

Untersuchungen zur cholinergen Kontrolle der Expression und Aktivität von Matrixmetalloproteinasen in humanen Lungenfibroblasten

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

Barbara Grensemann geb. Söntgerath
Troisdorf

2013

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. K. Racké

2. Gutachter: Prof. Dr. med. U. R. Juergens

Tag der Mündlichen Prüfung: 27. Mai 2013

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

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1.	Abkürzungsverzeichnis	6
2.	Einleitung	7
2.1.	COPD.....	8
2.1.1.	Cholinergere Einfluss im Rahmen der COPD	8
2.1.1.1.	Vorkommen und Funktion von muscarinischen Rezeptoren in der Lunge	8
2.1.1.2.	Neuronaler und nicht neuronaler cholinergere Einfluss bei COPD	9
2.1.2.	Remodeling im Rahmen der COPD	10
2.2.	Matrixmetalloproteinasen (MMPs).....	13
2.2.1.	MMP1.....	15
2.2.2.	MMP2.....	15
2.2.3.	MMP3.....	15
2.2.4.	MMP9.....	16
2.2.5.	MMP im Rahmen des Remodeling bei COPD	16
2.3.	Substanzen	17
2.4.	Zielsetzung.....	21
3.	Methodik	22
3.1.	Materialien	22
3.1.1.	Allgemeine Chemikalien, Enzyme, Reaktionskits	22
3.1.2.	Primer	23
3.1.3.	Substanzen	24
3.1.4.	Arbeitsgeräte.....	24
3.2.	Methoden	25
3.2.1.	Kultur der humanen Fibroblasten-Zelllinie (MRC 5)	25
3.2.2.	RNA-Präparation.....	28
3.2.3.	Reverse Transkription	30
3.2.4.	Polymerase-Kettenreaktion.....	31
3.2.5.	Agarose- Gelelektrophorese	33
3.2.6.	Zymographie	35
3.2.7.	Statistik	37
4.	Ergebnisse	38
4.1.	Basisexpression der MMPs.....	38
4.2.	Einfluss von cholinergen Agonisten und Antagonisten auf die mRNA- Expression und Enzymaktivität der MMPs	40
4.3.	Wirkung von TGF- β auf die mRNA-Expression und Enzymaktivität der MMPs.....	47
4.4.	Cholinerge Expression und Enzymaktivität unter Stimulation mit TGF- β	50
4.5.	Wirkung von Butaprost und Isoprenalin auf mRNA Expression und Enzymaktivität	51
5.	Diskussion.....	54
6.	Zusammenfassung.....	59
7.	Literaturverzeichnis	60

1. Abkürzungsverzeichnis

Ach	Acetylcholin
Cl	Chlorid
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EZM	extrazelluläre Matrix
FDA	Food and Drug Administration
FKS	fetales Kälberserum
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure
GOLD	Global Initiative for Obstructive Lung Disease
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	messenger RNA
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PGE2	Prostaglandin E2
RNA	Ribonukleinacid
RT	Reverse Transkription
TGF- β	Transforming Growth Factor
TIMP	Tissue Inhibitors of Matrixmetalloproteinasen

2. Einleitung

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) stellt ein bedeutendes öffentliches Gesundheitsproblem dar. In den USA ist die COPD die vierthäufigste Todesursache bei mehr als 16 Millionen Erkrankten. Prognosen nach zu urteilen, wird die COPD im Jahre 2020 weltweit von der sechshäufigsten zur dritthäufigsten Todesursache aufgestiegen sein (Murray und Lopez, 1997).

In der Vergangenheit bestand das Problem, dass es keine einheitlichen Daten zur Prävalenz der COPD gab. Erst 2001 definierte die Global Initiative for Obstructive Lung Disease (GOLD) die COPD als ein pathologisches Phänomen, welches durch eine Limitation des Atemflusses, der nicht vollständig reversibel ist, gekennzeichnet ist (Schirnhöfer et al., 2007).

Während in den Richtlinien der GOLD die COPD als eine im allgemein progressive Erkrankung beschrieben wird, modifizierte die American Thoracic Society und die European Respiratory Society die Definition. Zum ersten Mal wird die COPD als eine vermeidbare Erkrankung definiert.

Die chronische Komponente ist ein wichtiger Aspekt der COPD. Sie ist durch Remodeling-Prozesse in den Atemwegen charakterisiert, die zu einer chronischen Bronchitis und einem Emphysem führen. Inflammatorische Zellen des Immunsystems spielen eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der COPD. Erhöhte Level an Neutrophilen, Makrophagen und CD8⁺ T-Zellen wurden in der bronchoalveolären Lavage bei Patienten mit COPD gefunden. Matrixmetalloproteinasen (MMPs), die vermehrt unter anderem von den erwähnten Zellen sezerniert werden, haben die Fähigkeit, in der Lunge morphologische Schädigungen zu verursachen, die signifikant zum Zustand der COPD beitragen (Srivastava et al., 2007).

Sowohl der prognostizierte Anstieg in der Todesursachenstatistik, als auch die Darstellung der COPD als progressive, aber auch gleichzeitig vermeidbare Erkrankung, weisen auf die Wichtigkeit weiterer Bemühungen in dem Verständnis der Pathogenese, als auch in den Bemühungen in der Suche nach Therapieansätzen, die zum Beispiel die MMPs als Ansatzpunkt haben könnten, hin.

2.1. COPD

Die COPD ist eine Erkrankung, die sich symptomatisch durch Husten, Auswurf und Belastungsdyspnoe bemerkbar macht (Reilly et al., 2009). Das pathologische Korrelat dazu sind Entzündungen der Bronchioli und Destruktion des Lungenparenchyms mit einem daraus resultierenden Lungenemphysem. Die funktionelle Konsequenz, die sich hieraus ergibt, besteht in einer Behinderung des Atemflusses (Cosio Piqueras und Cosio, 2001). Hauptursachen für die Entstehung ist das Rauchen. Es gibt noch andere Ursachen wie Atemwegsinfektionen, berufsbedingte Risikofaktoren und Luftschadstoffe. Genetisch bedingte Risikofaktoren, wie z. B. ein α_1 -Antitrypsin-Mangel spielen bei der Entstehung der COPD eher eine seltene Rolle (Biedermann und Köhnlein, 2006).

2.1.1. Cholinergere Einfluss im Rahmen der COPD

2.1.1.1. Vorkommen und Funktion von muscarinischen Rezeptoren in der Lunge

Es können fünf verschiedene Muscarinrezeptorsubtypen unterschieden werden; in der Lunge und den Atemwegen sind die Subtypen M_{1-3} von Bedeutung.

M_1 -Rezeptoren werden überwiegend in den peripheren kleinen Atemwegen mit einem Durchmesser <2 mm und den Alveolarwänden exprimiert (Racké et al., 2006). M_1 -Rezeptoren werden nicht in größeren Atemwegen nachgewiesen. Sie erleichtern die ganglionäre Transmission (Racke, 2006).

Die Subtypen M_2 und M_3 stellen das Hauptvorkommen an muscarinischen Rezeptoren in der Lunge und den Atemwegen dar. Muscarinische Rezeptoren werden in nahezu allen Zellen der Lunge und allen Zellen der Luftwege exprimiert, einschließlich glatter Muskelzellen der Atemwege und der Blutgefäße, verschiedener Drüsen, Oberflächenepithelien, Endothelzellen und verschiedenen inflammatorischer Zellen, sowie Lungenfibroblasten (Matthiesen et al., 2006; Racké et al., 2006).

Der M_2 -Rezeptor ist ein autoinhibitorischer Rezeptor, der bei stabiler COPD in seiner Funktion nicht beeinträchtigt ist (Gosens et al., 2004). Studien haben ergeben, dass die Proliferation von Lungenfibroblasten durch die Aktivierung des M_2 -Rezeptors stimuliert wird (Matthiesen et al., 2006).

M₃-Rezeptoren vermitteln die Kontraktion trachealer und bronchialer glatter Muskulatur. Dies konnte an M₃-Rezeptor Knock-out-Mäusen, mit vorhandenem M₂-Rezeptor gezeigt werden. Hier konnte weder durch Metacholin, ein β -Methyl-Derivat des Acetylcholins aus der Gruppe der quartären Ammoniumverbindungen, noch eine parasymphatisch induzierte Bronchokonstriktion in vivo ausgelöst werden. Ebenfalls wird die Schleimmsekretion über M₃-Rezeptoren vermittelt (Gosens et al., 2006).

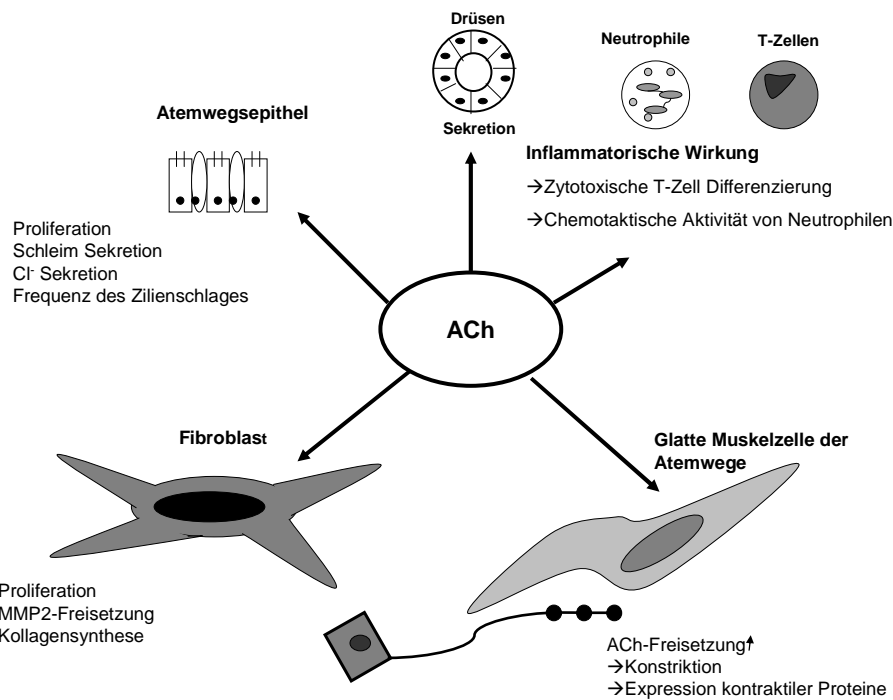


Abb. 1: Wirkung der Acetylcholin-Freisetzung auf die einzelnen Zellen in den Atemwegen, modifiziert nach (Kummer et al., 2008).

2.1.1.2. Neuronaler und nicht neuronaler cholinerges Einfluss bei COPD

Acetylcholin ist der Haupttransmitter parasymphatischer Nervenfasern, die die glatten Muskelzellen und Drüsen in der Lunge innervieren. Die offensichtlichsten Effekte nach Stimulation parasymphatischer Nervenfasern in der Lunge sind die Bronchokonstriktion und Sekretion, vermittelt über M₃-Rezeptoren (Gosens et al., 2006). Folglich sind M₃-Rezeptorantagonisten starke Bronchodilatoren, die bei COPD eingesetzt werden.

In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass nicht neuronale Zellen der Lunge Acetylcholin via Cholinacetyl-Transferase synthetisieren (Wessler et al., 1998). Dazu

gehören bronchiale Epithelzellen, T- und B-Lymphozyten, Mastzellen, Granulozyten, Alveolarmakrophagen und glatte Muskelzellen (Gosens et al., 2004). Der Acetylcholin Gehalt nicht neuronaler Zellen ist signifikant, jedoch geringer als der von neuronalen Zellen. Es wirkt als parakriner Modulator von Atemwegs- und Lungenfunktion. Die COPD betrifft überwiegend ein Kompartiment der Lunge, das nicht von cholinergen Nervenfasern innerviert wird. Daher wird angenommen, dass nicht neuronales Acetylcholin in die Pathogenese der COPD involviert ist (Kummer und Lips, 2006).

2.1.2. Remodeling im Rahmen der COPD

Im Rahmen der COPD kommt es zu Umbauprozessen in der Lunge, dem sogenannten Remodeling. Ausgelöst werden diese Prozesse durch eine chronische Bronchitis, wobei hier die genauen Zusammenhänge zwischen Entzündung und Remodeling noch nicht vollständig aufgeklärt sind. Die Stimuli für die Entstehung des entzündlichen Infiltrates sind nicht genau bekannt. Es wird angenommen, dass es zu einer Schädigung des Epithels, bedingt durch Zigarettenrauch kommt. Epithelzellen haben das Potential, eine Entzündung durch die Synthese von Arachidonsäure bzw. einem weiteren Produkt dieses Signalweges, welches zur Chemotaxis von Neutrophilen führt, zu initiieren. Eine weitere Annahme ist, dass es eine neurogene Entzündung, die durch Änderung oder Verlust der Oberfläche der Epithelzellen getriggert wird, gibt. Stimulation sensorischer Nerven im Epithel der Luftwege führt zu einer Freisetzung von Tachykininen, einschließlich Substanz P, sowie von Neurokinin A und B. Tachykinine führen zu einer Chemotaxis und Adhäsion von Neutrophilen. Die Folge ist eine Stimulation der Freisetzung inflammatorischer Zytokine und eine Degranulation von Eosinophilen (Cosio Piqueras und Cosio, 2001). Durch inflammatorische Prozesse bedingt, kommt es weiterhin sowohl zu einer Akkumulation von Neutrophilen, Makrophagen, CD8+ T-Zellen und Eosinophilen, als auch zur vermehrter Freisetzung von Interleukin-8, des Tumornekrose-Faktors- α und Transforming-Growth-Factor- β (TGF- β) (Bergeron und Boulet, 2006).

Eine weitere Komponente der COPD ist das Lungenemphysem. Hierbei steht die Destruktion bzw. die fehlende Reparatur des Lungenparenchyms, die Folge ist ein

Lungenemphysem (Bergeron und Boulet, 2006). Damit verbunden sind strukturelle Veränderungen in unterschiedlichen Ausprägungen, die die kleinen Bronchien, das heißt ab einem Durchmesser von $< 2\text{mm}$, und die Membranen der Bronchioli betreffen (Jeffery, 2001).

Es kommt zu einer Metaplasie des Plattenepithels, Verlust der epithelialen Zilien und einer Becherzellhyperplasie. Hinzu kommt noch eine Fibrose der Atemwege, sowie eine Hypertrophie glatter Muskelzellen besonders in den kleineren Atemwegen (Bergeron und Boulet, 2006). Die Folge ist eine Zunahme der Wanddicke der Bronchioli.

Klinische Bedeutung von Tiotropium

Tiotropium wurde Mitte der 1990 Jahre als erstes langwirksames Anticholinergikum zur Therapie der COPD entwickelt. Es konnte gezeigt werden, dass es ein potenter anticholinergischer Bronchodilatator mit einer Wirkung von > 24 Stunden ist, bei einer einmal täglichen Anwendung, sowie einer höheren kinetischen Selektivität für M3 als M2 Rezeptoren (Sokolova et al., 2008).

Der Vorteil gegenüber langwirksamen β_2 -Agonisten bestand in der nur einmal täglichen Anwendung, wodurch auch eine Verbesserung der Compliance erreicht wurde (Tennant et al., 2003).

2004 erfolgte die Zulassung von Tiotropium. Seitdem sind zahlreiche Studien veröffentlicht, die den Einfluss der einmal täglichen Gabe auf die Lungenfunktion zeigen. Es konnte eine deutliche Verbesserung der FEV1 und FVC im Vergleich zu Placebo nachgewiesen werden (Gahring und Rogers, 2005). Auch kam es unter der Therapie mit Tiotropium im Vergleich zu Salmeterol zu einer deutlichen Reduktion der Exazerbationen. Jede Exazerbation bedeutet eine Progression der Erkrankung, damit einhergehende Komplikationen und ein erhöhtes Risiko für nachfolgende Exazerbationen, aber auch eine Abnahme der Lungenfunktion, sowie eine erhöhte Mortalität. Daraus ergibt sich, dass die Verhinderung von Exazerbationen ein wichtiges therapeutisches Ziel ist, in dessen Vordergrund die Therapie mit Tiotropium steht, welches Salmeterol, einem β_2 -Agonisten, wie die **POET**-Studie zeigt, überlegen ist (Celli et al., 2010).

Die antiinflammatorische Wirkung wird durch eine Reduktion der TNF α vermittelten chemotaktischen Eigenschaften und der damit verbundenen zellulären Freisetzung von

reaktiven Sauerstoffspezies aus humanen Alveolarmakrophagen ausgelöst, so dass eine geringere zelluläre Inflammation das Ergebnis ist (Vacca et al., 2011).

Die COPD wird mit einer großen gesundheitlichen und ökonomischen Belastung in Verbindung gebracht. Woraus sich die Frage nach dem ökonomischen Aspekt der Therapie mit Tiotropium im Vergleich zu anderen langwirksamen Bronchodilatoren ergibt. In einer Studie in der die Kosteneffektivität der Therapie mit Tiotropium untersucht wurde, konnte gezeigt werden, dass ein besseres gesundheitliches Outcome, sowie niedrigere Gesundheitskosten durch eine Therapie mit Tiotropium sich ergaben. Der Grund für dieses Ergebnis ist in der niedrigeren Exazerbationsfrequenz und damit in einem selteneren Krankenhausaufenthalt zu sehen (Nilsson et al., 2006).

Anfänglich schien es, dass die inhalative Gabe von Tiotropium mit einem erhöhten Risiko für einen kardiovaskulären Tod, Myocardinfarkt oder Apoplex bei Patienten mit COPD assoziiert sei, wie in einer Metaanalyse nachgewiesen wurde (Singh et al., 2008). Fälschlicherweise wurde vorausgesetzt, dass die Integration der Placebo kontrollierten Studien mit aktiv kontrollierten Studien valide ist (Celli et al., 2010) .

In einer sehr großen prospektiven Studie, der Understanding Potential Longterm Impacts on Function with Tiotropium (UPLIFT)-Studie, in der ein Vergleich zwischen der Gabe von Tiotropium versus Placebo über 4 Jahre untersucht wurde, konnte kein erhöhtes Risiko eines Myocardinfarktes, kardiovaskulärer Tod oder Tod durch andere Ursachen unter der Therapie mit Tiotropium nachgewiesen werden (Thomas et al., 2007). Eine Stellungnahme der FDA kam zu dem dem Schluß, durch die UPLIFT-Studie bestärkt, dass die gegenwärtigen Daten den Rückschluss zu lassen, dass die Anwendung von Tiotropium nicht mit einem erhöhten Risiko für einen Apoplex, Myocardinfarkt oder Tod assoziiert ist (Thomas et al., 2007).

