

# **Regulation des Prostacyclin-Rezeptors in humanen glatten Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten**

**Inaugural – Dissertation**

**zur**

**Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

**vorgelegt von**

**Sigrid Maria Nilius  
aus Duisburg**

**Düsseldorf**

**2001**

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen  
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. K. Schrör

Korreferent: Prof. Dr. C. Hollenberg

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Juni 2001

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	EIKOSANOIDE	1
1.1.1	Prostacyclin	2
1.2	DER PROSTACYCLIN-REZEPTOR (IP-R)	3
1.2.1	Signaltransduktion durch IP-R	7
1.3	REZEPTORREGULATION	10
1.4	MEDIZINISCHER HINTERGRUND	14
1.4.1	Prostacyclin und seine klinischen Anwendungen	14
1.4.1.1	Applikation bei Tumoren	14
1.4.1.2	Behandlung von Gefäßrestenosen	15
1.4.1.3	Behandlung der pulmonalen Hypertonie	16
1.4.2	Zusammenfassung	18
1.5	ZIEL DER ARBEIT	19
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>20</b>
2.1	PUFFER UND LÖSUNGEN	20
2.2	ZELLKULTUR	21
2.3	TRANSFEKTIONEN	22
2.3.1	Stabile Expression von Genen mit der Polybren/DMSO-Methode	22
2.3.2	Transiente Expression von Genen	23
2.4	PRÄPARATION UND ANALYSE VON DNA	23
2.4.1	DNA-Vermehrung in Escherichia coli (E.coli)	23
2.4.1.1	Genotyp des verwendeten E.coli-Stammes	23
2.4.1.2	Anzucht des E.coli-Bakterienstammes	23
2.4.1.3	Transformationen von E.coli	23
2.4.1.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli	24
2.4.1.4.1	Alkalische Lyse	24
2.4.1.4.2	Qiagen („Midi-Präparation“)	24
2.4.2	Restriktion von DNA	24
2.4.3	Auftrennung von DNA in nativen Agarose-Gelen	24
2.4.4	Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten	25
2.4.5	Ligation von DNA	25
2.4.6	Sequenzierung von DNA	25
2.4.7	Verwendete Plasmide	26
2.4.8	Klonierung von Fusionsproteinen an den Prostacyclin-Rezeptor mit Hilfe der PCR (Polymerase-Kettenreaktion)-Methode	27
2.4.8.1	PCR	27
2.4.8.2	Klonierung eines 6 x-Histidin-gekoppelten IP-R (hIP-R-HIS)	28
2.4.8.3	Klonierung eines Hämagglutinin (HA)-gekoppelten IP-R (HA-IP-R)	28
2.4.8.4	Klonierung eines „Green Fluorescence Protein“-gekoppelten IP-R (IP-R-GFP)	29

2.5	ANALYSE VON RNA.....	30
2.5.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugetierzellen.....	30
2.5.2	Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) zum Nachweis der Expression von hIP-R und $\beta_2$ AR.....	30
2.6	PRÄPARATION UND ANALYSE VON PROTEINEN.....	31
2.6.1	Analyse von Proteinen durch Western Blot.....	31
2.6.1.1	Isolierung von Proteinen aus Säugetierzellen.....	31
2.6.1.2	Auftrennung von Proteinen im Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE).....	32
2.6.1.3	Transfer von Proteinen.....	32
2.6.1.4	Hybridisierung und Detektion von Proteinen.....	32
2.6.1.5	Prüfung der gleichmäßigen Proteinbeladung.....	33
2.6.2	Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	33
2.7	BESTIMMUNG VON CYCLO-ADENOSINMONOPHOSPHAT (cAMP-ASSAY).....	33
2.7.1	Desensibilisierungsversuche.....	34
2.7.2	Resensibilisierungsversuche.....	34
2.8	KONFOKALE LASERMIKROSKOPIE.....	35
2.8.1	Internalisierung des Prostacyclin-Rezeptors.....	35
2.8.2	Arrestin-Rezeptor-Wechselwirkungen.....	35
2.9	STATISTIK.....	35
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>36</b>
3.1	EXPRESSION UND DESENSIBILISIERUNGSKINETIK VON hIP-R IN VERSCHIEDENEN ZELLSYSTEMEN.....	36
3.1.1	Expression und Desensibilisierung von hIP-R in stabil transfizierten CHO-Zellen.....	38
3.1.2	Expression und Desensibilisierung von hIP-R auf humanen Hautfibroblasten.....	40
3.1.3	Beeinflussung der Adenylatzyklase durch cAMP-erhöhende Substanzen.....	42
3.2	EXPRESSION UND DESENSIBILISIERUNG DES HUMANEN $\beta_2$ -ADRENERGEN REZEPTORS (h $\beta_2$ AR).....	44
3.3	VERGLEICH DER REZEPTOR-MEDIERTEN cAMP-BILDUNG.....	47
3.4	KONZENTRATIONSABHÄNGIGE STIMULATION VON IP-R UND $\beta_2$ AR AUF HUMANEN HAUTFIBROBLASTEN.....	48
3.5	NACHWEIS DER INTERNALISIERUNG VON hIP-R DURCH KOPPLUNG AN „ENHANCED GREEN FLUORESCENCE PROTEIN“ (eGFP).....	50
3.6	UNTERSUCHUNGEN ZUM MECHANISMUS DER DESENSIBILISIERUNG: WELCHE KOMPONENTEN SIND BETEILIGT.....	53
3.6.1	Beteiligung der second messenger Kinasen PKC und PKA an der Desensibilisierung von hIP-R.....	53
3.6.1.1	Rolle der PKA.....	53
3.6.1.2	Rolle der PKC.....	56

3.6.2	Beteiligung von G-Protein gekoppelten Rezeptorkinasen (GRKs) an der Desensibilisierung von hIP-R.....	59
3.6.3	Beteiligung von Arrestinen an der Internalisierung von hIP-R.....	61
3.7	RESENSIBILISIERUNG DES HUMANEN IP-R.....	64
3.8	CHARAKTERISIERUNG VON hIP-R IN PULMONALEM GEWEBE.....	67
3.9	FUSION WEITERER EPITOPE AN hIP-R.....	72
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>74</b>
4.1	EXPRESSION UND FUNKTIONALITÄT DES PROSTACYCLIN-REZEPTORS.....	74
4.2	WIRKUNG VON PROSTACYCLIN-MIMETIKA AUF DIE SIGNALTRANSDUKTION DES PROSTACYCLIN-REZEPTORS.....	75
4.3	DESENSIBILISIERUNG VON hIP-R AUF REZEPTOREBENE.....	76
4.4	IP- UND $\beta_2$ -ADRENERGER REZEPTOR.....	77
4.5	LOKALISATION UND INTERNALISIERUNG VON hIP-R.....	78
4.6	BETEILIGTE PROTEINE AN DER DESENSIBILISIERUNG VON hIP-R.....	79
4.6.1	Beteiligung von second messenger Kinasen.....	79
4.6.2	Beteiligung von GRKs.....	82
4.6.3	Beteiligung von Arrestinen.....	83
4.7	RESENSIBILISIERUNG VON hIP-R.....	85
4.8	IP-R IN PULMONALEM GEWEBE.....	86
4.9	BEDEUTUNG DES PROSTACYCLIN-REZEPTORS FÜR DIE THERAPEUTISCHE ANWENDUNG VON PROSTACYCLIN UND SEINEN MIMETIKA.....	88
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>91</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNISS.....</b>	<b>92</b>
<b>7</b>	<b>VERÖFFENTLICHUNGEN im Zusammenhang mit dieser Arbeit.....</b>	<b>104</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>106</b>
<b>9</b>	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....</b>	<b>107</b>
<b>10</b>	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>108</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

Abb.	Abbildung
AC	Adenylatzyklase
APS	Ammoniumpersulfat
AT <sub>1A</sub> R	Angiotensin II Typ 1A-Rezeptor
B2-BKR	Bradykinin B2-Rezeptor
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
β <sub>2</sub> AR	beta <sub>2</sub> -adrenerger Rezeptor
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CHO	Chinesische Hamsteroarialzellen
COX	Cyclooxygenase
CX	Cycloheximid
DAG	Diacylglycerol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ET <sub>A</sub>	Endothelin-Rezeptor Typ A
ET <sub>B</sub>	Endothelin-Rezeptor Typ B
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Green Fluorescence Protein
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guanylnukleotid-bindendes Protein
G <sub>βγ</sub>	βγ-Untereinheit des G-Proteins
G <sub>sα</sub>	stimulatorisch wirkende α-Untereinheit des G-Proteins
G <sub>iα</sub>	inhibitorisch wirkende α-Untereinheit des G-Proteins
GRK	G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase
GTP	Guanin-tri-Phosphat
h	human
HA	Hämagglutinin
HEK	humane embryonale Nierenzellen
HIS	Histidin
InsP <sub>3</sub>	Inositol-tri-Phosphat

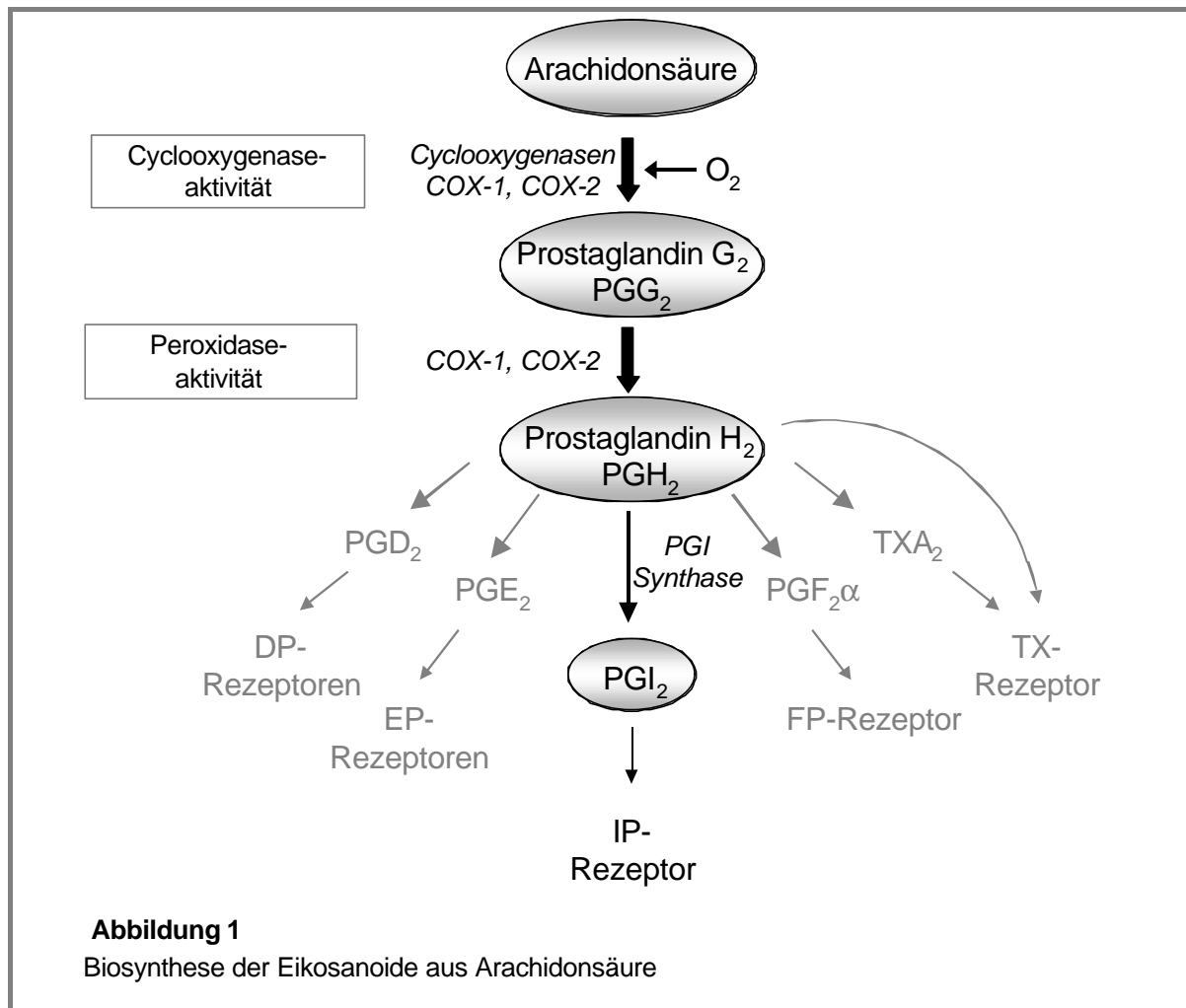
---

IP-R	Prostacyclin-Rezeptor
kDa	Kilo Dalton
Kon	Kontrolle
m	murin
mAChR	muskarinerge Acetylcholin-Rezeptoren (m1, m2, m3, m4)
mM	Millimolar (mMol / l)
$\mu$ M	Mikromolar ( $\mu$ Mol / l)
nM	Nanomolar (nMol / l)
OR	Opioid-Rezeptor
$\delta$ OR	delta Opioid-Rezeptor
$\kappa$ OR	kappa Opioid-Rezeptor
$\mu$ OR	mü Opioid-Rezeptor
p	pulmonal
PDGF	Platelet-derived growth factor
PG	Prostaglandin
PGI <sub>2</sub>	Prostacyclin
PH	pulmonale Hypertonie
PPH	primäre pulmonale Hypertonie
SPH	sekundäre pulmonale Hypertonie
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
aPKC	atypische PKC
cPKC	konventionelle PKC
nPKC	neue PKC
myr-PKI	Peptid-Inhibitor der PKA, myristoylierte Form
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
4 $\alpha$ -PMA	4 $\alpha$ -Phorbol-12-myristat-13-acetat
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SMC	glatte Gefäßmuskelzellen
TXA <sub>2</sub> R <sub><math>\alpha</math></sub>	Thromboxan-Rezeptor, alpha-Isoform
TXA <sub>2</sub> R <sub><math>\beta</math></sub>	Thromboxan-Rezeptor, beta-Isoform

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Eikosanoide

Prostaglandine (PG) sind Metabolite der Arachidonsäure (All-cis-5,8,11,14-Eikosatetraensäure), und zählen zu den Eikosanoiden (Schrör, 1984). Die Arachidonsäure ist eine mehrfach ungesättigte C<sub>20</sub>-Fettsäure und Bestandteil der Membranphospholipide. Unter Einwirkung von Phospholipase A<sub>2</sub> wird sie durch verschiedene Stimuli (z.B. Zellschädigung, Entzündungsmediatoren, Bradykinin, Absenkung des pH-Wertes) aus der Membran freigesetzt und über verschiedene Zwischenstufen zu Prostaglandinen metabolisiert (Abb. 1). Schlüsselenzym der Arachidonsäureumsetzung zu Prostaglandinen ist das Enzym



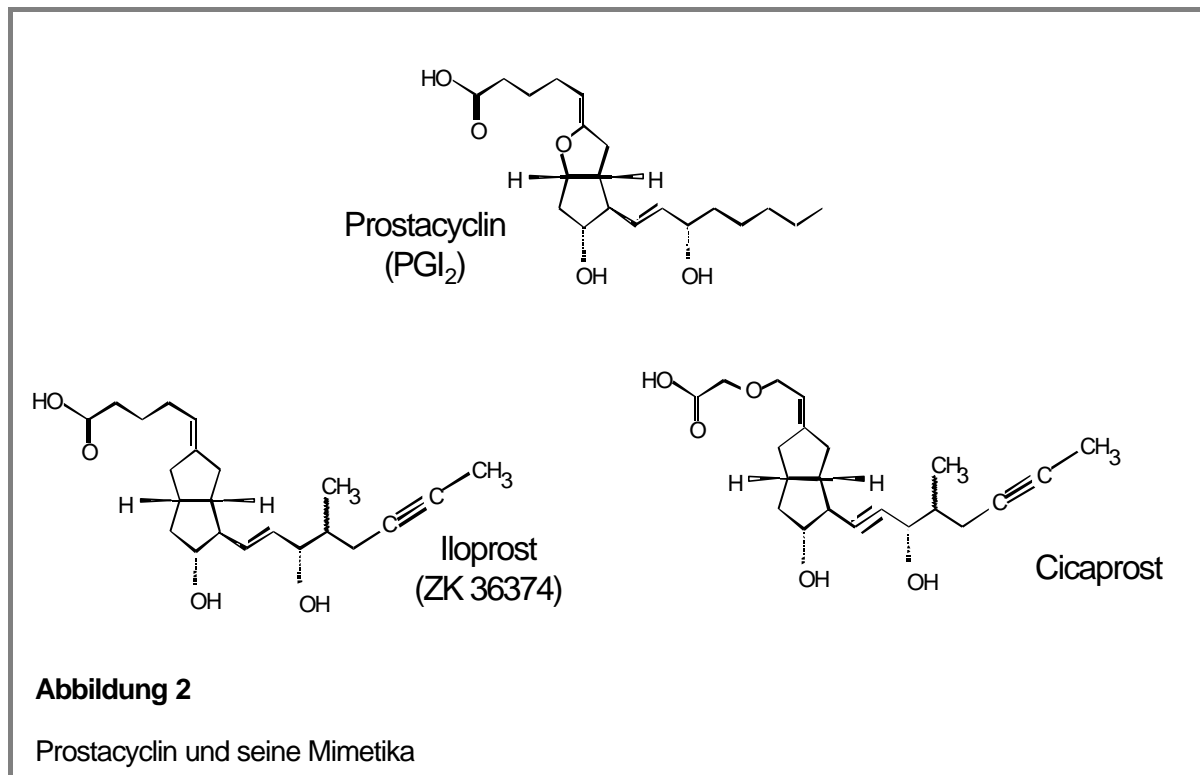
Cyclooxygenase (COX, Prostaglandin H Synthase), das in zwei Isoformen COX-1 und COX-2 vorkommt (Otto und Smith, 1995). In einem zweistufigen Prozess wird die Arachidonsäure zunächst durch die Cyclooxygenase-Aktivität der COX zu Prostaglandin G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) und durch die nachfolgende Peroxidase-Aktivität des Enzyms in Prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) reduziert. Die



anschließende Umsetzung von  $\text{PGH}_2$  zu den Prostaglandinen Prostacyclin (Prostaglandin  $\text{I}_2$ ,  $\text{PGI}_2$ ),  $\text{PGD}_2$ ,  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  und zu Thromboxan  $\text{A}_2$  ( $\text{TXA}_2$ ) erfolgt dann zell- bzw. gewebespezifisch durch unterschiedliche Enzyme. Prostaglandine werden nicht gespeichert, sondern nach Stimulation der Zellen, z.B. mit dem Wachstumsfaktor PDGF (Platelet-derived growth factor), in den unterschiedlichen Geweben synthetisiert und direkt freigesetzt. Sie beeinflussen u.a. die lokale Durchblutung durch gefäßrelaxierende (Vasodilatation) bzw. -kontrahierende (Vasokonstriktion) Wirkung. In der Niere regulieren sie das  $\text{Na}^+$ -Gleichgewicht (Breyer et al., 1996). Weiterhin sind sie beteiligt an der Thrombozytenfunktion und spielen eine Rolle bei Entzündungen und Fieber. Relevant für die vorliegende Arbeit ist im besonderen Prostacyclin, auf das nachfolgend detaillierter eingegangen wird.

### 1.1.1 Prostacyclin

$\text{PGH}_2$  wird mit Hilfe des Enzyms PGI-Synthase zu Prostacyclin umgesetzt, das 1976 erstmals strukturell identifiziert werden konnte (Whittaker et al., 1976) (Abb. 2). Es ist das Hauptprodukt des Prostaglandin-Stoffwechsels im Endothel, der glatten Gefäßmuskulatur und im Herzen (Schrör, 1977; Smith, 1986).



Die Wirkung von  $\text{PGI}_2$  besteht u.a. in der Relaxation der Gefäßmuskulatur (Moncada, 1976) und der Inhibition der Thrombozytenaggregation (Weiss und Turitto, 1979). Ausserdem hemmt es

die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (Sinzinger et al., 1987) und beeinflusst Entzündungsmechanismen (Schrör und Weber, 1997). Diese zellulären Effekte werden durch den Prostacyclin-Rezeptor (IP-R) vermittelt. Das ebenfalls in Thrombozyten gebildete Thromboxan A<sub>2</sub> agiert als funktioneller Antagonist von PGI<sub>2</sub> durch seine vasokonstriktorische Wirkung und durch die Induktion der Blutplättchenaggregation. Bei physiologischem pH-Wert hydrolysiert PGI<sub>2</sub> mit einer Halbwertszeit von 3-5 Minuten zu dem biologisch inaktiven 6-keto-PGF<sub>1α</sub> (Schrör, 1984; Negishi et al., 1993). Aufgrund dieser kurzen Halbwertszeit werden bei experimentellen Arbeiten am Prostacyclin-Rezeptor und in der klinischen Anwendung chemisch stabile Mimetika eingesetzt. Dazu zählen u.a. Cicaprost (K<sub>D</sub>: 10 nM; Müller et al., 1984) und Iloprost (K<sub>D</sub>: 11 nM; Schrör et al., 1981; Narumiya et al., 1999) (Abb. 2).

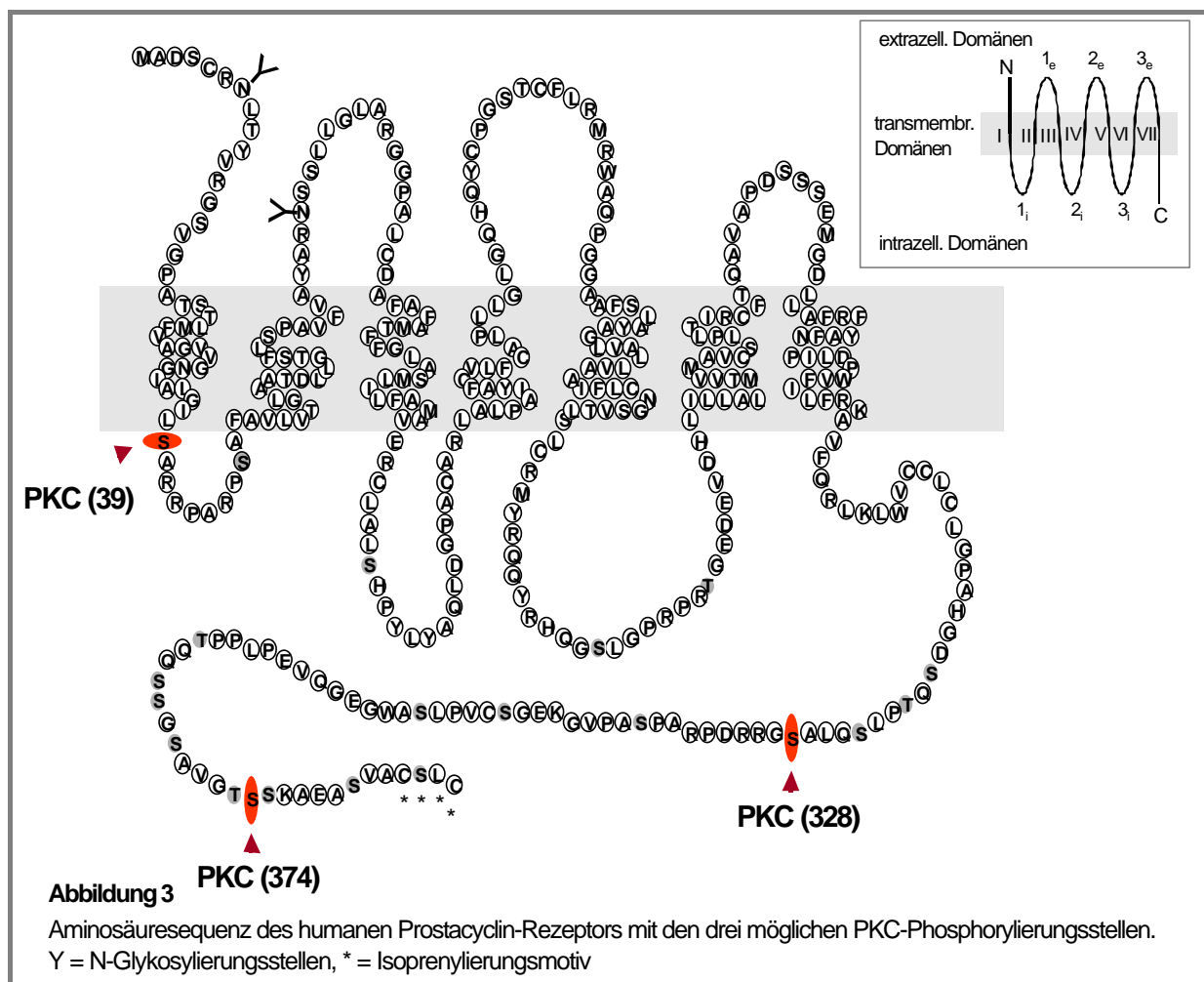
Die Plasmakonzentration von PGI<sub>2</sub>, die indirekt durch die Messung von 6-keto-PGF<sub>1α</sub> bestimmt wird, liegt beim gesunden Menschen unter Ruhebedingungen bei ca. 5 pg/ml. Die vaskuläre PGI<sub>2</sub>-Bildung wird erhöht durch Gefäßverletzungen und die damit einhergehende Aktivierung von Thrombozyten sowie bei pathologischen Gefäßwandveränderungen wie der Atherosklerose (FitzGerald et al., 1984). Sinzinger et al. (1981) haben eine verminderte Sensitivität von Blutplättchen auf antiaggregatorisch wirkende Prostaglandine wie PGI<sub>2</sub> bei koronaren Herzkrankheiten und Angina pectoris bei länger dauernder Anwendung nachgewiesen. Dieser Befund war der erste Hinweis auf eine Abschwächung von Prostacyclinwirkungen über Rezeptor-assoziierte Mechanismen. Allerdings war zum damaligen Zeitpunkt über Struktur und Regulation des Prostacyclin-Rezeptors nichts bekannt.

## 1.2 Der Prostacyclin-Rezeptor (IP-R)

Heute weiß man, dass der Prostacyclin-Rezeptor zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) des Rhodopsin-Typs gehört. 1993 wurde von der Gruppe um Narumiya die cDNA des IP-Rezeptors aus der Maus (m) kloniert (Namba et al., 1994). Es folgte 1994 die Klonierung des humanen (h) IP-R (Boie et al., 1994; Gen-Bank Nr. L29016; Katsuyama et al., 1994; Gen-Bank Nr. D25418). Ogawa et al. veröffentlichten 1995 die strukturelle Organisation des humanen Prostacyclin-Rezeptor-Gens. Das Gen ist auf Chromosom 19 lokalisiert und besteht aus drei Exons, die dementsprechend durch zwei Introns unterbrochen sind. Eine vergleichbare Exon-Intron-Anordnung wurde auch bei anderen Prostaglandin-Rezeptoren nachgewiesen. Ein Sequenzenvergleich innerhalb der Gruppe der gefäßrelaxierend wirkenden Rezeptoren (IP-R, DP-R, EP<sub>2</sub>-R und EP<sub>4</sub>-R) zeigte eine mäßige Homologie von 32 % bis 44 %. (Narumiya et al., 1999). Der Promotor des IP-R-Gens weist keine konventionellen

Sequenzmotive wie die TATA-Box und CCAAT-Elemente auf. Als mögliche regulatorische Elemente wurden aber Konsensussequenzen für die Bindung der Transkriptionsfaktoren SP-1, AP-1 und AP-2 beschrieben (Ogawa et al., 1995).

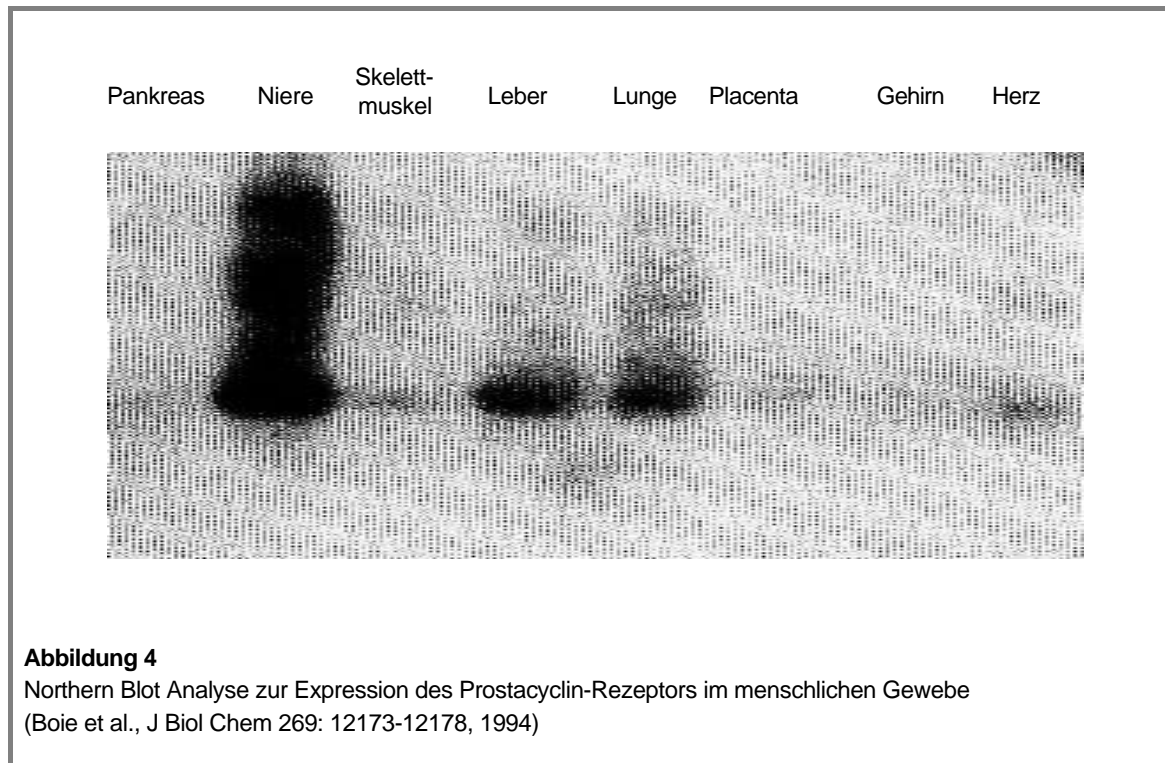
Der humane IP-Rezeptor besteht aus 386 Aminosäuren und besitzt eine molekulare Masse von ca. 41 kDa. Er weist sieben Transmembran-Domänen auf (I bis VII), wobei sich drei extra- (1<sub>e</sub>, 2<sub>e</sub>, 3<sub>e</sub>) und drei intrazelluläre (1<sub>i</sub>, 2<sub>i</sub>, 3<sub>i</sub>) Schleifen ausbilden (Abb. 3). Die Aminosäuresequenz des hIP-R enthält drei Konsensussequenzen für eine mögliche Phosphorylierung durch die „second messenger“ aktivierbare Proteinkinase C (PKC), eine davon in der 1. intrazellulären Domäne (Serin 39), zwei im C-Terminus des Rezeptors (Serin 328, Serin 347). Eine Konsensussequenz für eine Proteinkinase A (PKA)-vermittelte Phosphorylierung ist in der 1. intrazellulären Domäne des Prostacyclin-Rezeptors aus Maus und Ratte zu finden (Sasaki et al., 1994), nicht aber beim humanen Rezeptor (Smyth et al., 1996).



Der Rezeptor weist verschiedene posttranslationale Modifikationen auf. An den Aminosäuren 7 und 78 befinden sich mögliche Asparagin (N)-Glykosylierungsstellen (Katsuyama et al., 1994) (Abb. 3). An diese kann während der Translation des Rezeptorproteins im endoplasmatischen

Retikulum ein Oligosaccharid angeheftet werden, das während des intrazellulären Transportes umfangreich weiter modifiziert wird. Glykosylierungen spielen eine große Rolle bei der Faltung, Sekretion und Sortierung von Proteinen. Beim Prostaglandin-Rezeptor EP<sub>3</sub>β wurde gezeigt, dass eine fehlende N-Glykosylierung die Proteinfaltung nicht beeinflusste, aber keine effektive Lokalisation des Rezeptors in der Membran mehr stattfand (Böer et al., 2000). 1999 zeigten Hayes et al. am humanen und murinen IP-Rezeptor, dass durch ein CSLC-Motiv der C-Terminus der Rezeptoren durch einen Lipidrest modifiziert wird. Im Falle von IP-R handelt es sich dabei um eine Isoprenylierung mit einem 15C-Farnesylrest, der bei mIP-R an das Cystein 414 (analog Cystein 383 bei hIP-R) kovalent gebunden wird (Abb. 3). Die hydrophobe Modifikation garantiert die Membranlokalisation des Rezeptors und ist an Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt (Zhang und Casey, 1996). Für den IP-R wiesen Hayes et al. (1999) nach, dass die Isoprenylierung wichtig ist für die Signaltransduktion durch den Rezeptor. Bisher ist IP-R der einzige GPCR, für den eine Isoprenylierung gezeigt wurde. Öfter beschrieben sind Palmytylierungen als Lipidmodifikationen an Cysteinen im C-Terminus von GPCRs, wie z.B. beim Endothelin A-Rezeptor und beim β<sub>2</sub>-adrenergen Rezeptor. Die Palmytylierung bewirkt bei beiden Rezeptoren u.a. die effektive Kopplung an das G-Protein (O'Dowd et al., 1989; Horstmeyer et al., 1996).

Durch die Konstruktion von chimären IP / DP-Rezeptoren wurden Domänen von hIP-R identifiziert, die für die Ligandenbindung und -erkennung notwendig sind. Demnach liegt die Erkennungsdomäne für den Liganden im Bereich der 6. und 7. transmembranären Region des Rezeptors, die Bindedomäne in der Region der 1. und 2. extrazellulären Schleife. Weiterhin ist die Seitenkettenstruktur des Liganden wichtig für seine Erkennung und effektive Bindung am IP-Rezeptor (Kobayashi et al., 1997). Kedzie et al. (1998) beschreiben für die transmembranären Domänen eine vergleichsweise hohe Homologie von 60 % zwischen dem hEP<sub>2</sub>- und dem hIP-Rezeptor. Interessanterweise führte ein einziger Aminosäureaustausch beim EP<sub>2</sub>-Rezeptor in einem konservierten Teil der 7. Transmembrandomäne zu einer 100-fach höheren Selektivität für den IP-R-Agonisten Iloprost. Auch diese Autoren kommen zu dem Schluss, dass die 7. Transmembrandomäne an der Ligandenerkennung über spezifische Seitenketten beteiligt ist. Eine Expression des Prostacyclin-Rezeptors wurde durch Northern Analyse in den meisten Geweben nachgewiesen (Abb. 4). Dabei wird der Rezeptor am stärksten in der Aorta exprimiert, geringere Expression ist in Niere und Lunge zu finden. Innerhalb des Herzens ist der Rezeptor im Atrium und Ventrikel exprimiert (Boie et al., 1994; Nakagawa et al., 1994).



