische Pathophysiologie*. Georg Thieme Verlag, 2006.
- [126] V. Simon, M.-T. Robin, C. Legrand, and J. Cohen-Tannoudji. Endogenous G protein-coupled receptor kinase 6 triggers homologous beta-adrenergic receptor desensitization in primary uterine smooth muscle cells. *Endocrinology*, 144(7):3058–3066, 2003.
- [127] J. Smucny, L. Becker, and R. Glazier. Beta2-agonists for acute bronchitis. *Cochrane Database Syst Rev*, (4):CD001726, 2006.
- [128] M. A. Soriano-Ursúa, J. G. Trujillo-Ferrara, and J. Correa-Basurto. Scope and difficulty in generating theoretical insights regarding ligand recognition and activation of the beta(2) adrenergic receptor. *J Med Chem*, 2009.
- [129] M. Stauss-Grabo. Untersuchungen zur Pharmakokinetik des Efeu-Saponins alpha-Hederin in Ratten. *Dissertationsschrift Philipps-Universität Marburg*, 2008.

- [130] Y. Sun, D. McGarrigle, and X.-Y. Huang. When a G protein-coupled receptor does not couple to a G protein. *Mol Biosyst*, 3(12):849–854, 2007.
- [131] E. J. Swindle, J. E. Collins, and D. E. Davies. Breakdown in epithelial barrier function in patients with asthma: identification of novel therapeutic approaches. *J Allergy Clin Immunol*, 124(1):23–34; quiz 35–6, 2009.
- [132] Y. Tanaka, Y. Yamashita, T. Horinouchi, and K. Koike. Adrenaline produces the relaxation of guinea-pig airway smooth muscle primarily through the mediation of beta(2)-adrenoceptors. *J Smooth Muscle Res*, 41(3):153–161, 2005.
- [133] Y. Tanaka, Y. Yamashita, H. Michikawa, T. Horinouchi, and K. Koike. Pharmacological characterization of the beta-adrenoceptor that mediates the relaxant response to noradrenaline in guinea-pig tracheal smooth muscle. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 375(1):51–64, 2007.
- [134] C. Thäle, A. Kiderlen, and H. Kolodziej. Anti-infective mode of action of EPs 7630 at the molecular level. *Planta Med*, 74(6):675–681, 2008.
- [135] A. B. Tobin. G-protein-coupled receptor phosphorylation: where, when and by whom. *Br J Pharmacol*, 153 Suppl 1:S167–S176, 2008.
- [136] T. M. Tran, J. Friedman, F. Baameur, B. J. Knoll, R. H. Moore, and R. B. Clark. Characterization of beta2-adrenergic receptor dephosphorylation: Comparison with the rate of resensitization. *Mol Pharmacol*, 71(1):47–60, 2007.
- [137] T. M. Tran, J. Friedman, E. Qunaibi, F. Baameur, R. H. Moore, and R. B. Clark. Characterization of agonist stimulation of cAMP-dependent protein kinase and G protein-coupled receptor kinase phosphorylation of the beta2-adrenergic receptor using phosphoserine-specific antibodies. *Mol Pharmacol*, 65(1):196–206, 2004.

- [138] T. M. Tran, R. Jorgensen, and R. B. Clark. Phosphorylation of the beta2-adrenergic receptor in plasma membranes by intrinsic GRK5. *Biochemistry*, 46(50):14438–14449, 2007.
- [139] A. Trute, J. Gross, E. Mutschler, and A. Nahrstedt. In vitro antispasmodic compounds of the dry extract obtained from *Hedera helix*. *Planta Med*, 63(2):125–129, 1997.
- [140] P. Tsao and M. von Zastrow. Downregulation of G protein-coupled receptors. *Curr Opin Neurobiol*, 10(3):365–369, 2000.
- [141] J. Turner and C. E. Jones. Regulation of mucin expression in respiratory diseases. *Biochem Soc Trans*, 37(Pt 4):877–881, 2009.
- [142] D. J. Vaughan, E. E. Millman, V. Godines, J. Friedman, T. M. Tran, W. Dai, B. J. Knoll, R. B. Clark, and R. H. Moore. Role of the G protein-coupled receptor kinase site serine cluster in beta2-adrenergic receptor internalization, desensitization, and beta-arrestin translocation. *J Biol Chem*, 281(11):7684–7692, 2006.
- [143] D. Vobornik, Y. Rouleau, J. Haley, M. Bani-Yaghoub, R. Taylor, L. J. Johnston, and J. P. Pezacki. Nanoscale organization of beta2-adrenergic receptor-Venus fusion protein domains on the surface of mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 382(1):85–90, 2009.
- [144] J. K. Walker, R. R. Gainetdinov, D. S. Feldman, P. K. McFawn, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz, R. T. Premont, and J. T. Fisher. G protein-coupled receptor kinase 5 regulates airway responses induced by muscarinic receptor activation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 286(2):L312–L319, 2004.
- [145] H. Wang, S. Doronin, and C. C. Malbon. Insulin activation of mitogen-activated protein

