

University of Groningen

Heterologous amplification of homologous beta-adrenoceptor desensitization in airway smooth muscle

Boterman, Mark

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2006

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Boterman, M. (2006). *Heterologous amplification of homologous beta-adrenoceptor desensitization in airway smooth muscle: Implications for asthma?*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Nederlandse samenvatting

Astma is een wereldwijd voorkomende ziekte, waarvan de prevalentie steeds verder toeneemt. Deze ziekte wordt gekenmerkt door een chronische ontsteking van de luchtwegen, waarbij vele cellen, zoals mestcellen, eosinofielen, T-lymfocyten, neutrofielen, epitheelcellen en luchtweg gladde spiercellen, een belangrijke rol spelen. In gevoelige personen leidt deze ontsteking tot telkens terugkerende aanvallen van kortademigheid, piepend ademhalen, benauwdheid en hoesten. Een aanval komt vaak 's nachts of 's morgens vroeg en is meestal reversibel. De ontsteking van de luchtwegen gaat tevens gepaard met een overgevoeligheid voor zowel allergische (zoals: uitwerpselen van de huisstofmijt, huidschilfers van dieren, stuifmeel) als niet-allergische (zoals: rook, geuren en mist) prikkels.

Eén van de belangrijkste oorzaken van de benauwdheid bij astma is contractie van de gladde spieren in de bronchuswand. Deze bronchoconstrictie treedt onder andere op als gevolg van afgifte van mediators (zoals histamine) uit ontstekingscellen en afgifte van de neurotransmitter acetylcholine uit postganglionaire parasympathische zenuwuiteinden. Na afgifte grijpen histamine en acetylcholine aan op receptoren die zich op de celmembranen van de gladde spiercellen bevinden. Voor histamine is dat de H_1 -receptor en voor methacholine de M_3 -receptor. Na binding van deze agonisten aan hun receptor gaat de receptor een interactie aan met het G-eiwit G_q , wat leidt tot de activatie van het enzym fosfolipase C. Fosfolipase C zorgt vervolgens voor de hydrolyse van fosfatidylinositol-4,5-bisfosfaat (PIP_2) in inositol 1,4,5-trifosfaat (IP_3) en diacylglycerol (DAG). IP_3 diffundeert vanuit de celmembranen naar de cytosol en bindt daar aan specifieke IP_3 -receptoren op het endoplasmatisch reticulum, waaruit vervolgens Ca^{2+} wordt afgegeven. Hierdoor ontstaat een snelle intracellulaire Ca^{2+} -toename in de vorm van een Ca^{2+} -piek, gevolgd door een Ca^{2+} -plateau (dat duidelijk hoger is dan het basale Ca^{2+} -niveau), als gevolg van Ca^{2+} -influx van buiten de cel. De verhoging van Ca^{2+} leidt uiteindelijk tot contractie van de luchtweg gladde spieren. Het naast IP_3 gevormde DAG blijft achter in de plasmamembraan en zorgt voor de activatie van proteïne kinase C (PKC). PKC is in staat om eiwitten te fosforyleren en draagt tevens bij aan de contractie.

β -Adrenerge agonisten worden al meer dan een eeuw gebruikt als geneesmiddel bij astma. Ze grijpen aan op β -adrenerge receptoren in de luchtwegen en zorgen onder andere voor relaxatie van de luchtweg gladde spieren, verhoogde slijm secretie, verminderde permeabiliteit van de bloedvaten en verminderde mediator-afgifte uit ontstekingscellen, zoals mestcellen. Geïnhaleerde β -agonisten grijpen in luchtweg gladde spieren aan op de β -adrenerge receptoren van het β_2 -subtype. Na binding van een β -agonist aan de receptor vindt er een interactie plaats met het stimulatorische G-eiwit (G_s), wat leidt tot de activatie van het enzym adenylyl cyclase. Adenylyl cyclase zet vervolgens ATP om in cAMP, waarna het cAMP-afhankelijke proteïne kinase A (PKA) wordt geactiveerd. PKA is in staat om verschillende intracellulaire eiwitten te fosforyleren, voornamelijk resulterend in relaxatie van de gladde spieren door het verlagen van de Ca^{2+} -concentratie en het verminderen van de Ca^{2+} -gevoeligheid van contractiele eiwitten in de cel.