Eine weitere Veröffentlichung konnte ebenfalls zeigen, dass es unter Tiotropium zu einer Verminderung des Risikos der kardiovaskulären Mortalität und der kardiovaskulären Ereignisse kam (Celli et al., 2010).

Das zeigt, dass mit Tiotropium ein Durchbruch in der Therapie der COPD gelungen ist.

2.2. Matrixmetalloproteinasen (MMPs)

MMPs sind eine Familie von proteolytischen Enzymen mit einem Zinkion im aktiven Zentrum. Sie werden als Zymogene, das heißt als inaktive Enzymvorstufen sezerniert und bestehen aus drei Bereichen:

- der Pro-Domäne
- der katalytischen-Domäne
- der Hemopexin-Domäne

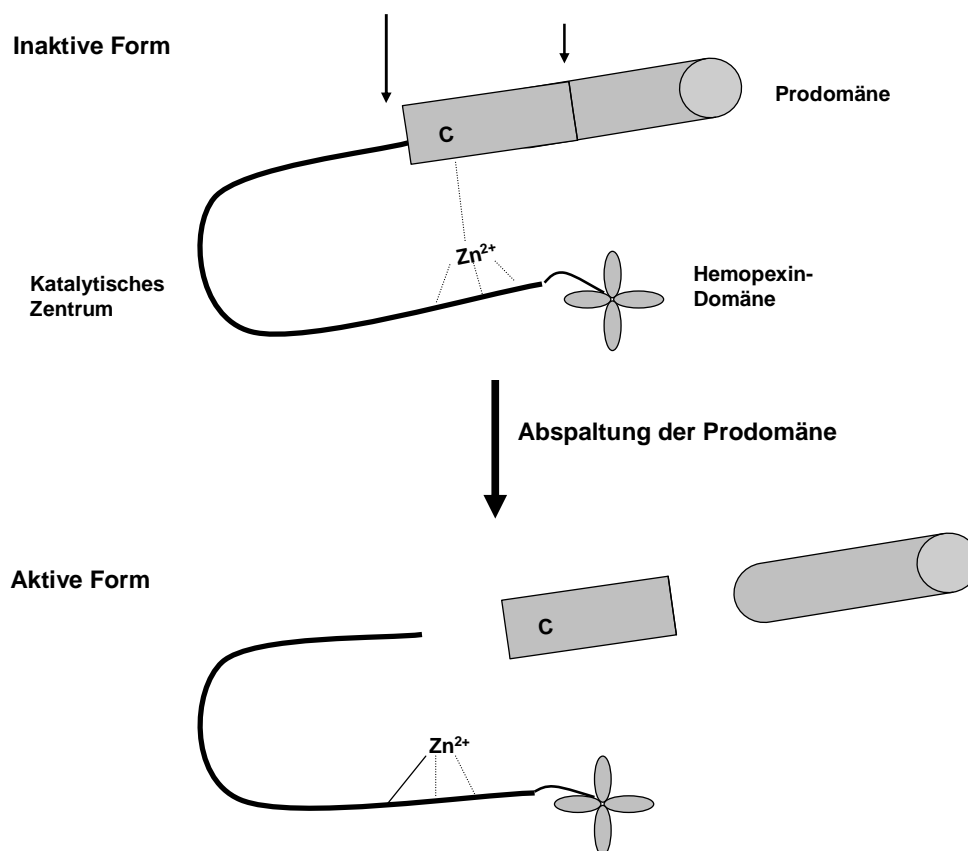


Abb. 2: Schematische Darstellung der Aktivierung der MMP. MMPs werden als Pro-Proteine exprimiert. Ein konserviertes Cystein in der Pro-Domäne koordiniert das Zinkion, welches für die Katalyse notwendig ist. Die Pro-Domäne wird zum einen von dem katalytischen Zentrum abgespalten und auch in sich noch gespalten. Die Pro-Domäne ist ein autoinhibitorischer Bereich, nach dessen Abspaltung die MMPs erst aktiviert werden. Die katalytische Domäne ist der Bereich, in dem Proteine gespalten werden. Die Hemopexin-Domäne vermittelt die Protein-Protein Interaktion (Page-McCaw et al., 2007).

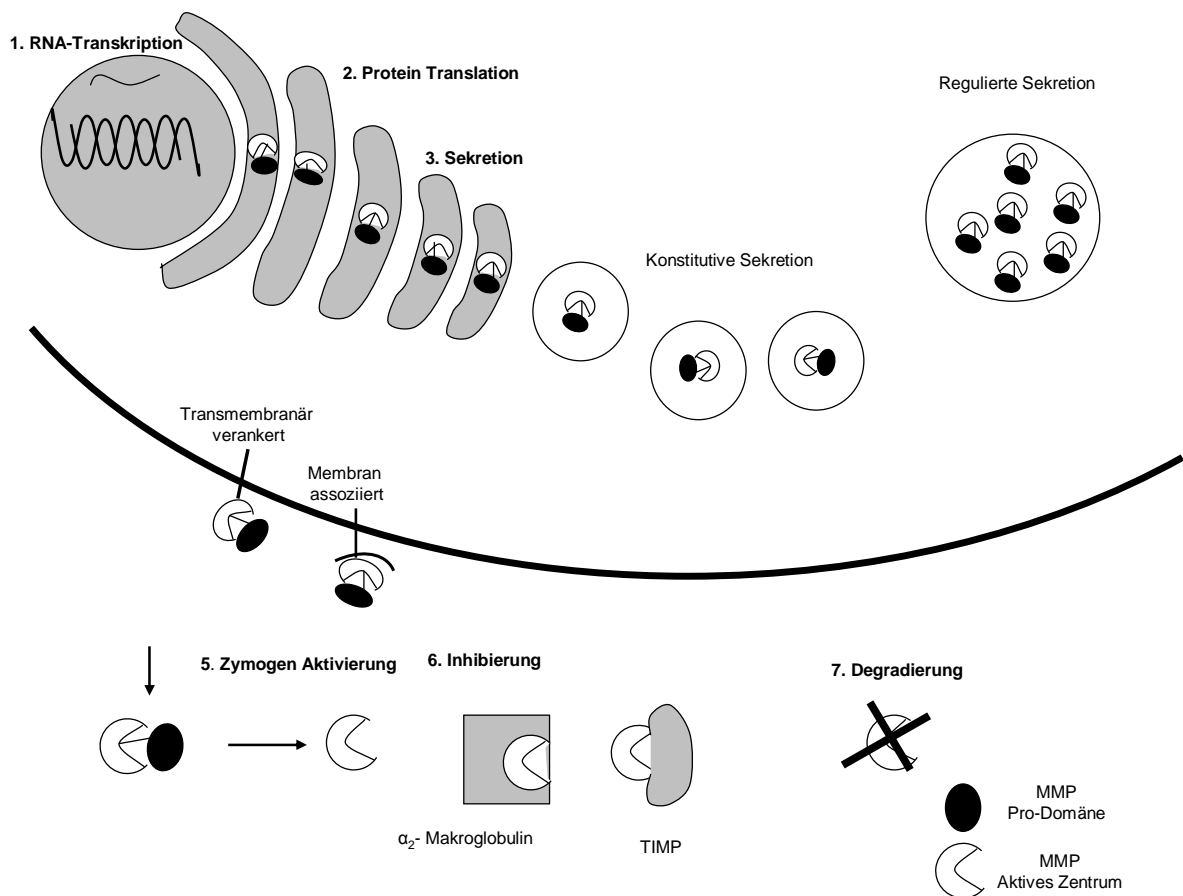


Abb. 3: Darstellung der MMP Regulation auf verschiedenen Ebenen. Die Regulation kann auf der Ebene der RNA-Transkription (1), der Protein-Synthese (2), der Sekretion (3), der subzellulären oder extrazellulären Lokalisation (4), auf der Ebene der Zymogen Aktivierung (5), der Inhibierung durch tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs), der natürlichen Inhibitoren der MMPs oder α_2 -Makroglobulin (6) und der Degradierung der MMPs selbst (7) beeinflusst werden. Modifiziert nach (Page-McCaw et al., 2007).

Zurzeit sind mindestens 24 MMPs identifiziert, die in die fünf folgenden Gruppen eingeteilt werden können:

Kollagenasen (MMP 1, 8, 13, 18)

Gelatinasen (MMP 2 und 9)

Stromelysine (MMP 3, 10, 11)

Membran-Typ MMPs (14, 15, 16, 17, 24, 25)

„others“ (7, 12, 19, 20, 21, 23, 26, 27, 28) (Ohbayashi, 2002)

MMPs sind in Umsatz und Aufrechterhaltung von Proteinen der extrazellulären Matrix (EZM) im verbindenden Gewebe und der Basalmembran involviert. Sie spielen eine Rolle im Rahmen des Remodeling, der Embryogenese und der Metastasierung

(Ohbayashi, 2002). Für die vorliegende Arbeit sind die MMP1, 2, 3 und 9 von besonderem Interesse, die im Folgenden näher charakterisiert werden.

2.2.1. MMP1

Die MMP1 ist eine 54 kDa schwere Kollagenase. Sie gehört zu der Gruppe der Kollagen-degradierenden MMPs. Kollagen Typ I-III, VII, VIII und X wird von der MMP1 abgebaut. Sie scheint das Enzym zu sein, welches hauptverantwortlich ist für den Kollagenumbau in den meisten Geweben. Sie wird überwiegend von Epithelzellen, Fibroblasten, Endothelzellen, Chondrozyten und Makrophagen exprimiert (Pilcher et al., 1997). In größeren Mengen wird sie bei Patienten mit COPD von Alveolarmakrophagen freigesetzt (Belvisi und Bottomley, 2003).

2.2.2. MMP2

MMP2, auch Gelatinase A genannt, ein 72 kDa schweres Enzym, degradiert u.a. Kollagen Typ IV und V, wodurch es zum Umbau der Basalmembran kommt. Weitere Substrate der MMP2 sind Kollagen I, II, VII; X, XI, XIV, Gelatine, Elastin, Fibronectin und Aggrecan. Sie wird von verschiedenen Zellen im verbindenden Gewebe synthetisiert, wie von Fibroblasten, Endothelzellen sowie verschiedenen Epithelzellen einschließlich bronchialer Epithelzellen. MMP2 wird als inaktives Zymogen sezerniert und an der Zelloberfläche von Membran-Typ MMPs, besonders der MMP14, aber auch der MMP1, aktiviert (Ohbayashi, 2002).

2.2.3. MMP3

Die MMP3, ein 57 kDa schweres Enzym, wird auch Stromelysin-1 genannt. Sie wird unter anderem von Fibroblasten exprimiert und ist in den Abbau von Kollagen Typ II, III, IV, IX, XI, sowie in den Abbau von Elastin und Fibronectin involviert. Die MMP3 ist der Hauptaktivator der MMP9 (Ogata et al., 1992).

2.2.4. MMP9

Die MMP9, eine 92 kDa Gelatinase (Gelatinase B) wird durch eine Proteinkaskade aktiviert. Das Hauptsubstrat ist Kollagen Typ IV, aber auch Kollagen Typ V, VII, X, XIV, sowie Elastin und Aggrecan werden von der MMP9 degradiert. Zur Aktivierung wird die Pro-Domäne abgespalten. Dies geschieht durch die MMP3 und die MMP2. Die MMP3 ist der effektivste Aktivator der MMP9. In der gesunden Lunge wird MMP9 nicht von residenten Zellen sezerniert. Unter Umständen, die noch weiteren Untersuchungen bedürfen, sind Clarazellen, Alveolartyp II Zellen, Fibroblasten, glatte Muskelzellen, Endothelzellen, sowie inflammatorische Zellen wie Leukozyten, Makrophagen, Neutrophile, Eosinophile und Mastzellen in der Lage, MMP9 zu sezernieren (Atkinson und Senior, 2003). Neutrophile enthalten beträchtliche Mengen an MMP9, die leicht freigesetzt werden können (Atkinson und Senior, 2003). In bronchioalveolären Lavagen von Patienten mit COPD zeigt sich ein erhöhter Level an MMP9.

2.2.5. MMP im Rahmen des Remodeling bei COPD

Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass ein Ungleichgewicht zwischen MMPs und *Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinasen* (TIMP), einer Gruppe von physiologischen Inhibitoren der MMPs, neben α_2 -Makroglobulin, (Lagente et al., 2005), in der Pathogenese der COPD eine Rolle spielt (Lowrey et al., 2008). Das Remodeling der Lungenarchitektur ist ein wesentliches Kennzeichen von verschiedenen Lungenerkrankungen, wie z.B. der Verlust von Alveolarwänden beim Emphysem im Rahmen der COPD. Diese pathologische Veränderung geht mit starken Veränderungen der EZM einher. Es wird davon ausgegangen, dass MMPs eine Schlüsselrolle bei diesen Veränderungen spielen, da MMPs in der Lage sind, Strukturproteine wie Elastin und Kollagen zu spalten (Atkinson und Senior, 2003).

Im Sputum von Patienten mit COPD kann ein erhöhter Level an inflammatorischen Zellen, wie Neutrophilen, Makrophagen und CD8⁺ Zellen nachgewiesen werden. MMPs werden von den erwähnten inflammatorischen Zellen sezerniert. Sie haben die enzymatische Fähigkeit, morphologische Veränderungen in der Lunge zu induzieren und tragen somit wesentlich zur Pathogenese der COPD bei. Es werden insbesondere

erhöhte Konzentration von MMP1, 2 und 9, die Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind, und MMP12 im Rahmen der COPD nachgewiesen (Srivastava et al., 2007).

Eine Zunahme der mRNA Transkripte der MMP1 kann im Sputum von COPD Patienten, die gleichzeitig eine Erhöhung inflammatorischer Zellen und Epithelzellen aufweisen, nachgewiesen werden.

2.3. Substanzen

Zur Untersuchung ob cholinerge Effekte vorliegen, wird in zahlreichen Experimenten Carbachol (siehe Abb. 4), ein direktes Parasympathomimetikum mit Wirkung an muscarinischen- und nicotinischen Rezeptoren, das nicht von der Acetylcholinesterase gespalten wird verwendet (Lüllmann und Mohr, 2001).

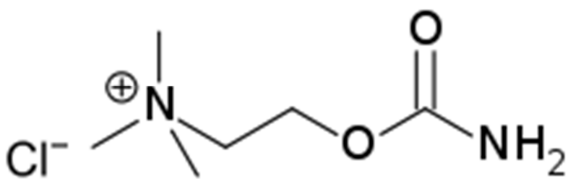


Abb. 4: Carbachol

Zur weiteren Differenzierung, ob ein muscarinischer Effekt oder nicotinerger Effekt vorliegt, wird Oxotremorin (siehe Abb. 5), ebenfalls ein direktes Parasympathomimetikum, ohne Wirkung an nicotinischen Rezeptoren verwendet (Ringdahl und Jenden, 1983).

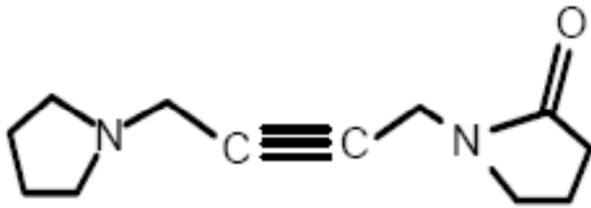


Abb. 5: Oxotremorin

Nicht nur zur Antagonisierung muscarinerger Effekte, sondern auch therapeutisch in der Behandlung der COPD, wird Tiotropium (siehe Abb. 6), eine quartäre Ammoniumverbindung, eingesetzt. Es gibt insgesamt fünf Muscarinrezeptor Subtypen, wobei jedoch nur die Subtypen M_{1-3} in der Lunge vorkommen. M_1 -Rezeptoren sind in parasymphathischen Ganglien der Luftwege lokalisiert und regulieren die ganglionäre Transmission.

Über M_2 -Rezeptoren, deren Lokalisation sich präganglionär befindet, wird eine autoinhibitorische Freisetzung von Acetylcholin vermittelt, wodurch eine Kontraktion der glatten Muskelzellen reduziert wird. M_3 -Rezeptoren werden von glatten Muskelzellen in der Lunge exprimiert. Durch sie wird die bronchokonstriktorische Wirkung der Acetylcholinfreisetzung vermittelt (Heredia, 2009; Racke, 2006). Pharmakologische Studien an Meerschweinchentracheen *in vitro* und nach Inhalation bei Hunden *in vivo* haben gezeigt, dass Tiotropium ein potenter Muskarin-Rezeptorantagonist mit einer prolongierten Blockade ist. Durch die Verwendung von radioaktiv markiertem Tiotropium konnte nachgewiesen werden, dass es weder eine Wirkung an cerebrocorticalen M_1 -Rezeptoren bei Ratten, noch an M_2 -Rezeptoren am Herz, noch an M_3 -Rezeptoren an Speicheldrüsen entfaltet (Santus und Di Marco, 2009). Tiotropium ist eine effektive Medikation für eine langandauernde Wirkung bei einmal täglicher Anwendung in der Behandlung der Bronchokonstriktion und Luftflusslimitierung, die mit der COPD assoziiert sind (Santus und Di Marco, 2009).

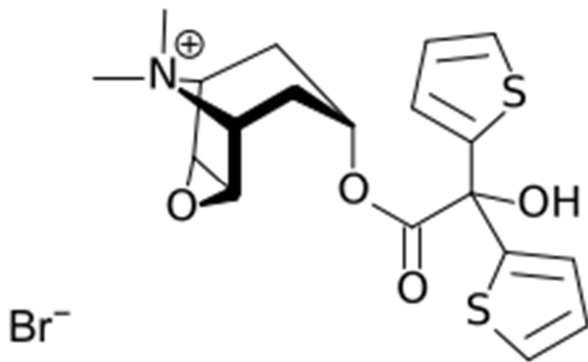


Abb. 6: Tiotropiumbromid

Der *Transforming Growth Factor β* (TGF- β), ein profibrotisches Protein, gehört in die Gruppe der Wachstumsfaktoren. Er spielt eine Schlüsselrolle als Regulator in Aufbau und Remodeling der EZM und wird als Hauptaktivator für Fibrosierungsprozesse angesehen. Fibroblasten werden zur Synthese von EZM durch TGF- β induziert. Die Wirkung von TGF- β wird über transmembranäre Serin/Threonin Kinasen vermittelt (Verrecchia und Mauviel, 2007).

Butaprost ist ein Prostaglandin E-Rezeptor (PGE₂) Agonist. Über den Prostaglandin E₂-Rezeptor wird die antigeninduzierte Proliferation von Lymphozyten, eine Kontraktion der glatten Muskelzellen der Atemwege, sowie der Übergang von Fibroblasten in Myofibroblasten inhibiert, der im Rahmen des Remodeling eine Rolle spielt (Vancheri et al., 2004).

