

Aus dem Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Veränderung der
Muskarin-(M₂)-Rezeptor-G_i-Protein-Adenylatzyklase-Interaktion
in den respiratorischen Segmenten der Atemwege bei der Recurrent Airway
Obstruction (RAO) des Pferdes**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Peter Hajek
aus Darmstadt

Leipzig, 2009

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig.

Dekan: Prof. Dr. Arwid Dauschies

Betreuer: Prof. Dr. Fritz Rupert Ungemach

Gutachter: Prof. Dr. Fritz Rupert Ungemach

Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie

Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Prof. Dr. Gerald Fritz Schusser

Medizinische Tierklinik

Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Prof. Dr. Manfred Kietzmann

Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie

Tierärztliche Hochschule Hannover

Tag der Verteidigung: 23. Juni 2009

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
2	LITERATURÜBERSICHT.....	5
2.1	Recurrent Airway Obstruction (RAO).....	5
2.2	Muskarin-cholinerge Rezeptoren.....	7
2.2.1	Klassifizierung.....	7
2.2.2	Mechanismen der Signalübertragung.....	8
2.2.3	Regulationsmechanismen.....	11
2.2.4	Lokalisation und Funktion muskarin-cholinergere Rezeptoren im Respirationstrakt.....	14
2.2.5	Bedeutung des muskarin-cholinergen Rezeptorsystems bei der RAO des Pferdes und beim Asthma bronchiale des Menschen.....	16
2.2.6	Messung der funktionellen Interaktion zwischen M ₂ -Rezeptoren und G _i -Proteinen.....	19
2.2.6.1	Die Guanosin 5'-(γ-[³⁵ S]thiotriphosphat) – Bindungsstudie.....	19
3	TIERE, MATERIALIEN UND METHODEN.....	25
3.1	Tiere.....	25
3.2	Materialien und Methoden.....	26
3.2.1	Gewinnung des Organmaterials.....	26
3.2.2	Membranpräparation für Western Blot und Adenylatzyklase.....	27
3.2.3	Membranpräparation für die ³⁵ S-GTPγS Radioligandenbindungsstudie.....	28
3.2.4	Proteinbestimmung.....	29
3.2.5	Untersuchungen zur Bestimmung der funktionellen M ₂ -G _i -Protein-Interaktion.....	30
3.2.5.1	Guanosin 5'-(γ-[³⁵ S]thiotriphosphat)-Bindungsstudien.....	30
3.2.5.1.1	GTPγS-abhängige ³⁵ S-GTPγS-Bindung.....	32
3.2.5.1.2	Mg ²⁺ - und Na ⁺ -abhängige ³⁵ S-GTPγS-Bindung.....	32
3.2.5.1.3	Guanosindiphosphat-abhängige ³⁵ S-GTPγS-Bindung.....	33
3.2.5.1.4	Zeitabhängige ³⁵ S-GTPγS-Bindung.....	34
3.2.5.1.5	Ermittlung der Agonisten-abhängigen Stimulation der ³⁵ S-GTPγS-Bindung.....	35
3.2.5.1.6	Einfluss von N-Ethylmaleimid und Pertussistoxin auf die ³⁵ S-GTPγS-Bindung.....	35
3.2.5.2	M ₂ -G _i -Protein-vermittelte Hemmung der Adenylatzyklase-Aktivität.....	36
3.2.5.3	Auswertung der Ergebnisse.....	39
3.2.6	SDS-Polyamidgelelektrophorese und Western Blot.....	40

3.2.7	Chemikalien.....	44
3.2.8	Einmalartikel.....	46
3.2.9	Geräte.....	47
4	ERGEBNISSE.....	49
4.1	Charakterisierung der muskarin-cholinergen Signaltransduktion im Respirationstrakt gesunder und RAO-erkrankter Pferde.....	49
4.1.1	³⁵ S-GTP γ S Radioligandenbindungsstudie.....	49
4.1.1.1	Messung der unspezifischen Bindung.....	50
4.1.1.2	Natrium-, Magnesium- und GDP-abhängige Stimulation der ³⁵ S-GTP γ S-Bindung.....	51
4.1.1.3	Zeitabhängige ³⁵ S-GTP γ S-Bindung.....	59
4.1.1.4	Charakterisierung der Muskarin-Rezeptor-G-Protein-Interaktion im equinen Respirationstrakt.....	60
4.1.1.4.1	Agonisten-induzierte Stimulierbarkeit der ³⁵ S-GTP γ S-Bindung.....	60
4.1.1.4.2	N-Ethylmaleimid- und Pertussistoxin-vermittelte Modulation der Agonisten-induzierten Erhöhung der ³⁵ S-GTP γ S-Bindung.....	65
4.1.1.5	Charakterisierung der Muskarin-Rezeptor-G-Protein-Interaktion im equinen Respirationstrakt bei der RAO.....	69
4.1.1.5.1	Agonisten-induzierte Stimulierbarkeit der ³⁵ S-GTP γ S-Bindung bei RAO-erkrankten Pferden.....	69
4.1.1.5.2	N-Ethylmaleimid- und Pertussistoxin-vermittelte Modulation der Agonisten-induzierten Erhöhung der ³⁵ S-GTP γ S-Bindung bei RAO-erkrankten Pferde.....	73
4.1.2	Western Blot-Analyse der G _{i/o} -Proteinmenge.....	80
4.1.3	Aktivität der Adenylatzyklase.....	81
4.1.3.1	Konzentrationsabhängige Wirkung von Forskolin auf die Adenylatzyklase-Aktivität...81	81
4.1.3.2	Konzentrationsabhängige Hemmung der Forskolin-stimulierten Adenylatzyklase- Aktivität durch Oxotremorin M.....	82
4.1.3.3	Wirkung von N-Ethylmaleimid, Pertussistoxin und Oxotremorin M auf die Adenylatzyklase-Aktivität.....	84
5	DISKUSSION.....	91
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	105
7	SUMMARY.....	107
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	109

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur des muskarin-cholinergen Rezeptors als GPCR.....	10
Abbildung 2: Schema der Signalübertragung der Rezeptorsysteme.....	11
Abbildung 3: Regulationsmechanismen von muskarin-cholinergen Rezeptoren.....	14
Abbildung 4: G-Protein-abhängige, messbare Signalstärken der stimulierten ³⁵ S-GTPS-Bindung...20	
Abbildung 5: Prinzip des G-Protein-Zyklus während der ³⁵ S-GTPγS-Bindungsstudie.....	22
Abbildung 6: Konzentrationsabhängige Hemmung der ³⁵ S-GTPγS-Bindung durch GTPγS.....	51
Abbildung 7: Konzentrationsabhängiger Einfluss von Na ⁺ (NaCl) auf die basale und Agonisten-stimulierte ³⁵ S-GTPγS-Bindung.....	53
Abbildung 8: Konzentrationsabhängiger Einfluss von Mg ²⁺ (MgCl ₂) auf die basale und Agonisten-stimulierte ³⁵ S-GTPγS-Bindung.....	55
Abbildung 9: GDP-abhängige Hemmung der basalen und Agonisten-stimulierten ³⁵ S-GTPγS-Bindung – Trachea.....	57
Abbildung 10: GDP-abhängige Hemmung der basalen und Agonisten-stimulierten ³⁵ S-GTPγS-Bindung – Bronchien.....	58
Abbildung 11: GDP-abhängige Hemmung der basalen und Agonisten-stimulierten ³⁵ S-GTPγS-Bindung – Lunge.....	59
Abbildung 12: Zeitabhängige, basale und Agonisten-vermittelte ³⁵ S-GTPγS-Bindungsmenge.....	60
Abbildung 13: Konzentrationsabhängige, Agonisten-induzierte ³⁵ S-GTPγS-Bindung.....	63
Abbildung 14: Nettostimulation der Agonisten-induzierten ³⁵ S-GTPγS-Bindung.....	64
Abbildung 15: NEM-vermittelte Hemmung der Agonisten-stimulierten ³⁵ S-GTPγS-Bindung.....	66
Abbildung 16: PTX-abhängige Hemmung der Agonisten-stimulierten ³⁵ S-GTPγS-Bindung.....	68
Abbildung 17: Konzentrationsabhängige, Agonisten-induzierte ³⁵ S-GTPγS-Bindung bei RAO.....	71
Abbildung 18: Agonisten-vermittelte Nettostimulation der ³⁵ S-GTPγS-Bindung bei RAO.....	72
Abbildung 19: NEM-vermittelte Hemmung der Agonisten-stimulierten ³⁵ S-GTPγS-Bindung bei RAO.....	75
Abbildung 20: Vergleich der E _{max} -Werte der ³⁵ S-GTPγS-Bindung zwischen Kontrolle und RAO in Anwesenheit von NEM.....	76
Abbildung 21: PTX-abhängige Hemmung der Agonisten-stimulierten ³⁵ S-GTPγS-Bindung bei RAO.....	78
Abbildung 22: PTX-abhängige, Agonisten-stimulierte ³⁵ S-GTPγS-Bindung (gesund vs. RAO).....	79
Abbildung 23: Immunoblot des G _i -Proteins.....	80

Abbildung 24: Hemmung der Forskolin-induzierten cAMP-Produktion durch Oxotremorin M.....	83
Abbildung 25: Einfluss von NEM auf die Forskolin-induzierte cAMP-Produktion.....	85
Abbildung 26: Einfluss von NEM auf die Forskolin-induzierte cAMP-Produktion bei RAO.....	86
Abbildung 27: Einfluss von PTX auf die Forskolin-induzierte cAMP-Produktion.....	87
Abbildung 28: Oxotremorin M- und PTX-abhängige Forskolin-induzierte cAMP-Produktion (gesund vs. RAO).....	89

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Alter und Geschlecht der Versuchspferde.....	26
Tabelle 2: Pipettierschema der Versuchsansätze der ³⁵ S-GTPγS-Bindungsstudien; MgCl ₂ /NaCl.....	33
Tabelle 3: Pipettierschema der Versuchsansätze der ³⁵ S-GTPγS-Bindungsstudien; GDP.....	34
Tabelle 4: Pipettierschema der Versuchsansätze der ³⁵ S-GTPγS-Bindungsstudien; Agonisten.....	35
Tabelle 5: Pipettierschema Adenylatzyklase – Leerwert.....	38
Tabelle 6: Pipettierschema Adenylatzyklase – Forskolin.....	38
Tabelle 7: Pipettierschema Adenylatzyklase – Oxotremorin M und NEM.....	39
Tabelle 8: Pipettierschema Adenylatzyklase – Oxotremorin M und PTX.....	39
Tabelle 9: Basalbindung und Agonisten-stimulierte ³⁵ S-GTPγS-Bindung in Anwesenheit von MgCl ₂	56
Tabelle 10: Hemmung der ³⁵ S-GTPγS-Bindung mit PTX.....	69
Tabelle 11: Agonisten-induzierte Nettostimulation der ³⁵ S-GTPγS-Bindung (E _{max}) in respiratorischen Segmenten gesunder und RAO-erkrankter Pferde.....	73
Tabelle 12: Densitometrische Bestimmung der Expressionsmenge von G _i -Proteinen.....	81
Tabelle 13: Vergleich der Forskolin-induzierten cAMP-Produktion in drei Segmenten des Respirationstrakts.....	82
Tabelle 14: Funktionelle Beeinflussung der AC durch Oxotremorin M und PTX.....	90

Abkürzungen

[³ H]-PIP ₂	[³ H]-Phosphoinositol-4,5-bisphosphat
³⁵ S-GTPγS	Guanosin 5'-(γ-[³⁵ S]thiotriphosphat)
AC	Adenylatzyklase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintri-phosphat
BSA	Bovines Serum Albumin
cAMP	cyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
COB	chronisch obstruktive Bronchitis
CPM	counts per minute
DAG	Diacylglycerol
DPM	disintegrations per minute
DTT	DL-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(-aminoethylether)-N,N,N',N' -tetraacetylsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
G-Protein	Guanosinnukleotid-bindendes Protein
GDP	Guanindiphosphat
GRKs	gekoppelte Rezeptorkinasen
GPCR	G-Protein Coupled Receptor
GTP	Guanosintri-phosphat
GTPγS	Guanosin-5'-O-(3-thiophosphat)
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
MBP	Major Basic Protein
MR-Agonist	Muskarin-Rezeptor-Agonist
NEM	N-Ethylmaleimid
Ox _o M	Oxotremorin M
PIP ₂	Phosphoinositol-4,5-diphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PTX	Pertussistoxin

RG	Reaktionsgemisch
RPM	rounds per minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TBS	Tris Buffer Sodium
TBS-T	Tris Buffer Sodium-Tween
TB	Gesamtbindung
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UB	Unspezifische Bindung

1 EINLEITUNG

Die Funktion der Atemwege wird durch das autonome Nervensystem gesteuert, das aus dem sympathischen und dem parasympathischen Nervensystem besteht. Das sympathische Nervensystem bewirkt über das β -adrenerge Rezeptorsystem eine Relaxation der glatten Atemwegsmuskulatur. Das parasympathische Nervensystem, das den Respirationstrakt über den N. vagus erreicht, führt bei Aktivierung seines muskarin-cholinergen Rezeptorsystems zu einer Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur. Es herrscht eine Balance zwischen beiden Systemen, über die die physiologische Atemwegsfunktion aufrecht erhalten wird.

Eine veränderte Regulation durch das autonome Nervensystem und dessen Rezeptorsysteme stellt bei den obstruktiven Atemwegserkrankungen eine der wichtigsten mechanistischen Ursachen dar.

Zahlreiche Studien zur Funktion der Rezeptorsysteme geben Hinweise darauf, dass beim Asthma bronchiale des Menschen eine Beeinträchtigung der β -adrenergen Rezeptoren vorliegt (BAI 1992). Erst kürzlich konnte eine Abnahme der β -adrenergen Rezeptorsignalwege im Respirationstrakt von an RAO erkrankten Pferden festgestellt werden (ABRAHAM et al. 2006).

Ob die muskarin-cholinergen Rezeptorsysteme eine wesentliche Rolle bei obstruktiven Atemwegserkrankungen spielen, ist bisher nicht eindeutig geklärt. Die Bronchokonstriktion bzw. der Bronchospasmus ist jedoch beim Asthma bronchiale des Menschen und bei der RAO des Pferdes durch eine erhöhte Aktivität des parasympathischen Nervensystems gekennzeichnet. Die Gründe hierfür beruhen bisher nur auf Vermutungen. Die erhöhte Aktivität kann mit einer gesteigerten Expression postsynaptischer muskarin-cholinergerezeptoren bzw. mit einem Defekt der präsynaptischen Autorezeptoren verbunden sein. Es ist nicht bekannt, ob die gesteigerte cholinerge Aktivität bei der RAO durch eine erhöhte Freisetzung von Acetylcholin aus parasympathischen Nervenendigungen oder durch eine verstärkte Antwort der glatten Muskulatur auf Acetylcholin hervorgerufen wird. Eine Ursache könnte auch ein Überwiegen der muskarin-cholinergen Funktion infolge des beeinträchtigten β -adrenergen System bei RAO sein. So konnten neuere Untersuchungen der glatten Atemwegsmuskulatur bei Pferden zumindest eine unveränderte Expression muskarin-cholinergerezeptoren bei der RAO zeigen (ABRAHAM et al. 2007A). Die Pathogenese und die genauen Mechanismen obstruktiver Atemwegserkrankungen sind aber im Detail nicht eindeutig untersucht.

Muskarin-cholinerge Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren und übertragen ihr Signal über G-Proteine der $G_{i/o}$ -Familie bzw. G-Proteine der $G_{q/11}$ -Familie. Bisher wurden vier verschiedene Muskarinrezeptor-Subtypen (M_1 , M_2 , M_3 , M_4) pharmakologisch

charakterisiert. Unklar ist die pharmakologische Funktion eines fünften Muskarinrezeptor-Subtyps, der durch Klonierung von cDNA (m5) ermittelt werden konnte. Hinsichtlich der Lokalisation und Verteilung der verschiedenen muskarin-cholinergen Rezeptorsubtypen gibt es erhebliche speziesabhängige Unterschiede. In Trachea und Bronchien des equinen Respirationstrakts kommen nur die Subtypen M_2 und M_3 in einem Verhältnis von 4:1 vor (ABRAHAM et al. 2007B). Im Lungenparenchym kommen diese beiden Subtypen im etwa gleichen Verhältnis vor. Außerdem wird der M_1 -Subtyp exprimiert und stellt einen kleineren Teil (24-28%) an der Gesamtmenge dar. Der M_2 - und der M_3 -Subtyp koppeln an unterschiedliche G-Proteine und beeinflussen folglich unterschiedliche Effektorproteine. Der vorwiegend exprimierte M_2 -Rezeptor koppelt bevorzugt an $G_{i/o}$ -Proteine und senkt durch Inhibition der Adenylatzyklase den intrazellulären cAMP-Spiegel (FELDER 1995). Er antagonisiert somit die Funktion des β_2 -Adrenozeptors, der über den Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels eine Relaxation der glatten Atemwegsmuskulatur bewirkt, und steigert damit die Kontraktion der glatten Muskulatur (FERNANDES et al. 1992, EGLIN et al. 1994). Der M_3 -Rezeptor koppelt mit Präferenz an G-Proteine der $G_{q/11}$ -Familie und stimuliert nach Rezeptoraktivierung das Enzym Phospholipase C. Nach Bildung der second messenger Inositoltriphosphat und Diacylglycerin führt dies zu einer direkten Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur durch Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration (FELDER 1995, CAULFIELD 1993).

Hinsichtlich dieser Unterschiede ist es schwierig, die physiologischen Rollen der einzelnen Subtypen in ihrem Zusammenspiel zu definieren. Die Regulierung des Tonus der glatten Atemwegsmuskulatur und die Regulation der Sekretion der mukösen Drüsen wurden bisher gut untersucht (BARNES 1993). Wenig bekannt sind jedoch Veränderungen hinsichtlich der Lokalisation und Funktion muskarin-cholinergen Rezeptoren bei Atemwegserkrankungen wie Asthma oder der COB des Pferdes. In asthmatischen Tiermodellen wird eine Dysfunktion von hauptsächlich präsynaptischen M_2 -Rezeptoren, die die Acetylcholin-Freisetzung über einen negativen Feedbackmechanismus kontrollieren, vermutet (TEN BERGE et al. 1995, SANTING et al. 1995, TEN BERGE 1996). Die vermutete Beteiligung der M_2 -Rezeptoren beim Krankheitsgeschehen bezog sich bisher nur auf die Entdeckung und die Quantifizierung der Rezeptoren auf der Zelloberfläche und nicht auf die Weiterleitung des Signals in das Zellinnere. In dieser Arbeit sollen Erkenntnisse über die molekularen Pathomechanismen bei der Entstehung der RAO beim Pferd gewonnen werden, die sich auf die Post-Rezeptorebene beziehen. Deshalb ist eine Zielstellung dieser Arbeit die Etablierung einer pharmakologischen Methode zur Untersuchung der

M₂-Rezeptor-abhängigen G_i-Protein-Aktivierung, welche als limitierender Faktor der glatten Atemwegsmuskelfunktion beschrieben wird (ROUX et al. 1998, BILLINGTON u. PENN 2003). Eine geeignete Methode für die Messung der M₂-G_i-Protein-Interaktion ist die ³⁵S-GTPγS-Bindungsstudie. Die muskarin-Rezeptor-abhängige M₂-G_i-Interaktion wurde bisher im menschlichen Myokard (BÖHM et al. 1994), im Vorhof des Herzens von Schweinen (HILF u. JAKOBS 1992), im Bulbus olfactorius der Ratte (OLIANAS u. ONALI 1996) und in verschiedenen Zelllinien (WIELAND et al. 1995) charakterisiert.

Bisher wurde keine derartige Untersuchung im Gewebe des equinen Respirationstrakts durchgeführt. Die ³⁵S-GTPγS-Bindungsstudie soll an Membranpräparationen des Tracheal- und Bronchialepithels mit der darunter liegenden glatten Muskulatur und des Lungenparenchyms etabliert werden.

Um weitere Rückschlüsse auf die Funktionalität der Signalkaskade zu erhalten, ist eine weitere Zielstellung dieser Arbeit die Überprüfung der rezeptor-vermittelten Aktivierbarkeit der Adenylatzyklase (G_i) in den oben genannten Geweben.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Recurrent Airway Obstruction (RAO)

Eine der häufigsten Erkrankungen des Pferdes ist die chronisch obstruktive Bronchitis mit einem Auftreten von über 50% (BRACHER et al. 1991, DIXON et al. 1995). Geographisch betrachtet häuft sich diese Erkrankung vor allem in der nördlichen Hemisphäre (Europa, USA), wo kälteres Klima und feuchte Sommermonate eine längere Einstallung und schlechte Heu- und Strohqualität bedingen.

Bronchokonstriktion, Husten, vermehrte Schleimsekretion und Hyperreaktivität sind allgemeine Symptome der klinischen Manifestation einer obstruktiven Bronchitis des Pferdes und ähnelt damit dem Asthma bronchiale des Menschen. Diese Symptome korrelieren gut mit dem Schweregrad der Erkrankung (O'BYRNE 1988, SASSE 1995). Die hierfür verantwortlichen Mechanismen sind nicht vollständig geklärt, wobei aber die Entzündung der Atemwege und die Veränderung der autonomen Funktionen eine wesentliche Rolle zu spielen scheinen. Die bronchiale Hyperreaktivität deutet darauf hin, dass sowohl die RAO als auch das Asthma bronchiale allergenen Ursprungs sind. Beim Pferd stellen die bei Stallhaltung entstehenden Verunreinigungen von Futter und Einstreu die wichtigsten Allergene dar. Schimmelpilzsporen von *Faenia rectivirgula* und *Aspergillus fumigatus* werden hierbei als wichtige Noxen vermutet (DERKSEN et al. 1988, MCGORUM et al. 1993). Darüber hinaus scheinen Faktoren wie vorangegangene Virusinfektionen (THORSEN et al. 1983, SCHLOCKER et al. 1995), Endotoxine (PIRIE et al. 2001) und unspezifische Stimuli wie z.B. staubhaltige und ammoniakbelastete Stallluft, das Krankheitsbild zu begünstigen. Außerdem liegt möglicherweise bei Pferden eine genetische Prädisposition vor (MARTI et al. 1991).

Es liegen zahlreiche Erkenntnisse vor, die darauf hinweisen, dass in den Atemwegen komplexe Interaktionen zwischen entzündlichen Prozessen und dem autonomen Nervensystem mit dessen Rezeptorsystemen stattfindet, die letztendlich dazu führen, dass bei obstruktiven Atemwegserkrankungen wie der RAO des Pferdes und dem Asthma bronchiale des Menschen eine übermäßige Bronchokonstriktion (Bronchospasmus) auftritt. Bei den meisten Säugetierspezies einschließlich dem Pferd und dem Menschen bewirken Arzneimittel, die β -adrenerge Rezeptoren stimulieren (FERNANDES et al. 2004, BARNES 1995) und Arzneimittel, die muskarin-cholinerge Rezeptoren blockieren (CHAPMAN 2001), eine signifikante und teilweise fast maximale Bronchodilatation. Daraus resultiert, dass den obstruktiven Atemwegserkrankungen eine veränderte Regulation durch das autonome Nervensystem und dessen Rezeptorsysteme als eine der wichtigsten

mechanistischen Ursachen der Erkrankungen zugrunde liegt.

Im Respirationstrakt herrscht grundsätzlich eine Balance zwischen dem β -adrenergen (sympathischen) und dem muskarin-cholinergen (parasympathischen) Rezeptorsystem, wobei durch die entgegengesetzten Wirkungen beider Rezeptorsysteme die physiologische Atemwegsfunktion aufrecht erhalten wird. Über diese autonomen Rezeptorsysteme wird die Bronchialweite durch die Kontrolle der Dynamik (Relaxation/Kontraktion) der glatten Atemwegsmuskulatur reguliert, so dass das Gleichgewicht zwischen dem Widerstand der Luftbewegung und dem physiologischen Totraum optimiert werden kann (CANNING u. UNDEM 1994). Ein funktioneller Defekt dieser Rezeptorsysteme stellt somit eine wesentliche Ursache der bronchialen Hyperreaktivität bei der RAO des Pferdes, aber auch beim Asthma bronchiale des Menschen dar (INSEL u. WASSERMAN 1990, KNEUSSL et al. 1986, RICHARDSON u. BOUCHARD 1975), der von großer klinischer Bedeutung ist und die Möglichkeit einer zielgerichteten therapeutischen Anwendung eröffnet. Nach wie vor sind jedoch die transregulatorischen Mechanismen beider Rezeptorsysteme, die bei Atemwegserkrankungen sowohl beim Menschen, als auch beim Pferd zu einer erhöhten Spannung (Kontraktion) der glatten Atemwegsmuskulatur führen, und somit eine pathogenetische Rolle bei der Erkrankung spielen können, nicht eindeutig geklärt. Eine verstärkte Aktivität des parasympathischen (cholinergen) Nervensystems stellt eine reversible Ursache der Atemwegsobstruktion beim Asthma/RAO dar. Es liegt eine Überempfindlichkeit der asthmatischen Atemwege vor, die sich in einer übermäßig raschen Bronchokonstriktion, nach Überreaktion gegenüber bronchokonstriktorisch wirkenden Mediatoren (Histamin, Leukotriene, Prostaglandine), sowie gegenüber cholinergen Agonisten (Carbachol, Metacholin) oder auch nach Belastung mit bestimmten Antigenen (siehe oben) oder sonstigen Strukturen, äußert (EVANS et al. 1997). Diese Tonuszunahme der glatten Muskulatur der Atemwege und ihre Hyperreaktivität kann zum einen durch eine erhöhte und unkontrollierte Freisetzung der Neurotransmitter (z.B. Acetylcholin) und/oder durch eine erhöhte Sensitivität der prä-/postsynaptisch lokalisierten muskarin-cholinergen Rezeptoren (MOLFINO et al. 1993), zum anderen durch eine Hypofunktion der sympatho-adrenergen Rezeptoren (v.a. β -adrenerge Rezeptoren) (KALINER et al. 1982) verursacht sein. Hier wäre also folgerichtig zu vermuten, dass signifikante Veränderungen der Funktion und/oder eine Veränderung der Konzentration aller bei der Erkrankung beteiligten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (cholinerg/adrenerg) und deren Signaltransduktionswege, in den Atemwegen stattfinden könnten. Im Folgenden werden das muskarin-cholinerge Rezeptorsystem, seine Signaltransduktions- und Regulationsmechanismen sowie die Lokalisation und Funktion im

Respirationstrakt beschrieben. Außerdem wird im Anschluss die Bedeutung des muskarin-cholinergen Rezeptorsystems für die Pathogenese der RAO des Pferdes bzw. des Asthma bronchiale des Menschen näher erläutert und eine Versuchsmethode vorgestellt, mit der die funktionelle Kopplung von muskarin-cholinergen Rezeptoren an G-Proteine untersucht werden kann.

2.2 Muskarin-cholinerge Rezeptoren

2.2.1 Klassifizierung

Generell gehören zum parasympathischen Teil des autonomen Nervensystems zwei Arten von Rezeptoren, und zwar nikotin- und muskarin-cholinerge Rezeptoren, die sich in ihrer Struktur und Funktion unterscheiden. Nikotin-cholinerge Rezeptoren gehören zur Familie der Rezeptorkanalproteine. Muskarin-cholinergen Rezeptoren hingegen gehören zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Der Neurotransmitter Acetylcholin, der aus präsynaptischen Vesikeln freigesetzt wird, bindet je nach Rezeptortyp entweder an nikotin- oder muskarin-cholinergen Rezeptoren.

Die Atemwege aller Säugetierspezies werden parasympathisch (cholinerg) innerviert. Dieses System besteht aus efferenten und afferenten Nervenfasern (RICHARDSON 1979) und schließt cholinerge Rezeptoren ein (BARNES 1993). Beim Pferd erfolgt die primäre exzitatorische Innervation der Trachea, der Bronchien und Bronchioli über das parasympathische Nervensystem, das die Lunge mit dem Vagusnerv erreicht (BROADSTONE 1991). Seine Aktivierung führt zur Kontraktion der glatten Muskulatur der Atemwege und somit zur Bronchokonstriktion. Folglich fungiert im Respirationstrakt das parasympathische/cholinerge Nervensystem mit cholinergen Rezeptoren als Gegenspieler des sympathischen/adrenergen Nervensystems mit adrenergen Rezeptoren. Nach bisherigen Erkenntnissen werden alle Effekte des autonomen, parasympathischen Nervensystems in den Atemwegen über muskarin-cholinerge Rezeptoren vermittelt.

Während über längere Zeit vermutet wurde, dass die muskarin-cholinergen Rezeptoren, die mittels (selektiver) Aktivierung durch Muskarin bzw. durch Hemmung mit Atropin charakterisiert wurden, eine homogene Rezeptorpopulation darstellen, bewiesen funktionelle Studien mit Radioliganden die Existenz mehrerer Subtypen.

Vier verschiedene Muskarinrezeptor-Subtypen (M_1 , M_2 , M_3 , M_4) wurden pharmakologisch charakterisiert – M_1 -Subtypen im Cervikalganglion der Ratte (BROWN et al. 1980) und der V. saphena des Hundes (WATSON 1995), M_2 -Subtypen im Herzen von Meerschweinchen (GIRALDO

et al. 1988) und dem Cortex der Ratte (WAELBROECK et al. 1990), M₃-Subtypen im Herzen von Hunden (SHI et al. 1999, WANG et al. 1999), Ratten und Kaninchen (LIU et al. 2001), M₄-Subtypen im Herzen von Hühnern, in der Lunge von Kaninchen (LAZARENO et al. 1990). Erst kürzlich wurden die Rezeptorsubtypen M₁-M₄ im Respirationstrakt von Pferden beschrieben (KOTTKE 2005).

Durch Klonierung von Säugetier-cDNA konnten allerdings fünf muskarin-cholinerge Rezeptorsubtypen (m₁-m₅) ermittelt werden, und zwar m₁-m₄ beim Menschen (PERALTA et al. 1987), m₁ und m₂ beim Schwein (KUBO et al. 1986A, 1986B) und m₅ bei der Ratte und beim Menschen (BONNER et al. 1988).

2.2.2 Mechanismen der Signalübertragung

Alle Subtypen der muskarin-cholinergen Rezeptoren gehören zur Familie der G-Proteingekoppelten Rezeptoren. Jeder dieser Subtypen besteht aus sieben Transmembrandomänen, welche durch drei extra- und drei intrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind. Die extrazelluläre Schleife endet mit einer NH₂-Gruppe (N-Terminus) und die intrazelluläre mit einer COOH-Gruppe (C-Terminus). Abbildung 1 zeigt ein Modell dieser Rezeptorstruktur. Der Unterschied zwischen den fünf bekannten Subtypen liegt in der unterschiedlichen Aminosäuresequenz am N- und C-Terminus und in der unterschiedlichen Länge der Schleife zwischen der intrazellulären fünften und sechsten Transmembrandomäne (BONNER et al. 1988). Der intrazelluläre C-Terminus ist die Phosphorylierungsstelle, der extrazelluläre N-Terminus dient als Ligandenbindungsstelle (z.B. für Acetylcholin). Die Bindung des endogenen Transmitters Acetylcholin wird vermutlich durch die negative Ladung der zwei Aspartat-Reste in der zweiten und dritten Transmembrandomäne vermittelt (PERALTA et al. 1987, SPALDING et al. 1994). Die Struktur der intrazellulären Schleifen bestimmt die G-Protein-Spezifität des muskarin-cholinergen Rezeptorsubtyps. Die muskarin-cholinergen Rezeptorsubtypen M₂ und M₄ koppeln vorwiegend an G-Proteine der G_{i/o}-Familie, die Rezeptorsubtypen M₁, M₃ und M₅ vorwiegend an G-Proteine der Familie G_{q/11} (ROUX et al. 1998, BILLINGTON u. PENN 2003).

Die Bindung endogener oder synthetischer Agonisten an den muskarin-cholinergen Rezeptor führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, welche wiederum die Interaktion des Rezeptors mit dem G-Protein ermöglicht. Das membrangebundene G-Protein besteht aus einer α - und $\beta\gamma$ -Untereinheit. An diesen Komplex ist GDP gebunden, welches nach Stimulation des Rezeptors durch einen Agonisten gegen GTP ausgetauscht wird. Der G $\alpha\beta\gamma$ -GDP-Komplex dissoziiert dabei in

das $G\beta\gamma$ -Dimer und $G\alpha$ -GTP, welches das Signal an das entsprechende Effektorprotein weitergibt. $G\alpha$ -GTP wird anschließend durch eine GTPase zu $G\alpha$ -GDP dephosphoryliert, was einen Zusammenschluss mit dem $G\beta\gamma$ -Dimer ermöglicht. Der ursprüngliche $G\alpha\beta\gamma$ -GDP-Komplex ist somit wiederhergestellt und kann erneut mit dem stimulierten Rezeptor in Interaktion treten.

Grundsätzlich gibt es zwei Signalübertragungswege im muskarin-cholinergen System. Zum einen die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) über $G_{q/11}$ -Protein-Kopplung, zum anderen die Hemmung des Enzyms Adenylatzyklase über $G_{i/0}$ -Protein-Kopplung. Letzterer Weg antagonisiert die Aktivierung der Adenylatzyklase, die im adrenergen System nach Aktivierung von β -Adrenozeptoren über G_s -Protein-Kopplung vermittelt wird. Die Adenylatzyklase katalysiert die Umsetzung von Adenosintriphosphat (ATP) zum zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP). Demnach hemmen aktivierte M_2/M_4 -Rezeptoren über G_i -Proteine die cAMP-Bildung. Hierdurch bleibt die Calciumkonzentration im Zytoplasma der glatten Muskelzelle hoch genug, um für eine Aktin-Myosin-Interaktion (Kontraktion) zur Verfügung zu stehen. Außerdem hemmt der Signalweg über G_i -Proteine die Phosphorylierung des Enzyms Myosinkinase, welches hochaffin für die Aktivierung durch Calcium-Calmodulin-Komplexe bleibt, was eine Voraussetzung für die Kontraktion der Muskelzelle ist. Überdies phosphoryliert die Myosinkinase nach Aktivierung die Myosin-ATPase, wodurch die Brückenbildung mit Actinfilamenten (Kontraktion) erst ermöglicht wird. Die Kontraktion der glatten Muskelzelle wird hiernach nur indirekt, nämlich über Hemmung des G_s -Protein-vermittelten Signalwegs, reguliert. Eine Aktivierung von M_2/M_4 -Rezeptoren führt demnach zu einer Hemmung der über β_2 -Adrenozeptoren vermittelten Relaxation der glatten Muskulatur und somit zu einer Kontraktion.

Aktivierte $M_1/M_3/M_5$ -Rezeptoren aktivieren über $G_{q/11}$ -Proteine das membranständige Enzym Phospholipase C (PLC), welches Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in das membranständige Diacylglycerol (DAG) und das cytosolische Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) umwandelt. DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC), die wiederum eine Vielzahl verschiedener zellulärer Proteine phosphoryliert – u.a. kontraktile Proteine sowie β -adrenerge Rezeptoren. IP_3 bindet an IP_3 -Rezeptoren des endoplasmatischen Retikulums, wodurch Ca^{2+} -Kanäle geöffnet und Calciumionen in das Zytosol freigegeben werden. Außerdem strömen Calciumionen aus dem Extrazellularraum nach Aktivierung von membranständigen, spannungsabhängigen Calciumkanälen in den Intrazellularraum ein. Die Calciumionen verbinden sich mit Calmodulin zu Calcium-Calmodulin-Komplexen, die die Myosinkinase aktivieren, was eine Kontraktion der glatten Muskelzelle zum Ergebnis hat (s. oben). Der G_q -Protein-vermittelte Signalweg beeinflusst somit auf

LITERATURÜBERSICHT

direktem Weg die Kontraktion der glatten Muskelzelle und steht in Wechselbeziehung (Cross-Talk) mit der Aktivierung der adrenergen β_2 -Adrenozeptoren mit Kopplung an G_s -Proteine. Abbildung 2 zeigt ein Schema der verschiedenen Signalwege der muskarin-cholinergen Subtypen.

Eine Besonderheit im muskarin-cholinergen System ist das Auftreten von präsynaptischen Rezeptoren, sogenannter Autorezeptoren, die über einen negativen Feedbackmechanismus die Freisetzung von Acetylcholin aus parasympathischen Nervenenden regulieren. Diese wurden bei einer Vielzahl von Spezies nachgewiesen (FRYER u. MACLAGAN 1984, BLABER et al. 1985) und gehören dem M_2 -Subtyp an (MINETTE u. BARNES 1988, AAS u. MACLAGAN 1990, PATEL et al. 1995). Hohe Konzentrationen von Acetylcholin bewirken eine Aktivierung dieser Autorezeptoren, die die weitere Acetylcholin-Ausschüttung an der präsynaptischen Membran und somit eine übermäßige Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur hemmen. Allerdings wird vermutet, dass diese Rezeptoren beim Pferd nicht zum M_2 -Subtyp gehören, sondern ein neuartiger Subtyp beteiligt sein könnte (WANG et al. 1995B), was bisher nicht bestätigt wurde.

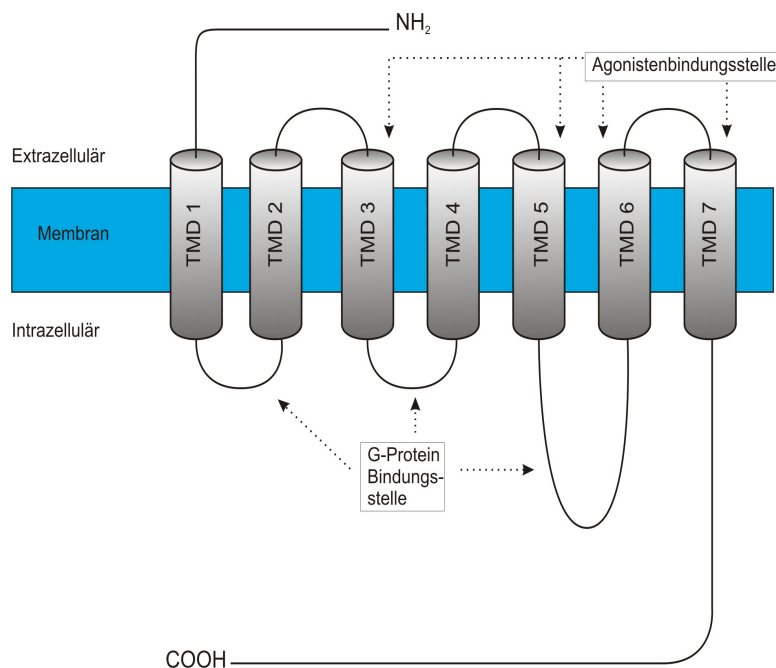


Abbildung 1: Struktur des muskarin-cholinergen Rezeptors als GPCR

TMD = Transmembrandomäne

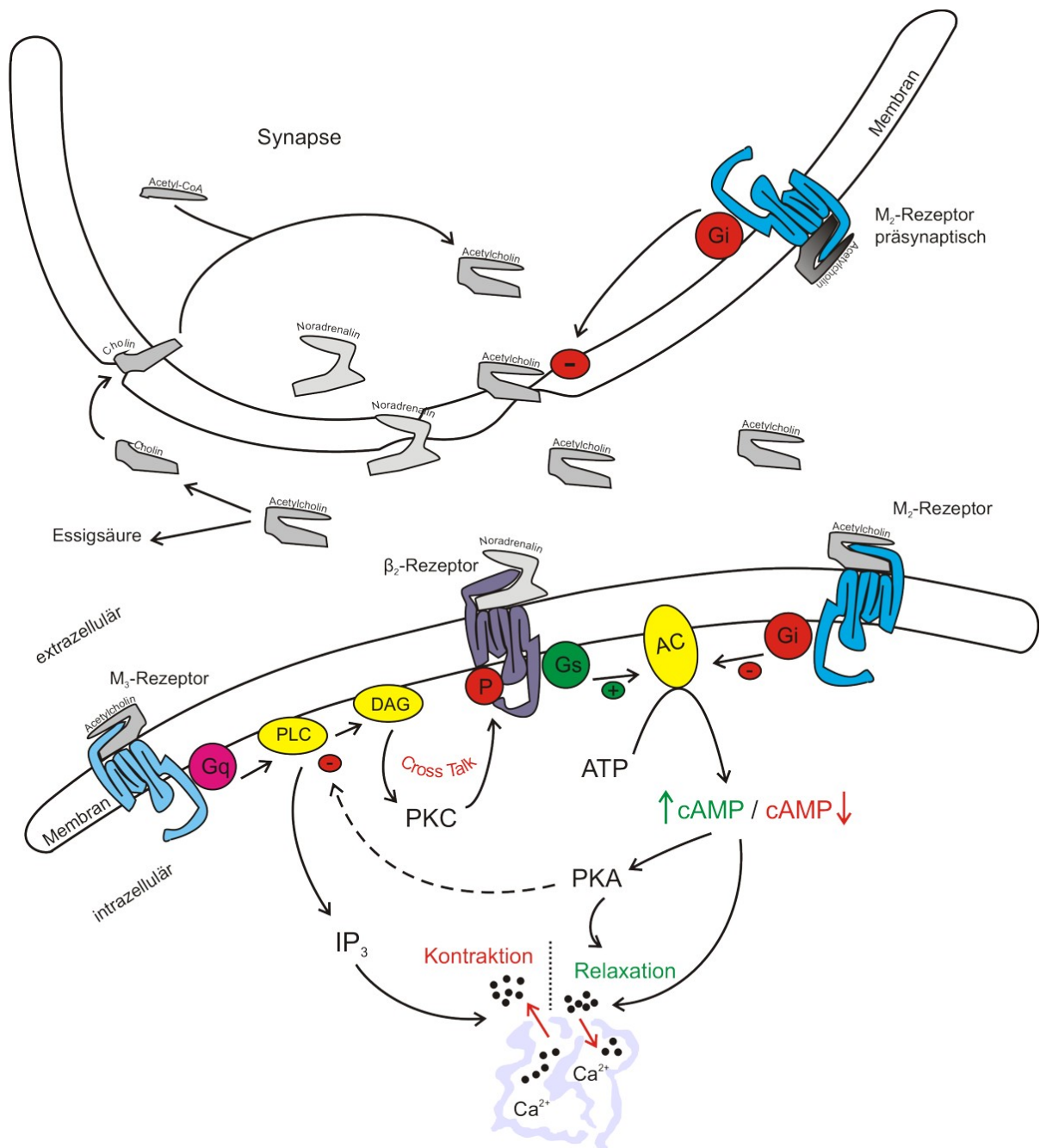


Abbildung 2: Schema der Signalübertragung der Rezeptorsysteme
 Signalübertragung des muskarin-cholinergen Rezeptorsystems (M₂, M₃) und die Wechselbeziehung zum beta-adrenergen Rezeptorsystem (beta₂). M₂-Rezeptoren inhibieren die Adenylatzyklase (AC), beta₂-Adrenozeptoren stimulieren die AC. Die Aktivierung von M₃-Rezeptoren führt zu einer Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), die beta₂-Adrenozeptoren phosphoryliert und damit von G_s-Proteinen entkoppelt (Cross Talk).