Ondanks het feit dat geïnhaleerde β -agonisten de meest effectieve bronchusverwijders zijn die op dit moment beschikbaar zijn, hebben verschillende studies aangetoond dat langdurig gebruik van deze middelen gepaard kan gaan met nadelige effecten. Voorbeelden hiervan zijn een verminderde bescherming tegen bronchoconstrictieve prikkels, een verminderde bronchusverwijdende werking en een verhoogde luchtweggevoeligheid voor bronchoconstrictieve prikkels na beëindiging van de behandeling. De mechanismen die ten grondslag liggen aan deze nadelige effecten zijn echter nog onvolledig in kaart gebracht. Opheldering van een aantal van deze mechanismen was dan ook het voornaamste doel van de studies uit dit proefschrift.

Eén van de mechanismen die verantwoordelijk zou kunnen zijn voor een verminderde werking van β_2 -agonisten is heterologe desensitisatie van de β_2 -adrenerge receptor. De term desensitisatie staat voor elk proces dat leidt tot een verminderde functie van een receptor-signaal systeem. De term heterologe (of receptor-nonspecifieke) desensitisatie geeft aan dat de binding van een agonist aan één receptor ook de functie van andere (verschillende) receptoren kan verminderen, die gebruik maken van dezelfde of andere signaal-transductie routes. Het enzym PKC, dat geactiveerd wordt door de M_3 -receptor, zou bijvoorbeeld bij kunnen dragen aan heterologe desensitisatie van de β_2 -adrenerge receptor door deze te fosforyleren. Hierdoor wordt de interactie met het G_s -eiwit geremd (ontkoppeling) en kan adenylyl cyclase niet meer geactiveerd worden. Naast PKC is ook PKA in staat om de β_2 -adrenerge receptor te ontkoppelen door middel van fosforylering. In verschillende studies zijn aanwijzingen gevonden dat PKC, dat geactiveerd kan worden door verscheidene ontstekingsmediatoren maar ook door acetylcholine, betrokken zou kunnen zijn bij de verminderde β_2 -adrenerge receptor functie in luchtweg gladde spieren van patiënten met astma. Inderdaad is gebleken dat activatie van PKC in staat is om de β_2 -adrenerge receptor te desensitiseren, door fosforylering van de β_2 -adrenerge receptor en/of G_s . Tot nu toe is er echter nooit gekeken naar de functionele rol van PKC-activatie door contractiele agonisten met betrekking tot de desensitisatie van β_2 -adrenerge receptoren in de luchtweg gladde spier.

In **hoofdstuk 2** hebben we daarom de effecten onderzocht van een specifieke PKC-remmer (GF 109203X) op de relaxatie van runder tracheaal glad spierweefsel door de β -agonist isoprenaline. Hiertoe werden spierpreparaten gecontraheerd met verschillende concentraties methacholine en histamine. Het bleek dat in afwezigheid van GF 109203 de gevoeligheid voor isoprenaline geleidelijk minder werd bij toenemende concentraties methacholine en histamine. Alleen bij hogere concentraties methacholine was ook de maximale relaxatie ook verminderd. Het fenomeen dat contractiele agonisten in hoge concentraties zorgen voor een verminderde relaxatie door β_2 -agonisten was al eerder aangetoond en zou kunnen verklaren waarom β_2 -agonisten bij een zware astma aanval minder effectief worden.

Na remming van PKC door GF 109203X was de gevoeligheid voor isoprenaline duidelijk verhoogd en bij de hogere concentraties methacholine werd tevens een verhoogde maximale relaxatie gevonden. Hoewel de methacholine- en histamine-geïnduceerde contracties ook zelf wat geremd werden door GF 109203X, kon de verbeterde relaxatie slechts ten dele hierdoor verklaard worden: ook na voorzichtig bijtitreren met kleine beetjes