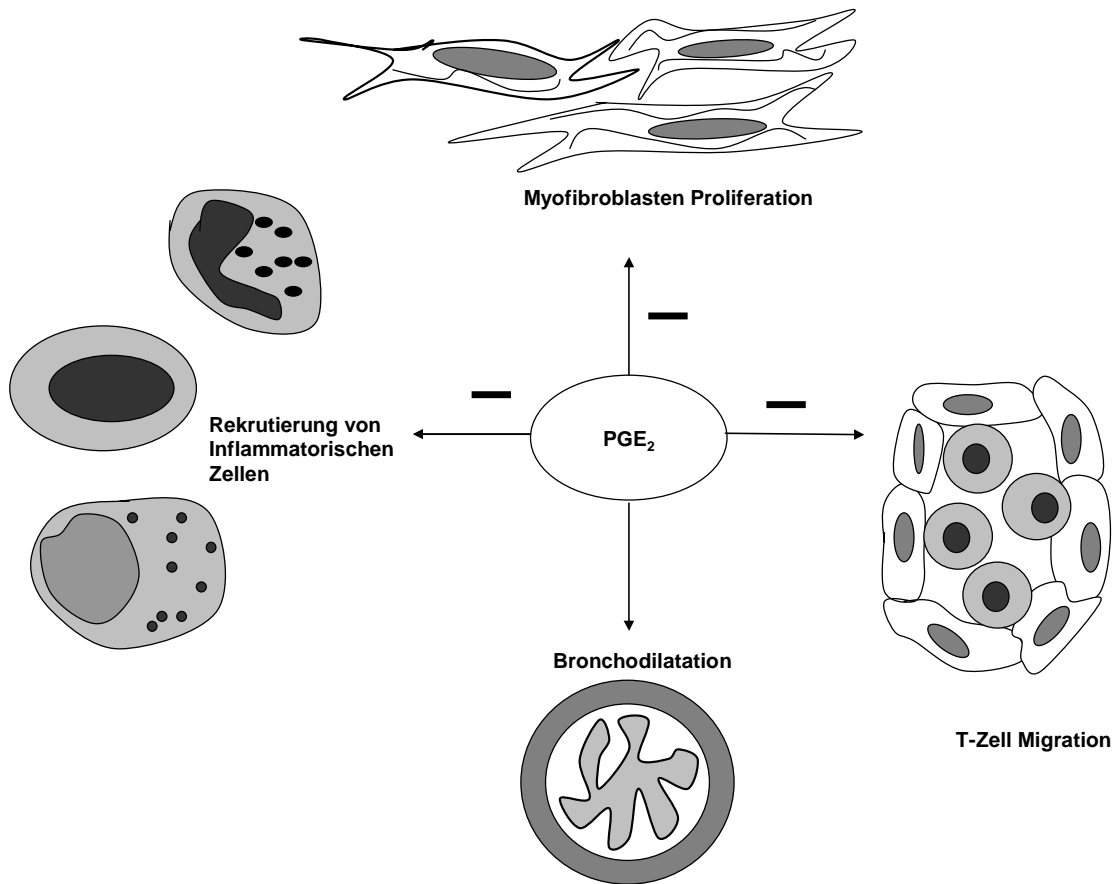


Abb. 7: Wirkung von Prostaglandin E₂ in der Lunge. Die Wirkung von Prostaglandin E₂ besteht in einer Bronchodilatation, einer Inhibition der Rekrutierung von inflammatorischen Zellen, sowie Inhibition der T-Zell Migration. Es beeinflusst ebenfalls den bronchialen Remodeling Prozess durch Inhibition des Überganges von Fibroblasten in Myofibroblasten, modifiziert nach (Vancheri et al., 2004).

Isoprenalin (siehe Abb. 8) ist ein reiner Agonist an β_1 - und β_2 -Rezeptoren. β_2 -Rezeptoren kommen unter anderem in der Lunge vor und spielen pathophysiologisch eine Rolle bei der COPD. Über sie wird eine Bronchodilatation vermittelt (Starke und Palm, 1996).

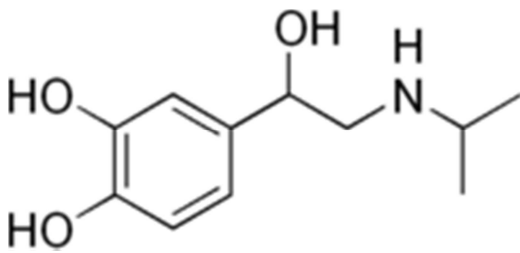


Abb. 8: Isoprenalin

2.4. Zielsetzung

Zahlreiche klinische Studien haben gezeigt, dass Tiotropium die Progression der COPD mindern kann. Dies lässt Rückschlüsse zu, dass Tiotropium und damit cholinerge Mechanismen Einfluss auf Remodeling Vorgänge nehmen. In vitro Befunde an Fibroblasten zeigen, dass Kollagensynthese und Proliferation von Fibroblasten cholinerg kontrolliert werden. Hier stellt sich die Frage, ob cholinerge Mechanismen an der Steuerung von MMPs beteiligt sind.

In der vorliegenden Studie wird die Expression von MMP1, -2, -3 und -9 in humanen Lungenfibroblasten, sowie die Wirkung von cholinergen Agonisten und Antagonisten auf die Expression und Aktivität der MMPs untersucht. Hierzu werden cholinerge Agonisten Carbachol und Oxotremorin, sowie der cholinerge Antagonist Tiotropium verwendet. Als Referenzstimuli werden TGF β und Butaprost, ein Prostaglandin E-Rezeptor Agonist verwendet (Malemud, 2006).

Folgende Fragen sollen überprüft werden:

- Einfluss cholinergischer Effekte auf die mRNA Expression der MMP1, 2, 3 und 9 in humanen Lungenfibroblasten (MRC5-Zellen)
- Einfluss cholinergischer Effekte auf die Aktivität der MMP1, 2, 3 und 9 in humanen Lungenfibroblasten

3. Methodik

3.1. Materialien

3.1.1. Allgemeine Chemikalien, Enzyme, Reaktionskits

Agarose	Roth, Karlsruhe
Basismedium EARLE'S MEM	PAA, Cölbe
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Brij	Sigma, Steinheim
Bromphenol-Blau	Amersham, Freiburg
CaCl ₂ • 2H ₂ O	Merck, Darmstadt
Coomassie R-250	Serva, Heidelberg
DNA Ladder Ready-Load 100bp	Invitrogen, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München
Ethydiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, München
Eisessig	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol (absolut)	Merck, Darmstadt
Ficoll 400	Sigma-Aldrich, München
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin
Glycerol	Serva, Heidelberg
Glycin	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCL)	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
β-Mercopthoethanol	Sigma-Aldrich, München
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
MEM Non Essential Amino Acid (100 x) (NEAA)	PAA, Cölbe
Omniscript RT Kit	Qiagen, Hilden
Oligo dT Primer	MWG-Biotech, Ebersberg
Penicillin/Streptomycin-Lösung (1000 U/ml / 10mg/ml)	Sigma-Aldrich, München
RNase-Free DNase Set (50)	Qiagen, Hilden
RNase Inhibitor RNAsin plus 40 U/μl	Promega, Madison
RNeasy Mini Kit (250)	Qiagen, Hilden

Salzsäure 32% (HCL konz.)	Merck, Darmstadt
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Pharmacia, Wien
Sodium Pyrovate Solution (100mM)	PAA, Cölbe
TaqDNA Polymerase 5 U/μl	Invitrogen, Carlsbad
Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Tris-hydroxymethyl-aminomethan Hydrochlorid (Tris-HCL)	Boehringer Ingelheim, Mannheim
Triton x-100	Boehringer Ingelheim, Mannheim
Trypan Blau (0,4%)	Sigma-Aldrich, München
Trypsin EDTA 10x	Sigma-Aldrich, München
Zymogram-Gel (Gelatine 10%)	Invitrogen, Karlsruhe

3.1.2. Primer

MMP-1-s 5'-CGA CTC TAG AAA CAC AAG AGC AAG A-3'	MWG-Biotech, Ebersberg
MMP-1-as 5'-AAG GTT AGC TTA CTG TCA CAC GCT T-3'	MWG-Biotech, Ebersberg
MMP-2-s 5'-GTG CTG AAG GAC ACA CTA AAG AAG A-3'	MWG-Biotech, Ebersberg
MMP-2-as 5'-TTG CCA TCC TTC TCA AAG TTG TAG G-3'	MWG-Biotech, Ebersberg
MMP-3-s 5'-AGA TGC TGT TGA TTC TGC TGT TGA G-3'	MWG-Biotech, Ebersberg
MMP-3-as 5'-ACA GCA TCA AAG GAC AAA GCA GGA T-3'	MWG-Biotech, Ebersberg
MMP-9-s 5'-CAC TGT CCA CCC CTC AGA GC-3'	MWG-Biotech, Ebersberg
MMP-9-as 5'-GCC ACT TGT CGG CGA TAA GG-3'	MWG-Biotech, Ebersberg
MMP-9-s2 5'-ATC CAG TTT GGT GTC GCG GAG C-3'	MWG-Biotech, Ebersberg
MMP-9-as2 5'-GAA GGG GAA GAC GCA CAG CT-3'	MWG-Biotech, Ebersberg

3.1.3. Substanzen

Butaprost
Carbachol
Isoprenalin

Oxotremorin
TGF β
Tiotropium

Sigma-Aldrich
Boehringer Ingelheim,
Mannheim
Sigma-Aldrich
Sigma-Aldrich, München
Boehringer Ingelheim,
Ingelheim am Rhein

3.1.4. Arbeitsgeräte

Analysenwaage
Autoklav

2444, Satorius, Göttingen
80230, WEbeco

Brutschrank

Forma Scientific

Elektrophoresekammer: NuPAGE

Invitrogen, Karlsruhe

Gefrierschrank
Gelelektrophoresekammer (Zymographie)
Photodokumentationssystem Power Shot G5

-86°C Freezer, Forma Scientific
Invitrogen, Karlsruhe
Canon, Krefeld

Mikroskop

IMT2-RFL, Olympus

Neubauerzählkammer

Brand

pH-Elektrode
pH-Meter
Photometer
Pipetten (0,5-10, 2-20, 10-100, 100-1000 μ l)

SenTix 81, WTW
inoLab 1, WTW
DU-64, Beckmann, München
Research und Reference
Eppendorf, Hamburg
Pipetus akku, Hirschmann
Labortechnik, Solingen

Pipettierhilfe elektrisch

Quarzküvette

10x15 mm Suprasil, Hellma

Rüttler

Stratagene, Heidelberg

Sicherheitswerkbänke
Spannungsgeräte

Lamin Air HB HHB 2436, Holten
2297 Macrodrive 5, LKB
Bromma, Schweden

Zentrifugen

5408 R Kühlzentrifuge,
Eppendorf, Hamburg
5415 C, Eppendorf, Hamburg
L7-55 Ultrazentrifugen,
Beckmann, München

Heizblöcke und Thermocycler:
PCR Thermal Reactor
MyCycler

MWG, Ebersberg
BioRad, München

3.2. Methoden

3.2.1. Kultur der humanen Fibroblasten-Zelllinie (MRC 5)

Es wird mit humanen Fibroblasten aus der Lunge eines 14 Wochen alten männlichen Feten (MRC5-Zellen) gearbeitet, die sich in Kultur befinden.

Die Zellen werden bei einer Temperatur von 37 °C und einem CO₂ Gehalt von 5 %, den optimalen Umgebungsbedingungen, in einer Flasche, die Nährmedium enthält, in einem Brutschrank gelagert. Regelmäßig werden sie auf Vitalität, Verkeimung und Konfluenz, das heißt, wie dicht der Boden der Flasche von einem Zellrasen besiedelt ist, überprüft. Bei einer Konfluenz von 90 % werden die Zellen trypsiniert, um sie von dem Flaschenboden zu lösen, wobei ein Teil der Zellen für Versuche ausgesät und der andere Teil in eine neue Kulturflasche zur Erhaltung der Zellkultur überführt wird.

Um die Zellen zu passagieren wird eine auf 37 °C aufgewärmte sterile 1-fache PBS Lösung (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung) zur Entfernung von Mediumresten, sterile 1-fache Trypsin-EDTA Lösung zur Lyse der Zellen vom Flaschenboden und Kulturmedium mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS), zur Abstopfung der durch Trypsin in Gang gesetzten Reaktion benötigt.

Das in der Zellkulturflasche befindliche Medium wird abgesaugt und verworfen. Um Rückstände des Mediums zu entfernen werden die Zellen zweimal mit steriler 1-facher PBS Lösung gewaschen. Zur Trypsinierung der am Flaschenboden haftenden Zellen wird eine von der Flaschengröße abhängige definierte Menge sterile 1-fache Trypsin-EDTA Lösung hinzugegeben.

Nach einer Einwirkzeit von 30 Sekunden wird die Reaktion durch Zugabe von Kulturmedium mit 10 % FKS gestoppt, nachdem die Trypsin-EDTA Lösung vorher entfernt wird. Anschließend wird die Zell-/Mediumlösung zentrifugiert, um die Zellen von dem Medium zu trennen. Dazu wird die Zell- beziehungsweise Mediumsuspension in ein steriles Röhrchen überführt und bei 1000 U/min 5 Minuten zentrifugiert. Die Zellen befinden sich nun als Pellet am Boden des Röhrchen. Der Überstand wird verworfen und die als Pellet vorliegenden Zellen werden in einer definierten Menge frischem FKS-haltigen Medium resuspendiert.

Die Bestimmung der Zellzahl wird mit Hilfe der Neubauer Zählkammer und die der Zellvitalität durch gleichzeitige 0,15 % Trypanblau-Färbung vorgenommen. Die Kammer wird mit einem Teilvolumen der Zellsuspension gefüllt (20 µl Zellsuspension und 80 µl 0,15 % Trypanblau-Lösung). Die Zellen werden unter dem Mikroskop ausgezählt. Die avitalen Zellen färben sich blau und werden nicht mitgezählt. Die im vollständigen Volumen der Zellsuspension vorliegende Zellzahl kann mit Hilfe des Kammerfaktors berechnet werden.

Sowohl für die PCR als auch für die Zymographie wird eine Zellzahl zwischen 0,2 und 0,4 Millionen Zellen in einer 6 Well-Platte ausgesät und 2 ml Kulturmedium mit 10 % FKS hinzu pipettiert. Der Rest der Zellen wird in eine neue Kulturflasche für spätere Versuche überführt. Am folgenden Tag werden das Aussehen und die Konfluenz der Zellen unter dem Mikroskop begutachtet. In Abhängigkeit von der Konfluenz der Zellen, das heißt bei einer Konfluenz der Zellen zwischen 70-80 %, werden diese noch am selben Tag für die Substanzzugabe vorbereitet. Der Ablauf ist folgendermaßen:

Abpipettierung des FKS-haltigen Mediums

2-fache Waschung mit steriler 1x-PBS-Lösung zur Entfernung noch eventuell vorhandener Mediumreste

Erneuerung des Mediums ohne FKS

Bei einer 24-stündigen Inkubationszeit wird ein Intervall von 4 Stunden zwischen Mediumwechsel und Substanzzugabe berücksichtigt. Beträgt die Inkubationszeit 48 Stunden, werden die Substanzen unmittelbar nach dem Mediumwechsel hinzugegeben.

Es werden folgende Substanzen in folgenden Konzentrationen verwendet:

Carbachol

10 µM

Carbachol	20 µM
Oxotremorin	10 µM
TGF-β	5 ng/ml
Tiotropium	100 nM
Tiotropium	1 nM
Isoprenalin	100 nM
Butaprost	100 nM

Carbachol, Oxotremorin, Tiotropiumbromid und Isoprenalin werden in sterilem Wasser gelöst. Es wird eine 1 mM Lösung hergestellt, die auf die gewünschte Endkonzentration verdünnt wird. Bei der Verwendung von Isoprenalin ist zu beachten, dass sowohl für die Stammlösung als auch zur weiteren Verdünnung eine 0,1 % Ascorbinsäurelösung verwendet wird.

Die Substanzen werden in den oben erwähnten Konzentrationen in das Medium gegeben. Eine Versuchsreihe sieht eine Inkubationszeit von 24 Stunden, eine zweite eine Inkubationszeit von 48 Stunden vor. Nach Ende der Inkubationszeit werden das Aussehen und die Konfluenz der Zellen unter dem Mikroskop begutachtet. Das Medium wird für die Zymographie abgenommen und bei -80 °C eingefroren. Die Zellen werden für die RNA-Präparation lysiert.

Kulturmedium für humane Fibroblasten ohne FKS

Basis medium EARLE'S MEM

Penicillin / Streptomycin	100 U/ml / 100 µg/ml
10x Non Essential Amino Acids (NEAA)	1x
Sodium Pyruvate Solution	1 mM

Kulturmedium für humane Fibroblasten mit 10% FKS

Basismedium EARLE'S MEM

Fetales Kälberserum (FKS)	10% (v/v)
Penicillin / Streptomycin	100 U/ml / 100 µg/ml
10x Non Essential Amino Acids (NEAA)	1x
Sodium Pyruvate Solution	1 mM

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

KCL 27 mM

KH₂PO₄ 15 mM

NaCl 1,38 M

Na₂HPO₄ 81 mM

Bidestilliertes Wasser

1x Trypsin-EDTA Lösung

10x Trypsin-EDTA

1:10 verdünnt mit sterilem 1x PBS-Puffer

0,15% Trypanblau-Lösung

0,4 % Trypan Blue Stain

3:8 verdünnt mit sterilem PBS

3.2.2. RNA-Präparation

Das Prinzip der RNA-Präparation besteht in der Lyse der Zellen mit einer anschließenden Isolation der in den Zellen vorhandenen RNA. Über eine Bindung der RNA an eine spezielle im Reaktionsgefäß enthaltene Matrix, findet eine Aufreinigung mit anschließender Lösung der RNA von der Matrix statt. Diese Schritte ermöglichen eine Isolation der RNA. Die RNA-Isolation erfolgt mit Hilfe des RNeasy[®] Mini Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben.

Für die Zelllyse wird Lysepuffer, der 1:100 mit β -Mercaptoethanol versetzt ist, benötigt. Für eine 35 mm Schale, mit der hier gearbeitet wird, werden 350 μ l Lysepuffer mit 3,5 μ l β -Mercaptoethanol verwendet. Das Medium wird für die Zymographie in ein Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C eingefroren. Die Zellen werden einmal mit unsteriler warmer einfacher PBS Lösung gewaschen, um noch vorhandene Mediumreste zu entfernen, und mit β -Mercaptoethanol versetztem Lysepuffer bedeckt. Nach mehrmaligem auf- und abpipettieren, zur Lösung der Zellen von der Unterfläche,

wird die Zellsuspension in ein Qiashreder Tube überführt und bei 13000 U/min zwei Minuten zentrifugiert, um den in der Suspension enthaltenen Zelldetritus zu entfernen.