Eine Besonderheit in der Expression von IP-R findet sich im Zentralnervensystem. Im Gehirn von Mensch und Maus konnte kein IP-R nachgewiesen werden (Boie et al., 1994; Namba et al., 1994), exprimiert wird der Rezeptor aber im Gehirn von Ratte und Schwein (Takechi et al., 1996; Parkinson et al., 2000). Im Ratten-Modell wurde dabei erstmals die mögliche Existenz einer zweiter Isoform von IP-R, IP-R<sub>2</sub> genannt, beschrieben. Diese Rezeptor-Isoform zeichnet sich durch eine geringe Bindeaffinität zum PGI<sub>2</sub>-Analogon Iloprost aus, aber einer höheren Affinität zu dem ansonsten schwächer bindenden Analogon Isocabacyclin. Zusätzlich ist diese Besonderheit in der Bindeaffinität auch auf bestimmte Bereiche des Gehirns beschränkt, nämlich auf Thalamus und Großhirnrinde. In Rückenmark und Medulla binden beide Analoga mit vergleichbarer Affinität. Die Autoren vermuten eine Funktion von IP-R<sub>2</sub> in der Regulation der neuronalen Aktivität (Takechi et al., 1996).

Um die Funktion von IP-R besser untersuchen zu können, wurde in der Arbeitsgruppe von Narumiya 1997 eine knockout-Maus gezüchtet, die einen Defekt im Prostacyclin-Rezeptor-Gen aufwies. Die Maus ist lebensfähig, phänotypisch ist aber eine höhere Anfälligkeit für Thrombosen zu beobachten und eine Reduktion der Schmerz- und Entzündungsreaktionen (Murata et al., 1997).

### 1.2.1 Signaltransduktion durch IP-R

Die zellulären Effekte des Prostacyclin-Rezeptors werden über unterschiedliche Signaltransduktionswege vermittelt, die im nachfolgenden näher erläutert werden (Abb. 5).

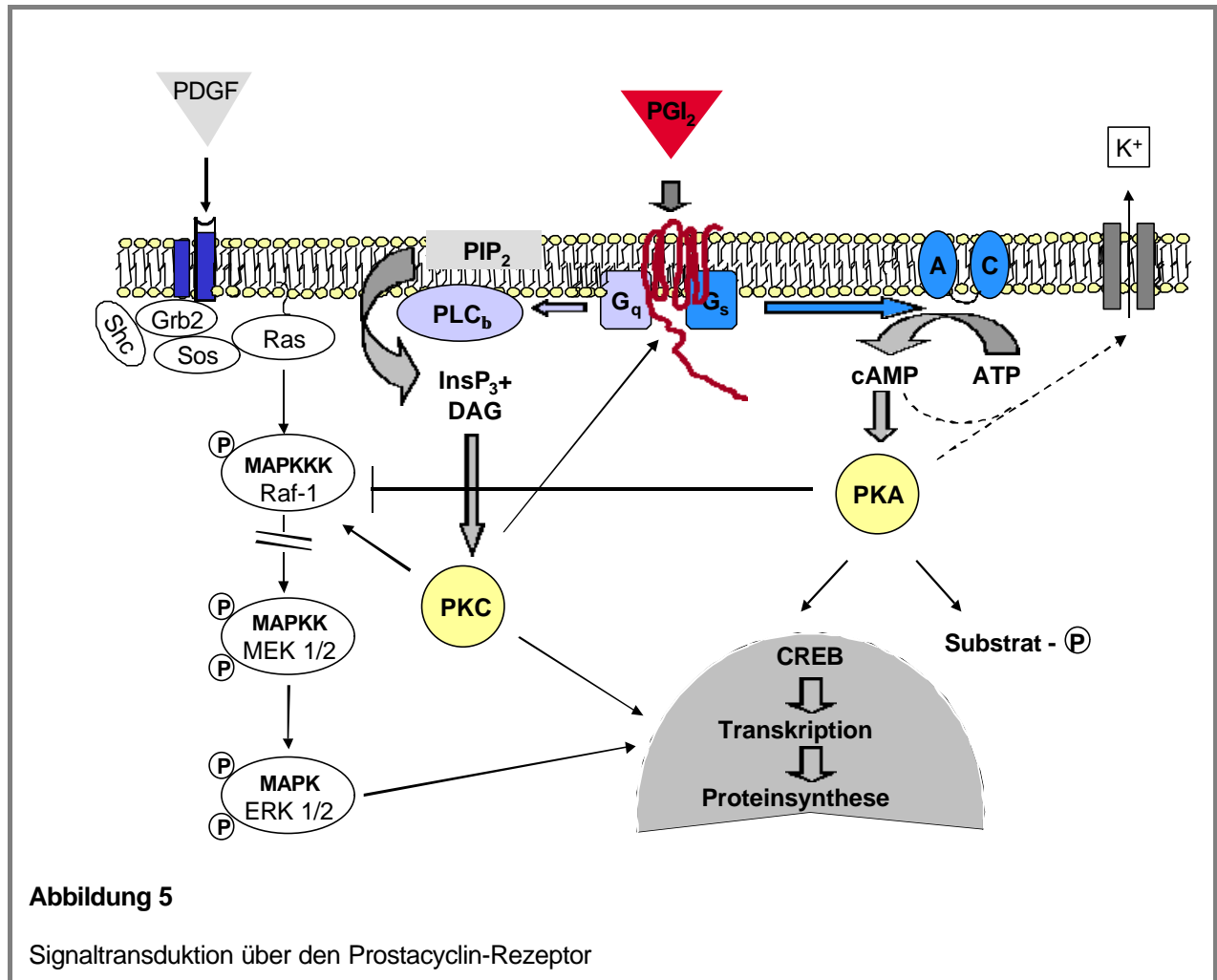


Abbildung 5

Signaltransduktion über den Prostacyclin-Rezeptor

#### ● Kopplung von IP-R an ein stimulatorisches G-Protein (G<sub>s</sub>)

Bei Aktivierung durch seinen Agonisten koppelt der Prostacyclin-Rezeptor an ein trimeres Guanin-tri-Phosphat (GTP)-bindendes Protein (G-Protein), das aus einer  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit besteht. Im Falle von IP-R im vaskulären System handelt es sich um ein stimulatorisches G-Protein (G<sub>s</sub>), dessen  $\alpha$ -Untereinheit an die Adenylatzyklase (AC) bindet und sie aktiviert. Die Adenylatzyklase setzt Adenosintriphosphat (ATP) zum sekundären Botenstoff cyclo-Adenosinmonophosphat (cAMP) um. Diese Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration führt zur Aktivierung der cAMP-abhängigen Serin- / Threonin-Proteinkinase A (PKA) (Abb. 5). Die aktivierte PKA phosphoryliert verschiedene Proteine, wie z.B.

Membranproteine (Rezeptoren, Kaliumkanäle) oder Genexpressionsfaktoren wie das CREB-Protein (cAMP-response Element-bindendes Protein). Das so aktivierte CREB Protein bindet an das im Promotorbereich verschiedener Gene lokalisierte CRE-Element und kann deren Aktivität erhöhen. Dazu gehört z.B. das Gen c-Fos, welches eine Untereinheit des Transkriptionsfaktors AP-1 kodiert (Lee, 1991).

Weiterhin ist die aktive PKA in der Lage, das durch Wachstumsfaktoren aktivierbare Raf-1 Protein zu hemmen, eine zytosolische Serin- / Threonin-Kinase. Raf-1 wird aktiviert durch das monomere G-Protein Ras und ist Komponente einer Kaskade aus drei durch Phosphorylierung aktivierbaren MAP-Kinasen (Mitogen-aktivierte Proteinkinasen, MAPK), die der intrazellulären Signalübertragung dienen. Raf-1 als MAPKKK (MAPK-Kinase-Kinase) phosphoryliert die MAPKKs (MAPK-Kinase) MKK 1 / MKK 2, die nachfolgend die MAPKs ERK 1 / ERK 2 phosphorylieren. Am Ende der MAPK-Kaskade steht die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, deren Aufgabe in der Aktivierung bzw. Deaktivierung bestimmter Gene liegt (Cook und McCormick, 1993). Die Hemmung der durch Wachstumsfaktoren wie PDGF aktivierten Raf-1-Signalkaskade ist die Grundlage für die antiproliferative und antimitogene Wirkung von Prostacyclin via PKA-Aktivierung in der glatten Gefäßmuskulatur (Weber et al., 1998; Bornfeldt und Krebs, 1999).

### ❷ Einfluss von IP-R auf Kalium ( $K^+$ )-Kanäle

Die gefäßrelaxierende Wirkung von Prostacyclin beruht auf der IP-R-vermittelten Öffnung von  $K^+$ -Kanälen in der Zellmembran (Siegel et al., 1991). Dies führt zu einem  $K^+$ -Ausstrom aus der Zelle. Der Verlust von positiv geladenen Ionen führt zu einer Zunahme des Membranruhepotentials (Hyperpolarisation) und als Folge davon zu einem verminderten Einstrom von Kalzium ( $Ca^{2+}$ )-Ionen durch spannungsregulierte  $Ca^{2+}$ -Kanäle. Die verminderte intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration führt zur Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur (Faraci und Heistad, 1998). Auch dieser Effekt wird durch das nach der Stimulation von IP-R von der AC gebildete cAMP vermittelt, vermutlich via PKA (Siegel et al., 1992; Kapural und Fein, 1997) (Abb. 5).

### ❸ Kopplung von IP-R an $G_q$

In einigen nicht vaskulären Zelllinien wurde auch eine Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration nach Aktivierung des Prostacyclin-Rezeptors beschrieben. Daher ist auch

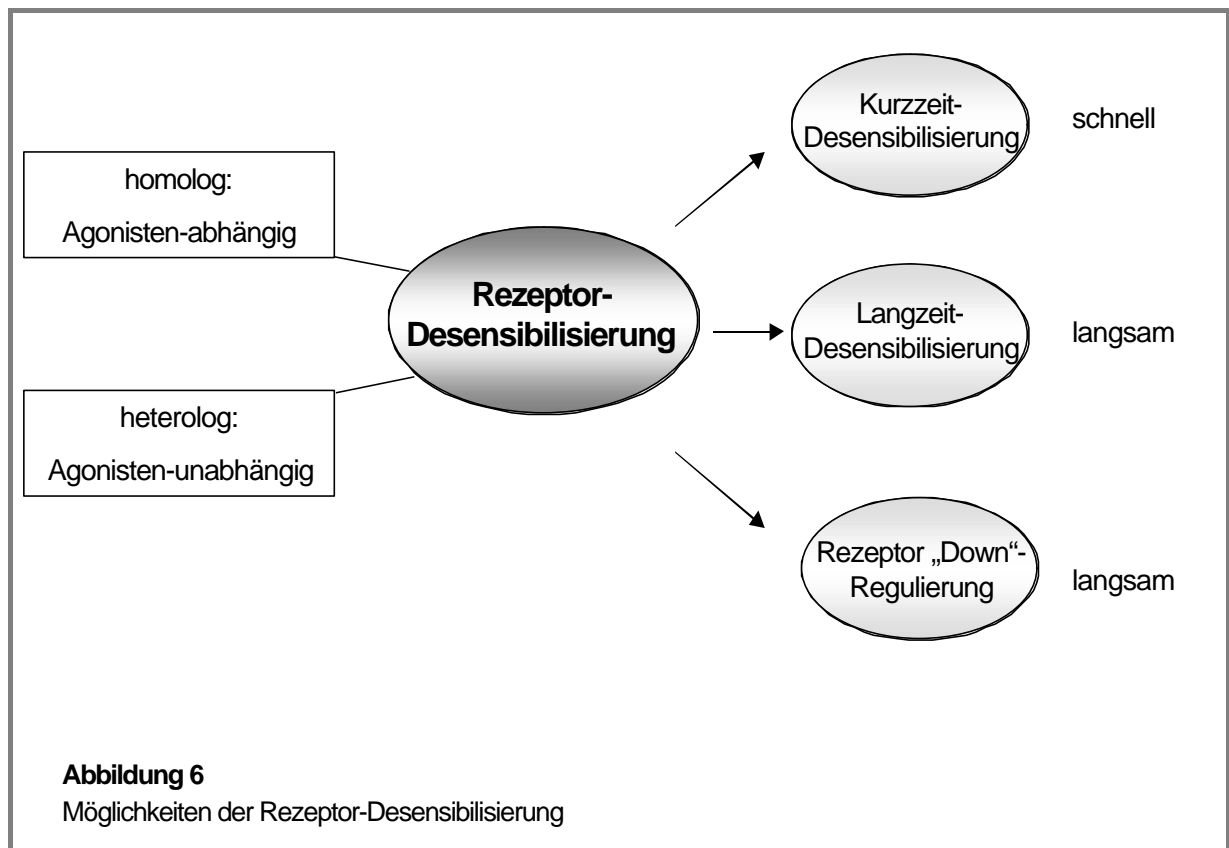
eine Kopplung an ein weiteres trimeres G-Protein ( $G_q$ ) zu vermuten (Oka et al, 1993; Schwaner et al., 1992). Durch die  $\alpha$ -Untereinheit von  $G_q$  wird die beta-Isoform der Phospholipase C ( $PLC_\beta$ ) aktiviert (Abb. 5). Diese spaltet Phosphatidylinositol-bis-Phosphat ( $PIP_2$ ) in Inositol-tri-Phosphat ( $InsP_3$ ) und Diacylglycerol (DAG).  $InsP_3$  diffundiert ins Zytosol und bindet an  $InsP_3$ -abhängige  $Ca^{2+}$ -Kanäle der ER-Membran, was eine  $Ca^{2+}$ -Ausschüttung bewirkt. DAG aktiviert die PKC, was zum Anstieg der Transkription spezifischer Gene durch Phosphorylierung verschiedener Zielproteine führt. Im Thymus wurde eine konzentrations-abhängige Stimulation des PLC-Weges bei hohen Prostacyclin-Konzentrationen gezeigt (Namba et al., 1994). Ein solcher Mechanismus würde auch die Beobachtung vasokonstriktorisches Effekte höherer Prostacyclin-Konzentrationen erklären (Schrör und Verheggen, 1988).

Bei der von Takechi et al. (1996) im ZNS der Ratte beschriebenen Rezeptor-Isoform  $IP-R_2$  konnte keine der vorher beschriebenen G-Protein-Kopplungen gezeigt werden. Sie vermuten einen weiteren Signaltransduktionsweg, dessen Effektoren weder durch eine Adenylatzyklase-Stimulation, noch durch  $Ca^{2+}$ -Mobilisierung wirken.



### 1.3 Rezeptorregulation

Die Signaltransduktion über G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) wird durch unterschiedliche Mechanismen kontrolliert (Übersichtsartikel: Krupnick und Benovic, 1998; Bünemann et al., 1999). Genauso wichtig wie die Aktivierung eines Signalweges ist dabei auch seine Inaktivierung (Desensibilisierung), die durch mehrere Ereignisse mit unterschiedlichen zeitlichen Abläufen vonstatten geht (Abb. 6).

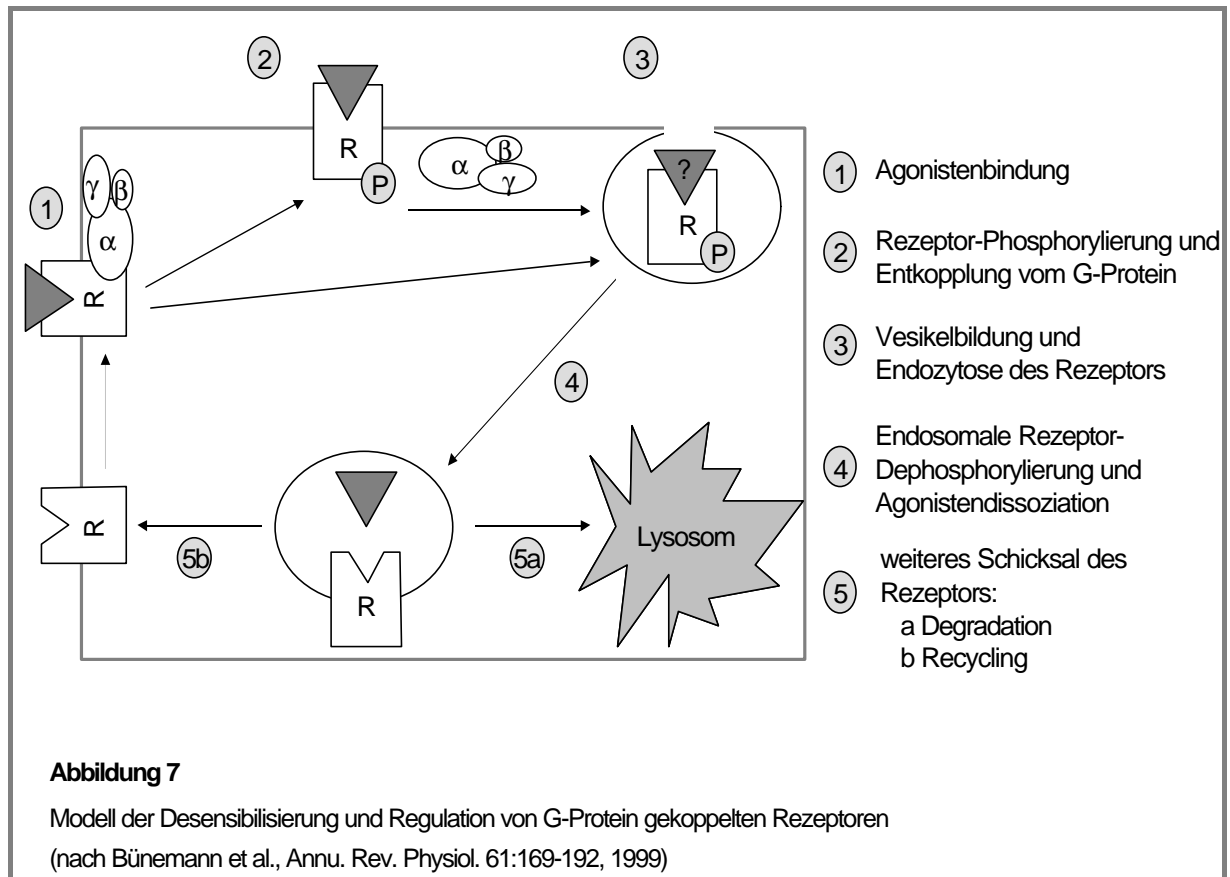


Die Dissoziation des Agonisten vom Rezeptor ist der zeitlich schnellste Vorgang, der zur Signalabschaltung führt. Längerfristig spielen intrazelluläre Vorgänge eine größere Rolle. Die verminderte Signaltransduktion des Rezeptors in Gegenwart seines Agonisten wird als homologe Desensibilisierung bezeichnet. Diese kann in Sekunden bis Minuten nach Agonistenzugabe eintreten (Kurzzeitdesensibilisierung). Alternativ können einige Rezeptoren heterolog desensibilisiert werden. Letzteres geschieht Agonisten-unabhängig am nicht-aktivierten Rezeptor. In beiden Fällen wird der Rezeptor phosphoryliert und dadurch eine Interaktion zwischen Rezeptor und G-Protein verhindert. Bei der homologen Desensibilisierung wird so die Signalweiterleitung unterbrochen, bei der heterologen kommt sie erst gar nicht zustande. Die Langzeitdesensibilisierung zeigt einen langsameren Zeitverlauf (Minuten bis Stunden nach Agonistenstimulation). Hier wird das Signal für längere Zeit durch

Internalisierung des Rezeptors in das Zellinnere unterbrochen. Die Langzeitdesensibilisierung kann ein Recycling oder die „Down“-Regulierung des Rezeptors beinhalten. Die „Down“-Regulierung ist der langsamste Desensibilisierungsmechanismus und führt zur Degradation des Rezeptorproteins im Lysosom oder auch Proteasom. Eine erneute Agonisten-vermittelte Signalinitiation benötigt die Neusynthese des Rezeptors.

GPCRs werden nach physiologischen und pharmakologischen Stimuli desensibilisiert. Dazu gehören im kardiovaskulären System die Endothelin-Rezeptoren ( $ET_A$  und  $ET_B$ ), die Opioid-Rezeptoren ( $\delta$ OR,  $\mu$ OR und  $\kappa$ OR), der Bradykinin B2-Rezeptor (B2-BKR), die muskarinergen Acetylcholin-Rezeptoren (m1, m2, m3 und m4 AChR) und die  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Adrenozeptoren. Am besten untersucht ist der Desensibilisierungsmechanismus des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors ( $\beta_2$ AR), der als Modell für viele GPCRs dient (Lohse et al., 1990; Lefkowitz et al., 1998).

Abbildung 7 stellt den im folgenden beschriebenen Ablauf der Rezeptor-Desensibilisierung am Modell des  $\beta_2$ AR schematisch dar: Beteiligt an der Desensibilisierung des aktivierten  $\beta_2$ AR sind G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs), die zur Familie der Serin- / Threonin-Proteinkinasen gehören (Inglese et al., 1993; Lefkowitz, 1993). Durch die Dissoziation des G-Proteins translozieren die GRKs u.a. mit Hilfe der  $\beta\gamma$ -Untereinheit zum C-Terminus des Rezeptors und phosphorylieren ihn dort. Auch second messenger Kinasen wie PKA und PKC können die Rezeptoren phosphorylieren. Als Folge der Phosphorylierung wird der Rezeptor vom G-Protein entkoppelt. Die anschließend bindenden Arrestinproteine verhindern weitere Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und G-Protein (Ferguson et al., 1996). Zugleich leiten sie die Endozytose des Rezeptors und damit seine Internalisierung von der Zelloberfläche in die Zelle ein. Arrestin dient zusätzlich als Adapterprotein, an das das zytosolische Clathrin bindet und sich zu trihelikalen Strukturen zusammenlagert (Krupnick et al., 1998; Marsh und McMahon, 1999). Die so gebildeten Clathrin-Vesikel transportieren den Rezeptor in die Zelle. Unterstützt wird dieser Vorgang von einer GTPase der Dynamin-Familie (Zhang et al., 1996). In der Zelle können zwei unterschiedliche Wege beschritten werden. In den Endosomen durchläuft der Rezeptor durch den sauren pH-Wert der Umgebung eine Konformationsänderung. Dies führt zur Dephosphorylierung des Rezeptors durch Phosphatasen und anschließend zum Recycling des Rezeptors an die Zelloberfläche. Alternativ kann der internalisierte Rezeptor in den Lysosomen degradiert werden, was zu einer Herunterregulation der Rezeptorzahl führt. Hier kann nur durch eine Neusynthese die Zahl der aktivierbaren Rezeptoren wieder erhöht werden (König und Edwardson, 1997).



Für viele Rezeptoren sind inzwischen mehrere Möglichkeiten beschrieben, die zu ihrer Desensibilisierung führen. Neben dem „klassischen“ Desensibilisierungsmodell, dem  $\beta_2$ AR,  $ET_A$  und  $ET_B$  und auch  $\delta$ OR und  $\kappa$ OR folgen können und an dem Dynamin, Arrestin und Clathrin beteiligt sind, werden zur Zeit noch zwei weitere Varianten des Desensibilisierungsvorganges beschrieben:

Die  $m_1$ ,  $m_3$  und  $m_4$  AChR internalisieren dynaminabhängig, aber weder Arrestin als Adapterprotein noch Clathrin (bei  $m_3$  und  $m_4$ ) als Vesikelprotein sind beteiligt. Bisher ist noch kein Protein beschrieben, das die Funktion des Arrestins übernehmen könnte. An Stelle des Clathrins können endozytotische Vesikel auch mit Hilfe von Caveolin gebildet werden, einem integralen Membranprotein (Okamoto et al., 1998). Caveolin bildet durch Oligomerisierung sogenannte Caveolae, in denen verschiedene Rezeptoren, aber auch ihre Effektormoleküle nachgewiesen werden konnten (Shaul et al., 1998). Dazu gehören  $B_2$ -BKR,  $ET_A$  und  $m_2$  AChR.

Der Angiotensin II Typ 1A-Rezeptor ( $AT_{1A}R$ ) und der  $m_2$  AChR, für dessen Desensibilisierung alternativ auch der „klassische“ Weg beschrieben ist, werden durch den dritten, am wenigsten erforschten Weg internalisiert. Hier läuft die Rezeptorinternalisierung unabhängig von Dynamin, Arrestin und Clathrin ab, wobei bisher aber keines der daran beteiligten Proteine identifiziert werden konnten.

Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht verschiedener Rezeptoren und die Beteiligung von Arrestin, Clathrin, Dynamin und Caveolin an deren Endozytose. Hier wird deutlich, dass ein Rezeptor zur Desensibilisierung verschiedene Wege beschreiten kann. Wie diese unterschiedlichen Wege gesteuert werden ist bisher nicht bekannt.

<b>Rezeptor</b>	<b>Adaptorprotein</b>	<b>Vesikelprotein</b>	<b>GTPase</b>	<b>Referenz</b>
<b>AT<sub>1A</sub>R</b>			Dynamin	Werbonat et al., 2000
<b>AT<sub>1A</sub>R</b>	Arrestin-unabh.		Dynamin-unabh.	Zhang et al., 1996
<b>b<sub>2</sub>AR</b>	Arrestin	Clathrin	Dynamin	Ferguson et al., 1998
<b>B2-BKR</b>		Caveolin		De Weerd und Leeb-Lundberg, 1997
<b>ET<sub>A</sub>, ET<sub>B</sub></b>	Arrestin	Clathrin	Dynamin	Bremnes et al., 2000
<b>ET<sub>A</sub></b>		Caveolin		Chun et al., 1994
<b>m1, m3, m4 AChR</b>	Arrestin-unabh.	m1: Clathrin	Dynamin	Santini et al., 2000; Lee et al., 1998
<b>m2 AChR</b>	a) Arrestin b) Arrestin- unabh.	a) Clathrin b) Clathrin- unabh.	a) Dynamin b) Dynamin- unabh.	Gurevich et al., 1993; Pals-Rylaarsdam, 1997; Werbonat et al., 2000
<b>m2 AChR</b>		Caveolin		Feron et al., 1997
<b>dOR</b>	Arrestin	Clathrin		Kovoor et al., 1999; Hasbi et al., 2000
<b>kOR</b>	Arrestin	Clathrin	Dynamin	Li et al., 1999
<b>mOR</b>	Arrestin	Clathrin	Dynamin	Koch et al., 1998; Zhang et al., 1998
<b>TXA<sub>2</sub>R<sub>b</sub></b>	Arrestin	Clathrin	Dynamin	Parent et al., 1999

Bei Prostaglandin-Rezeptoren wurde die Desensibilisierung der G<sub>s</sub>-gekoppelten EP<sub>2</sub>- und EP<sub>4</sub>-Rezeptoren untersucht. Dabei zeigt der EP<sub>2</sub>-Rezeptor keine Agonist-induzierte Kurzzeit-

Desensibilisierung (Nishigaki et al., 1996; Hibbs et al., 1999). Für den EP<sub>4</sub>-Rezeptor dagegen ist eine schnelle Desensibilisierungskinetik beschrieben (Nishigaki et al., 1996; Neuschäfer-Rube et al., 1999). Weitere Untersuchungen gibt es zum Thromboxan-Rezeptor, von dem zwei Isoformen, alpha (TXA<sub>2</sub>R<sub>α</sub>) und beta (TXA<sub>2</sub>R<sub>β</sub>), existieren (Raychowdhury et al., 1994). Beide Isoformen werden nach Stimulation des Rezeptors phosphoryliert und desensibilisiert, wobei eine Internalisierung nur für die beta-Isoform gezeigt werden konnte, die dem „klassischen“ Modell folgt (Habib et al., 1997). Die Desensibilisierung des IP-Rezeptors wird von der Gruppe um FitzGerald untersucht. Dort zeigte man in stabil IP-R exprimierenden HEK 293-Zellen eine schnelle Kurzzeit-Desensibilisierung des Rezeptors (Smyth et al., 1996).

## **1.4 Medizinischer Hintergrund**

Krankheiten wie die Atherosklerose (Schrör, 1997), Fieber (Milton und Wendtland, 1970) oder entzündliche Prozesse (Davies et al., 1984) beinhalten u.a. Störungen im Prostaglandin-Stoffwechsel. Daher ist zur Behandlung solcher Krankheiten eine gezielte Beeinflussung der Prostaglandinwirkungen durch exogene Gabe oder Hemmung der Biosynthese von großem Interesse. Früh erkannte man auch das therapeutische Potential von Prostacyclin (Moncada und Vane, 1981). Zu den Erkrankungen, die in der heutigen Zeit, allerdings mit unterschiedlichem Erfolg, mit Prostacyclin therapiert werden gehören:

- die Hemmung der Metastasenbildung bei soliden Tumoren.
- die Behandlung von Gefäßrestenosen
- die Behandlung der pulmonalen Hypertonie (PH)

### **1.4.1 Prostacyclin und seine klinischen Anwendungen**

#### **1.4.1.1 Applikation bei Tumoren**

Schirner et al. untersuchten im Ratten-Modell die Auswirkung von Cicaprost auf die Metastasenbildung beim Mammakarzinom (Schirner et. al, 1997, 1998). Dabei wurde eine dosisabhängige Reduktion der Bildung von Lungenmetastasen nachgewiesen. Eine Reduktion konnte nur bei solchen Tieren nachgewiesen werden, die die applizierte Tagesdosis an Cicaprost nicht kontinuierlich, sondern als eine einmalige Gabe erhalten hatten. Die Autoren stellten dabei einen Zusammenhang zwischen anti-metastatischer Wirkung und der Anzahl funktioneller Rezeptoren her, die durch den kontinuierlichen Einsatz von Cicaprost vermindert sein könnte.

#### 1.4.1.2 Behandlung von Gefäßrestenosen

Bei der Atherosklerose handelt es sich um eine Erkrankung der großen Arterien, bei der die innerste Schicht (Intima) der Gefäßwand verändert ist. Dieser Umbau der Gefäßwandstruktur führt zum Elastizitätsverlust und zur Einengung des Lumens (Stenose) und damit zur Minderdurchblutung des nachgeschalteten Organs. Zur Beseitigung von Gefäßstenosen wird das Verfahren der Angioplastie angewandt. Durch Ballondilatation im Bereich der Stenose wird das Gefäßvolumen erweitert. Dadurch kommt es zu einer Überdehnung der Gefäßwand, deren Verletzung zu einem erneuten Umbau und zur Neointimabildung führen kann. Für die Pathophysiologie der Restenosen ist die glatte Gefäßmuskulatur von besonderer Bedeutung (Raines und Ross, 1993). Die Muskelzellen migrieren unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren in das Gefäßlumen und proliferieren dort. Die dabei gebildeten Matrixproteine führen zur Gefäßverengung und begünstigen so die Anlagerung von Thrombozyten und anderen zellulären und azellulären Bestandteilen des Blutes (Ross, 1999). Dieser Mechanismus führt zur Entwicklung einer Restenose. Als endogener Schutzmechanismus wird die Induktion der COX-2 in stenosierten Gefäßen angesehen. Die gesteigerte Bildung von PGI<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub> in glatten Gefäßmuskulzellen und die nachfolgende Aktivierung von Prostaglandin-Rezeptoren (IP-R und EP<sub>2</sub>-R) führt zur Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels und Aktivierung cAMP / PKA-vermittelter Signaltransduktionswege (Rimarachin et al., 1994, Belton et al., 2000). Dadurch kann die Wirkung von Wachstumsfaktoren wie PDGF vermindert werden und damit die Migration und Proliferation der glatten Gefäßmuskulzellen (Bornfeldt und Krebs, 1999). Zusätzlich wird die Thrombozytenaggregation inhibiert. Im Fall einer Restenose scheint diese antimitogene Wirkung der Prostaglandine aber nicht ausreichend zu sein. Es stellt sich daher die Frage, ob durch eine therapeutische Gabe von Prostaglandinen nach Angioplastie diese Wirkung verstärkt werden kann. Am Kaninchenmodell führte die Behandlung mit dem Prostacyclin-Mimetikum Beraprost vier Wochen nach der Angioplastie zu einem signifikant größeren Gefäßdurchmesser im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Isogaya et al., 1995). Ähnliche Befunde zeigten auch zwei mit Cicaprost durchgeführte Studien an Kaninchen (Braun et al., 1993) und Schweinen (Banning et al., 1997). Eine Beschichtung koronarer Stents, die kontinuierlich Iloprost freisetzen, verminderte ebenfalls signifikant die Neointimabildung im Schweine- und Schaf-Modell (Alt et al., 2000). In klinischen Studien konnten diese experimentellen Daten allerdings nur teilweise bestätigt werden. Zwei randomisierte Doppelblindstudien an Patienten konnten nach einer Angioplastie für das Prostacyclin-Mimetikum Ciprosten eine Reduktion der Restenoserate nachweisen (Darius et al., 1992; Raizner et al., 1993). Andererseits ergaben zwei weitere Studien mit intravenöser Zufuhr

von Prostacyclin keine signifikante Reduktion der Restenoserate (Knudtson et al., 1990; Gershlick et al., 1994).

Aus den angeführten Untersuchungen ergibt sich die Frage nach den Ursachen, die zu diesen unterschiedlichen Befunden führen. Arbeiten aus unserer Gruppe weisen darauf hin, dass eine kontinuierliche Aktivierung des Prostacyclin-Rezeptors durch Agonisten zur Desensibilisierung führt. Schon 1986 wurde in einer Patientenstudie gezeigt, dass Iloprost dosisabhängig die ADP-induzierte Blutplättchenaggregation hemmt, diese Funktionshemmung aber nach einer Infusionszeit von Iloprost von bis zu 4 h um ca. 50 % vermindert wurde (Darius et al., 1986). In einer von Schröder und Schrör 1993 veröffentlichten Untersuchung wurde gezeigt, dass eine kontinuierliche endogene PGI<sub>2</sub>-Freisetzung in Endothelzellen der Schweineaorta zu einer verminderten Stimulation der Adenylatzyklase auf Prostacyclin führt. In einer anderen Arbeit wurde an bovinen glatten Gefäßmuskelzellen nachgewiesen, dass die antimitogene Wirkung von Iloprost nach Vorbehandlung der Zellen mit dem Prostacyclin-Mimetikum aufgehoben wurde (Zucker et al., 1998). Beide Befunde weisen auf eine Bedeutung der IP-R-Regulation bezüglich der verminderten zellulären Wirkungen von Prostacyclin hin.