methacholine of histamine, om zo dezelfde uitgangssituatie te creëren als in afwezigheid van de PKC remmer, werden nog steeds verhoogde gevoeligheden gevonden voor isoprenaline zowel in de methacholine- als de histamine-gecontraheerde preparaten. Ook bleek dat de verhoging van de maximale relaxatie van isoprenaline door GF 109203X toenam bij opklimmende methacholine-concentraties wat betekent dat de verslechtering van de β_2 -adrenerge receptor functie parallel loopt met toenemende PKC activatie. In tegenstelling tot isoprenaline werd de relaxatie geïnduceerd door forskoline, dat adenylyl cyclase activeert zonder tussenkomst van de receptor, niet beïnvloed door GF 109203X. Dit geeft aan dat het effect van PKC tot stand komt door fosforylering van de β_2 -adrenerge receptor en/of het G_s -eiwit, leidend tot ont koppeling van de receptor van zijn effector systeem. Deze studie heeft voor het eerst laten zien dat heterologe desensitisatie van β_2 -adrenerge receptoren door PKC een functionele rol kan spelen in de relaxatie van luchtweg gladde spieren. Omdat vele mediators en neurotransmitters die betrokken zijn bij allergische luchtweg aandoeningen in staat zijn om PKC te activeren, zou heterologe desensitisatie erg belangrijk kunnen zijn in de verminderde β_2 -adrenerge receptor functie in patiënten met ernstig astma.

Een ander mechanisme dat verantwoordelijk zou kunnen zijn voor de verminderde β_2 -adrenerge receptor functie in patiënten, die langdurig gebruik maken van β_2 -agonisten, is homologe desensitisatie van de receptor. De term homologe (of receptor-specifieke) desensitisatie geeft aan dat wanneer een receptor geactiveerd wordt door een agonist, alleen deze receptor minder gevoelig wordt, zonder dat andere receptoren of receptor-systemen in dezelfde cel worden beïnvloed. Voor het optreden van homologe desensitisatie is het noodzakelijk dat de agonist gebonden is aan de receptor. In geval van de β_2 -adrenerge receptor wordt het proces gekarakteriseerd door een snelle vermindering van de agonist-geïnduceerde cAMP productie en wordt primair gemedieerd door G-eiwit gekoppelde receptor kinases (GRK's). GRK's herkennen en fosforyleren de agonist-bezette vorm van de receptor. Deze fosforylering leidt tot de binding van β -arrestines die er voor zorgen dat de interactie met het G_s -eiwit niet meer kan plaatsvinden (ontkoppeling); dit kan worden gevolgd door sequestratie en downregulatie van de receptor. Het is gebleken dat heterologe en homologe desensitisatie niet noodzakelijkerwijs onafhankelijk hoeven te zijn. In eerder onderzoek is namelijk aangetoond dat PKC de cellulaire expressie en activiteit van GRK's kan beïnvloeden. Zo blijkt bijvoorbeeld PKC-gemedieerde fosforylering van GRK2 niet alleen de activiteit te verhogen, maar ook de translocatie van dit enzym naar de plasmamembraan te bevorderen. Er is echter zeer weinig bekend over de functionele consequenties van deze interacties.

In **hoofdstuk 3** hebben we daarom in runder tracheale gladde spierpreparaten onderzocht of PKC, naast zijn rol in heterologe desensitisatie, ook in staat is om de β -agonist-geïnduceerde desensitisatie van de β_2 -adrenerge receptor te verhogen. Allereerst werd β -agonist geïnduceerde desensitisatie opgewekt door voorbehandeling met verschillende concentraties fenoterol. Na grondig uitwassen werden de preparaten op contractie gebracht met methacholine en vervolgens gerelaxeerd met isoprenaline. Voorbehandeling met fenoterol bleek de maximale relaxatie van isoprenaline inderdaad dosisafhankelijk te

verminderen. PKC-gemedieerde heterologe desensitisatie werd vervolgens geïnduceerd door de preparaten voor te behandelen met de PKC-activator forbol 12-myristaat 13-acetaat (PMA, 1 μ M). Dit leidde tot een kleine maar significante vermindering van de maximale relaxatie van isoprenaline. Gecombineerde behandeling met zowel 1 μ M PMA als 1 μ M fenoterol leidde tot een sterke vermindering van de isoprenaline-geïnduceerde maximale relaxatie, groter dan de optelsom van de afzonderlijke effecten van PMA en fenoterol. In aanwezigheid van de PKC-remmer GF 109203X was dit synergistische effect van β -agonist en forbol ester op de desensitisatie van de β_2 -adrenerge receptor echter volledig verdwenen, wat aangeeft dat PKC-activatie inderdaad in staat is om in luchtweg glad spierweefsel de homologe β_2 -adrenerge receptor desensitisatie te versterken.