2.2.3 Regulationsmechanismen

Unabhängig vom Rezeptorsubtyp wird, wie bei allen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR), die Ansprechbarkeit bzw. die Funktion aller fünf muskarin-cholinergen Rezeptoren durch

zahlreiche Mechanismen reguliert. Infolge einer Stimulation mit den klassischen Rezeptoragonisten (z.B. Acetylcholin) oder Hormonen werden diese Rezeptoren durch unterschiedliche Rezeptorkinasen und Second-Messenger-regulierte Kinasen in ihrer Anzahl oder Funktion herauf- oder herabreguliert.

In der Regel übertragen GPCRs ein extrazelluläres Signal in das Zellinnere, indem sie mit heterotrimeren G-Proteinen, die wiederum unterschiedliche Effektorproteine aktivieren, interagieren. Nach einer vorangegangener Stimulation aktivieren GPCR nicht nur G-Protein-abhängige Effektorsysteme, sondern leiten auch eine Reihe von molekularen Interaktionen ein, die die „Feedback“-Regulation der G-Protein-Kopplung, die Rezeptorendozytose und die G-Protein-unabhängige Signalübermittlung, ermöglichen (FERGUSON 2001, KRUPNICK u. BENOVIC 1998, LUTTRELL u. LEFKOWITZ 2002).

An der Regulation der Dichte und der Signaltransduktion muskarin-cholinergere Rezeptoren sollen vielfältige, sowohl homologe als auch heterologe Mechanismen beteiligt sein.

Die Rezeptordesensibilisierung stellt einen wichtigen Regulationsmechanismus dar, der den Rezeptor vor akuter und chronischer Stimulation schützt. Hierbei verringert sich die Wirksamkeit und die Wirkungsdauer endogener und exogener Agonisten und ist somit ein Indiz für die klinisch bedeutsame Entwicklung einer Toleranz.

Das klassische Modell der GPCR-Desensibilisierung bezieht hauptsächlich drei Geschehen ein:

- I) Entkopplung des Rezeptors vom entsprechenden heterotrimeren G-Protein als Konsequenz der Rezeptorphosphorylierung;
- II) Internalisierung (Sequestrierung) der plasmamembran-gebundenen/assoziierten Rezeptoren und
- III) Down-Regulation des gesamten zellulären Komplements der Rezeptoren, die aus veränderter mRNA-Menge und Proteinsynthese bzw. erhöhtem lysosomalen Abbau der präexistierenden Rezeptoren resultieren kann.

Die Rezeptorphosphorylierung kann bereits innerhalb von Sekunden oder Minuten nach Stimulation des Rezeptors mit einem Agonisten auftreten und führt zu einer Entkopplung des Rezeptors vom entsprechenden G-Protein.

An diesem Prozess sind G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs) beteiligt. Es handelt sich um zytoplasmatische Enzyme, die nach Rezeptoraktivierung dissoziierte $\beta\gamma$ -Untereinheiten binden und somit die Rezeptoren der GPCRs (alle muskarin-cholinergere Subtypen eingeschlossen)

phosphorylieren (RICHARDSON et al. 1993, HAGA et al. 1996, TSUGA et al. 1998). In den Atemwegen werden 4 Klassen der GRK-Familien exprimiert, nämlich GRK2, GRK3, GRK5 und GRK6, wobei bisher nur den GRK2 und GRK3 eine wichtige Rolle zugeordnet werden konnte (HOSEY et al. 1995). Nach der Rezeptorphosphorylierung werden spezifische Bindungsstellen für hemmende Proteine, so genannte Arrestine, hochaffin, die wiederum durch Bindung an den phosphorylierten Rezeptor die Signalübertragung vom Rezeptor auf das G-Protein unterbrechen. Bisher wurden 4 Arrestin-Familien identifiziert: Visual Arrestin, Cone Arrestin (C-/X-Arrestin), β -Arrestin, Arrestin3 (β -Arrestin2). Eine Polypeptidvariante des Arrestin3 stellt arr3S dar, welches eine Rolle bei der Sequestrierung von M_2 -Rezeptoren, aber auch bei β_2 -Adrenozeptoren, spielt (GUREVICH et al. 1995, FERGUSON 2001). Arrestin scheint nur bei der Sequestrierung von M_2 -Rezeptoren von Bedeutung zu sein (GUREVICH et al. 1993), wobei M_1 -, M_3 - und M_4 -Rezeptoren unabhängig von Arrestin internalisiert werden können (LEE et al. 1998).

Bleibt die Stimulation des Agonisten erhalten, kommt es zur Translokation des entkoppelten Rezeptoren in das Zellinnere, der so genannten „Internalisierung“ oder „Sequestrierung“ (KOENIG u. EDWARDSON 1997). Gleichzeitig wird die Gen-Transkription gehemmt und somit die Neusynthese verringert. Die internalisierten Rezeptoren können, wenn der Agonist zeitnah entfernt wird, resensibilisiert werden und wieder an der Oberfläche erscheinen, oder der Rezeptor wird degradiert, d.h. in der Zelle abgebaut. Dies kann Stunden bis Tage dauern und wird auch als „Down-Regulation“ bezeichnet (Abb. 3).

Die „Up-Regulation“ stellt den gegensätzlichen Mechanismus dar, wobei die Zelle durch Erhöhung der Rezeptordichte sensibler auf ein Signal reagieren kann. Die Erhöhung der Rezeptorzahl auf der Zelloberfläche resultiert hierbei aus einer Steigerung der Gen-Transkriptionsrate und post-transkriptionaler Mechanismen (Abb. 3).

Nachgewiesen wurde dies experimentell durch die chronische Einwirkung von Antagonisten auf die Zelle. Insbesondere die chronische Behandlung von Kaninchen mit Atropin führte zu einer Hochregulierung („Up-Regulation“) von muskarin-cholinergen Rezeptoren des Subtyps M_2 und M_3 in der glatten Atemwegsmuskulatur (WITT-ENDERBY et al. 1994). Dies ist von klinischer Bedeutung, weil die chronische Therapie mit inhalierbaren Anticholinergika zu einer vorübergehenden Überreaktion der glatten Muskulatur der Bronchien führte, was sich durch eine Überempfindlichkeit bzw. eine gesteigerte Kontraktilität der Atemwegsmuskulatur bemerkbar machte (NEWCOMB et al. 1985).

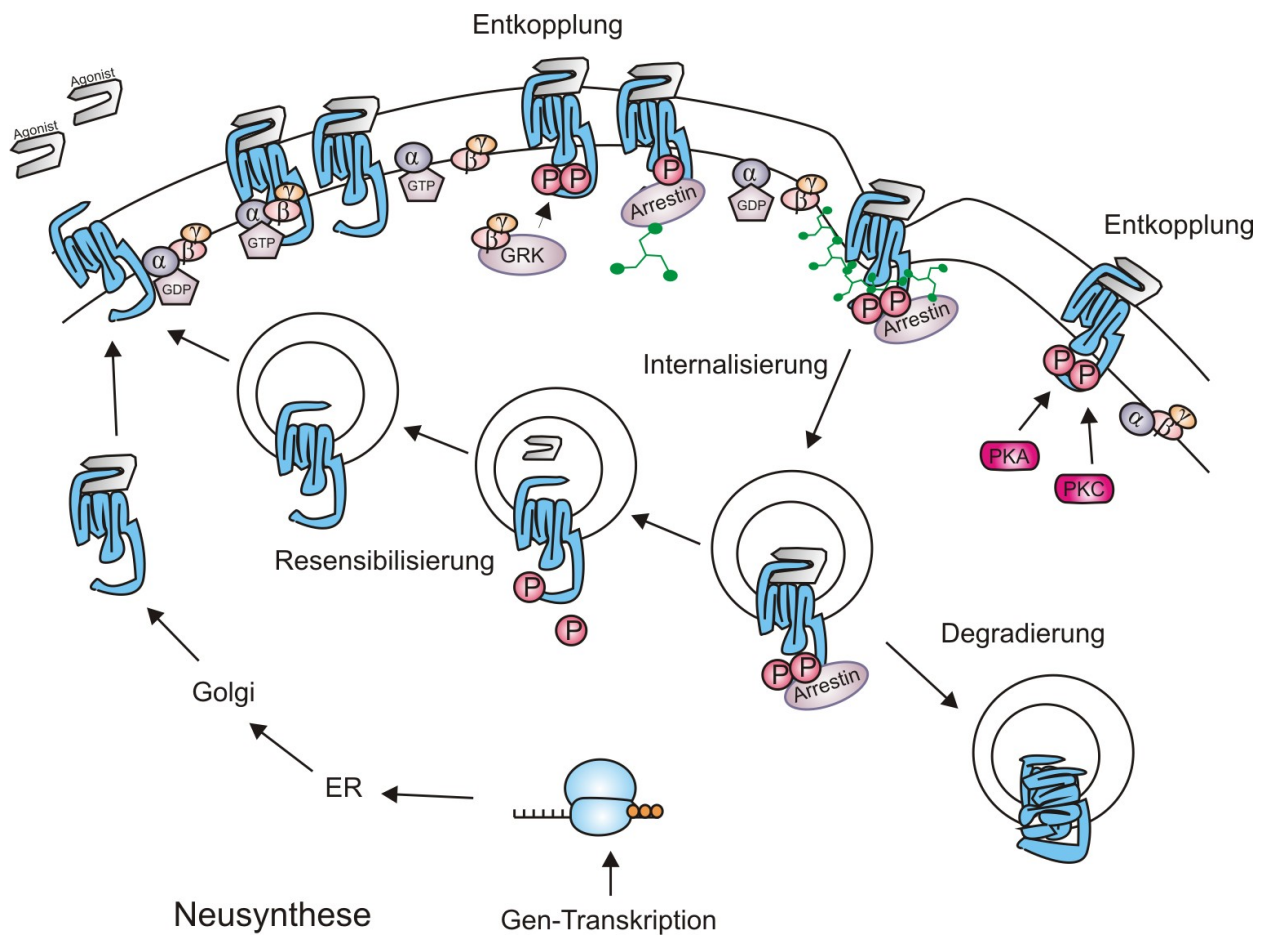


Abbildung 3: Regulationsmechanismen von muskarin-cholinergen Rezeptoren (modifiziert nach BILLINGTON u. PENN 2003)

2.2.4 Lokalisation und Funktion muskarin-cholinergere Rezeptoren im Respirationstrakt

In den Atemwegen von verschiedenen Säugetierspezies wurden mittels verschiedener Techniken wie Radioligandenbindungsstudien, molekularbiologischen und immunologischen Methoden vier Subtypen muskarin-cholinergere Rezeptoren nachgewiesen, und zwar M_1 , M_2 , M_3 und M_4 .

Den physiologischen Funktionen in den Atemwegen konnten vorwiegend die Subtypen M_1 , M_2 und M_3 zugeordnet werden (BARNES 1993). Der M_4 -Rezeptor wurde bisher nur beim Kaninchen in der Bronchialmuskulatur und in der Alveolarwand nachgewiesen (LAZARENO et al. 1990). Aufgrund der Affinität verschiedenener selektiver Antagonisten gibt es Vermutungen, dass auch in der

porcinen Lunge M₄-Rezeptoren vorkommen (CHELALA et al. 1998), wohingegen in anderen Versuchen nur die mRNA des M₁-, M₂- und M₃-, nicht jedoch die des M₄-Subtyps, in der Lunge von Schweinen nachgewiesen werden konnten (HADDAD et al. 1994). Eine Studie von YASUDA et al. (1993) zeigt ähnliche Ergebnisse in der Lunge von Kaninchen, wo M₂- und M₃-Rezeptoren die dominanten Subtypen sind und nur eine kleine Population von M₁-Rezeptoren vorkommt. Aufgrund der Ergebnisse von Radioligandenbindungsstudien mit Membranpräparationen boviner Trachealmuskulatur wurde das alleinige Vorkommen der Rezeptorsubtypen M₂ und M₃ beschrieben, wobei der letztere die Minderheit der vorhandenen Population darstellte (LUCCHESI et al. 1990, EGLIN et al. 1996).

Auch in der Trachealmuskulatur des Hundes wurde nur das Vorhandensein von M₂- und M₃-Rezeptoren festgestellt (Yang et al. 1991), im Lungenparenchym hingegen nur M₃-Rezeptoren (EMALA 1995), die die Kontraktion der glatten Muskulatur steuern. M₅-Rezeptoren konnten bisher im Respirationstrakt nicht identifiziert werden.

Zur Verteilung muskarin-cholinerger Rezeptoren im equinen Respirationstrakt liegen nur wenige Untersuchungen vor. Zum einen wird der M₂-Rezeptor als dominanter Subtyp beschrieben, wobei aber die Anwesenheit von M₃- und M₄-Rezeptoren nicht ausgeschlossen werden kann (TÖRNEKE et al. 2002). Zum anderen zeigten funktionelle Studien an der Trachea des Pferdes, dass die Kontraktion vor allem durch M₃-Rezeptoren vermittelt wird (YU et al. 1992, VAN NIEUWSTADT et al. 1997). Neueste Ergebnisse von ABRAHAM et al. (2007A) zeigten, dass die absolute muskarin-cholinerge Rezeptordichte im equinen Respirationstrakt von den großen Luftwegen (Trachea) in Richtung kleiner luftführender Wege (Lunge) abnimmt und in der Trachea und den Bronchien nur die Subtypen M₂ und M₃ in einem Verhältnis von 4:1 vorkommen. Im Lungenparenchym wurden sowohl M₁- (24-28%), als auch M₂- (~ 50%) und M₃-Rezeptoren (~ 40%) nachgewiesen. M₂-Rezeptoren hemmen im equinen Respirationstrakt über G_i-Proteine das Adenylatzyklasesystem, während M₁- und M₃-Rezeptoren über G_q-Proteine das Enzym Phospholipase C aktivieren.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass M₂- und M₃-Rezeptoren in der glatten Atemwegsmuskulatur und im Lungenparenchym der meisten Säuger exprimiert werden, während der M₁-Subtyp nur im Lungenparenchym vorkommt. Unter den vier pharmakologisch charakterisierten muskarin-cholinerger Rezeptoren (M₁-M₄) vermitteln zumindest unter Normalbedingungen primär die M₃-Rezeptoren beim Menschen und beim Tier eine Kontraktion der extra- und intrapulmonalen glatten Muskulatur. Die Bedeutung der M₂-Rezeptorpopulation für die

glatte Muskulatur wird kontrovers diskutiert. Es wird vermutet, dass dieser Rezeptorsubtyp eine Rolle bei der Feinregulation der Kontraktion der glatten Muskulatur („fine-tuning“) spielen könnte. Obwohl eine große Population muskarin-cholinerger Rezeptoren in den Atemwegen nachgewiesen wurde, bedarf es noch weiterer Untersuchungen zur Subtypisierung und der pharmakologischen Charakterisierung der Interaktion dieser Rezeptoren mit korrespondierenden und Signalübertragenden Proteinen (G-Proteinen), um sie gezielt als therapeutische Angriffspunkte bei obstruktiven Atemwegserkrankungen nutzen zu können.

2.2.5 Bedeutung des muskarin-cholinerger Rezeptorsystems bei der RAO des Pferdes und beim Asthma bronchiale des Menschen

Das Krankheitsbild des menschlichen Asthma und der RAO des Pferdes sind durch eine erhöhte Aktivität des parasympathischen/cholinerger Nervensystems gekennzeichnet. Genaue Gründe für den erhöhten Parasympathikustonus sind noch nicht bekannt, aber es wird vermutet, dass entweder eine gesteigerte Expression postsynaptischer muskarin-cholinerger Rezeptoren bzw. ein Defekt der präsynaptischen Autorezeptoren oder ein Missverhältnis zwischen adrenergem und muskarin-cholinerger Nervensystem für die gesteigerte Aktivität des Parasympathikus verantwortlich sein könnte. Bisher wurde die Rezeptorebene untersucht, um die Ursachen dieser Aktivität zu erklären, wohingegen es über die Rezeptoren-vermittelte Signalkaskade beim Pferd keine Erkenntnisse gibt.

Untersuchungen bei Asthmamodellen deuteten darauf hin, dass beim Asthma eine Dysfunktion der Autorezeptoren und die daraus resultierende gesteigerte Aktivität des Parasympathikus eine bedeutende pathogenetische Rolle spielen könnte. Nach Antigensensibilisierung als auch durch Infektion mit Parainfluenzaviren, Ozon oder ein Vitamin A-Defizit, konnte eine funktionelle Störung des negativen Rückkopplungsmechanismus durch präsynaptische M_2 -Rezeptoren und dadurch eine erhöhte Acetylcholin-vermittelte Kontraktilität der Atemwegsmuskulatur beobachtet werden. Dies wurde beispielsweise bei mit Ovalbumin sensibilisierten Meerschweinchen beobachtet, wobei es nach Antigenexposition zu einer Infiltration von eosinophilen Granulozyten und Freisetzung von Major Basic Protein (MBP) gekommen ist (FRYER u. WILLS-KARP 1991, TEN BERGE et al. 1996, COSTELLO et al. 1997). Gleiches wurde in vitro bei mit der Hausstaubmilbe sensibilisierten humanen Bronchialringen festgestellt (SONG et al. 1997). MBP ist ein selektiver Antagonist für M_2 -Rezeptoren und kann dadurch den negativen Rückkopplungsmechanismus der Acetylcholinfreisetzung blockieren (FRYER u. JACOBY 1993, JACOBY et al. 1993) und scheint auch der Auslöser für die bei Meerschweinchen durch Ozon

hervorgerufene Hyperreaktivität der Atemwege zu sein, wo ebenfalls eine Dysfunktion präsynaptischer M₂-Rezeptoren vorzuliegen scheint (SCHULTHEIS et al. 1994, YOST et al. 1999). Auch ein Verlust der Funktionsfähigkeit der präsynaptischen M₂-Rezeptoren wurde bei Ratten und Meerschweinchen festgestellt, bei denen eine Infektion mit Parainfluenzaviren zur Induktion des Asthmodells benutzt wurde (FRYER u. WILLS-KARP 1991, SORKNESS et al. 1994, FRYER u. JACOBY 1991). Hierbei ist die virale Neuraminidase in der Lage Sialinsäurereste von M₂-Rezeptoren abzuspalten und damit die Affinität des M₂-Rezeptors für Agonisten zu senken (FRYER et al. 1990). Außerdem wird durch die Virusinfektion das Immunsystem aktiviert, was zur Freisetzung von Interferonen aus T-Helferzellen führt. Durch Hemmung der Genexpression wurde in Zellkulturen von parasymphatischen Neuronen der Atemwege eine Interferon- γ vermittelte Degradierung der M₂-Rezeptoren beobachtet (JACOBY et al. 1998). Die beobachtete Dysfunktion von präsynaptischen M₂-Rezeptoren aufgrund Vitamin A-Mangels bei Ratten (MCGOWEN et al. 2002) ist unbekannt. Auch die beschriebene Dysfunktion der präsynaptischen M₂-Rezeptoren beim menschlichen Asthma (MINETTE et al. 1989) ist nicht geklärt, wobei es nahe liegt, dass beim allergischen Asthma die gleichen Mechanismen eine Rolle spielen wie im Tiermodell, weil eine virale Genese im Vordergrund steht, und nachfolgend ein neutrophiles und eosinophiles Entzündungsgeschehen ausgelöst werden kann (FOLKERTS et al. 1998).

Hinsichtlich der Expression und Funktion postsynaptischer muskarin-cholinerger Rezeptoren wurden im Lungenparenchym von Asthmatikern keine Veränderungen nachgewiesen (HADDAD et al. 1996). In den bisher verwendeten asthmatischen Tiermodellen hingegen gibt es zum Teil widersprüchliche Ergebnisse. Keine Veränderung postsynaptischer muskarin-cholinerger Rezeptoren wurde bei Meerschweinchen, bei denen eine Hyperreaktivität der Atemwege in vivo durch Sensibilisierung mit Ovalbumin und anschließender Antigenexposition, durch virale Infektion, ein Vitamin A-Defizit oder durch Ozon ausgelöst wurde, festgestellt (HAYASHI et al. 1988, LEE et al. 1994, SCHULTHEIS et al. 1994, MCGOWEN et al. 2002). Im Unterschied dazu konnte ein Anstieg von M₃-Rezeptoren bei gleich bleibender Anzahl von M₁- und M₂-Rezeptoren im Lungenparenchym von Meerschweinchen, die nach Antigenexposition einen Bronchospasmus zeigten, beobachtet werden (TOHDA et al. 2002). Im Respirationstrakt von Basenji-Greyhounds wurde eine erhöhte Expression von M₂-Rezeptoren und eine verstärkte Hemmung der Adenylatzyklase gefunden, wodurch die in dieser Hunderasse natürlich vorkommende Bronchokonstriktion erklärt werden könnte (EMALA et al. 1995).

Über die Funktionsfähigkeit der präsynaptischen M₂-Rezeptoren bei der RAO bestehen unterschiedliche Auffassungen. Zum einen konnte Atropin in „in vitro“-Studien an der Atemwegsmuskulatur bei erkrankten Pferden die Acetylcholin-Freisetzung in gleichem Maße erhöhen wie bei gesunden Pferden, was auf eine volle Funktionsfähigkeit der präsynaptischen Autorezeptoren schließen ließ (WANG et al. 1995b). Zum anderen konnte eine Dysfunktion der präsynaptischen M₂-Rezeptoren in einer anderen funktionellen Studie beobachtet werden (ZHANG et al. 1999).

Bei an RAO-erkrankten Pferden sind derartige Veränderungen bisher noch nicht genauer beschrieben. In Anbetracht der weitreichenden Entwicklungen der neuro-immunologischen Forschung, konnte die Frage, ob RAO eine neuronale oder immunologische Erkrankung ist, gelöst werden. Es handelt sich bei diesem Krankheitsbild primär um eine komplexe, entzündliche Krankheit, wobei jedoch wichtige Wechselwirkungen der autonomen Rezeptoren (u.a. muskarin-cholinerge Rezeptoren) mit dem Immunsystem existieren könnten. Es ist jedoch noch unbekannt, ob die gesteigerte muskarin-cholinerge Aktivität bei RAO durch eine erhöhte Freisetzung von Acetylcholin oder durch eine verstärkte Antwort der glatten Muskulatur auf Acetylcholin via muskarin-cholinergen Rezeptoren hervorgerufen wird.

Eine erhöhte Freisetzung von Acetylcholin könnte durch einen Defekt präsynaptischer muskarin-cholinergere Rezeptoren und einer damit verbundenen Störung des negativen Feedback-Mechanismus hervorgerufen werden.

Neuere Untersuchungen (ABRAHAM et al. 2007A) des muskarin-cholinergen Rezeptorsystems bei der RAO des Pferdes haben gezeigt, dass es keine Unterschiede in der Rezeptordichte und dem Vorkommen/Ausprägung der einzelnen Muskarinrezeptorsubtypen im Vergleich zu gesunden Pferden gibt (siehe Seite 14). Diese Ergebnisse stimmten mit bisherigen Untersuchungen des Respirationstrakts von gesunden Pferden überein. TÖRNEKE et al. 2002 hatten ebenfalls den M₂-Rezeptor als dominanten Subtyp im equinen Respirationstrakt beschrieben, wobei nicht bekannt ist, welcher Anteil der M₂-Rezeptorpopulation präsynaptisch und welcher Anteil postsynaptisch lokalisiert ist.

Weil bis dato alle Untersuchungen darauf hin deuten, dass bei der RAO des Pferdes keine Veränderungen auf der Rezeptorebene des muskarin-cholinergen Systems vorliegen, soll in der vorliegenden Arbeit, die nach Rezeptoraktivierung ausgelöste Signalkaskade des M₂-Rezeptors, der in allen Segmenten der Atemwege vorwiegend (> 50% bis 80%) exprimiert wird, mit den nachfolgenden Signalkomponenten (G_i-Proteine, Adenylatzyklase), untersucht werden.

2.2.6 Messung der funktionellen Interaktion zwischen M₂-Rezeptoren und G_i-Proteinen

Die Interaktion zwischen M₂-Rezeptoren und G_i-Proteinen wurde bisher in Segmenten des Respirationstrakts noch nicht untersucht. Die ³⁵S-GTPγS-Bindungsstudie stellt eine geeignete Möglichkeit dar, die Interaktion von hauptsächlich M₂-Rezeptoren, die an G_i-Proteine gekoppelt sind, in den Luftwegen des Pferdes zu untersuchen und so den Funktionszustand der M₂-Rezeptor-G_i-Protein-Interaktion von gesunden Pferden mit denen an RAO erkrankten zu vergleichen und zu charakterisieren.

2.2.6.1 Die Guanosin 5'-(γ-[³⁵S]thiotriphosphat) – Bindungsstudie

Die ³⁵S-GTPγS-Bindungsstudie gibt Aufschluss über die Menge der Rezeptor-vermittelten G-Proteinaktivierung zu Beginn der Signalkaskade und liefert so pharmakologische Daten zur Funktionalität der Weitergabe des Signals, welches durch einen Agonisten-besetzten Rezeptor vermittelt wird. Mittels dieser Methode wurde bereits die muskarin-Rezeptor-abhängige M₂-G_i-Interaktion im menschlichen Myokard (BÖHM et al. 1994), im Vorhof des Herzens von Schweinen (HILF u. JAKOBS 1992), im Bulbus olfactorius der Ratte (OLIANAS u. ONALI 1996) und verschiedenen Zelllinien charakterisiert (WIELAND et al. 1995).

Die Interaktion zwischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und den G-Proteinen ist die erste Stufe der Signalübertragung, um nachfolgend die second-messenger Systeme zu aktivieren. Dieser erste Schritt kann mit der ³⁵S-GTPγS-Bindungsstudie gemessen werden und ist weitgehend auf die Messung von Rezeptoren, die mit der Familie der PTX-sensitiven G_i-Proteine interagieren, beschränkt. Versuche, die Interaktion anderer G-Protein-Familien mit ihren Rezeptoren zu messen, scheiterten an einem zu schwach messbaren Signal, das sich nicht vom „Hintergrundrauschen“ abhebt. Diese Tatsache spiegelt zum einen die relativen Expressionsmengen der verschiedenen G-Proteine in den Zellmembranen wieder, zum anderen haben G-Proteine der G_i-Familie eine wesentlich höhere basale Austauschrate von Guanosinnukleotiden als G-Proteine anderer Familien (MILLIGAN 2003). Die ³⁵S-GTPS-Bindung besteht aus dem Austausch von Guanosinnukleotiden zellulärer heterotrimerer G-Proteine und anderen Proteinen (z. B. Tubulin), die ebenfalls Guanosinnukleotide austauschen. Pertussistoxin-sensitive G_i-Proteine werden in den meisten Fällen in Säugetierzellen höher exprimiert und haben eine höhere basale Austauschrate von

LITERATURÜBERSICHT

Guanosinnukleotiden. Das bedeutet, dass die maximale Stimulation durch einen Agonisten für einen G_i -Protein-gekoppelten Rezeptor zum Beispiel nur 3 mal höher als der Basalwert ist und dieses Signal damit schon deutlich über dem Basalwert („Hintergrundgeräusch“) liegt und leicht gemessen werden kann. Im Gegensatz hierzu ist die über G_s - und G_q -Proteine vermittelte maximale Stimulation, die zum Beispiel 10-fach höher als der Basalwert liegt, nur undeutlich oder gar nicht zu messen (Abbildung 4).

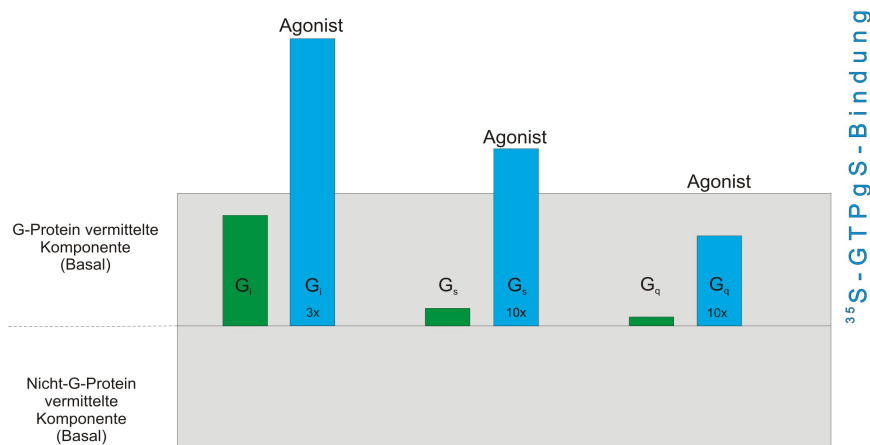


Abbildung 4: G-Protein-abhängige, messbare Signalstärken der stimulierten ^{35}S -GTPS-Bindung

Die ^{35}S -GTPS-Bindung besteht aus dem Austausch von Guanosinnukleotiden zellulärer heterotrimerer G-Proteine und anderen Proteinen (z. B. Tubulin), die ebenfalls Guanosinnukleotide austauschen. Pertussistoxin-sensitive G_i -Proteine werden meistens in Säugetierzellen höher exprimiert und haben eine höhere basale Austauschrate von Guanosinnukleotiden (grün). Die maximale Stimulation durch einen Agonisten für einen G_i -Protein-gekoppelten Rezeptor liegt im Beispiel 3 mal höher als der Basalwert. Das Signal liegt deutlich über dem Basalwert (grau, = „Hintergrundgeräusch“) und kann leicht gemessen werden. Im Gegensatz hierzu ist selbst ein 10-facher Anstieg der ^{35}S -GTPS-Bindung vermittelt über G_s - und G_q -Proteine nur undeutlich oder gar nicht zu messen. (modifiziert nach [HARRISON, 2003](#))

Nach Aktivierung des Rezeptors bindet ^{35}S -GTP γ S anstelle des endogenen GTP an die $G\alpha_i$ -Untereinheit und bildet einen $G\alpha_i$ - ^{35}S -GTP γ S-Komplex. Dieser Komplex kann nur sehr schlecht durch die GTPase hydrolysiert werden – ein Enzym, das in der Regel GTP hydrolysiert (Abb. 5A). Dadurch wird eine Wiederherstellung des heterotrimeren $G\alpha\beta\gamma$ -GDP-Komplexes verhindert. Folglich akkumuliert die an ^{35}S -GTP γ S gebundene $G\alpha_i$ -Untereinheit und kann gemessen werden (Abb. 5B). Die Höhe der gemessenen Radioaktivität gibt Aufschluss über die Muskarinrezeptor- G_i -Protein-Interaktion (gleich prozentuale Erhöhung der Basalbindung). Außerdem ist es möglich

einen Rückschluss auf die G_i-Protein-Expressionsmenge (absolut gebundene Menge an ³⁵S-GTPγS in fmol pro mg Protein) im untersuchten Gewebe zu ziehen.

In der praktischen Umsetzung macht man sich die Eigenschaft zu nutze, dass die Gα_i-Untereinheit membranständig lokalisiert ist. Dadurch bindet die Membran mit dem Rezeptor und dem Gα_i-³⁵S-GTPγS-Komplex an einem Glasfaserfilter, über den der Versuchsansatz filtriert wird. Anschließend kann die an die Membran gebundene Menge an ³⁵S-GTPγS bestimmt werden.

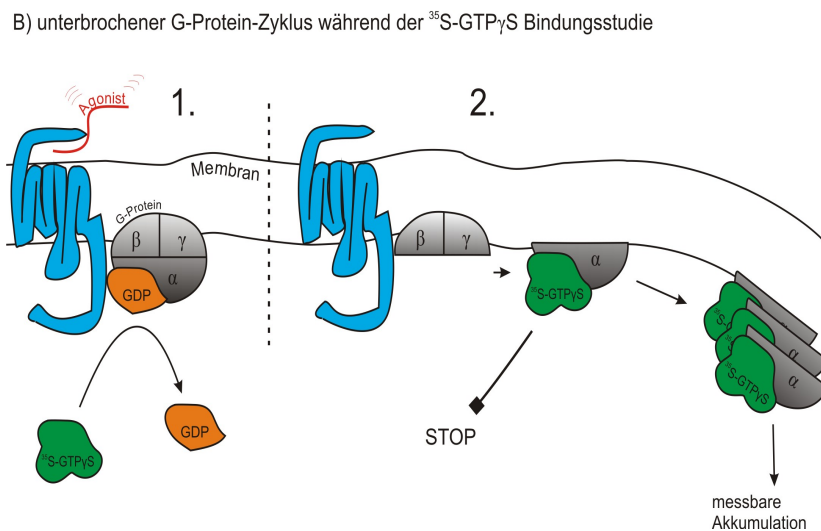
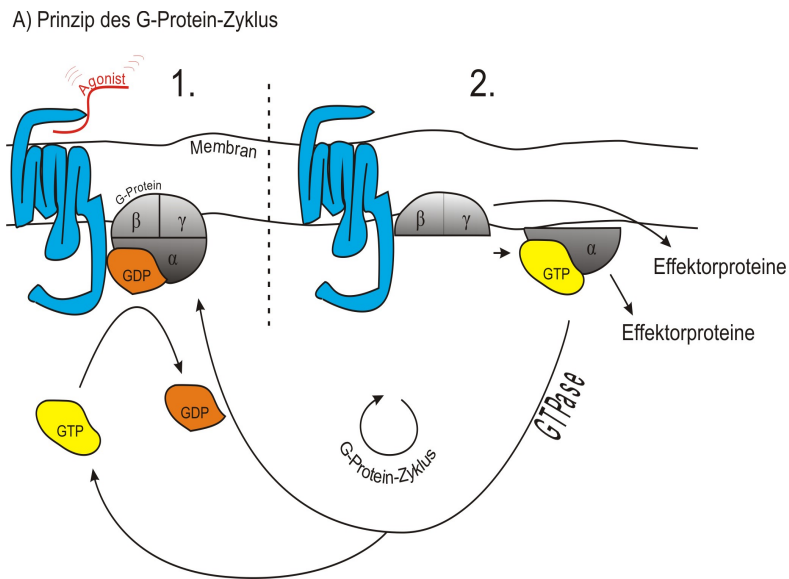


Abbildung 5: Prinzip des G-Protein-Zyklus während der ³⁵S-GTPγS-Bindungsstudie

A) Dargestellt ist das Prinzip des G-Protein-Zyklus. Nach Stimulation des Rezeptors wird GDP der α -Einheit des G-Proteins ($\alpha\beta\gamma$ -Komplex) gegen GTP ausgetauscht. Das G-Protein dissoziiert in ein $\beta\gamma$ -Dimer und α -GTP. Eine GTPase ist in der Lage den α -GTP-Komplex in α -GDP zu überführen. Ein Zusammenschluss von α -GDP mit dem $\beta\gamma$ -Dimer ist nun möglich und eine weitere Aktivierung des G-Proteins ist nun durch den Rezeptor möglich.

B) Anstelle des endogenen GTPs wird der Radioligand ³⁵S-GTPγS gegen GDP der α -Einheit ausgetauscht. Der entstandene α -³⁵S-GTPγS-Komplex kann nur sehr schlecht durch die GTPase hydrolysiert werden, was zu einer Akkumulation des Komplexes führt. Die gemessene Höhe der Radioaktivität gibt Aufschluss über die akkumulierte Menge der α -³⁵S-GTPγS-Komplexe.

Wichtige, die ^{35}S -GTP γ S-Bindung beeinflussende Versuchsbedingungen sind die Inkubationszeit und die Konzentrationen von GDP, Mg^{2+} (in Form von MgCl_2) und Na^+ (in Form von NaCl). Der Einfluss dieser Faktoren auf die ^{35}S -GTP γ S-Bindungsstudie variiert in unterschiedlichen Spezies und Geweben, weshalb die Ermittlung der optimalen Konzentrationen im Versuchsansatz für das Gelingen der ^{35}S -GTP γ S-Bindungsstudie zwingend erforderlich ist.

Weil GDP, Mg^{2+} und Na^+ die Rezeptor-G-Protein-Interaktion auf unterschiedliche Art und Weise beeinflussen, wird nachfolgend auf deren Wirkung und Bedeutung, die ^{35}S -GTP γ S-Bindung betreffend, eingegangen.

Die Zugabe von GDP ist nötig, um eine optimale, durch einen Agonisten stimulierte ^{35}S -GTP γ S-Bindung zu messen. Durch Bindung von GDP an den Bindungsstellen aller $G\alpha$ -Untereinheiten wird die spontane Aktivierung von G-Protein-Zyklen verhindert (Abb. 5A). Da die $G\alpha$ -Einheiten aller G-Proteinfamilien besetzt werden, reduziert sich dadurch im Versuchsansatz die Basalbindung, die die spontane Kopplung verschiedenster G-Protein-gekoppelter Rezeptoren mit den G-Proteinen beinhaltet. Folglich kommt es zu einer Senkung des „Hintergrundgeräusches“, was zu einer deutlicheren Messung des durch den Muskarin-Rezeptor-Agonisten (nachfolgend nur als „Agonist“ bezeichnet) vermittelten Signals führt. Außerdem wird durch GDP die Geschwindigkeit und das Ausmaß der ^{35}S -GTP γ S-Bindung durch Konkurrenz mit ^{35}S -GTP γ S um die Bindungsstelle von $G\alpha$ reduziert, weil $G\alpha$ für GDP affiner als ^{35}S -GTP γ S ist, wenn das G-Protein nicht durch ein Agonisten-vermitteltes Signal aktiviert wurde. Der Agonist wiederum erhöht durch Aktivierung des Rezeptors die Affinität des G-Proteins für ^{35}S -GTP γ S. Auch deshalb wird das durch den Agonisten vermittelte Signal besser messbar.

Die optimale GDP-Konzentration ist in jedem System (Spezies, Gewebe) unterschiedlich, weil verschiedene Konzentrationen und/oder verschiedene Subtypen von heterotrimeren G-Proteinen für eine Interaktion vorliegen.

Die Zugabe von Mg^{2+} ist nötig, um eine Agonisten-stimulierte ^{35}S -GTP γ S-Bindung zu messen (SZEKERES u. TRAYNOR; 1997). Es ist nicht vollständig geklärt, ob Mg^{2+} die Rezeptoren und/oder die G-Proteine beeinflussen. Fest steht, dass in Anwesenheit von Mg^{2+} , die Basalbindung von ^{35}S -GTP γ S, aber auch die Agonisten-stimulierte ^{35}S -GTP γ S-Bindung erhöht wird, wobei der Effekt auf die Agonisten-stimulierte ^{35}S -GTP γ S-Bindung größer ist. Letzteres führt für sich genommen zu einem besser messbaren Signal, aber auch die Mg^{2+} -vermittelte Erhöhung der durch

GDP reduzierten ^{35}S -GTP γ S-Bindung wirkt sich positiv auf die Messung aus.

Die Anwesenheit von Na^+ hingegen verbessert das relative Verhältnis von Agonisten-stimulierter ^{35}S -GTP γ S-Bindung zur Basalbindung (relative Stimulation) und damit verbessert sich das Signal-Stör-Verhältnis, d.h. es verbessert sich das messbare, durch den Agonisten vermittelte Signal im Verhältnis zur Basalbindung/Hintergrundgeräusch. Dieser Effekt wird der Bindung der Na^+ an einen Aspartat-Rest in der Transmembrandomäne II des G-Protein-gekoppelten Rezeptors zugeschrieben, was zu einer Präferenz des entkoppelten Zustandes des G-Protein-Rezeptor-Komplexes führt, wodurch die basale ^{35}S -GTP γ S-Bindung verringert wird (TIAN et al. 1994). In Kombination mit GDP und Mg^{2+} ist dies eine Voraussetzung, um das durch Agonistenstimulation vermittelte Signal zu messen.

Mit der Hilfe von N-Ethylmaleimid (NEM) und Pertussistoxin (PTX) können noch weitere Rückschlüsse auf die M_2 -Rezeptor- G_i -Protein-Interaktion gezogen bzw. eine Funktionsanalyse durchgeführt werden. Diese Substanzen verhindern durch Strukturveränderung der $\text{G}\alpha$ -Untereinheit eine Interaktion des G-Proteinkomplexes mit dem Rezeptor. Hierdurch wird $\text{G}\alpha$ im GDP-gebundenen Zustand blockiert, was zu einer Inaktivierung des G-Proteins führt. Man spricht auch von der Entkopplung des G-Proteins vom Rezeptor. Angriffspunkt der Strukturveränderung ist für beide Substanzen höchstwahrscheinlich gleich, nämlich ein Cystein-Rest der $\text{G}\alpha$ -Untereinheit, der durch NEM alkyliert und durch PTX ADP-ribosyliert wird (ASANO u. OGASAWARA 1986).