#### **1.4.1.3 Behandlung der pulmonalen Hypertonie (PH)**

Eine weitere Anwendung finden Prostacyclin und seine Mimetika bei der Therapie der pulmonalen Hypertonie. Dabei handelt es sich um eine lebensbedrohende Krankheit, bei der Herz und Lunge betroffen sind. Die pulmonale Zirkulation hat die Aufgabe, das Blut mit Sauerstoff zu versorgen und den pH-Wert über die Kohlendioxid-Abatmung aufrechtzuerhalten. Durch eine Verengung der pulmonalen Blutgefäße fließt nur unter sehr hohem Druck ausreichend viel Blut. Die rechte Herzkammer kann diesen Druck nur begrenzt erzeugen. Die daraus resultierende Durchblutungsstörung der Lunge führt zu einer verschlechterten Sauerstoffaufnahme und zu einer zunehmenden Überlastung der rechten Herzkammer. Patienten mit dieser Erkrankung sind chronisch kurzatmig und körperlich wenig belastbar. Häufigste Todesursache ist das chronische Rechtsherzversagen. Die seltenere primäre pulmonale Hypertonie (PPH) ist erblich bedingt und tritt am häufigsten bei Frauen im frühen oder mittleren Lebensalter auf, ohne dass man die genaue Ursache kennt. Die PPH zeigt oft einen dramatischen Krankheitsverlauf mit einer mittleren Überlebenszeit von nur 2-3 Jahren. Die sekundäre pulmonale Hypertonie (SPH) zeigt einen schleichenden Verlauf und ist die Folge anderer Herz- / Lungenerkrankungen. Sie tritt häufiger auf und betrifft Männer und Frauen gleichermaßen. Die schlechte Prognose einer einmal entstandenen PH ist mit den schon frühzeitig auftretenden chronischen Umbauvorgängen in der Gefäßwand (vaskuläres

Remodelling) zu erklären. Das Remodelling zeigt sich u.a. in der Vergrößerung der kontraktilen Elemente der Gefäße und einer verstärkten Fibrose durch Fibroblastenwachstum und -migration in der äußersten Gefäßschicht (Adventitia) (Olschewski et al., 1999; Archer und Rich, 2000). Auch nach Beseitigung der Ursachen, z.B. durch eine Herztransplantation, ist das Remodelling kaum rückbildungsfähig. Vasokonstriktion und Remodelling bieten die Ansatzpunkte für eine Therapie der PH mit PGI<sub>2</sub>. Der relaxierende Effekt von PGI<sub>2</sub> wirkt dabei der pathologischen Verengung der Lungengefäße entgegen und führt zu einer Senkung des Blutdruckes im Pulmonalkreislauf. Weiterhin kann PGI<sub>2</sub> durch antiproliferative Wirkungen den strukturellen Umbau und durch antithrombotische Wirkungen den Verschluss der Lungengefäße verhindern. Zu Beginn des therapeutischen Einsatzes von PGI<sub>2</sub>-Mimetika bei PH in der Klinik erfolgte eine intravenöse Verabreichung, die zur Verbesserung des Grundzustandes führte (Higenbottam et al., 1984; Scott et al., 1990; Barst et al., 1994). Die Therapie mit PGI<sub>2</sub> ist aber nicht unproblematisch und auch mit sehr hohen Kosten verbunden. PGI<sub>2</sub> muss durch die kurze Halbwertszeit als Dauerinfusion appliziert werden, was Sterilitätsprobleme bereitet und technisch schwierig ist. Zudem wirkt PGI<sub>2</sub> nicht selektiv auf die Lungengefäße und kann auch zu einem arteriellen Blutdruckabfall, z.B. in Armen und Beinen, führen. Dadurch würde die rechte Herzkammer aber nicht ent-, sondern belastet. Der kritischste Punkt der Dauerinfusion ist die erforderliche kontinuierliche Dosiserhöhung, die zu einer Vervielfachung des Medikamentenbedarfs führt (Barst et al., 1994). Nach einem Jahr ist die Infusionsdosis von PGI<sub>2</sub> in der Regel von 2 ng / kg / min auf 20 bis 40 ng / kg / min erhöht (Grimminger et al., 1999). Möglicherweise liegt auch dieser Toleranzentwicklung gegenüber PGI<sub>2</sub> eine Desensibilisierung des Prostacyclin-Rezeptor zugrunde. Um lokal eine selektivere Wirkstoffkonzentration in den pulmonalen Gefäßen zu erzielen, wurde mit gutem Erfolg die inhalative Applikation von PGI<sub>2</sub> erprobt (Walmrath et al., 1993; Olschewski et al., 1996). Auch neue klinische Studien bestätigen, dass durch die Inhalation von Iloprost die Herzleistung verbessert und damit der Druck im Gefäßsystem der Lunge gesenkt werden kann (Olschewski et al., 1998, 1999; Höper et al., 2000) und dies mit vergleichsweise geringeren Nebenwirkungen (Ewert et al., 2000). Ein weiterer Vorteil ist, dass bei der inhalativen Anwendung von PGI<sub>2</sub>, im Gegensatz zur intravenösen, in der Regel keine nennenswerte Steigerung der Anfangsdosis beobachtet werden konnte. Auch im pulmonalen Gewebe gilt das Interesse dem Desensibilisierungsverhalten von IP-R, um die inhalative PGI<sub>2</sub>-Therapie weiter zu verbessern und möglichen Toleranzentwicklungen, z.B. durch Inhalationspausen, vorzubeugen.



### 1.4.2 Zusammenfassung

Zusammenfassend ermöglichen Prostacyclin-Mimetika die Therapie verschiedener vaskulärer Erkrankungen, zum einen durch die gefäßrelaxierende Wirkung und zum anderen durch die Hemmung einer unkontrollierten Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen. Es stellt sich aber die Frage, warum in einigen Fällen die endogen im Endothel gebildeten Prostaglandine, im besonderen Prostacyclin, nicht antimitogen und vasodilatierend wirken. Hinzu kommt, dass es durch die systemische Gabe von Prostacyclin-Mimetika zu erheblichen Nebenwirkungen in verschiedenen Organsystemen kommen kann. Im zentralen Nervensystem beobachtet man z.B. Müdigkeit, Verwirrheitszustände, aber auch Hyperaktivität. Nebenwirkungen auf das Herz-Kreislaufsystem beinhalten Blutdruckveränderungen in beide Richtungen sowie Herzrhythmus-Störungen. Daher ist es für die weitere effektive klinische Anwendung von Prostaglandin-Mimetika oder auch -hemmstoffen von Interesse, die Regulationsmechanismen und Signaltransduktionswege der in der Gefäßwand lokalisierten Prostaglandin-Rezeptoren aufzuklären und möglichen Toleranzentwicklungen vorzubeugen. Allerdings stellt sich auch die Frage, ob möglicherweise durch endogen synthetisierte Prostaglandine bereits eine Desensibilisierung der Rezeptoren erreicht wird. In diesem Fall wäre es denkbar, dass der vorherige Einsatz von Inhibitoren der Prostaglandin-Synthese eine Wirkungssteigerung der therapeutisch verabreichten Prostaglandine bewirken könnte.

### 1.5 Ziel der Arbeit

Wichtig für die klinische Anwendung von Prostacyclin-Mimetika ist ihre Langzeitwirkung auf die intrazelluläre Signaltransduktion über den Prostacyclin-Rezeptor. Vorliegende Arbeiten weisen auf eine Regulation des IP-Rezeptors hin. Folgende Punkte sind dabei von Interesse:

- Es soll geklärt werden, welche Mechanismen der Desensibilisierung von hIP-R zugrunde liegen und welche Komponenten daran beteiligt, bzw. nicht beteiligt sind. Dazu wird zunächst die Expression des Rezeptors in verschiedenen Zellsystemen (humane Hautfibroblasten und Transfektionssystem CHO-Zellen) untersucht und anschließend die Desensibilisierungskinetik durch cAMP-Assays ermittelt. Die Internalisierung des humanen

Rezeptors nach seiner Stimulation soll mit Hilfe eines „Green Fluorescence Fusionsproteins“ (GFP) verfolgt werden.

- Es soll untersucht werden, ob und in welcher Weise die Signaltransduktion über hIP-R nach der Desensibilisierung wiederhergestellt wird.
- Im letzten Teil der Arbeit soll in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Thoraxchirurgie der Universität Gießen die Expression und Desensibilisierung von IP-R im humanen pulmonalen Gewebe untersucht werden. Hier könnten sich neue Erkenntnisse für die inhalative Therapie der pulmonalen Hypertonie mit Iloprost ergeben. Diese Versuche werden in humanen glatten Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten aus der Adventitia der Pulmonalarterie durchgeführt, die nach Lungenoperationen gewonnen wurden.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Puffer und Lösungen

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden in bester verfügbarer Qualität und Reinheitsgrad von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

**Blot-Puffer:**

1 x Laufpuffer ohne SDS  
20 % Methanol

**10 x HBSS:**

1.35 mM NaCl  
50 mM KCl  
4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
4.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
8 mM MgSO<sub>4</sub>  
40 mM NaHCO<sub>3</sub>  
pH 7.0

**10 x Laufpuffer:**

250 mM Tris  
1.9 mM Glycin  
0.1 % SDS

**P1-Puffer:**

50 mM Tris / HCl  
10 mM EDTA  
100 µg / ml RNase A  
pH 8.0

**P3-Puffer:**

3 M KAc-Lösung  
pH 5.5

**4 x Sammelgelpuffer:**

0.5 mM Tris / HCl  
0.4 % SDS  
pH 8.8

**10 x TBE-Puffer:**

**1 x HBSS:**

10 x HBSS mit:  
1 mM CaCl<sub>2</sub>  
5.5 mM Glukose  
10 mM HEPES pH 7.8  
1 mg / ml BSA

**4 x Laemmli-Puffer:**

250 mM Na-Phosphat-Puffer pH 7.0  
8 % SDS  
40 % Glycerin  
20 % 2-Mercaptoethanol  
0.001 % Bromphenolblau  
100 mM Dithiothreitol (DTT)

**PBS:**

137 mM NaCl  
2.7 mM KCl  
1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
8.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
pH 7.4

**P2-Puffer:**

0.2 M NaOH  
1 % SDS

**RIA-Puffer:**

50 mM Tris / HCl  
4 mM EDTA  
pH 7.5

**10 x TAE-Puffer:**

40 mM Tris  
20 mM Na-Acetat  
2 mM EDTA  
pH 7.8

**10 x TBS:**

1 mM Tris  
83 mM Borsäure  
10 mM EDTA  
pH 7.4

100 mM Tris/HCl  
1.5 mM NaCl  
pH 7.4

**TBST:**  
1 x TBS mit:  
0.1 % Tween 20

**TBSTM:**  
1 x TBS mit:  
0.1 % Tween 20  
5 % Magermilchpulver

**TE-Puffer:**  
10 mM Tris / HCl  
1 mM EDTA  
pH 8.0

**4 x Trenngelpuffer:**  
1.5 mM Tris / HCl  
0.4 % SDS  
pH 8.8

## 2.2 Zellkultur

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Zelllinien verwendet:

Zell-Linie	Herkunft	Kulturmedium
<b>CHO</b>	Chinesische Hamsterovarialzellen	Häm's F12
<b>COS1</b>	SV40 transformierte Nierenzellen von Afrikanischen Grünen Affen	Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) mit GlutaMAX I™ mit 4.5 mg/ml Glukose
<b>NF29</b>	humane Hautfibroblasten; Dr. Rösen, Düsseldorf	DMEM
<b>CRL1635</b>	humane Vorhautfibroblasten; American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)	DMEM mit 4.5 mg/ml Glukose
<b>hpSMC</b>	humane pulmonale glatte Gefäßmuskelzellen aus der Lungenarterie; Dr. Rose, Giessen	Komplettmedium
<b>hpAdv</b>	humane Fibroblasten aus der pulmonalen Adventitia; Dr. Rose, Giessen	Komplettmedium

Den Medien für CHO-, COS1- und Fibroblasten-Zellen wurde 100 U/ml Penicillin, 0.1 mg/ml Streptomycin und 10 % Foetales Kälberserum (FCS) zugesetzt (alles Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe). Die humanen pulmonalen Zellen erhielten ein Komplettmedium (Smooth Muscle Cell Growth Medium 2 mit SupplementMix; Promocell, Heidelberg). Die

Kulturgefäße wurden von den Firmen Becton und Dickinson (Heidelberg) und Greiner (Solingen) bezogen.

Die Zellen wurden bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C kultiviert. Die Passagierung der Zellen erfolgte alle 4-6 Tage durch Ablösen der Zellen mittels Trypsin/EDTA (0.05 % / 0.5 mM) nach einmaligem Waschen mit PBS. Die Zellen wurden subkonfluent passagiert.

Für die Versuche mit Fibroblasten wurden Zellen der Passagen 7-15 (NF29), bzw. 12-17 (CRL1635) verwendet. Versuche mit pulmonalen Zellen wurden in den Passagen 5-10 durchgeführt.

## **2.3 Transfektionen**

### **2.3.1 Stabile Expression von Genen mit der Polybren/ DMSO-Methode**

Zur Erzeugung einer stabilen Zelllinie, die den humanen Prostacyclin-Rezeptor exprimiert, wurden CHO-Zellen mit dem Expressionsvektor pc3hIP transfiziert. Dazu wurden 100 µg pc3hIP über Nacht mit PvuI bei 37 °C linearisiert.

CHO-Zellen wurden auf Kulturplatten (Ø 150 mm) 30-50 % konfluent angezogen. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit einem Absorptionsmix aus 10 ml vorgewärmten Vollmedium, 100 µg linearisierter DNA und 20 µl Polybren-Stammlösung (Hexadimethin Bromid; Sigma-Aldrich (Deisenheim); Stammlösung: 5 mg Polybren in 1 ml 1 x HBSS-Puffer (ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>) lösen, sterilfiltrieren und bei -20 °C aufbewahren) über Nacht inkubiert, um die Bindung der DNA an die Zelloberfläche zu ermöglichen (Aubin et al., 1991). Am nächsten Tag wurde der Absorptionsmix abgesaugt und die Zellen für 5 min mit 5 ml Medium/ 15 % DMSO (Dimethylsulfoxid) (v/v) zur Permeabilisierung der Zellwände im CO<sub>2</sub>-Brutschrank inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen über Nacht in ihrem Kulturmedium regeneriert und am nächsten Tag im Verhältnis 1:20 auf neue Kulturplatten (Ø 150 mm) passagiert. Zur Selektion der transfizierten Zellen wurde dem CHO-Medium das Antibiotikum Genitacin-Sulfat (G418, Calbiochem, USA) in einer Konzentration von 250 µg/ml Medium zugesetzt. Unter dem Einfluß von G418 starben nicht-transfizierte Zellen ab. Transfizierte Zellen hingegen überlebten und bildeten einzelne Klone, die isoliert und separat kultiviert wurden.

### **2.3.2 Transiente Expression von Genen**

Um Gene transient in den verschiedenen Zelllinien zu exprimieren, wurde die entsprechende DNA in den Transfektionsvektor pcDNA3 kloniert. Die Zellen wurden 30-50 % konfluent in

6-Lochplatten angezogen und die DNA mittels LipofectAMIN PLUS™ Reagenz (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe) nach Herstellerangaben in die Zellen transfiziert. Dabei wurden 1 µg DNA, 6 µl PLUS-Reagenz und 4 µl LipofectAMIN eingesetzt. Für cAMP-Assays wurden die Zellen einen Tag nach der Transfektion auf 24-Lochplatten gesät. 48-72 h nach der Transfektion wurden die Zellen für die entsprechenden Versuche verwendet.

## 2.4 Präparation und Analyse von DNA

### 2.4.1 DNA-Vermehrung in *Escherichia coli* (*E.coli*)

#### 2.4.1.1 Genotyp des verwendeten *E.coli*-Stammes

DH5αF' F' / *endA1 hsdR17*(r<sub>k</sub><sup>-</sup>m<sub>k</sub><sup>+</sup>) *supE44* lambda<sup>-</sup> *thi-1 recA1* GibcoBRL Life  
*gyrA relA1* (lacZY A-*argF*)<sub>U169</sub> (m80*dlacZ*ΔM15) Technologies, Karlsruhe

#### 2.4.1.2 Anzucht des *E.coli*-Bakterienstammes

Vollmedium (LB): 1 % Trypton (Pepton 140; Difco, USA), 0.5 % Hefeextrakt (Difco, USA),  
 0.5 % NaCl

Für die Herstellung von festem Nährboden wurden 1.2 % Agar (GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe) zugegeben. Um Bakterien, die ein Plasmid mit Antibiotikaresistenz enthalten, zu selektionieren, wurde dem Medium nach dem Autoklavieren Ampicillin in einer Konzentration von 50 µg/ml zugegeben.

Die Bakterien wurden bei 37 °C angezogen. Zur Lagerung wurden sie bei 4 °C längstens zwei Monate aufbewahrt.

#### 2.4.1.3 Transformationen von *E.coli*

Transformationen von *E.coli* wurden nach der Rubidiumchlorid-Methode durchgeführt (Hanahan, 1985).

#### **2.4.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli***

##### **2.4.1.4.1 Alkalische Lyse („Mini-Präparation“)**

Die Präparation wurde nach Birnboim und Doly (1979) durchgeführt, deren Methode nach Vorschrift der Firma Qiagen (Hilden) modifiziert wurde. 1.5 ml einer Übernachtskultur wurden durch Zentrifugation geerntet und in 300 µl P1-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl P2-Puffer und kurzem Vortexen wurden 300 µl P3-Puffer zugefügt. Die aufgeschlossenen Zellen wurden 15 min bei 12.500 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand, der sowohl die DNA als auch RNA enthält, in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Anschließend erfolgte die Fällung der DNA durch Zugabe 2.5 Volumenteilen Ethanol (96 %). Das Pellet wurde in 50 µl TE-Puffer aufgenommen.

##### **2.4.1.4.2 Qiagen („Midi-Präparation“)**

Die Plasmid-DNA, die in größeren Mengen benötigt wurde, wurde mit dem „Plasmid Midi Kit“ der Firma Qiagen (Hilden) isoliert. Dies wurde nach Anweisung des Herstellers durchgeführt.

#### **2.4.2 Restriktion von DNA**

Die sequenzspezifische Spaltung von DNA erfolgte mit Restriktionsendonukleasen der Firmen Roche Molecular Biochemicals (Mannheim) und New England Biolabs (Frankfurt). Nach Herstellerangaben wurden Puffer und Reaktionstemperatur gewählt. Für 1 µg Plasmid-DNA wurden 1 U Enzym eingesetzt und die DNA für eine Stunde bei entsprechender Temperatur inkubiert.

#### **2.4.3 Auftrennung von DNA in nativen Agarose-Gelen**

Zur Analyse von DNA-Fragmenten wurden diese in 0.8-1.5 %igen Agarose-Gelen (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) aufgetrennt. Als Gelpuffer wurde 1 x TAE-, bzw. TBE-Puffer verwendet. Die Proben wurden vor Beladung des Gels mit 1/10 Volumen Blaumarker (Bromphenolblau 0.25 %, Saccharose 40 %) versetzt. Als Längenstandard dienten eine Basenpaar 100 Leiter oder ein DNA-Molekular-Gewichtsmarker II (beides Roche Molecular Biochemicals, Mannheim). Durch Zugabe von 0.5 µg/ml Ethidiumbromid zum Agarosegel wurde die DNA nach der Auftrennung in TAE-, bzw. TBE-Puffer bei Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht.

#### **2.4.4 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten**

Um bestimmte DNA-Fragmente zu isolieren, wurden diese in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Das gewünschte Fragment wurde unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und

das Agarosestück mit der DNA in dreifachem Volumen 6 M Na-Iodid-Lösung bei 50 °C geschmolzen. Nach Zugabe von 5 µl „Glasmilk“, einer DNA-bindenden Silikat-Matrix, erfolgte eine Inkubation für 5 min bei 50 °C. Der „Glasmilk“ / DNA-Komplex wurde durch Zentrifugation (30 s, 13.000 rpm, Eppendorf Centrifuge 5415 C) sedimentiert und anschließend 3 x mit je 1 ml kalter Wasch-Lösung (50 mM NaCl, 10 mM Tris / HCl, 2.5 mM EDTA, 50 % Ethanol (v/v), pH 7.5) gewaschen. Die DNA wurde dann mit 20 µl 1 x TE-Puffer durch eine 5-minütige Inkubation bei 50 °C von der Matrix gelöst und durch Zentrifugation (30 s, 13.000 rpm, Eppendorf Centrifuge 5415 C) von dieser getrennt. Der Überstand mit der DNA wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

### 2.4.5 Ligation von DNA

Für die Ligation wurden 0.1-0.2 µg linearisierte Vektor-DNA und Fragment in 3–5-fachem molaren Überschuß eingesetzt. Die Ligationsreaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 1 U T4 DNA-Polymerase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) 2-3 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16 °C.

### 2.4.6 Sequenzierung von DNA

Alle Materialien und Geräte zur Sequenzierung von DNA wurden von der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen.

Die Sequenzierung von DNA erfolgte mit dem „Thermo Sequenase Cy5 Dye Terminator Sequencing Kit“ nach Protokoll des Herstellers. Diese Methode beruht auf einer Modifikation der Dideoxy-Methode nach Sanger et al. (1977). Als Primer wurden verwendet:

„pcDNASeq“: 5' CGA GGC TGA TCA GCG AGC TC 3' (anti-sense)

Sequenzgel:	8.8 ml Long-Ranger Acrylamid
	29 g Harnstoff
	12 ml 10 x TBE ad 60 ml Aqua dest.
	550 µl APS (10 %)
	55 µl TEMED
Elektrophoresebedingungen:	1500 V, 55 mA, 25 W, 53 °C, Laufpuffer: 0.5 x TBE
System:	ALF-Express DNA-Sequenzierer
Programm:	ALF-Manager 3.01



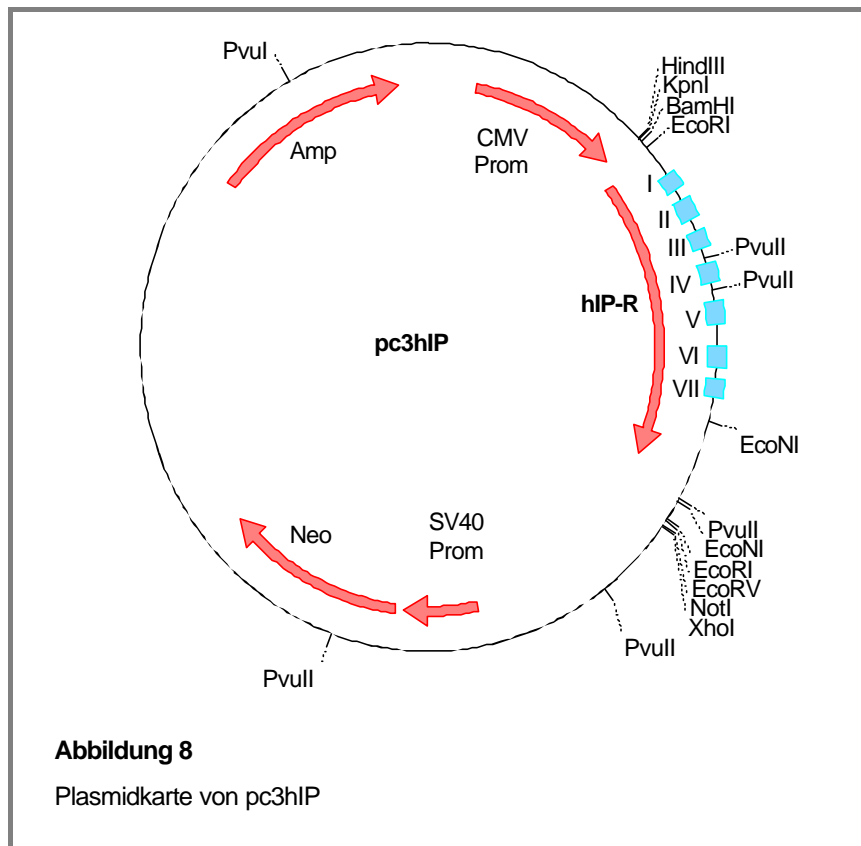
## 2.4.7 Verwendete Plasmide

Tabelle mit den in der Arbeit verwendeten Plasmide:

<b>Plasmid</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Herkunft</b>
<b>pcDNA1</b>	Vektor zur stabilen Expression von Genen in Säugetierzellen	Invitrogen Corp. (Groningen, NL)
<b>pcDNA3</b>	Vektor zur stabilen Expression von Genen in Säugetierzellen	
<b>pc1hIP</b>	enthält das humane Prostacyclin-Rezeptor-Gen im Vektor pcDNA1	Boie et al., 1994
<b>pc3hIP</b>	enthält hIP-R-Gen im Vektor pcDNA3	A. Hasse
<b>pc3hIPmut</b>	wie pc3hIP, mit Mutation des Stop-Codons in eine EcoRV-Schnittstelle	diese Arbeit
<b>pc3hIP-GFP</b>	C-terminal GFP-gekoppeltes hIP-R-Gen im Vektor pcDNA3	
<b>pc3hIP-HIS</b>	C-terminal mit 6 x Histidin-gekoppeltes hIP-R-Gen im Vektor pcDNA3	
<b>pcHAhIP2</b>	enthält N-terminal HA-gekoppeltes hIP-R-Gen im Vektor pcDNA3	
<b>pc3badRez</b>	Umklonierung der cDNA von h $\beta_2$ AR aus pBCbeta2-AR in den Vektor pcDNA3	
<b>pBCbeta2-AR</b>	enthält cDNA von h $\beta_2$ AR im Vektor pBC	J. Meyer-Kirchrath
<b>HA-b2AR</b>	wie pBCbeta2-AR, Rezeptor ist N-terminal mit einem HA-Epitop fusioniert	
<b>GRK2</b>	enthält bovines GRK2-Gen	
<b>GRK5</b>	enthält bovines GRK5-Gen	
<b>b-Arrestin2-GFP</b>	enthält cDNA des h $\beta$ -Arrestin2-Gens, C-terminal mit GFP fusioniert	
<b>pc3GRK2</b>	Umklonierung von GRK2 in Expressionsvektor pcDNA3	A. Hasse
<b>pc3GRK5</b>	Umklonierung von GRK5 in Expressionsvektor pcDNA3	
<b>pEGFP-C1</b>	enthält cDNA für GFP zur C-terminalen Fusion an zu untersuchende Proteine	Clontech, Heidelberg

### 2.4.8 Klonierung von Fusionsproteinen an den Prostacyclin-Rezeptor mit Hilfe der PCR (Polymerase-Kettenreaktion)-Methode

Ausgangsplasmid aller Klonierungen von Fusionsproteinen an den Prostacyclin-Rezeptor war das Plasmid pc3hIP.



#### 2.4.8.1 PCR

Die PCR wurde mit Ready-To-Go™-PCR-Pillen (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden aus einem TAE-Gel isoliert (s. 2.4.4) oder über Säulen nach Herstellerangaben aufgereinigt (GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Die verwendeten Primer wurden von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) oder von MWG-Biotech AG (Ebersberg) hergestellt.

PCR-Bedingungen:

5 min, 95 °C	} 35 Zyklen
1 min, 95 °C	
1.5 min, 60 °C	
1 min, 72 °C	
15 min, 72 °C	

### 2.4.8.2 Klonierung eines 6 x-Histidin-gekoppelten IP-R (hIP-R-HIS)

Mit der PCR-Methode wurde der C-Terminus des Prostacyclin-Rezeptors aus dem Plasmid pc3hIP amplifiziert. Gleichzeitig wurde mit Hilfe des anti-sense-Primers an das PCR-Produkt sechs Histidin-Reste und eine XbaI-Schnittstelle gekoppelt. Das 600 bp große PCR-Produkt wurde über eine GFX™-Säule aufgereinigt und mit EcoNI und XbaI geschnitten. Das entstehende 100 bp große Fragment wurde aus einem Agarosegel isoliert und enthält eine Teilsequenz des Rezeptor-C-Terminus mit sechs Histidinresten.

PCR-Ansatz:

Template: pc3hIP

Primer: „EPhIPu1“: 5' GCC TTC TCG CTG GCC TAC GC 3' (sense)

„hIPHis“: 5' CG CAG CGG ACG AGG GAG ACG GTA GTA GTA GTA  
*hIP-R* *6xHis*

GTA GTA ACT AGATCTGGG 3' (anti-sense)  
*STOP* *XbaI*

Das Plasmid pc3hIP wurde mit EcoNI und XbaI geschnitten und ein 6459 bp großes Fragment aus einem Agarosegel isoliert. In einem Ligationsansatz wurde das PCR-Produkt in das Plasmid inkloniert. Das neu entstandene Plasmid pc3hIP-HIS enthält den Prostacyclin-Rezeptor mit einem C-terminal fusionierten 6 x-Histidin-Rest. Das Plasmid wurde durch Sequenzierung auf seine Richtigkeit überprüft.

### 2.4.8.3 Klonierung eines Hämagglutinin (HA)-gekoppelten IP-R (HA-IP-R)

Das Plasmid pc3hIP wurde mit BamHI und partiell mit BstEII geschnitten und ein 6626 bp großes Fragment aus einem Agarosegel isoliert. Mit Hilfe der PCR wurde ein 527 bp großes Fragment amplifiziert und über eine GFX™-Säule aufgereinigt. Anschließend wurde das PCR-Produkt mit BamHI und mit BstEII geschnitten und in den isolierten Vektor ligiert. Das neu entstandene Plasmid pcHAhIP2 enthält den Prostacyclin-Rezeptor mit einer N-terminalen HA-Kopplung. Das Plasmid wurde durch Sequenzierung auf seine Richtigkeit überprüft

Template: pc3hIP

Primer: „HAhIP2“: 5' TTT TGG ATC CAT GTA CCC ATA CGA CGT CCC AGA CTA  
*BamHI* *START* *HA*

CGC TGC GGA TTC GTG CAG GAA CCT C 3' (sense)  
*hIP*

„hIPd“: 5' CGG AGG AAG CAC CAG CTG CC 3' (anti-sense)  
*hIP*



## 2.5 Analyse von RNA

### 2.5.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugetierzellen

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Geweben oder kultivierten Zellen erfolgte mit der Trizol<sup>®</sup>-Methode (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe).

Zellen wurden direkt nach Abnahme des Mediums in der Kulturschale durch Zugabe von Trizol<sup>®</sup>-Reagenz (1 ml/10 cm<sup>2</sup>) lysiert. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die RNA-Proben mit 200 µl Chloroform/ml Trizol versetzt, ausgeschüttelt, 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 10 min zentrifugiert (8000 rpm, 4 °C, Beckmann J2-HS Zentrifuge; JA 20-Rotor oder 13.000 rpm, 4 °C, Heraeus Biofuge 13). Die Fällung der RNA aus dem Überstand erfolgte mit 500 µl Isopropanol / ml Trizol bei Raumtemperatur für 10 min und anschließender Zentrifugation für 30 min (13.000 rpm, 4 °C, Heraeus Biofuge 13). Das RNA-Pellet wurde nach Waschen mit 75 % Ethanol an der Luft getrocknet und anschließend bei 37 °C in DEPC (Diethylpyrocarbonat)-H<sub>2</sub>O (500 µl/l) gelöst.

Quantifizierung von RNA erfolgte durch Messung der Absorption bei 260 nm in einem Genequant II DNA / RNA Calculator (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg).

1 OD<sub>260</sub> = 40 µg/ml RNA.

### 2.5.2 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) zum Nachweis der Expression von hIP-R und hb<sub>2</sub>AR

Die RT-PCR wurde mit Ready-To-Go<sup>™</sup> RT-PCR-Pillen durchgeführt (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Als interner Standard wurde die Expression des Enzymes Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) nachgewiesen. Die erwarteten PCR-Produkte zum Nachweis des Prostacyclin-Rezeptors besitzen eine Größe von 370 bp („Oligo 1“ und „Oligo 2“), bzw. 335 bp („Oligo 1“ und „Oligo 3“), für den β<sub>2</sub>-adrenergen Rezeptor 461 bp. Für die GAPDH wurde ein 240 bp („GAPDH 5“ und „GAPDH 3“) großes PCR-Fragment amplifiziert. Die verwendeten Primer wurden von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) oder MWG-Biotech AG (Ebersberg) bezogen.

#### Verwendete Primer:

Nachweis des Prostacyclin-Rezeptors

„Oligo 1“: 5′ GGT CCC CCA TCT CAC TGC TGC TGT CAG G 3′ (anti-sense)

„Oligo 2“: 5′ GCG TCC TCT TCT GCG CGC TGC CCC TGC TGG 3′ (sense)

„Oligo 3“: 5′ AGC AGT ACT GCC CCG GCA GCT GGT GCT TCC 3′ (sense)

Nachweis des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors

„RTAdRzu“: 5'CCC ACC AGG AAG CCA TCA ACT GC 3' (sense)

„RTAdRzd“: 5'CTG GGC TCC GGC AGT AGA TAA GG 3' (antisense)

Nachweis der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

„GAPDH 5“: 5' TGA TGA CAT CAA GAA GGT TGG TGA A 3' (sense)

„GAPDH 3“: 5' TCC TTG GAG GAA ATG TGG GCC AT 3' (anti-sense)

RT-PCR-Ansatz: 500 ng RNA  
 500 ng Oligo d(T)  
 je 15 pmol genspezifische Primer  
 je 15 pmol „GAPDH 3“ und „GAPDH 5“

Ansatz mit DEPC-Wasser auf 50  $\mu$ l auffüllen.

RT-PCR-Bedingungen: 30 min, 42 °C  
 5 min, 95 °C  
 1 min, 95 °C  
 1.5 min, 60 °C  
 1 min, 72 °C  
 15 min, 72 °C

} 35 Zyklen

## 2.6 Präparation und Analyse von Proteinen

### 2.6.1 Analyse von Proteinen durch Western Blot

#### 2.6.1.1 Isolierung von Proteinen aus Säugetierzellen

Für die Untersuchungen mittels Western Blot wurden konfluente Zellen aus 6-Lochplatten 2x mit PBS gewaschen und anschließend durch Zugabe von modifiziertem 1 x Laemmli-Puffer (Laemmli, 1970; Cannon und Tang, 1997) lysiert. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Boden der Kulturplatten gelöst, 2 sec im Eppendorfgefäß sonifiziert und 10 min bei 95 °C denaturiert.

#### 2.6.1.2 Auftrennung von Proteinen im Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine aus dem Zelllysate erfolgte nach dem Prinzip der diskontinuierlichen Gelelektrophorese (Laemmli, 1970; Neville, 1971). Dazu wurde ein

Sammelgel (5 % Acrylamid) auf ein Trenngel (7.5 %, 10 % oder 12 % Acrylamid; „Rotiphorese“, Roth, Karlsruhe) gegossen. Für die Untersuchung der Proteine wurden 10-20 µg Protein eingesetzt.

Der Gellauf erfolgte bei 200 V in einer BioRad Elektrophoresekammer (BioRad, München) mit 1 x Laufpuffer + 0.1 % SDS. Als Molekulargewichtsmarker diente ein biotinylierter hochmolekularer Proteinstandard (Sigma-Aldrich, Deisenhofen).

### 2.6.1.3 Transfer von Proteinen

Die Proteine wurden mittels einer „Semi-Dry“-Blotting Apparatur (BioRad, München) auf eine Polyvinyliden Difluorid Membran (PVDF, Millipore, ImmobilonP, Sigma-Aldrich, Deisenhofen) transferiert. Der Transfer erfolgte mit Blotpuffer bei insgesamt 12 V für 30 min.