Der Überstand wird in ein neues Eppendorf Gefäß überführt; dabei ist zu beachten, dass keine festen Bestandteile mit abgenommen werden. Um eine bessere Bindung der RNA an die im Reaktionsgefäß enthaltene Membran zu schaffen, wird die Suspension mit 70 % Ethanol (1:1) versetzt. Die Zell-/Ethanol suspension wird in die dem Kit beigegefügte Spin Column überführt, das mit einer Kieselsäurenmatrix ausgekleidet ist, an die die RNA bindet. Die Zell-/Ethanol suspension wird 15 Sekunden bei 10000 U/min zentrifugiert. Die RNA ist an der Kieselsäurematrix gebunden. Das Filtrat wird verworfen. Die folgenden Waschschriffe dienen der RNA Aufreinigung. In die gleiche Spin Column werden 350 µl des RW1 Waschpuffer pro Säule pipettiert, es wird wieder bei 10000 U/min 15 Sekunden zentrifugiert. Um eventuell kontaminierende genomische DNA abzubauen, werden 80 µl mit RDD-Puffer versetzte DNase I auf die Säule gegeben und bei Raumtemperatur 15 Minuten inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit werden 350 µl RW1 Puffer auf die Säule gegeben und wieder 15 Sekunden bei 10000 U/min zentrifugiert.

Das RNeasy Column wird in ein neues Tube überführt und 500 µl RPE-Puffer werden hinzupipettiert die sich anschließende Zentrifugation findet wieder bei 10000 U/min für 15 Sekunden statt, das Filtrat wird verworfen und der oben beschriebene Schritt wiederholt, wobei die Zentrifugation auf zwei Minuten verlängert wird. Das Filtrat wird wiederum verworfen. Es schließt sich eine erneute Zentrifugation von zwei Minuten an, um eine optimal Trocknung der Säule zu erreichen. Die Säule wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und es werden 60 µl RNase freies Wasser auf den Boden der Säule pipettiert ohne diesen jedoch zu berühren, um Kontaminationen zu vermeiden. Die anschließende Zentrifugation für die Dauer von einer Minute bei 10000 U/min ist zur Elution der RNA notwendig. Zur Erhöhung der RNA Konzentration wird das Eluat erneut auf die Membran gegeben und zentrifugiert. Die Konzentration der RNA wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Hierzu wird die Probe 1:10 mit RNase-freiem Wasser verdünnt, um einen RNA Abbau zu verhindern.

Die präparierte RNA wird entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -80 °C eingefroren.

3.2.3. Reverse Transkription

Hierzu wird das Omniscript RT Kit von Qiagen (Hilden) verwendet.

Durch das Enzym Reverse Transkriptase werden die in der Probe enthaltenen RNA Sequenzen in komplementäre cDNA Sequenzen umgeschrieben.

Durch die hohe Instabilität der RNA ist es wichtig, dass alle Gefäße die RNA enthalten, auf Eis gestellt werden und für die Pipettiervorgänge nur RNase freie Reaktionsgefäße und gestopfte Pipettenspitzen verwendet werden.

Nach photometrischer Absorptionbestimmung bei 260 nm wird die RNA-Konzentration nach folgender Formel berechnet:

$$A_{260nm} \times 40(\text{RNA-Faktor}) \times 10 (\text{Faktor der Verdünnung})/1000 = \text{RNA-Konzentration in } \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

Es wird eine Menge von 1 μg in die Reaktion eingesetzt, das entsprechende Volumen wird entnommen und in ein neues 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit RNase-freiem Wasser auf ein Endvolumen von 12,5 μl aufgefüllt.

Hierzu werden 7,5 μl Master-Mix hinzugegeben. (Herstellung siehe unten)

Das erreichte Endvolumen beträgt 20 μl . Die RT-Reaktion findet bei 37 °C und einer Inkubationszeit von 60 Minuten statt. Die anschließende Inkubation bei 93 °C und einer Dauer von fünf Minuten wird zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase durchgeführt. Die Proben werden 10 Sekunden zentrifugiert, um die am Deckel gebildeten Kondensationströpfchen wieder in Lösung zu bringen. Es werden pro Reaktionsgefäß 80 μl steriles Wasser hinzugegeben. Die bei der Reversen Transkription hergestellte cDNA wird entweder bei 20 °C eingefroren oder direkt für weitere Versuche verwendet.

Master-Mix für die Reverse Transkription

Die Angaben beziehen sich auf ein Probenvolumen von den oben erwähnten 7,5 μl . Der Master-Mix wird für n+1 Proben angesetzt:

10xRT Puffer	2 μl
5 nM dNTP-Mix	2 μl
10 μM Oligo dT-Primer	2 μl
10 U/ μl RNase Inhibitor RNAsin Plus (1:4 verdünnt mit 1xRT-Puffer)	0,5 μl
Omniscript RT	1 μl

3.2.4. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein wichtiges Verfahren zur Amplifikation durch Oligonukleotide (Primer) festgelegter DNA Sequenzen. Das Prinzip der DNA Amplifikation besteht aus folgenden drei Schritten:

Denaturierung

Anlagerung der Primer an die komplementäre DNA-Sequenz

Elongation

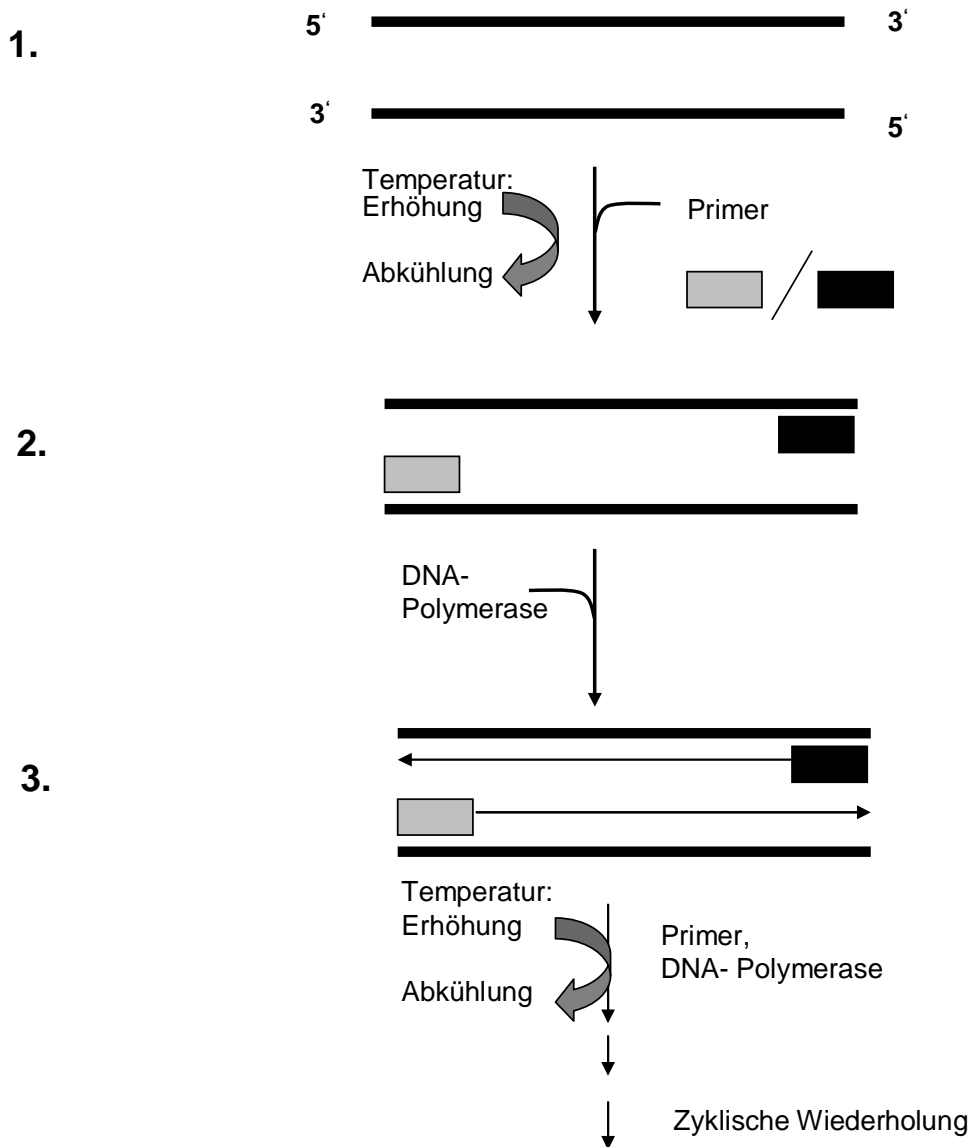


Abb. 9: Darstellung der grundlegenden Prinzipien der PCR.

Denaturierung des Doppelstranges durch Temperaturerhöhung mit anschließender Abkühlung zur Anlagerung der Oligonukleotide (Primer), die der Sequenz an den 3' -Enden des DNA-Stückes komplementär sind, das amplifiziert werden soll.

Anlagerung der DNA-Polymerase

Verlängerung der beiden Einzelstränge von 3' in 5' Richtung zum jeweiligen Doppelstrang komplementär (cDNA), so dass zwei DNA- Doppelstränge vorliegen. DNA-Polymerasen stammen aus thermophilen Bakterien und sind in der Lage, auch bei Temperaturen bis 100°C DNA zu synthetisieren. Durch Wiederholung des beschriebenen Reaktionszyklus kommt es zu einer exponentiellen Zunahme der amplifizierten DNA.

Die Dauer einer PCR beträgt zwischen 23-35 Zyklen. Jeder Zyklus besteht aus den in der Abbildung 9 dargestellten Phasen.

Das Gesamtreaktionsvolumen setzt sich aus 5 µl cDNA und 45 µl Mastermix zusammen. Die cDNA wird in den Reaktionsgefäßen vorgelegt. Anschließend wird der Mastermix auf Eis wie folgt pipettiert:

Für n+1

Steriles H ₂ O	32 µl
10x PCR Puffer (-MgCl ₂)	5 µl
50 mM MgCl ₂	1,5µl
10 mM dNTP	1 µl
10 µM Primer Sense	2,5 µl
10 µM Primer Antisense	2,5 µl
5 U/µl Taq DNA Polymerase	0,3 µl

und auf die entsprechenden Reaktionsgefäße verteilt; das Gesamtreaktionsvolumen von 50 µl wird kurz gevortext und runterzentrifugiert, bevor die Reaktion im Thermocycler mit folgendem Programm:

Denaturierung	94 °C	3 Minuten 1x
23 Zyklen (β-Actin)/ 30 Zyklen (MMP1,2,3,9)		
Zyklen:		
Denaturierung	94 °C	45 Sekunden
Primer-Annealing	56 °C	30 Sekunden
Elongation	72 °C	1,5 Minuten
Elongation	72 °C	10 Minuten 1x

gestartet wird. Die durch die PCR erhaltenen DNA Amplifikate werden entweder bei 20 °C eingefroren oder direkt auf ein Agarose-Gel aufgetragen.

3.2.5. Agarose- Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient zur Auftrennung der amplifizierten cDNA Fragmente. Hierzu wird eine elektrische Spannung angelegt. Die cDNA-Fragmente

wandern entsprechend ihrer Größe, Ladung und der angelegten Spannung weit bzw. weniger weit. Zur Längenidentifizierung der amplifizierten cDNA-Fragmente wird eine Basenpaarleiter aufgetragen, in der sich DNA-Fragmente bekannter Größe befinden.

Es wird ein 1,2 % Agarose-Gel hergestellt, das mit 0,33 µg/ml Ethidiumbromid, einem Fluoreszenzfarbstoff, versetzt wird.

Das Agarose-Gel wird mit 0,5 x TBE Puffer in der Elektrophoresekammer bedeckt. Die Proben, die zuvor mit Probenpuffer versetzt wurden, werden in die Geltaschen aufgetragen. Das aufgetragene Probenvolumen umfasst zwischen 25-30 µl. In eine weitere Geltasche werden 10 µl der 100 bp DNA-Leiter zur Größenidentifizierung der amplifizierten DNA Fragmente aufgetragen. Es wird eine Stromstärke von 70 mA angelegt, die solange angelegt bleibt, bis die Probenfront den unteren Gelrand erreicht hat. Das Ergebnis wird fotografisch festhalten. Durch die Anregung mit UV Licht bei 254 nm des in der DNA eingelagerten Ethidiumbromids können die amplifizierten cDNA Fragmente sichtbar gemacht und fotografisch dargestellt werden.

Mit Hilfe des RFLP-Scan, einem Computer Programm, wird eine semiquantitative Auswertung der dargestellten Banden vorgenommen, wobei eine Messung der optischen Dichte der Banden stattfindet. Es wird der Quotient aus der Probenbande und der β-Actin Bande, die zur Kontrolle dient, gebildet.

Agarose-Gel 1,2 %

Agarose 1,2 g

TBE 0,5x 100 ml

Ethidiumbromid-Stammlösung(10mg/ml) 0,33 µg/µl

5x TBE-Puffer

Tris 54,9 g

Borsäure 27,5 g

EDTA 4,65 g

Mit bidestilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen

0,5x TBE-Puffer

1:10 verdünnt mit bidestilliertem Wasser

1 % Ethidiumbromid-Lösung

Ethidiumbromid 1 % (w/v)

Bidestilliertes Wasser

Probenpuffer

Ficoll 400 1,5 g 15 % (w/v)

1 % (w/v) Bromphenolblau-Lösung 2,5 ml 0,25 % (w/v)

5x TBE 1 ml 0,5x

Mit bidestilliertem Wasser auf 10 ml auffüllen

3.2.6. Zymographie

Die Zymographie ist eine elektrophoretische Technik, mit der die Aktivität von MMPs dargestellt werden kann. Es wird Substrat (hier wird Gelatine verwendet) im Gel verankert. Die MMPs werden mit SDS (sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat) denaturiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der sich anschließenden Renaturierung mit einem nicht ionischen Detergenz, wie z.B. Triton X-100, wird das Gel in einer Pufferlösung zur Aktivierung der MMPs inkubiert. Die im Gel enthaltene Gelatine wird durch die MMPs degradiert. Diese Zonen erscheinen nach Färbung mit Coomassie Blau transparent, im Gegensatz zum Rest des Gels, in dem die Gelatine nicht degradiert wurde.

Die bei -80 °C eingefrorenen Proben werden langsam auf Eis aufgetaut und durchmischt. Die Proben werden 1:1 mit einem Puffer nach Laemmli versetzt. Es werden 20 µl auf ein 10 % Gelatine-Gel aufgetragen, das in einer mit 1x Elektrodenpuffer gefüllten Elektrophorese Kammer eingespannt ist. Die Laufzeit des Gels beträgt 90 Minuten bei 125 V konstant und 35 mA.

Nach Beendigung der Laufzeit wird das Gel mit Renaturierungspuffer, zur Entfernung des SDS und Entfaltung der Enzyme, auf einem Plattentaumler für 30 Minuten inkubiert. Zur Entfernung des Renaturierungs-Puffers schließt sich ein Waschschrift mit destilliertem Wasser für 30 Minuten an. Dieser Schritt wird 2 x wiederholt.

Nach Beendigung der Waschung wird das Gel in einen verschließbaren Behälter überführt. Dieser enthält Entwicklungs-Puffer zur Optimierung der Umgebungs- und

Aktivierungsbedingungen der im Gel aufgetragenen MMPs. Die Inkubationszeit beträgt 3 Stunden bei 37 °C. Zur Entfernung des Developing-Puffers wird das Gel nach Beendigung der Inkubationszeit 10 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wird das Gel in eine 0,5 % Coomassie Blue Lösung überführt und für 10 Sekunden in der Mikrowelle bei 470 Watt erwärmt. Dies dient zur besseren Einlagerung der Färbelösung an die im Gel enthaltene Gelatine. Die Inkubationszeit in der Färbelösung nach Erwärmung beträgt 10 Minuten. Dieser Vorgang wird nach Beendigung der Inkubationszeit mit Entfärbelösung wiederholt, wodurch es zu einer Auswaschung der Coomassie Blue Lösung an den Banden kommt, an denen von den in den Proben enthaltenen MMPs die Gelatine abgebaut wurde.

Das Ergebnis ist ein blau gefärbtes Gel da, wo die Coomassie Blue Lösung sich an die Gelatine angelagert hat und mit weißen Banden da, wo die Gelatine von den MMPs abgebaut wurde.

Das Gel wird auf einem Weißlichttisch fotografiert, so dass ein Foto, auf dem das Gel weiß und die Banden schwarz dargestellt sind, entsteht. Dieser Schritt ist Voraussetzung, für die anschließende semiquantitative Auswertung der Banden mit Hilfe eines Computerprogramms, des RFLP-Scan. Hierbei wird die optische Dichte der Banden gemessen und der Quotient aus der optischen Dichte der Kontrollbande und der der Probenbande gebildet

Elektrodenpuffer 5x

Tris (125mM)	15 g
Glycin (7,2 %)	72 g
SDS (0,5 %)	5 g
Aqua dest.	auf 1000 ml auffüllen

Der Elektrodenpuffer wird vor Gebrauch 1:5 mit Aqua dest. verdünnt.

Laemli-Puffer 2x

Tris-HCL 63 mM	2,5 ml einer 0,5 M Lösung
Glycerol 10 %	2 ml
SDS 2 %	4 ml einer 10 % Lösung
Bromphenol-Blau 0,0025 %	0,5 ml einer 0,1 % Lösung

Aqua dest. auf 10 ml auffüllen
Der Laemli-Puffer wird 1:1 mit der im Gel aufzutragenden Probe verdünnt.

Renaturierungs-Puffer 5x

Triton-X 100, 35 % (w/v) in H₂O 67,5 g
Aqua dest. auf 500 ml auffüllen
Der Puffer wird vor Benutzung 1:5 mit Aqua dest. verdünnt.

Entwicklungs-Puffer 10x

Aqua dest. 400 ml
Tris Base 30,2 g
6 M HCL 33 ml
NaCl 58,5 g
CaCl₂• 2H₂O 3,7 g
Brij 10 g
Aqua dest. auf 500 ml auffüllen
pH-Wert messen und mit 20% NaOH auf 7,6 einstellen
Für die Zymographie wird der Puffer 1:10 mit Aqua dest. verdünnt.