Die M_2 -Rezeptor- und die M_3 -Rezeptor-vermittelte Signalkaskade beeinflussen auf indirektem und direktem Weg die Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur. Krankhafte Veränderungen dieser Signalwege könnten eine Ursache für den bei der RAO des Pferdes vorkommenden Bronchospasmus sein. Da zur funktionellen Kopplung der muskarin-cholinergen Rezeptoren an G-Proteine und deren Aktivierung von Effektorproteinen im equinen Respirationstrakt bisher keine Untersuchungen vorliegen und vorausgehende Untersuchungen gezeigt haben, dass bei der RAO des Pferdes keine Veränderungen der muskarin-cholinergen Rezeptorpopulation vorliegt, soll insbesondere der über G_{i0} -Proteine vermittelte Signalweg der im equinen Respirationstrakt dominant vorkommenden M_2 -Rezeptorpopulation bei gesunden und an RAO-erkrankten Pferden untersucht werden. Weiterhin soll die Aktivität des Effektorproteins Adenylatzyklase nach Weiterleitung des Signals bestimmt werden.

3 TIERE, MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 Tiere

Das Probenmaterial für die vorliegende Arbeit wurde von 19 Schlachtpferden gewonnen. Falls möglich, wurden anhand der Pferdepässe nach §24 K Viehverkehrsverordnung die arzneilichen Anwendungen kontrolliert und das Alter, die Rasse und das Geschlecht dokumentiert. Der Schlachtgrund und – falls bekannt – ein Vorbericht wurden uns mündlich überliefert. Die Rossschlächtereien Vogt (Freiberg) und Wirth (Grimma) haben uns freundlicherweise das Organmaterial zur Verfügung gestellt.

Die Schlachtpferde wurden in zwei Versuchsgruppen (Kontrollgruppe – Gruppe A; RAO-Gruppe – Gruppe B) eingeteilt und miteinander verglichen (Tabelle 1). Der Vorbericht und die makroskopische Untersuchung des Respirationstrakts waren Kriterien der Gruppenbildung. Gruppe A (Kontrollgruppe) bestand aus 11 Pferden im Alter von durchschnittlich 13,7 Jahren, bei denen weder vorberichtlich Erkrankungen der Atemwege bekannt waren, noch bei makroskopischen Untersuchungen der Organmaterialien Anzeichen auftraten, die auf eine RAO hinweisen würden.

Gruppe B bestand aus acht Pferden mit einem durchschnittlichen Lebensalter von 16,4 Jahren, bei denen vorberichtlich "Dämpfigkeit" diagnostiziert wurde. Die makroskopischen Untersuchungen der Lungen erkrankter Tiere zeigten eine Zunahme des Lungenvolumens, ausgedehnte Emphyseme, herdförmige Fibrosen oder auch fibrotisch veränderte Lungenlappen und zum Teil gerötete Schleimhäute mit einer zähen, weißen, schaumigen Flüssigkeit in den Luftwegen von Trachea und Bronchien. Eine starke Kontraktion der glatten Trachealmuskulatur konnte in einzelnen Fällen beobachtet werden.

Tabelle 1: Alter und Geschlecht der Versuchspferde

Tier Nr.	Geschlecht	Alter (Jahre)
Kontrollgruppe (A)		
1	W	10
2	S	16
3	S	8
4	S	27
5	S	10
6	S	14
7	S	18
8	W	10
9	H	2,5
10	S	24
11	S	12
RAO-Gruppe (B)		
12	W	12
13	S	22
14	S	15
15	W	12
16	W	12,5
17	W	30
18	W	20
19	W	8
20	H	1

W: Wallach, S: Stute, H: Hengst

3.2 Materialien und Methoden

3.2.1 Gewinnung des Organmaterials

Die Lunge mit der Luftröhre wurde unmittelbar nach Schlachtung der Tiere aus dem Brustkorb entnommen und innerhalb von zwei Stunden auf Eis in das Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie der veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig transportiert.

Gewebestücke des Lungenparenchyms wurden aus dem rechten und linken Lobus caudalis

präpariert, die frei von Pleura, sichtbaren Gefäßen und Bronchioli waren. Die tracheobronchialen Verzweigungen wurden freipräpariert, ein Stück der Trachea und die Bronchien zweiter und dritter Ordnung wurden entnommen und im Längsschnitt eröffnet. Das Epithel mit der darunter liegenden glatten Muskulatur wurde mit Pinzette und Skalpell von den Knorpelringen der Bronchien beziehungsweise von den Knorpelspannen der Trachea getrennt.

Jeweils ca. 1-2 g der gewonnenen Gewebestücke wurden in Eppendorfgefäße (2 ml) überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

3.2.2 Membranpräparation für Western Blot und Adenylatzyklase

Für die Präparation der Membranen und die nachfolgenden Versuche wurden folgende Puffer-Lösungen verwendet:

1) TRIS-EDTA-Puffer (TE-Puffer), pH 7,4

25 mmol/l TRIS-HCl

5 mmol/l EDTA

5 mmol/l EGTA

2) Inkubationspuffer, pH 7,4

25 mmol/l TRIS-Maleat

7,5 mmol/l EGTA

3) T.E.N.-Puffer, pH 7,4

20 mmol/l TRIS-Base

1 mmol/l EDTA-Na₄

25 mmol/l NaCl

Für die Bestimmung der Aktivität der Adenylatzyklase und die Durchführung des Western Blots wurden Plasmamembranen aus eingefrorenem Gewebe der jeweiligen Lokalisationen isoliert. Die bei -80°C aufbewahrte Gewebestücke wurden zunächst in 15 ml TE-Puffer (Nr. 1) (Western Blots) bzw. Inkubationspuffer (Nr. 2) (AC) aufgenommen und auf Eis ca. eine Stunde aufgetaut. Dann

erfolgte die grobe Zerkleinerung mit einer Schere und anschließend die Homogenisierung auf Eis mit einem Ultra-Turrax bei 1500 RPM für zweimal 30 Sekunden mit einer Pause von einer Minute. Das Homogenat wurde anschließend bei 500 x g und 4°C 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde durch vierlagige chirurgische Gaze filtriert und das Sediment wurde verworfen. Im nächsten Schritt erfolgte die Trennung der Membranfraktion von den restlichen Zellbestandteilen mittels Zentrifugation bei 18000 RPM und 4°C für 30 Minuten. Danach wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 15 ml TE-Puffer (Nr. 1) (Western Blot) bzw. Inkubationspuffer (Nr. 2) (AC) resuspendiert und erneut bei 18000 RPM und 4°C für 30 Minuten "gewaschen". Zum Abschluss wurde das Pellet in 200 µl – 500 µl TE-Puffer (Nr. 1) (Western Blot) bzw. 500 µl – 1 ml T.E.N.-Puffer (Nr. 3) (AC) aufgenommen und der Proteingehalt bestimmt. Nach der Bestimmung des Proteingehalts nach LOWRY (1951) wurde die Membransuspension in Eppendorfgefäße aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

3.2.3 Membranpräparation für die ³⁵S-GTPγS Radioligandenbindungsstudie

Puffer-Lösung:

Inkubationspuffer, pH 7,4

1 mmol/l EGTA

50 mmol/l TRIS-HCl

10 mmol/l MgCl₂

200 mmol/l NaCl

0,2 mmol/l DTT (täglich frisch hinzugeben)

Die Gewebestücke aus den jeweils drei zu untersuchenden Segmenten des Respirationstrakts wurden in 15 ml Inkubationspuffer auf Eis ca. eine Stunde aufgetaut. Anschließend erfolgte, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, die Zerkleinerung/Homogenisierung und Zentrifugation. Nachdem der Überstand durch vierlagige chirurgische Gaze filtriert wurde, wurde das Filtrat bei 40000 x g, 4°C für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2 ml Inkubationspuffer resuspendiert und mit einer Injektionsnadel (18 G) homogenisiert. Die Trennung und die Gewinnung der gewünschten Membranfraktion wurde über eine Zentrifugation über einen Saccharose-Dichte-Gradienten erhalten. Hierzu wurde ein diskontinuierlicher Saccharose-

Dichtegradient erstellt, der aus Lagen von jeweils 4 ml einer 5%-, 20%-, 25%- und 30%igen Saccharoselösung bestand. Das Homogenat (2 ml) wurde vorsichtig auf die oberste Schicht des Gradienten pipettiert und mit einem Ausschwenkrotor bei 70000 x g, 4°C für eine Stunde zentrifugiert. Danach wurden die Schichten 5% und 20% entnommen und miteinander vermengt und für weitere 60 Minuten bei 40000 x g zentrifugiert, um die Saccharose zu entfernen. Das endgültige Pellet wurde in 3 ml Inkubationspuffer resuspendiert und homogenisiert. Kleinere Mengen (50 µl – 1 ml) wurden in Eppendorfgläser portioniert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt, nachdem die Proteinbestimmung nach LOWRY (1951) erfolgte.

3.2.4 Proteinbestimmung

Puffer-Lösungen:

Lowry-Lösung A

188,7 mmol/l Na₂CO₃

100 mmol/l NaOH

5,67 mmol/l Kalium-Natriumtartrat-Tetrahydrat

3,47 mmol/l Natriumdodecylsulfat

Lowry-Lösung B

1,6 mmol/l CuSO₄ + 5 H₂O

Lowry-Lösung C

Lowry-Lösung A/Lowry-Lösung B (100:1 v/v)

Die Proteinkonzentration der Membransuspension wurde wie in Kapitel 3.2.2 und 3.2.3 beschrieben nach der Methode von LOWRY (1951) bestimmt. Die Eichkurve der Standardproben wurde mit bovinem Serumalbumin (0,5 mg/ml, 1,0 mg/ml, 1,5 mg/ml und 2,0 mg/ml) erstellt. 25 µl Gewebeprobe bzw. Standardprobe wurden mit 750 µl der Lowry-Lösung C in 1,5 ml Eppendorfgläsern vermischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 37,5 µl des Folin-Ciocalteu-Phenolreagens versetzt und sofort am Vortex gerüttelt.

Nach einer weiteren Inkubation von 40 Minuten wurden die Proben in Quarzglas­küvetten bei 660 nm Wellenlänge spektral­photometrisch gegen den Leerwert gemessen und der Proteingehalt mit Hilfe der Eichkurve in mg/ml berechnet. Für die Ermittlung des Leerwerts wurden 25 µl Kaliumphosphat-Puffer anstelle der Probe verwendet. Der Proteingehalt der Membransuspensionen wurde mittels Doppelbestimmung ermittelt.

3.2.5 Untersuchungen zur Bestimmung der funktionellen M₂-G_i-Protein-Interaktion

3.2.5.1 Guanosin 5'-(γ-[³⁵S]thiotriphosphat)-Bindungsstudien

1) Inkubationspuffer, pH 7,4

1 mmol/l EGTA

50 mmol/l TRIS-HCl

10 mmol/l MgCl₂

200 mmol/l NaCl

0,2 mmol/l DTT (täglich frisch hinzugeben)

2) Waschpuffer, pH 7,4

1 mmol/l EGTA

50 mmol/l TRIS-HCl

Versuchsablauf

Ein Versuchsansatz der ³⁵S-GTPγS-Bindung hat ein Gesamtvolumen von 500 µl. Nachfolgend sind die Substanzen und deren Endkonzentrationen aufgelistet:

- Puffer (1 mmol/l EGTA, 10 mmol/l MgCl₂, 100 mmol/l NaCl, 50 mmol/l TRIS-HCl und 0,2 mmol/l DTT)
- 10 µmol/l GDP
- 0,5 nmol/l ³⁵S-GTPγS

Es wurden pro Ansatz die Gesamtbindung (TB = Gesamtbindung (engl. total); umfasst spezifische und unspezifische Bindung), die unspezifische Bindung (UB) und die Bindung unter Einfluss verschiedener Substanzen in Doppelbestimmung ermittelt.

Mit jedem Versuchsansatz wurde die Gesamtbindung (TB) bestimmt. Hierbei enthielt der Versuchsansatz Puffer, Membransuspension, ^{35}S -GTP γ S und GDP. Die zu testende Substanz der Verdünnungsreihe wurde nicht hinzugefügt (siehe unten Pipettierschemata).

Die unspezifische Bindung wurde parallel in Gegenwart von 10 $\mu\text{mol/l}$ unmarkiertem GTP γ S gemessen. Diese Hemmkonzentration wurde vorher in separaten Versuchen ermittelt. Der Ansatz hierfür enthielt grundsätzlich 100 μl ^{35}S -GTP γ S, 100 μl Membransuspension, 100 μl GDP, 100 μl Puffer und 100 μl der entsprechenden Konzentration von GTP γ S (siehe unten).

Die unspezifische Bindung wurde von jedem Messwert abgezogen. Damit erhält man die Werte für die spezifische Bindung. Die Differenz aus der Gesamtbindung und der unspezifischen Bindung wird als Basalbindung oder unstimulierte Bindung bezeichnet. Die Messwerte der Konzentrationsreihe abzüglich der unspezifischen Bindung werden in Versuchen, in denen Muskarin-Rezeptor-Agonisten (MR-Agonisten) in einer Konzentrationsreihe eingesetzt wurden, als „stimulierte Bindung“ bezeichnet. Die Differenz aus unstimulierter und stimulierter Bindung entspricht der relativen Stimulation und wird in Prozent dargestellt. Sie stellt die prozentuale Erhöhung der Agonisten-stimulierten ^{35}S -GTP γ S-Bindung im Vergleich zur Basalbindung von ^{35}S -GTP γ S dar. Die relative Stimulation wird zur Festlegung der optimalen Konzentration von Na^+ und GDP benötigt. Außerdem können über die Höhe der relativen Stimulation in den Versuchen mit Beteiligung der MR-Agonisten Rückschlüsse auf die funktionelle M_2 - G_i -Protein-Interaktion gezogen werden. Je höher der Wert ist, desto funktionell aktiver war die M_2 - G_i -Protein-Interaktion.

Die Reaktion wurde mit Zugabe der Membransuspension, die auf 10 μg Protein eingestellt wurde, gestartet. Nach einer Inkubationszeit von 120 Minuten bei 30°C wurde der Reaktionsansatz auf Eis überführt und die Reaktion mit eiskaltem Waschpuffer (6 ml) gestoppt. Der Reaktionsansatz wurde mit dem Filtrationsautomaten (Brandl, Cell Harvester) über eine Glasfasermembran filtriert, um das membrangebundene ^{35}S -GTP γ S von dem ungebundenen zu trennen. Der Wasch- und Filtrationsvorgang wurde ein zweites Mal durchgeführt. Hiernach wurden die entsprechenden Bereiche der Filterblätter (membrangebundenes ^{35}S -GTP γ S) in vorbereitete Mini-Vials gestanzt und über Nacht in einem Trockenschrank bei 37°C getrocknet. In jedes Vial wurden am nächsten Tag 3 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint Eco) hinzu gegeben. Anschließend wurden die Proben 10 min geschüttelt. Die Messung der Radioaktivität erfolgte mit einem Wallac Beta-Counter mit einer Effizienz von 94% und wurde als "counts per minute" (CPM) angegeben.

Dieser Ablauf wurde grundsätzlich eingehalten und je nach Zielstellung der ^{35}S -GTP γ S-

Bindungsstudie wurden die Versuchsansätze leicht modifiziert.

3.2.5.1.1 GTP γ S-abhängige ³⁵S-GTP γ S-Bindung

Mit diesem Versuch wurde die GTP γ S-Konzentration ermittelt, die eingesetzt wurde, um den Anteil der unspezifischen ³⁵S-GTP γ S-Bindung zu messen.

Hierbei wurde die ³⁵S-GTP γ S-Bindung mit zunehmenden Konzentrationen von GTP γ S (10 Konzentrationen zwischen 10⁻⁵ und 10⁻¹¹ mol/l) gehemmt. Die für die Bestimmung der unspezifischen Bindung erforderliche GTP γ S-Konzentration wurde aus der Konzentrations-Hemmungskurve der ³⁵S-GTP γ S-Bindung ermittelt. Die Grundlagen für diese Berechnung sind in Abschnitt 2.2.5.1 beschrieben.

3.2.5.1.2 Mg²⁺- und Na⁺-abhängige ³⁵S-GTP γ S-Bindung

Da die Stimulierbarkeit der ³⁵S-GTP γ S-Bindung sehr stark von der Mg²⁺- bzw. Na⁺-Konzentration abhängig ist, sollte zunächst die optimale Konzentration dieser Ionen für die weiteren Versuchsansätze ermittelt werden.

Mit zunehmenden Konzentrationen von Mg²⁺- bzw. Na⁺ (500 mmol/l, 200 mmol/l, 10⁻¹ mol/l bis 10⁻⁸ mol/l) wurde die ³⁵S-GTP γ S-Bindung in Ab- (Basalbindung) und Anwesenheit von 1 mmol/l Oxotremorin M (muskarin-cholinerger Agonist) in allen drei Geweben des Respirationstrakts gemessen. Der jeweilige Inkubationspuffer enthielt keine Ionen der zu überprüfenden Ionenart (Mg²⁺ bzw. Na⁺). Der allgemeine Versuchsablauf ist in Kapitel 3.2.5.1 beschrieben und das Pipettierschema ist aus Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2: Pipettierschema der Versuchsansätze der ³⁵S-GTPγS-Bindungsstudien; MgCl₂/NaCl

	Puffer	NaCl/MgCl ₂ aus Verdünnungsreihe	Agonist: Oxotremorin M (1 mmol/l)	GTPγS	Membran- suspension	³⁵ S-GTPγS	GDP
TB Basal	200 µl				100 µl	100 µl	100 µl
UB Basal	100 µl			100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Versuchsreihe Basal	100 µl	100 µl			100 µl	100 µl	100 µl
TB Agonist	100 µl		100 µl		100 µl	100 µl	100 µl
UB Agonist			100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Versuchsreihe Agonist		100 µl	100 µl		100 µl	100 µl	100 µl

TB = Gesamtbindung, UB= unspezifische Bindung

3.2.5.1.3 Guanosindiphosphat-abhängige ³⁵S-GTPγS-Bindung

Neben der Bestimmung der optimalen Konzentrationen von Mg²⁺ und Na⁺ im Versuchsansatz war auch wichtig, die optimale Konzentration von Guanosindiphosphat (GDP) zu ermitteln. Durch die Zugabe einer optimalen Menge an GDP wird das durch einen Agonisten vermittelte Signal der ³⁵S-GTPγS-Bindung besser messbar (siehe Kapitel 2.2.6).

GDP wurde jeweils in den Konzentrationen 10⁻⁵ M bis 10⁻¹¹ M den Ansätzen zugegeben. Die Basalbindung der ³⁵S-GTPγS-Bindung (Abwesenheit von Oxotremorin M) wurde mit der stimulierten ³⁵S-GTPγS-Bindung (1 mmol/l Oxotremorin M) verglichen. Der allgemeine Versuchsablauf ist in Kapitel 3.2.5.1 beschrieben und das Pipettierschema ist aus Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3: Pipettierschema der Versuchsansätze der ³⁵S-GTPγS-Bindungsstudien; GDP

	Puffer	GDP aus Verdünnungsreihe	Agonist: Oxotremorin M (1 mmol/l)	GTPγS	Membran- suspension	³⁵ S-GTPγS
TB Basal	300 µl				100 µl	100 µl
UB Basal	200 µl			100 µl	100 µl	100 µl
Versuchsreihe Basal	200 µl	100 µl			100 µl	100 µl
TB Agonist	200 µl		100 µl		100 µl	100 µl
UB Agonist	100 µl		100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Versuchsreihe Agonist	100 µl	100 µl	100 µl		100 µl	100 µl

TB = Gesamtbindung, UB= unspezifische Bindung

3.2.5.1.4 Zeitabhängige ³⁵S-GTPγS-Bindung

Ein weiterer wichtiger Faktor zur Optimierung der ³⁵S-GTPγS-Bindungsstudie ist die Festlegung der optimalen Inkubationszeit. Diese sollte so gewählt werden, dass ausreichend ³⁵S-GTPγS in die Gα-Untereinheit eingebaut wird, damit ein deutlicher Unterschied zwischen Basalbindung und stimulierter ³⁵S-GTPγS-Bindung messbar ist.

Um die möglichst größte Differenz zwischen Basalbindung und der Agonisten-stimulierter ³⁵S-GTPγS-Bindung in allen Versuchen zu messen, wurde der Einfluss der Inkubationszeit in An- und Abwesenheit von 1 mmol/l Carbachol (Agonist) auf die ³⁵S-GTPγS-Bindung ermittelt.

Der Ansatz zur Messung der Basalbindung enthielt 100 µl ³⁵S-GTPγS, 100 µl Membransuspension und 300 µl Inkubationspuffer. In Anwesenheit von 100 µl Carbachol (1 mmol/l) wurden dem Ansatz 100 µl ³⁵S-GTPγS, 100 µl Membransuspension und 200 µl Inkubationspuffer hinzugefügt. Die Reaktion wurde mit Zugabe der Membransuspension gestartet und nach jeweils 15 min, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 150 min und 180 min gestoppt. Die weitere Aufarbeitung der Proben erfolgte wie in Abschnitt 3.2.5.1 beschrieben.

In weiteren Versuchen wurde außerdem die zeitabhängige Akkumulation von ³⁵S-GTPγS in Anwesenheit des Agonisten Oxotremorin M (1 mmol/l) ermittelt.

3.2.5.1.5 Ermittlung der Agonisten-abhängigen Stimulation der ³⁵S-GTPγS-Bindung

Um die funktionelle Kopplung der M₂-Rezeptoren mit G-Proteinen (insbesondere G_i) im Respirationstrakt des Pferdes zu überprüfen, wurden die muskarin-cholinergen Rezeptoren mit verschiedenen Agonisten stimuliert und die daraus resultierende ³⁵S-GTPγS-Bindung gemessen.

Der Einfluss der nicht-selektiven Agonisten Carbachol, Acetylcholin und Oxotremorin M auf die ³⁵S-GTPγS-Bindung wurde mit jeweils acht Konzentrationen (10⁻³ bis 10⁻⁸ mol/l) im jeweiligen Versuchsansatz untersucht. Parallel wurde Atropin (muskarin-cholinerges Rezeptorantagonist) in einer Konzentration von 10 μmol/l eingesetzt, um zu prüfen, ob die konzentrationsabhängige, durch Agonisten-vermittelte Stimulation der ³⁵S-GTPγS-Bindung, Muskarinrezeptor-vermittelt (insbesondere M₂) sein kann. Der allgemeine Versuchsablauf der Radioligandenbindungsstudie ist in Kapitel 3.2.5.1 beschrieben und das Pipettierschema ist aus Tabelle 4 zu entnehmen..

Tabelle 4: Pipettierschema der Versuchsansätze der ³⁵S-GTPγS-Bindungsstudien; Agonisten

	Puffer	Agonist aus Verdünnungsreihe	Antagonist: Atropin (10 μmol/l)	GTPγS	Membran- suspension	³⁵ S-GTPγS	GDP
TB Basal	200 μl				100 μl	100 μl	100 μl
UB Basal	100 μl			100 μl	100 μl	100 μl	100 μl
Versuchsreihe Basal	100 μl	100 μl			100 μl	100 μl	100 μl
TB Antagonist	100 μl		100 μl		100 μl	100 μl	100 μl
UB Antagonist			100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl
Versuchsreihe Antagonist		100 μl	100 μl		100 μl	100 μl	100 μl

TB = Gesamtbindung, UB= unspezifische Bindung

3.2.5.1.6 Einfluss von N-Ethylmaleimid und Pertussistoxin auf die ³⁵S-GTPγS-Bindung

N-Ethylmaleimid (NEM) und Pertussistoxin (PTX) sind Substanzen, die vorzugsweise G_i-Proteine von deren Rezeptoren entkoppeln (Kapitel 2.2.6). Aufgrund dieser Eigenschaft ist es möglich, nach Stimulation des Rezeptors mit einem Agonisten, Erkenntnisse über die M₂-G_i-Protein-Interaktion im Respirationstrakt des Pferdes zu erhalten.

Der Versuchsansatz gleicht grundsätzlich dem aus Kapitel 3.2.5.1.5, außer dass kein Antagonist

(Atropin) verwendet wurde.

Der Agonist Oxotremorin M wurde je Versuchsansatz in verschiedenen Konzentrationen (10^{-3} bis 10^{-8} mol/l) verwendet, um durch Stimulation der muskarin-cholinergen Rezeptoren (insbesondere M_2) die über G_i -Proteine vermittelte ^{35}S -GTP γ S-Bindung zu stimulieren.

Versuchsansatz mit NEM:

Die Membransuspension wurde eine Stunde bei Raumtemperatur mit 100 $\mu\text{mol/l}$ NEM vorinkubiert. Ein zweiter Versuchsansatz (Kontrolle) wurde ohne NEM gleichermaßen behandelt. Danach wurde – wie in Kapitel 3.2.5.1 beschrieben – die ^{35}S -GTP γ S-Bindung mit Zugabe von jeweils 100 μl Membransuspension je Ansatzröhrchen gestartet.

Versuchsansatz mit PTX:

PTX wurde in Gegenwart von 25 mmol/l DTT bei 30°C für 30 Minuten im Wasserbad aktiviert. Anschließend wurde die Membransuspension ohne (Kontrollansatz) bzw. mit 1 $\mu\text{g/ml}$ des aktivierten PTX bei 30°C für 60 Minuten im Wasserbad vorinkubiert. Bei der Untersuchung der Adenylatzyklase-Aktivität wurde in Versuchen mit Oxotremorin M eine PTX-Konzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$ benutzt. Der weitere Versuchsablauf wurde wie in Kapitel 3.2.5.1 beschrieben durchgeführt.

3.2.5.2 M_2 - G_i -Protein-vermittelte Hemmung der Adenylatzyklase-Aktivität

Das membrangebundene Enzym Adenylatzyklase (AC) katalysiert die Umsetzung von Adenosintriphosphat (ATP) zum zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) und unterliegt der Kontrolle stimulatorischer und inhibitorischer G-Proteine (G_s und G_i ; siehe Kapitel 2.2.2).

Nach der Methode von SALOMON et al. (1974) mit einigen Modifikationen (ABRAHAM et al. 2003) erfolgte durch den Umsatz von $[\alpha]$ - ^{32}P -ATP in das ^{32}P -cAMP die Messung der Aktivität der AC-Aktivität in den Membranfraktionen des equinen Tracheal- und Bronchialepithels und der darunter liegenden glatten Muskulatur und des Lungenparenchyms.

Es wurde geprüft, inwieweit die Aktivierbarkeit der AC, die unmittelbar mit Forskolin (aktiviert die katalytische Untereinheit der AC) ausgelöst wird, durch den Muskarin-Rezeptor-Agonisten Oxotremorin M gehemmt wird. Darüber hinaus wurden Membransuspensionen – wie in Kapitel 3.2.5.1.6 beschrieben – mit NEM bzw. PTX vorbehandelt.

Folgende Versuche wurden durchgeführt:

- Bestimmung der stimulierenden Forskolin-Konzentration
- Hemmung der Forskolin-induzierten Stimulation mit Oxotremorin M
- Einfluss von NEM (50 $\mu\text{mol/l}$, 100 $\mu\text{mol/l}$) auf die Forskolin-induzierte Stimulation
- funktionelle Studie mit Forskolin, Oxotremorin M und PTX

Da aufgrund der Membranpräparation dem Enzym das zytoplasmatische Umfeld fehlt, wird ein Phosphatgruppenüberträger bzw. -fänger benötigt. Hierzu wurde dem Reaktionsansatz Creatinphosphat und Creatinphosphokinase in Form eines „Reaktionsgemisches“ (RG) beigefügt. Dieses enthielt pro 100 μl Reaktionsansatz 40 mmol/l HEPES, 5 mmol/l MgCl_2 , 1 mmol/l EDTA- Na_4 , 0,5 mmol/l ATP, 0,1 mmol/l cAMP, 5 mmol/l Creatinphosphat und 50 I.E./ml Creatinphosphokinase. Um die Hemmung der cAMP-Bildung durch hydrolysiertes ATP in Form von Adenosin auszuschließen, wurden 20 I.E. Adenosindeaminase pro Ansatz hinzugefügt. Der entsprechende Reaktionsansatz wurde in der Regel jeweils 10 min mit der entsprechenden Substanz bei 37°C im Wasserbad vorinkubiert und anschließend nach Zugabe von 1000000 CPM $[\alpha]$ - ^{32}P -ATP nochmal bei 37°C für 10 min im Wasserbad inkubiert. Durch Zugabe von 100 μl Stopplösung (inklusive 100 μl ^3H -cAMP, 8500 CPM) und 800 μl destilliertem Wasser wurde die Reaktion gestoppt. Danach erfolgte die Trennung von ^{32}P -cAMP von ^{32}P -ATP in zwei Schritten über Säulenchromatographie: Fixierung von anionischen Verbindungen auf Anionenaustauschersäulen (Dowex) und Elution von cAMP vom neutralen Austauscher (Alumina). Der Reaktionsansatz wurde zunächst auf die Dowex-Säulen gegeben und nach Versickern der Reaktionsflüssigkeit wurde zweimal mit 1 ml destilliertem Wasser gewaschen. Danach wurden die Dowex-Säulen auf die Alumina-Säulen gestellt und 4 ml destilliertes Wasser wurde auf die Dowex-Säulen gegeben. Durch einen letzten Waschvorgang mit 0,1 molarer Imidazolösung wurde das gebildete ^{32}P -cAMP aus den Alumina-Säulen gelöst und in Messgefäßen aufgefangen. Nach Zugabe von 15 ml Szintillationsflüssigkeit Rotiszint Eco plus wurden die Proben im Beta-Counter (Wallac 1409) gemessen.

Das tritiummarkierte cAMP der Stopplösung dient der Bestimmung der Wiederfindungsrate nach der Säulenchromatographie. Die Messwerte (in CPM) wurden nach Abzug des Leerwerts (Tab. 5) und unter Einbeziehung der Wiederfindungsrate in pmol/mg Protein/min umgerechnet und dargestellt. Die Bestimmung der rechnerisch ermittelten Konzentrationen von $[\alpha]$ - ^{32}P -ATP und ^3H -cAMP erfolgte über Messung der Radioaktivität, indem von der jeweils hergestellten

TIERE, MATERIALIEN UND METHODEN

Konzentration 23,5 μl $[\alpha]$ - ^{32}P -ATP bzw. 100 μl ^3H -cAMP in je 3 separate Messgefäße, mit Zusatz von 15 ml Szintillationsflüssigkeit, gegeben wurden.

Jeder Messpunkt für jedes untersuchte Gewebe wurde dreifach ausgeführt. Die Pipettierschemata sind in Tabelle 5 bis 8 veranschaulicht. Die vorausgehende Membranpräparation ist in Kapitel 3.2.2 beschrieben. Die Proteinkonzentration für die Membransuspensionen betrug in allen Geweben 2 mg Protein/ml (\cong 40 μg /Ansatz).

Tabelle 5: Pipettierschema Adenylatzyklase – Leerwert

Leerwert	Ansatz Zugabe
50 μl	H ₂ O dest.
10 μl	ADA
16,5 μl	RG
23,5 μl	$[\alpha]$ - ^{32}P -ATP

ADA = Adenosindeaminase, RG = Reaktionsgemisch

Tabelle 6: Pipettierschema Adenylatzyklase – Forskolin

Basalwert	Forskolin 10 ⁻⁷	Forskolin 10 ⁻⁶	Forskolin 10 ⁻⁵	Forskolin 10 ⁻⁴	Ansatz Zugabe
30 μl	20 μl	20 μl	20 μl	20 μl	H ₂ O dest.
10 μl	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl	ADA
16,5 μl	16,5 μl	16,5 μl	16,5 μl	16,5 μl	RG
-	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl	Forskolin
20 μl	20 μl	20 μl	20 μl	20 μl	Membran
23,5 μl	23,5 μl	23,5 μl	23,5 μl	23,5 μl	$[\alpha]$ - ^{32}P -ATP

Tabelle 7: Pipettierschema Adenylatzyklase – Oxotremorin M und NEM

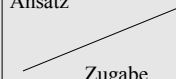
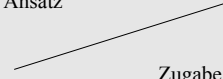
Basalwert	Forskolin 10^{-5}	Forskolin 10^{-5} NEM 50 $\mu\text{mol/l}$	Forskolin 10^{-5} NEM 100 $\mu\text{mol/l}$	Forskolin 10^{-5} Oxo M 10^{-3}	Ansatz  Zugabe
30 μl	20 μl	10 μl	10 μl	10 μl	H ₂ O dest.
10 μl	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl	ADA
16,5 μl	16,5 μl	16,5 μl	16,5 μl	16,5 μl	RG
-	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl	Forskolin
-	-	10 μl	10 μl	10 μl	NEM / Oxo M
20 μl	20 μl	20 μl	20 μl	20 μl	Membran
23,5 μl	23,5 μl	23,5 μl	23,5 μl	23,5 μl	[α]- ³² P]-ATP

Tabelle 8: Pipettierschema Adenylatzyklase – Oxotremorin M und PTX

Basalwert	Forskolin 10^{-5}	Forskolin 10^{-5} Oxo M 10^{-3}	Forskolin 10^{-5} Oxo M 10^{-3} PTX 2 $\mu\text{g/ml}$	Ansatz  Zugabe
30 μl	20 μl	10 μl	-	H ₂ O dest.
10 μl	10 μl	10 μl	10 μl	ADA
16,5 μl	16,5 μl	16,5 μl	16,5 μl	RG
-	10 μl	10 μl	10 μl	Forskolin
-	-	10 μl	10 μl	Oxo M
-	-	-	10 μl	PTX
20 μl	20 μl	20 μl	20 μl	Membran
23,5 μl	23,5 μl	23,5 μl	23,5 μl	[α]- ³² P]-ATP

3.2.5.3 Auswertung der Ergebnisse

Die Messwerte wurden in den Abbildungen und in den Tabellen als arithmetisches Mittel der gemessenen Einzelwerte sowie deren Standardfehler (S.E.M) dargestellt. Aufgrund der geringen Tierzahl und der Annahme der nicht-normal verteilten Population wurde in einigen Fällen der vorliegenden Untersuchungen auf die statistische Analyse und Darstellung der Standardabweichungen verzichtet.

Alle Berechnungen erfolgten mit der Software GraphPadTMPrism Version 4.03 (GraphPad Software, San Diego, USA).

Bei Verdrängungsexperimenten mit GTP γ S und GDP wurde der F-Ratio-Test verwendet, um auf ein mono- oder biphasisches-Bindungsmodell zu schließen. F beträgt ungefähr 1,0 beim einseitigen Bindungsmodell und beim zweiseitigen Bindungsmodell ist $F > 1,0$.

Die Agonisten-stimulierte ^{35}S -GTP γ S-Bindung wurde als Dosis-Wirkungskurve dargestellt. Diese Darstellung wurde gewählt, weil Rückschlüsse über den Einsatz von verschiedenen Substanzen und deren Wirkungen auf die ^{35}S -GTP γ S-Bindung gezogen werden sollen. Die Dosis-Wirkungskurve beschreibt die Beziehung der Konzentration einer bestimmten Substanz (z.B. Agonist) auf die Wirkung (hier: ^{35}S -GTP γ S-Bindung). Die Berechnung erfolgte mittels nichtlinearer Regressionsanalyse. Im Falle der fehlenden Konvergenz wurde eine lineare Beziehung zugrunde gelegt und die Darstellung der Messwerte über die lineare Regressionsanalyse berechnet.

Da aufgrund der geringen Zahl von kranken Versuchstieren keine Normalverteilung der gemessenen Parameter angenommen werden konnte, wurden nicht-parametrische Tests verwendet, um die Versuchsgruppen miteinander zu vergleichen.

Der statistische Vergleich erfolgte, wenn möglich, über gepaarte t-Tests mit Hilfe von Wilcoxon-Test. Andere Auswertungen erfolgten unter Verwendung der einfachen Varianzanalyse (One-Way ANOVA), gefolgt vom Dunnett's Test. Der Test von Dunnett vergleicht die Mittelwerte einer Kontrollgruppe mit den Mittelwerten einer anderen Gruppe. Bei der Analyse von Mittelwertsunterschieden galten diese bei $P < 0,05$ als signifikant.

3.2.6 SDS-Polyamidgelelektrophorese und Western Blot

Folgende Pufferlösung und Lösungen wurden verwendet:

1) Trenngelpuffer

1,5 mol TRIS-HCl

0,4% SDS

Aqua dest.

2) Sammelgelpuffer

0,5 mol TRIS-HCl

5% SDS

Aqua dest.

3) Trenngel 12%

4 ml Acrylamid
2,5 ml Trenngelpuffer
3,45 ml Aqua dest.
5 µl TEMED
50 µl APS

4) Sammelgel

0,67 ml Acrylamid
1,25 ml Sammelgelpuffer
3,05 ml Aqua dest.
5 µl TEMED
30 µl APS

5) TRIS-EDTA-Puffer (TE-Puffer), pH 7,4

25 mmol/l TRIS-HCl
5 mmol/l EDTA
5 mmol/l EGTA

6) Probenpuffer

60 mmol/l TRIS-HCl pH 6,8
25% Glycerol
2% SDS
14,4 mmol/l Mercaptoethanol
0,1% Bromphenolblau
Aqua dest.

7) Laufpuffer (10fach), pH 8,3

25 mmol/l TRIS-Base
192 mmol/l Glycin
0,1% SDS
(1+9 mit Aqua dest. Verdünnen)

8) Transferpuffer

25 mmol/l TRIS-Base
192 mmol/l Glycin
20% Methanol
Aqua dest.

9) TBS

20 mmol/l TRIS-HCl pH 7,5
150 mmol/l NaCl
Aqua dest.

10) TBS-T

TBS 500 ml
250 µl Tween 20 (0,05%)

Die SDS-Polyamidgelelektrophorese dient der Analyse von Proteinmischungen. In dieser Arbeit wurde die Methode benutzt, um die G_I -Proteinmenge in der glatten Muskulatur mit dem darüber liegenden Epithel von Trachea und Bronchien und im Lungenparenchym zu quantifizieren. Weil eine mögliche Veränderung der G_I -Proteinmenge die M_2 - G_I -Protein-Interaktion funktionell beeinflussen würde, wurde die G_I -Proteinmenge von gesunden Pferden mit denen von an RAO-erkrankten Pferden verglichen.

Die Auftrennung der einzelnen Proteine erfolgte nach dem Prinzip der diskontinuierlichen Gelelektrophorese (LAEMMLI, 1970). Ein großporiges Sammelgel (3%) überschichtet ein kleinporiges Trenngel (12%). Die Proteinmischung wurde in Taschen des Sammelgels aufgetragen. Die Proteine wandern zwischen den schneller wandernden Chlorid-Ionen des Sammelgelpuffers und den langsamer wandernden Glycin-Ionen des Laufpuffers und werden dadurch in engen Banden im Sammelgel konzentriert. Beim Einwandern in das Trenngel wandern die Glycin-Ionen an die Front und die Proteine werden aufgrund ihrer molekularen Größe getrennt. Markerproteine helfen die Molekulargewichte der zu analysierenden Proteine zu ermitteln. Nach der Proteinauftrennung wurden die Gele durch Elektrotransfer auf eine Nitrocellulose-Membran

(Protran®) übertragen.

Als Erstes erfolgte die Herstellung der Polyacrylamidgele. Hierzu wurde zunächst das 12%ige Trenngel zwischen zwei mit Alkohol gereinigten Glasplatten, die in einer Gelgießapparatur eingespannt waren, gegossen. Um ein Austrocknen zu vermeiden und zur Ausbildung einer glatten Oberfläche, wurde das Trenngel mit Butanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation des Trenngels wurde das Butanol entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel aufgetragen. Ein Elektrophoresekamm wurde eingesetzt, um Taschen zur Aufnahme der Proben zu erstellen. Das Gel wurde nach vollständiger Polymerisation des Sammelgels und Entfernung des Elektrophoresekamms in eine vertikale Elektrophoresekammer (BioRad, München) eingesetzt, die später mit Laufpuffer gefüllt wurde.

Die Membransuspension wurde mit TE-Puffer und dem Probenpuffer so eingestellt, dass in jeweils 10 µl dieser Lösung pro Geltasche 20 µg (G_i-Proteinanalyse) Protein enthalten war. Die eingestellte Membransuspension wurde bei 100°C für 5 min im Wasserbad erhitzt, um die Proteine zu denaturieren. Das im Probenpuffer enthaltene anionische Detergenz (SDS) überdeckt die Eigenladung der Proteine. Dadurch entstehen anionische Mizellen mit konstanter Nettoladung, die in Richtung Anode wandern können. Von der so vorbereiteten Probe wurden in Doppelbestimmung jeweils 10 µl in eine Geltasche pipettiert. Der Molekulargewichtsmarker „peqGOLD Protein-Marker IV“ (3 µl/Geltasche) wurde auf jedem Gel jeweils einmal aufgetragen. Anschließend wurde ein Vorlauf von 15 min bei 90 Volt Spannung in der Elektrophoresekammer durchgeführt. Danach erfolgte die Trennung der Proteine mittels einer Laufzeit von 90 min bei einer Spannung von 150 Volt.

Nach Auftrennung der Proteinfractionen wurden diese vom Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert, um diese für die nachfolgende Immundetektion zu immobilisieren. Die Nitrocellulose-Membran und das Filterpapier wurden auf die Größe der Gele zurechtgeschnitten und in Transferpuffer getränkt. Sieben Schichten Filterpapier wurden auf die mit Transferpuffer befeuchtete Graphitplatte der Blotting-Kammer gelegt. Darauf kam die Nitrocellulose-Membran, auf die das Gel gelegt wurde. Möglichst luftblasenfrei wurden weitere sieben Schichten Filterpapier darauf gelegt, die den oberen Abschluss bildeten. Das Blotting in der Blotting-Kammer dauerte 90 min bei einer Stromstärke von 50 mA pro Gel.