### 2.6.1.4 Hybridisierung und Detektion von Proteinen

Zur Sättigung unspezifischer Bindungen wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in TBSTM prähybridisiert. Anschließend erfolgte die Hybridisierung mit Primärantikörper (1:1000, siehe Tabelle) in 10 ml TBSTM für 1-2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Nach 3 x 10 min Waschen in TBST erfolgte die Hybridisierung mit Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern (1:5000, Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg) in TBSTM für 1 h bei Raumtemperatur.

Tabelle mit den im Western Blot verwendeten Primärantikörpern:

Bezeichnung	Beschreibung	Hersteller
Monoklonaler Antikörper, HA.11	Antikörper gegen HA-Fusionsprotein	Babco, Kalifornien, USA
GFP Polyklonaler Antikörper	Antikörper gegen GFP-Fusionsprotein	Clontech, Kalifornien, USA
Penta-HIS™ Antikörper	Antikörper gegen 6xHIS-Fusionsprotein	Qiagen, Hilden
GRK2 (C-15)	Antikörper gegen GRK2	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
GRK5 (C-20)	Antikörper gegen GRK5	
β2AR (M-20)	Antikörper gegen β2AR	

Nach 3 x 10 min Waschen in TBST wurden die Proteine mittels eines Lumi-Light Western Blotting Substrat (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) nach Angaben des Herstellers detektiert. Bei dieser Methode werden mit der, bei der Oxidation von Luminol durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entstehenden Lichtemission die Stellen mit Peroxidaseaktivität auf der Membran nachgewiesen.

Die Chemilumineszenz wird durch Exposition der Membran auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm<sup>TM</sup> ECL<sup>TM</sup>, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) sichtbar gemacht.

### **2.6.1.5 Prüfung der gleichmäßigen Proteinbeladung**

Nach der Detektion wurde die PVDF-Membran mit TBST gewaschen und 10 min in einer Amidoschwarz-Lösung (0.1 % in 25 % Isopropanol / 10 % Essigsäure; Sigma-Aldrich, Deisenhofen) gefärbt. Nach 10-minütigem Abwaschen der überschüssigen Farbstoffmenge mit 25 % Isopropanol / 10 % Essigsäure wurden die Proteinbanden sichtbar und die Gleichmäßigkeit der Proteinbeladung auf der Membran kontrolliert.

### **2.6.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen**

Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Bradford (1976) mit Hilfe eines „BioRad Protein Assay Dye Reagent“ (BioRad, München) bestimmt. Als Standard wurde eine Eichkurve mit Rinderserumalbumin hergestellt. Die photometrische Bestimmung der Proben erfolgte 20 min nach Zugabe des Bradfordreagens in einem ELISA-Reader Modell 550 (BioRad, München) bei einer Wellenlänge von 595 nm.

## **2.7 Bestimmung von cyclo-Adenosinmonophosphat (cAMP-Assay)**

Zur Bestimmung der intrazellulären cAMP-Konzentration wurden die Zellen bis zur Konfluenz in 24-Loch Platten kultiviert. Die Zellen wurden zweimal mit 1 x HBSS-Puffer gewaschen und für 10 min bei 37 °C mit 200 µl 1 mM IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin, Sigma-Aldrich, Deisenhofen; Phosphodiesterase-Hemmstoff) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 100 nM Iloprost (Schering, Berlin), 1 µM Isoprenalin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) oder 3 bzw. 10 µM Forskolin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) für 10 min bei 37 °C stimuliert. Am Ende der Inkubationszeit wurde der Überstand von den Zellen abgesaugt und die Reaktion durch Zugabe von 200 µl eiskaltem Ethanol (96 %) abgestoppt. Dieser wurde bei 37 °C verdampft und anschließend 300 µl RIA-Puffer pro Loch zugegeben. Die Platte wurde über Nacht bei –80 °C eingefroren und der Überstand nach dem Auftauen zentrifugiert. Der Gehalt an zyklischen Nukleotiden im Überstand wurde mittels Radioimmunoassay (RIA) bestimmt (Steiner et al., 1972; Schröder et al., 1993). Zur Proteinbestimmung wurden die Zellen mit 200 µl 100 mM NaOH bei 37 °C in einem Inkubator für 30 min geschüttelt und der Proteingehalt der Zellsuspension mittels der Bradford-Methode bestimmt.



### 2.7.1 Desensibilisierungsversuche

Zur Desensibilisierung des Prostacyclin-Rezeptors wurden die Zellen in 24-Loch Platten kultiviert und für die angegebenen Zeiten mit Iloprost bzw. Cicaprost (jeweils 100 nM) vorinkubiert. Im Falle von  $\beta_2$ AR erfolgte die Vorinkubation mit Isoprenalin (1  $\mu$ M). Alle anderen untersuchten Substanzen wurden wie in den jeweiligen Experimenten beschrieben eingesetzt. Bei zusätzlicher Vorinkubation mit Iloprost bzw. Cicaprost wurden die Substanzen 15 min vor den Agonisten zu den Zellen gegeben. Nach jeder Inkubationsperiode wurde die cAMP-Bildung bestimmt.

Tabelle der Substanzen, die im cAMP-Assay eingesetzt wurden:

Substanz	Wirkung	Hersteller
<b>Iloprost</b> <b>Cicaprost</b>	Rezeptor-Agonisten von hIP-R	Schering, Berlin
<b>Isoprenalin</b>	Rezeptor-Agonist von $\beta_2$ AR	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
<b>Forskolin</b>	Aktivator der Adenylatzyklase	
<b>Phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA)</b>	PKC-Aktivator	
<b>4a-PMA</b>	inaktive Form des PKC-Aktivators	Alexis, Grünberg
<b>GF-109203X</b>	PKC-Inhibitor	
<b>myr-PKI</b>	PKA-Inhibitor	Biomol, Hamburg

### 2.7.2 Resensibilisierungsversuche

Für die Resensibilisierungsversuche wurden die Zellen in 24-Loch Platten kultiviert und über 2 h, 6 h bzw. 16 h desensibilisiert. Nach dreimaligem Waschen mit FCS-freiem Medium wurden sie über 6 h oder 24 h in Agonisten-freiem Nährmedium regeneriert. Am Ende jeder Regenerationsphase wurde ein cAMP-Assay durchgeführt. Substanzen, deren Einfluß auf die Resensibilisierung von hIP-R untersucht wurden, waren während der gesamten Regenerationszeit anwesend: Cycloheximid (Inhibitor der Proteinsynthese, 20  $\mu$ g/ml; Sigma-Aldrich, Deisenhofen), Iloprost (100 nM).

## 2.8 Konfokale Lasermikroskopie

Die Aufnahmen mit dem konfokalen Lasermikroskop (Leica DM IRB / E (invers), DM TCS SP (konfokal)) wurden im Institut für Biochemie I der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln (Joseph-Stelzmann-Str. 53, 50931 Köln) durchgeführt. Es wurden Objektive mit der numerischen Apertur 40 x 1.3 oder 63 x 1.4 (Öl-Immersionlinsen) verwendet.

CHO-Zellen oder Fibroblasten wurden auf Glassplättchen (Ø 12 mm) 30-50 % konfluent angezogen und transient mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert.

### 2.8.1 Internalisierung des Prostacyclin-Rezeptors

Zellen, die das Plasmid pc3hIP-GFP exprimieren, wurden 0 h, 8 h, 12 h und 20 h mit 100 nM Iloprost stimuliert und zu den jeweiligen Zeitpunkten im konfokalen Lasermikroskop untersucht.

### 2.8.2 Arrestin-Rezeptor-Wechselwirkungen

Zur Untersuchung der Arrestin-Rezeptor-Wechselwirkung wurden die Zellen mit den Plasmiden pc3hIP und  $\beta$ -Arrestin2-GFP transfiziert, bzw. mit  $\beta_2$ AR und  $\beta$ -Arrestin2-GFP. Die Zellen, die den Prostacyclin-Rezeptor und Arrestin exprimieren, wurden für 0 h bis 3 h mit 100 nM Iloprost stimuliert. Zellen, die den  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor und Arrestin exprimierten wurden für 0 min und 10 min mit 1  $\mu$ M Isoprenalin stimuliert.

## 2.9 Statistik

Bei allen aufgeführten Einzelergebnissen wurden generell drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt, bei mehr als drei Versuchen ist dies im Ergebnisteil bei der jeweiligen Abbildung vermerkt. Bei Western Blots und RT-PCRs wurde jeweils eine repräsentative Abbildung von drei separaten Versuchen mit ähnlichem Ergebnis dargestellt.

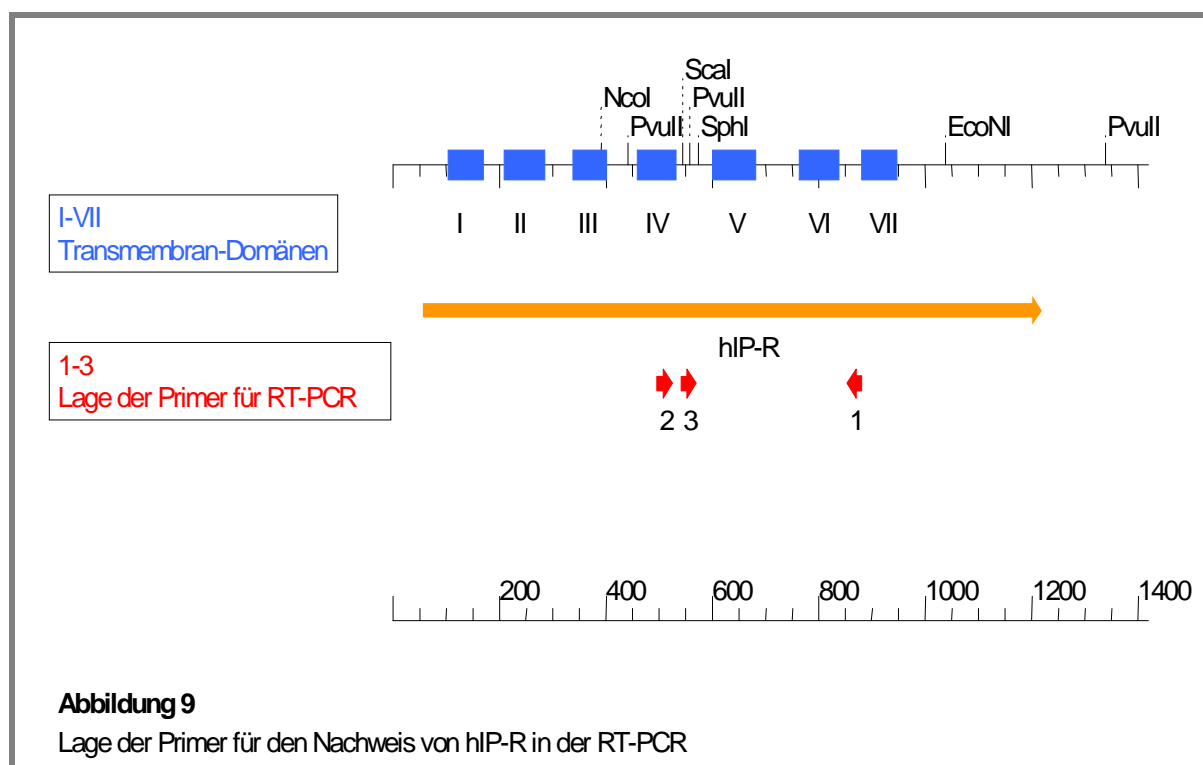
Die Messdaten wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) der jeweiligen Anzahl (n) von Einzelexperimenten angegeben. Das Signifikanzniveau p für  $\alpha$  wurde mit 0.05 festgelegt. Signifikanzunterschiede wurden mit dem Bonferroni-Test überprüft. Die statistische Berechnung erfolgte mit dem Computerprogramm GraphPad InStat, Version 3.01 für Windows 95 der Firma GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Expression und Desensibilisierungskinetik von hIP-R in verschiedenen Zellsystemen

Verschiedene Zellsysteme wurden zur Analyse der Desensibilisierung des IP-Rezeptors herangezogen. Ein Transfektionssystem (CHO-Zellen) und zwei natürlich hIP-R exprimierende Zellsysteme (humane Hautfibroblasten, Zelllinien NF29 und CRL1635) wurden vergleichend untersucht. Nach Abschluss dieser Arbeiten ergab sich die Möglichkeit in Zusammenarbeit mit der Thoraxchirurgie der Universität Gießen, das Desensibilisierungsverhalten des IP-Rezeptor im humanen pulmonalen Gewebe zu untersuchen. Für die Experimente wurden Primärkulturen aus humanen Fibroblasten der pulmonalen Adventitia (hpAdv) und humanen glatten Gefäßmuskelzellen der Lungenarterie (hpSMC) verwendet.

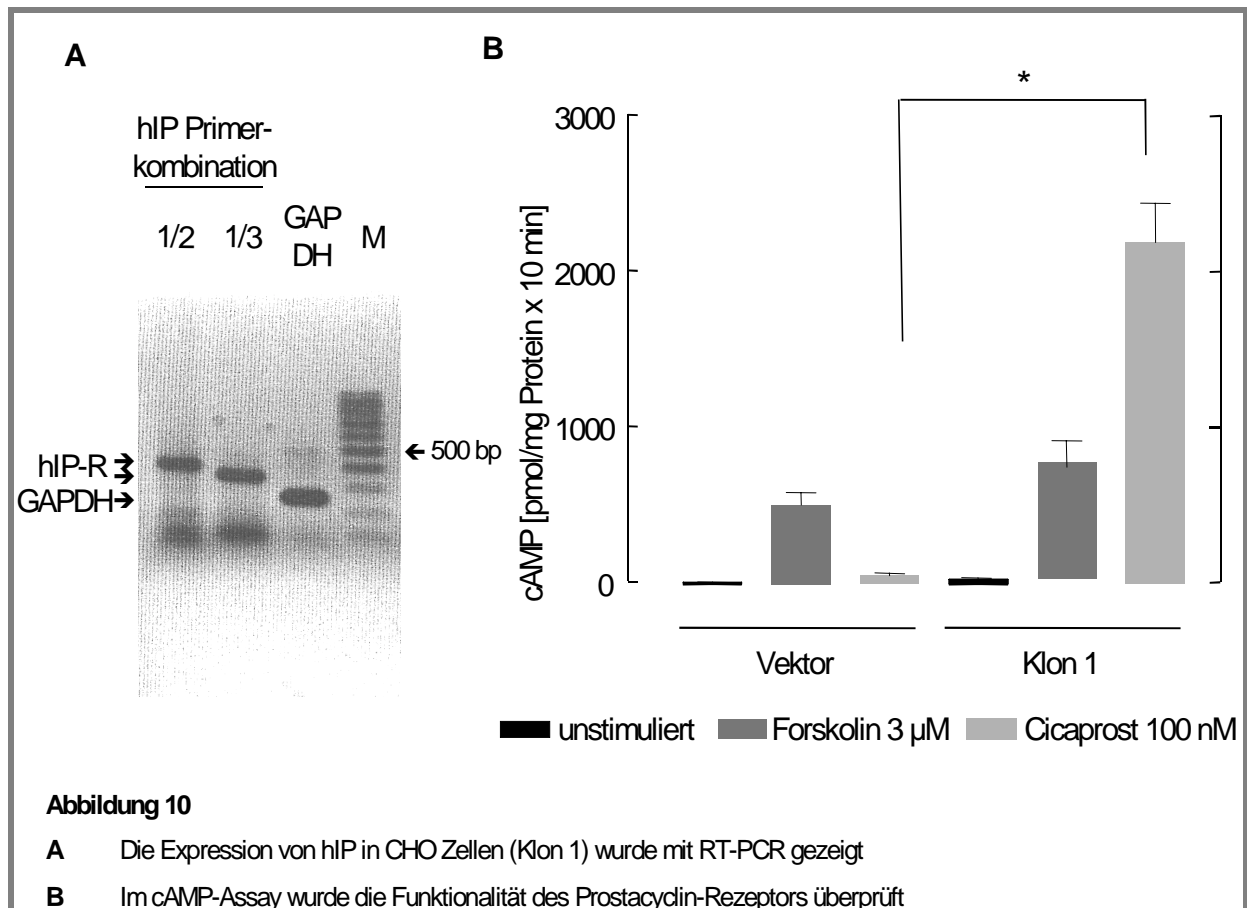
In sämtlichen Zellsystemen wurde zunächst die Expression des Prostacyclin-Rezeptors durch RT-PCR überprüft. Für den IP-Rezeptor wurde dabei je nach Primerwahl ein 370 bp großes („Oligo 1“ und „Oligo 2“) oder ein 335 bp großes („Oligo 1“ und „Oligo 3“) Fragment amplifiziert (Abb. 9). Als interne Kontrolle wurde die Expression des konstitutiven Enzyms Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als 240 bp großes RT-PCR-Produkt verwendet.



Die Stimulation von hIP-R mit den PGI<sub>2</sub>-Mimetika Iloprost oder Cicaprost führt in allen verwendeten Zellsystemen durch die Rezeptor-Kopplung an ein stimulatorisches G-Protein (G<sub>s</sub>) zur Aktivierung der Adenylatzyklase und damit zu einer Erhöhung der cAMP-Konzentration in der Zelle. Dieser Anstieg wurde im cAMP-Assay bestimmt und so die Funktionalität des Rezeptors überprüft. Als interne Kontrolle für die Ansprechbarkeit des Adenylatzyklase-Systems wird das Diterpen Forskolin eingesetzt. Es aktiviert die Adenylatzyklase direkt und erhöht so den cAMP-Spiegel in der Zelle. Das Desensibilisierungsverhalten von hIP-R wurde in den verschiedenen Zellsystemen durch Bestimmung der Iloprost- bzw. Cicaprost-vermittelten cAMP-Bildung nach unterschiedlichen Vorinkubationszeiten des Rezeptors mit seinen Agonisten untersucht. Dazu wurden die Zellen über 0 h bis 9 h bzw. 24 h mit Cicaprost oder Iloprost (jeweils 100 nM) vorbehandelt. Nach Abwaschen des Agonisten wurden die Zellen dann erneut mit Iloprost stimuliert und über 10 min die IP-R-vermittelte cAMP-Bildung gemessen. Die cAMP-Entstehung in den nicht vorinkubierten Zellen (0 h Vorinkubation = Kontrolle (Kon)) wurde dabei als maximale (= 100 %) der Rezeptor-vermittelten möglichen cAMP-Bildung betrachtet. Die cAMP-Bildung in den Agonisten-vorbehandelten Zellen wurde zu diesem Kontrollwert in Relation gesetzt.

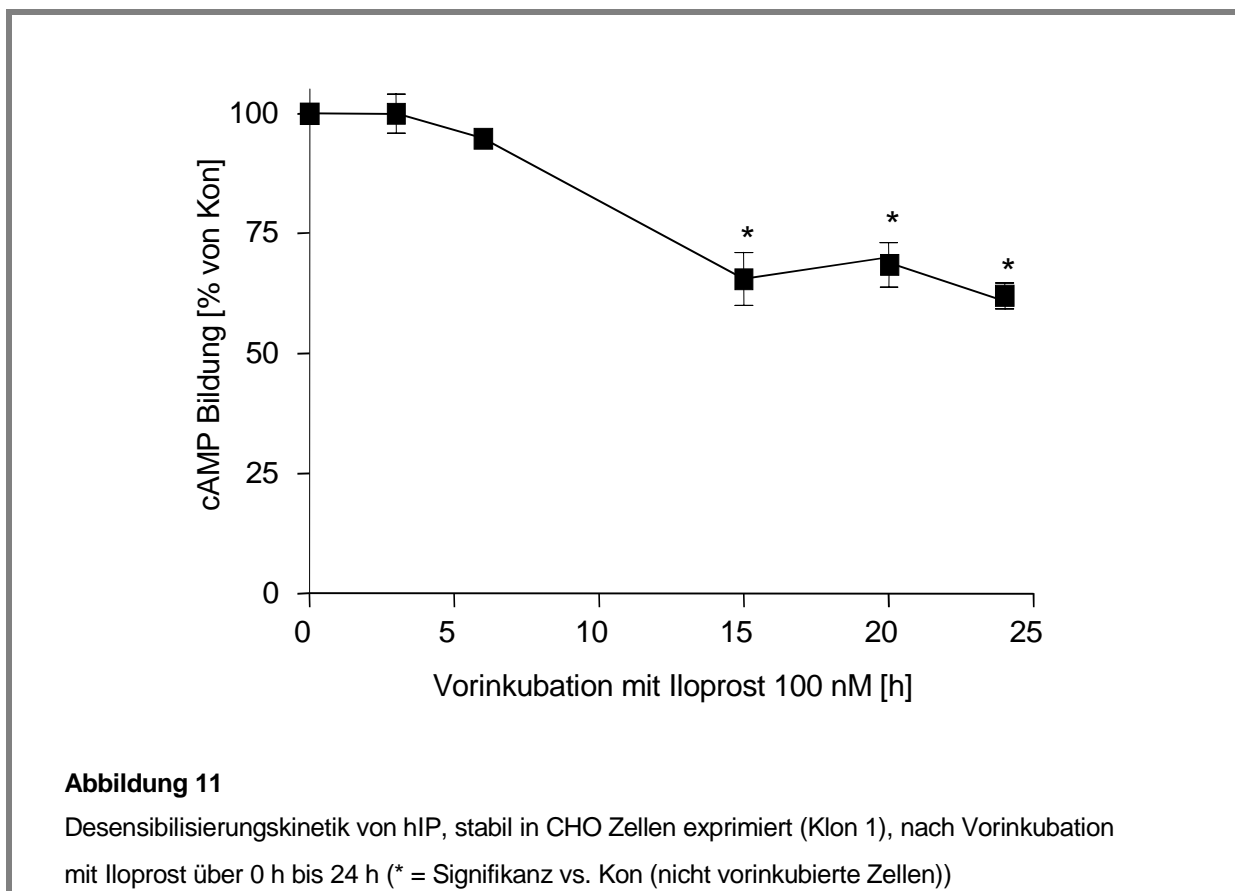
### 3.1.1 Expression und Desensibilisierung von hIP-R in stabil transfizierten CHO-Zellen

Das humane Gen des Prostacyclin-Rezeptors wurde durch Transfektion der Zellen mit dem Plasmid pc3hIP stabil in CHO-Zellen exprimiert. In mehreren Klonen, die G418-Resistenz aufwiesen, wurden die Rezeptorexpression mittels RT-PCR bestätigt (Abb. 10 A) und im cAMP-Assay die Funktionalität des Rezeptors überprüft (Abb. 10 B). Für alle weiteren Analysen wurde ein repräsentativer Klon (Klon 1) ausgewählt.



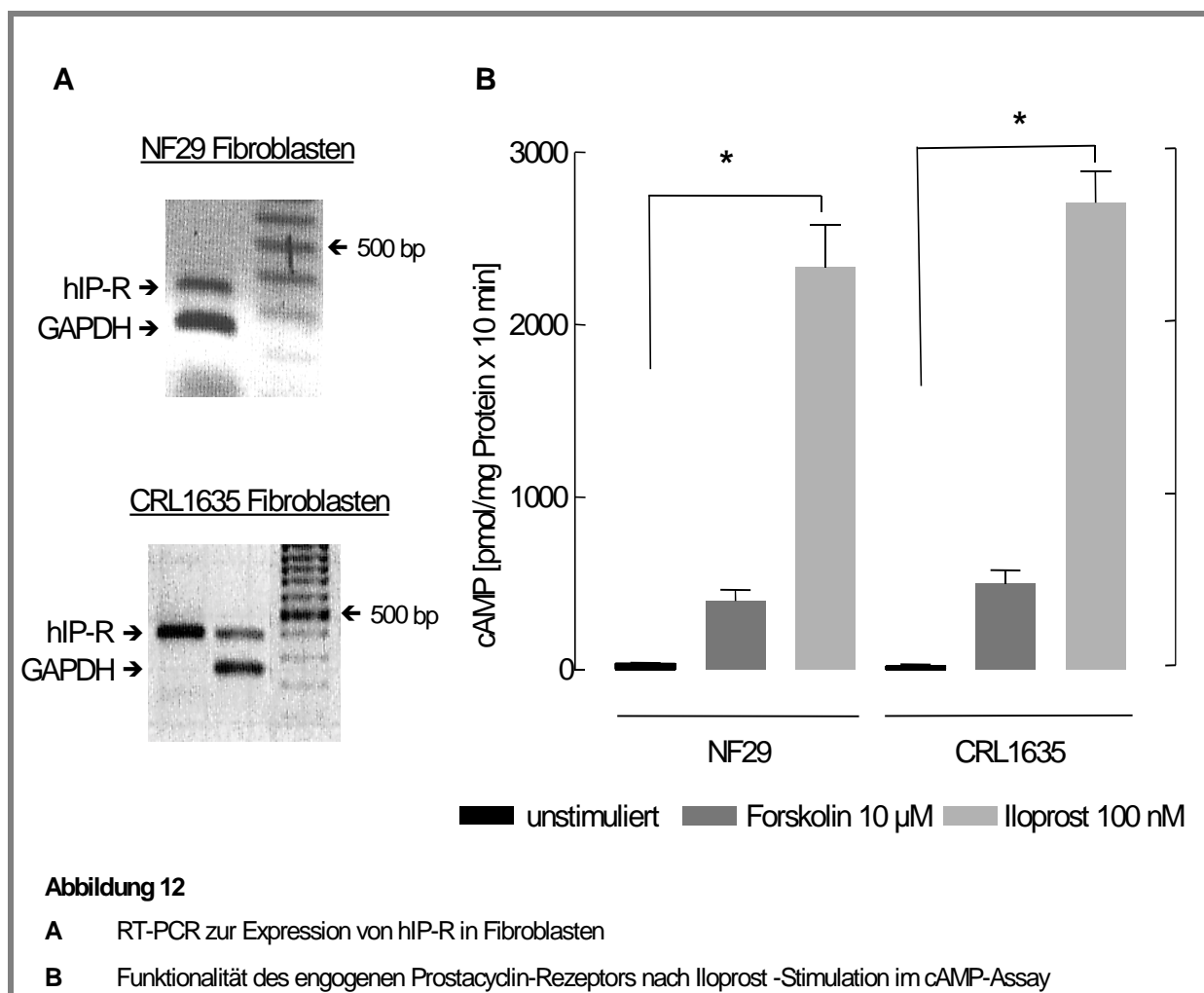
Zur Erfassung der Desensibilisierung von hIP-R in den transfizierten CHO-Zellen wurden diese 0 h bis 24 h mit Iloprost (100 nM) vorinkubiert und dann erneut mit Iloprost (100 nM) stimuliert. Verglichen mit den nicht-vorinkubierten Kontroll-Zellen (Cicaprost-vermittelte cAMP-Bildung: 100 % = Kon) ist nach einer Vorinkubation von 6 h die cAMP-Bildung auf

95 % reduziert, nach 24 h auf 62 %. Das bedeutet, dass die Rezeptor-vermittelte cAMP-Bildung nach 24-stündiger Vorinkubation um 38 % reduziert ist (Abb. 11). Diese Daten belegen eine langsame Desensibilisierung des IP-Rezeptors im CHO-Zellsystem. Ein vergleichbarer langsamer Desensibilisierungsverlauf wurde auch in einem stabil hIP-R exprimierenden COS1-Zellsystem beobachtet (A. Hasse, persönliche Mitteilung).

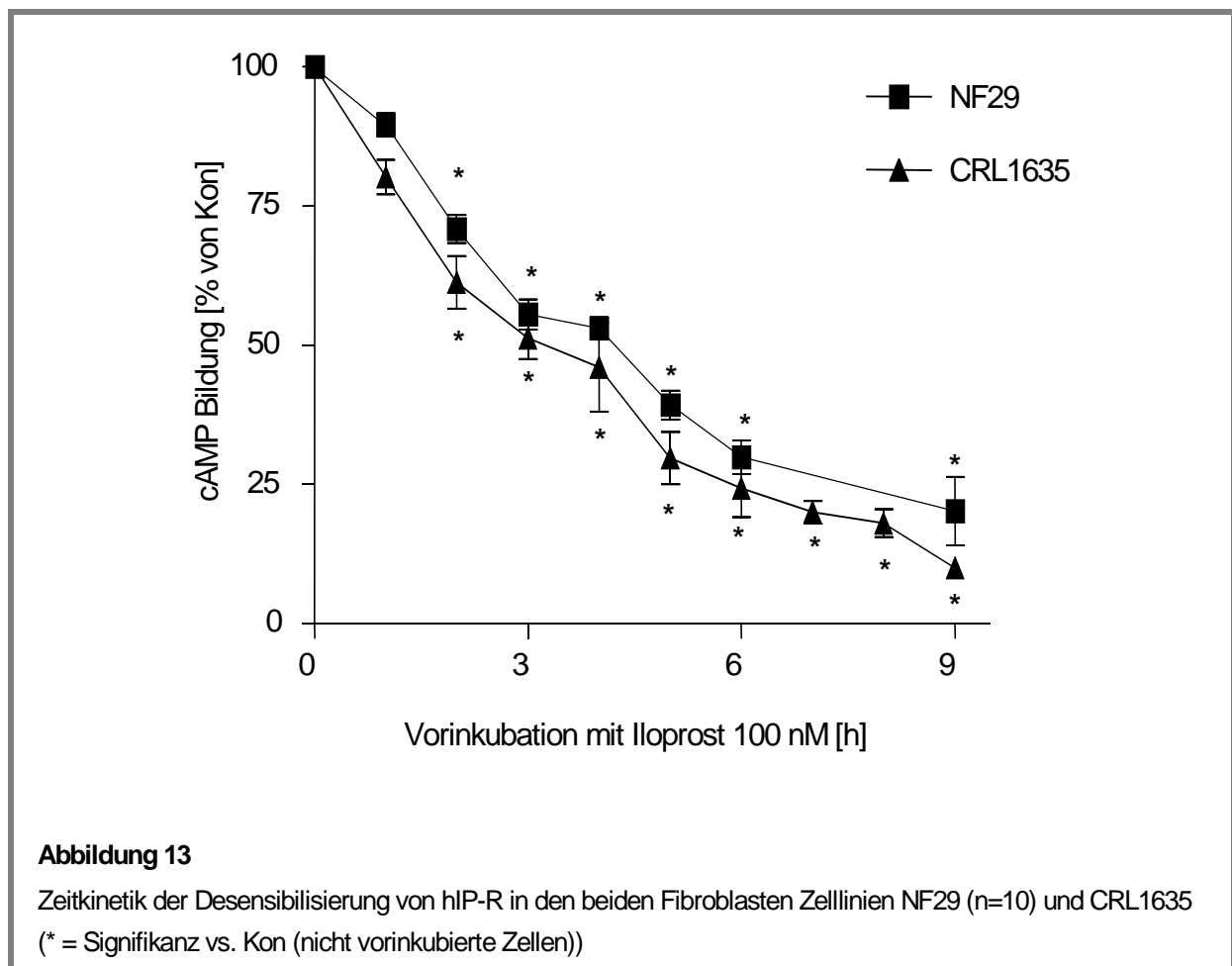


### 3.1.2 Expression und Desensibilisierung von hIP-R auf humanen Hautfibroblasten

Zur Untersuchung des Desensibilisierungsverhaltens des Rezeptors in einem natürlichen Zellsystem wurden humane Hautfibroblasten der Zelllinien NF29 und CRL1635 verwendet. In einem natürlichen Zellsystem ist von Vorteil, dass die an der Desensibilisierung beteiligten Komponenten nicht nur endogen exprimiert werden, sondern auch in dem benötigten stöchiometrischen Verhältnis zueinander stehen. Mittels RT-PCR wurde die endogene Expression von hIP-R gezeigt („Oligo 1“ und „Oligo 2“; Abb. 12 A), die Rezeptorkopplung wurde durch Agonisten-medierte cAMP-Bildung nachgewiesen (Abb. 12 B).



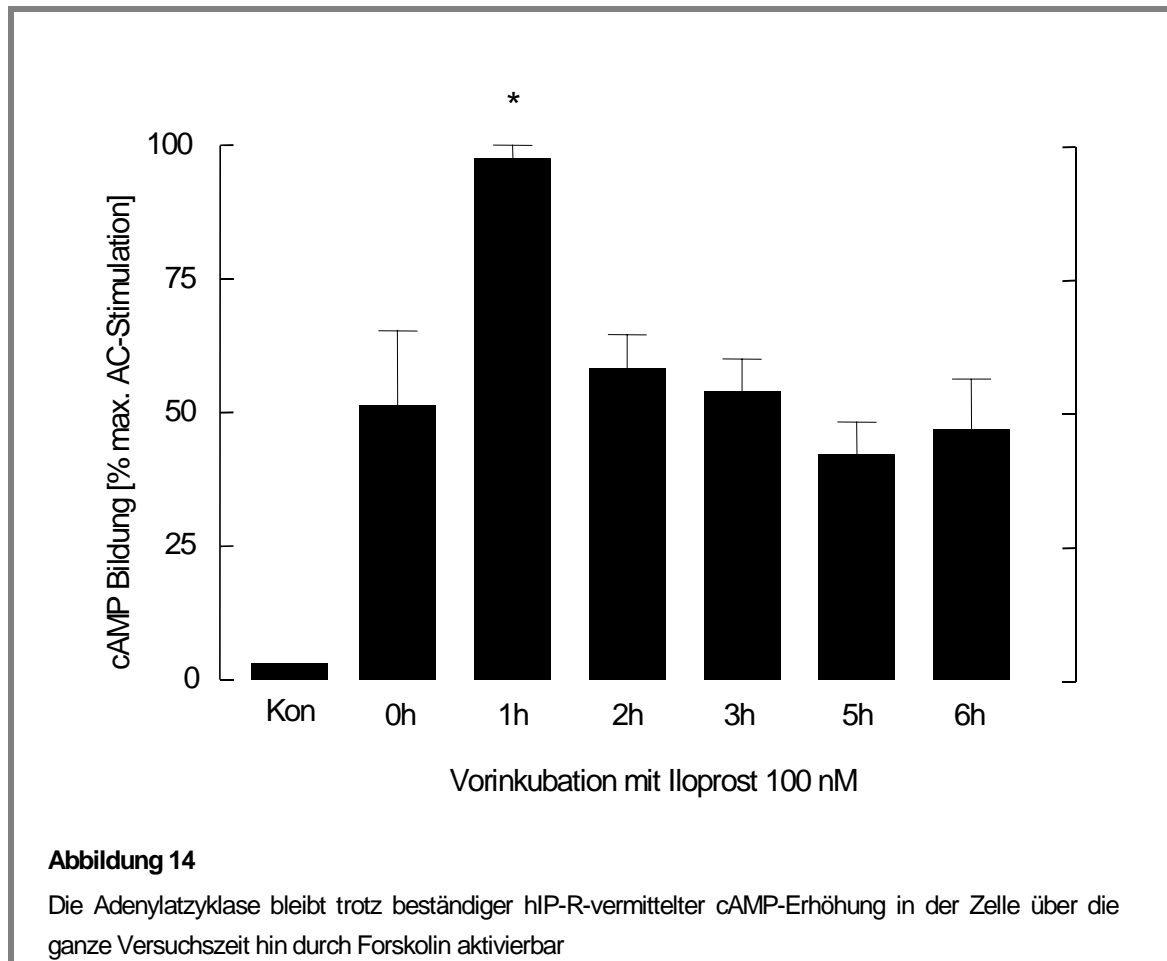
In den humanen Fibroblasten-Zelllinien NF29 und CRL1635 zeigt die Vorinkubation der Zellen mit Iloprost viel deutlichere Effekte auf das Desensibilisierungsverhalten von hIP-R als in dem Rezeptor-exprimierenden CHO-Zellsystem. Die Desensibilisierung des Rezeptors unterliegt einer sehr viel schnelleren Zeitkinetik. In NF29 Fibroblasten ist im Vergleich zur Kontrolle nach einer Vorinkubationszeit mit dem Agonisten von 3 h nur noch eine 55 %ige, nach 9 h eine 20 %ige Rezeptor-mediierte cAMP-Bildung zu beobachten. Ähnliche Werte ergeben sich für CRL1635 Fibroblasten: nach einer 3-stündigen Vorinkubation ist die cAMP-Bildung auf 51 % vermindert, nach 9-stündiger Vorinkubation auf 10 % (Abb. 13).