3.2.7. Statistik

RFLP-Scan

Das Programm wird zur semiquantitativen Berechnung der PCR und Zymographie Banden auf den Agarose-/ Gelatinegelen verwendet.

GraphPad Prism 5

Das Programm GraphPad Prism wird für die statistische Auswertung benutzt. Die Signifikanz wird mit dem gepaarten t-Test und one way ANOVA ebenfalls mit Hilfe von GraphPad Prism 5 bestimmt. Es werden nur Mittelwerte in den grafischen Darstellungen verwendet, die mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 5 erstellt werden. Die Signifikanz wird für ein $p < 0,05$ festgelegt.

4. Ergebnisse

4.1. Basisexpression der MMPs

Bevor der Frage nach einer möglichen Regulation der MMPs in Lungenfibroblasten nachgegangen werden konnte, wurde zunächst untersucht, welche MMP-Isoenzyme in humanen Lungenfibroblasten exprimiert werden. Die vorliegenden Untersuchungen wurden an der Zelllinie MRC5, die sich in zahlreichen früheren Untersuchungen des hiesigen Labors als primären Zellen sehr ähnlich erwiesen haben (Haag et al., 2008; Matthiesen et al., 2006), durchgeführt.

Mittels RT-PCR konnte gezeigt werden, dass in MRC5 Zellen die Isoenzyme MMP1, MMP2 und MMP3 deutlich exprimiert werden, während Transkripte für MMP9 nicht dedektierbar waren (Abb. 10). Auch nach einer Kultivierung der Zellen mit TGF- β (5ng/ml für 24 Stunden) oder mit den Muskarinrezeptoragonisten Carbachol oder Oxotremorin (jeweils 10 μ g für 24 Stunden) blieb die MMP9 undedektierbar, d. h. eine Induktion der Expression konnte durch diese Stimuli nicht erzielt werden (Abb. 11).

In weiteren Versuchen mit DNase Verdau während der RNA Präparation, um eine Verunreinigung mit DNA auszuschließen, konnte ebenfalls keine Expression auf mRNA Ebene nachgewiesen werden.

Das vorliegende Ergebnis weist darauf hin, dass keine mRNA Expression der MMP9 in humanen Lungenfibroblasten der Zelllinie MRC5 stattfindet.

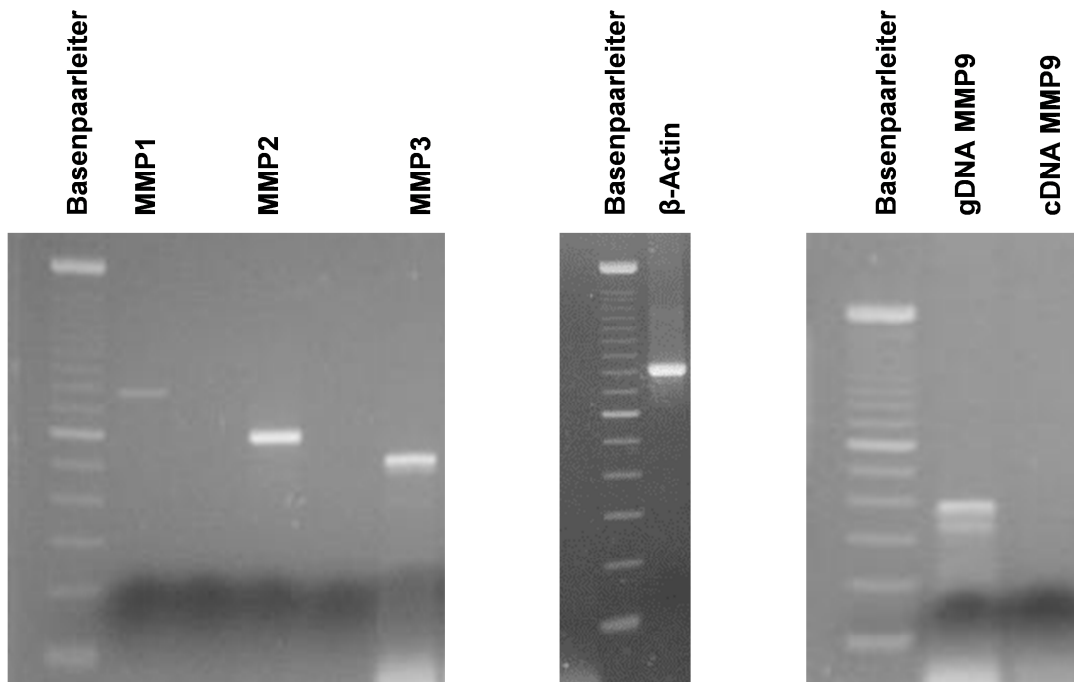


Abb.10: RT-PCR Analyse zur Expression der MMP1, MMP2, MMP3 und MMP9 in humanen MRC5 Lungenfibroblasten. MRC5 Zellen wurden bei 37 C°, einem 5 % CO₂ Gehalt mit einem 10% FKS-Medium bis zu einer Konfluenz von 90% inkubiert. Nach anschließender Zellyse und RNA Präparation wurden RT-PCR Analyse mit Primerpaaren, die spezifisch für die jeweilige MMP-Isoform waren, durchgeführt (30 Zyklen). Die Qualität der cDNA wurde durch Amplifizierung von β-Aktin kontrolliert. Die Amplifikate wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. In der Abbildung sind repräsentative Gele dargestellt.

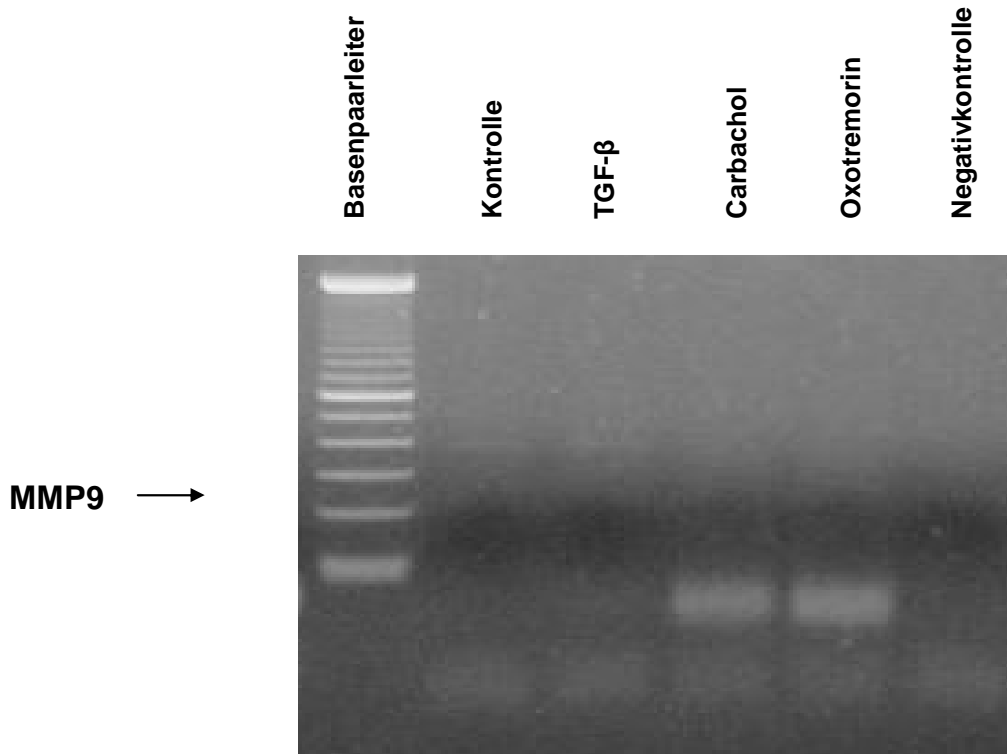


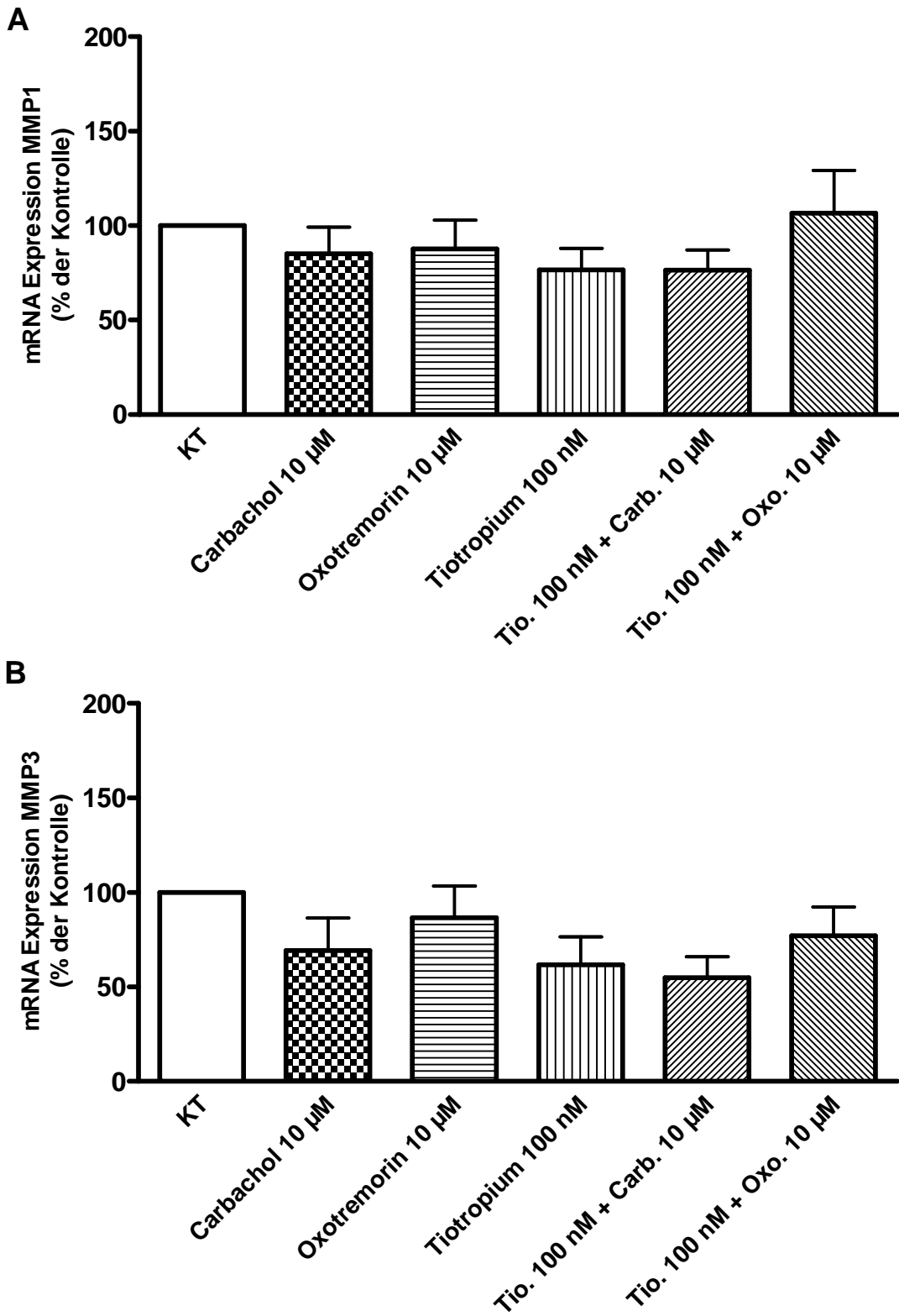
Abb. 11: Wirkung von Transforming Growth Factor 1 (TGF- β und muskarinischen Agonisten auf die mRNA Expression von MMP9 in MRC-5 Lungenfibroblasten. Nach Aussaat von 600000 Zellen erfolgte eine 24-stündige Kulturphase mit FKS haltigem (10%) Medium. Danach folgte ein Wechsel auf FKS-freies Medium und 4 Stunden danach eine weitere Kultur in Ab- oder Anwesenheit der Testsubstanz (TGF- β 5 ng/ml, Carbachol 10 μ M oder Oxotremorin 10 μ M) für weitere 24 Stunden. Nach anschließender Zelllyse und Präparation der mRNA wurden RT-PCR Analysen wie in Abb. 10 beschrieben durchgeführt. Dargestellt ist ein repräsentatives Gel einer Serie von Experimenten mit n = 3 (Negativkontrolle = PCR ohne Zugabe von spezifischer cDNA).

4.2. Einfluss von cholinergen Agonisten und Antagonisten auf die mRNA-Expression und Enzymaktivität der MMPs

Zur Prüfung einer möglichen cholinergen Beeinflussung der Expression von MMPs wurde eine Versuchsreihe mit Carbachol, einem Agonisten an muscarinischen und nicotinischen Rezeptoren, Oxotremorin, einem Agonisten an muscarinischen Rezeptoren und Tiotropium einem Antagonisten an muscarinischen Rezeptoren durchgeführt.

Hierbei zeigte sich, dass weder die mRNA Expression von MMP1, noch die von MMP3 durch eine 24 stündige Exposition mit diesen Pharmaka beeinflusst wurde (MMP1, Abb. 12A, MMP3, Abb. 12B). Weiterhin blieb auch die mRNA Expression von MMP2, in Anwesenheit dieser cholinergen Testsubstanzen unbeeinflusst (Abb. 12C). Auch auf

Ebene der Enzymaktivität (MMP2, Abb. 13) konnte keine Wirkung der cholinergen Agonisten oder Antagonisten bei einer 24-stündigen Kulturphase nachgewiesen werden.



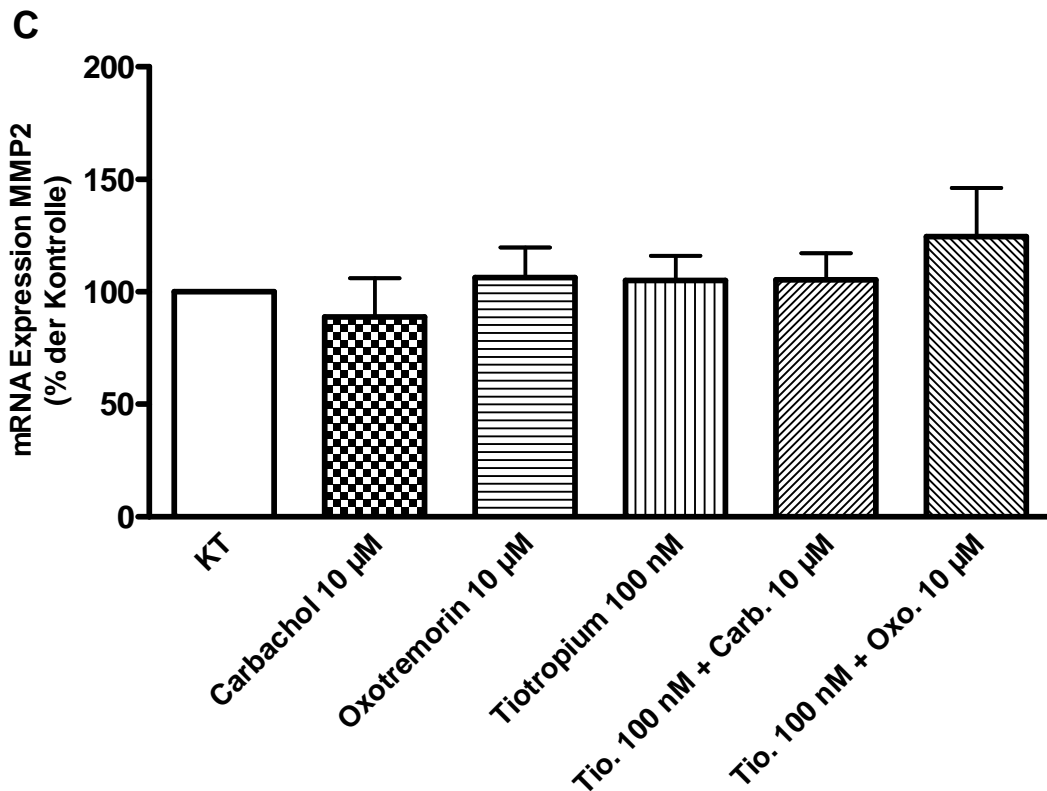


Abb. 12: Wirkung von Carbachol (Carb.), Oxotremorin (Oxo.) und/oder Tiotropium (Tio.) auf die mRNA Expression von MMP1 (**12A**), MMP3 (**12B**) bzw. MMP2 (**12C**) in MRC-5 Lungenfibroblasten. Nach Aussaat von 600000 Zellen erfolgte eine 24 stündige Kulturphase mit FKS haltigem (10%) Medium. Danach folgte ein Wechsel auf FKS-freies Medium und 4 Stunden später eine weitere Kultur in Ab- oder Anwesenheit der Testsubstanzen in den angegebenen Konzentrationen für weitere 24 Stunden. Nach anschließender Zelllyse und Präparation der mRNA wurden RT-PCR Analysen wie in Abb. 10 beschrieben durchgeführt. Die Expression ist ausgedrückt als % der Kontrolle der jeweiligen Zellpräparation. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM von n = 6 Experimenten.

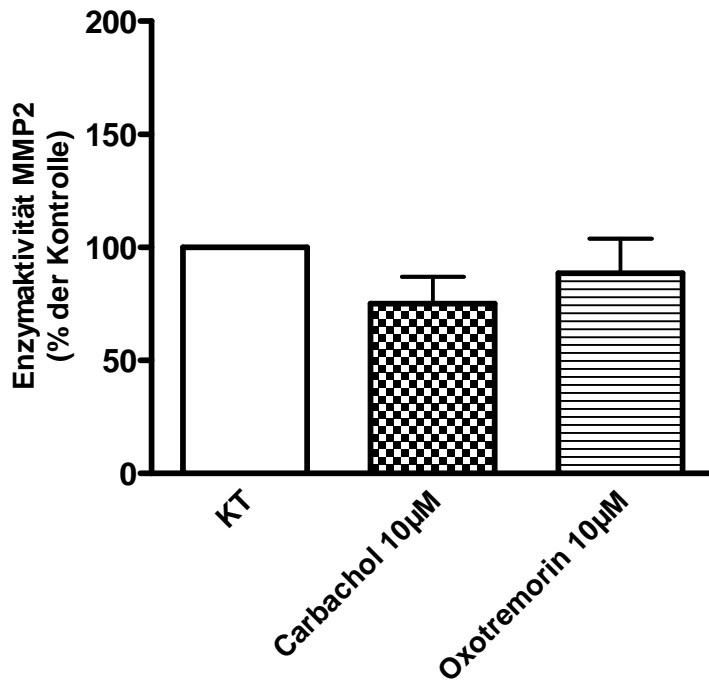


Abb. 13: Wirkung von Carbachol und Oxotremorin auf die Enzymaktivität von MMP2 in MRC-5 Lungenfibroblasten. Nach Aussaat von 600000 Zellen erfolgte eine 24 stündige Kulturphase mit FKS haltigem (10%) Medium. Danach folgte ein Wechsel auf FKS-freies Medium und 4 Stunden danach eine weitere Kulturphase in Ab- oder Anwesenheit der Testsubstanzen in den angegebenen Konzentrationen für weitere 24 Stunden. Es erfolgte die Abnahme des Mediums, in welches die MMPs sezerniert wurden mit anschließender SDS-Gelelektrophorese zur Aktivitätsbestimmung der MMPs. Nach elektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Auswaschung des im Gel enthaltenen SDS mit anschließender Inkubation mit Entwicklungspuffer bei 37 °C, nach erneuter Entfernung des Entwicklungspuffers erfolgte die Färbung des Gels zur Darstellung der Enzymaktivität durch Abbau der im Gel enthaltenen Gelatine, mit 0,5 % Coomassie-Blaulösung. Die Enzymaktivität ist ausgedrückt als % der Kontrolle der jeweiligen Enzymaktivität im Medium. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM von n = 3 Experimenten.