Nach dem Blotting wurde die Nitrocellulose-Membran in 3%iger BSA-Lösung (bovines

Serumalbumin) für 60 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler gewaschen, um die freien Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren.

Anschließend wurde der Primärantikörper (Anti-G_i-Protein) mit einer Verdünnung von 1:2000 auf die Membran aufgetragen. Die Kontaktzeit betrug ca. 12 Stunden bei + 4°C. Ein 3maliges Waschen für je 10 min mit TBS-T-Lösung erfolgte anschließend bevor die Sekundärantikörper (Anti-Rabbit-IgG, 1:2000) aufgetragen wurden. Nach 60-minütiger Kontaktzeit wurde ein zweites Mal mit TBS-T-Lösung 3x 10 min gewaschen, 3 mal mit Leitungswasser gespült und 2 ml einer fertigen Entwicklerlösung (Promega Corporation) auf die Membran aufgetragen. Die Entwicklungszeit betrug 4 min. Danach wurden die feuchten Nitrocellulose-Membranen an der Luft getrocknet.

Die entwickelten Membranen wurden zur Auswertung digitalisiert und mit der Software „GeneTools“ der Firma SynGene (Synoptics Ltd.) analysiert. Die Rohpixelwerte der Proteinbanden gesunder Pferde wurden mit denen von RAO erkrankten Pferden verglichen, um Rückschlüsse auf die Menge der G_i-Proteine ziehen zu können.

3.2.7 Chemikalien

Alexis Biochemicals (Lausen, Switzerland):

- Pertussistoxin (PTX)

Amersham Biosciences (Freiburg, D):

- [³H]-cAMP ≙ [2,8-³H]-Adenosin-3',5'-cyclic phosphat (spezifische Aktivität: 42 Ci/mmol)

Carl Roth GmbH + Co. (Karlsruhe, D):

- Ammoniumpersulfat (APS)
- Glycin
- Imidazol
- Natriumchlorid
- Rotiphorese Gel 30® (Acrylamid)
- Rotiszint® Eco
- Rotiszint® Eco plus
- Tetramethylethyldiamin (TEMED)
- Tween 20®

E. Merck (Darmstadt, D):

- Calciumchlorid-dihydrat
- Folin-Ciocalteu-Phenolreagens
- Kalium-Natrium-Tartrat
- Kupfersulfat-pentahydrat
- Laurylsulfat
- Magnesiumchlorid-hexahydrat
- Natriumbicarbonat, wasserfrei
- Natriumdodecylsulfat (SDS)
- Natriumhydroxid

Fluka Chemie GmbH (Buchs, Schweiz):

- Aluminiumoxid (Alumina)
- Saccharose

Peqlab Biotechnologie GmbH:

- peqGold Protein-Marker IV

PerkinElmer Life Sciences (Boston, USA):

- $[\alpha]$ - ^{32}P -Adenosin-5'-triphosphat (spezifische Aktivität: 30 Ci/mmol)
- Guanosin 5'- (γ) - ^{35}S thiotriphosphat (spezifische Aktivität 1250 Ci/mmol)

Promega Corporation (Madison, USA):

- Western Blue®, Entwicklerlösung für Western Blot

Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, D):

- Adenosindeaminase
- Adenosin-5'-triphosphat (ATP)
- Creatinphosphat
- Creatinkinase
- Dibutyryl-cyclisches Adenosinmonophosphat

- Guanosin-5'-O-(3-thiophosphat) (GTP γ S)

SERVA Feinbiochemica (Heidelberg, D):

- Dowex 50 WX 8

Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, D):

- Acetylcholin-Chlorid
- Albumin, bovin
- Anti- β -Actin (Clone AC-15)
- Atropinsulfat
- Carbamylcholinchlorid (Carbachol)
- DL-Dithiothreitol (DTT)
- Ethylenglycol-bis(-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetylsäure (EGTA)
- Forskolin
- Guanosindiphosphat (GDP)
- Guanosintriphosphat (GTP)
- N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure) (HEPES)
- N-Ethylmaleimid (NEM)
- Lithiumchlorid
- Manganchlorid
- N-Methylscopolaminbromid
- Natriumdeoxycholat
- Oxotremorin M
- Trizma – Base
- Trizma – Hydrochlorid (TRIS-HCl)

Prof. Ammer (Veterinärpharmakologie München):

- Antikörper: Anti-G_{v0}-Protein

3.2.8 Einmalartikel

- Eppendorfggefäße 1,5 und 2 ml: Eppendorf AG; Hamburg, D

- Falconröhrchen 50 ml: Greiner BIO-ONE GmbH; Frickenhausen, D
- Glasfaser Rundfilter GF 52, 25 mm: Whatman Schleicher & Schuell; Dassel, D
- Glasfaser Filter: Brandel Biomedical Research and Development Lab. Inc., Gaithersburg; USA
- Handschuhe Latex, ungepudert: Diagonal GmbH; Münster, D
- Handschuhe Nitril-blue: Diagonal GmbH; Münster, D
- Mini Vials B 5 ml: Carl Roth GmbH + Co.; Karlsruhe, D
- Mullkompressen: Wilh. Weisweiler GmbH & CoKG; Münster, D
- Pipettenspitzen: Carl Roth GmbH + Co.; Karlsruhe, D
- Polypropylenröhrchen 12 ml: Greiner BIO-ONE GmbH; Frickenhausen, D
- Protran® (Nitrocellulose Transfer Membran): Whatman, Schleicher & Schuell, Dassel, D

3.2.9 Geräte

- Beta-Counter Wallac 1409: Perkin Elmer Wallac GmbH; Freiburg, D
- Vakuumfiltrationsanlage, Cell-Harvester: Brandel Biomedical Research and Development Lab. Inc., Gaithersburg; USA)
- Elektrophorese Gelkammer + PowerPac Basic Power Supply: Bio-Rad Laboratories GmbH; München, D
- Elektrophorese Power Supply EPS 600 + Blotting-Kammer Multiphor II: Pharmacia: Amersham Pharmacia Biotech; Wien, AUT
- Eppendorf Zentrifuge 5403: Eppendorf AG; Hamburg, D
- Gamma-Counter Wallac WIZARD 1470: Perkin Elmer Wallac GmbH; Freiburg, D
- pH-Meter 761 Calimatic: Knick; Berlin, D
- Sampling Manifold (Filtertopf): Millipore; USA
- Schere, Pinzette, Skalpell: HEILAND VET GmbH & Co. KG; Hamburg, D
- Schüttler Polymax 1040: Heidolph Instruments GmbH; Schwabach, D
- Spectrophotometer DU® 640: Beckman Coulter, Inc.; Fullerton, USA
- Ultra-Turrax: Janke & Kunkel IKA Labortechnik; Staufen, D
- Ultrazentrifuge XL-70: Beckman Coulter, Inc.; Fullerton, USA
- Waage MC1 Analytic AC 210 S: Sartorius AG; Göttingen, D
- Waage MC1 Laboratory LC 620 P: Sartorius AG; Göttingen, D

- Wasserbad Jalubo SW23: Jalubo LABORTECHNIK GmbH; Seelbach, D
- Zentrifuge Sorvall Evolution RC: Thermo Electron; Langenselbold, D

4 ERGEBNISSE

4.1 Charakterisierung der muskarin-cholinergen Signaltransduktion im Respirationstrakt gesunder und RAO-erkrankter Pferde

Die im equinen Respirationstrakt dominant vorkommende M_2 -Rezeptorpopulation vermittelt ihr Signal über G_i -Proteine in das Zellinnere. Da die Annahme besteht, dass bei der RAO des Pferdes die M_2 - G_i -Protein-Interaktion verändert ist, wurden Versuche durchgeführt, um diese Interaktion zu charakterisieren.

Das Gewebe von drei Segmenten des equinen Respirationstrakts (Lungenparenchym, Bronchial- und Trachealepithel mit der darunter liegenden glatten Muskulatur) wurde mit folgenden Zielstellungen untersucht:

- die Etablierung einer ^{35}S -GTP γ S Radioligandenbindungsstudie zur Untersuchung der funktionellen Kopplung von hauptsächlich M_2 -Rezeptoren an G_i -Proteine und deren Aktivitätszustände
- die quantitative Bestimmung der G_i -Proteinmengen mittels Western-Blotting
- die Erfassung der $G_{i/0}$ -Protein-vermittelte Aktivierung der Adenylatzyklase

4.1.1 ^{35}S -GTP γ S Radioligandenbindungsstudie

Zur Bestimmung der quantitativen oder qualitativen Veränderungen der $G_{i/0}$ -Proteine wurden ^{35}S -GTP γ S-Radioligandenbindungsstudien an den Membranen der glatten Muskulatur von Trachea und Bronchien und dem Lungenparenchym des equinen Respirationstrakts durchgeführt. Diese Segmente gesunder und RAO-erkrankter Pferde wurden untersucht, um den „Feedback“-Mechanismus der M_2 -Rezeptor und deren G_i -Protein-Kopplung zu untersuchen. Da jedoch für eine funktionierende ^{35}S -GTP γ S-Bindungsstudie gewisse experimentelle Voraussetzungen erfüllt werden müssen, erfolgte in den ersten Versuchsreihen zunächst die Ermittlung der für die optimale Bindung notwendigen Substratkonzentrationen aus Konzentrations-Wirkungskurven. Dies wurde in Membranen der drei Segmente (Lungenparenchym, Bronchial- und Trachealepithel mit der darunter liegenden glatten Muskulatur) des equinen Respirationstrakts in Anwesenheit von Na^+ , Mg^{2+} und GDP bestimmt. Darüber hinaus wurde zur Ermittlung der basalen Bindungsdichte) und der Affinität der $G_{i\alpha}$ -Untereinheit für ^{35}S -GTP γ S die Stimulierbarkeit der ^{35}S -GTP γ S-Bindung für

verschiedene Muskarin-Rezeptor-Agonisten untersucht.

4.1.1.1 Messung der unspezifischen Bindung

Um eine Aussage über die spezifische Bindung bzw. die über Agonisten vermittelte/stimulierte Bindung von ^{35}S -GTP γ S treffen zu können, musste dessen unspezifische Bindung bestimmt werden. Die unspezifische Bindung gibt an, in welcher Menge alle im Versuchsansatz eingesetzten molekularen Strukturen mit dem Radioliganden ^{35}S -GTP γ S eine „unspezifische“ Bindung eingehen. Der Umfang der unspezifischen Bindung des Liganden ist nur dann messbar, wenn für die Bindung des Liganden keine freien Ligandenbindungsstellen mehr zu Verfügung stehen. Zu diesem Zweck wurde nicht radioaktiv-markiertes GTP γ S benötigt, das das radioaktiv-markierte GTP γ S (^{35}S -GTP γ S) aus seiner spezifischen Bindung, jedoch nicht aus seiner unspezifischen Bindung verdrängt. Das GTP γ S muss in relativ hoher Konzentration eingesetzt werden, um sicherzustellen, dass die vorhandenen ^{35}S -GTP γ S-Bindungsstellen ($G_{i\alpha}$) von ihm besetzt werden. Um aber den Einfluss von GTP γ S auf die funktionelle ^{35}S -GTP γ S-Bindung so gering wie möglich zu halten, ist es wichtig, eine Menge einzusetzen, die gerade ausreicht alle Bindungsstellen von ^{35}S -GTP γ S zu blockieren. Nach (GONZALES-MAESO et al. 2000) sind 10 $\mu\text{mol/l}$ GTP γ S geeignet, um den Anteil der unspezifischen Bindung der ^{35}S -GTP γ S-Bindung zu bestimmen.

Es wurde geprüft, welche Konzentration von GTP γ S (unmarkiertes) unter den gegebenen Versuchsbedingungen benötigt wird, um eine komplette Hemmung des ^{35}S -GTP γ S-Zugangs zu G_i / M_2 -Rezeptoren zu erreichen.

Eine Membransuspension aus jedem der drei Segmente des equinen Respirationstrakts wurde mit einer definierten Konzentration von ^{35}S -GTP γ S inkubiert und dessen Bindung durch steigende Konzentrationen von GTP γ S (10^{-15} bis 10^{-3}) gehemmt.

Das unmarkierte GTP γ S hemmte die ^{35}S -GTP γ S-Bindung mit einem monophasischen Verlauf der Verdrängungskurve und entsprechendem Hill-Koeffizienten (nH) von 0,84 in der Trachea, 0,69 in den Bronchien und 1,03 im Lungengewebe (Abb. 6). Die Konzentrationshemmungskurven von GTP γ S verliefen identisch monophasisch in allen drei Geweben.

Anhand der Ergebnisse dieser Versuche wurde für die nachfolgenden Versuchsreihen zur Bestimmung des unspezifischen Anteils der ^{35}S -GTP γ S-Bindung eine Konzentration von 10^{-5} mol/l GTP γ S festgelegt und routinemäßig eingesetzt, weil ab der gewählten Konzentration die ^{35}S -

GTP γ S-Bindung an G-Proteine fast vollständig blockiert wird und davon auszugehen ist, dass der gemessene „Rest“ unspezifisch ist.

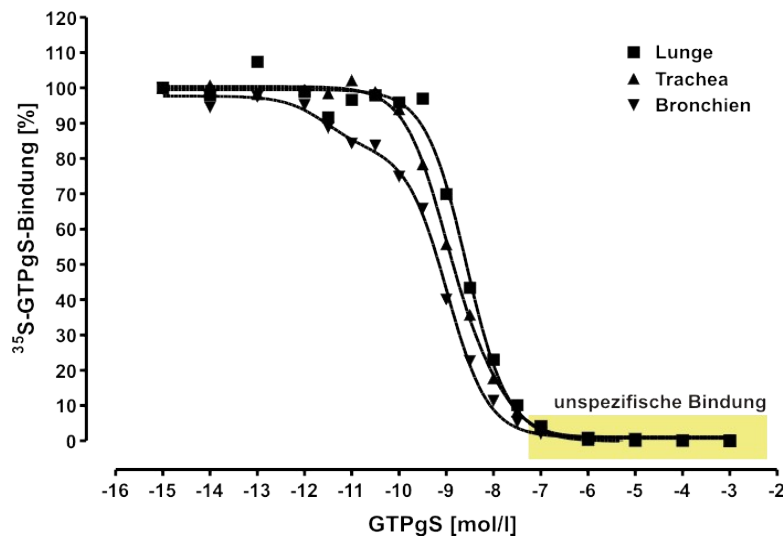


Abbildung 6: Konzentrationsabhängige Hemmung der ³⁵S-GTP γ S-Bindung durch GTP γ S. Die hier gezeigten Daten sind Mittelwerte aus einer Doppelbestimmung an Membranen von Trachea, Bronchien und Lunge.

4.1.1.2 Natrium-, Magnesium- und GDP-abhängige Stimulation der ³⁵S-GTP γ S-Bindung

Die Konzentrationen von Natriumionen, Magnesiumionen und GDP im Versuchsansatz sind die entscheidenden Faktoren für eine funktionierende ³⁵S-GTP γ S-Bindungsstudie. Die Beeinflussung der ³⁵S-GTP γ S-Bindung fällt in verschiedenen Geweben aufgrund ungleicher Rezeptordichte bzw. Rezeptorausstattung und ungleicher G-Protein-Exprimierung bzw. -Ausstattung unterschiedlich aus. Deshalb ist es zwingend erforderlich zunächst die optimalen Na⁺, Mg²⁺- und GDP-Konzentrationen für ein zu untersuchendes Gewebe festzulegen.

Natriumionen

Durch die Anwesenheit von Natriumionen (Na⁺ in Form von NaCl) verbessert sich das messbare, durch den Agonisten vermittelte Signal im Verhältnis zur Basalbindung.

Deshalb wurde der konzentrationsabhängige Einfluss von NaCl auf die unstimulierte (Basalbindung) und die stimulierte (1 mmol/l Oxotremorin M) ³⁵S-GTP γ S-Bindung gemessen.

ERGEBNISSE

In allen untersuchten Geweben/Segmenten hemmt NaCl die Basalbindung und die stimulierte ^{35}S -GTP γ S-Bindung mit zunehmender Konzentration (Abb. 7).

Die aus der Differenz zwischen Basalbindung und der Oxotremorin M-stimulierter ^{35}S -GTP γ S-Bindung berechnete relative Stimulation zeigte jedoch, dass diese mit zunehmender NaCl-Konzentration segmentabhängig (zumindest in der Membran von Trachea und Bronchien) steigt (Abb. 7 A und B). Die maximale relative Stimulation der ^{35}S -GTP γ S-Bindung wurde allerdings in beiden Segmenten bei einer NaCl-Konzentration von 200 mmol/l erreicht, die wiederum nach weiterer Konzentrationszunahme abfiel. In der Membran von Trachea erhöhte sich die relative Stimulation von ca. 35% (bei 1 mmol/l NaCl) auf ca. 75% (bei 200 mmol/l NaCl) (Abb. 7A) und in der Membran von den Bronchien von ca. 1% (bei 1 mmol/l NaCl) auf ca. 88% (bei 200 mmol/l NaCl) (Abb. 7B). An Membranen des Lungenparenchyms war es nicht möglich eine NaCl-abhängige Stimulation der ^{35}S -GTP γ S-Bindung zu messen (Abb. 7C).

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wurde 200 mmol/l als optimale NaCl-Konzentration in weiteren ^{35}S -GTP γ S Radioligandenbindungsstudien verwendet.

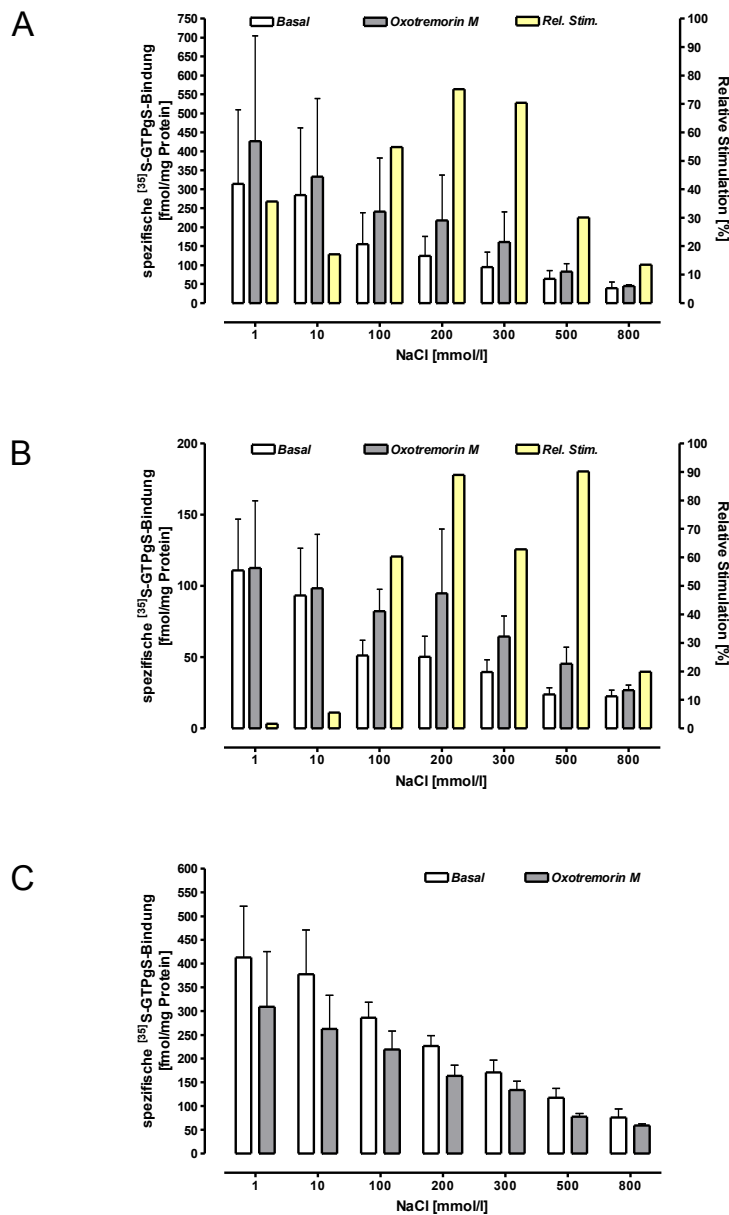


Abbildung 7: Konzentrationsabhängiger Einfluss von Na⁺ (NaCl) auf die basale und Agonisten-stimulierte ³⁵S-GTPγS-Bindung. Die ³⁵S-GTPγS-Bindung wurde an Membranen von Trachea (A), Bronchien (B) und Lunge (C) in An- und Abwesenheit von Oxotremorin M (1 mmol/l) durchgeführt. Jeder Versuchsansatz enthielt 10 μg Protein, 10 μmol/l GDP und wurde mit 0,5 nmol/l ³⁵S-GTPγS für 120 min bei 30°C inkubiert. Die linke Y-Achse zeigt die absolut gebundene Menge in fmol/mg Protein. Die relative Stimulation wurde aus der Differenz zwischen der Basalbindung und der von Oxotremorin M stimulierten Bindung berechnet und in Prozent (rechte Y-Achse) dargestellt (A, B). Die unspezifische Bindung wurde mit 10 μmol/l unmarkiertem GTPγS bestimmt. Die hier gezeigten Daten sind Mittelwerte (S.E.M.) aus je vier Versuchen mit jeweils Doppelbestimmung.

Magnesiumionen

Die Anwesenheit von Magnesiumionen (Mg^{2+} in Form von $MgCl_2$) erhöhte die Basalbindung von ^{35}S -GTP γ S, aber auch die Agonisten-stimulierte ^{35}S -GTP γ S-Bindung, wobei der Effekt auf die Agonisten-stimulierte ^{35}S -GTP γ S-Bindung größer ist.

Weil sich dieser Effekt positiv auf die Messung auswirkt, wurde die optimale Mg^{2+} -Konzentration für die untersuchten Gewebe des equinen Respirationstrakts ermittelt.

In Gegenwart zunehmender Mg^{2+} -Konzentrationen wurde die basale (ohne Agonist) und die Oxotremorin M-stimulierte (1 mmol/l) ^{35}S -GTP γ S-Bindung in Membranen aller drei Segmente des Respirationstrakts bestimmt. $MgCl_2$ veränderte die Basalbindung und die stimulierte ^{35}S -GTP γ S-Bindung mit biphasischem Verlauf (Abb. 8 A-C) – zunächst erhöhte $MgCl_2$ die Bindung von ^{35}S -GTP γ S konzentrationsabhängig, wobei das Maximum bei ca. 10 mmol/l erreicht wurde. Die weitere Mg^{2+} -Konzentrationszunahme ließ die Bindungskurve von ^{35}S -GTP γ S wieder abfallen. Um die optimale Mg^{2+} -Konzentration zu ermitteln, war es notwendig die Nettostimulation aus der Differenz der Agonisten-stimulierten ^{35}S -GTP γ S-Bindung und der Basalbindung zu berechnen.

Die optimale Mg^{2+} -Konzentration – in Tab. 9 dargestellt –, die das durch Oxotremorin M stimulierte Signal der ^{35}S -GTP γ S-Bindung verbesserte, lag in allen drei untersuchten Segmenten des Respirationstrakts bei 10 mmol/l. Folglich wurde diese Konzentration in allen weiteren Versuchsansätzen eingesetzt.

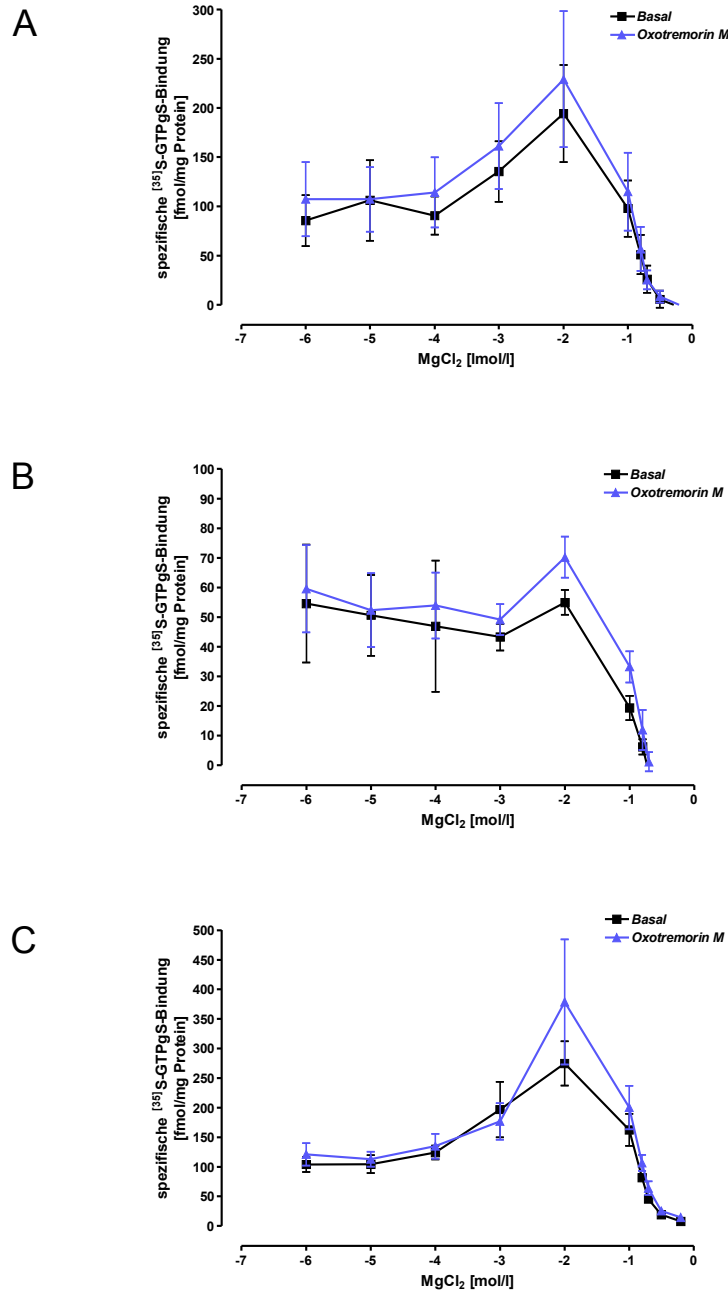


Abbildung 8: Konzentrationsabhängiger Einfluss von Mg²⁺ (MgCl₂) auf die basale und Agonisten-stimulierte ³⁵S-GTPγS-Bindung. Die ³⁵S-GTPγS-Bindung wurde an Membranen von Trachea (A), Bronchien (B) und Lunge (C) in An- und Abwesenheit von Oxotremorin M (1 mmol/l) durchgeführt. Jeder Versuchsansatz enthielt 10 µg Protein, 10 µmol/l GDP und wurde mit 0,5 nmol/l ³⁵S-GTPγS für 120 min bei 30°C inkubiert. Die unspezifische Bindung wurde mit 10 µmol/l unmarkiertem GTPγS bestimmt. Die hier gezeigten Daten sind Mittelwerte (S.E.M.) aus je vier Versuchen mit jeweils Doppelbestimmung.

Tabelle 9: Basalbindung und Agonisten-stimulierte ³⁵S-GTPγS-Bindung in Anwesenheit von MgCl₂

MgCl ₂	³⁵ S-GTPγS [fmol/mg]			³⁵ S-GTPγS [fmol/mg]			Differenz Basal/ OxoM
	Basal			Oxotremorin M			
	100 μmol/l	10 mmol/l	800 mmol/l	100 μmol/l	10 mmol/l	800 mmol/l	10 mmol/l
Trachea	90,67	194,37	0	114,31	229,29	0	34,92
Bronchien	46,96	54,93	0	53,93	70,22	0	15,29
Lunge	124,25	274,81	7,93	135,09	378,71	14,62	103,9

Guanosindiphosphat (GDP)

Die Zugabe von GDP verringerte die Basalbindung im Versuchsansatz durch Bindung an den Bindungsstellen aller Gα-Untereinheiten, weil hierdurch die spontane Aktivierung von G-Protein-Zyklen verhindert wird. Da die Basalbindung aus der spontanen Kopplung verschiedenster G-Protein-gekoppelter Rezeptoren mit den G-Proteinen besteht, ist der Einsatz einer optimalen GDP-Konzentration zwingend erforderlich, um die spontanen/unspezifischen Kopplungen und G-Protein-Zyklen soweit zu unterdrücken, dass das durch den Agonisten-vermittelte Signal messbar wird. Wie auch der Einfluss von Na⁺ und Mg²⁺ fällt der Einfluss von GDP in verschiedenen Geweben unterschiedlich stark aus. Somit muss für jeden untersuchten Gewebetyp eine optimale GDP-Konzentration im Versuchsansatz ermittelt werden.

In der Trachea hemmte GDP die Basalbindung von ³⁵S-GTPγS mit einem Hill-Koeffizienten (nH) von 0,70 und einem IC₅₀-Wert von 1,82⁻⁷ mol/l (Abb. 9). Der nH-Wert der Oxotremorin M-stimulierten ³⁵S-GTPγS-Bindung betrug 0,54 mit einem etwas höheren IC₅₀-Wert (2,27⁻⁷ mol/l) als der IC₅₀-Wert der Basalbindung. In den Bronchien betrug der nH-Wert für die Hemmung der Basalbindung durch GDP 0,81 und der IC₅₀-Wert 7,94⁻⁸ mol/l. Der Wert für den nH-Wert betrug für die mit Oxotremorin M stimulierte ³⁵S-GTPγS-Bindung 0,73 und der IC₅₀-Wert lag mit 8,22⁻⁸ mol/l im Vergleich zur Basalbindung etwas höher (Abb. 10). Im Lungenparenchym betrug der nH-Wert jeweils 0,68. Der IC₅₀-Wert war in der mit Oxotremorin M-stimulierten Versuchsreihe etwas höher (2,7⁻⁸ mol/l) als in der Versuchsreihe der Basalbindung (2,22⁻⁸ mol/l) (Abb. 11).

Entscheidend für die Festlegung der optimalen GDP-Konzentration ist die Berechnung (siehe Kapitel 3.2.5.1) der relativen Stimulation (eingefügte Abbildung („Inset“) in Abb. 9-11). In der

Lunge konnte jedoch kein Anstieg der relativen Stimulation beobachtet werden („Inset“ Abb. 11). Im Gegensatz hierzu stieg die relative Stimulation ab einer GDP-Konzentration von 10^{-7} mol/l in Trachea und Bronchien an. Der maximale Wert der relativen Stimulation wird in diesen Geweben bei einer GDP-Konzentration von 10^{-5} mol/l (10 μ mol/l) erreicht und betrug in der Trachea 83,96% und in den Bronchien 65,57% („Inset“ Abb. 9 und 10). Folglich konnte bei einer GDP-Konzentration von 10 μ mol/l das durch einen Agonisten ausgelöste Signal am deutlichsten gemessen werden. Deshalb wurde diese Konzentration in allen weiteren 35 S-GTP γ S-Bindungsstudien verwendet.

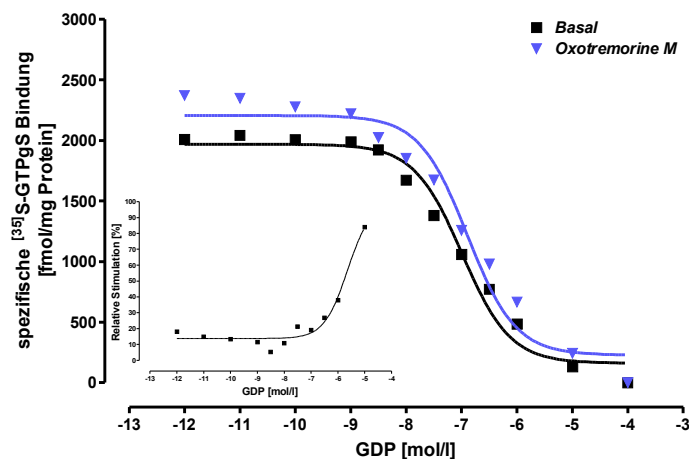


Abbildung 9: GDP-abhängige Hemmung der basalen und Agonisten-stimulierten 35 S-GTP γ S-Bindung – Trachea.

Die 35 S-GTP γ S-Bindung wurde an der Membran von Trachea in An- und Abwesenheit von Oxotremorin M (1 mmol/l) durchgeführt. Jeder Versuchsansatz enthielt 10 μ g Protein und wurde mit 0,5 nmol/l 35 S-GTP γ S für 120 min bei 30°C inkubiert. Das „Inset“ zeigt die relative Stimulation, die aus der Differenz zwischen Basalbindung und stimulierter Bindung berechnet wurde. Die unspezifische Bindung wurde mit 10 μ mol/l unmarkiertem GTP γ S bestimmt. Die hier gezeigten Daten sind Mittelwerte aus je vier Versuchen mit jeweils Doppelbestimmung.

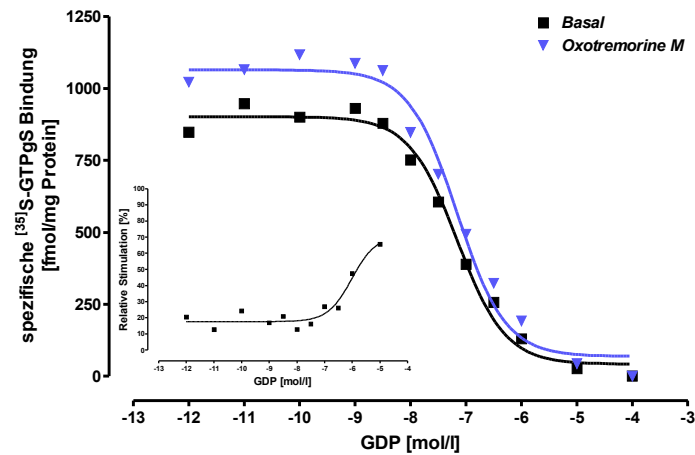


Abbildung 10: GDP-abhängige Hemmung der basalen und Agonisten-stimulierten ³⁵S-GTPγS-Bindung – Bronchien.
 Die ³⁵S-GTPγS-Bindung wurde an der Membran von Bronchien in An- und Abwesenheit von Oxotremorin M (1 mmol/l) durchgeführt. Jeder Versuchsansatz enthielt 10 µg Protein und wurde mit 0,5 nmol/l ³⁵S-GTPγS für 120 min bei 30°C inkubiert. Das „Inset“ zeigt die relative Stimulation, die aus der Differenz zwischen Basalbindung und stimulierter Bindung berechnet wurde. Die unspezifische Bindung wurde mit 10 µmol/l unmarkiertem GTPγS bestimmt. Die hier gezeigten Daten sind Mittelwerte aus je vier Versuchen mit jeweils Doppelbestimmung.

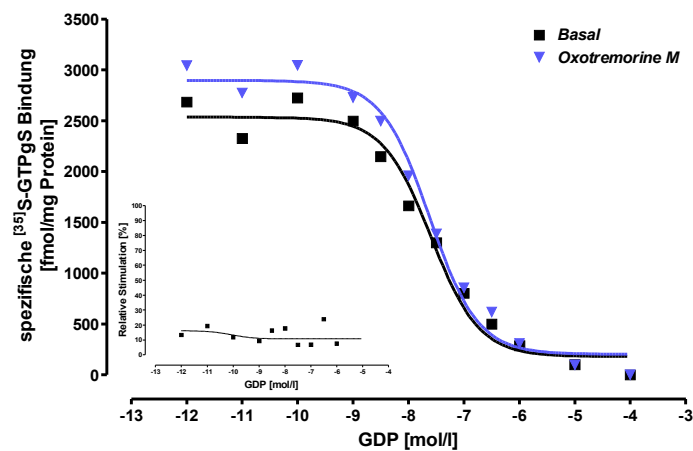


Abbildung 11: GDP-abhängige Hemmung der basalen und Agonistenstimulierten ^{35}S -GTP γ S-Bindung – Lunge. Die ^{35}S -GTP γ S-Bindung wurde an der Membran vom Lungenparenchym in An- und Abwesenheit von Oxotremorin M (1 mmol/l) durchgeführt. Jeder Versuchsansatz enthielt 10 μg Protein und wurde mit 0,5 nmol/l ^{35}S -GTP γ S für 120 min bei 30°C inkubiert. Das „Inset“ zeigt die relative Stimulation, die aus der Differenz zwischen Basalbindung und stimulierter Bindung berechnet wurde. Die unspezifische Bindung wurde mit 10 $\mu\text{mol/l}$ unmarkiertem GTP γ S bestimmt. Die hier gezeigten Daten sind Mittelwerte aus je vier Versuchen mit jeweils Doppelbestimmung.

4.1.1.3 Zeitabhängige ^{35}S -GTP γ S-Bindung

Um die für die Bindung optimale Inkubationszeit festzulegen, wurde die ^{35}S -GTP γ S-Bindung in Abhängigkeit von verschiedenen Inkubationszeiten gemessen. Zum einen wurde die ^{35}S -GTP γ S-Bindung in Anwesenheit, zum anderen in Abwesenheit von Carbachol (1 mmol/l) bestimmt. Aus der Berechnung der relativen Stimulation sollte sich ein durch den Agonisten optimal vermitteltes Signal ergeben, um dieses in weiteren Versuchen möglichst gut zu erfassen.

Die Reaktion in den entsprechenden Versuchsansätzen wurde nach den jeweiligen Inkubationszeiten (15 min bis 180 min) mit kaltem Waschpuffer gestoppt und filtriert (siehe Kapitel 3.2.5.1 und 3.2.5.1.4).

Abbildung 12 zeigt einen deutlichen, zeitabhängigen Anstieg der Basalbindung und der Agonistenstimulierten ^{35}S -GTP γ S-Bindung, wobei die Bindungsmenge der mit Carbachol stimulierten Versuchsansätze bei allen Inkubationszeiten höher lag. Ein Sättigungsbereich war selbst nach einer Inkubationszeit von 180 min nicht erreicht. Jedoch zeigte die Berechnung der relativen Stimulation

ERGEBNISSE

einen Anstieg bis zu einer Inkubationszeit von 120 min (78,88%) und bei anschließender Verlängerung der Inkubationszeit einen Abfall der relativen Stimulation (Abb. 12, „Inset“).

Da in weiteren ^{35}S -GTP γ S-Bindungsstudien die relative Stimulation möglichst gut erfasst werden soll – um Rückschlüsse auf die M_2 -G $_i$ -Protein-Interaktion zu ziehen – wurde nach den vorliegenden Versuchsdaten eine Inkubationszeit von 120 min in allen weiteren Versuchen routinemäßig verwendet.

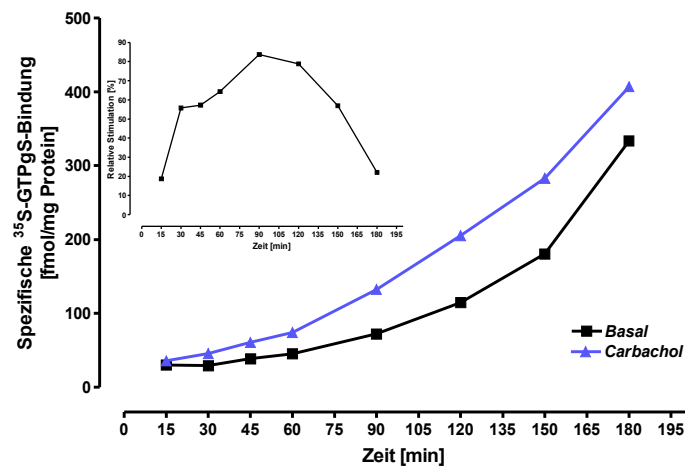


Abbildung 12: Zeitabhängige, basale und Agonisten-vermittelte ^{35}S -GTP γ S-Bindungsmenge.

Die ^{35}S -GTP γ S-Bindung wurde an der Membran von Trachea in An- und Abwesenheit von Carbachol (1 mmol/l) durchgeführt. Die unspezifische Bindung wurde mit 10 $\mu\text{mol/l}$ unmarkiertem GTP γ S bestimmt. Das „Inset“ zeigt die relative Stimulation, die aus Differenz zwischen der Basalbindung und der Carbachol-stimulierten Bindung berechnet wurde. Die hier gezeigten Daten sind Mittelwerte aus einem Versuch mit Dreifachbestimmung.

4.1.1.4 Charakterisierung der Muskarin-Rezeptor-G-Protein-Interaktion im equinen Respirationstrakt

4.1.1.4.1 Agonisten-induzierte Stimulierbarkeit der ^{35}S -GTP γ S-Bindung

Nach Festlegung der optimalen Versuchsbedingungen (Abschnitt 4.1.1.1 bis 4.1.1.3) wurde der Frage nachgegangen, inwieweit die basale Bindungsaktivität bzw. -affinität der $G_i\alpha$ -Untereinheiten für ^{35}S -GTP γ S durch die Bindung von unterschiedlichen Muskarinrezeptor-Agonisten an muskarin-cholinerge Rezeptoren in den drei Segmenten des equinen Respirationstrakts stimulierbar ist.

Grundlage hierfür ist die Abhängigkeit der ^{35}S -GTP γ S-Bindung von der Muskarinrezeptordichte.

Durch den Muskarinrezeptor-Antagonisten Atropin wurde außerdem versucht, die Agonisten-stimulierte ^{35}S -GTP γ S-Bindung zu hemmen.

Die Bindung der Agonisten an muskarin-cholinerge Rezeptoren (M_2) aktiviert die G-Proteine (G_i), die nachfolgend (im Gegensatz zum Ruhezustand/Basalzustand) verstärkt GDP durch das radioaktiv markierte GTP γ S (^{35}S -GTP γ S) austauschen.