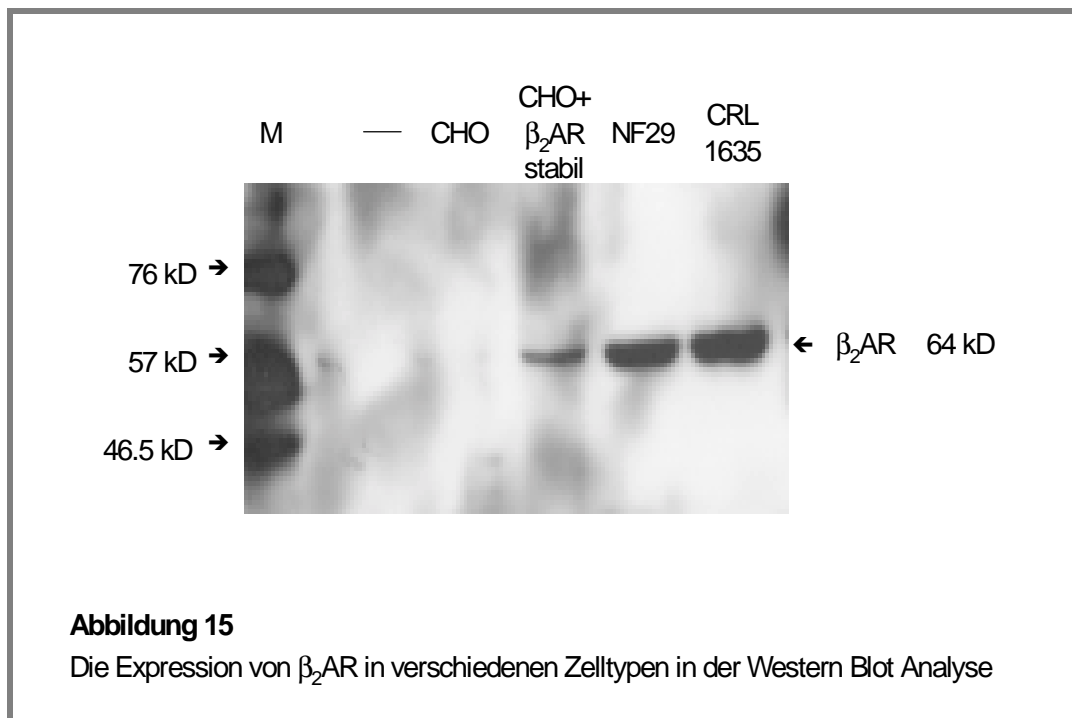
### 3.1.3 Beeinflussung der Adenylatzyklase durch cAMP-erhöhende Substanzen

Die  $G_s$ -Kopplung von hIP-R in den hier verwendeten Zellen bewirkt durch die Vorinkubation des Rezeptors mit seinem Agonisten, dass der cAMP-Spiegel der Zelle beständig erhöht wird. Um sicherzustellen, dass die Desensibilisierung von hIP-R auf Rezeptorebene verläuft und nicht auf einer Desensibilisierung des Adenylatzyklase-Systems durch die beständig hohe cAMP-Konzentration beruht, wurde der Einfluss von Iloprost auf die Forskolin-vermittelte cAMP-Bildung untersucht. Dazu wurden Fibroblasten mit Iloprost (100 nM) 0 h bis 6 h vorbehandelt und anschließend im cAMP-Assay mit Forskolin (10  $\mu$ M), dem direkten Aktivator der Adenylatzyklase, erneut stimuliert (Abb. 14). Zur Kontrolle (Kon) wurde die cAMP-Bildung in unstimulierten Zellen gemessen. Es ist zu beobachten, dass das Adenylatzyklase-System nicht durch einen Rezeptor-vermittelten erhöhten cAMP-Spiegel in der Zelle seine Aktivierbarkeit verliert. Nach einer Vorinkubationszeit von 1 h mit Iloprost ist allerdings ein signifikanter Anstieg der Forskolin-vermittelten cAMP-Bildung von 51 % bei nicht-vorbehandelten Zellen auf 97 % (Maximalwert) zu bemerken. Dieser Anstieg der cAMP-Bildung kann Folge einer Sensitivierung der Adenylatzyklase sein, da eine gleichzeitige Bindung von Forskolin und  $G_s$ -Protein stattfindet (Alousi et al., 1991). Danach (2 h bis 6 h) erreicht die cAMP-Konzentration aber wieder nahezu das cAMP-Ausgangsniveau, möglicherweise durch die beginnende Desensibilisierung des Rezeptors. Insgesamt betrachtet, findet die Desensibilisierung von hIP-R auf Rezeptorebene statt und ist nicht auf eine Desensibilisierung des Adenylatzyklase-Systems zurückzuführen.

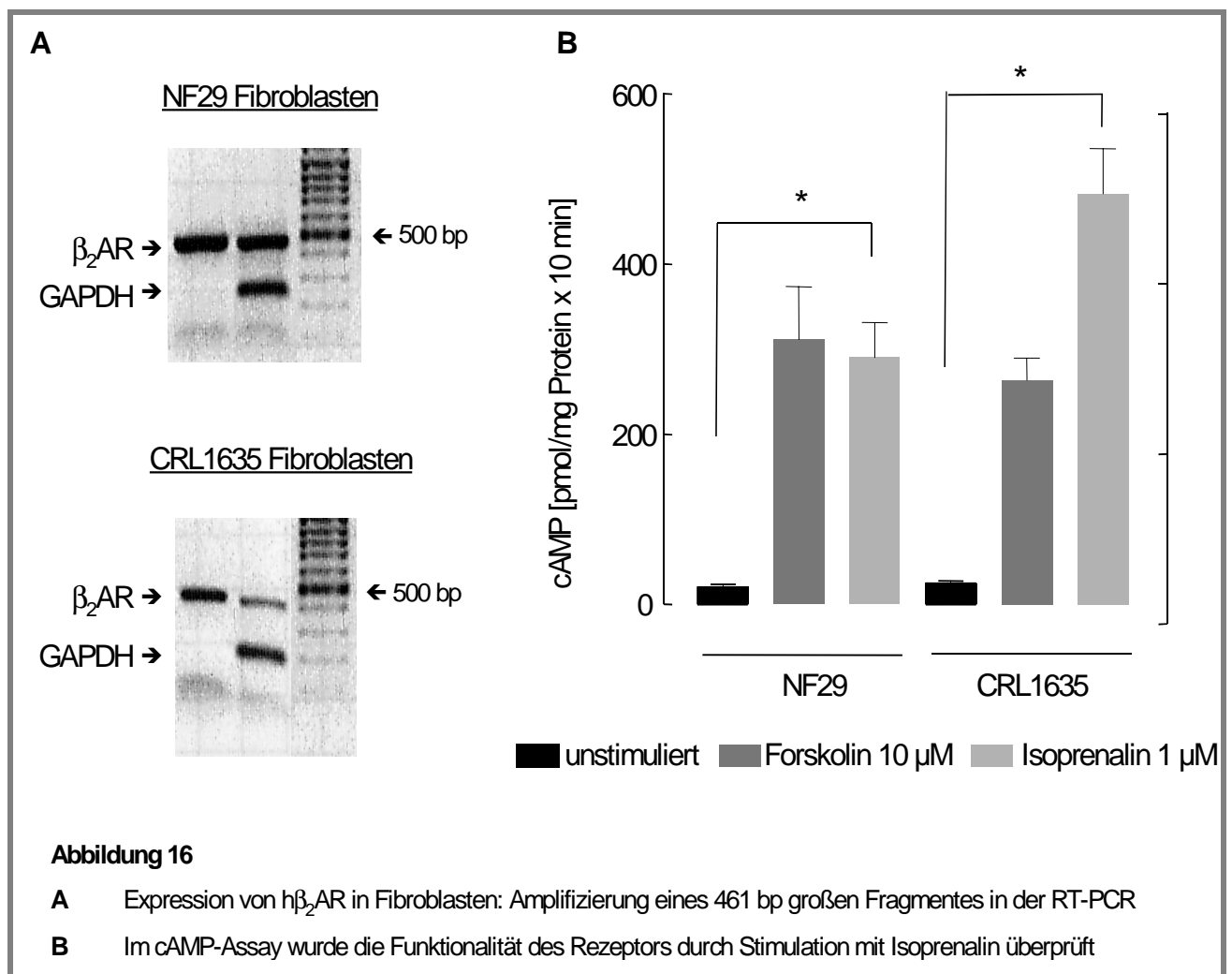


### 3.2 Expression und Desensibilisierung des humanen $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors ( $h\beta_2AR$ )

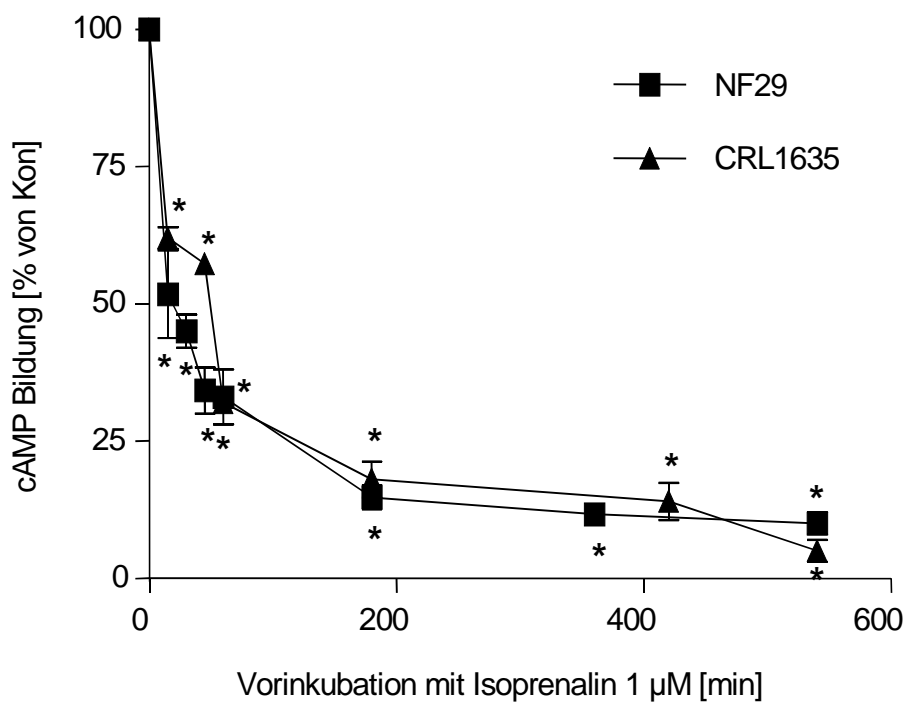
Die Mechanismen der Desensibilisierung des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors sind gut untersucht. In der vorliegenden Arbeit diente  $\beta_2AR$  als Modellsystem, um die Beteiligung verschiedener Proteine, wie z.B.  $\beta$ -Arrestin2, an der Rezeptor-Internalisierung zu untersuchen. Eine Western Blot-Analyse verschiedener Zelllinien zeigte, dass der  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor auf den Fibroblasten-Zelllinien NF29 und CRL1635 endogen exprimiert wird, nicht aber im CHO-Zellsystem. Dort kann die Expression nach stabiler Transfektion des Zellsystems mit dem Vektor pc $\beta$ adRez nachgewiesen werden (Abb. 15).



Wie bei hIP-R konnte die Expression von  $\beta_2$ AR auf den verwendeten Fibroblasten auch mittels RT-PCR durch die Amplifikation eines 461 bp großen Fragmentes gezeigt werden (Abb. 16 A). Der  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor ist wie hIP-R an ein stimulatorisches  $G_s$ -Protein gekoppelt. Seine Stimulation führt auch zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase und damit zu einer Erhöhung der cAMP-Konzentration in der Zelle. Als Agonist des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors wurde Isoprenalin ( $1 \mu\text{M}$ ) eingesetzt und die Rezeptor-Funktionalität im cAMP-Assay nachgewiesen (Abb. 16 B).



Zum Vergleich der Regulationsmechanismen von hIP-R und h $\beta_2$ AR wurde auch die Desensibilisierung des endogenen  $\beta_2$ AR auf den Fibroblasten untersucht (Abb. 17).  $\beta_2$ AR durchläuft dabei eine sehr viel schnellere Desensibilisierungskinetik als hIP-R. Schon nach 15 min ist die Rezeptor-vermittelte cAMP um 48 % (NF29) bzw. 38 % (CRL1635) vermindert. Nach einer 4-stündigen Vorbehandlung ist praktisch keine durch  $\beta_2$ AR-vermittelte cAMP-Bildung mehr zu messen. Die abweichenden Kinetik-Verläufe von hIP-R und h $\beta_2$ AR deuten auf unterschiedliche Mechanismen in der Rezeptoren-Regulation hin.

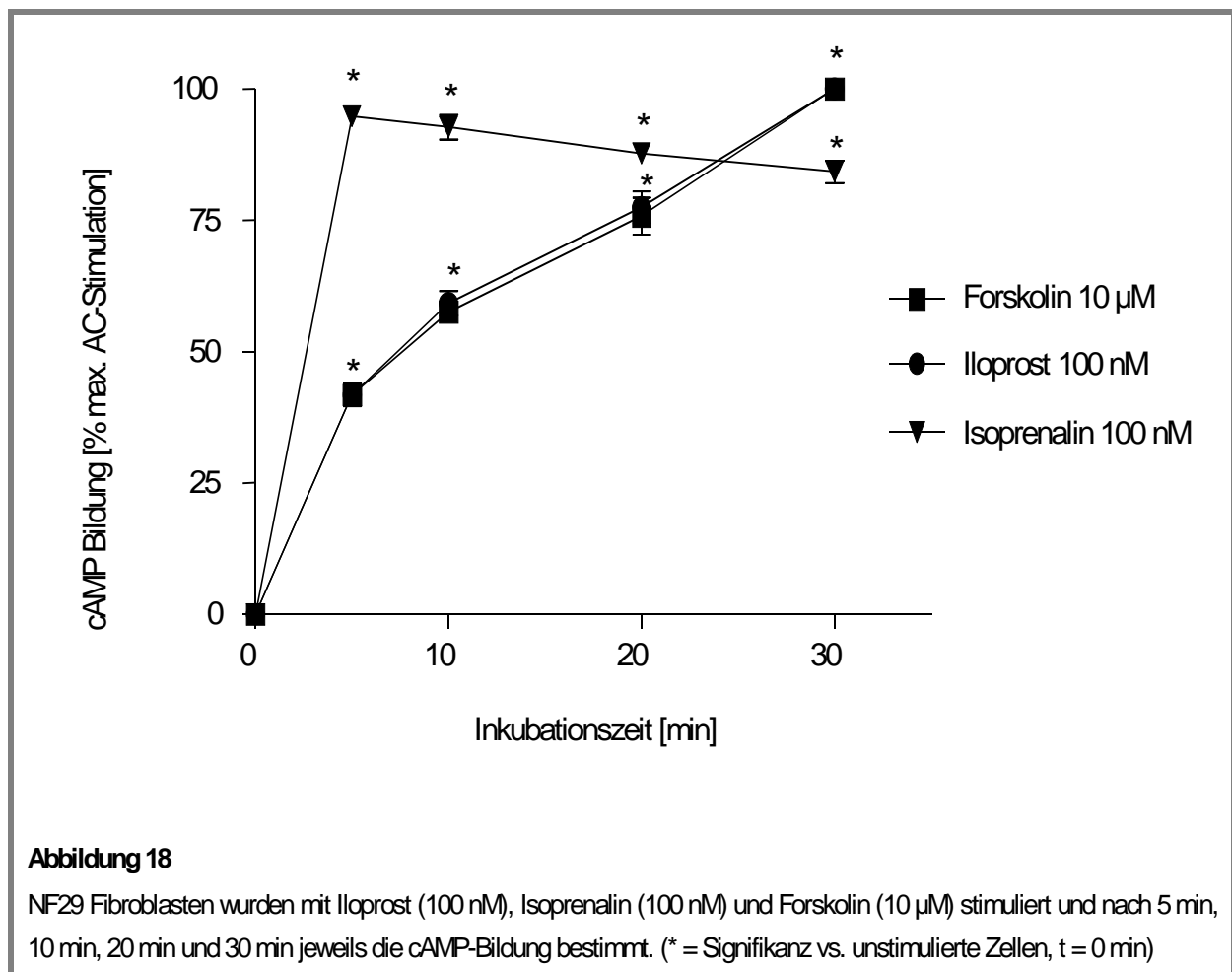


**Abbildung 17**

Zeitkinetik der Desensibilisierung von  $\beta_2$ AR in den beiden Fibroblasten Zelllinien NF29 (n=4) und CRL1635 (\* = Signifikanz vs. Kon (nicht vorinkubierte Zellen))

### 3.3 Vergleich der Rezeptor-medierten Adenylatzyklaseaktivierung

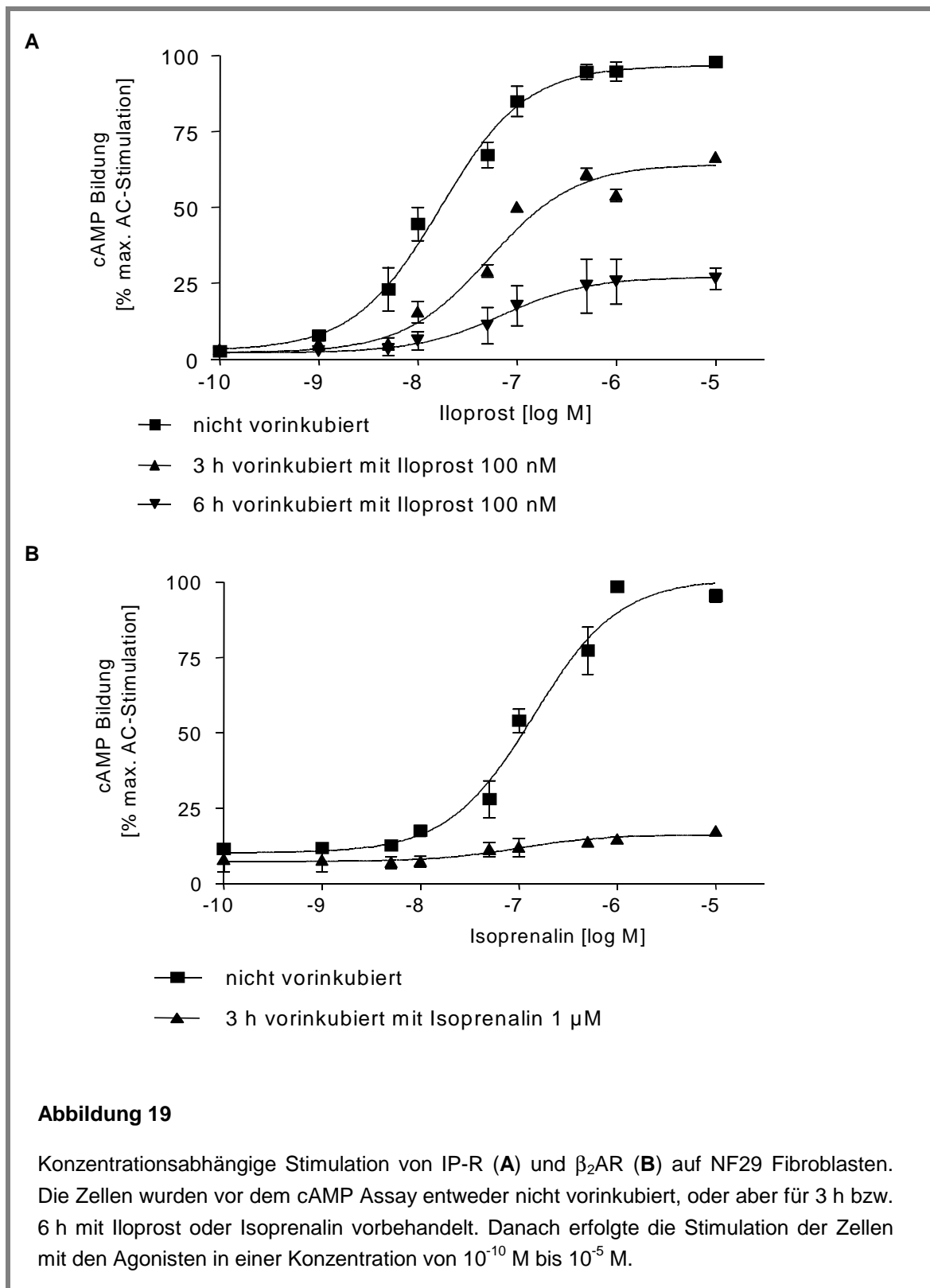
Um das unterschiedliche Desensibilisierungsverhalten von hIP-R und h $\beta_2$ AR näher zu untersuchen, wurde in Fibroblasten die Rezeptor-medierte cAMP-Bildung über 30 min kontinuierlich gemessen (Abb. 18). Als Kontrolle wurde die Adenylatzyklase unabhängig von den Rezeptoren direkt mit Forskolin stimuliert. Auch hier sind deutliche Unterschiede im Verhalten der Rezeptoren zu erkennen: während die IP-R- und Forskolin-medierte cAMP-Bildungen annähernd linear verlaufen, erreicht die  $\beta_2$ AR-medierte cAMP-Bildung nach 5 min ihr Maximum. Dies deutet darauf hin, dass schon nach 5 min keine durch Isoprenalin stimulierbaren  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren an der Zellmembran mehr vorhanden sind. Die Aussage aus den Desensibilisierungskinetiken finden sich somit auch hier wieder: die Desensibilisierung des IP-Rezeptor folgt einem langsamen Zeitverlauf, während  $\beta_2$ AR schnell desensibilisiert.



### 3.4 Konzentrationsabhängige Stimulation von IP-R und $\beta_2$ AR auf humanen Hautfibroblasten

Die Stimulation von IP-R und  $\beta_2$ AR erhöht durch die Rezeptor-Kopplung an  $G_s$  den intrazellulären cAMP-Spiegel. Dies geschieht abhängig von der Agonistenkonzentration. Im folgenden Versuch wurden die Rezeptoren mit ihrem jeweiligen Agonisten in Konzentrationen von  $10^{-10}$  M bis  $10^{-5}$  M stimuliert und für jede Konzentration die maximale Adenylatzyklase-Antwort durch Messung des gebildeten cAMP bestimmt (Abb. 19).

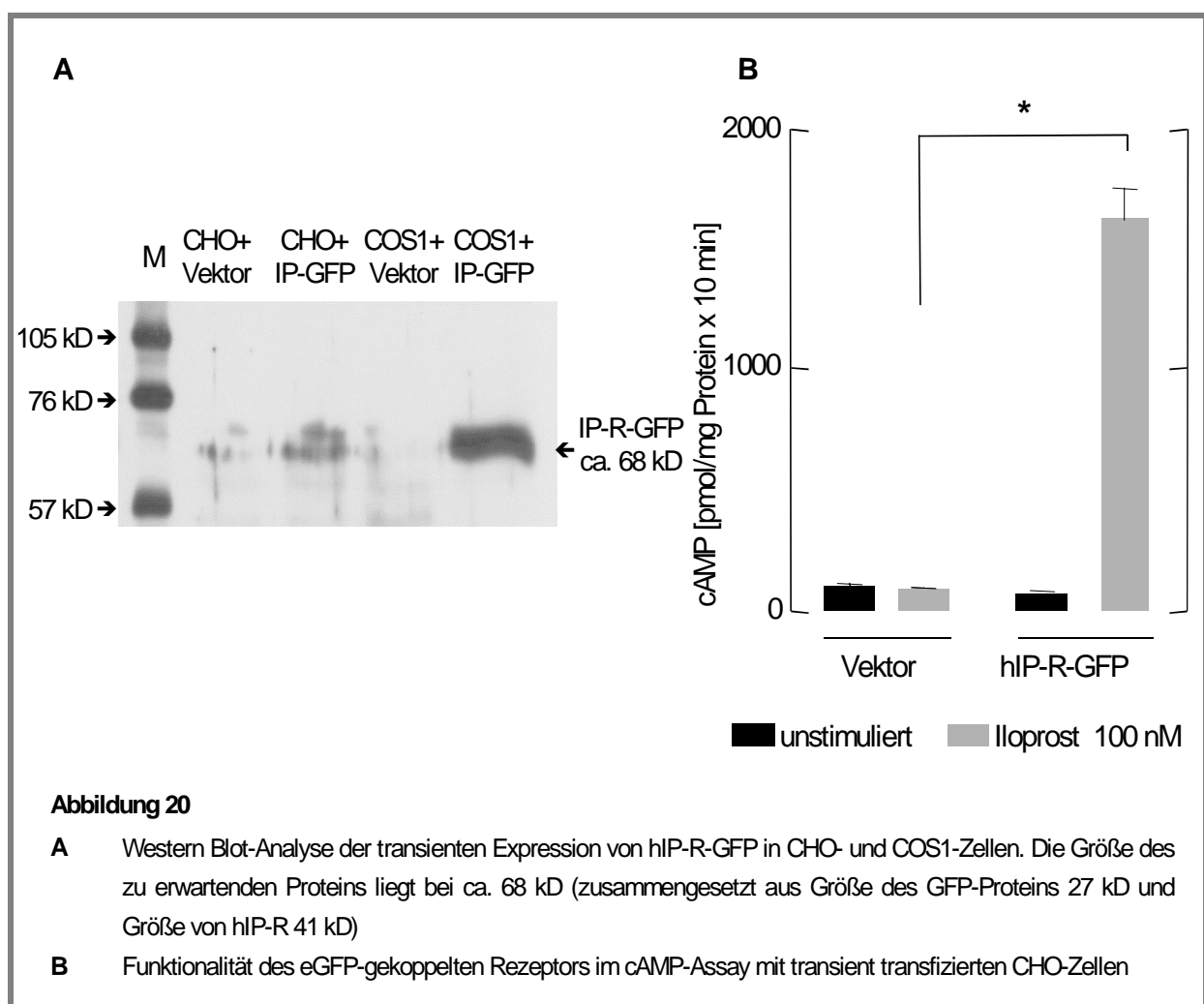
Durch Vorinkubation der Zellen mit dem jeweiligen Agonisten über 3 h und 6 h wird die Desensibilisierung von hIP-R (Abb. 19 A) und h $\beta_2$ AR (Abb. 19 B) sichtbar. Die erneute Aktivierbarkeit der Rezeptoren im cAMP-Assay ist im Vergleich zum nicht vorinkubierten Rezeptor reduziert. Im Falle von hIP-R ist die maximale Agonisten-vermittelte Rezeptorantwort von 98 % nach einer 3-stündigen Vorinkubation mit 100 nM Iloprost auf 66 % (Iloprost  $10^{-5}$  M) vermindert, nach einer 6-stündigen Vorinkubation auf 26 %. Das schnellere Desensibilisierungsverhalten von h $\beta_2$ AR zeigt sich auch in diesem Versuch: nach einer 3-stündigen Vorinkubation des Rezeptors mit 1  $\mu$ M Isoprenalin ist die maximale Rezeptorantwort von 95 % auf 17 % (Isoprenalin  $10^{-5}$  M) reduziert.



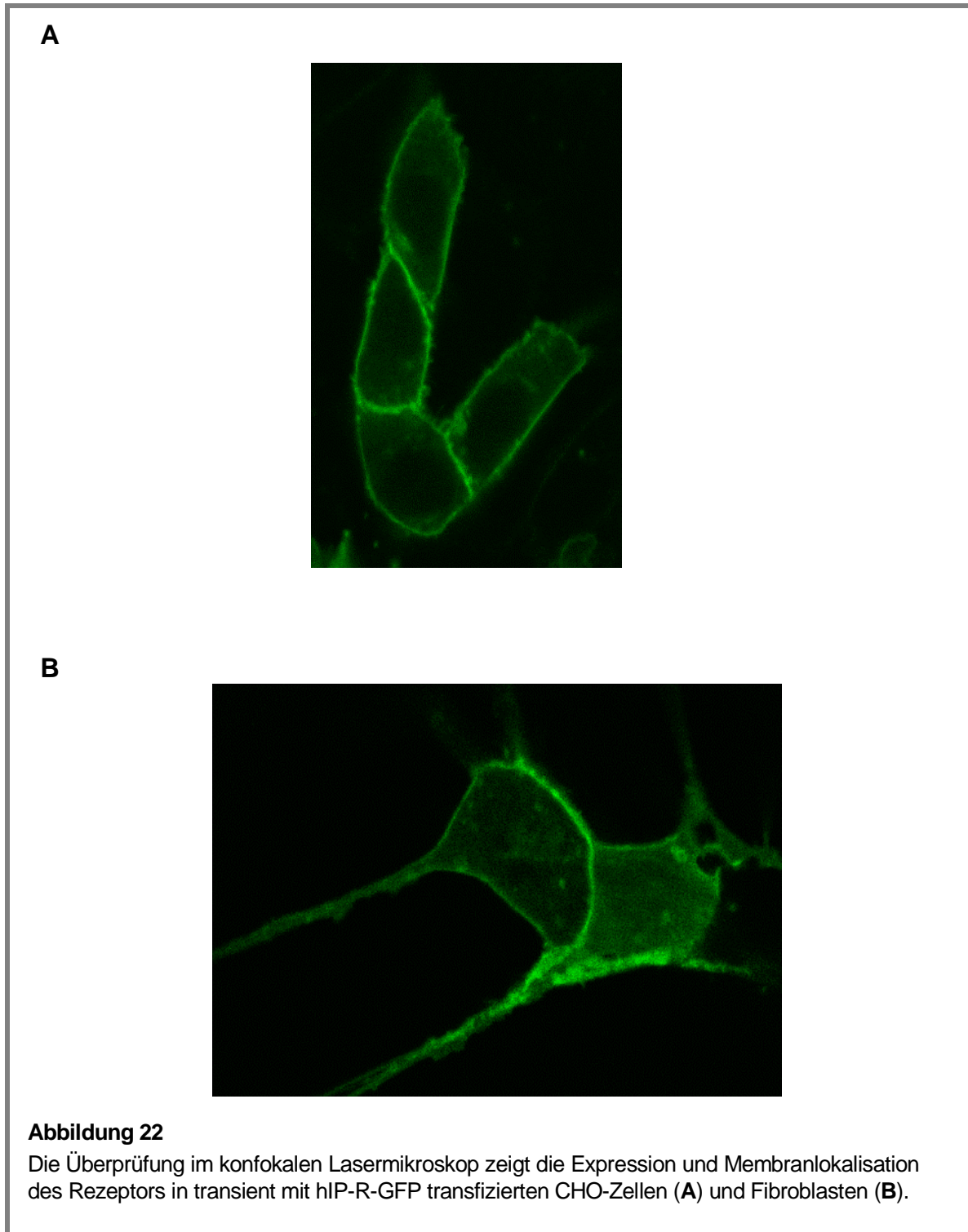


### 3.5 Nachweis der Internalisierung von hIP-R durch Kopplung an „enhanced Green Fluorescence Protein“ (eGFP)

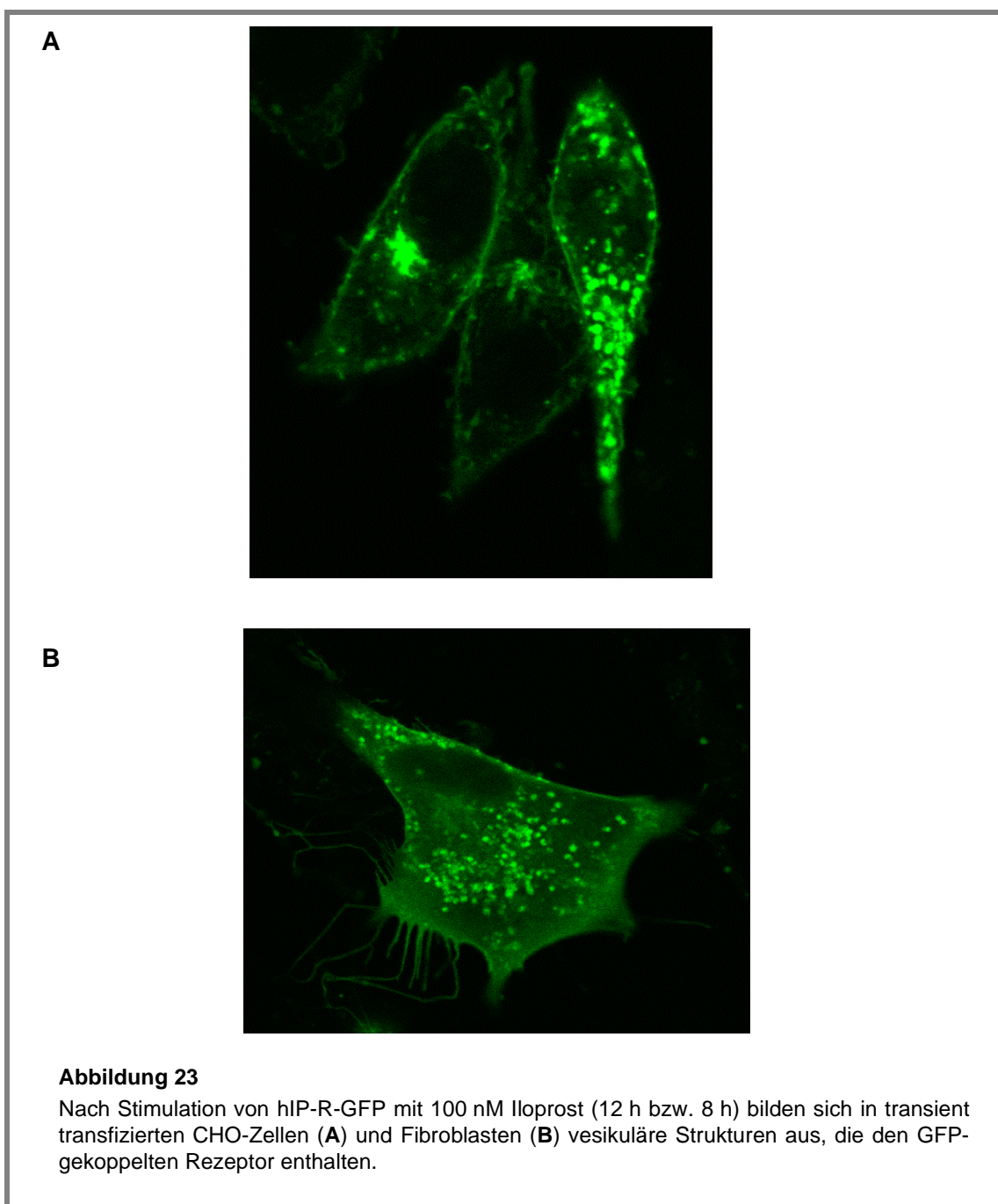
Viele GPCRs werden nach ihrer Stimulation in die Zelle internalisiert. Es sollte überprüft werden, ob auch bei hIP-R eine Agonisten-induzierte Translokation zu beobachten ist. Um den Weg des Rezeptors nach Agonisten-Stimulation zu verfolgen, wurde mit Hilfe der PCR C-terminal ein eGFP-Protein an hIP-R fusioniert (hIP-R-GFP). Nach Sequenzierung des Plasmids erfolgte die Transfektion transient in CHO-, COS1-Zellen und in CRL1635 Fibroblasten. Die Proteinexpression von hIP-R-GFP wurde im Western Blot in CHO- und COS1-Zellen überprüft. Der Nachweis des Rezeptors erfolgte indirekt mit Hilfe eines Antikörpers gegen das GFP-Protein (Abb. 20 A). Die funktionelle Aktivität des GFP-gekoppelten Rezeptors wurde im cAMP-Assay überprüft (Abb. 20 B).