Interessanterweise war nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden mit der relativ hohen Konzentration von 100 nM Tiotropium eine geringe, aber signifikante Abnahme der Enzymaktivität der MMP2 um ca. 15 % zu beobachten. Bei einer Konzentration von 1 nM Tiotropium war kein signifikanter Effekt zu beobachten (Abb. 14). Der Effekt einer langen Exposition von Tiotropium in hoher Konzentration zeigt sich nur auf Ebene der Enzymaktivität (Abb. 14). Auf Expressionsebene war dagegen kein Effekt einer langen Exposition von Tiotropium in hoher Konzentration (100 nM) zu beobachten (Abb. 15).

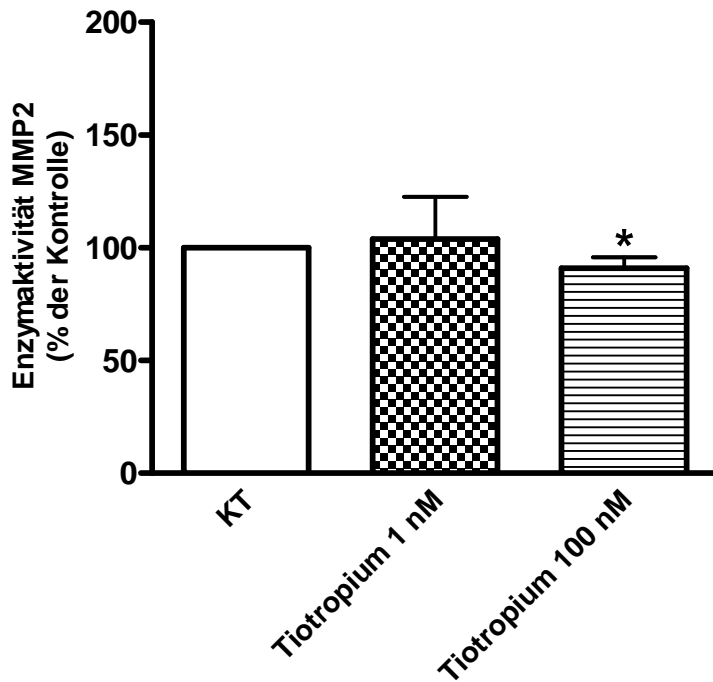


Abb. 14: Wirkung von Tiotropium 1 nM und 100 nM auf die Enzymaktivität von MMP2 in MRC-5 Lungenfibroblasten bei einer 48-stündigen Kulturphase in Analogie zu Abb. 13. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM von n = 4 Experimenten, Signifikanz als Unterschied zur Kontrolle (KT) (* p < 0,05).

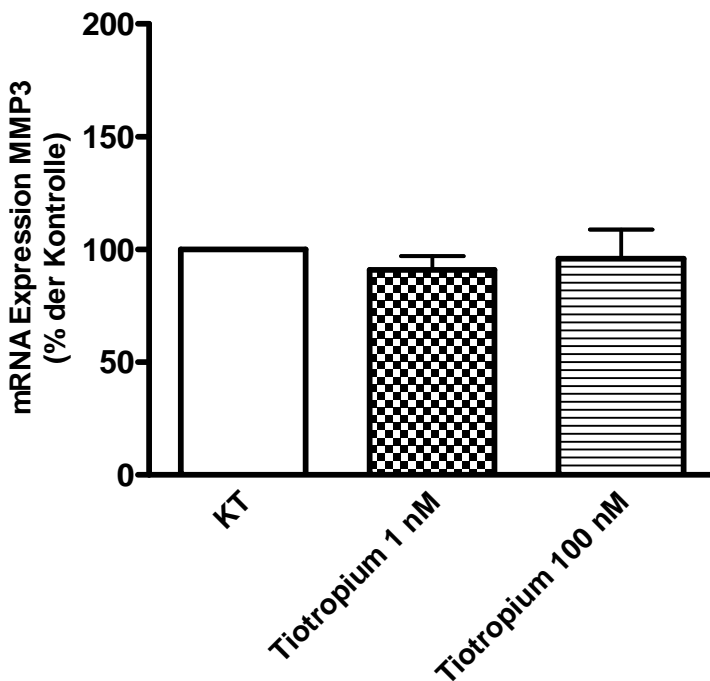


Abb. 15: Wirkung von Tiotropium 1 nM und 100 nM auf die mRNA Expression von MMP3 in MRC-5 Lungenfibroblasten bei einer 48 stündigen Kulturphase in Analogie zu Abb.12. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM von n = 4 Experimenten.

Um die Spezifität der Hemmwirkung, die bei 48-stündiger Exposition von 100 nM Tiotropium beobachtet wurde zu überprüfen, wurde auch die Wirkung des cholinergen Agonisten Carbachol allein und in Interaktion mit dem Antagonisten Tiotropium in einem 48-stündigen Protokoll auf die Enzymaktivität der MMP2 untersucht. Carbachol allein zeigt keine Wirkung und die Hemmwirkung von Tiotropium blieb selbst in Anwesenheit einer hohen Konzentration von 20 μ M Carbachol unverändert bestehen, Beobachtungen, die dagegen sprechen, dass die Hemmwirkung von Tiotropium Folge einer spezifischen Blockade von Muskarinrezeptoren ist (Abb. 16 und 17).

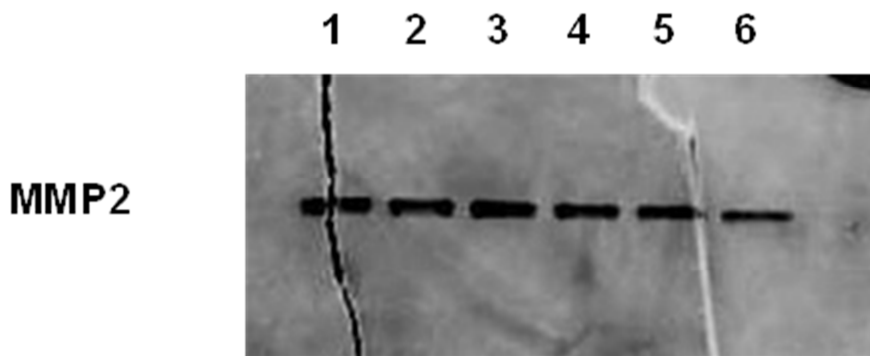


Abb. 16: Zymographie zur Enzymaktivität der MMP2 in humanen MRC-5 Lungenfibroblasten nach gelelektrophoretischer Auftrennung mit Darstellung der entstandenen Bande durch negativ Coomassie Blue Färbung. Versuchsaufbau und Versuchsdurchführung analog zu Abb.13 mit einer 48 stündigen Kulturphase.

1 = Kontrolle, 2 = Carbachol 10 μ M, 3 = Carbachol 20 μ M, 4 = Tiotropium 100 nM, 5 = Tiotropium 100 nM + Carbachol 10 μ M, 6 = Tiotropium 100 nM + Carbachol 20 μ M.

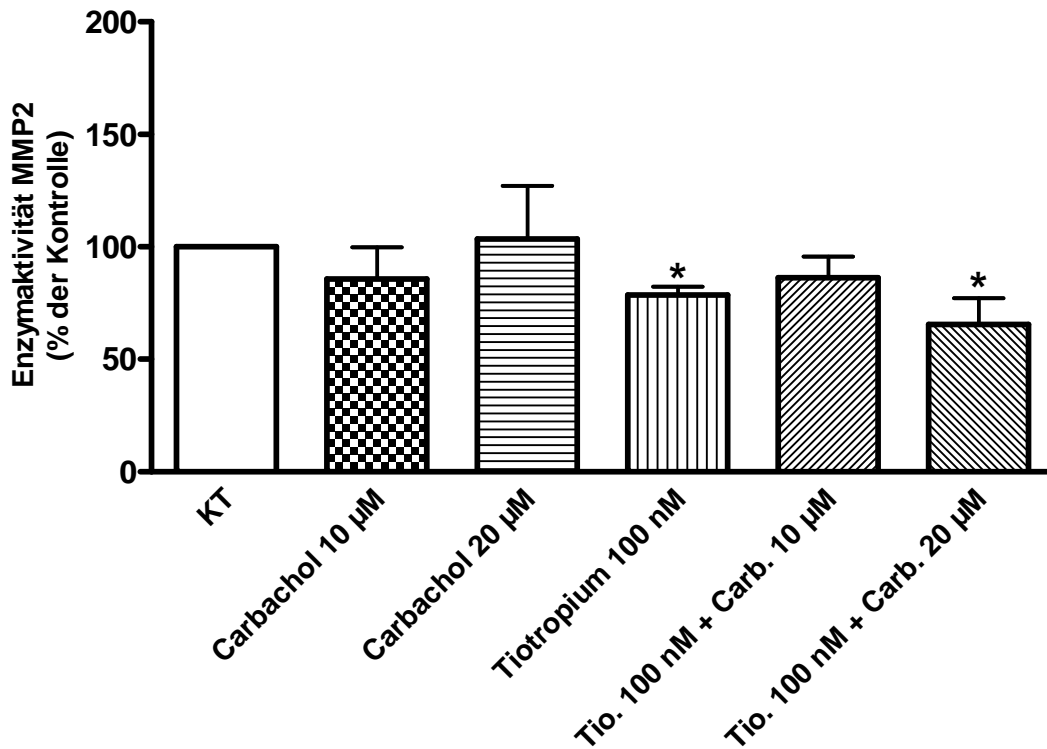


Abb. 17: Wirkung von Carbachol (Carb.) und/ oder Tiotropium (Tio.) auf die Enzymaktivität von MMP2 in MRC-5 Lungenfibroblasten bei einer 48 stündigen Kulturphase. Versuchsaufbau und Versuchsdurchführung analog zu Abb. 13. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM von n = 3 Experimenten. Signifikanz der Unterschiede zur Kontrolle (KT), * p < 0,05.

Auch die mRNA Expression der MMP3 zeigte unter Verlängerung der Inkubationszeit und Erhöhung der Carbachol Konzentration keine signifikante Änderung (Abb. 18).

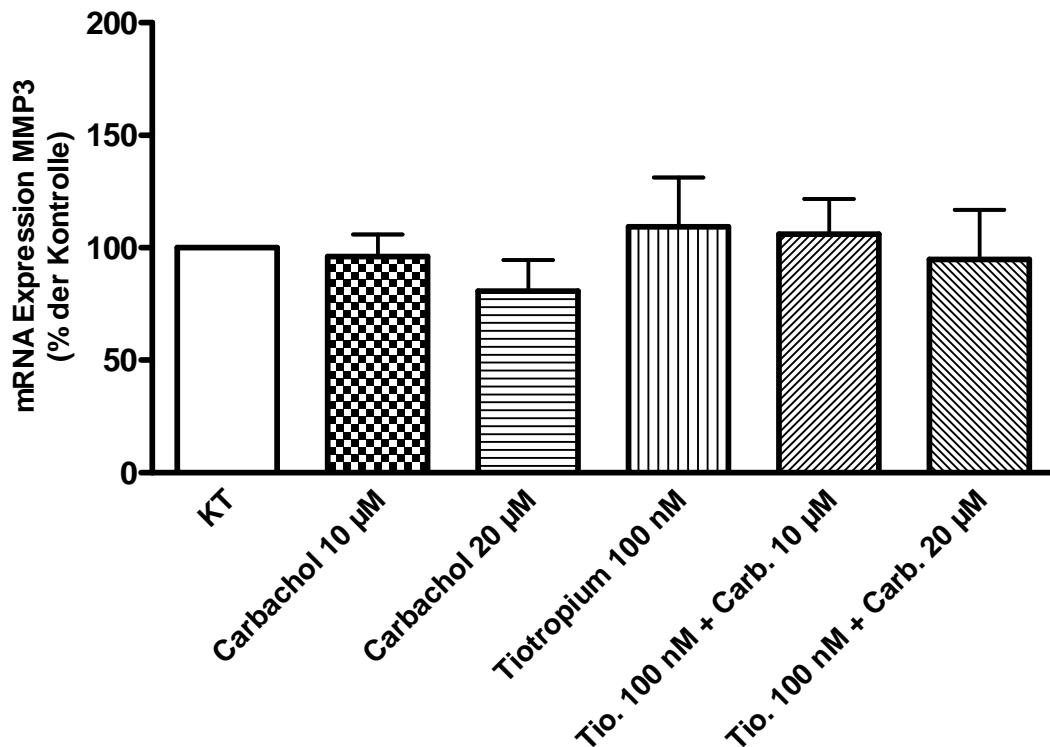


Abb. 18: Wirkung von Carbachol (Carb.) und/ oder Tiotropium (Tio.) auf die mRNA Expression von MMP3 in MRC-5 Lungenfibroblasten bei 48 stündigen Kulturphase. Versuchsaufbau und Versuchsdurchführung erfolgte analog zu Abb. 12. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM von n = 3 Experimenten.

4.3. Wirkung von TGF- β auf die mRNA-Expression und Enzymaktivität der MMPs

TGF- β , ein profibrotisches Protein, spielt eine regulatorische Schlüsselrolle im Aufbau und Remodelling der EZM. Cholinerge Mechanismen spielen eine zentrale Rolle bei Remodelling Prozessen in der Lunge. Wie bereits mehrfach nachgewiesen wurde, fördert TGF- β die Synthese der MMPs (Asano, 2010). Die vorliegenden Ergebnisse stellen den Einfluss auf die mRNA Expression der MMP1, MMP2 und MMP3 und Enzymaktivität der MMP2 von TGF- β 5 ng/ml in Abhängigkeit von der Inkubationszeit dar.

Eine Inkubationszeit von 24 Stunden mit TGF- β 5 ng/ml hat weder einen signifikanten Einfluss auf die mRNA Expression der MMP1, MMP2 oder MMP3 (Abb. 19), noch auf die Enzymaktivität der MMP2 (Abb. 20).

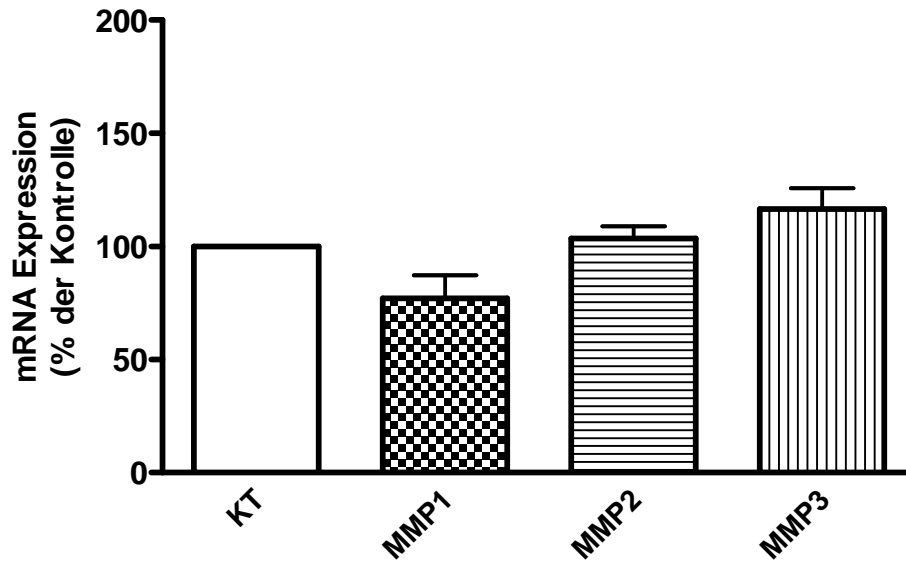


Abb. 19: Wirkung von TGF- β auf die mRNA Expression von MMP1, MMP2 und MMP3 in MRC-5 Lungenfibroblasten bei einer 24 stündigen Kulturphase analog zu Abb. 12. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM von n = 5 Experimenten.

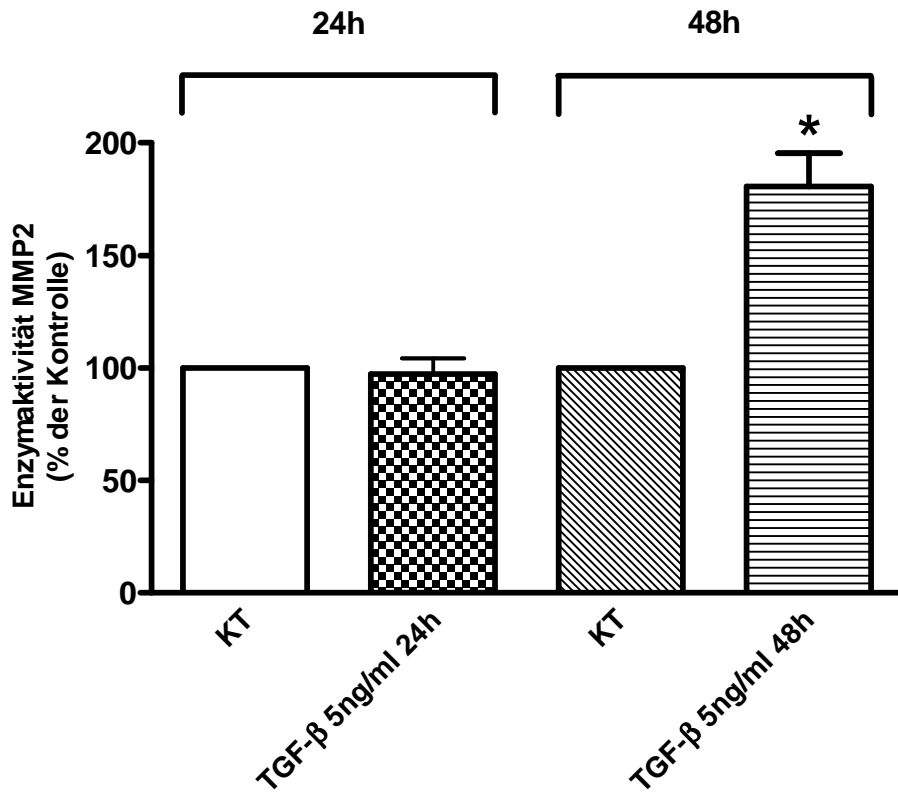


Abb. 20: Wirkung von TGF-β auf die Enzymaktivität von MMP2 in MRC-5 Lungenfibroblasten bei einer 24 und 48 stündigen Kulturphase analog zu Abb. 13. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM von n = 3 Experimenten (* p = 0,007).