Die Anwesenheit der Agonisten Oxotremorin M, Acetylcholin und Carbachol führte segmentabhängig zu einer Zunahme der E_{\max} -Werte. Wie die Abbildung 13 (A-C) zeigt, stieg die Stimulierbarkeit der ^{35}S -GTP γ S-Bindung mit zunehmender Konzentrationen der Agonisten an, wobei der Verlauf der Konzentrations-Wirkungskurven der untersuchten Agonisten einen Hinweis auf unterschiedliche Wirkungsstärken geben. Die E_{\max} -Werte in der Trachea lagen für Oxotremorin M, Acetylcholin und Carbachol jeweils bei 244,22 fmol/mg Protein, 192,15 fmol/mg Protein und 149,44 fmol/mg Protein; in den Bronchien bei 319,28 fmol/mg Protein, 231,77 fmol/mg Protein und 222,15 fmol/mg Protein; im Lungenparenchym bei 236,72 fmol/mg Protein, 215,75 fmol/mg Protein und 225,13 fmol/mg Protein (Abb. 13 A-C). In allen drei Segmenten konnte die Agonisten-vermittelte Stimulation der ^{35}S -GTP γ S-Bindung durch den Antagonisten Atropin (10 $\mu\text{mol/l}$) gehemmt werden (Abb. 13 A), was darauf hinweist, dass die Agonisten-induzierte Steigerung der ^{35}S -GTP γ S-Bindung als Ausdruck der Effizienz der Agonisten zur Muskarinrezeptor-induzierten Aktivierung der G-Proteine angesehen werden kann. Die niedrigste Konzentration des Agonisten (fmol/mg Protein) wurde 0% gleichgesetzt und der konzentrationsabhängige Anstieg der Agonisten-stimulierten ^{35}S -GTP γ S-Bindungsmenge wurde zu diesem Wert in Relation gesetzt. Um die Effizienz der Agonisten-vermittelten G-Protein-Aktivierung zu beschreiben, wurden mittels nicht-linearer Regressionsanalyse und der Berechnung der Nettostimulation (Prozent Stimulation über der Basalbindung) Konzentrations-Wirkungs-Kurven erstellt (Abb 14).

Oxotremorin M erhöhte mit steigender Konzentration die ^{35}S -GTP γ S-Kontrollbindung in den Bronchien auf ca. 126% und in der Trachea auf ca. 104% (Abb. 14 A, B). Die maximale Stimulation der ^{35}S -GTP γ S-Bindung wurde bei einer Konzentration des Agonisten über 10 $\mu\text{mol/l}$ erreicht. Einen ähnlichen Verlauf der Konzentrations-Wirkungs-Kurve konnte in beiden Geweben für Carbachol und Acetylcholin beobachtet werden, jedoch mit einem geringeren Ausmaß der Stimulation der ^{35}S -GTP γ S-Bindung, nämlich 62% in den Bronchien und 54% in der Trachea (Carbachol) bzw. 60% in den Bronchien und 53% in der Trachea (Acetylcholin) (Abb. 14 A, B). Diese, vom Agonisten abhängige Stimulation der G_i -Protein-Aktivierung, konnte mit dem nicht-

ERGEBNISSE

selektiven Muskarinrezeptorantagonisten Atropin gehemmt werden, was die Beteiligung von muskarin-cholineren Rezeptoren bestätigt (Abb. 14 A). In der Lunge konnte nur in Anwesenheit von Oxotremorin M eine nennenswerte Nettostimulation (41%) der ^{35}S -GTP γ S-Bindung gemessen werden (Abb. 14 C).

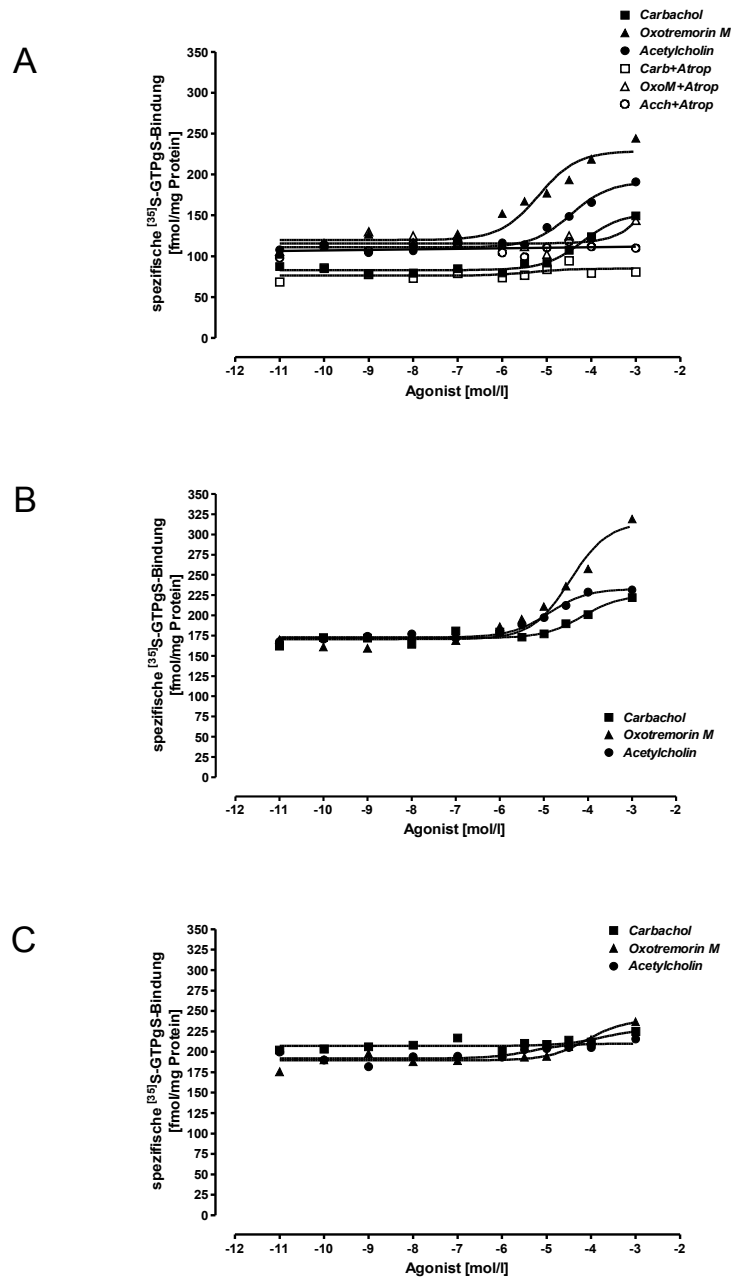


Abbildung 13: Konzentrationsabhängige, Agonisten-induzierte ³⁵S-GTPγS-Bindung.

Die ³⁵S-GTPγS-Bindung wurde jeweils in der Trachea (A), den Bronchien (B) und im Lungenparenchym (C) mit Carbachol, Oxotremorin M und Acetylcholin stimuliert. Die Hemmung der Stimulation mit Atropin (10 μmol/l) wurde repräsentativ für die Trachea (A) dargestellt. Jeder Versuchsansatz enthielt 10 μg Protein, 10 μmol/l GDP und wurde mit 0,5 nmol/l ³⁵S-GTPγS für 120 min bei 30°C inkubiert. Die unspezifische Bindung wurde mit 10 μmol/l unmarkiertem GTPγS bestimmt. Die hier gezeigten Daten sind Mittelwerte aus je acht Versuchen mit jeweils Doppelbestimmung.

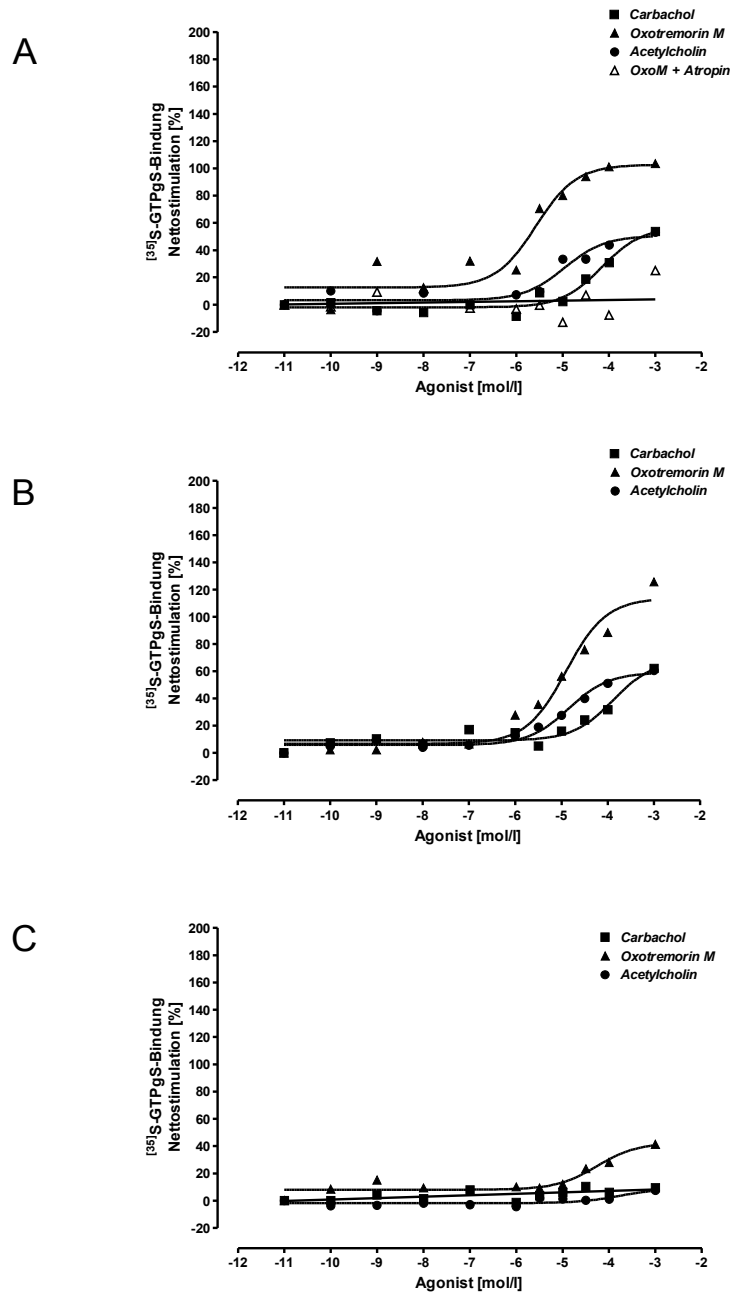


Abbildung 14: Nettostimulation der Agonisten-induzierten ^{35}S -GTP γ S-Bindung.

Die ^{35}S -GTP γ S-Bindung wurde jeweils in der Trachea (A), den Bronchien (B) und im Lungenparenchym (C) mit Carbachol, Oxotremorin M und Acetylcholin stimuliert. Jeder Versuchsansatz enthielt 10 μg Protein, 10 $\mu\text{mol/l}$ GDP und wurde mit 0,5 nmol/l ^{35}S -GTP γ S für 120 min bei 30°C inkubiert. Die unspezifische Bindung wurde mit 10 $\mu\text{mol/l}$ unmarkiertem GTP γ S bestimmt. Die hier gezeigten Daten sind Mittelwerte aus je acht Versuchen mit jeweils Doppelbestimmung.

4.1.1.4.2 N-Ethylmaleimid- und Pertussistoxin-vermittelte Modulation der Agonisten-induzierten Erhöhung der ³⁵S-GTPγS-Bindung

Um weitere Informationen über die M₂-Rezeptor-G_i-Protein-Interaktion im Respirationstrakt des Pferdes nach Stimulation des Rezeptors mit einem Agonisten zu erhalten, wurden N-Ethylmaleimid (NEM) und Pertussistoxin (PTX) eingesetzt, die vorzugsweise G_i-Proteine von deren Rezeptoren entkoppeln (Kapitel 2.2.6). Die Folge wäre eine Verringerung der Agonisten-stimulierten ³⁵S-GTPγS-Bindung in Anwesenheit von NEM oder PTX. Somit können über die gemessene ³⁵S-GTPγS-Bindung Rückschlüsse auf die Funktionalität der M₂-Rezeptor-G_i-Protein-Interaktion gezogen werden.

Die Membranfraktion des Tracheal- und Bronchialepithels mit der darunter liegenden glatten Muskulatur und des Lungenparenchyms wurden mit NEM (100 μmol/l) bzw. PTX (1 μg/ml) vorinkubiert (siehe Kapitel 3.2.5.1.6). Anschließend wurde der konzentrationsabhängige Einfluss von Oxotremorin M auf die ³⁵S-GTPγS-Bindung bestimmt.

Die durch Oxotremorin M stimulierte ³⁵S-GTPγS-Bindung wurde durch Vorinkubation mit 100 μmol/l NEM in Membranen von Trachea, Bronchien und Lungenparenchym gehemmt (Abb. 15). Folglich deutet die Hemmung der ³⁵S-GTPγS-Bindung durch NEM auf eine Beteiligung von G_i-Proteinen hin.

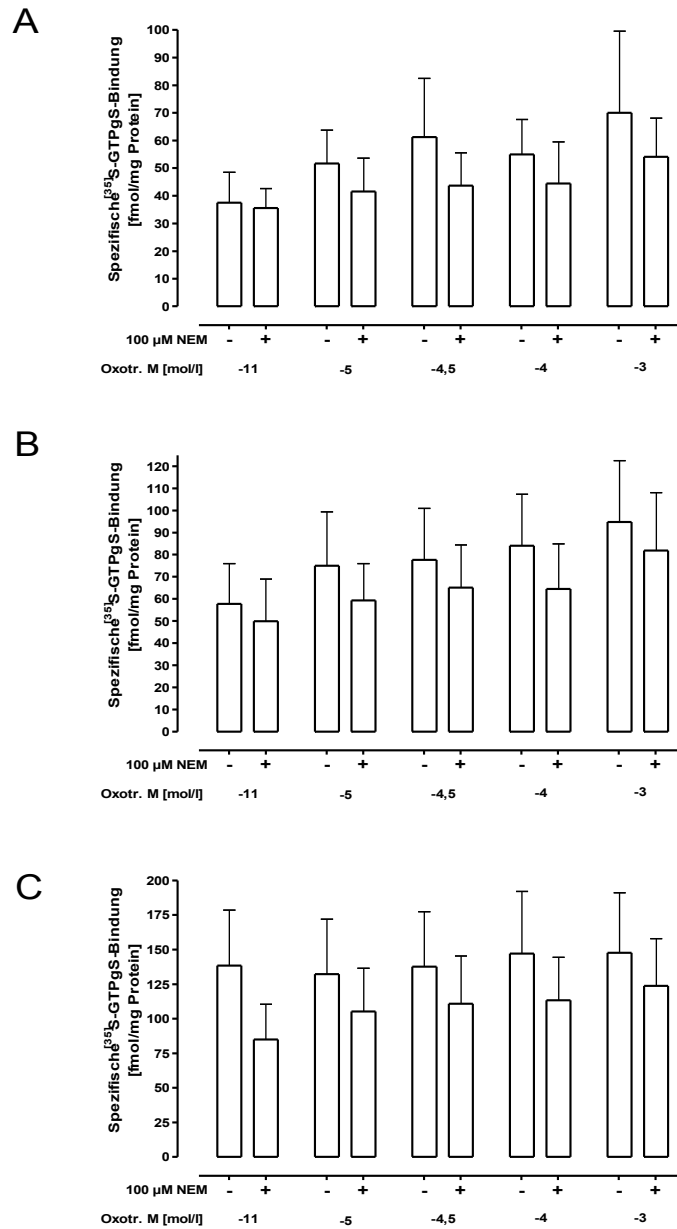


Abbildung 15: NEM-vermittelte Hemmung der Agonisten-stimulierten ³⁵S-GTPγS-Bindung.

In Gegenwart von 100 μmol/l NEM wurde die konzentrationsabhängige, durch Oxotremorin M stimulierte, ³⁵S-GTPγS-Bindung in der Trachea (A), den Bronchien (B) und im Lungengparenchym (C) gemessen. Jeder Versuchsansatz enthielt 10 μg Protein, 10 μmol/l GDP und wurde mit 0,5 nmol/l ³⁵S-GTPγS für 120 min bei 30°C inkubiert. Die unspezifische Bindung wurde mit 10 μmol/l unmarkiertem GTPγS bestimmt. Die hier gezeigten Daten sind Mittelwerte (S.E.M) von jeweils sechs Versuchen mit Doppelbestimmung.

Eine Vorinkubation der Gewebemembranen der zu untersuchenden Segmente mit 1 µg/ml PTX führte wie auch bei NEM zu einer Verringerung der mit Oxotremorin M stimulierten ³⁵S-GTPγS-Bindung (Abb. 16). Um die Hemmung zwischen den einzelnen Segmenten zu charakterisieren, wurde der E_{max}-Wert bei einer Konzentration von 10⁻³ Oxotremorin M in An- und Abwesenheit von PTX in Relation zueinander gesetzt. Der hemmende Effekt war am stärksten und zeigte tendenziell eine Signifikanz nur in Membranen der Trachea, gefolgt von den Bronchien und war am schwächsten in der Lunge (Tab. 10). Somit scheinen im Lungengewebe, aufgrund einer möglichen höheren G_i-Proteinmenge als im Vergleich zur Trachea und den Bronchien, in Anwesenheit von PTX immer noch genügend G_i-Proteine an die M₂-Rezeptoren gekoppelt zu sein.

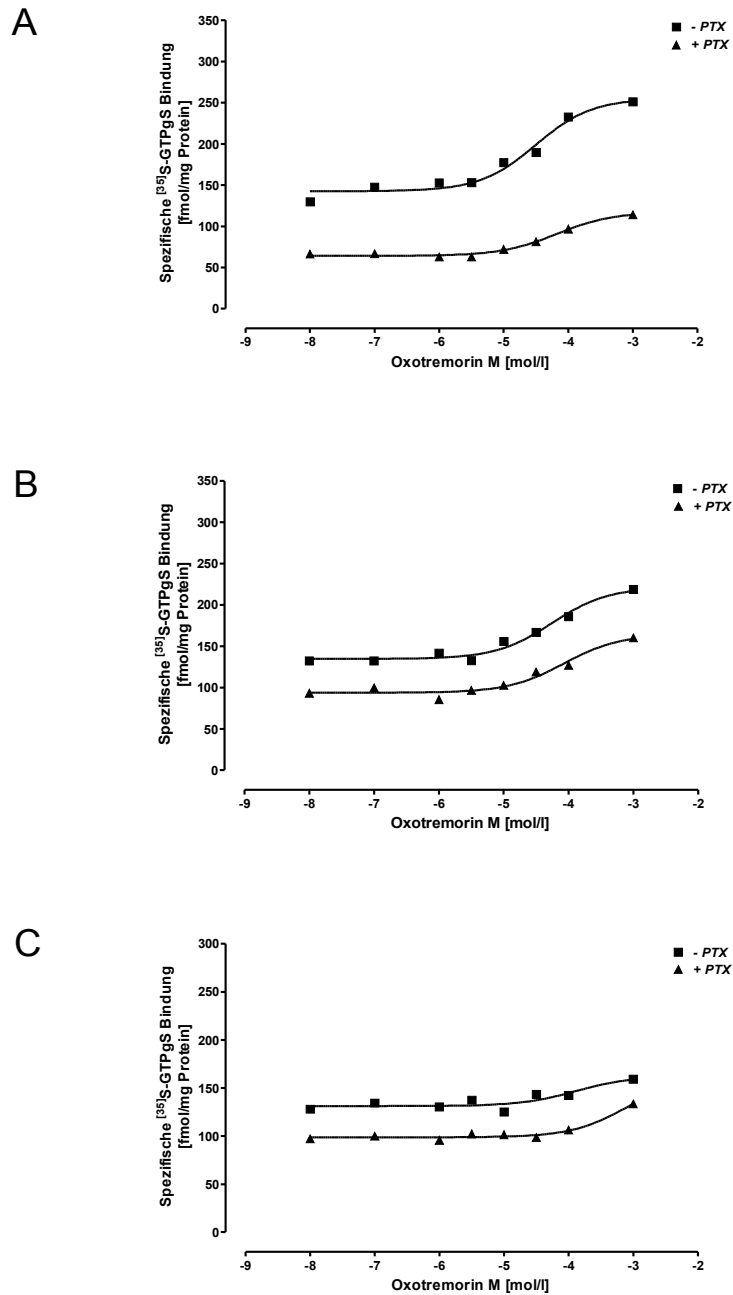


Abbildung 16: PTX-abhängige Hemmung der Agonisten-stimulierten ^{35}S -GTP γ S-Bindung.

Die ^{35}S -GTP γ S-Bindung wurde mit Oxotremorin M in Ab- (■) und Anwesenheit (▲) von PTX (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in Trachea (A), Bronchien (B) und Lunge (C) stimuliert. Jeder Versuchsansatz enthielt 10 μg Protein, 10 $\mu\text{mol}/\text{l}$ GDP und wurde mit 0,5 nmol/l ^{35}S -GTP γ S für 120 min bei 30°C inkubiert. Die unspezifische Bindung wurde mit 10 $\mu\text{mol}/\text{l}$ unmarkiertem GTP γ S bestimmt. Die hier gezeigten Daten sind Mittelwerte von jeweils vier Versuchen mit Doppelbestimmung.

Tabelle 10: Hemmung der ^{35}S -GTP γ S-Bindung mit PTX. Die E_{max} -Werte aus Abb. 16 wurden in Prozent umgerechnet und in Relation zueinander gesetzt (n = 4).

	Oxotremorin M (10^{-3} mol/l)				
	- PTX		+ PTX		-PTX vs. +PTX (P)
	[fmol/ mg Protein]	Stimulation [%]	[fmol/ mg Protein]	Stimulation [%]	
Trachea	251,38	100	113,93	45,32	0,056
Bronchien	218,83	100	160,26	73,23	n.s.
Lunge	159,16	100	133,56	83,92	n.s.

4.1.1.5 Charakterisierung der Muskarin-Rezeptor-G-Protein-Interaktion im equinen Respirationstrakt bei der RAO

Da die Annahme besteht, dass die cholinerge/parasymphatische Aktivität bei obstruktiven Atemerkrankungen (Asthma des Menschen/RAO des Pferdes) übermäßig erhöht sein könnte, wurde die Aktivierung der muskarin-cholinergen Rezeptoren und deren Interaktion mit entsprechenden G-Proteinen im Sinne der Signalübertragung untersucht. Besondere Aufmerksamkeit richtete sich in diesem Abschnitt vor allem auf die Bestimmung quantitativer und qualitativer Veränderungen der G_i -Proteine und deren Interaktion mit M_2 -Rezeptoren in den Segmenten des Respirationstrakts bei RAO-erkrankten Pferden. Um dies zu realisieren, wurden ebenfalls ^{35}S -GTP γ S-Bindungsstudien, die die quantitative Bestimmung der oben genannten Interaktionen ermöglichten, an den α -Untereinheiten der G_i -Proteine durchgeführt. Damit sollte überprüft werden, ob bei unveränderter Zahl der muskarin-cholinergen Rezeptoren die Menge/Anzahl der G_i -Proteine durch die chronische obstruktive Erkrankung der Atemwege des Pferdes (RAO) zunehmen könnte. Diese Veränderung könnte die funktionelle Kopplung insbesondere des M_2 -Rezeptors an G_i -Proteine steigern und somit die antagonisierende Wirkung auf relaxierende Stimuli (β_2 -Adrenozeptoren) verstärken. Darüber hinaus sollte in Segmenten des Respirationstrakts von RAO-erkrankten Pferden, nach spezifischer Hemmung der heterotrimeren G_i -Proteine mit Pertussistoxin (PTX) bzw. N-Ethylmaleimid (NEM), das Ausmaß dieser Proteinaktivierung untersucht werden.

4.1.1.5.1 Agonisten-induzierte Stimulierbarkeit der ^{35}S -GTP γ S-Bindung bei RAO-erkrankten Pferden

Wie erwartet führten alle untersuchten Agonisten (Carbachol, Oxotremorin M, Acetylcholin) in den

untersuchten Segmenten RAO-erkrankter Pferde ebenfalls konzentrationsabhängig zur Zunahme der Konzentrations-Wirkungs-Kurve und somit zur Zunahme der M_2 -Rezeptor-vermittelten G_i -Protein-Aktivierung (Abb. 17 A-C). Wie im Gewebe von gesunden Pferden erhöhten alle Agonisten ab einer Konzentration von $10 \mu\text{mol/l}$ die absolute $^{35}\text{S-GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsmenge in Membranen von Trachea und Bronchien (Abb. 17 A, B). Im Lungenparenchym von RAO-erkrankten Pferden war Oxotremorin M in der Lage, die absolute $^{35}\text{S-GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsmenge deutlich zu erhöhen (Abb. 17 C), was in Membranen der Lunge von gesunden Pferden nicht beobachtet werden konnte (Abb. 13 C). Die E_{max} -Werte der absoluten $^{35}\text{S-GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsmenge lagen in der Trachea für Oxotremorin M, Carbachol und Acetylcholin bei jeweils $586,38 \text{ fmol/mg Protein}$, $466,33 \text{ fmol/mg Protein}$ und $467,86 \text{ fmol/mg Protein}$; in den Bronchien bei $292,42 \text{ fmol/mg Protein}$, $195,97 \text{ fmol/mg Protein}$ und $215,87 \text{ fmol/mg Protein}$ und im Lungenparenchym bei $1005,24 \text{ fmol/mg Protein}$, $555,35 \text{ fmol/mg Protein}$ und $524,73 \text{ fmol/mg Protein}$. Verglichen mit den E_{max} -Werten gesunder Pferde (Kapitel 4.1.1.4.1) war eine Erhöhung der absoluten $^{35}\text{S-GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsmenge in Membranen von Trachea und Lunge bei RAO-erkrankten Pferden festzustellen.

Um die Effizienz zu vergleichen, mit der die Agonisten die M_2 -Rezeptor-gekoppelten G_i -Proteine aktivieren, wurde wie in Kapitel 4.1.1.4.1 die Nettostimulation berechnet. Der effizienteste Agonist war wie auch im gesunden Gewebe Oxotremorin M mit einer maximalen Nettostimulation von ca. 100% in der Trachea, ca. 141% in den Bronchien und 78% in der Lunge, gefolgt von Acetylcholin und Carbachol (Abb. 18). Der Vergleich der Nettostimulation zwischen gesunden und RAO-erkrankten Pferden zeigte für den effizientesten Agonisten Oxotremorin M eine Erhöhung der Nettostimulation in Membranen von Bronchien und Lunge RAO-erkrankter Pferde (Tab. 11), was auf eine Erhöhung der funktionellen M_2 - G_i -Protein-Interaktion bei erkrankten Pferden hinweist. Jedoch war nur der Wert in der Lunge statistisch signifikant ($P < 0,04$) (Tab. 11).

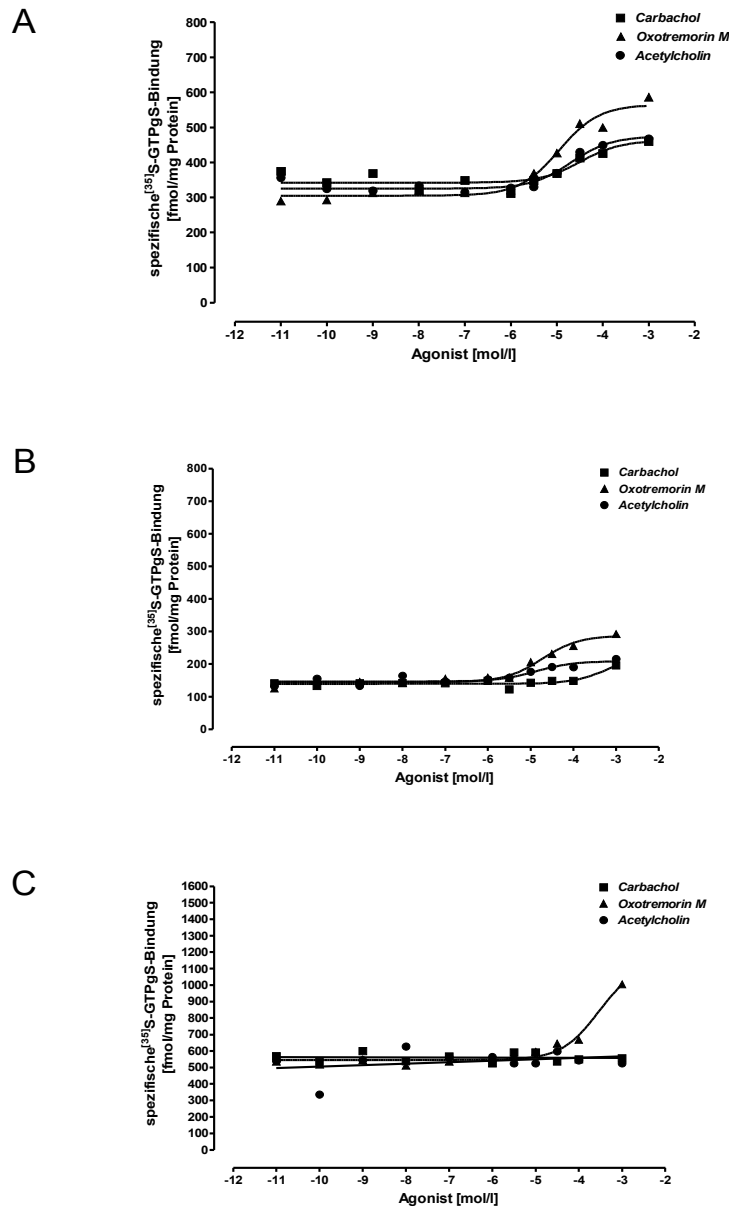


Abbildung 17: Konzentrationsabhängige, Agonisten-induzierte ³⁵S-GTPγS-Bindung bei RAO. Die ³⁵S-GTPγS-Bindung wurde mit Carbachol, Oxotremorin M und Acetylcholin in Trachea (A), Bronchien (B) und Lunge (C) durchgeführt. Jeder Versuchsansatz enthielt 10 µg Protein, 10 µmol/l GDP und wurde mit 0,5 nmol/l ³⁵S-GTPγS für 120 min bei 30°C inkubiert. Die unspezifische Bindung wurde mit 10 µmol/l unmarkiertem GTPγS bestimmt. Die hier gezeigten Daten sind Mittelwerte aus je fünf Versuchen mit Trachea und Bronchien und vier Versuchen mit Lunge – alle Gewebe mit jeweils Doppelbestimmung.

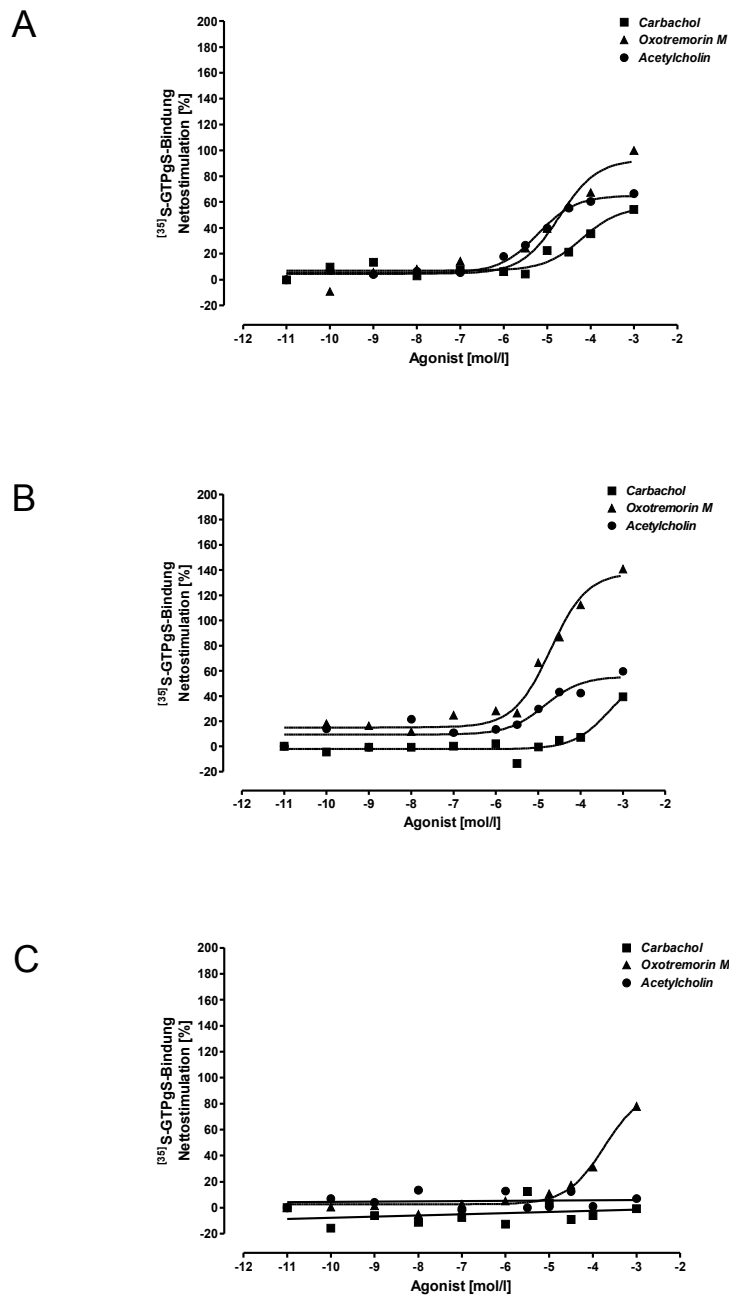


Abbildung 18: Agonisten-vermittelte Nettostimulation der ^{35}S -GTP γ S-Bindung bei RAO. Die ^{35}S -GTP γ S-Bindung wurde mit Carbachol, Oxotremorin M und Acetylcholin in Trachea (A), Bronchien (B) und Lunge (C) durchgeführt. Die Nettostimulation wurde aus den Werten der Abb. 17 berechnet. Jeder Versuchsansatz enthielt 10 μg Protein, 10 $\mu\text{mol/l}$ GDP und wurde mit 0,5 nmol/l ^{35}S -GTP γ S für 120 min bei 30°C inkubiert. Die unspezifische Bindung wurde mit 10 $\mu\text{mol/l}$ unmarkiertem GTP γ S bestimmt. Die hier gezeigten Daten sind Mittelwerte aus je fünf Versuchen mit Trachea und Bronchien und vier Versuchen mit Lunge – alle Gewebe mit jeweils Doppelbestimmung.

Tabelle 11: Agonisten-induzierte Nettostimulation der ^{35}S -GTP γ S-Bindung (E_{max}) in respiratorischen Segmenten gesunder und RAO-erkrankter Pferde

	Oxotremorin M (1 mmol/l)		Acetylcholin (1 mmol/l)		Carbachol (1 mmol/l)	
	Nettostimulation [%]		Nettostimulation [%]		Nettostimulation [%]	
	gesund	RAO	gesund	RAO	gesund	RAO
Trachea	104 ± 26	100 ± 26	53 ± 32	66 ± 21	54 ± 27	54 ± 23
Bronchien	126 ± 30	141 ± 39	60 ± 22	59 ± 24	62 ± 15	39 ± 14
Lunge	41 ± 8	78 ± 16*	0	0	0	0

* P = 0,04

4.1.1.5.2 N-Ethylmaleimid- und Pertussistoxin-vermittelte Modulation der Agonisten-induzierten Erhöhung der ^{35}S -GTP γ S-Bindung bei RAO-erkrankten Pferde

Wie bereits im Respirationstrakt von gesunden Pferden durchgeführt (s.o.) wurden die Membranfraktionen des Tracheal- und Bronchialepithels mit der darunter liegenden glatten Muskulatur und des Lungenparenchyms mit NEM (100 $\mu\text{mol/l}$) bzw. PTX (1 $\mu\text{g/ml}$) vorinkubiert und anschließend der konzentrationsabhängige Einfluss von Oxotremorin M auf die ^{35}S -GTP γ S-Bindung bestimmt. Ein Vergleich der gemessenen ^{35}S -GTP γ S-Bindung von RAO-erkrankten Pferden mit der ^{35}S -GTP γ S-Bindung von gesunden Pferden soll Unterschiede in der M_2 -Rezeptor- G_i -Protein-Interaktion zwischen beiden Versuchsgruppen aufdecken.

Sollte bei RAO-erkrankten Pferden tatsächlich eine Erhöhung der funktionellen M_2 - G_i -Protein-Interaktion, die durch eine Erhöhung der G_i -Protein-Expressionsmenge zu erklären wäre, vorhanden sein, würden gleiche Konzentrationen von NEM und PTX in Versuchsansätzen der RAO-erkrankten Tiere zu einer geringeren Hemmung der ^{35}S -GTP γ S-Bindung führen als in den Segmenten der gesunden Tiere.

100 $\mu\text{mol/l}$ NEM hemmen die Oxotremorin M stimulierte ^{35}S -GTP γ S-Bindung in Membranen von Trachea und Bronchien (Abb. 19 A, B). In Membranen vom Lungenparenchym ist zum einen keine Stimulation der ^{35}S -GTP γ S-Bindung mit Oxotremorin M zu beobachten und zum anderen ist keine Hemmung der ^{35}S -GTP γ S-Bindung mit NEM messbar (Abb. 19 C).

Die beobachtete Hemmung der ^{35}S -GTP γ S-Bindung in Trachea und Bronchien des Gewebes von

ERGEBNISSE

RAO-erkrankten Pferden scheint schwächer ausgeprägt zu sein als in Trachea und Bronchien von gesunden Pferden (Abb. 15). Im Gegensatz zu Messungen der ^{35}S -GTP γ S-Bindung in Anwesenheit von NEM im Lungenparenchym RAO-erkrankter Pferde, ist im Lungenparenchym gesunder Pferde eine Hemmung der ^{35}S -GTP γ S-Bindung mit NEM messbar (Abb. 15C, 19C).

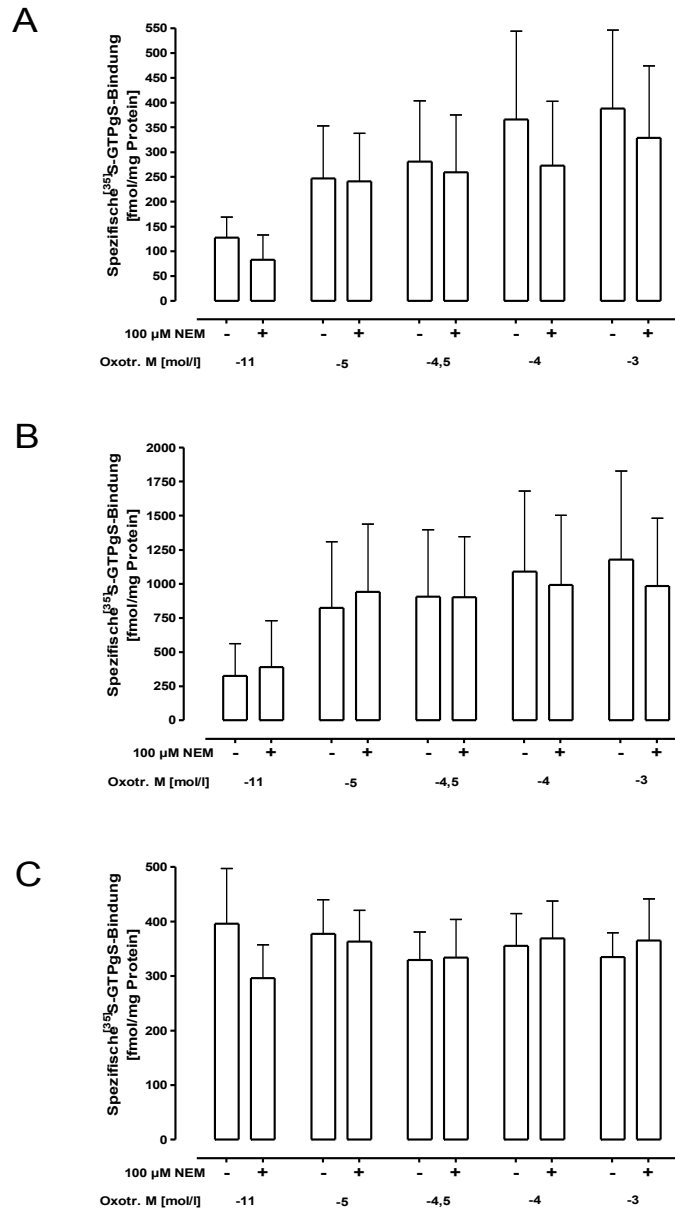


Abbildung 19: NEM-vermittelte Hemmung der Agonisten-stimulierten ³⁵S-GTPγS-Bindung bei RAO.

In Gegenwart von 100 μmol/l NEM wurde die konzentrationsabhängige, durch Oxotremorin M stimulierte, ³⁵S-GTPγS-Bindung in der Trachea (A), den Bronchien (B) und im Lungparenchym (C) gemessen. Jeder Versuchsansatz enthielt 10 μg Protein, 10 μmol/l GDP und wurde mit 0,5 nmol/l ³⁵S-GTPγS für 120 min bei 30°C inkubiert. Die unspezifische Bindung wurde mit 10 μmol/l unmarkiertem GTPγS bestimmt. Die hier gezeigten Daten sind Mittelwerte (S.E.M.) von jeweils vier Versuchen mit Doppelbestimmung.

ERGEBNISSE

Die in Abbildung 20 gezeigten E_{max} -Werte stammen aus der Oxotremorin M-stimulierten ^{35}S -GTP γ S-Bindung von Gewebemembranen RAO-erkrankter Pferde (Abb. 19) und gesunder Pferde (Abb. 15) in Anwesenheit von 100 $\mu\text{mol/l}$ NEM.