Für die konfokale Lasermikroskopie wurden CHO-Zellen und CRL1635 Fibroblasten transient mit hIP-R-GFP transfiziert. Die Expression des Fusionsproteins und die Lokalisation des Rezeptors in der Plasmamembran wurden durch Mikroskopie bestätigt (Abb. 21)



Im nächsten Schritt sollte eine mögliche Internalisierung des Rezeptors nach seiner Stimulation nachgewiesen werden. Dazu wurden die transient hIP-R-GFP exprimierenden CHO-Zellen und Fibroblasten über 0 h bis 20 h mit 100 nM Iloprost stimuliert und die Lokalisation des Rezeptors im Mikroskop überprüft. Dabei konnte die Translokation des Rezeptors von der Membran in das Zytoplasma in vesikulären Strukturen beobachtet werden (Abb. 22). Die Vesikel traten bei in CHO-Zellen exprimiertem hIP-R-GFP nach einer 12- bis 20-stündigen Stimulation auf (Abb. 22 A), in Fibroblasten schon nach einer 6- bis 8-stündigen Stimulation (Abb. 22 B).



### 3.6 Untersuchungen zum Mechanismus der Desensibilisierung

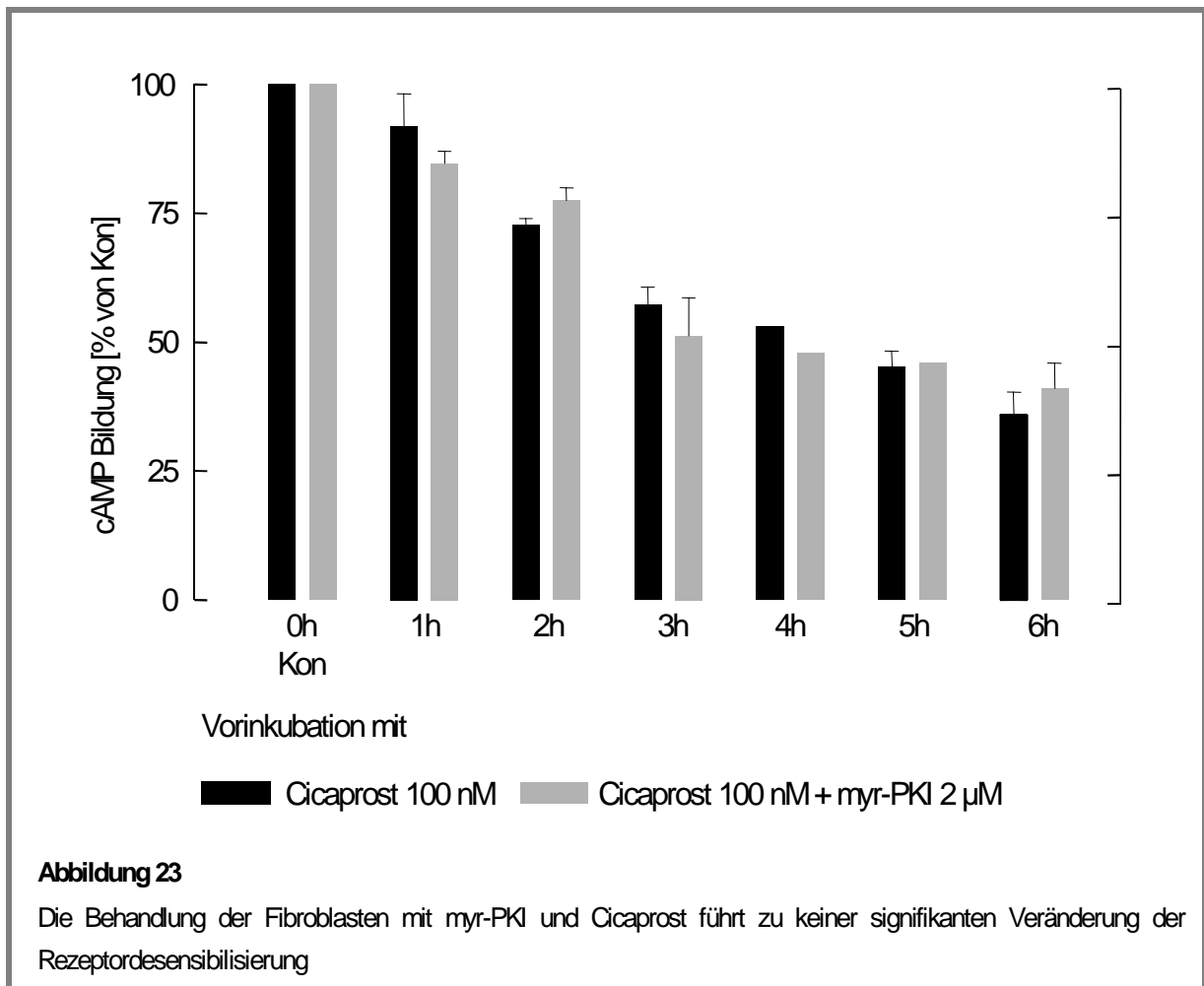
Im folgenden Teil der Arbeit wurde untersucht, welche Vorgänge zur Abschwächung der durch IP-R-vermittelten Signaltransduktion führen, die sich in der verminderten cAMP-Bildung nach Vorinkubation des Rezeptors mit seinem Agonisten widerspiegelt. Viele GPCRs werden durch ihre Phosphorylierung vom G-Protein entkoppelt, was zur Unterbrechung der Signalkaskade führt. Zunächst wurde untersucht, ob eine Phosphorylierung des Rezeptors eine Rolle spielt. Dazu wurde die Beteiligung von „second messenger“ Kinasen Proteinkinase C (PKC) und Proteinkinase A (PKA) sowie der G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen (GRKs) analysiert. Eine Rezeptor-Phosphorylierung kann auch den initiiierenden Schritt zu einer Abfolge von Reaktionen darstellen, die letztendlich zur Internalisierung des Rezeptors und damit zu einer längerfristigen Abschaltung des Signales führen. Dabei spielen bei vielen GPCRs, wie z.B.  $\beta_2$ AR, Proteine der Arrestinfamilie eine große Rolle, deren Beteiligung an der Internalisierung von hIP-R untersucht werden soll.

#### 3.6.1 Beteiligung der second messenger Kinasen PKC und PKA an der Desensibilisierung von hIP-R

Für viele GPCRs ist eine Phosphorylierung durch die second messenger Kinasen PKC und PKA beschrieben. Die Aminosäuresequenz von hIP-R enthält drei Konsensussequenzen für eine mögliche Phosphorylierung durch PKC, eine davon in der 1. intrazellulären Domäne (Serin 39), zwei im C-Terminus des Rezeptors (Serin 328, Serin 374). Eine Konsensussequenz für eine PKA-vermittelte Phosphorylierung ist beim humanen IP-Rezeptor nicht zu finden. Es wurde überprüft, ob die Desensibilisierung von hIP-R durch Inhibitoren bzw. Aktivatoren der PKC und PKA beeinflusst werden kann.

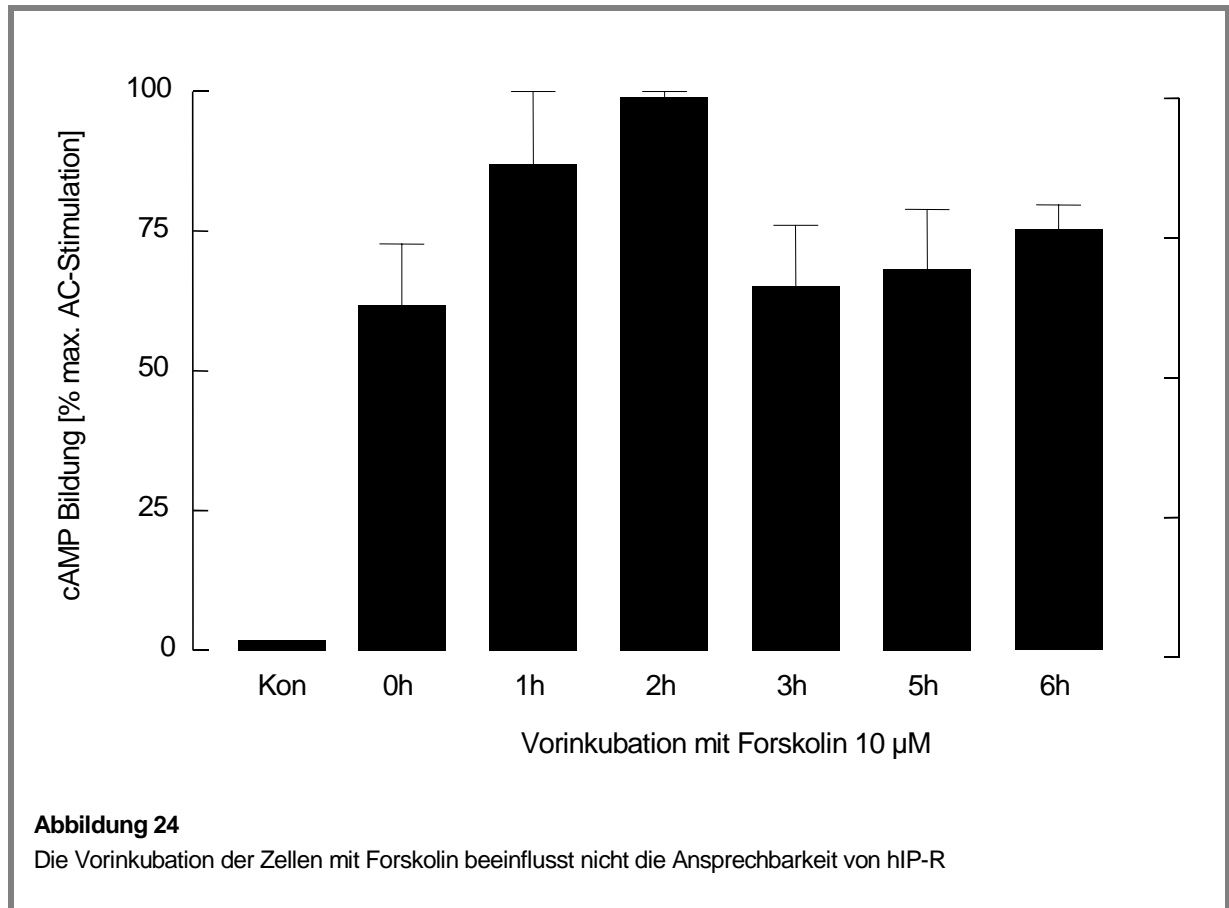
##### 3.6.1.1 Rolle der PKA

Um eine Beteiligung der PKA an der Rezeptordesensibilisierung zu untersuchen, wurden Fibroblasten zusätzlich zur Vorinkubation mit Cicaprost auch mit dem zellgängigen PKA-Inhibitor myr-PKI (2  $\mu$ M) über 0 h bis 6 h behandelt (Abb. 23). Im Vergleich der Kinetiken konnte bei den mit myr-PKI und Cicaprost vorbehandelten Zellen keine signifikant langsamere Desensibilisierung von IP-R beobachtet werden, als bei den nur mit Cicaprost behandelten Zellen. Die Hemmung der PKA hat somit keinen Einfluss auf die Desensibilisierungskinetik von hIP-R.



Einen anderen Ansatz zur Untersuchung der Rolle der PKA bietet die Aktivierung der Kinase durch andere  $G_s$ -gekoppelte Rezeptoren. Dieser „crosstalk“ auf cAMP-Ebene kann bei verschiedenen Rezeptoren beobachtet werden, z.B. zwischen Thromboxan- und Prostacyclin-Rezeptor (Walsh et al., 2000). Um eine solche cAMP-abhängige Desensibilisierung von hIP-R zu untersuchen, wurden Zellen mit Forskolin ( $10 \mu\text{M}$ ) über 0 h bis 6 h vorbehandelt und anschließend im cAMP-Assay die Stimulierbarkeit des Rezeptors mit Iloprost zu jedem Zeitpunkt überprüft (Abb. 24). Zur Kontrolle (Kon) wurde die cAMP-Bildung in unstimulierten Zellen gemessen. Wie schon in 3.1.3 für die Vorinkubation mit Iloprost beschrieben, ist auch in diesem Versuchsansatz nach einer 1- bis 2-stündigen Vorinkubationszeit mit Forskolin ein Anstieg der Iloprost-vermittelten cAMP-Bildung zu

beobachten: in nicht-vorbehandelten Zellen wurde eine cAMP-Bildung von 62 % durch den Iloprost-stimulierten IP-Rezeptor gemessen, die nach 1-stündiger Vorinkubation mit Forskolin auf 87 % und nach 2-stündiger Vorinkubation auf 99 % (Maximum) ansteigt. Danach (3 h bis 6 h) erreicht die cAMP-Konzentration aber wieder nahezu das cAMP-Ausgangsniveau.

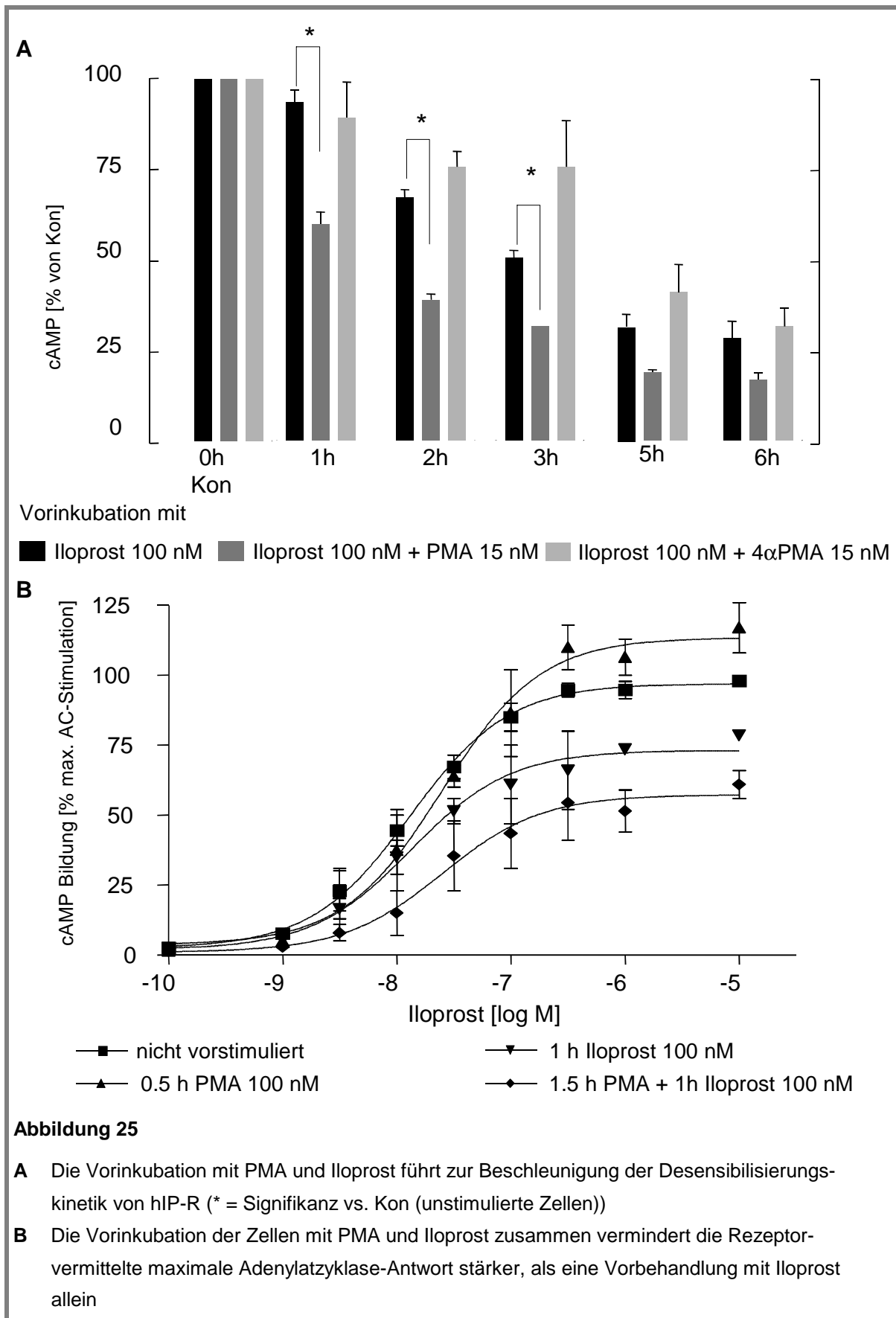


Die Desensibilisierung von hIP-R wird nicht schon durch die Vorinkubation der Zellen mit Forskolin und der nachfolgenden Erhöhung des cAMP-Spiegels in der Zelle initialisiert. Somit beruht die Desensibilisierung von hIP-R nicht auf cAMP-vermittelten Vorgängen.

### 3.6.1.2 Rolle der PKC

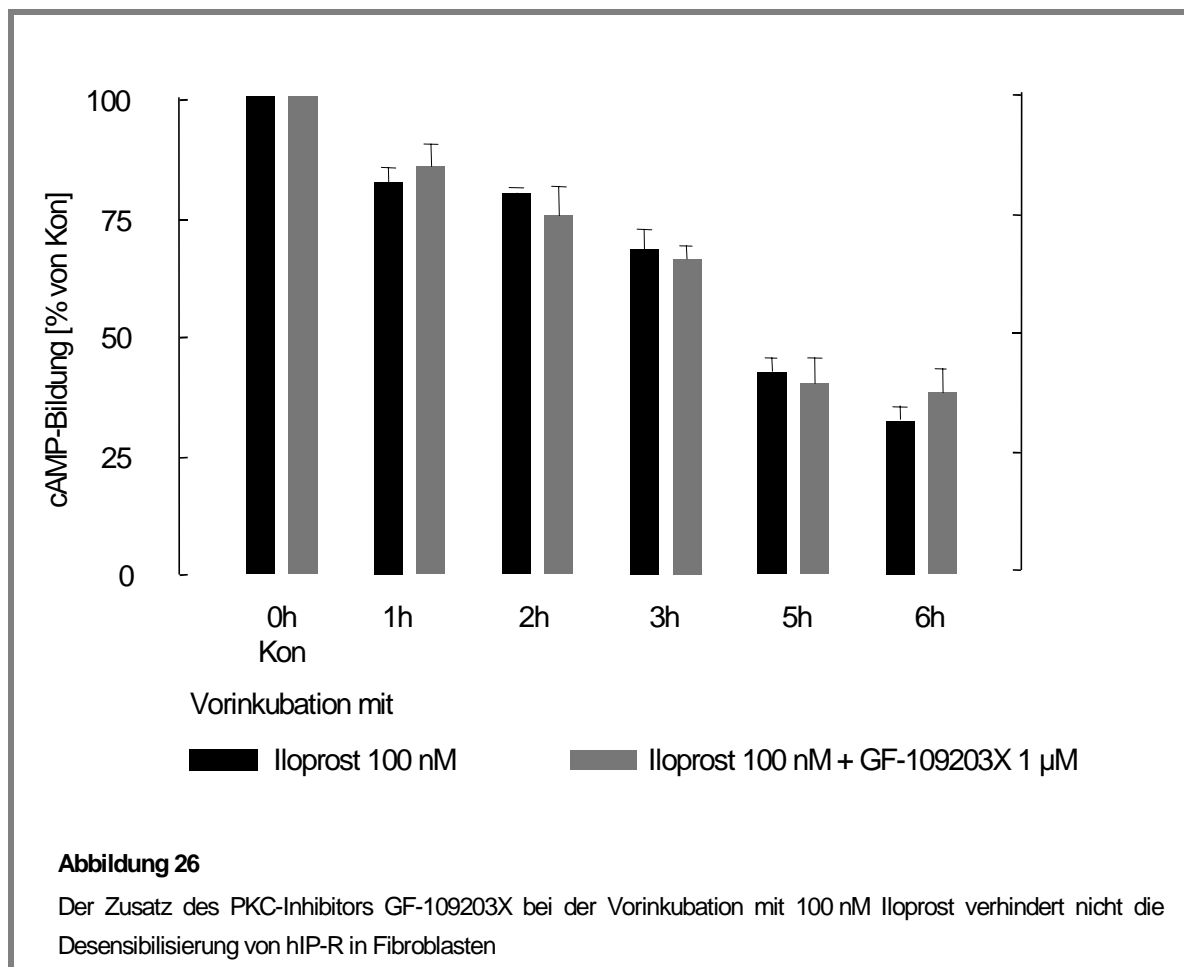
Ein Aktivator der PKC ist der Phorbolester PMA. Smyth et al. (1998) zeigten in IP-R-stabilen HEK 293-Zellen, dass die Desensibilisierung von hIP-R bei Überexpression *in vitro* PKC-abhängig abläuft. Eine Vorbehandlung mit 5  $\mu$ M PMA führte zur Rezeptorphosphorylierung. Hier sollte untersucht werden, ob die PKC auch in den Fibroblasten mit natürlicher hIP-R-Expression an der Rezeptor-Desensibilisierung beteiligt ist. Eine PKC-Aktivierung ist in verschiedenen Zelltypen schon bei sehr niedrigen PMA-Konzentrationen beschrieben (Lederer et al., 1993; Hsu et al., 1998). Längerfristig angewendet führt die PMA-Behandlung aber zu einer Desensibilisierung der Kinase. Fibroblasten wurden mit 100 nM Iloprost bzw. mit Iloprost und PMA für 0 h bis 6 h vorinkubiert. Um eine Aktivierung der PKC auch noch nach 6-stündiger Vorinkubation mit PMA zu gewährleisten, wurde 15 nM als Konzentration in der Kinetik gewählt. 4 $\alpha$ -PMA, eine inaktive Form des PMA, wurde in gleicher Konzentration als Kontrollreihe mitgeführt. Dabei zeigte sich, dass IP-R in den Zellen, die zusätzlich mit dem PKC-Aktivator PMA behandelt worden waren, anfänglich schneller desensibilisierte als in nur mit Iloprost vorbehandelten Zellen (Abb. 25 A). Nach 1-stündiger Vorinkubation mit Iloprost und PMA war die Rezeptor-vermittelte cAMP-Bildung um 43 % reduziert, gegenüber einer Reduktion um 11 % bei Vorinkubation mit Iloprost alleine. Ähnlich Unterschiede waren auch nach 2- und 3-stündiger Vorinkubation zu beobachten: eine Reduktion um 73 % (Iloprost und PMA) gegenüber 36 % (nur Iloprost) bzw. 70 % gegenüber 52 %. Die Vorinkubation mit Iloprost und 4 $\alpha$ -PMA beschleunigte die Kinetik nicht.

Nachfolgend wurde untersucht, ob die Beschleunigung der Kinetik Agonisten-abhängig oder -unabhängig verläuft, d.h. ob es sich um einen homologen oder heterologen Desensibilisierungsvorgang handelt. Dazu wurden die Fibroblasten jeweils mit Iloprost (100 nM) oder PMA (100 nM) oder beiden Substanzen zusammen vorbehandelt und die Rezeptor-vermittelte, konzentrationsabhängige maximale cAMP-Bildung gemessen (Abb. 25 B). Eine 30-minütige PMA-Behandlung allein führte dabei nicht zu einer Verminderung der Rezeptor-vermittelte Adenylatzyklase-Antwort. Eine 1-stündige Vorbehandlung der Zellen mit Iloprost reduziert die maximale Antwort auf 77 % (Iloprost  $10^{-5}$  M), wobei die zusätzliche Vorbehandlung mit PMA diese Reduktion um 20 % verstärkte. Somit beeinflusst PMA nur die Desensibilisierung des aktivierten, Agonisten-besetzten Rezeptors. Es handelt sich also um eine homologen, Agonisten-abhängigen Vorgang.



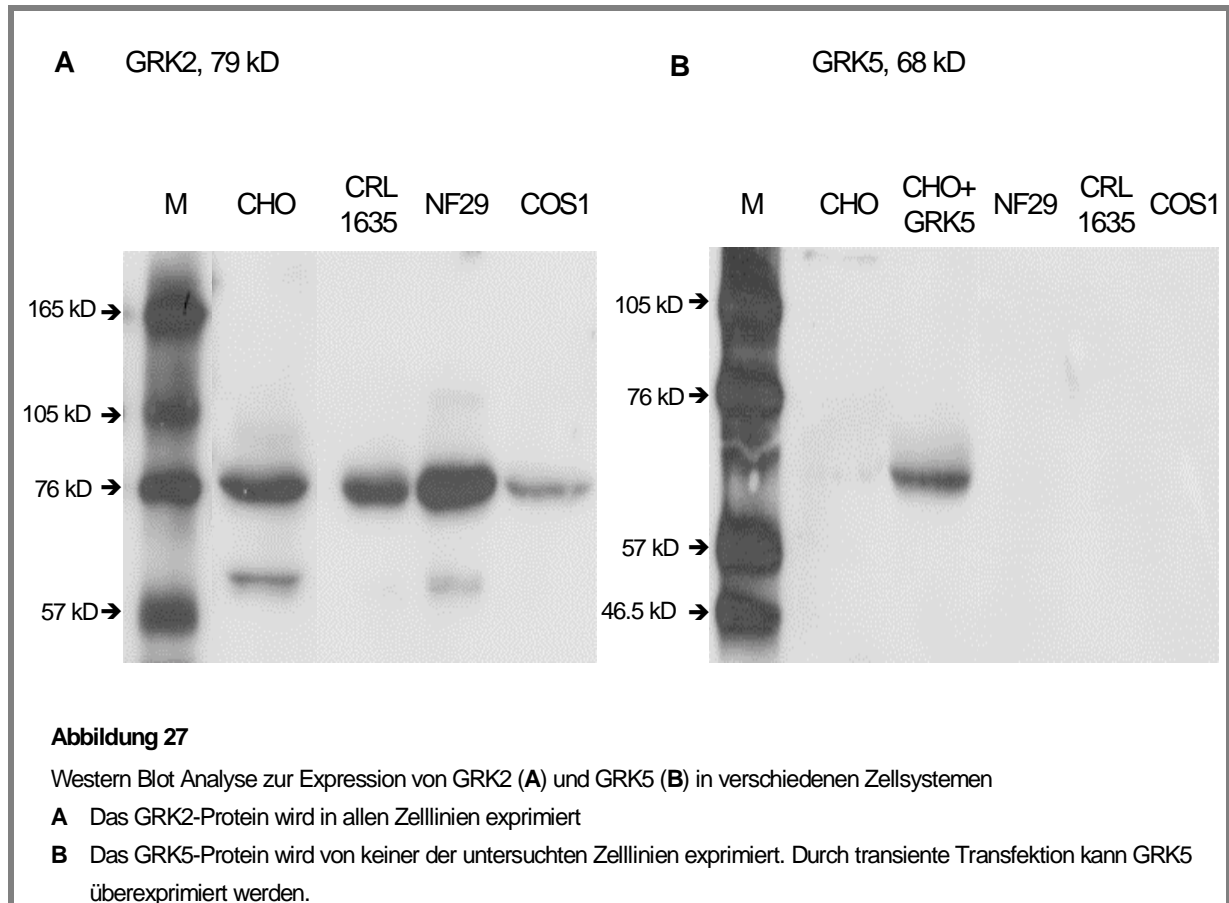


In einem anderen Versuchsansatz wurde der Einfluss des PKC-Inhibitors GF-109203X auf die IP-R-Desensibilisierung überprüft. Die Arbeitsgruppe von FitzGerald zeigte, dass eine 30-minütige Vorbehandlung der IP-R-exprimierenden HEK 293-Zellen mit GF-109203X (5  $\mu$ M) die Phosphorylierung des Rezeptors durch die nachfolgende Iloprost-Stimulation verhinderte (Smyth et al., 1996). Andererseits zeigten sie in Bindungsstudien, dass GF-109203X nicht die Internalisierung des Rezeptors verhindert (Smyth et al., 2000). In unserem Zellsystem wurde der PKC-Inhibitor mit einer Konzentration von 1  $\mu$ M eingesetzt, da in anderen Arbeiten die inhibierende Wirkung auf die Rezeptor-Desensibilisierung schon bei einer Konzentration von 200 nM (Yoon et al., 1998) beim  $\delta$ OR bzw. 1  $\mu$ M beim m2 mAChR (Rousell et al., 1995) beschrieben wurde. Die Fibroblasten wurden während der 0- bis 6-stündigen Vorinkubation mit Iloprost (100 nM) oder Iloprost und GF-109203X behandelt. Der Vergleich zwischen den Iloprost- und Iloprost / GF-109203X-behandelten Zellen zeigte aber keine signifikante Veränderung in der Desensibilisierungskinetik von hIP-R (Abb. 26).

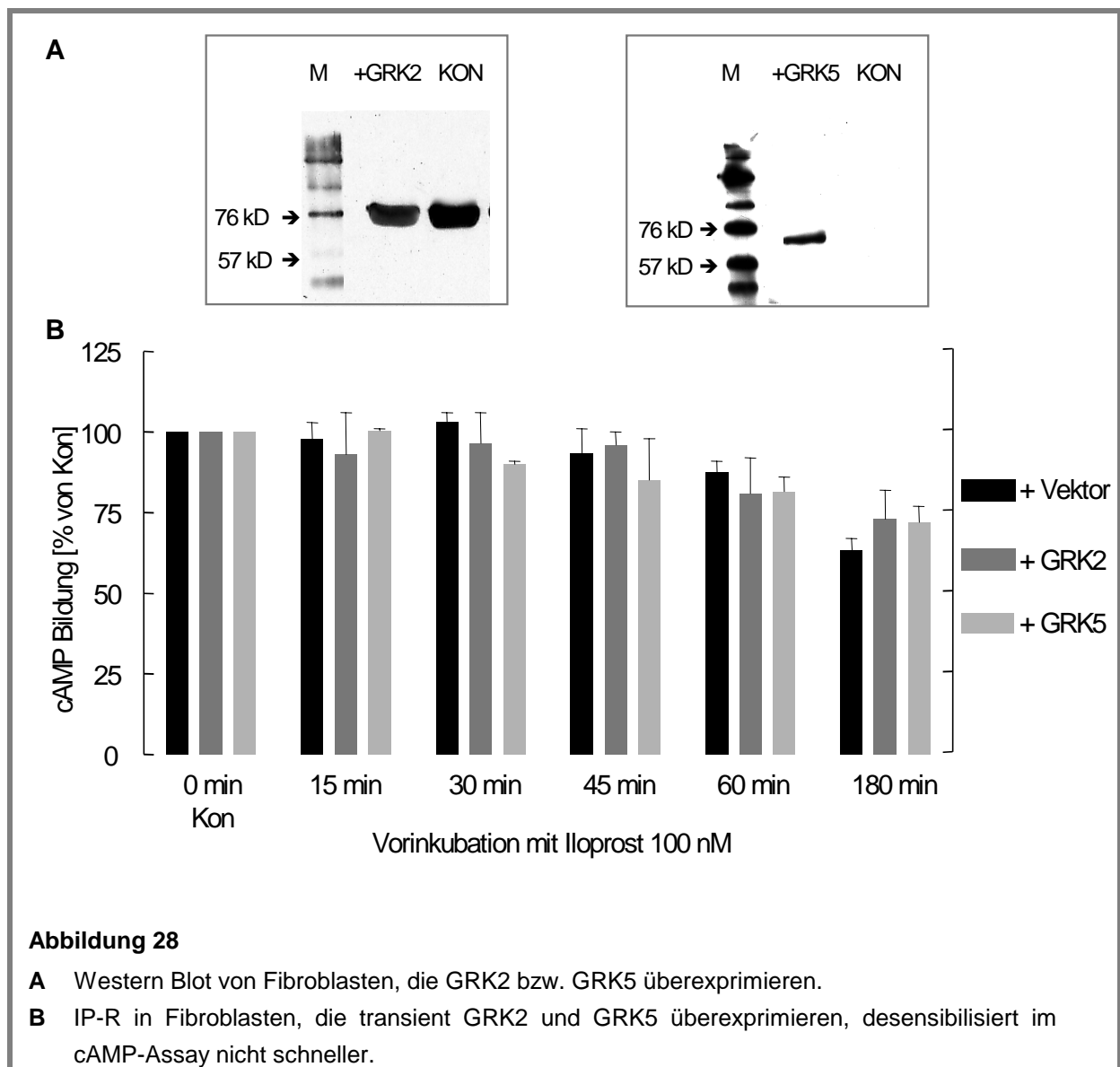


### 3.6.2 Beteiligung von G-Protein gekoppelten Rezeptorkinasen (GRKs) an der Desensibilisierung von hIP-R

Alternativ zu den second messenger Kinasen können GPCRs auch von GRKs phosphoryliert werden und so den Rezeptor vom G-Protein entkoppeln. Die Phosphorylierungsstellen sind dabei nicht identisch mit denen der second messenger Kinasen. Stellvertretend für die Familie der GRKs soll untersucht werden, wie die Überexpression von GRK2 oder GRK5 das Desensibilisierungsverhalten von hIP-R beeinflusst. Die Isoformen wurden ausgewählt, da in der Literatur hauptsächlich die Beteiligung von GRK2 und GRK5 an Rezeptor-Phosphorylierungen beschrieben ist (Eason et al., 1995; Fredericks et al., 1996). Die klonierten Gene der Kinasen wurden von N.J. Freedman (Duke Universität, Durham, NC, USA) zur Verfügung gestellt und jeweils in den Expressionsvektor pcDNA3 umkloniert. Im Western Blot wurde zunächst die Expression der beiden GRKs in verschiedenen Zellsystemen überprüft. Dabei zeigte sich, dass GRK2 als 79 kD großes Protein endogen in CHO-, COS1-Zellen und Fibroblasten exprimiert wird (Abb. 27 A), nicht aber GRK5 (Abb. 27 B). GRK5 lässt sich als 68 kD großes Protein durch transiente Transfektion, hier in CHO-Zellen, exprimieren.