In **hoofdstuk 4** is dit concept nader bekeken op het niveau van de intracellulaire Ca^{2+} -huishouding in celsuspensies van geïsoleerde runder tracheale gladde spiercellen. Zoals eerder besproken zorgt stimulatie van de muscarine M_3 -receptor voor een snelle Ca^{2+} -piek, gevolgd door een Ca^{2+} -plateau. Dit plateau, veroorzaakt door Ca^{2+} -influx, kan minutenlang aanhouden. Een β -agonist is in staat om het Ca^{2+} -plateau te verlagen door de influx van Ca^{2+} te verminderen. In deze studie werden individuele concentraties van isoprenaline (1 nm - 10 μ M) toegediend op het methacholine-geïnduceerde Ca^{2+} -plateau, op 150 sec. en 340 sec na toediening van methacholine. De remming van het Ca^{2+} -plateau trad zeer snel op, maar liep vrij snel terug, totdat het beginniveau van het Ca^{2+} -plateau weer was bereikt. Hieruit bleek dat na toediening van isoprenaline een snelle desensitisatie van de β_2 -adrenerge receptor optrad. In aanwezigheid van de PKC-remmer GF 109203X werd de terugkeer naar het oorspronkelijke Ca^{2+} -plateau aanzienlijk geremd. Dit betekent dat PKC, geactiveerd onder invloed van methacholine, een belangrijke rol speelt in deze snelle β_2 -adrenerge receptor desensitisatie.

Opmerkelijk genoeg bleek een direct heteroloog effect van PKC vrijwel afwezig te zijn, aangezien GF 109203X slechts een minimaal effect had op de acute verlaging van het Ca^{2+} -plateau onmiddellijk na de toediening van isoprenaline. Dit werd ondersteund door de waarneming dat isoprenaline, toegediend op twee tijdstippen, 150 en 340 sec na methacholine, een vergelijkbaar remmend effect had op het Ca^{2+} -plateau. Dit lijkt in tegenspraak te zijn met **hoofdstuk 2**, waarin aangetoond was dat methacholine-geïnduceerde PKC activatie wel degelijk direct betrokken is bij directe heterologe desensitisatie van de β_2 -adrenerge receptor in intact tracheaal glad spierweefsel. Echter, deze effecten waren gevonden na langere incubatietijden van methacholine (variërend van 15 tot 45 minuten, voor en tijdens de dosis-werkings-curve). Geheel in overeenstemming met de bevindingen in **hoofdstuk 3**, laten de resultaten van **hoofdstuk 4** zien dat geactiveerd PKC in geïsoleerde luchtweg gladde spiercellen in staat is om de acute β_2 -agonist-geïnduceerde homologe desensitisatie te potentieren, en dat dit proces vooraf gaat aan de directe PKC-geïnduceerde heterologe desensitisatie van de β_2 -adrenerge receptor.

β_2 -Adrenerge agonisten die gebruikt worden bij astma bestaan uit een mengsel van 50% S- en 50% R-enantiomeren (ook wel een racemisch mengsel genoemd). Enantiomeren zijn exacte spiegelbeelden van elkaar, waarvan de ene vorm wel en de andere niet (of slecht) kan binden aan de receptor. In de afgelopen jaren is er bezorgdheid ontstaan over de

inactieve S-enantiomeer in het racemisch mengsel van β_2 -agonisten. Deze S-enantiomeer zou wellicht betrokken zijn bij het ontwikkelen of verergeren van luchtweg-hyperreactiviteit en zou zelfs de sterftekans ten gevolge van astma kunnen verhogen. Deze bezorgdheid werd ondersteund door dierexperimentele studies, zowel *in vivo* als *in vitro*, die suggereren dat S-salbutamol ontstekingsprocessen en hyperreactiviteit zou kunnen bevorderen. Ondanks deze groeiende evidentie, zijn er ook twijfels over mogelijke adverse effecten van de S-enantiomeer. In cavia's is bijvoorbeeld aangetoond dat zowel de basale luchtweg reactiviteit als ook de allergen-geïnduceerde hyperreactiviteit voor histamine niet beïnvloed wordt door S-salbutamol. Ook sommige klinische studies in patiënten met mild tot matig astma hebben geen directe adverse effecten van S-salbutamol aangetoond of voordelen van het gebruik van R-salbutamol in plaats van het racemaat. Van al het onderzoek gedaan met S-salbutamol zijn de bevindingen dat deze enantiomeer in geïsoleerde gladde spiercellen de basale intracellulaire Ca^{2+} -concentratie verhoogt en de carbachol-geïnduceerde Ca^{2+} -mobilisatie versterkt, beide vermoedelijk door stimulatie van de M_3 -receptor, zeer intrigerend.