Die gemessene ^{35}S -GTP γ S-Bindung ist in allen drei untersuchten Segmenten von RAO-erkrankten Pferden signifikant höher als bei gesunden Pferden. In Membranen der Bronchien von RAO-erkrankten Pferden war die absolute ^{35}S -GTP γ S-Bindung am höchsten (Abb. 20). Die erhöhten Messwerte der ^{35}S -GTP γ S-Bindung im Gewebe von RAO-erkrankten Pferden lassen vermuten, dass die G_i -Proteinexpression im Respirationstrakt kranker Pferde erhöht ist.

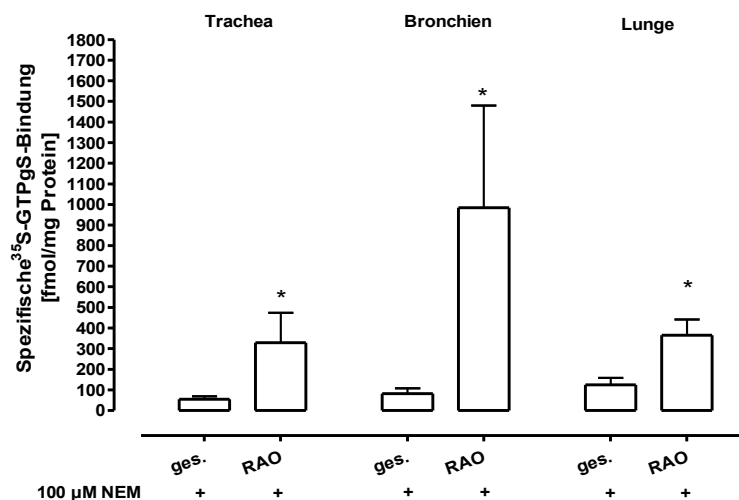


Abbildung 20: Vergleich der E_{max} -Werte der ^{35}S -GTP γ S-Bindung zwischen Kontrolle und RAO in Anwesenheit von NEM. Vergleichende Darstellung der E_{max} -Werte aus Abbildung 15 und 19 zwischen gesunden (ges.) und RAO-erkrankten Pferden (RAO). Jeder Versuchsansatz enthielt 10 μg Protein, 10 $\mu\text{mol/l}$ GDP und wurde mit 0,5 nmol/l ^{35}S -GTP γ S für 120 min bei 30°C inkubiert. Die unspezifische Bindung wurde mit 10 $\mu\text{mol/l}$ unmarkiertem GTP γ S bestimmt. Die hier gezeigten Daten sind Mittelwerte (S.E.M.) von jeweils vier Versuchen mit Doppelbestimmung.

* ges. vs. RAO:

Trachea: P = 0,046

Bronchien: P = 0,05

Lunge: P = 0,01

PTX konnte die Oxotremorin M-stimulierte ^{35}S -GTP γ S-Bindung in Trachea und Bronchien von RAO-erkrankten Pferden hemmen (Abb. 21 A, B). In Membranen des Lungenparenchyms konnte keine Stimulation der ^{35}S -GTP γ S-Bindung durch Oxotremorin M festgestellt werden und doch hatte hier PTX einen hemmenden Effekt auf die ^{35}S -GTP γ S-Bindung (Abb. 21 C). Die spezifische Bindungsmenge an ^{35}S -GTP γ S war, wie auch in Versuchen mit NEM bei RAO-erkrankten Pferden,

im Vergleich zu Trachea und dem Lungenparenchym in den Bronchien am höchsten. Die E_{\max} -Werte in Anwesenheit von PTX betragen hierzu in der Trachea 227,9 fmol/mg Protein, in der Lunge 338,63 fmol/mg Protein und in den Bronchien 809,1 fmol/mg Protein (Abb. 21).

Die Messwerte der spezifischen ^{35}S -GTP γ S-Bindung in Anwesenheit von PTX von gesunden (Abb. 16) und von RAO-erkrankten Pferden (Abb. 21) wurden von „fmol/mg Protein“ in prozentuale Stimulation umgerechnet und miteinander verglichen. Hierbei wurde die gemessene ^{35}S -GTP γ S-Bindung bei einer Oxotremorin M-Konzentration von 10^{-8} mol/l als Nullwert festgelegt und die durch Oxotremorin M-induzierte Erhöhung der ^{35}S -GTP γ S-Bindung in Prozent über dem Nullwert dargestellt (Abb. 22). Die Messwerte der maximalen Stimulation betragen in der Trachea und den Bronchien gleichermaßen 71% bei gesunden Pferden und jeweils 113% und 90% bei RAO-erkrankten Pferden (Abb. 22 A, B), wobei der Vergleich der EC_{50} -Werte bei $n = 4$ keine Signifikanz zeigte. Aus dem Kurvenverlauf ist jedoch ersichtlich, dass Oxotremorin M in Anwesenheit von PTX in der Lage ist, die ^{35}S -GTP γ S-Bindung in Trachea und Bronchien von RAO-erkrankten Pferden stärker zu stimulieren als in den entsprechenden Segmenten von gesunden Pferden. Grund hierfür könnte eine erhöhte Expression der G_i -Proteine in Trachea und Bronchien von erkrankten Pferden sein, weil folglich unter Einfluss der eingesetzten PTX-Konzentration immer noch genügend nicht entkoppelte $G_i\alpha$ -Untereinheiten vorhanden sind, die weiterhin auf die Stimulation des M_2 -Rezeptors mit Oxotremorin M reagieren können. In Membranfraktionen des Lungenparenchyms überstieg zwar bei gesunden Pferden die Agonisten-stimulierte ^{35}S -GTP γ S-Bindung die der RAO-erkrankten Pferde (Abb. 22 C), aber gleichzeitig konnte kaum eine Oxotremorin M-stimulierte ^{35}S -GTP γ S-Bindung in Anwesenheit von PTX bei RAO-erkrankten Pferden festgestellt werden (Abb. 21 C).

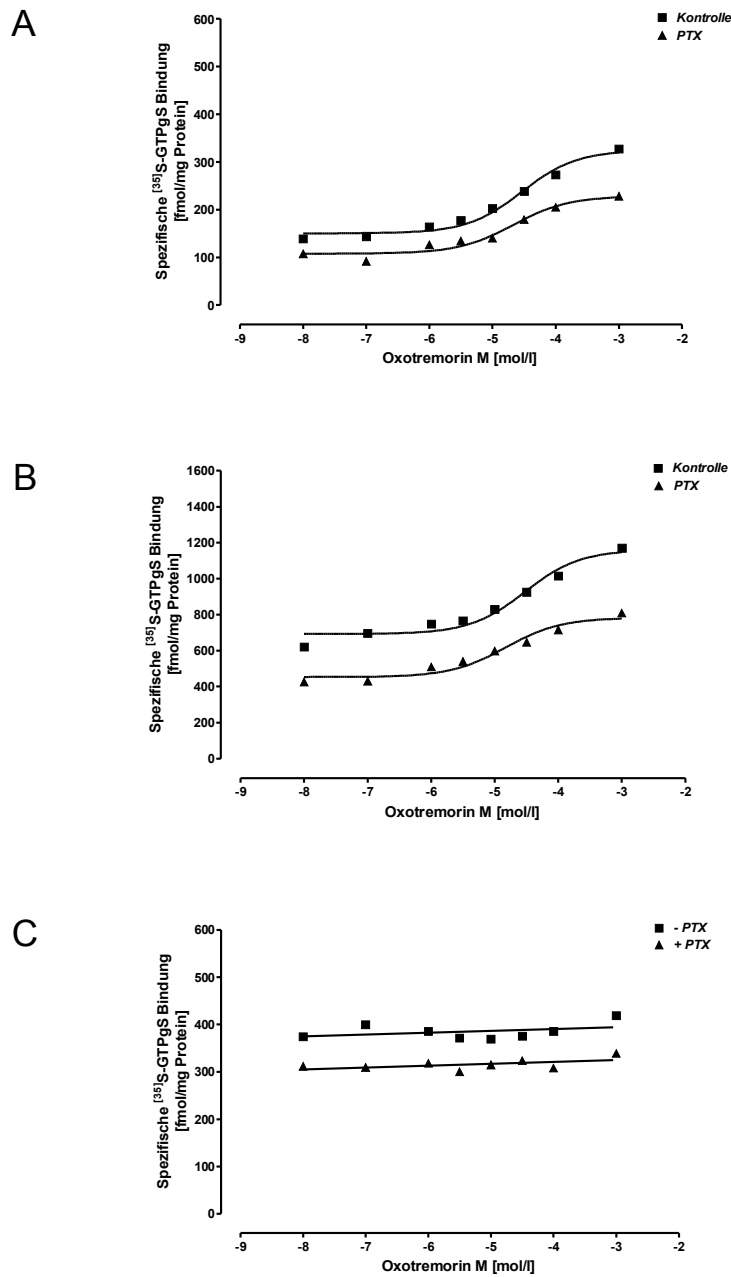


Abbildung 21: PTX-abhängige Hemmung der Agonisten-stimulierten ³⁵S-GTPγS-Bindung bei RAO.

Die ³⁵S-GTPγS-Bindung wurde mit Oxotremorin M in Ab- (■) und Anwesenheit (▲) von PTX (1 µg/ml) in Trachea (A), Bronchien (B) und Lunge (C) stimuliert. Jeder Versuchsansatz enthielt 10 µg Protein, 10 µmol/l GDP und wurde mit 0,5 nmol/l ³⁵S-GTPγS für 120 min bei 30°C inkubiert. Die unspezifische Bindung wurde mit 10 µmol/l unmarkiertem GTPγS bestimmt. Die hier gezeigten Daten sind Mittelwerte von jeweils vier Versuchen mit Doppelbestimmung.

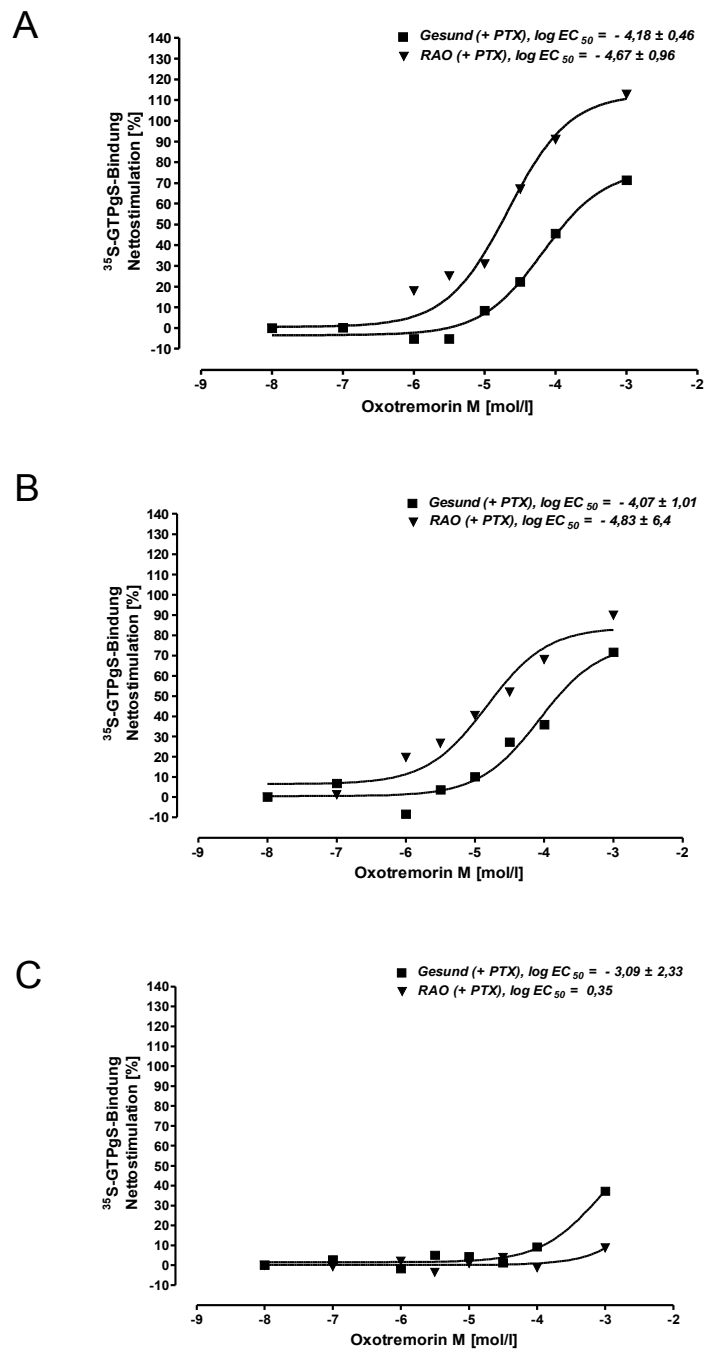


Abbildung 22: PTX-abhängige, Agonisten-stimulierte ³⁵S-GTPγS-Bindung (gesund vs. RAO).
 Vergleich der mit Oxotremorin M stimulierten ³⁵S-GTPγS-Bindung in Anwesenheit von PTX (1 µg/ml) zwischen gesunden- (■) und an RAO-erkrankten Pferden (▲) in der Trachea (A), den Bronchien (B) und im Lungenparenchym (C). Die dargestellten Daten wurden aus Abb. 16 und 21 berechnet (siehe Text).

4.1.2 Western Blot-Analyse der $G_{i/o}$ -Proteinmenge

Da -wie oben beschrieben – die M_2 -Rezeptor-vermittelte Aktivierung der G_i -Proteine im Respirationstrakt RAO-erkrankter Pferde verstärkt zu sein scheint, war es von großem Interesse, die G_i -Protein-Expressionsmenge in den genannten Gewebemembranen zu untersuchen. Zur Bestimmung der relativen Molmasse (Molekulargewicht) der G_i -Proteine wurden Membranfraktionen der drei zu untersuchenden Segmente (Trachea, Bronchien, Lunge) präpariert (siehe Kapitel 3.2.2), gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrocellulose Membran übertragen (siehe Kapitel 3.2.6). Mit einem G_i -Protein-Antikörper wurde in allen drei Geweben eine Proteinbande detektiert, die ~ 41 kDa beträgt. In Abbildung 23 ist ein repräsentativer Western Blot eine G_i -Proteinbande in allen drei Segmenten von gesunden und RAO-erkrankten Pferden dargestellt. Die aus den Banden densitometrisch berechneten Daten (Tab. 12) zeigten jedoch keinen auffälligen Unterschied der Expressionsmenge der G_i -Proteine zwischen allen Segmenten gesunder und RAO-erkrankter Pferde.

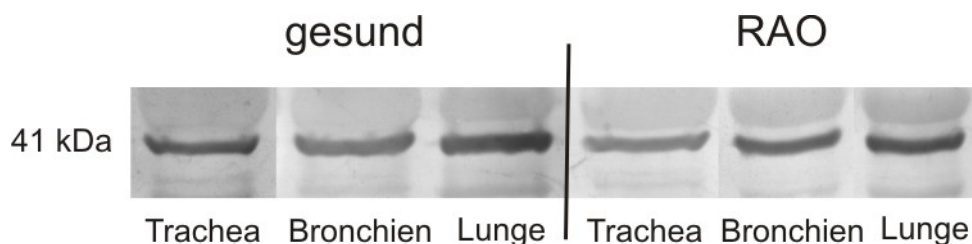


Abbildung 23: Immunoblot des G_i -Proteins
 Repräsentative Darstellung des Immunoblots des G_i -Proteins in Trachea (A), Bronchien (B) und Lungenparenchym (C). Jede Kammer ist mit 10 μ g Protein der Membransuspension beladen. Der Primärantikörper ist gegen G_i -Proteine gerichtet. Die Sichtbarmachung erfolgte mit Anti-Rabbit-IgG als Sekundärantikörper.

Tabelle 12: Densitometrische Bestimmung der Expressionsmenge von G_i-Proteinen als Mittelwerte von jeweils drei Pferden in Doppelbestimmung je Gewebe dargestellt.

	[Rohpixelwert]	
	gesund	RAO
Trachea	1.105.992	1.112.185
Bronchien	1.454.570	1.188.769
Lunge	1.472.579	1.467.130

4.1.3 Aktivität der Adenylatzyklase

Die Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren führt in den Zellen zu Konzentrationsänderungen intrazellulärer Botenstoffe (sog. Second Messenger). In den meisten Fällen lösen Hormone, Neurotransmitter oder Pharmaka (Agonisten) enzymatische Reaktionskaskaden aus, die entweder zu einer Erhöhung oder Senkung der Second Messenger (z.B. cAMP) führen. Von M₂-Subtypen der muskarin-cholinergen Rezeptoren ist bekannt, dass sie einen Abfall des intrazellulären cAMP-Spiegels bewirken und somit den β₂-adrenergen Rezeptor-vermittelten Signalweg funktionell antagonisieren. Um zu prüfen, ob der Signalweg über M₂-Rezeptoren bei der RAO des Pferdes verändert sein könnte und bei übermäßiger Obstruktion der Atemwege eine pathogenetische Rolle spielen könnte, wurde mittels Messung der cAMP-Bildung die Aktivität der membranständigen Adenylatzyklase indirekt ermittelt (siehe Kapitel 3.2.5.2). Es war notwendig, Vorversuche durchzuführen, um die Konzentration von Forskolin, das direkt die katalytische Untereinheit der AC und somit die cAMP-Bildung stimuliert und von Oxotremorin M, das über Aktivierung der M₂-Rezeptoren und verstärkte funktionelle Kopplung an das heterotrimere G_i-Protein die AC-Aktivierung hemmt, zu ermitteln. Weiterhin wurde der Frage nachgegangen, inwieweit die Inaktivierung der G_i-Proteine mit PTX oder NEM den Feedback-Mechanismus der M₂-Rezeptor-vermittelten AC-Regulation bei den untersuchten Segmenten RAO-erkrankter Pferde beeinflussen würde.

4.1.3.1 Konzentrationsabhängige Wirkung von Forskolin auf die Adenylatzyklase-Aktivität

In allen drei untersuchten Segmenten des equinen Respirationstrakts von gesunden Pferden führten

ERGEBNISSE

erhöhte Forskolin-Konzentrationen (10^{-7} bis 10^{-4} mol/l) segmentabhängig zu einer steigenden cAMP-Produktion (Tab. 13). Die absolute Menge an produziertem cAMP war in der glatten Muskulatur der Trachea am höchsten (387,45 pmol/mg Protein/min) und nahm über Bronchien bis hin zum Lungenparenchym ab (214,99 pmol/mg Protein/min und 109,59 pmol/mg Protein/min). Somit lag die cAMP-Bildung in der Trachea 1,8fach höher als in den Bronchien und 3,5fach höher als in der Lunge.

Die forskolinabhängige cAMP-Bildung und somit die Stimulation der Adenylatzyklase ist in Tabelle 13 zusammengefasst.

Aus den Dosis-Wirkungskurven von Forskolin wurde eine Forskolinkonzentration von 10 μ mol/l für die weitere Verwendung in den nachfolgenden Experimenten ermittelt.

Tabelle 13: Vergleich der Forskolin-induzierten cAMP-Produktion in drei Segmenten des Respirationstrakts (n = 3)

	Trachea	Bronchien	Lunge
	[pmol/mg Protein/min cAMP] abzüglich des Basalwerts		
Forskolin 10^{-7} mol/l	20,57 \pm 9,95	17,14 \pm 7,58	11,07 \pm 4,16
Forskolin 10^{-6} mol/l	111,07 \pm 53,19	57,21 \pm 16,21	27,50 \pm 7,03
Forskolin 10^{-5} mol/l	289,91 \pm 91,92	169,20 \pm 38,58	77,98 \pm 13,40
Forskolin 10^{-4} mol/l	387,45 \pm 137,24	214,98 \pm 37,76	109,59 \pm 23,90

4.1.3.2 Konzentrationsabhängige Hemmung der Forskolin-stimulierten Adenylatzyklase-Aktivität durch Oxotremorin M

Zur Überprüfung der Fragestellung, ob die direkte Stimulation der AC durch Forskolin über die M_2 -Rezeptor-vermittelte Aktivierung von G_i -Proteinen gehemmt werden kann, wurde die mit 10 μ mol/l Forskolin stimulierte AC-Aktivität mit steigenden Konzentrationen von Oxotremorin M (10^{-8} bis 10^{-3} mol/l) in allen drei Geweben gehemmt.

Oxotremorin M hemmte konzentrationsabhängig die Forskolin-stimulierte cAMP-Bildung in allen drei untersuchten Segmenten. In Membranen von Bronchien und Lunge konnte eine Hemmung ab einer Konzentration von 100 μ mol/l Oxotremorin M beobachtet werden. In Membranen der Trachea wurde bereits ein hemmender Effekt der Forskolin-stimulierten AC-Aktivität ab einer Konzentration von 0,1 μ mol/l Oxotremorin M beobachtet, wobei sich die Hemmung bis zu einer Konzentration von 10 μ mol/l verstärkte und höhere Konzentrationen von Oxotremorin M keinen stärkeren Einfluss auf die AC-Aktivität hatten (Abb. 24).

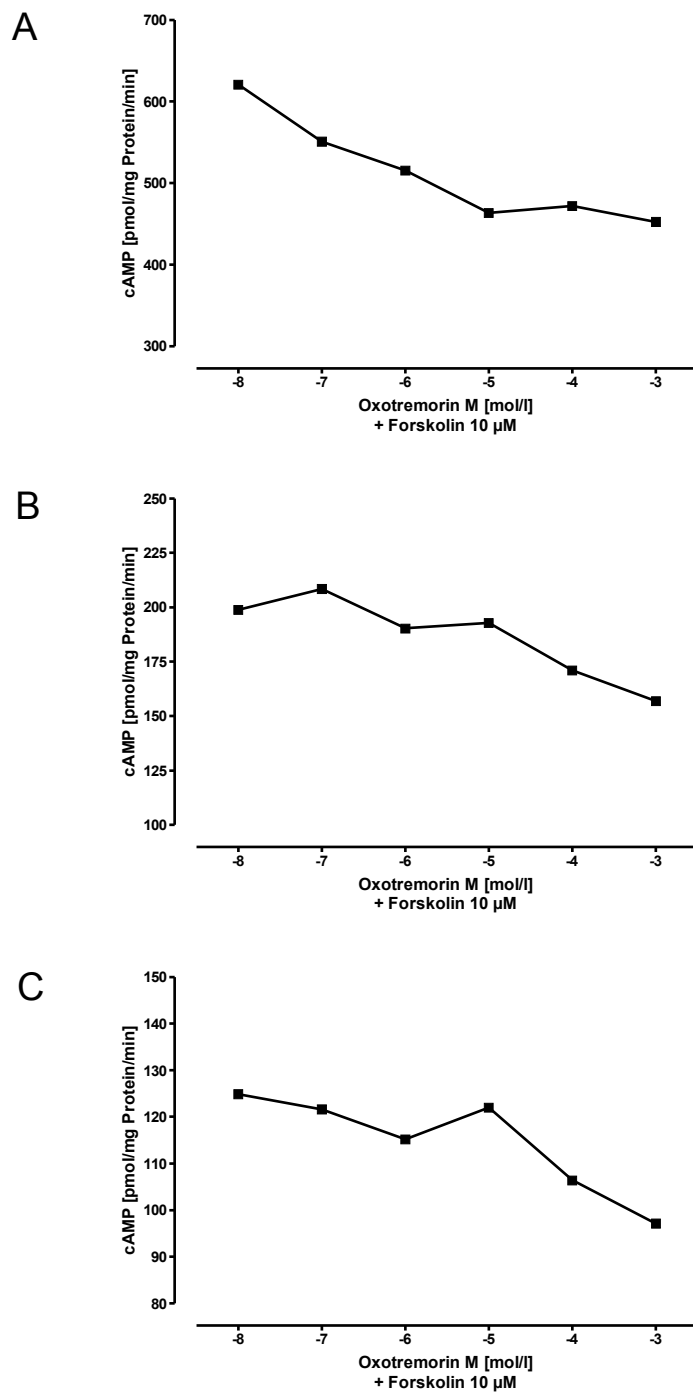


Abbildung 24: Hemmung der Forskolin-induzierten cAMP-Produktion durch Oxotremorin M. Die cAMP-Produktion wurde in der Trachea (A), in den Bronchien (B) und im Lungenparenchym (C) von gesunden Pferden gemessen. Die hier gezeigten Daten sind Mittelwerte aus je zwei Versuchen mit jeweils Doppelbestimmung.

4.1.3.3 Wirkung von N-Ethylmaleimid, Pertussistoxin und Oxotremorin M auf die Adenylatzyklase-Aktivität

Der Einfluss von N-Ethylmaleimid (NEM) und Pertussistoxin (PTX) auf die M₂-Rezeptor-G_i-Protein-AC-Signalkaskade kann nach Messung der cAMP-Bildung weitere Informationen über die M₂-G_i-Protein-Interaktion liefern. NEM und PTX sind in der Lage, selektiv G_i-Proteine von M₂-Rezeptoren zu entkoppeln. Da die AC nach Stimulation des M₂-Rezeptors über G_i-Proteine gehemmt wird, entfällt trotz Stimulation mit einem muskarin-cholinergen Agonisten (Oxotremorin M) somit der hemmende Einfluss auf die AC. Dadurch unterbricht die Inaktivierung der G_i-Proteine mit NEM oder PTX die M₂-Rezeptor-G_i-Protein-AC-Signalkaskade.

Die nach den bisherigen Ergebnissen von uns vermutete Erhöhung der G_i-Protein-Aktivität bei RAO-erkrankten Pferden würde sich auf die AC-Aktivität und folglich auf die cAMP-Bildung auswirken. Die Zielstellung der Messung der AC-Aktivität soll sein, weitere Hinweise auf eventuelle Unterschiede im Respirationstrakt zwischen gesunden und RAO-erkrankten Pferden zu erhalten.

Zunächst wurde der Einfluss von NEM und PTX auf die Forskolin-induzierte cAMP-Bildung untersucht. Danach wurde die AC-Aktivität nach Stimulation der M₂-Rezeptoren mit Oxotremorin M gemessen, um anschließend die mit Oxotremorin M ausgelöste Signalkaskade mit PTX zu hemmen.

Nachdem die AC in allen zu untersuchenden Segmenten des Respirationstrakts mit Forskolin stimuliert wurde, war NEM in einer Konzentration von 100 µmol/l in der Lage, die Forskolin-induzierte Stimulation in allen drei untersuchten Segmenten deutlich zu hemmen (Abb. 25 und 26), und zwar bei gesunden (Kontrollgruppe) und bei RAO-erkrankten Pferden (RAO-Gruppe). Die Hemmung in der Kontrollgruppe war in allen drei Geweben signifikant (Abb. 25). Bei RAO-erkrankten Pferden konnte nur in der Trachea und in der Lunge eine signifikante Hemmung festgestellt werden (Abb. 26).

In der Kontrollgruppe unterschied sich die cAMP-Bildung segmentabhängig. In den Bronchien betrug die Forskolin-induzierte cAMP-Bildung 374 ± 115 pmol/mg Protein/min und lag damit 4,4fach höher als in der Trachea (85 ± 22 pmol/mg Protein/min) und 7,6fach höher als in der Lunge (49 ± 12 pmol/mg Protein/min) (Abb. 25). In Lungenmembranen konnte somit die niedrigste cAMP-Bildung/AC-Aktivität festgestellt werden (s.o.).

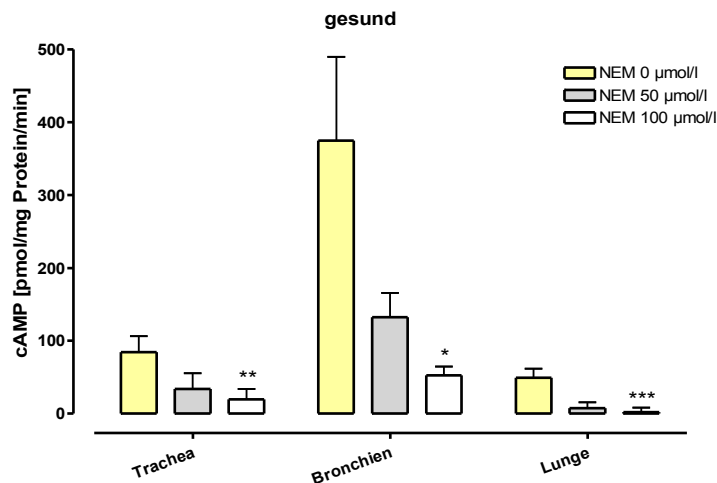


Abbildung 25: Einfluss von NEM auf die Forskolin-induzierte cAMP-Produktion.

Das Gewebe gesunder Pferde wurde mit 10 µmol/l Forskolin stimuliert. Die hier gezeigten Daten sind Mittelwerte (S.E.M.) aus je fünf Versuchen mit jeweils Doppelbestimmung.

** $p < 0,01$ (vs. 0 µmol/l NEM)

* $p = 0,011$ (vs. 0 µmol/l NEM)

*** $p < 0,01$ (vs. 0 µmol/l NEM)

Die cAMP-Bildung in Trachea und Bronchien der RAO-Gruppe war annähernd identisch und betrug in der Trachea 100 ± 37 pmol/mg Protein/min und in den Bronchien 108 ± 52 pmol/mg Protein/min (Abb. 26). Hiervon unterschieden hat sich die Forskolin-induzierte cAMP-Bildung im Lungengewebe. Die cAMP-Bildung war ca. 5fach niedriger als in der Trachea und in den Bronchien.

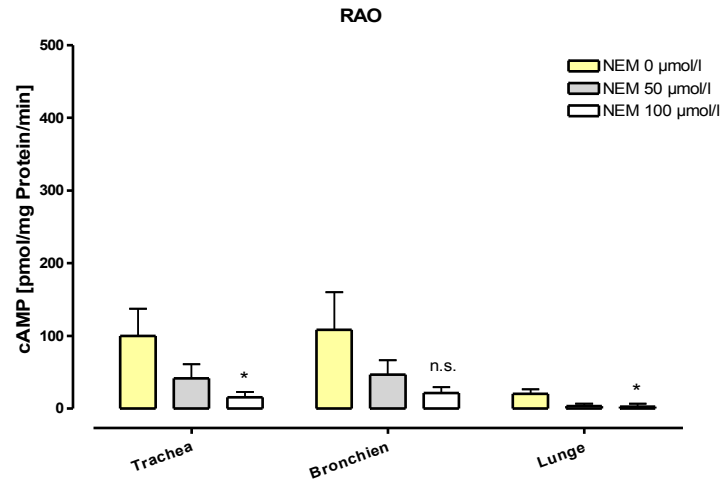


Abbildung 26: Einfluss von NEM auf die Forskolin-induzierte cAMP-Produktion bei RAO.

Das Gewebe RAO-erkrankter Pferde wurde mit 10 µmol/l Forskolin stimuliert. Die hier gezeigten Daten sind Mittelwerte (S.E.M.) aus je fünf Versuchen mit jeweils Doppelbestimmung.

Trachea: * $p > 0,05$ (vs. 0 µmol/l NEM)
 Lunge: * $p > 0,05$ (vs. 0 µmol/l NEM)

Vergleicht man die cAMP-Bildung/AC-Aktivität beider Versuchsgruppen, dann liegt die cAMP-Bildung in den Bronchien der RAO-Gruppe ca. 3,5fach niedriger als in den Bronchien der Kontrollgruppe und auch in der Lunge der RAO-Gruppe konnte eine ca. 2,5fach niedrigere cAMP-Bildung als in der Lunge der Kontrollgruppe gemessen werden.

Folglich kann zusammengefasst werden:

NEM hemmt deutlich die AC-Aktivität in allen Segmenten und Versuchsgruppen.

Die Lunge besitzt im Vergleich zu Trachea und Bronchien die niedrigste AC-Aktivität.

Die AC-Aktivität bei RAO-erkrankten Pferden ist im Vergleich zu gesunden Pferden in Bronchien und Lunge verringert und in der Trachea annähernd gleich.

Als nächstes wurde PTX eingesetzt, um die Forskolin-induzierte AC-Aktivität zu beeinflussen. PTX war im Gegensatz zu NEM nicht in der Lage, die Forskolin-stimulierte AC-Aktivität zu beeinflussen (Abb. 27).

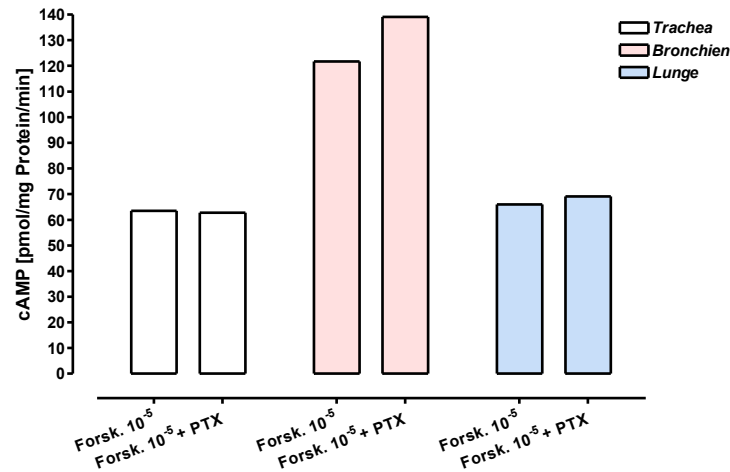


Abbildung 27: Einfluss von PTX auf die Forskolin-induzierte cAMP-Produktion.

Das Gewebe von einem gesunden Pferd wurde mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Forskolin in Ab- und Anwesenheit von PTX (1 $\mu\text{g/ml}$) stimuliert. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch mit Doppelbestimmung.

Die in diesem Kapitel mit NEM und PTX durchgeführten Versuche untersuchten den letzten Abschnitt der M_2 -Rezeptor- G_i -Protein-AC-Signalkaskade, nämlich die AC-Aktivität und ihr Syntheseprodukt cAMP. Obwohl NEM und PTX beide in der Lage sind G_i -Proteine von ihren Rezeptoren zu entkoppeln bzw. zu inaktivieren, zeigen die ersten beiden Versuche (Abb. 25 bis 27), dass NEM zusätzlich die AC direkt zu beeinflussen scheint. Damit ergeben sich zwei Angriffspunkte, an denen die M_2 -Rezeptor- G_i -Protein-AC-Signalkaskade durch NEM beeinflusst wird. Eine weitere Analyse der Signalkaskade mit NEM ist nicht möglich. Da PTX nur die M_2 -Rezeptor-gekoppelten G_i -Proteine inaktiviert und keinen direkten Einfluss auf die AC zu haben scheint, wurde weiterhin nur PTX benutzt, um die M_2 -Rezeptor-gekoppelten G_i -Proteine zu inaktivieren, um Rückschlüsse auf die Funktionalität der M_2 -Rezeptor- G_i -Protein-AC-Signalkaskade zu ziehen.

In Abbildung 28 und in Tabelle 14 ist der Einfluss von Oxotremorin M und von Oxotremorin M in Kombination mit PTX auf die Forskolin-induzierte cAMP-Bildung in Gewebemembranen von gesunden und RAO-erkrankten Pferden dargestellt. Die Forskolin-induzierte cAMP-Bildung wurde

als Basalwert definiert und mit den Messwerten für Oxotremorin M und für Oxotremorin M in Anwesenheit von PTX verglichen.

In allen Segmenten des equinen Respirationstrakts war die cAMP-Produktion bei RAO-erkrankten Pferden geringer als im Gewebe von gesunden Pferden (Abb. 28). Diese Verringerung im Gewebe von RAO-erkrankten Pferden war in fast allen Versuchsreihen signifikant. Die P-Werte sind aus Abbildung 28 zu entnehmen. Dies spricht für eine Verringerung der AC-Aktivität bei der RAO, aber auch eine erhöhte Aktivität der M₂-Rezeptor-G_i-Protein-AC-Signalkaskade wäre denkbar.

Bei gesunden und an RAO-erkrankten Pferden wurde in Anwesenheit von Oxotremorin M (1 mmol/l) eine geringe Hemmung der Forskolin-induzierten cAMP-Produktion in allen Segmenten des Respirationstrakts gemessen, die aber aufgrund der niedrigen Versuchstieranzahl (n = 4) nicht signifikant war. In Gegenwart von PTX schien jedoch Oxotremorin M die Forskolin-induzierte cAMP-Produktion in allen Segmenten von gesunden Pferden (außer Bronchien) und von RAO-erkrankten Pferden nicht mehr zu hemmen. Allerdings zeigten die Messwerte auch hier nur einen Trend, aber keinen signifikanten Unterschied (Abb. 28, Tab. 14).

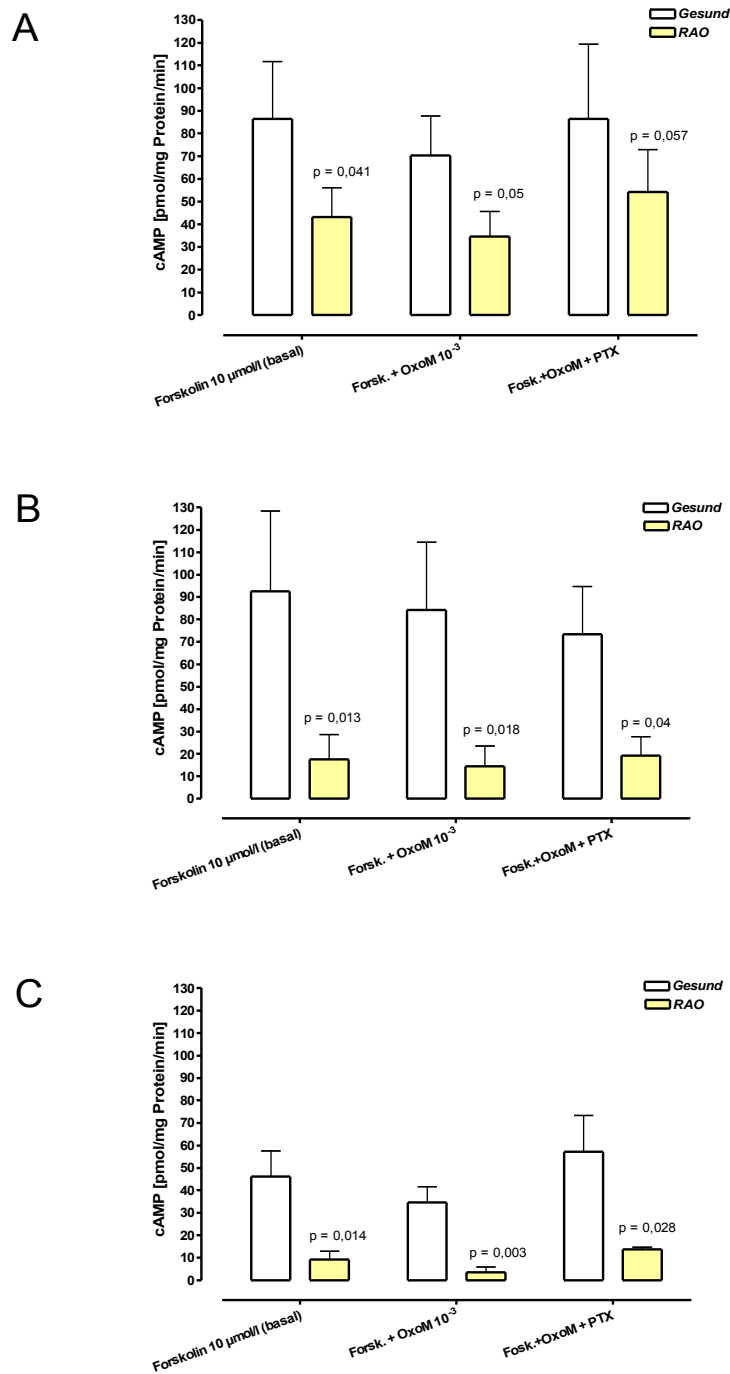


Abbildung 28: Oxtremorin M- und PTX-abhängige Forskolin-induzierte cAMP-Produktion (gesund vs. RAO)
 Die Forskolin-induzierte cAMP-Produktion wurde in Abhängigkeit von Oxtremorin M (1 mmol/l) und PTX (2 µg/ml) in Trachea (A), Bronchien (B) und Lungenparenchym (C) gemessen. Die hier gezeigten Daten sind Mittelwerte (S.E.M.) aus je vier Versuchen mit jeweils Doppelbestimmung.
 P-Werte: Gesund vs. RAO

Tabelle 14: Funktionelle Beeinflussung der AC (pmol/mg Protein/min) durch Oxotremorin M und PTX (n = 4)

	Trachea		Bronchien		Lunge	
	gesund	RAO	gesund	RAO	gesund	RAO
Forskolin 10 ⁻⁵ mol/l	86,44 ± 25,33	43,23 ± 12,79	92,53 ± 35,81	17,59 ± 11,11	46,25 ± 11,23	9,28 ± 3,69
Forsk. + Oxo M 10 ⁻³ mol/l	70,26 ± 17,58	34,64 ± 11,12	84,23 ± 30,29	14,44 ± 9,06	34,64 ± 6,97	3,53 ± 2,39
Fosk. + Oxo M + PTX	86,45 ± 33,00	54,23 ± 18,70	73,45 ± 21,24	19,25 ± 8,39	57,2 ± 16,25	13,77 ± 0,88

5 DISKUSSION

Die β -adrenergen und muskarin-cholinergen Rezeptoren sind im equinen Respirationstrakt weitgehend pharmakologisch/biochemisch charakterisiert. Neben ihrer Bedeutung bei der Regulation der physiologischen Atemwegsfunktion sind diese Rezeptorsysteme bei den pathologischen Veränderungen der Atemwege beteiligt und somit wichtige pharmakologische Ansatzpunkte. Die RAO des Pferdes ist eine allergische Erkrankung und ist durch entzündliche und immunologische Vorgänge, sowie durch Veränderungen der Rezeptorsysteme des autonomen Nervensystems gekennzeichnet. Es wird ergänzend zu den bisherigen Untersuchungen der Fragestellung nachgegangen, ob bei RAO das Gleichgewicht auch auf muskarin-cholinergem Rezeptorebene gestört ist und ob solche Veränderungen mit der Signaltransduktion der Rezeptoren assoziiert sind, nachdem gezeigt werden konnte, dass der β -adrenerge Rezeptor- G_s -Protein-Adenylatzyklase-Signalweg bei der RAO beeinträchtigt ist (ABRAHAM et al. 2006). Es ist bereits bekannt, dass bei obstruktiven Atemwegserkrankungen neben dieser verminderten Aktivität des sympathischen (adrenergen) Nervensystems (insbesondere β -adrenerge Mechanismen) die parasympathische (cholinerge) Aktivität erhöht ist, wobei für die letztere keine Veränderung hinsichtlich der Anzahl und der Verteilung der muskarin-cholinergen Rezeptoren bei RAO-Pferden festgestellt werden konnte (ABRAHAM et al. 2007A). Da jedoch bei der Pathogenese der RAO auch die Signaltransduktionswege dieser Rezeptoren eine bedeutende Rolle spielen könnten, wurde auf Post-Rezeptorebene die Interaktion des jeweiligen muskarin-cholinergen Rezeptorsubtyps mit den entsprechenden G-Proteinen und Effektorproteinen in drei Segmenten des equinen Respirationstrakts von gesunden und an RAO-erkrankten Pferden untersucht. Beim untersuchten Gewebe handelt es sich um Membranen des Tracheal- und Bronchialepithels mit der darunter liegenden Muskulatur und Membranen des Lungenparenchyms.