Um die mögliche Beteiligung von GRK2 oder GRK5 an der Desensibilisierung von hIP-R zu untersuchen, wurden die Plasmide pc3GRK2 und pc3GRK5 jeweils transient in CRL1635 Fibroblasten überexprimiert. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit pcDNA3 transfiziert wurden. Die Überexpression der Kinasen wurde im Westen Blot überprüft, wobei die Menge der endogen exprimierten GRK2 kaum verstärkt werden konnte (Abb. 28 A). Da beschrieben ist, dass die Phosphorylierung durch GRKs schneller erfolgt als durch second messenger Kinasen (Roth et al., 1991), wurden in einer Desensibilisierungs-Kinetik die Zellen über 0 min bis 180 min mit Iloprost vorinkubiert und IP-R im cAMP-Assay erneut mit dem Agonisten stimuliert (Abb. 28 B). In der Kinetik ist keine signifikant schnellere Desensibilisierung von IP-R durch die Überexpression von GRK2 oder GRK5 zu beobachten. Diese scheinen daher nicht an der Desensibilisierung von hIP-R beteiligt zu sein.

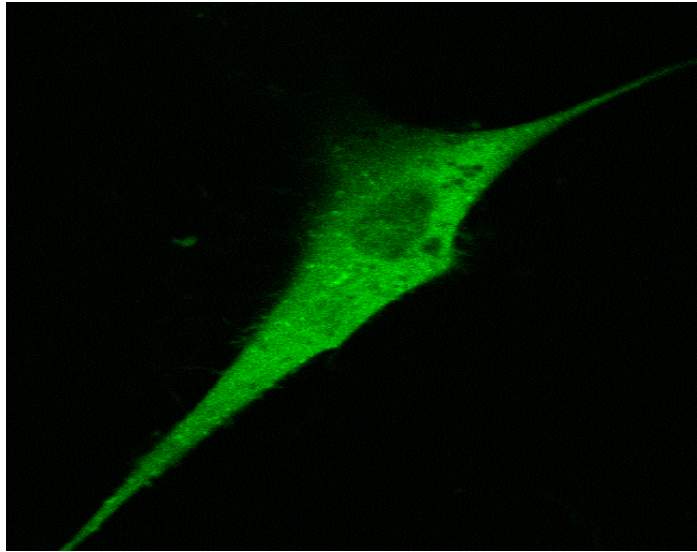


### 3.6.3 Beteiligung von Arrestinen an der Internalisierung von hIP-R

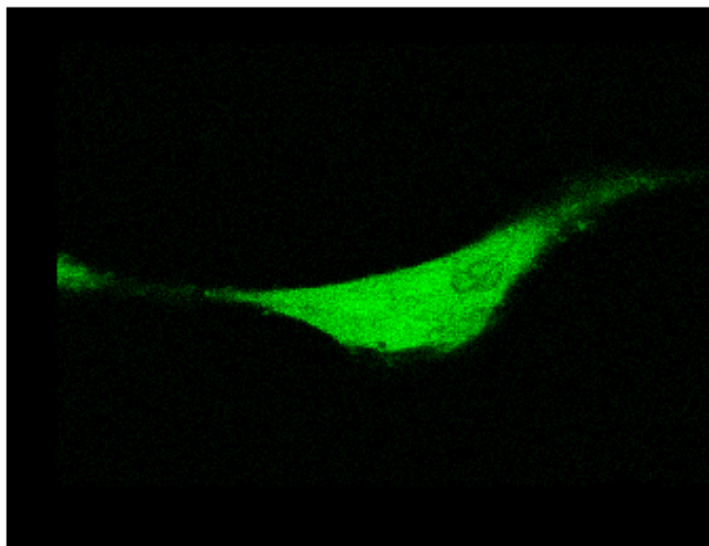
Für eine „klassische“ Internalisierung nach Vorbild des  $\beta_2$ AR wird die Bindung von Arrestinen benötigt, die über ein C-terminales Clathrin-Bindemotiv die Endozytose des Rezeptors einleiten. Stellvertretend für die Familie der Arrestine sollte die Beteiligung von  $\beta$ -Arrestin2 an der Internalisierung von hIP-R untersucht werden. Dazu wurde ein GFP-gekoppeltes  $\beta$ -Arrestin2 eingesetzt, das freundlicherweise von M.G. Caron, (Duke Universität, Durham, NC, USA) zur Verfügung gestellt wurde.  $\beta$ -Arrestin2-GFP wurde transient mit hIP-R bzw.  $h\beta_2$ AR in CHO-Zellen und CRL1635 Fibroblasten exprimiert. In den Fibroblasten, die endogen anscheinend nur geringe Rezeptormengen exprimieren, mussten die Rezeptoren jeweils transient überexprimiert werden. Im konfokalen Lasermikroskop konnte bei den unstimulierten Zellen die gleichmässige Verteilung des GFP-gekoppelten Arrestins im Zytoplasma beobachtet werden (Abb. 29 A, 30 A).

Nach Stimulation der Zellen mit Iloprost (100 nM) bzw. Isoprenalin (1  $\mu$ M) wurde erneut die Lokalisation von  $\beta$ -Arrestin2-GFP im Mikroskop überprüft. Dabei konnte in Zellen, die  $h\beta_2$ AR und  $\beta$ -Arrestin2-GFP exprimierten, schon nach wenigen Minuten die Translokation des Arrestins zur Plasmamembran in grün leuchtenden Vesikeln beobachtet werden (Abb. 30 B). Im Gegensatz dazu trat diese Umverteilung nicht in Zellen auf, die hIP-R und  $\beta$ -Arrestin2-GFP exprimierten (Abb. 29 B). Dies spricht dafür, dass  $\beta$ -Arrestin2 nicht an der Internalisierung von hIP-R beteiligt ist.

**A**



**B**



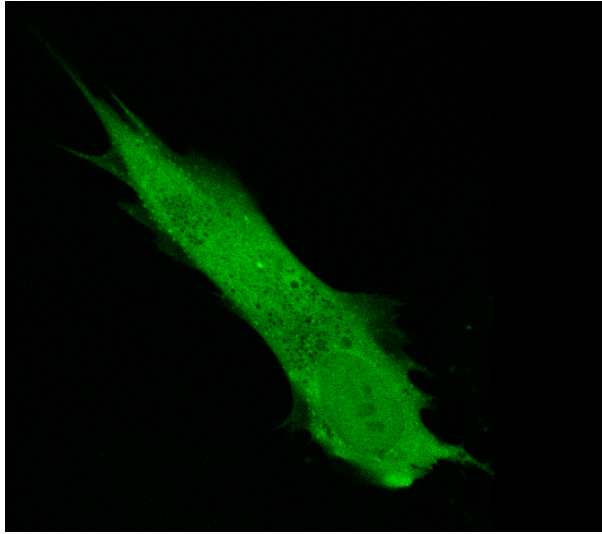
**Abbildung 29**

Transient mit hIP-R und  $\beta$ Arrestin2-GFP transfizierte Fibroblasten

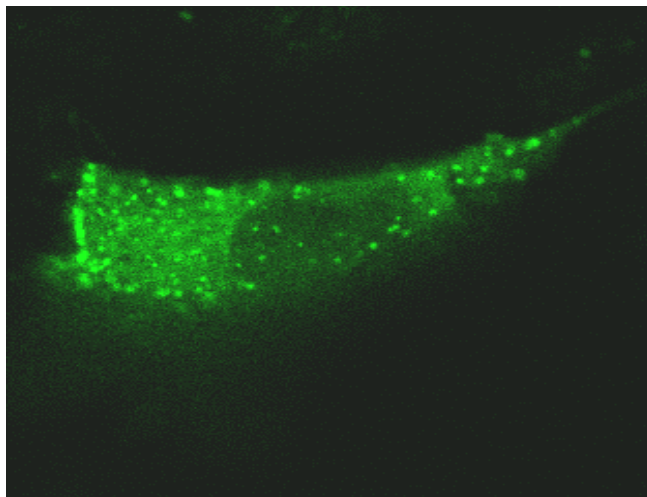
**A** unstimuliert

**B** 3 h stimuliert mit Iloprost 100 nM

**A**



**B**



**Abbildung 30**

Transient mit  $\beta_2$ AR und  $\beta$ - Arrestin2- GFP transfizierte Fibroblasten

**A** unstimuliert

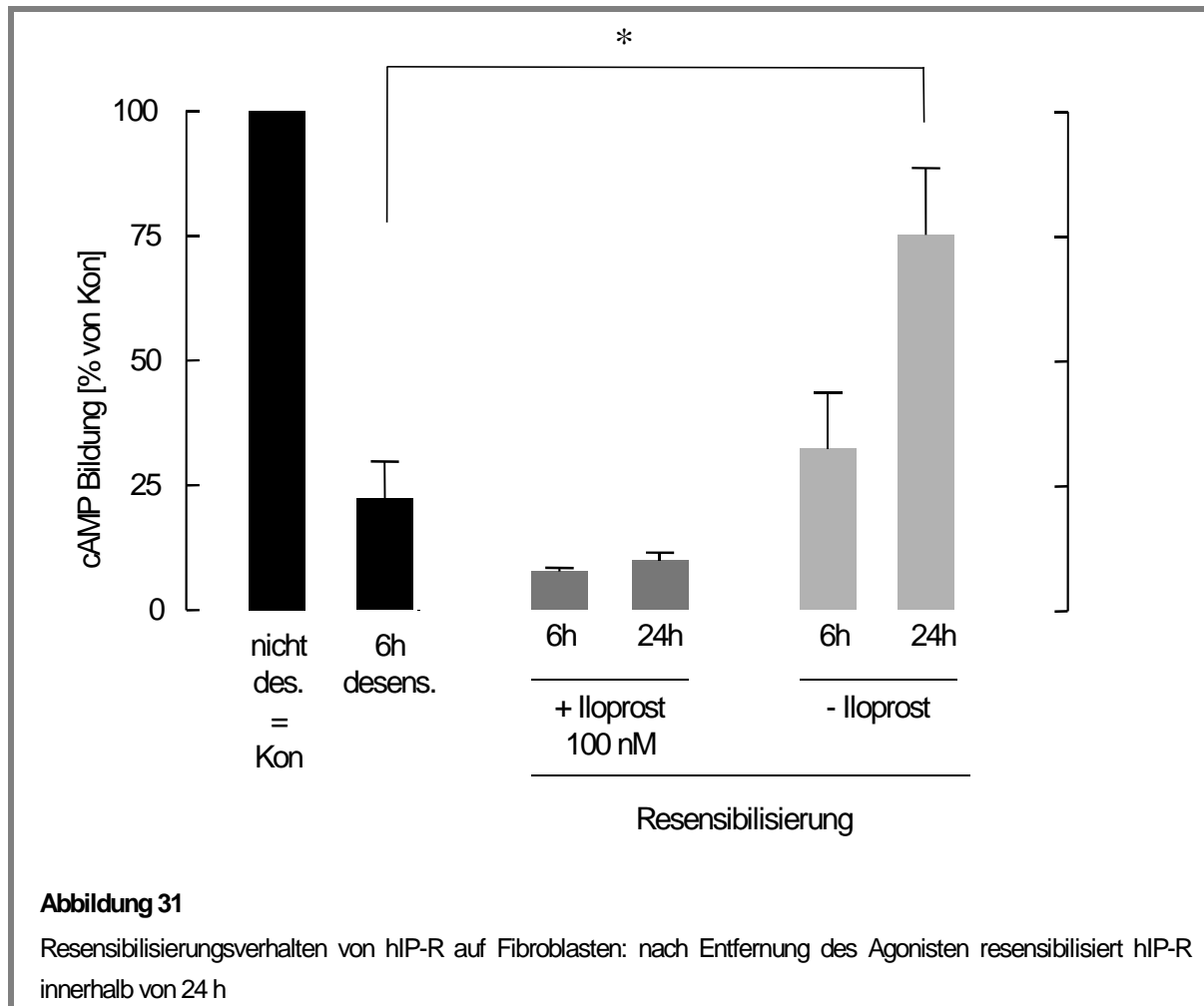
**B** 10 min stimuliert mit Isoprenalin 1  $\mu$ M

Die Versuche wurden mit vergleichbarem Ergebnis auch in CHO-Zellen durchgeführt.

### 3.7 Resensibilisierung des humanen IP-R

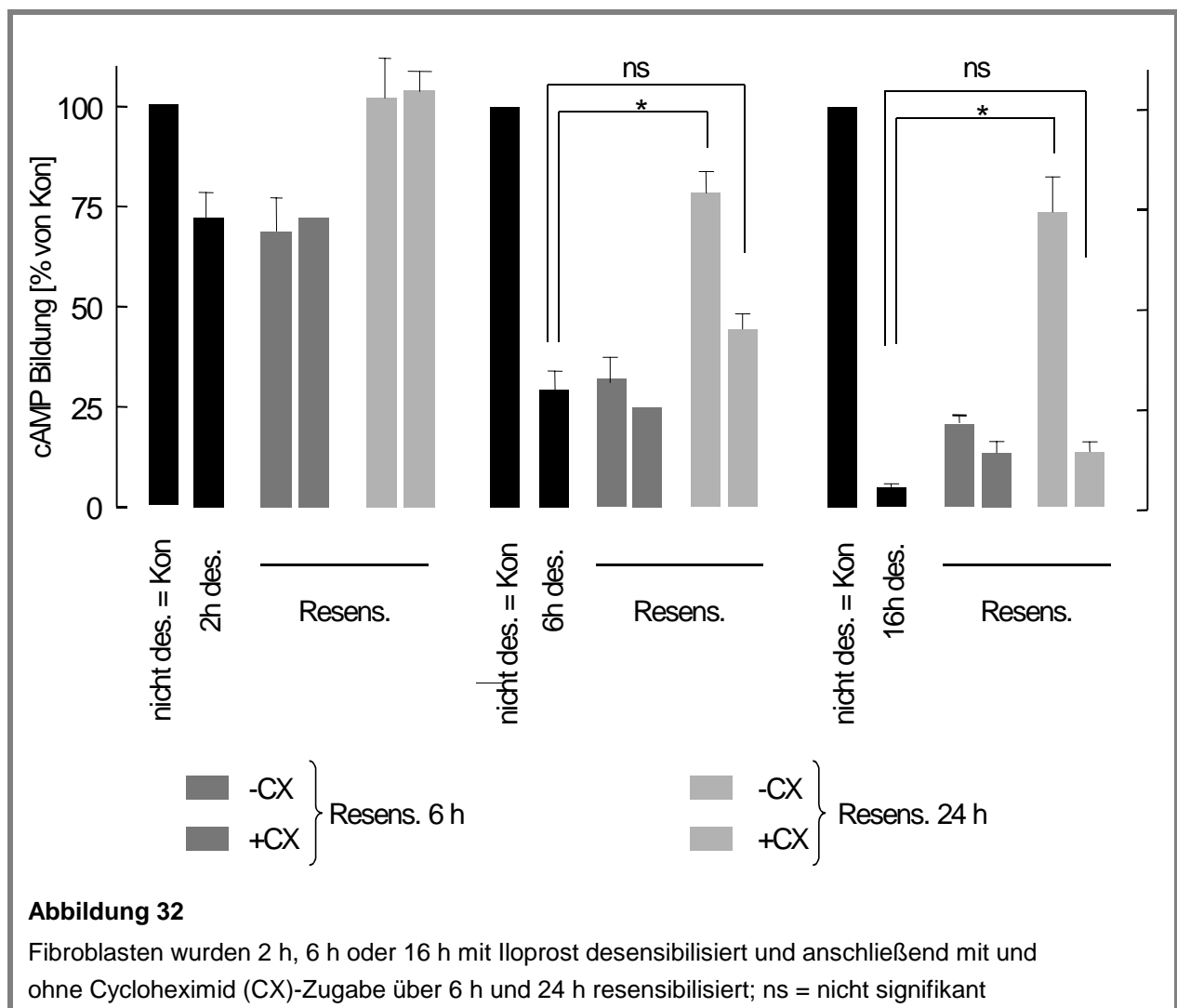
Für GPCRs werden unterschiedliche Wege beschrieben, die sie nach ihrer Internalisierung in der Zelle durchlaufen können. Zum einen kann der Rezeptor nach der Dephosphorylierung in den Endosomen zur Oberfläche zurückkehren. Ein anderer Weg beinhaltet die Degradation des Rezeptors und damit eine längerfristige Signalabschaltung. Manche Rezeptoren können abhängig vom Zelltyp und von der Dauer der Stimulation durch den Agonisten beide Wege beschreiten. Letztendlich führen beide Vorgänge früher (nach Recycling) oder später (nach Degradation und Neusynthese) zur erneuten Verfügbarkeit aktivierbarer Rezeptoren an der Zellmembran. Nachdem Desensibilisierung und Internalisierung des Prostacyclin-Rezeptors gezeigt wurden, soll nun der Frage nach der Wiederherstellung der Signalantwort von hIP-R untersucht werden.

Um die Resensibilisierungskinetik von hIP-R zu untersuchen, wurde der Rezeptor in NF29 Fibroblasten 6 h mit Iloprost (100 nM) desensibilisiert, die Zellen gewaschen und in agonistenfreien Nährmedium über 6 h und 24 h resensibilisiert. Parallel dazu wurde während der Resensibilisierungsphase in einem weiteren Ansatz Iloprost (100 nM) zu den Zellen gegeben. Im cAMP-Assay wurde dann die Ansprechbarkeit des Rezeptors zu den verschiedenen Zeitpunkten überprüft (Abb. 31). Die Rezeptor-vermittelte cAMP-Bildung in den Fibroblasten war nach 6-stündiger Vorinkubation mit Iloprost im Vergleich zu nicht-vorbehandelten Zellen (Kon = 100 %) auf 22 % reduziert. Nach Abwaschen des Agonisten wurde nach einer Resensibilisierungszeit von 6 h ein Anstieg der Rezeptor-vermittelten cAMP-Antwort auf 33 %, nach 24 h auf 75 % gemessen. In den Zellen, die während der Resensibilisierungsphase mit Iloprost behandelt wurden, konnte keine Resensibilisierung des Rezeptors beobachtet werden. Somit ist hIP-R nach Beendigung des Stimulus in der Lage, wieder zu resensibilisieren. Dies erfordert aber einen Zeitraum von ca. 24 h.





Anschließend wurde den Zellen während der Resensibilisierungsphase der Proteinsynthese-Inhibitor Cycloheximid (CX, 20 µg/ml) zugesetzt. Das relativ langsame Resensibilisierungsverhalten von hIP-R legt die Vermutung nahe, dass zur Wiederherstellung der Rezeptoraktivität eine Neusynthese des Rezeptorproteins erforderlich ist. Zudem ergab sich die Frage, ob an allen Zeitpunkten der Desensibilisierung ausschliesslich eine Rezeptor-Neusynthese zur Resensibilisierung nötig ist, oder ob auch ein Recycling-Mechanismus beteiligt sein könnte (Abb. 32).

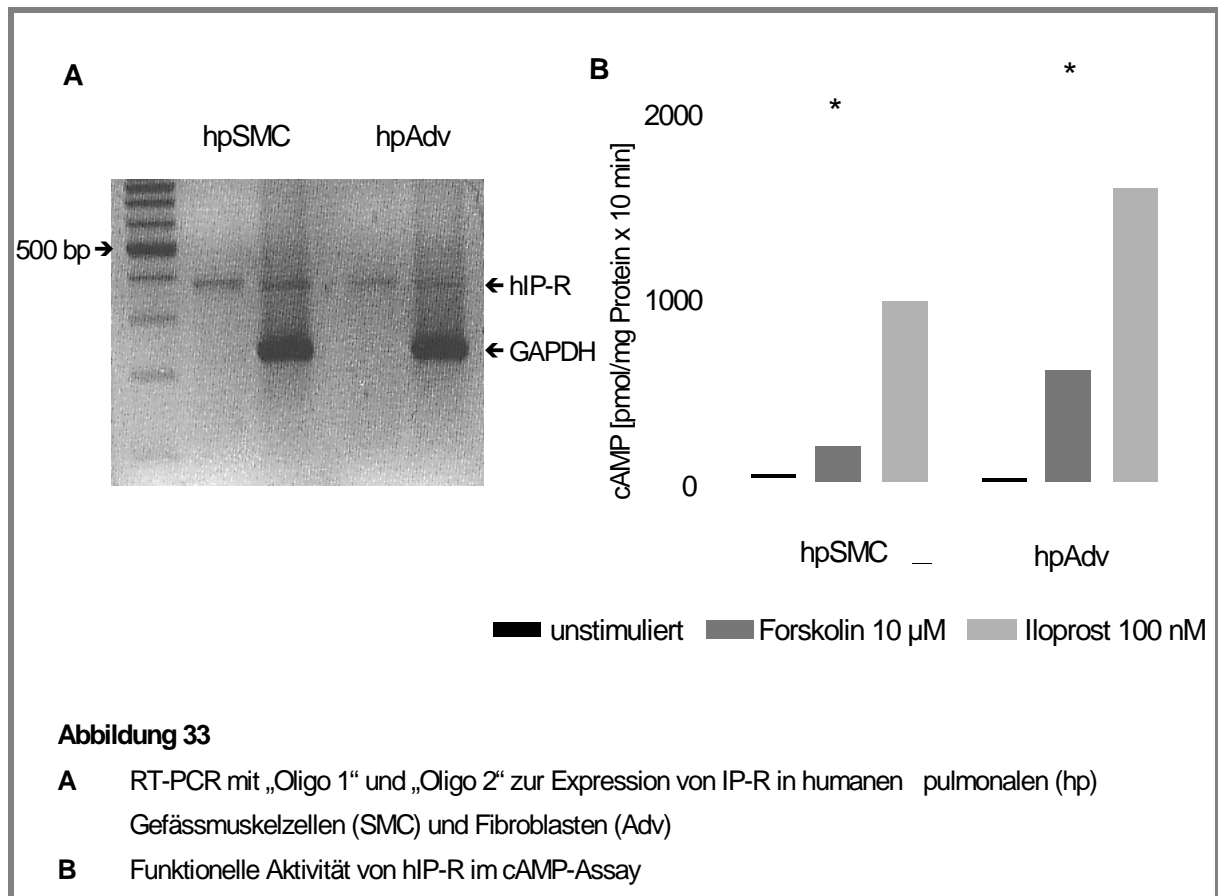


Der Zusatz von Cycloheximid hatte keinen Effekt auf die Resensibilisierung von IP-R nach 2-stündiger Desensibilisierung der Zellen, führte aber zu einer signifikant geringeren Resensibilisierung nach 6- und 16-stündiger Desensibilisierung im Vergleich zu CX-unbehandelten Zellen. Dabei war die Rezeptor-vermittelte cAMP-Bildung in den unbehandelt resensibilisierten Zellen nach 24 h wieder von 29 % (6-stündige Desensibilisierung) auf 78 % bzw. von 5 % (16-stündige Desensibilisierung) auf 74 % angestiegen. Betrachtet man die Resensibilisierung unter Einfluss von Cycloheximid, so steigt die Rezeptorantwort nur auf 44 % bzw. 14% an. Der geringe Effekt von CX nach 2-stündiger Desensibilisierung könnte bedeuten, dass hier noch ein Rezeptor-Recycling entscheidend für die Wiederherstellung des IP-R-Signals beteiligt ist. Dies wäre allerdings ein sehr langsames Recycling. Andererseits ist der Rezeptor nach einer 2-stündigen Iloprost-Behandlung noch nicht so stark desensibilisiert, so dass die wiederhergestellte Signalweiterleitung auch von den Rezeptoren stammen könnte, die vor der CX-Gabe synthetisiert wurden, und nun an der Zell-Oberfläche angekommen sind. Insgesamt sprechen der langsame Zeitverlauf der Resensibilisierung und der hemmende Effekt von Cycloheximid für eine Regulation des Rezeptors auf Proteinebene. Dies bedeutet, dass hIP-R nach seiner Internalisierung abgebaut wird und hauptsächlich seine Neusynthese zur Wiederherstellung des Signales führt.

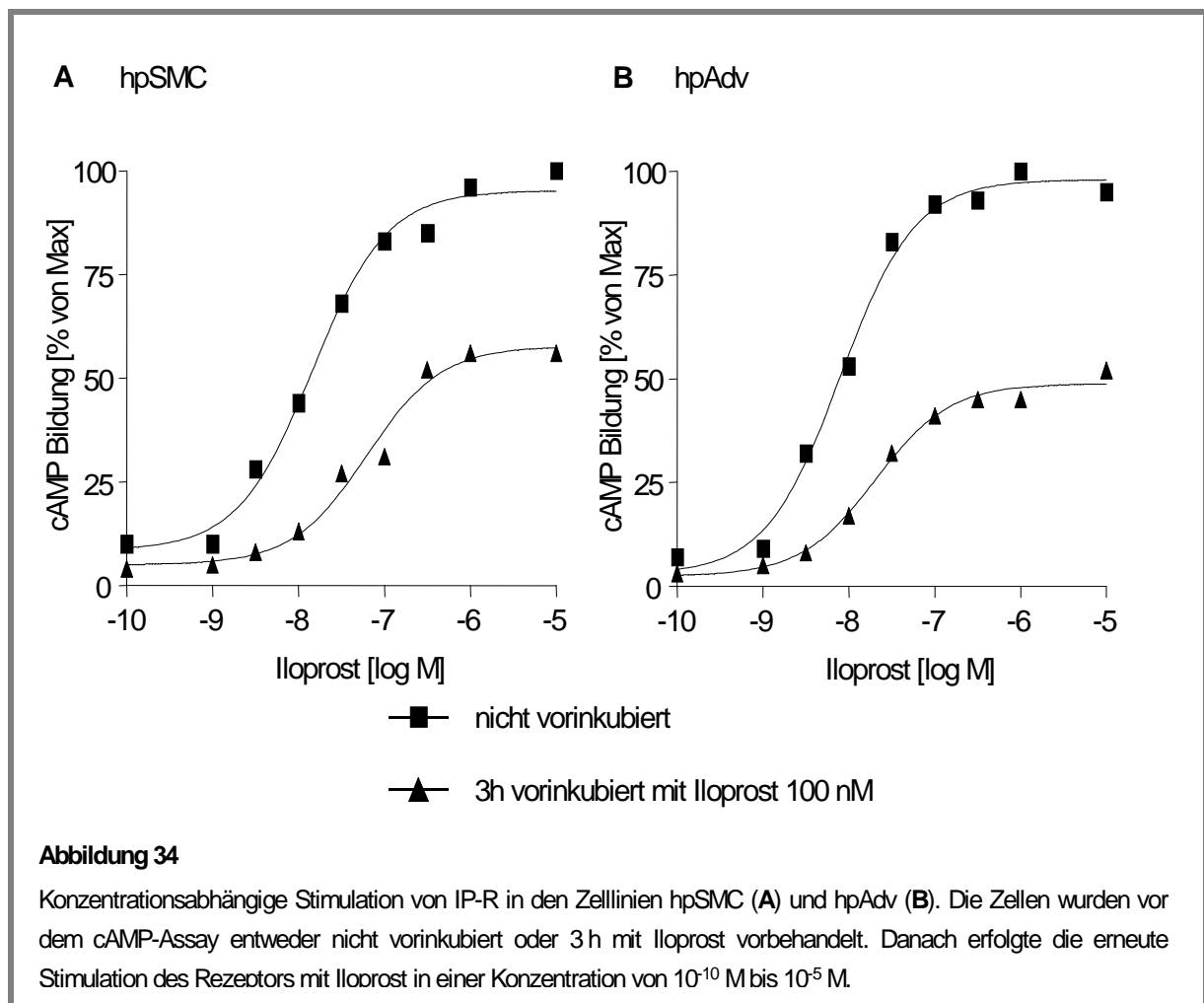
### **3.8 Charakterisierung von hIP-R in pulmonalem Gewebe**

Auch bei der Behandlung der pulmonalen Hypertonie werden Prostacyclin und seine Mimetika eingesetzt. Durch die vasodilatatorische Wirkung von Prostacyclin kann der Gefäßdruck in der Lunge gesenkt werden. Einige Patienten können aber nur durch beständige Steigerung der Arzneydosis den anfänglich verbesserten Zustand aufrecht erhalten. So scheint der Prostacyclin-Rezeptors auch im pulmonalen Gewebe eine Desensibilisierung nach beständiger Aktivierung durch den Agonisten zu durchlaufen. Um den im pulmonalen Gewebe exprimierten hIP-R zu charakterisieren, wurde nach Lungenoperationen Zellkulturen aus pulmonalen Fibroblasten der Adventitia (hpAdv) und Gefäßmuskelzellen pulmonaler Arterien (hpSMC) angelegt. In dieser Arbeit wurde dann mittels RT-PCR die Expression von hIP-R in beiden Zelllinien nachgewiesen (Abb. 33 A) und im cAMP-Assay die Funktionalität des Rezeptors bestätigt (Abb. 33 B). Dabei ist die Rezeptor-vermittelte cAMP-Bildung durch

die Stimulation mit Iloprost in den pulmonalen Zellen mit 980 pmol / mg Protein x 10 min (hpSMC) und 1600 pmol / mg Protein x 10 min (hpAdv) geringer als in den Fibroblasten-Zelllinien NF29 (2300 pmol / mg Protein x 10 min; Abb. 12 B) und CRL1635 (2700 pmol / mg Protein x 10 min; Abb. 12 B). Die Forskolin-vermittelte cAMP-Bildung, die sich auf 200 pmol / mg Protein x 10 min (hpSMC) bzw. 600 pmol / mg Protein x 10 min (hpAdv) beläuft, ist mit der in den Fibroblasten-Zelllinien vergleichbar (Abb. 33 B).

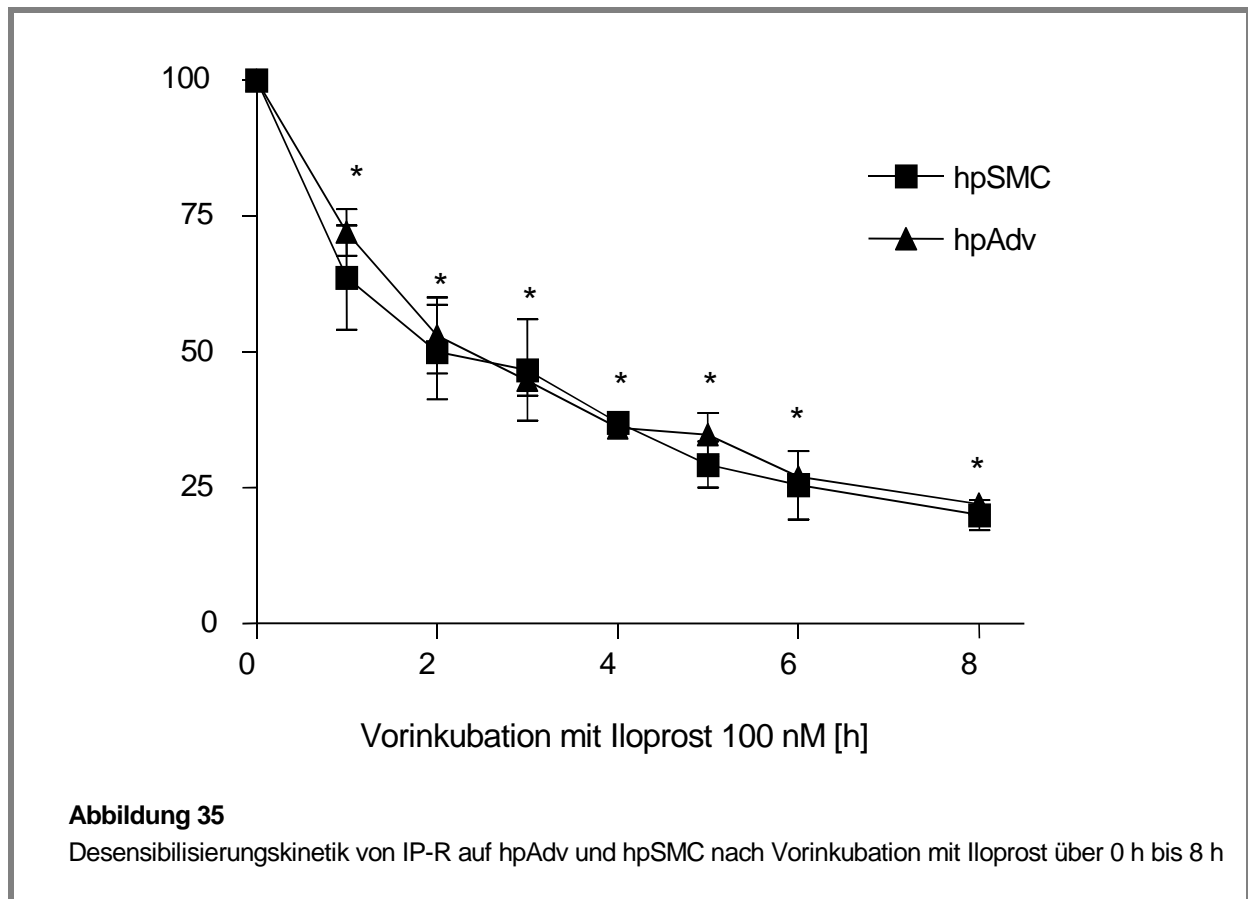


Die konzentrationsabhängige, maximale cAMP-Bildung durch hpIP-Rezeptor, der mit Iloprost-Konzentrationen von  $10^{-10}$  M bis  $10^{-5}$  M stimuliert wurde, ergibt eine sigmoidale Kurve, die bei beiden Zelllinien gleich verläuft (Abb. 34).