Jedoch konnte durch eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 48 Stunden ein signifikante Steigerung der Enzymaktivität der MMP2 ($p = 0,007$, Abb. 20) beobachtet werden. Dieser Effekt, eine signifikante Steigerung um ca. 73 %, bei einer ebenfalls 48 stündigen Kulturphase, wurde auch bei der mRNA Expression der MMP3 ($p = 0,03$) nachgewiesen (nicht dargestellter Befund).

4.4. Cholinerge Expression und Enzymaktivität unter Stimulation mit TGF- β

In weiteren Untersuchungen wurde durch Inkubation mit TGF- β kein signifikanter Trigger, weder auf eine über cholinerge Mechanismen vermittelte mRNA Expression der MMP3 (Abb. 21) noch auf die Enzymaktivität der MMP2 (Abb. 22), gefunden.

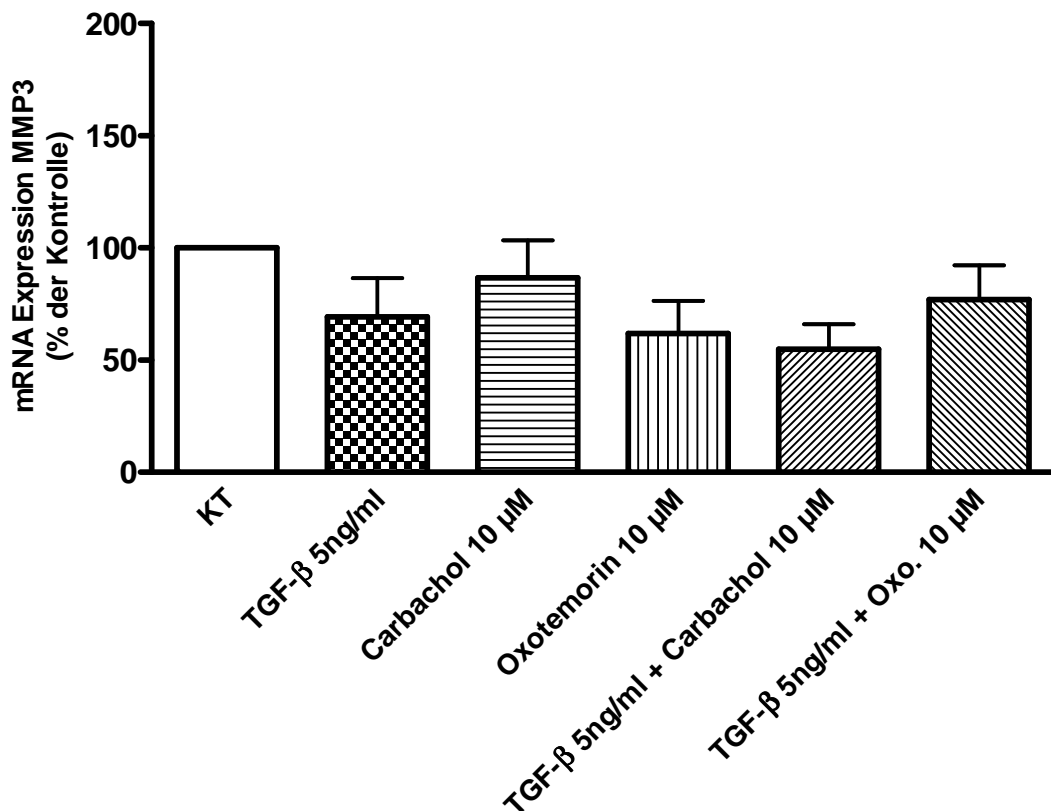


Abb. 21: Wirkung von TGF- β , Carbachol (Carb.), Oxotremorin (Oxo.) und/ oder TGF- β auf die mRNA Expression von MMP3 in MRC-5 Lungenfibroblasten bei einer 48 stündigen Kulturphase in Analogie zu Abb. 12. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM von n = 3 Experimenten.

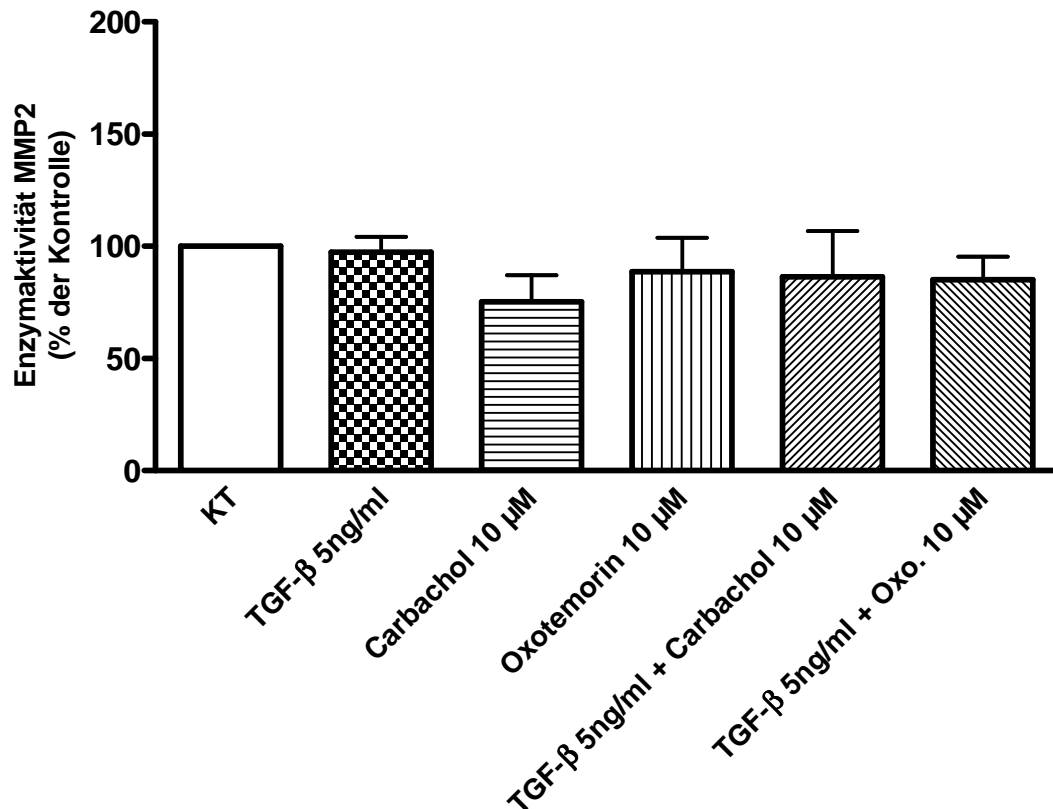


Abb. 22: Wirkung von TGF- β , Carbachol (Carb.), Oxotremorin (Oxo.) und/ oder TGF- β auf die Enzymaktivität von MMP2 in MRC-5 Lungenfibroblasten bei einer 48 stündigen Kulturphase in Analogie zu Abb. 13. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM von n = 3 Experimenten.

4.5. Wirkung von Butaprost und Isoprenalin auf mRNA Expression und Enzymaktivität

In weiteren Referenzen wurde der Einfluss von Butaprost, einem Agonisten am Prostaglandin E₂ Rezeptor, auf die mRNA Expression der MMP3 und die Enzymaktivität der MMP2 bei einer Inkubationszeit von 48 Stunden untersucht, sowie der Effekt von Isoprenalin, einem Agonisten an β -Rezeptoren.

Ein signifikanter Einfluss auf die mRNA Expression der MMP3 unter Butaprost und Isoprenalin war nicht nachzuweisen (Abb.23).

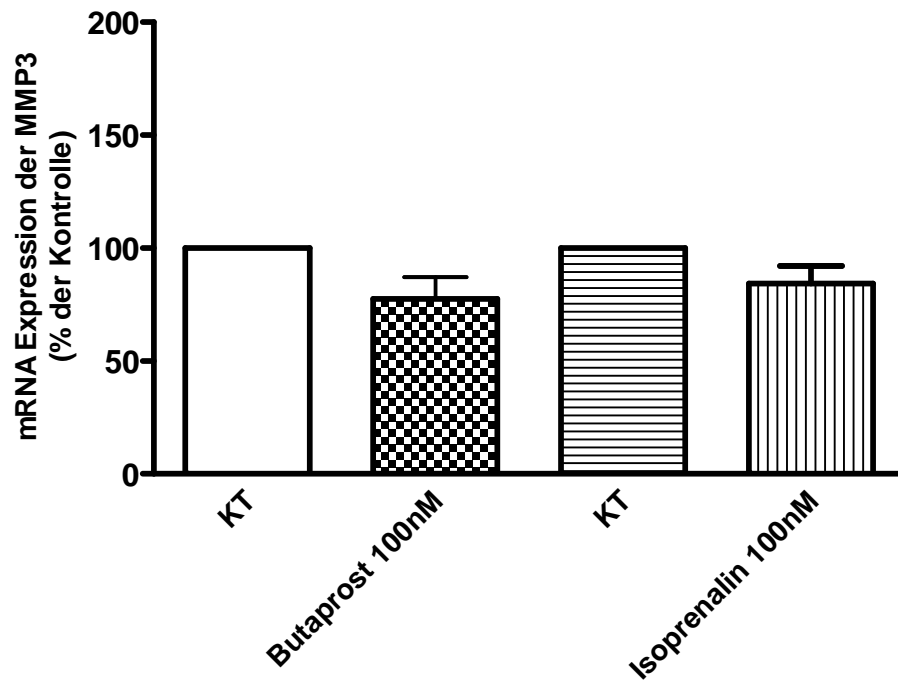


Abb. 23: Wirkung von Butaprost und Isoprenalin auf die mRNA Expression von MMP3 in MRC-5 Lungenfibroblasten bei einer 48 stündigen Kulturphase in Analogie zu Abb. 12. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM von n = 3 Experimenten.

Es zeigte sich aber eine signifikante Hemmung der Enzymaktivität der MMP2 (Mittelwert = 80%, $p = 0,002$) unter Butaprost, nicht jedoch unter Isoprenalin (Abb. 24).

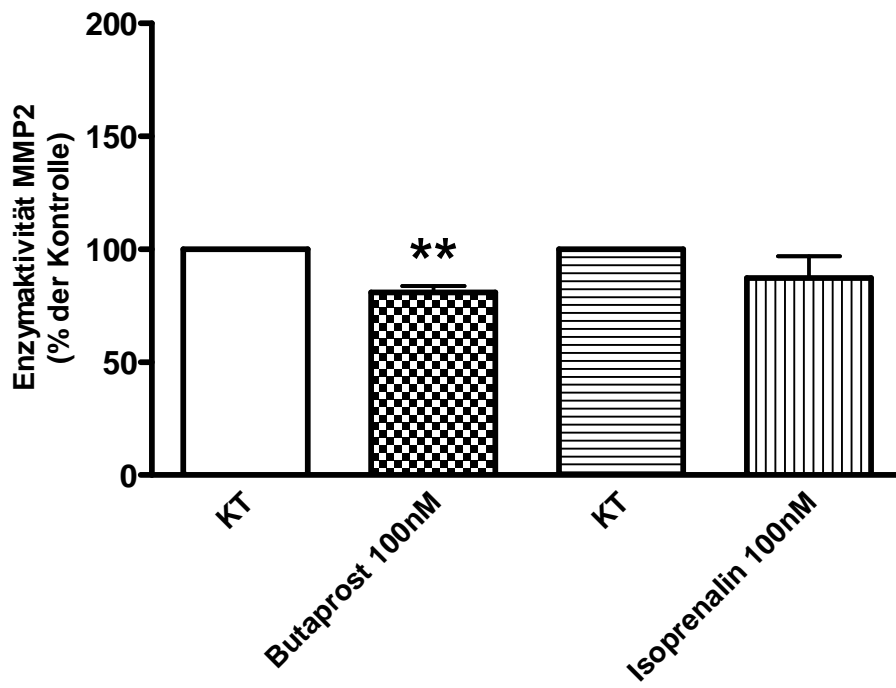


Abb. 24: Wirkung von Butaprost und Isoprenalin auf die Enzymaktivität von MMP2 (** $p = 0,002$) in MRC-5 Lungenfibroblasten bei einer 48 stündigen Kulturphase in Analogie zu Abb. 13. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM von $n = 3$ Experimenten.

5. Diskussion

Anticholinergika sind ein wesentliches Element in der Behandlung der COPD, wobei das langwirksame Tiotropium sich gegenüber dem kurzwirksamen Ipratropium in der Dauerbehandlung als überlegen erwiesen hat. In zahlreichen Studien wurde nachgewiesen, dass Tiotropium neben einer akuten bronchilatierenden Wirkung auch einen positiven Effekt auf den Krankheitsverlauf von COPD-Patienten zeigt (Anzueto et al., 2005; Casaburi et al., 2002; Tashkin und Kesten, 2003; Vincken et al., 2002) was eine therapeutische Wirksamkeit der Anticholinergika über die Bronchodilatation hinaus vermuten lässt. Da strukturelle Umbauprozesse (auch als "Remodelling" bezeichnet), bei denen Fibrosierungen insbesondere der kleinen Atemwege im Vordergrund stehen (Hogg et al., 2004; Jeffery, 2004; Molino und Jeffery, 2007), wesentlich den Langzeitverlauf der COPD-Erkrankung bestimmen, tat sich daher die Frage auf, ob Lungenfibroblasten einem cholinergen Einfluss unterliegen und ob über diesen profibrotische Prozesse gefördert werden (Racke et al., 2008).

Frühere Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe zeigten dann in der Tat, dass Lungenfibroblasten Muskarinrezeptoren vom M2 Subtyp exprimieren und dass über diese sowohl deren Proliferation (Matthiesen et al., 2006) als auch Kollagensynthese (Haag et al., 2008) gesteigert werden kann. für Remodellingprozesse verantwortlich (Matthiesen et al., 2006).

Ein weiterer wichtiger Aspekt in der Pathogenese der COPD ist die chronische Inflammation, bei der ebenfalls cholinerge Mechanismen beteiligt zu sein scheinen, die durch Anticholinergika gedrosselt werden können (Hogg et al., 2004).

Auch MMPs sind in zahlreiche Prozesse im Rahmen der Pathogenese der COPD involviert (Racke et al., 2008). In zahlreichen Studien bei Patienten mit COPD wurden im Sputum erhöhte Level an MMP1, -2 und 9 sezernierenden inflammatorischen Zellen, wie z. B. neutrophile Granulozyten und Makrophagen, nachgewiesen (Belvisi und Bottomley, 2003). Eine Überexpression von MMPs durch Lungenfibroblasten führt zu einer Gewebedestruktion mit einer entsprechenden Inflammation (Martin-Chouly et al., 2004). Weiterhin können MMPs durch ihre enzymatische Aktivität strukturelle Veränderungen in der Lunge herbeiführen (Srivastava et al., 2007). Sowohl die Überexpression als auch

die direkten Effekte der MMPs auf die Lungenstruktur tragen wesentlich zur Pathogenese der COPD bei.

Aufgrund der Bedeutung des Remodellings der extrazellulären Matrix, sowie des Einflusses der MMPs, besteht ein großes Interesse an der Nutzung der MMPs als therapeutisches Ziel (Anzueto et al., 2005).

In Anbetracht dessen und der zentralen Rolle des Atemwegsremodellings in der Pathogenese der COPD, wurde die vorliegende Arbeit unter der Fragestellung durchgeführt, ob cholinerge Mechanismen zu einer Beeinflussung der Expression und/oder der Enzymaktivität von MMPs in humanen Lungenfibroblasten führen.

Zwar liegen bereits Studien zur Expression von MMPs in inflammatorischen Zellen vor, allerdings wurde bisher nicht untersucht, ob MMPs überhaupt in humanen MRC5 Lungenfibroblasten exprimiert werden (Baraldo et al., 2007; Belvisi und Bottomley, 2003). Aus diesem Grund musste vor Untersuchung der cholinergen Regulationsmechanismen die Expression der MMPs in dieser Zelllinie mittels PCR in einem ersten Versuchsteil bestimmt werden.

Hiermit wurde eine Expression der MMP1, -2 und -3, nicht jedoch der MMP9 in humanen MRC5 Lungenfibroblasten gefunden. Diese Ergebnisse sind konträr zu einer Untersuchung im Rattenmodell, in der sowohl eine Expression der MMP2 als auch der MMP9 nachgewiesen werden konnte. Weiterhin konnte hierbei ein Einfluss auf pulmonale Remodellingprozesse der Ratte belegt werden (Li et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit konnte auch in weiteren Versuchen an humanen MRC5 Lungenfibroblasten weder unter cholinergischer Stimulation, noch unter Stimulation mit TGF- β , eine Expression der MMP9 nachgewiesen werden.

Daher ist als erstes Teilergebnis festzuhalten, dass humane MRC5 Lungenfibroblasten zwar MMP1, -2 und -3 exprimieren, jedoch nicht die MMP9. An dieser Stelle ist der Unterschied zu anderen Zellen, die in die Pathogenese der COPD involviert sind, hervorzuheben: Die MMP9 wird durch inflammatorische Zellen wie neutrophile Granulozyten und Makrophagen sowie Epithelzellen exprimiert, nicht jedoch in humanen MRC5 Lungenfibroblasten (Demedts et al., 2005).

Wie bereits erwähnt, spielen nicht nur die MMP Expression, sondern auch cholinerg induzierte Remodellingprozesse in humanen Lungenfibroblasten eine wichtige Rolle in der Pathogenese chronisch obstruktiver Lungenerkrankungen. Aus diesem Grund

wurde, nach der Erbringung des Expressionsnachweises für die MMP1, -2 und -3 in humanen MRC5 Lungenfibroblasten, im zweiten Versuchsteil dieser Arbeit für diese Enzyme die cholinerge Regulation untersucht. Hierbei musste zwischen einer Regulation auf Ebene der mRNA Expression und auf Ebene der Enzymaktivität differenziert werden.