In **hoofdstuk 5** hebben we daarom het effect van S-salbutamol, in vergelijking met de R-enantiomeer, op de Ca^{2+} -huishouding nader onderzocht. Vergeleken zijn de effecten op de methacholine- en histamine-geïnduceerde Ca^{2+} -responsen in runder tracheale gladde spiercellen in zowel celsuspensies, als in individuele gehechte cellen met behulp van fluorescentie-microscopie. In ons onderzoek bleek S-salbutamol de basale intracellulaire Ca^{2+} -concentratie niet te verhogen, noch in celsuspensies noch in individuele gehechte cellen.

In de suspensie vonden we een concentratie-afhankelijke remming van de 1 μM methacholine-geïnduceerde Ca^{2+} -piek, zowel door R- als bij - 250 tot 400-voudig hogere concentraties - S-salbutamol. Hieruit blijkt duidelijk de stereoselectiviteit van salbutamol voor de β_2 -adrenerge receptor. In gehechte cellen bleek de 1 μM methacholine-geïnduceerde Ca^{2+} -piek minder gevoelig voor remming door R- en S-salbutamol. Alleen de hoogste concentratie van de R-enantiomeer (10 μM) had een remmend effect. Echter, evenmin als in celsuspensie werd er geen verhoging van de methacholine-geïnduceerde Ca^{2+} -piek gevonden in aanwezigheid van S-salbutamol. Op de 10 μM histamine-geïnduceerde Ca^{2+} -responsen had alleen R-salbutamol een significant remmend effect (op de Ca^{2+} -piek), terwijl S-salbutamol geen enkel effect had.

Een interessante bevinding was dat onder gehechte condities een groot aantal cellen langzame Ca^{2+} -oscillaties lieten zien na stimulatie met methacholine of histamine. In verschillende studies die gebruik maakten van 'real-time' confocale microscopie zijn deze intracellulaire Ca^{2+} -oscillaties in luchtweg gladde spiercellen eerder gezien. Stimulatie van de IP_3 -receptoren blijkt betrokken te zijn bij de initiatie van deze Ca^{2+} -oscillaties, terwijl de voortgang van deze oscillaties op rekening komt van ryanodine receptoren in de sarcoplasmatisch reticulum membraan. Om toch een methacholine- en histamine-geïnduceerd Ca^{2+} -plateau te kunnen berekenen in deze experimenten, hebben we de oppervlakte onder de curve berekend na de eerste Ca^{2+} -piek. Alleen 10 μM R-salbutamol was in staat om dit Ca^{2+} -plateau (bestaande uit de optelsom van Ca^{2+} -influx en Ca^{2+} -

oscillaties) te remmen. Dit remmende effect van 10 μM R-salbutamol werd echter niet gevonden in celsuspensie metingen. R- noch S-salbutamol hadden effect op het *aantal* (methacholine-geïnduceerde) oscillerende cellen. Ook de *oscillatiefrequentie* werd door beiden niet beïnvloed. Bij opsplitsing in oscillerende en niet-oscillerende cellen, bleek dat 10 μM R-salbutamol geen remmend effect had op het methacholine-geïnduceerde Ca^{2+} -plateau (pure influx) in niet-oscillerende cellen, waaruit geconcludeerd kon worden dat R-salbutamol dit plateau remt door de *amplitude* in de oscillerende cellen te verlagen. Ook het aantal histamine-geïnduceerde oscillerende cellen werd niet beïnvloed door R- en S-salbutamol. Echter, in tegenstelling tot methacholine, werd het histamine-geïnduceerde Ca^{2+} -plateau in niet-oscillerende cellen (pure Ca^{2+} -influx) aanzienlijk geremd door 10 μM R-salbutamol en werden er in aanwezigheid van 10 μM R-salbutamol zelfs helemaal geen histamine-geïnduceerde Ca^{2+} -oscillaties gevonden. Hieruit blijkt dat de Ca^{2+} -responsen die door histamine werden geïnduceerd veel gevoeliger waren voor R-salbutamol dan de methacholine-geïnduceerde Ca^{2+} -responsen.