Besonderes Augenmerk wurde in dieser Arbeit auf den M_2 -Rezeptorsubtyp und seine Interaktion mit G_i -Proteinen und der Adenylatzyklase gelegt, weil dieser Rezeptor in allen Segmenten des Respirationstrakts die überwiegende Anzahl ausmacht (ROFFEL et al. 1988, LUCCHESI et al. 1990, YANG 1991, HADDAD et al. 1994, ABRAHAM et al. 2007A) und funktionell den β_2 -Signalweg antagonisiert. Um die Interaktion des M_2 -Rezeptors mit den entsprechenden G_i -Proteinen zu untersuchen, wurde zunächst eine ^{35}S -GTP γ S-Bindungsstudie etabliert. Für die Etablierung und Charakterisierung der ^{35}S -GTP γ S-Bindung, die unter anderem von der Proteinmenge der Probe, der Rezeptorzahl und dem G_i -Proteinlevel abhängt, wurden zunächst optimale Versuchsbedingungen

ermittelt. Diese beinhalten den Einfluss von Mg^{2+} , Na^+ , GDP und der Temperatur/Zeit auf die ^{35}S -GTP γ S-Bindung. Anschließend wurden funktionelle Untersuchungen der M_2 -Rezeptor- G_i -Protein-AC-Signalkaskade mit verschiedenen Agonisten und den Inhibitorsubstanzen NEM und PTX durchgeführt. Weiterhin wurde mit Hilfe unterschiedlicher Versuchsmethoden die muskarin-vermittelte Aktivierbarkeit der Effektorproteine der Adenylatzyklase untersucht.

Bislang wurde bei Pferden festgestellt, dass das muskarin-cholinerge Rezeptorsystem bei RAO in Bezug auf die Rezeptordichte, das Vorkommen und die Ausprägung der einzelnen Muskarinrezeptorsubtypen im Vergleich zu gesunden Pferden unverändert ist (KOTTKE 2005). Der M_1 -, M_2 - und der M_3 -Rezeptor sind die vorkommenden Subtypen. Der M_2 -Subtyp ist der vorherrschende Subtyp im Tracheal- ($\sim 80\%$) und Bronchialepithel ($\sim 80\%$) mit der darunter liegenden glatten Muskulatur und im Lungenparenchym ($\sim 50\%$), gefolgt vom M_3 -Rezeptor in allen drei Segmenten. Der M_1 -Rezeptor kommt nur zu einem geringen Anteil (24-28%) im Lungenparenchym vor. Die Expressionsdichte der Gesamtmenge an muskarin-cholinergen Rezeptoren nimmt von proximal nach distal ab (KOTTKE 2005). Ergänzend konnten ABRAHAM et al. (2007B) in einer Western Blot Analyse auch einen ähnlichen segment-abhängigen Unterschied in der Expressionsmenge von G_i -Proteinen im equinen Respirationstrakt nachweisen (Trachea > Bronchien > Lunge).

Die mittels der ^{35}S -GTP γ S-Bindungsstudie gemessene M_2 - G_i -Protein-Interaktion ist grundsätzlich von der muskarin-cholinergen Rezeptordichte abhängig, weil eine hohe Rezeptoranzahl auch eine größere Anzahl an G-Proteinen aktivieren kann. Um mit der ^{35}S -GTP γ S-Bindungsstudie insbesondere die M_2 - G_i -Protein-Interaktion zu messen, wurde die ^{35}S -GTP γ S-Bindung mit den muskarin-cholinergen Agonisten Carbachol, Acetylcholin und Oxotremorin M stimuliert. Diese war in den Bronchien und der Trachea stärker ausgeprägt als in der Lunge. Die nachgewiesene Stimulation der ^{35}S -GTP γ S-Bindung durch die Agonisten könnte demnach mit der Menge der endogen vorhandenen, mit GTP beladenen $G_{i\alpha}$ -Einheiten (aktive Konformation) verbunden sein. Gestützt wird diese Hypothese durch eine in-vitro-Studie, in der die M_2 -Rezeptor-vermittelte Stimulation der ^{35}S -GTP γ S-Bindung in Sf9 Insektenzellen, die muskarin-cholinerge Rezeptoren und $G_{\alpha i\beta\gamma}$ -, aber auch $G_{\alpha 0\beta\gamma}$ -Proteine nebeneinander exprimieren, untersucht wurde (UUSTARE et al. 2004). In dieser Studie stimulierten die muskarin-cholinergen Agonisten Acetylcholin und Oxotremorin M deutlich die ^{35}S -GTP γ S-Bindung, wobei sich beim Vergleich der Agonisten-Wirksamkeit keine signifikanten Unterschiede zwischen M_2/G_i - und M_2/G_0 -Membranen zeigten.

Auch wenn mit der vorliegenden Arbeit die Menge der $G_{i/o}$ -Proteine im equinen Respirationstrakt nicht exakt quantifiziert werden konnte, kann die Beteiligung und der Einfluss der $G_{i/o}$ -Proteinkonzentration auf die Agonisten-stimulierte ^{35}S -GTP γ S-Bindung durch die partielle Inhibition der funktionellen $G_{i/o}$ -Proteine durch NEM und PTX belegt werden (Abb. 15, Abb.16). Die Beteiligung von $G_{i/o}$ -Proteinen wurden auch bei anderen Rezeptorsystemen, z. B. bei $G_{i/o}$ -gekoppelten μ -Opioidrezeptoren in C6-Gliazellen und SH-SY5Y-Zellen (menschliche Neuroblastenzellen) (REMMERS et al. 2000) und Adenosin A_1 -Rezeptoren in Gehirnen von Ratten (LORENZEN et al. 2002) untersucht. Mit der ^{35}S -GTP γ S-Bindungsstudie ist es somit möglich, die funktionelle Aktivität von speziell $G_{i/o}$ -gekoppelten Rezeptoren zu messen, weil sie zum einen im Vergleich mit anderen G-Proteinen relativ hoch exprimiert werden und zum anderen eine wesentlich höhere basale Austauschrate von Guanosinnukleotiden haben als G-Proteine anderer Familien (siehe Kapitel 2.2.6 Abb. 4). Außerordentlich wichtig für das Gelingen der ^{35}S -GTP γ S-Bindungsstudie ist darüber hinaus die Anwesenheit von Mg^{2+} , Na^+ und GDP (LAZARENO 1999, GONZALES-MAESO et al. 2000). Durch die Zugabe von unmarkiertem GTP γ S wurde überprüft, ob die verwendeten Membranfraktionen ^{35}S -GTP γ S umsetzen und in die G_α -Einheiten einbauen. Steigende Konzentrationen von GTP γ S sollten demnach die ^{35}S -GTP γ S-Bindung hemmen. Abb. 6 zeigt diesen Effekt und bestätigt damit die Funktionalität der G-Proteine in den verwendeten Membranfraktionen von Tracheal-, Bronchialepithel und der darunter liegenden glatten Muskulatur und dem Lungenparenchym. GTP γ S diente zusätzlich zur Bestimmung der unspezifischen Bindung in allen durchgeführten ^{35}S -GTP γ S-Bindungsversuchen. Die unspezifische Bindung wurde von der Agonisten-stimulierten ^{35}S -GTP γ S-Bindung subtrahiert, um die spezifische, an die G_i -Einheiten gebundene Menge an ^{35}S -GTP γ S zu berechnen.

In Anwesenheit von 10 $\mu\text{mol/l}$ GTP γ S im Versuchsansatz wurde die ^{35}S -GTP γ S-Bindung fast vollständig gehemmt. Weil davon auszugehen ist, dass der gemessene Rest an Bindung unspezifisch ist, wurden 10 $\mu\text{mol/l}$ GTP γ S in weiteren ^{35}S -GTP γ S-Bindungsversuchen zur Bestimmung des spezifisch gebundenen Anteils eingesetzt. Übereinstimmend wurde diese Konzentration zur Ermittlung der unspezifischen Bindung für ^{35}S -GTP γ S-Bindungsstudien am Herzen von Schweinen (HILF et al. 1989) und auch am menschlichen Gehirn benutzt (GONZALES-MAESO et al. 2000). Zunehmende Konzentrationen von Mg^{2+} erhöhten die Basalbindung und die stimulierte ^{35}S -GTP γ S-Bindung bis zu einer Mg^{2+} -Konzentration von 10 mmol/l. Diese Konzentration wurde deshalb als optimale Konzentration im Versuchsansatz eingesetzt. Die durch Oxotremorin M stimulierte ^{35}S -

GTP γ S-Bindung wurde von Mg²⁺ stärker beeinflusst als die basale ³⁵S-GTP γ S-Bindung, was die Berechnung der Nettostimulation (Differenz) deutlich machte (Tab. 13) (SZEKERES u. TRAYNOR 1997). Höhere Konzentrationen von Mg²⁺ hemmten sowohl die Basalbindung als auch die Agonisten-stimulierte ³⁵S-GTP γ S-Bindung deutlich.

Die Ansatzpunkte der Wirkungen von Mg²⁺ an G-Proteinen sind weitgehend unbekannt. Eine Erklärung für die Mg²⁺-bedingte Beeinflussung der Basalbindung und der Agonisten-stimulierten ³⁵S-GTP γ S-Bindung könnte das Ergebnis einer erhöhten Dissoziationsrate von GDP in Kombination einer erhöhten Assoziationsrate von ³⁵S-GTP γ S, welches nur mäßig vom G-Protein dissoziiert wird, sein (SZEKERES u. TRAYNOR 1997).

Im Gegensatz zur Mg²⁺-abhängigen Stimulation verringerte die Anwesenheit von Na⁺ die Basalbindung und die Agonisten-stimulierte ³⁵S-GTP γ S-Bindung in der Trachea und den Bronchien. Im Lungenparenchym war keine Stimulation der ³⁵S-GTP γ S-Bindung durch Oxotremorin M messbar, was mit der niedrigen muskarin-cholinergen Rezeptordichte zusammenhängen könnte. Die Berechnung der relativen Stimulation war deshalb nur in der Trachea und den Bronchien möglich und wurde durch die Zugabe von Na⁺ verbessert (Abb. 7). Folglich verbesserte sich das Signal-Stör-Verhältnis bei einer Na⁺-Konzentration von 200 mmol/l und 300 mmol/l in der Trachea und 200 mmol/l und 500 mmol/l in den Bronchien. Daraus resultierend wurden die weiteren Versuche mit einer Na⁺-Konzentration von 200 mmol/l durchgeführt. In anderen Studien wurde eine geringere Na⁺-Konzentration (100 mmol/l) eingesetzt – allerdings handelte es sich um eine Stimulation von Opioid-Rezeptoren an CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary cells) und NG108-15-Zellen (SELLEY et al. 2000, SZEKERES u. TRAYNOR 1997). Der Unterschied ist damit zu erklären, dass unterschiedliche Gewebe eine unterschiedliche Rezeptor-G-Protein-Ausstattung besitzen. In Zellen mit einem hohen Rezeptor-G-Protein-Verhältnis (wie im Respirationstrakt) ist die spontane Kopplung höher, weshalb eine höhere Na⁺-Konzentration eingesetzt werden muss, um die Agonisten-stimulierte ³⁵S-GTP γ S-Bindung messbar zu machen (COSTA et al. 1990, LEFKOWITZ et al. 1993). Es wird vermutet, dass Na⁺ die Verringerung der ³⁵S-GTP γ S Basalbindung durch eine Entkopplung des Rezeptors vom G-Protein herbeiführen (HORSTMAN et al. 1990). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind ein weiterer Hinweis darauf, dass die segment-abhängigen muskarin-cholinergen Rezeptoren, auf ihre Dichte bezogen, an eine proportionale Menge an G_i-Proteinen gekoppelt zu sein scheinen.

Der kritische Faktor, der über das Gelingen der ^{35}S -GTP γ S-Bindungsstudie entscheidet, ist die dem Versuchsansatz beigefügte Menge an exogenem GDP. Diese GDP-Abhängigkeit wurde bei der Stimulation der ^{35}S -GTP γ S-Bindung in einer Vielzahl von Studien beobachtet. Hierzu gehören folgende untersuchten Systeme: muskarin-cholinerge Agonisten an Membranen des porcinen Vorhofs (HILF u. JAKOBS 1989, HILF et al. 1989) und CHO-Zellmembranen (LAZARENO 1999), aber auch Membranfraktionen des Gehirns der Ratte und des menschlichen Gehirns (OLIANAS u. ONALI 1996, GONZALES-MAESO et al. 2000), Adenosin A₁-Agonisten im Gehirn von Rindern (LORENZEN et al. 1993), Opioid-Agonisten in verschiedenen Zellkultursystemen (TRAYNOR u. NAHORSKI 1995, SZEKERES u. TRAYNOR 1997), Cannabinoid-Agonisten im Gehirn der Ratte (BREIVOGEL et al. 1998) und das chemotaktische Peptid fMeth-Leu-Phe in HL60-Zellmembranen (WIELAND et al. 1992). Die GDP-abhängige Stimulation mit muskarin-cholinergen Agonisten an Membranen des equinen Respirationstrakts mit anschließender Messung der ^{35}S -GTP γ S-Bindung wurde bisher noch nicht durchgeführt.

In der Trachea, den Bronchien und in der Lunge hemmte GDP ab einer Konzentrationen von $> 100 \mu\text{mol/l}$ die ^{35}S -GTP γ S-Bindung (Abb. 9, 10 und 11). Entscheidend für die Optimierung der ^{35}S -GTP γ S-Bindungsstudie ist allerdings die Berechnung der relativen Stimulation aus der Basalbindung und der Agonisten-stimulierten ^{35}S -GTP γ S-Bindung (Abb. 9, 10 und 11 (insets)). Die optimale GDP-Konzentration ist erreicht, wenn die relative Stimulation den höchsten Wert zeigt. Erst in diesem Bereich kann mit der ^{35}S -GTP γ S-Bindungsstudie die Funktionalität der M₂-Rezeptor-G_i-Protein-Interaktion mittels Stimulation der Rezeptoren mit den jeweiligen Agonisten quantifizierbar gemacht werden. Diese Konzentration betrug $10 \mu\text{mol/l}$ in der Trachea und in den Bronchien. Im Lungenparenchym veränderte sich die stimulierte ^{35}S -GTP γ S-Bindung und die Kontrollbindung kaum, weshalb hier kein Anstieg der relativen Stimulation beobachtet werden konnte. Im Lungenparenchym ist die Dichte der muskarin-cholinergen Rezeptoren, wie bereits oben erwähnt, am niedrigsten. Deshalb ist es kaum möglich, das stimulierte Signal vom Hintergrundrauschen abzuheben und messbar zu machen. Die verwendete GDP-Konzentration war niedriger als die für α_2 -Agonisten benutzte Konzentration in Membranen des menschlichen Cortex (GONZALES-MAESO et al. 2000) und die verwendete Konzentration für muskarin-cholinerge Agonisten in Membranen des Bulbus olfactorius der Ratte (OLIANAS u. ONALI 1996), die in beiden Fällen $50 \mu\text{mol/l}$ betrug. Für die ^{35}S -GTP γ S-Bindungsstudie in Membranfraktionen des Herzens wurde allerdings nur $1 \mu\text{mol/l}$ GDP eingesetzt, um die Stimulation mit muskarin-cholinergen Agonisten zu messen (HILF et al. 1989). Im Unterschied zu den genannten Studien und

der vorliegenden Arbeit stimulierte in Membranfraktionen von PC-12-Zellen Adrenalin die ^{35}S -GTP γ S-Bindung in annähernd gleicher Höhe in An- und Abwesenheit von GDP und wurde nicht als limitierender Faktor der Bindungsstudie charakterisiert (TIAN et al. 1994). Demnach ist die Zugabe von GDP, wie auch in der vorliegenden Arbeit, unverzichtbar, um die Stimulation von Pertussistoxin-sensitiven G-Proteinen (G_i) zu messen, aber weniger wichtig, um die von Pertussistoxin-unempfindlichen G-Proteinen (z.B. G_q , G_s) zu ermitteln. Dies unterstreicht die Bedeutung des gekoppelten, spezifischen G-Protein-Typs in einzelnen Versuchssystemen (OFFERMANN et al. 1994). Die Wirkung von Mg^{2+} , Na^+ und GDP auf die ^{35}S -GTP γ S-Bindung macht deutlich, dass G-Protein-Prozesse vielfältig beeinflusst werden (BIRNBAUMER et al. 1990).

Weiterhin wurden die Potenz und die Wirksamkeit von drei Muskarin-Rezeptor-Agonisten (Oxotremorin M, Carbachol, Acetylcholin), die ^{35}S -GTP γ S-Bindung zu stimulieren, an Membranen von Tracheal- und Bronchialepithel mit der darunter liegenden glatten Muskulatur und dem Lungenparenchym von zunächst gesunden Pferden überprüft. Von den untersuchten Agonisten stimulierte Oxotremorin M am stärksten mit einer Stimulation der ^{35}S -GTP γ S-Bindung von jeweils 104% und 126% in der Trachea und den Bronchien. Eine vergleichbare, aber niedrigere Stimulation konnte für die Agonisten Carbachol und Acetylcholin gemessen werden. Carbachol und Acetylcholin stimulierten die ^{35}S -GTP γ S-Bindung in Trachea und Bronchien mit jeweils Werten um die 50 und 60%. Im Lungenparenchym stimulierte nur Oxotremorin M mit 41% die ^{35}S -GTP γ S-Bindung.

Der Antagonist Atropin war in der Lage, in einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ die Stimulation aller Agonisten in allen drei Segmenten vollständig zu hemmen. Das belegt zum einen die Beteiligung von muskarin-cholinergen Rezeptoren und deren Kopplung an G_i -Proteine und bestätigt zum anderen, dass die Messung der M_2 -Rezeptor- G_i -Protein-Interaktion mit der ^{35}S -GTP γ S-Bindungsstudie möglich ist.

Die Messwerte decken sich mit Untersuchungen von HILF u. JAKOBS 1989, die am porcinen Herzen eine 70%ige Stimulation der ^{35}S -GTP γ S-Bindung durch Carbachol messen konnten, die von Atropin geblockt werden konnte. GONZALES-MAESO et al. 2000 fanden allerdings eine geringere Stimulation der ^{35}S -GTP γ S-Bindung (25%) für Carbachol im menschlichen Gehirn (GONZALES-MAESO et al. 2000). Eine Carbachol- und Acetylcholin-vermittelte Stimulation der ^{35}S -GTP γ S-Bindung konnte im Bulbus olfactorius der Ratte festgestellt werden, wobei kein Unterschied zur Stimulation der ^{35}S -GTP γ S-Bindung durch Oxotremorin M vorhanden war

(OLIANAS u. ONALI 1996). Da in der glatten Muskulatur des Respirationstrakts vorwiegend der M_2 -Rezeptorsubtyp vorkommt und Oxotremorin M als M_2 -selektiver Agonist und partieller M_1 -Rezeptoragonist beschrieben wurde (GARVEY et al. 1992, RICHARDS 1990), ist eine hohe Oxotremorin M-vermittelte Stimulation der $^{35}\text{S-GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung zu erwarten. Demzufolge steht die gemessene maximale Stimulation der $^{35}\text{S-GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung mit Oxotremorin M für die charakteristische, funktionelle M_2 -Rezeptor- G_i -Protein-Interaktion im jeweils untersuchten Gewebe. Im Lungenparenchym reicht die Muskarinrezeptoranzahl möglicherweise nicht aus, um eine Rezeptor- G_i -Protein-Interaktionen mit allen Agonisten zu messen.

Die durch die drei Agonisten (Oxotremorin M, Acetylcholin, Carbachol) vermittelte Stimulation der $^{35}\text{S-GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung in den Geweben der RAO-Gruppe stellte sich ähnlich dar wie in der Kontrollgruppe, unterschied sich jedoch in der Höhe der maximalen Agonisten-vermittelten Stimulation mit Oxotremorin M. Oxotremorin M war auch in der RAO-Gruppe der wirksamste Agonist mit der höchsten Stimulation der $^{35}\text{S-GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung, und zwar in den Bronchien, gefolgt von der Trachea und der Lunge. Acetylcholin und Carbachol stimulierten die $^{35}\text{S-GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung in der Trachea und den Bronchien, aber nicht in der Lunge. Der Wert für die maximale Stimulation der $^{35}\text{S-GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung durch Oxotremorin M in der RAO-Gruppe lag in den Bronchien (141%) und in der Lunge (78%) tendenziell höher als in der Kontrollgruppe (Tab. 11). Dies könnte mit einer erhöhten Anzahl an Bindungsstellen für $^{35}\text{S-GTP}\gamma\text{S}$ begründet sein, was eine erhöhte Menge an G_i -Proteinen im erkrankten Gewebe bedeuten würde.

Um die Beteiligung der Pertussistoxin-empfindlichen Proteine (G_i) näher zu charakterisieren, wurden die Substanzen NEM und PTX eingesetzt. Beide sind in der Lage, durch Alkylierung der G_i -Proteine diese von den Rezeptoren zu entkoppeln. Im gesunden Gewebe konnte eine nicht vollständige Hemmung der $^{35}\text{S-GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung mit 100 $\mu\text{mol/l}$ NEM gemessen werden (Abb. 11). Im Unterschied dazu führte die Vorbehandlung von Membranfraktionen des Gehirns von Mensch und Rind mit 100 $\mu\text{mol/l}$ NEM zu einer fast vollständigen Hemmung der basalen und der Agonisten-stimulierten $^{35}\text{S-GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung, was als eine Interaktion der untersuchten muskarin-cholinergen Rezeptoren (GONZALES-MAESO et al. 2000, OLIANAS u. ONALI 1996) und Adenosin-Rezeptoren (A_1) (LORENZEN et al. 1993) mit G_i -Proteinen gedeutet wurde. Durch den Einsatz von NEM bei RAO-Pferden konnte keine deutliche Hemmung der $^{35}\text{S-GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung gezeigt werden (Abb. 19). Vergleicht man die $^{35}\text{S-GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung im gesunden Gewebe mit dem von RAO-erkrankten Pferden, dann wird bei gleicher NEM-Konzentration im kranken Gewebe mehr $^{35}\text{S-GTP}\gamma\text{S}$ gebunden (Abb. 20). Die Ergebnisse deuten auf eine erhöhte Menge an G_i -

DISKUSSION

Proteinen im Gewebe von RAO-erkrankten Pferden hin, weil die eingesetzte NEM-Konzentration – im Gegensatz zum gesunden Gewebe – nicht ausreicht, um einen vergleichbar umfangreichen Anteil der G_i -Proteine von M_2 -Rezeptoren zu entkoppeln. Eine Vorbehandlung des Gewebes mit PTX sollte diese Hypothese bestätigen.

PTX (10 $\mu\text{g/ml}$) konnte in Zellen (NG108-15-Zellen), die Opioidrezeptoren exprimieren, eine komplette Hemmung der ^{35}S -GTP γ S-Bindung hervorrufen, wobei die Vorinkubationszeit bei 24 Stunden lag (SZEKERES u. TRAYNOR 1997). In Membranen des Herzens wurde bei Vorbehandlung des Gewebes mit PTX (72 $\mu\text{g/ml}$) die basale und Carbachol-vermittelte ^{35}S -GTP γ S-Bindung auf weniger als 35% des Basalwerts reduziert (HILF et al. 1989). Die M_2 -Rezeptor- G_i -Protein-Interaktion wurde bisher im equinen Respirationstrakt mittels der ^{35}S -GTP γ S-Bindungsstudie unter Verwendung von muskarin-cholinergem Agonisten und PTX noch nicht untersucht.

In Abb. 16 und 15 ist dargestellt, dass sowohl PTX als auch NEM die absolute ^{35}S -GTP γ S-Bindung bei gesunden Pferden hemmte. Die Nettostimulation der ^{35}S -GTP γ S-Bindung durch Oxotremorin M war in Anwesenheit von PTX in der Trachea und den Bronchien von gesunden Pferden niedriger als im Gewebe von an RAO-erkrankten Pferden (Abb. 22). PTX konnte allerdings die ^{35}S -GTP γ S-Bindung unter gleichen Versuchsbedingungen im erkrankten Gewebe nicht gleichermaßen reduzieren. Die PTX-vermittelte Hemmung bestätigt aber trotzdem wie NEM die Hemmung der ^{35}S -GTP γ S-Bindung und damit die Schlussfolgerung, dass die G_i -Proteinmenge im erkrankten Gewebe erhöht ist.

Zum Nachweis eines segmentabhängigen Unterschieds (Trachea, Bronchien, Lunge) in der Expressionsmenge von $G_{\alpha i}$ -Proteinen im equinen Respirationstrakt wurde eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Das G_i -Protein wurde bei ~ 41 kDa nachgewiesen, wobei keine Unterschiede hinsichtlich der Expressionsmenge in den einzelnen Segmenten nachweisbar waren. Der Vergleich der Kontroll- mit der RAO-Gruppe zeigte keine nennenswerten Veränderungen (Tab 16). Die verwendeten G_i -Antikörper waren allerdings keine spezifischen Antikörper für die Spezies Pferd. Aufgrund der Heterogenität und Spezifität der Familie der G_i -Proteine ist wahrscheinlich, dass diese Antikörper nicht alle vorhandenen G_i -Proteine erfassen und somit die Ergebnisse der Western Blot Analyse nicht in vollem Umfang dem tatsächlichen Funktionszustand des Gewebes entsprechen.

Für eine erhöhte Menge an G_i -Proteinen im Respirationstrakt von RAO-erkrankten Pferden spricht aber die höhere absolute ^{35}S -GTP γ S-Bindung (fmol/mg Protein). Zu beachten ist allerdings, dass

der Basalwert grundsätzlich ebenfalls erhöht war und damit auch auf eine erhöhte Expressionsmenge von G-Proteinen anderer Familien hindeutet. Erst die Stimulation mit Oxotremorin M in Anwesenheit von PTX ließ auf die Veränderung der PTX-empfindlichen G_i-Proteine schließen. In der Literatur liegen hierzu keine Vergleichsdaten vor.

Das muskarin-cholinerge System ist an der Kontraktion der glatten Muskulatur der Atemwege und der bronchialen Schleimsekretion beteiligt und muss im Zusammenhang mit dem sympatho-adrenergen System, das die Bronchodilatation bewirkt, betrachtet werden. Die adrenergen β -Rezeptoren (hauptsächlich vom Subtyp β_2) verhalten sich in ihrer Verteilung umgekehrt zu den muskarin-cholinergen Rezeptoren (Lunge > Bronchien >>> Trachea). Im Respirationstrakt von an RAO erkrankten Pferden wurde eine verminderte Anzahl der β_2 -Adrenozeptoren in Bronchien und Lungenparenchym (42% und 33% niedriger) im Vergleich zu gesunden Pferden festgestellt und eine verminderte β -Agonisten-induzierte Stimulierbarkeit der Adenylatzyklase in den Atemwegen gemessen (ABRAHAM et al. 2007A). Eine Abnahme der β_2 -Adrenozeptorzahl wurde ebenfalls bei Asthmatikern nachgewiesen (SZENTIVANYI 1979) und auch experimentelle Daten aus Tiermodellen für das Asthma beim Menschen bestätigten dies (ENGELS et al. 1989). Es stellte sich immer die Frage, ob die klinischen Erscheinungen des Asthma bronchiale beim Menschen und bei der RAO des Pferdes hiermit erklärt werden können, vor allem, weil zum Teil über keine Veränderungen (HADDAD et al. 1996), aber auch über eine erhöhte Expression von β -adrenerger Rezeptoren bei Asthma berichtet wurde (BAI et al. 1992). Unterschiedliche Ergebnisse der β -Adrenozeptordichte beim Asthma können durch verschiedene Faktoren bedingt sein, wie besonders die Schwere des Krankheitsbildes und rezeptorbeeinflussende Arzneimittel, die die Rezeptordichte erheblich beeinflussen können.

M₂-Rezeptoren sind an G_i-Proteine gekoppelt und senken über die Hemmung der AC den cAMP-Spiegel und führen damit zu einer Kontraktion der glatten Muskulatur. Dieser Signalweg steht in direktem Gleichgewicht mit der β_2 -G_s-Proteininteraktion, welche die cAMP-Bildung über eine Stimulation der AC steigert. Beide G-Proteine (G_i und G_s) beeinflussen das Effektorprotein Adenylatzyklase.

Bisher wurde festgestellt, dass die mit Isoproterenol (β_2) stimulierte AC-Aktivität im equinen Respirationstrakt von Trachea über Bronchien bis hin zur Lunge abnimmt und somit der segmentabhängigen β_2 -Rezeptordichte im Respirationstrakt gegenläufig ist (ABRAHAM et al. 2003). Bestätigt wurde diese These durch Versuche bei Meerschweinchen und Kaninchen, wo ein

topographischer Unterschied in der Signalübertragungskaskade des β_2 -Adrenozeptors beobachtet werden konnte. Dies äußerte sich in einer stärkeren Relaxation in der Trachea als in den Bronchien trotz geringerer Rezeptordichte, was als Hinweis auf eine effektivere Signaltransduktion in der Trachea gewertet werden kann (SCHRAMM 2000). Im Respirationstrakt von Rindern hingegen scheint die Aktivität der AC eine geringere Rezeptordichte, wie zum Beispiel bei älteren Tieren, auszugleichen, weil sich die gemessene cAMP-Produktion nicht unterscheidet (ROETS u. BURVENICH 1995).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen im gesunden Gewebe ebenfalls eine segmentabhängige Reduzierung der AC-Aktivität von Trachea über Bronchien bis hin zur Lunge (Abb. 24). Oxotremorin M (M_2) war in der Lage, die Forskolin-induzierte cAMP-Produktion in allen drei Segmenten des equinen Respirationstrakts zu hemmen, was die M_2 -Rezeptor-vermittelte Hemmung der AC bestätigt. Der Vergleich der Wirkung der beiden Substanzen NEM und PTX auf die Forskolin-induzierte cAMP-Produktion zeigte, dass NEM in der Lage ist, bei gesunden und RAO-erkrankten Pferden die induzierte cAMP-Produktion zu hemmen (Abb. 25 und 26). PTX hemmte die Forskolin-induzierte cAMP-Produktion nicht (Abb. 27). Dieser Unterschied in der Wirkung beider Hemmstoffe ist darin begründet, dass NEM, im Gegensatz zu PTX, einen direkten Einfluss auf die Schwefel-Wasserstoff-Gruppen des katalytischen Zentrums der AC nimmt und diese alkyliert (SIGAFOOS u. ABRAMOWITZ 1986, TAKATS et al. 1990). Durch NEM werden somit nicht nur die G_i -Proteine inaktiviert, sondern gleichzeitig auch die AC direkt gehemmt. Folglich überschattet die Veränderung der AC in den mit NEM durchgeführten Versuchsansätzen die Alkylierung der G_i -Proteine. Aus diesem Grund kann nur PTX zur Überprüfung der M_2 - G_i -Protein-AC-Signalkaskade verwendet werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die AC-Aktivität nicht nur in den verschiedenen Segmenten des equinen Respirationstrakts, sondern auch zwischen der Kontrollgruppe und der RAO-Gruppe unterscheidet. Die Forskolin-induzierte cAMP-Produktion war im Allgemeinen bei an RAO-erkrankten Pferden reduziert (Abb. 28). Unter dem M_2 -Rezeptoragonisten Oxotremorin M zeigte sich, dass Oxotremorin M die Forskolin-induzierte cAMP-Produktion hemmt und PTX in der Lage ist, diese M_2 -Rezeptor-vermittelte Hemmung (durch Entkopplung der G_i -Proteine vom M_2 -Rezeptor) zu unterbinden (Abb. 28). Der Hauptunterschied hinsichtlich der Funktionalität der M_2 - G_i -Protein-AC-Signalkaskade zwischen gesunden und RAO-erkrankten Pferden blieb folglich die Beobachtung, dass die Forskolin-induzierte cAMP-Produktion bei an RAO-erkrankten Pferden im Vergleich zu gesunden Pferden

reduziert ist. Dies deckt sich mit der Hypothese, dass die G_i -Expression im erkrankten Gewebe erhöht ist (siehe oben). Eine krankheitsbedingte Verschiebung des G_s/G_i -Gleichgewichts zugunsten des G_i -Protein-Signalwegs und die verringerte β_2 -Adrenozeptorzahl bei RAO-Pferden wäre als funktioneller Mechanismus zur Erklärung der gemessenen Verminderung der cAMP-Produktion denkbar, der letztendlich zu einer Bronchokonstriktion bei RAO-erkrankten Pferden führen könnte.

Im Einklang mit den beschriebenen Erkenntnissen war in der Trachealmuskulatur von Kaninchen die verstärkte M_2 - G_i -Protein-Hemmung der Isoproterenol-induzierten Relaxation mit einer verminderten cAMP-Bildung und mit einer erhöhten G_i -Protein-Expression assoziiert (HAKONARSON et al. 1995). In Bronchien und im Lungenparenchym des equinen Respirationstrakts scheint dies ebenfalls der Fall zu sein, wobei die geringe Rezeptordichte die Erfassung der funktionellen Interaktion auf der Ebene „Rezeptor – G-Protein“ schwierig macht. Im Gegensatz hierzu zeigen die Ergebnisse von Versuchen mit Basenji-Greyhound-Hunden mit unspezifischer natürlicher Hyperreaktivität der Atemwege eine erhöhte M_2 -Rezeptor-Expression, kombiniert mit einer verstärkten Hemmung der AC (EMALA et al. 1995). Weiterhin wurde eine Dysfunktion muskarin-cholinerger Autorezeptoren (M_2) vermutet (ZHANG et al. 1999), jedoch belegten andere funktionelle Studien dies nicht (WANG et al. 1995A). Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Probenmaterial beinhaltet präparationsbedingt postsynaptische und präsynaptische muskarin-cholinerge M_2 -Rezeptoren. Deshalb konnten die Untersuchungen keinen vollständigen Aufschluss darüber geben, ob die M_2 -Rezeptor- G_i -Protein-Interaktion post- oder präsynaptisch verändert ist. Grundsätzlich kann beim Asthma oder so genannten „Asthmatiermodellen“ – wie auch hier bei der RAO des Pferdes – eine gestörte M_2 -Rezeptor- G_i -Protein-Interaktion des präsynaptischen M_2 -Rezeptors als wahrscheinlich angenommen werden. Sowohl durch Antigensensibilisierung, als auch durch Infektion mit Parainfluenzaviren oder durch Ozon und andere allergene Substanzen konnte in Asthmatermodellen eine funktionelle Veränderung des präsynaptischen M_2 -Rezeptors festgestellt werden. So konnten zum Beispiel COSTELLO et al (1997) in Ovalbumin-sensibilisierten Meerschweinchen sowie SONG et al. (1997) in sensibilisierten Bronchialringen vom Menschen nach Antigenexposition eine Infiltration von eosinophilen Granulozyten, die das Major Basic Protein (MBP) freisetzen, nachweisen. MBP bindet als allosterischer Antagonist an den M_2 -Rezeptor und blockiert dadurch den negativen Rückkopplungsmechanismus der Acetylcholinfreisetzung (JACOBY et al. 1993). Andere Untersuchungen bestätigen die Rolle von MBP bei der Pathogenese der obstruktiven Atemwegserkrankungen (SCHULTHEIS et al. 1994, YOST et al. 1999). Die Rolle des MBP bleibt

aber bei der RAO des Pferdes fraglich, weil hier eine Infiltration von neutrophilen Granulozyten vorherrscht (im Gegensatz zu einer Eosinophilie beim Asthma bronchiale), die jedoch ebenfalls Substanzen freisetzen, die zu einer Veränderung des Atemwegsepithels beitragen können (SASSE 2000, DAVIS und RUSH 2002). Proinflammatorische Zytokine sollen die Bindungskapazität des Rezeptors ebenfalls beeinflussen (JACOBY et al. 1998). In einer früheren Untersuchung beim Asthma bronchiale wurde gezeigt, dass die hemmende Funktion präsynaptischer Rezeptoren verringert zu sein scheint (MINETTE et al. 1989).

Die Dysfunktion des präsynaptischen M_2 -Rezeptors, ob durch MBP, Cytokine oder Allergene bedingt, führt zu einer allmählichen Freisetzung von Acetylcholin aus den parasympathischen Nervenfasern und somit zu einer Kontraktion der Atemwege, die mit einer Hypersekretion einher geht. Postsynaptisch können der M_2 - und M_3 -Rezeptorsignalweg ebenfalls eine Konstriktion der Atemwege und eine Hypersekretion verursachen. Über einen Cross-Talk-Mechanismus wird gleichzeitig das adrenerge Nervensystem durch das muskarin-cholinerge System negativ beeinflusst, was zu einer Downregulation und damit zu einer herabgesetzten Ansprechbarkeit für Sympathomimetika (Relaxation) führt. So kann bereits die Veränderung der G_i -Proteinmenge im Bereich des präsynaptischen M_2 -Rezeptors beim Asthma bronchiale und der equinen RAO zu einer übermäßigen Atemwegshyperreaktivität führen.

Allerdings könnte auch die Phosphorylierung der β -Adrenozeptoren durch die Proteinkinase C, die durch Aktivierung von M_3 -Rezeptoren induziert wird, hierbei eine tragende Rolle spielen. GRANDORDY et al. 1994 konnten diesen Effekt in der Trachealmuskulatur von gesunden Rindern feststellen und schlussfolgerten daraus, dass eine Verbindung zum herabgesetzten Kopplungsvermögen der β -Adrenozeptoren beim Asthma besteht. Von TOHDA et al. 2002 wurde der Bronchospasmus bei mit Ovalbumin sensibilisierten Meerschweinchen mit einer Überexpression des M_3 -Rezeptors erklärt, ohne dabei die Signalkaskade zu untersuchen.

M_3 -Rezeptoren koppeln an G_q -Proteine, die das membranständige Enzym PLC aktivieren, wodurch es über weitere Schritte zur Kontraktion der glatten Muskulatur kommt. Dieser Signalweg ist somit ein direkter Gegenspieler der β_2 -Rezeptor-Signalkaskade (siehe oben). Die Expressionsdichte und Verteilung des M_3 -Subtyps im Respirationstrakt von an RAO-erkrankten Pferden ist zumindest nicht verändert, aber in Kombination mit der Abnahme der β_2 -Adrenozeptoren kommt es zu einer Verschiebung des physiologischen Verhältnisses zwischen Kontraktion und Relaxation der glatten Atemwegsmuskulatur auf die Seite der Kontraktion (KOTTKE 2005).

Ursache für die beschriebenen Veränderungen der muskarin-cholinergen Signalkaskade ist wahrscheinlich eine Beeinflussung durch proinflammatorische Zytokine und/oder Allergene. Eine große Anzahl an Entzündungsmediatoren tritt mit einer Vielzahl von intrazellulären Signalwegen in Wechselwirkung, die in ihrem Zusammenspiel zur Bronchokonstriktion bei der RAO des Pferdes führen können. Untersuchungen, die diese Zusammenhänge aufklären, könnten in Zukunft zum Verständnis der Pathogenese der RAO beitragen und neue pharmakologische Angriffspunkte aufzeigen. Zumindest ist die Veränderung der M₂-Rezeptor-G_i-Protein-AC-Signalkaskade ein wichtiger Baustein, der zum klinischen Erscheinungsbild der RAO beim Pferd beiträgt. Die Ergebnisse zeigen, dass bei der RAO nicht nur eine Verschiebung des muskarin-cholinergen/adrenergen Gleichgewichts durch β -Adrenozeptor-Downregulation, sondern auch eine erhöhte Funktionalität des M₂-Rezeptor-G_i-Protein-AC-Signalkaskade zur erhöhten bronchokonstriktorischen Aktivität beiträgt. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern somit die Grundlage für ein Evidenz-basiertes Konzept der Pharmakotherapie der RAO des Pferdes mit Muskarin-M₂-selektiven Antagonisten zusätzlich zur etablierten Basistherapie mit β_2 -Sympathomimetika, insbesondere wenn gegenüber diesen bereits eine Toleranz besteht.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Peter Hajek

Veränderung der Muskarin-(M₂)-Rezeptor-G_i-Protein-Adenylatzyklase-Interaktion in den respiratorischen Segmenten der Atemwege bei der Recurrent Airway Obstruction (RAO) des Pferdes

Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

eingereicht im November 2008

108 Seiten, 28 Abbildungen, 14 Tabellen, 142 Literaturangaben

Schlüsselwörter: RAO, ³⁵S-GTPγS, Atemwege

Muskarin-cholinerge und adrenerge Rezeptoren des autonomen Nervensystems im Respirationstrakt spielen sowohl bei der physiologischen Regulation der Atemwegsfunktion als auch bei der Entstehung und Behandlung wiederkehrender obstruktiver Atemwegserkrankungen (RAO) des Pferdes eine wichtige Rolle. Im Wesentlichen sorgen diese Rezeptorsysteme für eine Relaxation und bzw. oder Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur. Bei einer Erkrankung der Atemwege wird eine Störung der Balance beider Rezeptorsysteme vermutet. Neuere Forschungsergebnisse belegen, dass zum einen der β-adrenerge Rezeptor-G_s-Protein-Adenylatzyklase-Signalweg im Respirationstrakt RAO-erkrankter Pferde beeinträchtigt ist. Gleichzeitig war die Verteilung und Dichte der muskarin-cholinergen Rezeptoren unverändert. Die Signaltransduktionswege, insbesondere die des muskarin-cholinergen Rezeptorsystems, wurden jedoch bisher noch nicht ausreichend untersucht.