Die Regulation der mRNA Expression wurde mittels PCR nach Inkubation mit cholinergen Agonisten und Antagonisten untersucht. Zu diesem Zweck wurde der Versuchsaufbau zunächst mittels TGF- β und MMP3 überprüft, für die bekannt sind, dass TGF- β zu einer Hochregulation der MMP3 Expression führt. Dieser Zusammenhang konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt und damit der Versuchsaufbau validiert werden. Da zum Untersuchungszeitpunkt keine Daten zur Beeinflussung der MMP1 und -2 durch TGF- β vorlagen, wurde auch dieser Zusammenhang untersucht, jedoch konnte hier weder für die MMP1, noch für die MMP2 eine Beeinflussung der Expression durch TGF- β gefunden werden. Trotzdem wird durch die Hochregulation der MMP3 die These untermauert, dass im Rahmen einer chronischen Entzündungsreaktion wie bei einer COPD mit einer erhöhten Freisetzung von Zytokinen wie z. B. TGF- β , die daraufhin vermehrt exprimierte MMP3 in humanen MRC5 Lungenfibroblasten in Remodellingprozesse involviert ist (Martin-Chouly et al., 2004).

In der vorliegenden Untersuchung konnte für keine der untersuchten MMPs eine signifikante Beeinflussung der mRNA Expression durch cholinerge oder anticholinerge Einflüsse gefunden werden. Daraus kann geschlossen werden, dass die Expressionsebene der MMPs kein direktes Ziel für Anticholinergika wie z. B. Tiotropium darstellt. Interessanterweise konnte in einer neueren Arbeit gezeigt werden, dass die nach einer Stimulation mit TGF- β erhöhte MMP Expression dennoch durch Tiotropium herunterreguliert werden kann (Asano, 2010).

Um im nächsten Schritt die Enzymaktivität zu untersuchen, erfolgte zunächst eine Validierung des Zymographie-Versuchsaufbaus durch eine Versuchsreihe mit TGF- β und MMP2, für die vorbeschrieben sind, dass TGF- β die Enzymaktivität der MMP2 steigert (Eickelberg et al., 1999; Hu et al., 2006). Durch eine Bestätigung dieses Ergebnisses wurde in dieser Untersuchung eine adäquate Funktionsweise des Versuchsaufbaus sichergestellt.

In den weiteren Versuchen zeigte sich unter cholinergem Stimulation oder Hemmung kein Einfluss auf die mittels Zymographie gemessene Enzymaktivität der MMPs.

Primär erscheint es paradox, ohne Nachweis einer cholinergen Regulation weder auf Expressions- noch auf Enzymebene weitere Versuchsreihen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit einem cholinergen Antagonisten durchzuführen. Jedoch zeigte sich interessanterweise unter einer verlängerten Inkubationszeit eine signifikante Hemmung der Enzymaktivität der MMP2 durch Tiotropium 100 nM. In weiteren Versuchen mit einer Erniedrigung der Konzentration auf 1 nM ließ sich dieser Effekt allerdings nicht reproduzieren. Daher ist von einem unspezifischen Effekt auszugehen. Läge ein spezifischer Effekt vor, müsste eine weitere Hemmung der Enzymaktivität der MMP2 unter Tiotropium 1 nM nachweisbar gewesen sein, denn die Tiotropium-Konzentration, bei der die Hälfte aller Muscarinrezeptoren besetzt ist, liegt für den M₁-Rezeptoren bei 0,041 nM, für den M₂-Rezeptoren bei 0,021 nM und für den M₃-Rezeptoren bei 0,014 nM (Racke, 2006). Dieses lag jeweils deutlich unter den verwendeten Konzentrationen, so dass von einer Rezeptorsättigung auszugehen war.

Es gibt zahlreiche Hinweise, dass diverse Zellpopulationen wie z. B. humane Epithelzellen in den Atemwegen, außerhalb des cholinergen neuronalen Netzwerke parakrin Acetylcholin synthetisieren und freisetzen (Wessler und Kirkpatrick, 2008). Da humane Lungenfibroblasten als nichtneuronale Zellen sowohl Muscarin-, als auch Nicotinrezeptoren exprimieren (Matthiesen et al., 2006), konnte mit der Versuchsreihe mit cholinergen Antagonisten geklärt werden, ob für Carbachol und Oxotremorin parakrine, nichtneuronale Regulationsmechanismen auf Expressions- oder Enzymebene vorliegen. Durch diese beiden Substanzen wurde in der vorliegenden Arbeit unter hoher Konzentration ein hemmender Effekt auf die MMP2 Enzymaktivität festgestellt, der allerdings nach einer Konzentrationsänderung der Testsubstanzen nicht mehr nachweisbar war. Aus diesem Grund ist von einem unspezifischen Effekt auszugehen. Damit liegen keine parakrinen, cholinergen Effekte auf die MMP2 Enzymaktivität vor.

Die vorliegenden Versuchsreihen wurden *in vitro* an humanen MRC5 Lungenfibroblasten durchgeführt. Hierbei handelt es sich um Untersuchungen mit Modellcharakter, deren Übertragbarkeit auf *in vivo* Bedingungen fraglich ist. Allerdings konnte in einer anderen Studie gezeigt werden, dass cholinerge Regulationsmechanismen in humanen MRC5 Lungenfibroblasten stellvertretend als

Modell für primäre humane Lungenfibroblasten genommen werden können, da sie sich in zahlreichen Untersuchungen primären humanen Lungenfibroblasten als sehr ähnlich erwiesen haben (Matthiesen et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Nachweis der Expression der MMP1, -2 und -3 in humanen MRC5 Lungenfibroblasten erbracht und ihre cholinergen Regulationsmechanismen auf Expression- und Enzymaktivitätsebene untersucht. Wie gezeigt wurde, unterliegt weder die Regulation der mRNA Expression, noch die Enzymaktivität der MMP1, -2 und -3, cholinergen Einflüssen. Da keine cholinergen, agonistischen Effekte auf die mRNA Expression oder Enzymaktivität der MMPs gefunden wurden, sind Versuchsreihen mit dem an Muscarinrezeptoren wirkenden Antagonisten Tiotropium in Abhängigkeit von der Inkubationszeit durchgeführt worden, um nichtneuronale Effekte auszuschließen. Damit konnte nachgewiesen werden, dass auch kein signifikanter nichtneuronal vermittelter Einfluss auf die mRNA Expression und die Enzymaktivität der MMP1, -2 und -3 vorliegt.

Abschließend ist zu folgern, dass cholinerge Mechanismen zwar über verschiedene Mechanismen pro-fibrotische Prozesse in den Atemwegen fördern können, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit aber keine Hinweise erbrachten, dass cholinerge Mechanismen auch an der Regulation der Expression und Aktivität von MMPs in humanen Lungenfibroblasten beteiligt sind .

6. Zusammenfassung

Remodellingprozesse sind wesentliche Mechanismen in der Pathogenese der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung. Einen wesentlichen Mechanismus stellt die Fibrosierung dar, die über cholinerge Rezeptoren in humanen MRC5 Lungenfibroblasten vermittelt wird. Weitere Remodellingmechanismen unterliegen dem Einfluss von MMPs in inflammatorischen Zellen im Rahmen eines Um- und Abbaus der extrazellulären Matrix. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob MMPs in humanen MRC5 Lungenfibroblasten auf mRNA Expressionsebene und Enzymaktivitätsebene cholinerg reguliert werden.

Zunächst wurde hierfür die Expression der MMP1, -2 und -3 in humanen MRC5 Lungenfibroblasten bestätigt und gezeigt, dass die MMP9 in diesen Zellen nicht exprimiert wird.

Im nächsten Versuchsabschnitt wurde die cholinerge Regulation zunächst auf mRNA Expressionsebene untersucht. Hier konnte kein Einfluss cholinergischer Mechanismen auf die MMP Expression gefunden werden. Daraufhin erfolgte die Untersuchung der Enzymaktivitätsebene, bei der ebenfalls kein spezifischer Einfluss durch cholinerge Mechanismen gezeigt werden konnte. Allerdings war ein unspezifischer anticholinergischer Effekt auf die Enzymaktivität der MMP2 nachweisbar, der auf eine nichtneuronale Aktivität zurückzuführen war. Ein in der Literatur beschriebener Effekt unter TGF- β auf die MMPs konnte insofern spezifiziert werden, als dass sowohl eine Induktion der mRNA Expression, als auch der Enzymaktivität nachzuweisen war.

Durch die vorliegende Untersuchung erscheint es unwahrscheinlich, dass die über Tiotropium als Anticholinergikum vermittelte Regulation der MMP1, -2 und -3 in humanen Lungenfibroblasten einen sinnvollen therapeutischen Ansatz zur Modulation von Remodellingprozessen bei COPD-Patienten darstellt. Dennoch ist es nicht ausgeschlossen, dass Anticholinergika die MMP Regulation über andere, in der Pathogenese der COPD involvierte Zellpopulationen wie z. B. neutrophile Granulozyten oder Epithelzellen, beeinflusst. Dieses sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

7. Literaturverzeichnis

Anzueto A, Tashkin D, Menjoge S, Kesten S. One-year analysis of longitudinal changes in spirometry in patients with COPD receiving tiotropium. *Pulm Pharmacol Ther* 2005; 18: 75-81

Asano K. Tiotropium bromide inhibits TGF- β -induced MMP production from lung fibroblasts by interfering with Smad and MAPK pathways in vitro. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* 2010; 277

Atkinson JJ, Senior RM. Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 28: 12-24

Baraldo S, Bazzan E, Zanin ME, Turato G, Garbisa S, Maestrelli P, Papi A, Miniati M, Fabbri LM, Zuin R, Saetta M. Matrix metalloproteinase-2 protein in lung periphery is related to COPD progression. *Chest* 2007; 132: 1733-1740

Belvisi MG, Bottomley KM. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in the pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease (COPD): a therapeutic role for inhibitors of MMPs? *Inflamm Res* 2003; 52: 95-100

Bergeron C, Boulet LP. Structural changes in airway diseases: characteristics, mechanisms, consequences, and pharmacologic modulation. *Chest* 2006; 129: 1068-1087

Biedermann A, Köhnlein T. Alpha-1-Antitrypsin-Mangel – eine versteckte Ursache der COPD: Überblick über Pathogenese, Diagnostik, Klinik und Therapie. *Dtsch Arztebl* 2006; 103: 1828-1832

Casaburi R, Mahler DA, Jones PW, Wanner A, San PG, ZuWallack RL, Menjoge SS, Serby CW, Witek T, Jr. A long-term evaluation of once-daily inhaled tiotropium in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2002; 19: 217-224

Celli B, Decramer M, Leimer I, Vogel U, Kesten S, Tashkin DP. Cardiovascular safety of tiotropium in patients with COPD. *Chest* 2010; 137: 20-30

Cosio Piqueras MG, Cosio MG. Disease of the airways in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J Suppl* 2001; 34: 41s-49s

Demedts IK, Brusselle GG, Bracke KR, Vermaelen KY, Pauwels RA. Matrix metalloproteinases in asthma and COPD. *Curr Opin Pharmacol* 2005; 5: 257-263

Eickelberg O, Kohler E, Reichenberger F, Bertschin S, Woodtli T, Erne P, Perruchoud AP, Roth M. Extracellular matrix deposition by primary human lung fibroblasts in response to TGF-beta1 and TGF-beta3. *Am J Physiol* 1999; 276: L814-824

Gahring LC, Rogers SW. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor expression and function on nonneuronal cells. *AAPS J* 2005; 7: E885-894

Gosens R, Zaagsma J, Grootte Bromhaar M, Nelemans A, Meurs H. Acetylcholine: a novel regulator of airway smooth muscle remodelling? *Eur J Pharmacol* 2004; 500: 193-201

Gosens R, Zaagsma J, Meurs H, Halayko AJ. Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD. *Respir Res* 2006; 7: 73

Haag S, Matthiesen S, Juergens UR, Racke K. Muscarinic receptors mediate stimulation of collagen synthesis in human lung fibroblasts. *Eur Respir J* 2008; 32: 555-562

Heredia JL. Tiotropium bromide: an update. *Open Respir Med J* 2009; 3: 43-52

Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Pare PD. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004; 350: 2645-2653

Hu YB, Zong YR, Feng DY, Jin ZY, Jiang HY, Peng JW. [p38/ERK signal pathways regulating the expression of type I collagen and activity of MMP-2 in TGF-beta1-stimulated HLF-02 cells]. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi* 2006; 24: 77-80

Jeffery PK. Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: S28-38

Jeffery PK. Remodeling and inflammation of bronchi in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2004; 1: 176-183

Kummer W, Lips KS. Non-neuronal acetylcholine release and its contribution to COPD pathology. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms* 2006; 3: 47-52

Kummer W, Lips KS, Pfeil U. The epithelial cholinergic system of the airways. *Histochem Cell Biol* 2008; 130: 219-234

Lagente V, Manoury B, Nenan S, Le Qument C, Martin-Chouly C, Boichot E. Role of matrix metalloproteinases in the development of airway inflammation and remodeling. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38: 1521-1530

Li H, Cui D, Tong X, Ma N, Gao Y, Cui X, Lu L, Wang D, Liang Y. [The role of matrix metalloproteinases in extracellular matrix remodelling in chronic obstructive pulmonary disease rat models]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 2002; 41: 393-398

Lowrey GE, Henderson N, Blakey JD, Corne JM, Johnson SR. MMP-9 protein level does not reflect overall MMP activity in the airways of patients with COPD. *Respir Med* 2008; 102: 845-851

Lüllmann H, Mohr K. Taschenatlas der Pharmakologie. Stuttgart - New York: Georg Thieme Verlag, 2001

Malemud CJ. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Front Biosci* 2006; 11: 1696-1701

Martin-Chouly CA, Astier A, Jacob C, Pruniaux MP, Bertrand C, Lagente V. Modulation of matrix metalloproteinase production from human lung fibroblasts by type 4 phosphodiesterase inhibitors. *Life Sci* 2004; 75: 823-840

Matthiesen S, Bahulayan A, Kempkens S, Haag S, Fuhrmann M, Stichnote C, Juergens UR, Racke K. Muscarinic receptors mediate stimulation of human lung fibroblast proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 35: 621-627

Molfino NA, Jeffery PK. Chronic obstructive pulmonary disease: histopathology, inflammation and potential therapies. *Pulm Pharmacol Ther* 2007; 20: 462-472

Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997; 349: 1498-1504

Nilsson SF, Drecolli E, Lutjen-Drecolli E, Toris CB, Krauss AH, Kharlamb A, Nieves A, Guerra T, Woodward DF. The prostanoid EP2 receptor agonist butaprost increases uveoscleral outflow in the cynomolgus monkey. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 4042-4049

Ogata Y, Enghild JJ, Nagase H. Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9. *J Biol Chem* 1992; 267: 3581-3584

Ohbayashi H. Matrix metalloproteinases in lung diseases. *Curr Protein Pept Sci* 2002; 3: 409-421

Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 221-233

Pilcher BK, Dumin JA, Sudbeck BD, Krane SM, Welgus HG, Parks WC. The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. *J Cell Biol* 1997; 137: 1445-1457

Racke K. Tiotropium. *Dtsch Med Wochenschr* 2006; 131: 1218-1220

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

Racké K, Juergens UR, Matthiesen S. Control by cholinergic mechanisms. *Eur J Pharmacol* 2006; 533: 57-68

Reilly JJ, Silverman EK, Shapiro SD. Chronisch obstruktive Lungenerkrankung. in: Dieter M, Suttrop N, Zeitz M, Hrsg. *Harrisons Innere Medizin*. Berlin: ABW Wissenschaftsverlag GmbH, 2009: 2018

Ringdahl B, Jenden DJ. Pharmacological properties of oxotremorine and its analogs. *Life Sci* 1983; 32: 2401-2413

Santus P, Di Marco F. Safety and pharmacological profile of tiotropium bromide. *Expert Opin Drug Saf* 2009; 8: 387-395

Schirnhofner L, Lamprecht B, Vollmer WM, Allison MJ, Studnicka M, Jensen RL, Buist AS. COPD prevalence in Salzburg, Austria: results from the Burden of Obstructive Lung Disease (BOLD) Study. *Chest* 2007; 131: 29-36

Singh S, Loke YK, Furberg CD. Inhaled anticholinergics and risk of major adverse cardiovascular events in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2008; 300: 1439-1450

Sokolova E, Hartig R, Reiser G. Downregulation of protease-activated receptor-1 in human lung fibroblasts is specifically mediated by the prostaglandin E receptor EP2 through cAMP elevation and protein kinase A. *FEBS J* 2008; 275: 3669-3679

Srivastava PK, Dastidar SG, Ray A. Chronic obstructive pulmonary disease: role of matrix metalloproteases and future challenges of drug therapy. *Expert Opin Investig Drugs* 2007; 16: 1069-1078

Starke K, Palm D. Pharmakologie noradrenerger und adrenerger Systeme. in: Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K, Hrsg. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Heidelberg - Berlin - Oxford: Spektrum Akademischer Verlag, 1996: 166-167

Tashkin D, Kesten S. Long-term treatment benefits with tiotropium in COPD patients with and without short-term bronchodilator responses. *Chest* 2003; 123: 1441-1449

Tennant RC, Erin EM, Barnes PJ, Hansel TT. Long-acting beta 2-adrenoceptor agonists or tiotropium bromide for patients with COPD: is combination therapy justified? *Curr Opin Pharmacol* 2003; 3: 270-276

Thomas PE, Peters-Golden M, White ES, Thannickal VJ, Moore BB. PGE(2) inhibition of TGF-beta1-induced myofibroblast differentiation is Smad-independent but involves cell shape and adhesion-dependent signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293: L417-428

Vacca G, Randerath WJ, Gillissen A. Inhibition of granulocyte migration by tiotropium bromide. *Respir Res* 2011; 12: 24

Vancheri C, Mastruzzo C, Sortino MA, Crimi N. The lung as a privileged site for the beneficial actions of PGE2. *Trends Immunol* 2004; 25: 40-46

Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor-beta and fibrosis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3056-3062

Vincken W, van Noord JA, Greefhorst AP, Bantje TA, Kesten S, Korducki L, Cornelissen PJ, Dutch/Belgian Tiotropium Study G. Improved health outcomes in patients with COPD during 1 yr's treatment with tiotropium. *Eur Respir J* 2002; 19: 209-216

Wessler I, Kirkpatrick CJ. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Br J Pharmacol* 2008; 154: 1558-1571

Wessler I, Kirkpatrick CJ, Racké K. Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans. *Pharmacol Ther* 1998; 77: 59-79