Interessant is ook dat de *fractie* oscillerende cellen veel groter was voor methacholine dan voor histamine. De zeer recente waarneming dat methacholine, maar niet histamine, de cADPR route, een additionele transductie route voor het induceren van Ca^{2+} -oscillaties, kan aansturen, zou een verklaring kunnen zijn voor de hogere fractie van oscillerende cellen bij methacholine. Het zou mede kunnen verklaren waarom histamine-geïnduceerde Ca^{2+} -oscillaties minder gevoelig zijn voor β_2 -agonisten.

De studie uit **hoofdstuk 6** is gebaseerd op één van de eerste bevindingen uit **hoofdstuk 2**, waaruit bleek dat PKC-activatie de isoprenaline-geïnduceerde relaxatie van de runder tracheale gladde spier sterk vermindert. In vervolg experimenten bleek verassenderwijs dat er een groot verschil was in de manier waarop PKC de isoprenaline- en de fenoterol-geïnduceerde relaxaties beïnvloedde. In methacholine-gecontraheerde preparaten verhoogde remming van PKC zowel de gevoeligheid als de effectiviteit (maximale relaxatie) van isoprenaline, terwijl bij fenoterol alleen de effectiviteit werd verhoogd. Aangezien isoprenaline -in tegenstelling tot fenoterol- een catecholamine is, en daardoor geïnactiveerd kan worden door het enzym catechol-O-methyl transferase (COMT), zou COMT hier mogelijk verantwoordelijk voor kunnen zijn.

In **hoofdstuk 6** hebben we daarom de mogelijk additieve en/of interactieve rol van PKC en COMT onderzocht bij het verminderen van de β_2 -adrenerge receptor respons in runder tracheale gladde spieren, gebruikmakend van de PKC-remmer GF 109203X en de COMT-remmers OR 486 en tropolon. Zowel in aanwezigheid van OR 486 (1 μM) als van tropolon (100 μM) schoof de isoprenaline-geïnduceerde relaxatiecurve significant naar links op (hogere gevoeligheid voor isoprenaline) bij zowel 1 als 10 μM methacholine-geïnduceerde voorcontractie, zonder de maximale relaxatie te veranderen. Dit betekent dat inactivatie van isoprenaline door COMT wel de gevoeligheid voor isoprenaline vermindert, maar niet het maximale effect. In aanwezigheid van GF 109203X trad ook een linksverschuiving op die van dezelfde orde van grootte was als met OR 486 en tropolon. Mochten PKC en COMT hun effecten onafhankelijk van elkaar uitoefenen, dan kan verwacht worden dat er een additief effect optreedt wanneer beide enzymen gelijktijdig geremd worden. Uit de

resultaten bleek dat de combinatie van GF 109203X en OR 486, zowel bij maximale (10 μM) als submaximale (1 μM) methacholine-geïnduceerde contractie, geen additief effect gaven op de gevoeligheid voor isoprenaline. Dit geeft aan dat PKC en COMT hun effect via een gemeenschappelijke route uitoefenen, waarschijnlijk activatie van COMT door PKC-gemedieerde fosforylering. In tegenstelling tot OR 486 en tropolon werd in aanwezigheid van GF 109203X ook de maximale relaxatie van isoprenaline verhoogd, wat inhoudt dat PKC ook onafhankelijk van COMT een effect heeft op de isoprenaline-geïnduceerde relaxatie. Zoals verwacht had OR 486 geen enkel effect op de fenoterol-geïnduceerde relaxatie, omdat fenoterol geen substraat is voor COMT en in aanwezigheid van GF 109203X werd dan ook alleen de maximale relaxatie van fenoterol verhoogd. Dit is volledig in overeenstemming met het idee dat de verhoogde gevoeligheid voor isoprenaline, gezien na remming van PKC, volledig op rekening komt van het voorkómen van COMT-activatie.