Membranen des Lungenparenchyms sowie des Tracheal- und Bronchialepithels mit der darunter liegenden glatten Muskulatur gesunder und RAO-erkrankter Pferde wurden hinsichtlich der Funktionalität der M₂-Rezeptor-G_i-Protein-AC-Kopplungsmechanismen mittels ³⁵S-GTPγS-Bindungsstudien untersucht.

Mit verschiedenen muskarin-cholinergen Agonisten und den Substanzen N-Ethylmaleimid (NEM) und Pertussistoxin (PTX) wurde die M₂-Rezeptor-G_i-Protein-Kopplung überprüft. Vorher war die Ermittlung der Konzentrationen von Na⁺ (200 mmol/l), Mg²⁺ (10 mmol/l) und GDP (10 μmol/l) zur Etablierung einer optimierten ³⁵S-GTPγS-Bindung notwendig.

Es konnte gezeigt werden, dass die Basalbindung und die Agonisten-stimulierte ³⁵S-GTPγS-Bindung zeitabhängig ist und eine Inkubationszeit festgelegt werden musste, bei der eine hohe relative Stimulation gemessen werden konnte. Diese Inkubationszeit lag bei 120 min bei einer Temperatur von 30°C. Bis zu

ZUSAMMENFASSUNG

diesem Zeitpunkt stieg die relative Stimulation der ^{35}S -GTP γ S-Bindung.

Die muskarin-cholinergen Agonisten Oxotremorin M, Carbachol und Acetylcholin waren in der Lage die ^{35}S -GTP γ S-Bindung in allen untersuchten Segmenten bei gesunden und bei an RAO-erkrankten Pferden zu stimulieren, wobei Oxotremorin M die ^{35}S -GTP γ S-Bindung stärker als Carbachol und Acetylcholin stimulierte. Die maximale relative Stimulation lag in den Bronchien bei 126 %, in der Trachea bei 104 % und in der Lunge bei 41 %. Diese segmentabhängige Stimulierbarkeit der ^{35}S -GTP γ S-Bindung entspricht der Dichte der M_2 -muskarin-cholinergen Rezeptoren, die an G_i -Proteine gekoppelt sind. Bei an RAO-erkrankten Pferden konnte eine tendenziell stärkere Agonisten-stimulierte Interaktion zwischen den M_2 -muskarin-cholinergen Rezeptoren und G_i -Proteinen gemessen werden (Bronchien 141 % und Lunge 78 %) als bei gesunden Pferden. Dies könnte mit einer erhöhten Anzahl an Bindungsstellen für ^{35}S -GTP γ S begründet sein, was eine erhöhte Menge an G_i -Proteinen im erkrankten Gewebe bedeuten würde. Hierfür spricht die Hemmung der ^{35}S -GTP γ S-Bindung mit NEM und PTX, die die Agonisten-vermittelte ^{35}S -GTP γ S-Bindung im Gewebe von an RAO-erkrankten Pferden schwächer hemmte als im Gewebe von gesunden Pferden.

Die indirekte Messung der AC-Aktivität zeigte eine segmentabhängige Reduzierung der cAMP-Produktion von Trachea über Bronchien bis hin zur Lunge. Oxotremorin M hemmte die Forskolin-vermittelte cAMP-Produktion, und PTX war in der Lage diese durch Entkopplung der G_i -Proteine vom M_2 -Rezeptor zu hemmen. Ein weiterer Hinweis auf die erhöhte Menge von G_i -Proteinen im Gewebe RAO-erkrankter Pferde war die gemessene Reduzierung der Forskolin-induzierten cAMP-Produktion.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig die Methode zur Messung der Rezeptorinteraktion mit korrespondierenden G-Proteinen - die ^{35}S -GTP γ S-Bindung - in Geweben des Respirationstrakts von Pferden etabliert. Die Stimulation mit muskarin-cholinergen Agonisten führte zu einer erhöhten ^{35}S -GTP γ S-Bindung bei an RAO-erkrankten Pferden. Außerdem konnte bei RAO eine Reduzierung der Forskolin-induzierten cAMP-Produktion beobachtet werden. Diese Ergebnisse deuten auf eine erhöhte G_i -Proteinmenge hin. Somit verschiebt sich bei RAO das G_i/G_s -Gleichgewicht auf Seite des G_i -Protein-vermittelten Signalwegs. Diese Veränderung des M_2 -Rezeptor- G_i -Protein-Signalwegs trägt, wie auch die Verschiebung des muskarin-cholinergen/adrenergen Gleichgewichts durch β -Adrenozeptor-Downregulation, letztendlich zur bronchokonstriktorisches Aktivität bei RAO bei. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern somit die Grundlage für ein Evidenz-basiertes Konzept der Pharmakotherapie der RAO des Pferdes mit Muskarin- M_2 -selektiven Antagonisten zusätzlich zur etablierten Basistherapie mit β_2 -Sympathomimetika, insbesondere wenn gegenüber diesen bereits eine Toleranz besteht.

7 SUMMARY

Peter Hajek

Alteration of the Muscarinic-(M₂)-Receptor-G_i-Protein-Adenylyl-cyclase-Interaction in segments of equine respiratory tract in Recurrent Airway Obstruction (RAO) of the horse

Institute of Pharmacology, Pharmacy and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

submitted in November 2008

108 pages, 28 figures, 14 tables, 142 references

Keywords: RAO, ³⁵S-GTPγS, airways

Muscarinic acetylcholine receptor (mAChR) and β-adrenergic receptors play a dominant role in the regulation of airway basal tone and are involved in pathological alterations in airway diseases. Activation of muscarinic acetylcholine receptors lead to contraction of the airway smooth muscles where as β-adrenergic receptors relax the airway smooth muscles, thus both receptor systems balance the function of the airway smooth muscle tone. In airway diseases supposed to occur an imbalance between the two receptor mechanisms.

Recent studies have shown that the β-adrenergic receptor G_s-protein adenylyl cyclase pathway is changed in bronchial smooth muscle and in lung parenchyma in RAO. In contrast the segment dependent receptor density and appearance of different receptor subtypes of the muscarin-cholinergic system is not altered in horses with Recurrent Airway Obstruction (RAO). The signal pathways especially of the mAChRs have not been investigated thoroughly.

In the present study, the muscarinic M₂ receptor G_i-protein Adenylyl cyclase coupling mechanism was investigated in membranes of tracheal and bronchial epithelium with the underlying smooth muscle and lung parenchyma obtained from healthy horses and from horses with RAO using ³⁵S-GTPγS binding assays. Using these binding studies, the receptor-G-protein-coupling were assessed by using different muscarin-cholinergic agonists and substances like N-ethylmaleimid (NEM) and pertussistoxin (PTX). In advance, it was necessary to detect the concentrations of Na⁺ (200 mmol/l), Mg²⁺ (10 mmol/l) and GDP (10 μmol/l) to establish an optimized ³⁵S-GTPγS binding study.

The basal and the agonist stimulated ³⁵S-GTPγS binding is influenced by the incubation time. The

SUMMARY

relative stimulation of the ^{35}S -GTP γ S binding achieved the maximum at 120 min. Even though a higher total ^{35}S -GTP γ S binding was measured after 120 min, the relative stimulation was decreasing.

The muscarin-cholinergic agonists oxotremorin M, carbachol and acetylcholin stimulated the ^{35}S -GTP γ S binding in all three investigated segments of the control group and in the segments of horses with RAO with the potency oxotremorin M > carbachol > acetylcholin. The highest relative stimulation was measured in bronchus (126 %) followed by trachea (104 %) and the lung (41 %). This segment dependent reduction is similar to the density of M_2 -receptors which are coupled to G_i -proteins. In the segments of horses with RAO the relative stimulation induced by the agonists shows the tendency to be higher than in the segments of healthy horses (bronchus 141 % and lung 78 %). One explanation is a higher number of binding sites for ^{35}S -GTP γ S which implies that there is a higher number of G_i -proteins in the respiratory tract in RAO. The same conclusion can be made due to weaker inhibition of the ^{35}S -GTP γ S binding by NEM and PTX in the segments of horses with RAO than in the control group.

The activity of the AC was specified by measuring the cAMP-production. The cAMP-production decreased segment dependent from trachea to lung. Oxotremorin M inhibited the forskolin induced cAMP-production and PTX reduced the oxotremorin M induced inhibition by uncoupling the G_i -proteins from the M_2 -receptors. The forskolin induced cAMP-production in RAO was reduced and indicates again that there is a higher expression of G_i -proteins in RAO.

In this study the ^{35}S -GTP γ S binding was established for the first time for native tissue of the respiratory tract in horses. The stimulation of the ^{35}S -GTP γ S binding by muscarin-cholinergic receptor agonists led to an increase of the ^{35}S -GTP γ S binding in horses with RAO. Furthermore, there was a reduced forskolin induced cAMP-production observed in RAO. These results indicates higher expression of G_i -proteins. Consequently the G_i - G_s -balance shifts to the side of the G_i -protein pathway in RAO. This alteration of muscarinic M_2 receptor G_i -protein adenylyl cyclase pathway leads in combination with the reduced density of β_2 -adrenergic receptors to a constriction of the bronchial smooth muscle in equine RAO. The results of this study provide the basis for an evidence based concept for pharmacotherapy of the equine RAO with muscarinic- M_2 -selective antagonists in addition to the therapy with β_2 -sympathomimetics, particularly in occurrence of a pharmacological tolerance.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Aas P, Maclagan J. Evidence for prejunctional M2 muscarinic receptors in pulmonary cholinergic nerves in the rat. *Br J Pharmacol.* 1990;101:73-6.
- 2 Abraham G, Kottke C, Ammer H, Dhein S, Ungemach FR. Segment-dependent expression of muscarinic acetylcholine receptors and G-protein coupling in the equine respiratory tract. *Vet Res Commun.* 2007B;31:207-26.
- 3 Abraham G, Kottke C, Dhein S, Ungemach FR. Agonist-independent alteration in beta-adrenoceptor-G-protein-adenylate cyclase system in an equine model of recurrent airway obstruction. *Pulm Pharmacol Ther.* 2006, 19: 218-229.
- 4 Abraham G, Kottke C, Ungemach FR. Alteration of β -Adrenoceptor Expression and Function during Bronchial Hyper-responsiveness: No Evidence for Adrenergic involvement in Tracheal Smooth muscle and Epithelium. *Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol* 2003;367: R104.
- 5 Abraham G, Kottke C, Ungemach FR. Equine recurrent airway obstruction does not alter airway muscarinic acetylcholine receptor expression and subtype distribution. *J Vet Pharmacol Ther.* 2007A;30:401-9.
- 6 Asano T, Ogasawara N. Uncoupling of γ -aminobutyric acid B receptors from GTP-binding proteins by N-Ethylmaleimide: effect of N-Ethylmaleimide on purified GTP-binding proteins. *Mol Pharmacol.* 1986; 29:244-9
- 7 Bai TR. Beta 2 adrenergic receptors in asthma: a current perspective. *Lung.* 1992;170:125-41.
- 8 Bai TR, Mak JC, Barnes PJ. A comparison of beta-adrenergic receptors and in vitro relaxant responses to isoproterenol in asthmatic airway smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1992;6:647-51.
- 9 Barnes PJ. Beta-adrenergic receptors and their regulation. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;152: 838-860.
- 10 Barnes PJ. Muscarinic receptor subtypes in airways. *Life Sci.* 1993;52:521-7.
- 11 Billington CK, Penn RB. Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle. *Respir Res.* 2003;4:2.
- 12 Birnbaumer L, Abramowitz J, Brown AM. Receptor-effector coupling by G proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1990;1031:163-224.
- 13 Blaber LC, Fryer AD, Maclagan J. Neuronal muscarinic receptors attenuate vagally induced contraction of feline bronchial smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 1985;86:723-8.
- 14 Böhm M, Gierschik P, Schwinger RH, Uhlmann R, Erdmann E. Coupling of M-cholinoceptors and A1 adenosine receptors in human myocardium. *Am J Physiol.* 1994;266:H1951-8.
- 15 Bonner TI, Young AC, Brann MR, Buckley NJ. Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes. *Neuron.* 1988;1:403-10.

- 16 Bracher V, von Fellenberg R, Winder CN, Gruenig G, Hermann M, Kraehenmann A. An investigation of the incidence of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in random populations of Swiss horses. *Equine Vet J.* 1991;23:136-41.
- 17 Breivogel CS, Selley DE, Childers SR. Cannabinoid receptor agonist efficacy for stimulating [35S]GTP γ S binding to rat cerebellar membranes correlates with agonist-induced decreases in GDP affinity. *J Biol Chem.* 1998;273:16865-73.
- 18 Broadstone RV, LeBlanc PH, Derksen FJ et al. In vitro responses of airway smooth muscle from horses with recurrent airway obstruction. *Pulm Pharmacol* 1991;4: 191-202.
- 19 Brown DA, Forward A, Marsh S. Antagonist discrimination between ganglionic and ileal muscarinic receptors. *Br J Pharmacol.* 1980;71:362-4.
- 20 Canning BJ, Udem BJ. Evidence that antidromically stimulated vagal afferents activate inhibitory neurones innervating guinea-pig trachealis. *J Physiol* 1994;480: 613-625.
- 21 Caulfield MP. Muscarinic receptors--characterization, coupling and function. *Pharmacol Ther.* 1993;58:319-79.
- 22 Chapman, KR. The role of anticholinergics in asthma and COPD. In: J. Zaagsma, H. Meurs und A.F. Roffel (Eds): *Muscarinic receptors in airways diseases*, Birkhäuser Verlag, 2001;203-219.
- 23 Chelala JL, Kilani A, Miller MJ, Martin RJ, Ernsberger P. Muscarinic receptor binding sites of the M4 subtype in porcine lung parenchyma. *Pharmacol Toxicol.* 1998;83:200-7.
- 24 Costa T, Lang J, Gless C, Herz A. Spontaneous association between opioid receptors and GTP-binding regulatory proteins in native membranes: specific regulation by antagonists and sodium ions. *Mol Pharmacol.* 1990;37:383-94.
- 25 Costello RW, Schofield BH, Kephart GM, Gleich GJ, Jacoby DB, Fryer AD. Localization of eosinophils to airway nerves and effect on neuronal M2 muscarinic receptor function. *Am J Physiol.* 1997;273:L93-103.
- 26 Davis E, Rush BR. Equine recurrent airway obstruction: pathogenesis, diagnosis, and patient management. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2002;18:453-67.
- 27 Derksen FJ, Robinson NE, Scott JS, Stick JA. Aerosolized *Micropolyspora faeni* antigen as a cause of pulmonary dysfunction in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). *Am J Vet Res.* 1988;49:933-8.
- 28 Dixon PM, Railton DI, McGorum BC. Equine pulmonary disease: a case control study of 300 referred cases. Part 1: Examination techniques, diagnostic criteria and diagnoses. *Equine Vet J.* 1995;27:416-21.
- 29 Eglen RM, Hedge SS, Watson N. Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function. *Pharmacol Rev.* 1996;48:531-65.
- 30 Eglen RM, Reddy H, Watson N, Challiss RA. Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in smooth muscle. *Trends Pharmacol Sci.* 1994;15:114-9.

- 31 Emala CW, Aryana A, Levine MA, Yasuda RP, Satkus SA, Wolfe BB, Hirshman CA. Basenji-greyhound dog: increased m2 muscarinic receptor expression in trachealis muscle. *Am J Physiol.* 1995;268:L935-40.
- 32 Engels F, Carstairs JR, Barnes PJ, Nijkamp FP. Autoradiographic localization of changes in pulmonary beta-adrenoceptors in an animal model of atopy. *Eur J Pharmacol.* 1989;164:139-46.
- 33 Evans CM, Fryer AD, Jacoby DB et al. Pretreatment with antibody to eosinophil major basic protein prevents hyperresponsiveness by protecting neuronal M2 muscarinic receptors in antigen-challenged guinea pigs. *J Clin Invest* 1997;100: 2254-2262.
- 34 Felder CC. Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. *FASEB J.* 1995;9:619-25.
- 35 Ferguson SS. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* 2001;53:1-24.
- 36 Fernandes LB, Fryer AD, Hirshman CA. M2 muscarinic receptors inhibit isoproterenol-induced relaxation of canine airway smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992;262:119-26.
- 37 Fernandes LB, Henry PJ, Goldie RG. β -Adrenoceptor agonists. In: Clive P. Page und Peter J Barnes (Eds.): *Pharmacology and Therapeutics of Asthma and COPD*, Springer Verlag (Berlin, Heidelberg), 2004: 3-36.
- 38 Folkerts G, Busse WW, Nijkamp FP, Sorkness R, Gern JE. Virus-induced airway hyperresponsiveness and asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157:1708-20.
- 39 Fryer AD, el-Fakahany EE, Jacoby DB. Parainfluenza virus type 1 reduces the affinity of agonists for muscarinic receptors in guinea-pig lung and heart. *Eur J Pharmacol.* 1990;181:51-8.
- 40 Fryer AD, Jacoby DB. Effect of inflammatory cell mediators on M2 muscarinic receptors in the lungs. *Life Sci.* 1993;52:529-36.
- 41 Fryer AD, Maclagan J. Muscarinic inhibitory receptors in pulmonary parasympathetic nerves in the guinea-pig. *Br J Pharmacol.* 1984;83:973-8.
- 42 Fryer AD, Wills-Karp M. Dysfunction of M2-muscarinic receptors in pulmonary parasympathetic nerves after antigen challenge. *J Appl Physiol.* 1991;71:2255-61.
- 43 Garvey DS, Wasicak JT, Chung JY, Shue YK, Carrera GM, May PD, McKinney MM, Anderson D, Cadman E, Vella-Rountree L, et al. Synthesis and in vitro characterization of novel amino terminally modified oxotremorine derivatives for brain muscarinic receptors. *J Med Chem.* 1992;35:1550-7.
- 44 Giraldo E, Micheletti R, Montagna E, Giachetti A, Vigano MA, Ladinsky H, Melchiorre C. Binding and functional characterization of the cardioselective muscarinic antagonist methoctramine. *J Pharmacol Exp Ther.* 1988;244:1016-20.
- 45 Gonzales-Maeso J, Rodriguez-Puertas R, Gabilondo AM, Meana JJ. Characterization of receptor-mediated [³⁵S]GTPgammaS binding to cortical membranes from postmortem human brain. *Eur J Pharmacol.* 2000;390:25-36.

- 46 Grandordy BM, Mak JC, Barnes PJ. Modulation of airway smooth muscle beta-adrenoceptor function by a muscarinic agonist. *Life Sci.* 1994;54:185-91.
- 47 Gurevich VV, Dion SB, Onorato JJ, Ptasienski J, Kim CM, Sterne-Marr R, Hosey MM, Benovic JL. Arrestin interactions with G protein-coupled receptors. Direct binding studies of wild type and mutant arrestins with rhodopsin, beta 2-adrenergic, and m2 muscarinic cholinergic receptors. *J Biol Chem.* 1995;270:720-31.
- 48 Gurevich VV, Richardson RM, Kim CM, Hosey MM, Benovic JL. Binding of wild type and chimeric arrestins to the m2 muscarinic cholinergic receptor. *J Biol Chem.* 1993;268:16879-82.
- 49 Haddad EB, Mak JC, Belvisi MG, Nishikawa M, Rousell J, Barnes PJ. Muscarinic and beta-adrenergic receptor expression in peripheral lung from normal and asthmatic patients. *Am J Physiol.* 1996;270:L947-53.
- 50 Haddad EB, Mak JC, Hislop A, Haworth SG, Barnes PJ. Characterization of muscarinic receptor subtypes in pig airways: radioligand binding and northern blotting studies. *Am J Physiol.* 1994;266:L642-8.
- 51 Haga K, Kameyama K, Haga T, Kikkawa U, Shiozaki K, Uchiyama H. Phosphorylation of human m1 muscarinic acetylcholine receptors by G protein coupled receptor kinase 2 and protein kinase C. *J Biol Chem.* 1996;271:2776-82.
- 52 Hakonarson H, Herrick DJ, Grunstein MM. Mechanism of impaired beta-adrenoceptor responsiveness in atopic sensitized airway smooth muscle. *Am J Physiol.* 1995;269:L645-52.
- 53 Harrison C, Traynor JR. The 35S-GTPγS binding assay: approaches and applications in pharmacology. *Life Sci.* 2003;74:489-508.
- 54 Hayashi K, Taki F, Sugiyama S, Takagi K, Satake T, Ozawa T. Mechanism responsible for alterations in numbers of autonomic nerve receptors in experimental asthma. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1988;86:170-5.
- 55 Hilf G, Gierschik P, Jakobs KH. Muscarinic acetylcholine receptor-stimulated binding of guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) to guanine-nucleotide-binding proteins in cardiac membranes. *Eur J Biochem.* 1989;186:725-31.
- 56 Hilf G, Jakobs KH. Activation of cardiac G-proteins by muscarinic acetylcholine receptors: regulation by Mg²⁺ and Na⁺ ions. *Eur J Pharmacol.* 1989;172:155-63.
- 57 Hilf G, Jakobs KH. Agonist-independent inhibition of G protein activation by muscarinic acetylcholine receptor antagonists in cardiac membranes. *Eur J Pharmacol.* 1992;225:245-52.
- 58 Horstman DA, Brandon S, Wilson AL, Guyer CA, Cragoe EJ Jr., Limbird LE. An aspartate conserved among G-protein receptors confers allosteric regulation of alpha 2-adrenergic receptors by sodium. *J Biol Chem.* 1990;265:21590-5.
- 59 Hosey MM, Benovic JL, DebBurman SK, Richardson RM. Multiple mechanisms involving protein phosphorylation are linked to desensitization of muscarinic receptors. *Life Sci.* 1995;56:951-5.
- 60 Insel PA, Wasserman SI. Asthma: a disorder of adrenergic receptors? *FASEB J*

- 1990;4:2732-2736.
- 61 Jacoby DB, Gleich GJ, Fryer AD. Human eosinophil major basic protein is an endogenous allosteric antagonist at the inhibitory muscarinic M2 receptor. *J Clin Invest.* 1993;91:1314-8.
 - 62 Jacoby DB, Xiao HQ, Lee NH, Chan-Li Y, Fryer AD. Virus- and interferon-induced loss of inhibitory M2 muscarinic receptor function and gene expression in cultured airway parasympathetic neurons. *J Clin Invest.* 1998;102:242-8.
 - 63 Kaliner M, Shelhamer JH, Davis PB et al. Autonomic nervous system abnormalities and allergy. *Ann Intern Med* 1982;96: 349-357.
 - 64 Kneussl M. Regulation of the tracheobronchial and lung vascular system: innervation and receptors. *Wien Klin Wochenschr* 1986;98: 7013-7025.
 - 65 Koenig JA, Edwardson JM. Endocytosis and recycling of G protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 1997;18:276-87.
 - 66 Kottke C. Beta-adrenerge und muskarin-cholinerge Rezeptoren im Respirationstrakt des Pferdes: Vergleichende Untersuchungen zwischen gesunden und COB-kranken Pferden [Dissertation med. vet.]. Leipzig: Univ. Leipzig; 2005.
 - 67 Krupnick JG, Benovic JL. The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998;38: 289-319.
 - 68 Kubo T, Fukuda K, Mikami A, Maeda A, Takahashi H, Mishina M, Haga T, Haga K, Ichiyama A, Kangawa K, et al. Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. *Nature.* 1986A;323:411-6.
 - 69 Kubo T, Maeda A, Sugimoto K, Akiba I, Mikami A, Takahashi H, Haga T, Haga K, Ichiyama A, Kangawa K, et al. Primary structure of porcine cardiac muscarinic acetylcholine receptor deduced from the cDNA sequence. *FEBS Lett.* 1986B;209:367-72.
 - 70 Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 2:680-685.
 - 71 Lazareno S, Buckley NJ, Roberts FF. Characterization of muscarinic M4 binding sites in rabbit lung, chicken heart, and NG108-15 cells. *Mol Pharmacol.* 1990;38:805-15.
 - 72 Lazareno S. Measurement of agonist-stimulated 35S-GTP γ S binding to cell membranes. *Methods in Mol Biol,* 1999;106:231-145.
 - 73 Lee JY, Uchida Y, Sakamoto T, Hirata A, Hasegawa S, Hirata F. Alteration of G protein levels in antigen-challenged guinea pigs. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994;271:1713-20.
 - 74 Lee KB, Pals-Rylaarsdam R, Benovic JL, Hosey MM. Arrestin-independent internalization of the m1, m3, and m4 subtypes of muscarinic cholinergic receptors. *J Biol Chem.* 1998;273:12967-72.
 - 75 Lefkowitz RJ, Cotecchia S, Samama P, Costa T. Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Trends Pharmacol Sci.* 1993;14:303-7.

- 76 Liu Y, Wang Y, Ma ML, Zhang Y, Li HW, Chen QW, Yang BF. Cardiac-hemodynamic effects of M3 receptor agonist on rat and rabbit hearts. *Yao Xue Xue Bao*. 2001;36:84-7.
- 77 Lorenzen A, Beukers MW, va de Graff PH, Lang H, van Muijlwijk-Koezen J, de Groote M, Menge W, Schwabe U, Ijzerman AP. Modulation of agonist responses at the A(1) adenosine receptor by an irreversible antagonist, receptor-G protein uncoupling and by the G protein activation state. *Biochem Pharmacol*. 2002;64:1251-65.
- 78 Lorenzen A, Fuss M, Vogt H, Schwabe U. Measurement of guanine nucleotide-binding protein activation by A1 adenosine receptor agonists in bovine brain membranes: stimulation of guanosine-5'-O-(3-[35S]thio)triphosphate binding. *Mol Pharmacol*. 1993;44:115-23.
- 79 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193: 265-75
- 80 Lucchesi PA, Scheid CR, Romano FD, Kargacin ME, Mullikin-Kilpatrick D, Yamaguchi H, Honeyman W. Ligand binding and G protein coupling of muscarinic receptors in airway smooth muscle. *Am J Physiol*. 1990;258: C730-C738.
- 81 Luttrell LM, Lefkowitz RJ. The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci*. 2002;115:455-65.
- 82 Marti E, Gerber H, Essich G, Oulehla J, Lazary S. The genetic basis of equine allergic diseases. 1. Chronic hypersensitivity bronchitis. *Equine Vet J*. 1991;23:457-60.
- 83 McGorum BC, Dixon PM, Halliwell RE. Responses of horses affected with chronic obstructive pulmonary disease to inhalation challenges with mould antigens. *Equine Vet J*. 1993;25:261-7.
- 84 McGowan SE, Smith J, Holmes AJ, Smith LA, Businga TR, Madsen MT, Kopp UC, Kline JN. Vitamin A deficiency promotes bronchial hyperreactivity in rats by altering muscarinic M(2) receptor function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;282:L1031-9.
- 85 Milligan G. Principles: Extending the utility of [35S]GTP γ S binding assays. *Trends Pharmacol Sci*. 2003; 24:87-90
- 86 Minette PA, Lammers JW, Dixon CM, McCusker MT and Barnes PJ. A muscarinic agonist inhibits reflex bronchoconstriction in normal but not in asthmatic subjects. *J Appl Physiol*. 1989;67:2461-5.
- 87 Minette PA, Barnes PJ. Prejunctional inhibitory muscarinic receptors on cholinergic nerves in human and guinea pig airways. *J Appl Physiol*. 1988;64:2532-7.
- 88 Molfino NA, Slutsky AS, Julia-Serda G et al. Assessment of airway tone in asthma. Comparison between double lung transplant patients and healthy subjects. *Am Rev Respir Dis* 1993;148: 1238-1243.
- 89 Newcomb R, Tashkin DP, Hui KK, Conolly ME, Lee E, Dauphinee B. Rebound hyperresponsiveness to muscarinic stimulation after chronic therapy with an inhaled muscarinic antagonist. *Am Rev Respir Dis*. 1985;132:12-5.
- 90 O'Byrne PM. Allergen-induced airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol*

- 1988;81:119-127.
- 91 Offermanns S, Wieland T, Homann D, Sandmann J, Bombien E, Spicher K, Schultz G, Jakobs KH. Transfected muscarinic acetylcholine receptors selectively couple to Gi-type G proteins and Gq/11. *Mol Pharmacol*. 1994;45:890-8.
- 92 Olianias MC, Onali P. Stimulation of guanosine 5'-O-(3-[35S] thiotriphosphate) binding by cholinergic muscarinic receptors in membranes of rat olfactory bulb. *J Neurochem*. 1996;67:2549-56.
- 93 Patel HJ, Barnes PJ, Takahashi T, Tadjkarimi S, Yacoub MH, Belvisi MG. Evidence for prejunctional muscarinic autoreceptors in human and guinea pig trachea. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;152:872-8.
- 94 Peralta EG, Ashkenazi A, Winslow JW, Smith DH, Ramachandran J, Capon DJ. Distinct primary structures, ligand-binding properties and tissue-specific expression of four human muscarinic acetylcholine receptors. *EMBO J*. 1987;6:3923-9.
- 95 Pirie RS, Dixon PM, Collie DD, McGorum BC. Pulmonary and systemic effects of inhaled endotoxin in control and heaves horses. *Equine Vet J*. 2001;33:311-8.
- 96 Remmers AE, Clark MJ, Alt A, Medzihradsky F, Woods JH, Traynor JR. Activation of G protein by opioid receptors: role of receptor number and G-protein concentration. *Eur J Pharmacol*. 2000;396:67-75.
- 97 Richards MH. Relative potencies of agonists and differential sensitivity to N-ethylmaleimide on muscarinic autoreceptors and postsynaptic receptors in rat hippocampus. *J Pharmacol Exp Ther*. 1990;255:83-9.
- 98 Richardson JB, Bouchard T. Demonstration of a nonadrenergic inhibitory nervous system in the trachea of the guinea pig. *J Allergy Clin Immunol* 1975;56: 473-80.
- 99 Richardson JB. Nerve supply to the lungs. *Am Rev Respir Dis* 1979;119: 785-802.
- 100 Richardson RM, Kim C, Benovic JL, Hosey MM. Phosphorylation and desensitization of human m2 muscarinic cholinergic receptors by two isoforms of the beta-adrenergic receptor kinase. *J Biol Chem*. 1993;268:13650-6.
- 101 Roets E, Burvenich C. The influence of ageing on muscarinic receptors, beta-adrenoceptors and adenylate cyclase activity in the bovine lung. *Vet Res Commun*. 1995;19:221-30.
- 102 Roffel AF, Elzinga CR, Van Amsterdam RG, De Zeeuw RA, Zaagsma J. Muscarinic M2 receptors in bovine tracheal smooth muscle: discrepancies between binding and function. *Eur J Pharmacol*. 1988;153:73-82.
- 103 Roux E, Molimard M, Savineau JP, Marthan R. Muscarinic stimulation of airway smooth muscle cells. *Gen Pharmacol*. 1998;31:349-56.
- 104 Salomon Y, Londos C, Rodbell M. A highly sensitive adenylate cyclase assay. *Anal Biochem*. 1974;58:541-8.
- 105 Santing RE, Pasman Y, Olymulder CG, Roffel AF, Meurs H, Zaagsma J. Contribution of a cholinergic reflex mechanism to allergen-induced bronchial hyperreactivity in permanently instrumented, unrestrained guinea-pigs. *Br J Pharmacol*. 1995;114:414-8.

- 106 Sasse H. Clinician's perspective of equine airway disease (heaves). International Workshop on Equine Chronic Airway Disease. Michigan State University 16-18 June 2000. *Equine Vet J.* 2001;33:5-19.
- 107 Sasse HHL. COB Prognose und Behandlungsmaßnahmen: COPD-Prognose and Therapy. *Prakt Tierarzt* 1995;76:66-69.
- 108 Schlocker N, Gerber-Bretscher R, von Fellenberg R. Equine herpesvirus 2 in pulmonary macrophages of horses. *Am J Vet Res.* 1995;56:749-54.
- 109 Schramm CM. Beta-adrenergic relaxation of rabbit tracheal smooth muscle: a receptor deficit that improves with corticosteroid administration. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;292:280-7.
- 110 Schultheis AH, Bassett DJ, Fryer AD. Ozone-induced airway hyperresponsiveness and loss of neuronal M2 muscarinic receptor function. *J Appl Physiol.* 1994;76:1088-97.
- 111 Selley DA, Rodriguez-Puertas R, Gabilondo AM, Meana JJ. Effects of sodium on agonist efficacy for G-protein activation in mu-opioid receptor-transfected CHO cells and rat thalamus. *Br J Pharmacol.* 2000;130:987-96.
- 112 Shi H, Wang H, Wang Z. Identification and characterization of multiple subtypes of muscarinic acetylcholine receptors and their physiological functions in canine hearts. *Mol Pharmacol.* 1999;55:497-507.
- 113 Sigafos JF, Abramowitz J. Effects of N-Ethylmaleimide on gonadotropin and beta-adrenergic receptor function coupled to rabbit luteal adenyl cyclase. *Endocrinology.* 1986;119:1432-8.
- 114 Song P, Milanese M, Crimi E, Rehder K, Brusasco V. Allergen challenge of passively sensitized human bronchi alters M2 and beta2 receptor function. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;155:1230-4.
- 115 Sorkness R, Clough JJ, Castleman WL, Lemanske RF Jr. Virus-induced airway obstruction and parasympathetic hyperresponsiveness in adult rats. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994;150:28-34.
- 116 Spalding TA, Birdsall NJ, Curtis CA, Hulme EC. Acetylcholine mustard labels the binding site aspartate in muscarinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem.* 1994;269:4092-7.
- 117 Szekeres PG, Traynor JR. Delta opioid modulation of the binding of guanosine-5'-O-(3-[35S]-thio)triphosphate to NG-108-15 cell membranes: characterization of agonist and inverse agonist effects. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997; 283:1276-84.
- 118 Szentivanyi A. The conformational flexibility of adrenoceptors and the constitutional basis of atopy. *Triangle.* 1979;18:109-15.
- 119 Takats A, Binh VH, Bertok L. Potential role of SH groups in the radiosensitivity of adenylate cyclase. *Acta Physiol Hung.* 1990;76:265-72.
- 120 ten Berge RE, Krikke M, Teisman AC, Roffel AC, Zaagsma J. Dysfunctional muscarinic M2 autoreceptors in vagally induced bronchoconstriction of conscious guinea pigs after the early allergic reaction. *Eur J Pharmacol.* 1996;318:131-9.

- 121 ten Berge RE, Santing RE, Hamstra JJ, Roffel AF, Zaagsma J. Dysfunction of muscarinic M2 receptors after the early allergic reaction: possible contribution to bronchial hyperresponsiveness in allergic guinea-pigs. *Br J Pharmacol.* 1995;114:881-7.
- 122 Thorsen J, Willoughby RA, McDonell W, Valli VE, Viel L, Bignell W. Influenza hemagglutination inhibiting activity in respiratory mucus from horses with chronic obstructive pulmonary disorders (heaves syndrome). *Can J Comp Med.* 1983;47:332-5.
- 123 Tian WN, Duzic E, Lanier SM, Deth RC. Determinants of alpha 2-adrenergic receptor activation of G proteins: evidence for a precoupled receptor/G protein state. *Mol Pharmacol.* 1994;45:524-31.
- 124 Tohda Y, Haraguchi R, Itoh M, Ohkawa K, Kubo H, Fukuoka M, Nakajima S. Role of muscarinic acetylcholine receptors in a guinea pig model of asthma. *Int Immunopharmacol.* 2002;2:1521-7.
- 125 Törneke K, Inguast-Larsson C, Bostrom A, Appelgren LE. Muscarinic receptors in equine airways. *Vet Res Commun.* 2002;26:637-50.
- 126 Traynor JR, Nahorski SR. Modulation by mu-opioid agonists of guanosine-5'-O-(3-[35S]thio)triphosphate binding to membranes from human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Mol Pharmacol.* 1995;47:848-54.
- 127 Tsuga H, Okuno E, Kameyama K, Haga T. Sequestration of human muscarinic acetylcholine receptor hm1-hm5 subtypes: effect of G protein-coupled receptor kinases GRK2, GRK4, GRK5 and GRK6. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;284:1218-26.
- 128 Uustare A, Nasman J, Akerman KE, Rinken A. Characterization of M2 muscarinic receptor activation of different G protein subtypes. *Neurochem Int.* 2004;44:119-24.
- 129 van Nieuwstadt RA, Henricks PA, Hajer R, van der Meer van Roomen WA, Breukink HJ, Nijkamp FP. Characterization of muscarinic receptors in equine tracheal smooth muscle in vitro. *Vet Q.* 1997;19:54-7.
- 130 Waelbroeck M, Tastenoy M, Camus J, Christophe J. Binding of selective antagonists to four muscarinic receptors (M1 to M4) in rat forebrain. *Mol Pharmacol.* 1990;38:267-73.
- 131 Wang H, Shi H, Lu Y, Yang B, Wang Z. Pilocarpine modulates the cellular electrical properties of mammalian hearts by activating a cardiac M3 receptor and a K⁺ current. *Br J Pharmacol.* 1999;126:1725-34.
- 132 Wang ZW, Yu MF, Robinson NE. Prejunctional muscarinic autoreceptors on horse airway cholinergic nerves. *Life Sci.* 1995B; 56: 2255-62.
- 133 Wang ZW, Yu MF, Robinson NE, Derksen FJ. Acetylcholine release from airway cholinergic nerves in horses with heaves, an airway obstructive disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995A;151:830-5.
- 134 Watson N, Reddy H, Eglen RM. Pharmacological characterization of the muscarinic receptors mediating contraction of canine saphenous vein. *J Auton Pharmacol.* 1995;15:437-41.
- 135 Wieland T, Kreiss J, Gierschik P, Jakobs KH. Role of GDP in formyl-peptide-receptor-

- induced activation of guanine-nucleotide-binding proteins in membranes of HL 60 cells. *Eur J Biochem.* 1992;205:1201-6.
- 136 Wieland T, Liedel K, Kaldenberg-Stasch S, Meyer zu Heringdorf D, Schmidt M, Jakobs KH. Analysis of receptor-G protein interactions in permeabilized cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1995;351:329-36.
- 137 Witt-Enderby PA, Yamamura HI, Halonen M, Lai J, Palmer JD, Bloom JW. Regulation of airway muscarinic cholinergic receptor subtypes by chronic anticholinergic treatment. *Mol Pharmacol* 1994;47:485-490.
- 138 Yang CM, Chou SP, Sung TC. Muscarinic receptor subtypes coupled to generation of different second messengers in isolated tracheal smooth muscle cells. *Br J Pharmacol.* 1991;104:613-8.
- 139 Yasuda RP, Ciesla W, Flores LR, Wall SJ, Li M, Satkus SA, Weisstein JS, Spagnola BV, Wolfe BB. Development of antisera selective for m4 and m5 muscarinic cholinergic receptors: distribution of m4 and m5 receptors in rat brain. *Mol Pharmacol.* 1993;43:149-57.
- 140 Yost BL, Gleich GJ, Fryer AD. Ozone-induced hyperresponsiveness and blockade of M2 muscarinic receptors by eosinophil major basic protein. *J Appl Physiol.* 1999;87:1272-8.
- 141 Yu M, Robinson NE, Wang Z, Derksen FJ. Muscarinic receptor subtypes in equine tracheal smooth muscle. *Vet Res Commun.* 1992;16:301-10.
- 142 Zhang XY, Robinson NE, Zhu FX. Modulation of ACh release from airway cholinergic nerves in horses with recurrent airway obstruction. *Am J Physiol.* 1999;276:L769-75.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. F. R. Ungemach danke ich für die Themenstellung und die Schaffung hervorragender Rahmenbedingungen am Institut und die wertvollen Ratschläge nach der Durchsicht des Manuskripts.

Herrn PD Dr. G. Abraham danke ich für die intensive wissenschaftliche Betreuung, die hilfreichen Anregungen zu den experimentellen Arbeiten und die Durchsicht des Manuskripts.

Den Mitarbeitern und Kollegen des Instituts danke ich für die gute Zusammenarbeit und das freundliche Arbeitsklima.

Den Mitarbeitern aus dem Veterinär-Physiologisch-Chemischen Institut danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes im Sicherheitslabor.

Herrn Prof. Dr. H. Ammer vom Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München für die Bereitstellung von G-Protein-Antikörpern.

Den Rossschlächtereien „Vogt“ in Freiberg und „Wirth“ in Grimma danke ich für die Bereitstellung des Probenmaterials.