- kinases ERK1,2 is amplified via beta-adrenergic receptor expression and requires the integrity of the Tyr350 of the receptor. *J Biol Chem*, 275(46):36086–36093, 2000.
- [146] W. C. Wang, K. A. Mihlbachler, A. C. Brunnett, and S. B. Liggett. Targeted transgenesis reveals discrete attenuator functions of GRK and PKA in airway beta2-adrenergic receptor physiologic signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(35):15007–15012, 2009.
- [147] U. Welsch. *Lehrbuch Histologie*. Urban & Fischer Verlag, 2006.
- [148] R. P. Wenzel and A. A. Fowler. Clinical practice. Acute bronchitis. *N Engl J Med*, 355(20):2125–2130, 2006.
- [149] N. Wienkötter, F. Begrow, U. Kinzinger, D. Schierstedt, and E. J. Verspohl. The effect of thyme extract on beta2-receptors and mucociliary clearance. *Planta Med*, 73(7):629–635, 2007.
- [150] G. Worrall. Acute bronchitis. *Can Fam Physician*, 54(2):238–239, 2008.
- [151] H. Worth, D. Adam, W. Handrick, W. Leupold, H. Lode, U. Loos, R. Marre, H. Mauch, T. Schaberg, P. Shah, V. Sill, and R. Wettengel. Prophylaxe und Therapie von bronchialen Infektionen. *Medizinische Klinik*, 92 (12):699–704, 1997.

## Publikationen

1. Wolf A, Gosens R, Meurs H, Häberlein H. *Pre-treatment with  $\alpha$ -hederin increases  $\beta$ -adrenoceptor mediated relaxation of airway smooth muscle.*

Eingereicht

2. Sieben A, Prenner L, Sorkalle T, Wolf A, Jakobs D, Runkel F, Häberlein H.  *$\alpha$ -Hederin, but not hederacosid C and hederagenin from *Hedera helix*, affects the binding behavior, dynamics, and regulation of  $\beta_2$ -adrenergic receptor.*

Biochemistry 2009; 48(15):5106-5113

## Poster

1. Wolf A, Sieben A, Runkel F, Häberlein H. *Influence of the saponins from *Hedera helix* on the  $\beta_2$ -adrenergic responsiveness of living cells investigated by  $\beta_2$ -adrenergic receptor internalization studies and determination of intracellular cAMP levels.*

7. Berliner Kongress Phytotherapie 2009

2. Sieben A, Wolf A, Runkel F, Häberlein H. *Fluorescence correlation spectroscopy is a noninvasive technique for studying ligand-receptor interactions in live cells as shown for  $\beta_2$ -adrenergic receptors.*

7. Berliner Kongress Phytotherapie 2009

3. Sieben A, Wolf A, Runkel F, Häberlein H.  *$\alpha$ -Hederin from *Hedera helix* affects the binding behaviour of  $\beta_2$ -adrenergic receptors as revealed by fluorescence correlation spectroscopy.*

7. Berliner Kongress Phytotherapie 2009

## Eidesstattliche Erklärung:

Hiermit versichere ich, Anne Katrin Wolf, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe. Ferner erkläre ich, die vorliegende Arbeit an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht zu haben. Ich habe noch keinen Promotionsversuch unternommen. Die Ergebnisse dieser Dissertation sind an den aufgeführten Stellen auszugsweise veröffentlicht.

Bonn, Dezember 2009

Anne Katrin Wolf

# Anhang

## BBS-Puffer (zweifach konzentriert)

50 mM BES

280 mM NaCl

1,8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

pH 6,95

## Blotpuffer

48 mM Tris, pH 6,8

39 mM Glycin

0,037 % SDS

20 % Methanol

## HE-Puffer

200 mM HEPES

1,0 mM EDTA

pH 7,7

## Krebs-Henseleit-Lösung

117,5 mM NaCl

5,6 mM KCl

1,18 mM MgSO<sub>4</sub>

2,5 mM CaCl<sub>2</sub>

1,28 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
25,0 mM NaHCO<sub>3</sub>  
5,55 mM D-Glucose

### Locke-Lösung

154 mM NaCl  
5,6 mM KCl  
2,3 mM CaCl<sub>2</sub>  
1,0 mM MgCl<sub>2</sub>  
3,6 mM NaHCO<sub>3</sub>  
5,0 mM HEPES  
20,0 mM D-Glucose  
pH 7,4

### Mowiol-Lösung

12 g Glycerol  
4,8 g Mowiol  
in 12 ml H<sub>2</sub>O, über Nacht lösen  
+ 24 ml 0,2 M Tris, pH 6,8  
bei 50°C für 10 min inkubieren  
15 min, 4000 rpm, 4°C

### SDS-Laufpuffer

25 mM Tris, pH 6,8  
0,1 % SDS



191 mM Glycerin

### SDS-Probenpuffer (zweifach konzentriert)

2 % SDS

10 % Glycerin

100 mM Tris, pH 6,8

0,01 % Bromphenolblau (v/v)

10 mM DTT

### SDS-Sammelgel

5 % Acrylamid

125 mM Tris, pH 6,8

0,1 % SDS

0,1 % APS

0,02 % TEMED

### SDS-Trenngel

10 % Acrylamid

37,5 mM Tris, pH 8,8

0,1 % SDS

0,1 % APS

0,02 % TEMED

### Solubilisierungspuffer

20 mM HEPES

150 mM NaCl

0,9 % Dodecyl- $\beta$ -maltosid

20 mM Natriumpyrophosphat tetrabasisch

10 mM NaF

0,1  $\mu$ M Okadasäure

1x Protease Inhibitor Cocktail

10  $\mu$ g/ml Trypsin Inhibitor

10  $\mu$ g/ml Leupeptin

1x Phosphatase Inhibitor Cocktail 1

pH 7,4