Concluderend kan gesteld worden dat in runder tracheaal glad spierweefsel activatie van COMT door PKC leidt tot een verminderde gevoeligheid van methacholine-gecontraheerde preparaten voor catecholamines en dat activatie van PKC ook direct betrokken is bij de verminderde β_2 -adrenerge receptor respons van zowel catecholamines als niet-catecholamines (heterologe desensitisatie). Aangezien circulerend adrenaline (een catecholamine) betrokken is bij de lichaamseigen bescherming tegen astma aanvallen, zou een verminderde β_2 -adrenerge receptor respons door PKC en COMT, als ook door een mogelijke interactie tussen deze twee enzymen, een belangrijke rol kunnen spelen in de verminderde endogene bronchoprotectie bij patiënten met (ernstig) astma.

Zoals eerder aangegeven berust de effectiviteit van β_2 -agonisten in astma in belangrijke mate op het tegengaan van de contractiele werking van neurotransmitters en (allergische) mediators. De meeste receptoren die bronchoconstrictie induceren, zoals muscarine M_3 - en histamine H_1 -receptoren, zijn gekoppeld aan het G-eiwit G_q . Stimulatie van deze receptoren leidt uiteindelijk tot Ca^{2+} -mobilisatie uit intracellulaire opslagplaatsen en extracellulaire Ca^{2+} -influx. Contractie van glad spierweefsel wordt geïnitieerd door complexvorming van Ca^{2+} met calmodulin, en de daarop volgende activatie van myosin light chain kinase (MLCK), resulterend in de fosforylering van myosin light chain (MLC). Het verhogen van de intracellulaire Ca^{2+} -concentratie is echter niet de enige manier waarop contractiele agonisten contractie kunnen bewerkstelligen. Ze zijn tevens in staat om de Ca^{2+} -gevoeligheid van de contractiele eiwitten te verhogen. Dit mechanisme wordt ook wel Ca^{2+} -sensitisatie genoemd. Eén van de belangrijkste regulatoren van Ca^{2+} -sensitisatie is Rho-kinase. Rho-kinase remt het enzym myosin light chain phosphatase (MLCP), resulterend in een verhoogde fosforylering van MLC. Op deze wijze kan een hoger contractieniveau bereikt worden bij eenzelfde intracellulaire Ca^{2+} -concentratie. In luchtweg glad spierweefsel zijn eerder grote verschillen aangetoond in de effectiviteit van volle en partiële muscarine receptor agonisten in het aansturen van de signaal transductie route, verantwoordelijk voor Ca^{2+} -mobilisatie en influx. Er blijkt een sterke correlatie te bestaan tussen de inositol fosfaat accumulatie en de mate van contractie geïnduceerde door volle en partiële muscarine receptor agonisten, waarbij een behoorlijke reserve in inositol fosfaat

productie is aangetoond voor de volle agonisten methacholine and oxotremorine en geen reserve voor de partiële agonist McN-A-343. Tevens is gebleken dat de maximale Ca^{2+} -mobilisatie geïnduceerd door volle muscarine receptor agonisten vele malen groter is dan bij partiële agonisten. Ondanks deze verschillen, zijn partiële agonisten toch in staat om submaximale tot bijna maximale contracties te induceren in luchtweg glad spierweefsel.

Om de mechanismen die ten grondslag liggen aan deze verschillen tussen volle en partiële muscarine receptor agonisten nader te analyseren, hebben we in **hoofdstuk 7** in runder tracheaal glad spierweefsel de bijdrage van Rho-kinase bestudeerd aan de contractie, Ca^{2+} -mobilisatie en Ca^{2+} -influx van de volle agonist methacholine en de partiële agonisten pilocarpine en McN-A-343. In aanwezigheid van de Rho-kinase remmer Y-27632 (1 μ M) werd de gevoeligheid voor alle agonisten significant verminderd. Echter, de maximale contractie was alleen verlaagd bij de partiële agonisten pilocarpine en McN-A-343 en niet bij de volle agonist methacholine. Hieruit kan geconcludeerd worden dat methacholine alleen bij lagere concentraties afhankelijk is van Rho-kinase voor zijn contractiele effect, maar niet voor het induceren van de maximale contractie. In een eerdere studie hadden we al aangetoond dat methacholine de grootste IP_3 -afhankelijke Ca^{2+} -mobilisatie en Ca^{2+} -influx induceert, in overeenstemming met zijn aanzienlijke reserve van inositol fosfaat productie (transductie reserve) en dat deze relatief hoge Ca^{2+} -responsen volstaan om de maximale contractie te bereiken, zonder Rho-kinase-gemedieerde Ca^{2+} -sensitisatie nodig te hebben. In tegenstelling tot methacholine werden met pilocarpine en McN-A-343 (zeer) lage effecten op de Ca^{2+} -mobilisatie gevonden als gevolg van een geringe of verwaarloosbare transductie reserve, waardoor deze agonisten in belangrijke mate afhankelijk zijn van Rho-kinase om hun maximale contractiele effect te bereiken. Volledig in overeenstemming met deze interpretatie bleek ook de methacholine-geïnduceerde contractie afhankelijk te worden van Rho-kinase als de receptorreserve werd uitgeschakeld door de spierpreparaten voor te behandelen met de irreversibele muscarine receptor antagonist propylbenzylcholine mustard (PrBCM). Tegenwoordig lieten de gegevens een fraaie inverse relatie zien tussen de afhankelijkheid van Rho-kinase en zowel Ca^{2+} -mobilisatie als Ca^{2+} -influx. Er werd geen direct effect van Y-27632 op de Ca^{2+} -mobilisatie en Ca^{2+} -influx gevonden voor alle drie agonisten, wat bevestigt dat de effecten van Y-27632 op de contractie inderdaad op rekening komen van vermindering van Ca^{2+} -sensitisatie.

Belangrijkste conclusies uit dit proefschrift:

- Activatie van proteïne kinase C (PKC) door contractiele agonisten vermindert acuut het functionele antagonisme van gecontraheerd runder tracheaal glad spierweefsel door β_2 -agonisten, vermoedelijk als gevolg van ontkoppeling van de β_2 -adrenerge receptor en G_s (heterologe desensitisatie)
- Homologe desensitisatie van β_2 -adrenerge receptoren, in runder tracheaal glad spierweefsel, wordt versterkt door de activatie van PKC (heterologe amplificatie van homologe desensitisatie). Dit mechanisme zou betrokken kunnen zijn bij de

verminderde relaxeerbaarheid van luchtweg gladde spieren door β_2 -agonisten in patiënten met ernstig astma.

- PKC-activatie door contractiele agonisten is voor een belangrijk deel verantwoordelijk voor de acute en snelle homologe desensitisatie van de β_2 -adrenerge receptor-gemedieerde remming van de Ca^{2+} -influx in runder tracheale gladde spiercellen (heterologe amplificatie van homologe desensitisatie).
- In runder tracheale gladde spiercellen leidt de inactieve S-enantiomeer van salbutamol niet tot verhoging van de basale intracellulaire Ca^{2+} -concentratie en worden de methacholine- en histamine-geïnduceerde Ca^{2+} -mobilisatie en -influx niet gepotentieerd, noch in celsuspensie, noch in individuele gehechte cellen. Hieruit blijkt dat S-salbutamol geen adverse effecten heeft op de (beïnvloeding van de) Ca^{2+} -huishouding.
- In individuele gehechte cellen blijkt dat de actieve enantiomeer R-salbutamol vooral de amplitude van de contractiele agonist-geïnduceerde Ca^{2+} -oscillaties remt.
- In runder tracheaal glad spierweefsel leidt de activatie van COMT door PKC tot een sterke vermindering van het functioneel antagonisme van de methacholine-geïnduceerde contractie door catecholamine β -agonisten.
- De gevoeligheidsverhoging van isoprenaline in methacholine-gecontraheerd runder tracheaal glad spierweefsel, die optreedt na remming van PKC, komt volledig op rekening van het remmen van de COMT activatie, terwijl de verhoogde maximale relaxatie veroorzaakt wordt door het voorkomen van de ontkoppeling van de β_2 -adrenerge receptor van G_s .
- Volle en partiële muscarine receptor agonisten zijn in verschillende mate afhankelijk van Rho-kinase voor hun contractiele effecten, waarbij er een inverse relatie bestaat tussen deze Rho-kinase afhankelijkheid en de Ca^{2+} -mobilisatie of Ca^{2+} -influx.