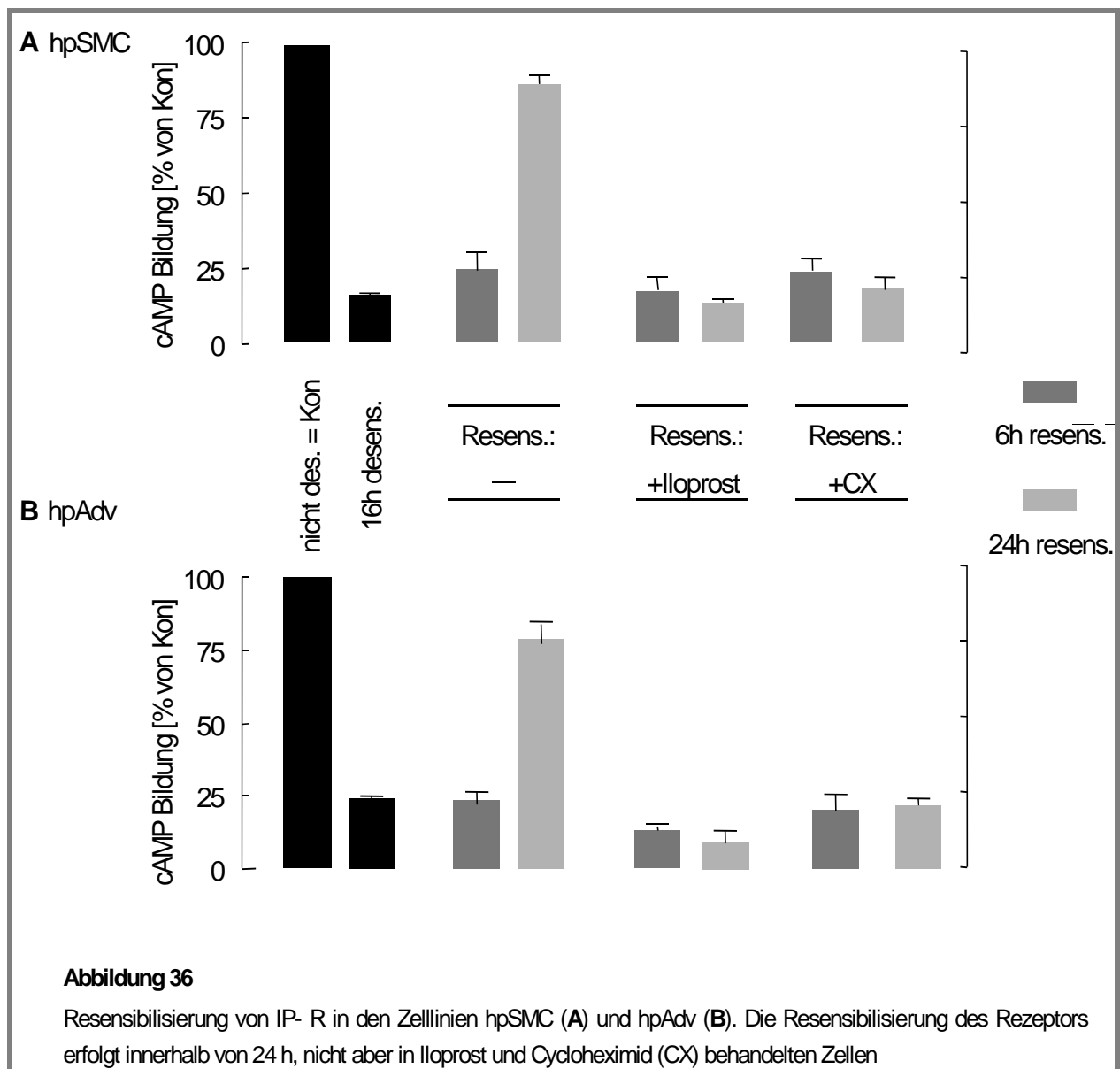
Im cAMP-Assay wurde das Desensibilisierungsverhalten von hpIP-R nach einer Vorinkubationszeit mit Iloprost von 0 h bis 8 h untersucht. Auch hier zeigt die Rezeptor-vermittelte cAMP-Bildung in beiden Zelllinien den gleichen Kinetikverlauf (Abb. 35). Nach 1-stündiger Vorinkubation war die IP-R-vermittelte cAMP-Bildung bei hpAdv auf 72 % reduziert, nach 2 h auf 53 % und nach 8 h auf 10 %. Die Werte für die Kinetik von hIP-R auf hpSMC liegen ähnlich: nach 1-stündiger Vorinkubation vermindert

sich die Rezeptor-vermittelte cAMP-Bildung auf 64 %, nach 2 h auf 50 % und nach 8 h auf 20 %. Im Vergleich zu den Fibroblastenlinien NF29 und CRL1635 zeigt sich, dass hIP-R in den ersten Stunden in beiden pulmonalen Zelltypen schneller desensibilisiert.



Nachdem die Desensibilisierungskinetik von hIP-R in den pulmonalen Zellen schneller verläuft als die Kinetik in den Fibroblasten, wurde auch die Resensibilisierung des pulmonal exprimierten Rezeptors verglichen. Dazu wurde IP-R auf hpSMC und hpAdv 16 h mit Iloprost (100 nM) desensibilisiert und nach Abwaschen des Agonisten für 6 h und 24 h resensibilisiert. Dies geschah in Agonisten-freiem Nährmedium oder unter Zusatz von Iloprost (100 nM) oder Cycloheximid (CX, 20 µg/ml). Zu jedem Zeitpunkt wurde ein cAMP-Assay durchgeführt, um die Ansprechbarkeit des Rezeptors zu überprüfen. Nach 16-stündiger Iloprost-Behandlung war die Rezeptor-vermittelte cAMP-Bildung von 100 % (nicht desensibilisiert = Kon) auf 17 % (hpSMC, Abb. 36 A) bzw. 25 % (hpAdv, Abb. 36 B)

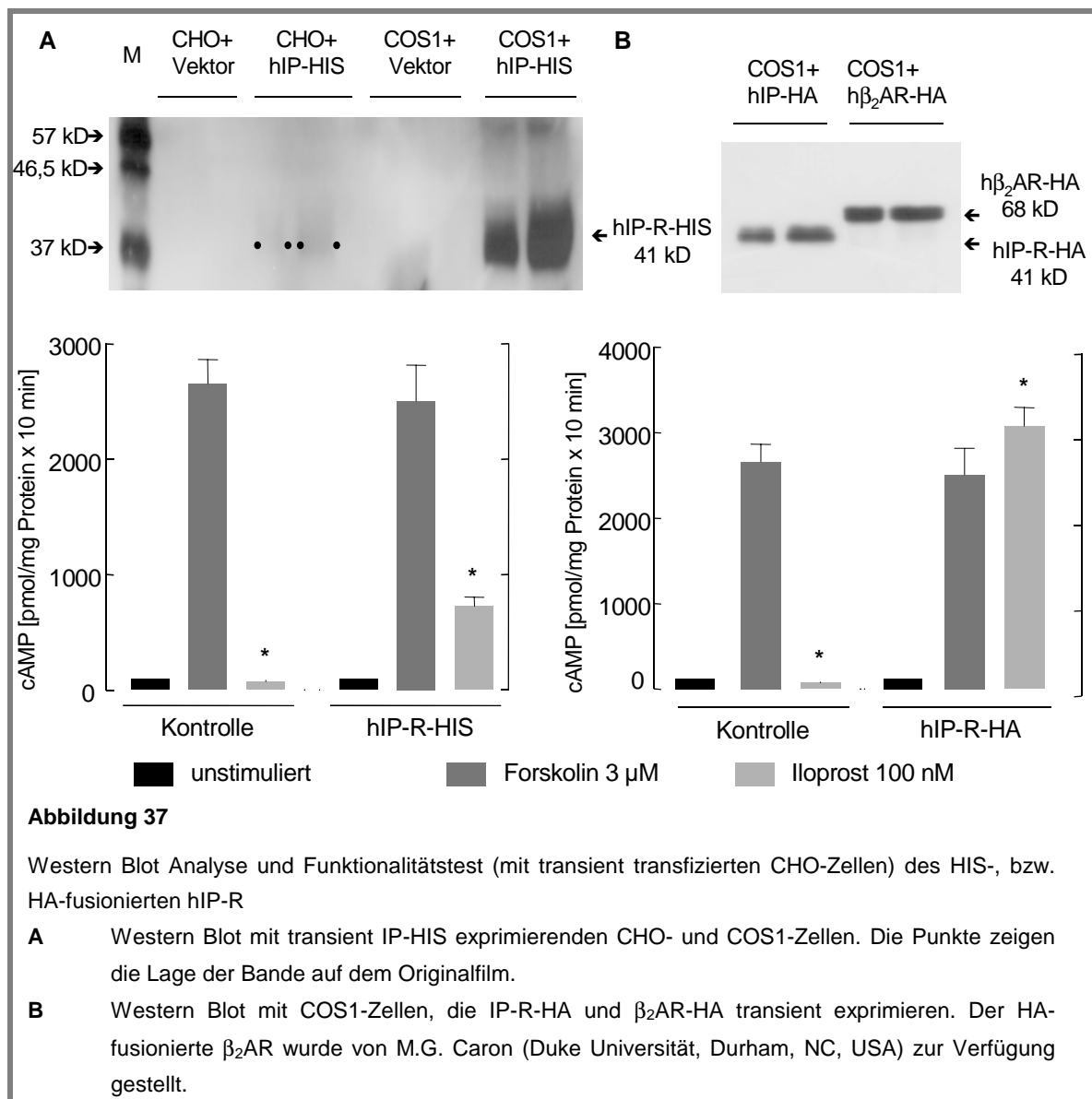
vermindert. Wie in den Fibroblasten resensibilisiert hpIP-R innerhalb von 24 h, so dass dann wieder eine cAMP-Bildung durch den Rezeptor von 82 % bzw. 91 % gemessen werden kann. Die Resensibilisierung erfolgte aber nicht in Iloprost oder Cycloheximid behandelten Zellen. So kann auch hier hauptsächlich von einer Rezeptor-Neusynthese zur Signalwiederherstellung ausgegangen werden. Das Resensibilisierungsverhalten von hIP-R in den beiden pulmonalen Zelllinien ist vergleichbar mit dem in der Fibroblastenzelllinie NF29.



### 3.9 Fusion weiterer Epitope an hIP-R

Der direkte Nachweis des IP-Rezeptors im Western Blot war bisher nicht möglich, da keine Antikörper vorhanden waren. Durch die Fusion von Epitopen ist ein indirekter Nachweis des Rezeptors möglich, da sich das Fusionsprotein mit Hilfe geeigneter Säulen aufreinigen und im Western Blot indirekt mit Antikörpern gegen das entsprechende Epitop nachweisen lässt.

Der IP-Rezeptor wurde C-terminal im Vektor pcDNA3 mit sechs Histidinen (6xHIS) markiert (hIP-R-HIS). In einer weiteren Klonierung wurde ein Hämagglutinin (HA)-Epitop N-terminal an IP-R fusioniert (HA-hIP-R). Die Klonierungen wurden durch Sequenzierung kontrolliert und CHO- und COS1-Zellen transient mit den Plasmiden transfiziert. Zur Überprüfung der Proteinexpression wurden Proteinextrakte der Zellen über unterschiedliche Säulen (HA-Matrix bzw. Nickel-NTA-Agarose) aufgereinigt. Im Western Blot wurde die Expression des fusionierten Rezeptors mit einem Anti-HIS- bzw. Anti-HA-Antikörper nachgewiesen und die funktionelle Aktivität im cAMP-Assay überprüft (Abb. 37).



Die bisher in der Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass hIP-R nicht dem „klassischen“ Desensibilisierungsmodell folgt, das für die meisten GPCRs beschrieben ist. Weder eine Beteiligung von Arrestin oder GRKs konnte nachgewiesen werden. Somit ist zukünftig für die weitere Aufklärung des Mechanismus wichtig, neue Proteine zu ermitteln, die an der Desensibilisierung beteiligt sind. Durch die Klonierung der Fusionsproteine an IP-R ist für weiterführende Untersuchungen u.a. die Methode der Immunopräzipitation anwendbar, um neue Komponenten zu identifizieren, die mit dem Rezeptor in Wechselwirkung treten. Denn auch durch eine mögliche Hemmung der Komponenten der Desensibilisierungsmaschinerie könnte die therapeutische Wirkung von Prostacyclin erhöht werden.



## 4 DISKUSSION

Für den klinischen Einsatz von PGI<sub>2</sub>-Mimetika ist die gefäßrelaxierende und antimittogene Wirkung der Substanz von großem Interesse. Allerdings sind die Erfolge bei der Behandlung von Erkrankungen wie der pulmonalen Hypertonie, Restenose und peripheren Durchblutungsstörungen nicht immer überzeugend. Dazu gehört u.a. die des öfteren beobachtete Notwendigkeit einer beständigen Dosiserhöhung. Die unterschiedlichen Behandlungserfolge könnten in einer verminderten Signaltransduktion durch den Prostacyclin-Rezeptor nach Applikation des Therapeutikums begründet sein. Es stellt sich daher die Frage, ob das auch *in vivo* die Folge einer Desensibilisierung des Prostacyclin-Rezeptors ist. Auch bei der Suche nach neuen Rezeptor-Agonisten wurde eine mögliche Desensibilisierung von IP-R bisher nicht berücksichtigt. In dieser Arbeit wurde daher der Frage nachgegangen, ob die verminderte Signaltransduktion nach längerer Agonisten-Stimulation auf einer Desensibilisierung von hIP-R beruht. Ein Vergleich mit dem „klassischen“ Desensibilisierungsmodell des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors soll Aufschluss über mögliche Mechanismen der Desensibilisierung von hIP-R geben. Um PGI<sub>2</sub>-Mimetika effektiver bei der Behandlung einzusetzen, ist auch die Wiederherstellung der Signaltransduktion (Resensibilisierung) durch hIP-R von Bedeutung. Durch entsprechende applikationsfreie Behandlungszeiten könnten Dosiserhöhungen vermieden werden. Anwendung finden diese Erkenntnisse im letzten Teil der Arbeit, der sich mit dem Einsatz von PGI<sub>2</sub>-Mimetika bei der pulmonalen Hypertonie beschäftigt. In Primärkulturen aus Lungengewebe wurde gezeigt, dass auch hier die De- und Resensibilisierung von hIP-R die Wirkung der verabreichten Medikamente beeinflussen kann.

### 4.1 Expression und Funktionalität des Prostacyclin-Rezeptors

Mit Hilfe der RT-PCR wurde der Rezeptor sowohl im stabil IP-R exprimierenden CHO-Zell-System nachgewiesen, als auch seine endogene Expression in den Fibroblasten-Zelllinien NF29 und CRL1635 und den pulmonalen Zelltypen hpAdv und hpSMC. Funktionell zeigen die Rezeptoren in den unterschiedlichen Systemen eine vergleichbare cAMP-Bildung nach Agonisten-Stimulation. Die natürlichen Zell-Systeme der Fibroblasten und glatten Gefäßmuskelzellen bieten den Vorteil, dass alle an dem Vorgang beteiligten Proteine vorhanden sind und im natürlichen stöchiometrischen Verhältnis zueinander stehen. Die Stöchiometrie von Komponenten des Signalweges und die mögliche Kompartimentierung der Zelle beeinflussen nach heutiger Meinung viele Vorgänge. So wird z.B. das Verhältnis von Rezeptor : G-Protein : Adenylatzyklase in verschiedenen Zelltypen mit 1 : 100 : 3 angegeben.

Die maximale Effizienz dieses Systems hängt also von Rezeptor und Adenylatzyklase ab. Diese Relationen können aber in den unterschiedlichen Zelltypen und G-Protein-Systemen variieren (Ostrom et al., 2000). Die Kompartimentierung und damit die Einteilung der Zelle in „Mikrodomänen“ wird als ein Grund für den unterschiedlichen Ablauf von Signaltransduktionsvorgängen gesehen. Dies ist z.B. beim  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor der Fall, die nach ihrer Stimulation unterschiedliche Signalwege in der Zelle induzieren, obwohl beide an  $G_s$ -gekoppelt sind (Kuschel et al., 1999). So können Daten aus modifizierten (nicht natürlichen) Zell-Systemen durch veränderte Verteilungsverhältnissen und mögliche Unterschiede in der Gesamtorganisation der beteiligten Proteine nicht immer die *in vivo* ablaufenden Vorgänge widerspiegeln.

#### **4.2 Wirkung von Prostacyclin-Mimetika auf die Signaltransduktion des Prostacyclin-Rezeptors**

Die Versuche mit humanen Fibroblasten zeigen deutlich, dass eine Vorinkubation der Zellen mit 100 nM Iloprost schon nach wenigen Stunden zu einer verminderten Signalweiterleitung und damit zu einer reduzierten cAMP-Bildung nach Stimulation des Prostacyclin-Rezeptors führt. Diese Beobachtung ist in den mit dem Rezeptor stabil transfizierten CHO-Zellen nicht so deutlich. Erst nach einer längeren Vorstimulation von ca. 15 h kann eine geringere Rezeptor-vermittelte cAMP-Bildung gemessen werden. Dies könnte zum einen an dem künstlichen Zellsystem liegen, das nicht alle benötigten Komponenten der Desensibilisierungsmaschinerie exprimiert. Wie in 4.1 ausgeführt ist das richtige stöchiometrisches Verhältnis der beteiligten Proteine in der Zelle wichtig. Zum anderen könnte der Rezeptor so massiv in den CHO-Zellen exprimiert werden, dass der noch nicht desensibilisierte Teil der Rezeptoren noch eine starke cAMP-Antwort liefert. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass IP-R eine homologe, d.h. vom Agonisten-induzierte Langzeit-Desensibilisierung durchläuft, die sich in einer verminderten Signalweiterleitung durch den Rezeptor zeigt.

Desensibilisierungskinetiken für den Prostacyclin-Rezeptor liegen nur für wenige Zelllinien vor. 1982 zeigten Kenimer et al., dass die Stimulation von Neuro-Glioblastom Tumorzellen NG108-15 mit  $PGE_1$ , einem mit Prostacyclin verwandten Agonisten, über 16 h zum Verlust der durch  $PGE_1$  stimulierbaren Rezeptoren, d.h. dem Prostacyclin- und EP-Rezeptoren, führt. Blair et al. (1982) fanden ähnliche Ergebnisse in der neuronalen Zelllinie NCB-20 nach einer Vorinkubation von 16 h mit Carbacyclin, einem für IP-R schwach spezifischen Prostacyclin-Analogon. Krane et al. (1994) führten ebenfalls Desensibilisierungsversuche in NG108-15

Zellen durch. Sie behandelten die Zellen für 17 h mit Iloprost vor, wobei die Konzentration mit 10  $\mu\text{M}$  recht hoch gewählt wurde. Hierbei ist nicht auszuschließen, dass Effekte durch eine mögliche PLC- und der damit einhergehenden PKC-Aktivierung zu beobachten sind. Sie fanden eine verminderte IP-R-vermittelte cAMP-Antwort, wobei die basale Aktivität der Adenylatzyklase durch die Vorinkubation nicht beeinflusst wurde. Die Gruppe um FitzGerald zeigten als einzige Arbeitsgruppe eine sehr schnelle Kurzzeit-Desensibilisierung des Prostacyclin-Rezeptors in HEK 293-Zellen, die hIP-R stabil exprimierten (Smyth et al., 1998). Hier war die Rezeptor-vermittelte cAMP-Bildung bereits nach einer Vorinkubation von 30 sec mit 1  $\mu\text{M}$  Iloprost im Vergleich zu den nicht vorbehandelten Zellen um mehr als das Doppelte reduziert.

Betrachtet man die Konzentrations-abhängige Stimulation von IP-R, so ist sowohl bei den in dieser Arbeit verwendeten Fibroblasten und dem von der FitzGerald-Gruppe verwendeten HEK 293-System eine Reduktion der Iloprost-vermittelten Adenylatzyklase-Aktivität nach entsprechender Vorbehandlung der Zellen zu sehen. Hier zeigt sich allerdings wieder die verschiedenen Zeitabläufe der Zellsysteme bei der Rezeptor-Desensibilisierung. In Fibroblasten ist die Rezeptor-vermittelte maximale cAMP-Antwort nach 3-stündiger Vorinkubation mit 100 nM Iloprost auf 66 % herabgesetzt, nach 6-stündiger Vorinkubation auf 26 %. Im HEK 293-System dagegen kann die Reduzierung der Maximalwerte schon nach einer 10-minütigen Vorinkubation beobachtet werden. Obwohl im letzteren Fall eine Iloprost-Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  verwendet wurde, ist nicht zu erwarten, dass diese Konzentration den Desensibilisierungsvorgang in den Fibroblasten stark beschleunigen würde.

### 4.3 Desensibilisierung von hIP-R auf Rezeptorebene

In Säugetierzellen sind bisher neun Isoformen der membran-assoziierten Adenylatzyklase (AC1 bis AC9) beschrieben. Sie werden in unterschiedlichen Mengen in allen Geweben und Organen exprimiert. Dabei ist die hohe Komplexität des Adenylatzyklase-Systems zu berücksichtigen, die die Voraussetzung für die Bindung der unterschiedlichsten Aktivatoren und Inhibitoren des Systems ist. Zu den möglichen Effektoren zählen die Untereinheiten der G-Proteine ( $G_{s\alpha}$ ,  $G_{i\alpha}$  und  $G_{\beta\gamma}$ ), das Diterpen Forskolin, die second messenger kinasen PKC und PKA und der sekundäre Botenstoff  $\text{Ca}^{2+}$ , die alle an unterschiedliche Domänen des Adenylatzyklase-Proteins binden können. Die Regulation der ACs kann zum einen auf Genebene stattfinden, wird aber hauptsächlich durch die Bindung der verschiedenen Effektoren beeinflusst (Hurley, 1999; Defer et al., 2000). Die IP-R-vermittelte PKA-Aktivierung durch den erhöhten cAMP-Spiegel in der Zelle kann zu einer Bindung der Kinase an die Adenylatzyklase führen. Daher ist es auch

denkbar, dass die verminderte cAMP-Bildung durch den IP-Rezeptor nach Vorinkubation mit seinem Agonisten auf eine veränderte Aktivität der Adenylatzyklase durch Phosphorylierung zurückzuführen ist. Bei den Isoformen AC5 und AC6 ist eine Hemmung der katalytischen Aktivität durch die Phosphorylierung mittels PKA beschrieben (Iwami et al., 1995; Chen et al., 1997).

Zur Überprüfung der Ansprechbarkeit des Adenylatzyklase-Systems nach Behandlung der Zellen mit Iloprost eignet sich eine Stimulation der Zellen im cAMP-Assay mit Forskolin. Die Substanz ist ein hydrophobes Diterpen und aktiviert die AC durch direkte Bindung an das hochkonservierte katalytische Zentrum. Bis auf AC9 sind alle Isoformen aktivierbar, wenn auch der Grad der Aktivierung unterschiedlich ist (Seamon et al., 1981; Hurley, 1999). Falls die Vorinkubation mit Iloprost das AC-System für eine weitere Stimulation nicht mehr ansprechbar machen sollte, würde eine anschließende Forskolin-Behandlung der Zellen nicht zu einer cAMP-Erhöhung in der Zelle führen. Nach Vorstimulation ist aber in den Fibroblasten eine Forskolin-vermittelte cAMP-Bildung messbar. Auffällig ist ein Anstieg der Forskolin-vermittelte cAMP-Bildung um 50 % nach einer 1-stündigen Vorinkubationszeit mit Iloprost, die sich aber im Verlauf der Kinetik wieder der cAMP-Ausgangskonzentration der nicht-vorbehandelten Zellen anpasst. In der Literatur ist diese cAMP-Erhöhung nach zusätzlicher Rezeptor-Stimulation u.a. von Alousi et al. (1991) beschrieben. Diese Autoren zeigten, dass die Wirkung von Forskolin auf die cAMP-Bildung erhöht wird, wenn die Adenylatzyklase zusätzlich mit  $G_s$  interagiert. Im Verlauf der Kinetik nimmt dieser Effekt in den Fibroblasten ab, möglicherweise durch die einsetzende Rezeptor-Desensibilisierung und der damit einhergehenden Entkopplung des Rezeptors vom  $G_s$ -Protein. Denkbar ist auch, dass andere Vorgänge, wie eine mögliche Phosphorylierung der AC durch die aktivierte PKA, der weiteren Bindung von  $G_s$  entgegenwirken. Insgesamt kann aber festgestellt werden, dass die Desensibilisierung von hIP-R auf Rezeptorebene verläuft.

#### 4.4 IP- und $\beta_2$ -adrenerger Rezeptor

Der  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor ist zur Zeit das am besten untersuchte Modellsystem zur Desensibilisierung von GPCRs. Beschrieben wurde dieses Phänomen schon 1976 durch Mukherjee und Lefkowitz an isolierten Erythrozyten-Membranen aus dem Frosch. Für  $\beta_2$ AR ist in vielen Zelllinien eine schnelle Kurzzeitdesensibilisierung beschrieben. Auf den hier verwendeten Fibroblasten-Zelllinien wurde auch die endogene Expression des ebenfalls  $G_s$ -gekoppelten  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors nachgewiesen. Im Vergleich mit IP-R zeigte sich

zunächst, dass die Stimulation von  $\beta_2$ AR durch 1  $\mu$ M Isoprenalin zu einer geringeren cAMP-Bildung führt verglichen mit einer Stimulation durch Iloprost. Deutliche Unterschiede ergeben sich im Verlauf der Desensibilisierungskinetiken: die  $\beta_2$ AR-vermittelte cAMP-Antwort ist schon nach 15-minütiger Vorinkubation der Fibroblasten mit 1  $\mu$ M Isoprenalin um die Hälfte reduziert. Nach 3 h ist eine Rezeptor-vermittelte cAMP-Bildung kaum mehr messbar. Dies spiegelt sich auch in der konzentrationsabhängigen Stimulation von  $\beta_2$ AR wieder. Die maximale cAMP-Bildung ist nach einer 3-stündigen Vorinkubation der Zellen von 100 % auf 17 % reduziert.

Die schnelle Kurzzeit-Desensibilisierung von  $\beta_2$ AR wird in dem hier verwendeten Zellsystem auch sichtbar, wenn man jeweils die Kinetiken der Rezeptor-vermittelten cAMP-Bildung über 30 min betrachtet. Die  $\beta_2$ AR-vermittelte cAMP-Bildung erreicht schon nach 5 min ihr Maximum. Es scheinen keine durch Isoprenalin ansprechbaren Rezeptoren mehr zur Verfügung stehen. Die IP-R- und auch Forskolin-vermittelte cAMP-Bildung dagegen folgt einem linearen Verlauf. Diese Kinetik der cAMP-Entstehung bestätigt auch die nicht vorhandene Kurzzeitdesensibilisierung von IP-R in den Fibroblasten.

#### 4.5 Lokalisation und Internalisierung von hIP-R

Die Kopplung an GFP eignet sich sehr gut, um Proteine zu lokalisieren und ihre mögliche Translokation intrazellulär zu verfolgen (Kallal und Benovic, 2000). Für viele GPCRs wurde so die Internalisierung nach ihrer Stimulation nachgewiesen. Dazu zählen z.B. die  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren (Barak et al., 1997; Awaji et al., 1998) oder auch der Secretin-Rezeptor (Walker et al., 1999). Die Überprüfung des Rezeptor-GFP-Konstrukts im cAMP-Assay zeigte, dass die GFP-Fusion am C-Terminus von hIP-R die Kopplung an  $G_s$  nicht beeinflusst. Im konfokalen Lasermikroskop wurde die Membran-Lokalisation von IP-R mit Hilfe des GFP-Proteins gezeigt. Nach seiner Stimulation wird der Rezeptor internalisiert, wobei sich vesikuläre Strukturen ausbilden. Das Auftreten deutlicher Vesikel nach 6- bis 8-stündiger Behandlung der Fibroblasten mit Iloprost läuft dabei parallel mit der Desensibilisierungskinetik von hIP-R.

Die Aktivierung und Internalisierung wird bei einigen Rezeptoren mit der sogenannten DRY-Sequenz in Zusammenhang gebracht, einer hochkonservierten Domäne einiger GPCRs. Sie kann je nach Rezeptortyp an unterschiedlichen Stellen im Rezeptor vorkommen. Beim  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor und den muskarinergen Rezeptoren befindet sie sich in der 3. intrazellulären Schleife (Samama et al., 1993; Moro et al., 1993), beim Chemokin-Rezeptor CXCR2 in der 2.

intrazellulären Domäne (Burger et al., 1999). Besonders gut ist die Bedeutung dieser Sequenz für den  $\alpha_{1b}$ -adrenergen Rezeptor untersucht, bei dem sie am Ende der 3. transmembranen Domäne zum Zytoplasma hin liegt. Dabei zeigte sich, dass eine Mutation in dieser Region zur konstitutiven Aktivierung des Rezeptors führt (Scheer et al., 1996) und durch die Mutation Phosphorylierung und Internalisierung des Rezeptors vermindert werden (Mhaouty-Kodja et al., 1998). Der Prostacyclin-Rezeptor wird aber internalisiert, ohne eine solche Sequenz aufzuweisen.

#### **4.6 Beteiligte Proteine an der Desensibilisierung von hIP-R**

Dem Mechanismus der  $\beta_2$ AR-Desensibilisierung folgen viele GPCRs. Eingeleitet wird dieser Vorgang durch die Phosphorylierung des Rezeptors durch second messenger Kinasen oder auch alternativ durch G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs). Die dadurch ausgelöste Entkopplung des Rezeptors von seinem G-Protein beendet kurzfristig das Signal des aktivierten Rezeptors. Der längerfristigen Signalabschaltung durch eine Rezeptor-Internalisierung geht oft eine Bindung von Arrestin-Proteinen am C-Terminus des Rezeptors voraus. Diese vermitteln die Clathrin-Bindung und damit die Entstehung von Clathrin-beschichteten Vesikeln, die der Endozytose des Rezeptors dienen. Es stellte sich die Frage, ob die Desensibilisierung von hIP-R diesem „klassischen“ Modell folgt.

##### **4.6.1 Beteiligung von second messenger Kinasen**

Second messenger Kinasen spielen eine Schlüsselrolle bei der intrazellulären Signalweiterleitung. Auf der eine Seite können sie durch Phosphorylierung bestimmter Zielproteine Signalwege aktivieren, zum anderen auch die Signalweiterleitung beenden, z.B. durch die Phosphorylierung aktivierter GPCRs. Eine PKA- oder PKC-vermittelte Phosphorylierung ist für die meisten Rezeptoren beschrieben.

Für den  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor wurde sowohl eine homologe als auch eine heterologe Desensibilisierung gezeigt. Die homologe Desensibilisierung erfolgt durch GRK-vermittelte Phosphorylierung des aktivierten, Liganden-besetzten Rezeptors (Inglese et al., 1993). Dagegen kann der nicht-aktivierte Rezeptor auch durch eine PKA-vermittelte Phosphorylierung heterolog desensibilisiert werden. Diese unterschiedlichen Mechanismen sind abhängig von der Konzentration des Agonisten, wobei bei  $\beta_2$ AR die Phosphorylierung durch GRK2 schneller erfolgt als durch PKA (Hausdorff et al., 1990; Roth et al., 1991). Zusätzlich erlaubt die heterologe Desensibilisierung den „crosstalk“ zwischen unterschiedlichen Rezeptorfamilien. So kann z.B. eine Aktivierung des Prostacyclin-Rezeptor indirekt durch die nachfolgende cAMP-

Erhöhung und PKA-Aktivierung die  $\alpha$ -Isoform des Thromboxan A<sub>2</sub> Rezeptors desensibilisieren (Walsh et al., 2000). Da der Prostacyclin-Rezeptor keine Phosphorylierungssequenz der PKA aufweist, wäre nur ein indirekter Einfluss von cAMP / PKA auf die Desensibilisierung des Rezeptors denkbar. Die in den NF29 Fibroblasten durchgeführten Untersuchungen mit myr-PKI, einem Inhibitor der PKA, bestätigen auch die Nicht-Beteiligung von PKA an der Desensibilisierung von hIP-R. Der Einfluss von cAMP auf die Rezeptordesensibilisierung wurde durch Vorstimulation der Zellen mit Forskolin untersucht. Diese „künstliche“ cAMP-Erhöhung führte aber auch nicht zu einer veränderten cAMP-Bildung durch den IP-Rezeptor. Dabei ist aber wiederum ein Anstieg der cAMP-Konzentration, wie in 4.6 schon diskutiert, zu beobachten, dieses Mal aber vermittelt durch den Rezeptor. Auch hier scheint wieder die gleichzeitige Bindung von Forskolin *und* G<sub>s</sub>-Protein die Adenylatzyklase zu sensibilisieren und auch hier hält der Effekt nur während der 1- bis 2-stündigen Vorinkubation mit Forskolin an. Dann erreicht die Rezeptor-vermittelte cAMP-Konzentration wieder den Ausgangswert der nicht vorbehandelten Zellen. Somit findet beim Prostacyclin-Rezeptor keine cAMP / PKA-abhängige heterologe Desensibilisierung statt.

Der Einfluss der PKC scheint eher wahrscheinlich, da der Rezeptor drei mutmaßliche Phosphorylierungssequenzen für die Kinase aufweist. Smyth et al. (1996) zeigten, dass ein HA-gekoppelter IP-Rezeptor, der stabil in HEK 293-Zellen überexprimiert wurde, zeit- und konzentrationsabhängig nach Iloprost-Stimulation phosphoryliert wird. In einer weiteren Arbeit wiesen sie nach, dass ein C-terminal truncierter IP-Rezeptors nach Stimulation mit 1  $\mu$ M Iloprost weder phosphoryliert noch desensibilisiert wurde. Durch anschließende Mutagenese der zwei im C-Terminus lokalisierten mutmaßlichen Phosphorylierungsstellen, konnte Serin 328 als Ziel der PKC identifiziert werden. Die Mutante wurde erheblich weniger phosphoryliert und zeigte eine vermindertes Desensibilisierungsverhalten im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor (Smyth et al., 1998). Es stellte daher die Frage, ob PKC auch im natürlichen Fibroblasten-System eine solche Rolle zukommt. Die PKC-Isoformen können in drei große Gruppen eingeteilt werden: „konventionelle“ (c)PKCs ( $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\gamma$ ), „neue“ (n)PKCs ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\eta$ ,  $\mu$ ) und „atypische“ (a)PKCs ( $\lambda/1$ ,  $\zeta$ ). Die drei Gruppen unterscheiden sich in der Art ihrer Aktivierung. cPKCs sind die durch Phosphatidylserin, Ca<sup>2+</sup> oder Diacylglycerol (DAG) aktivierbaren Isoformen. Die Kinaseaktivität der nPKCs ist Ca<sup>2+</sup>-unabhängig und nur Phosphatidylserin- oder DAG-abhängig, aPKCs benötigen nur Phosphatidylserin (Sugden und Bogoyevitch, 1995). Um den Einfluss der PKC auf das Desensibilisierungsverhalten des hIP-R bei NF29 Fibroblasten zu überprüfen, wurde das DAG-Analogon PMA, ein direkter Aktivator der c und nPKC, eingesetzt. Eine Aktivierung der PKC durch 30-minütige Behandlung der

Fibroblasten mit PMA führte nicht zu einer geringeren IP-R-vermittelten, konzentrationsabhängigen cAMP-Bildung im Vergleich zu PMA-unbehandelten Zellen. Eine heterologe, PKC-abhängige Desensibilisierung von IP-R kann daher nicht beobachtet werden. Zur Untersuchung der homologen Desensibilisierung wurde PMA zur PKC-Aktivierung vor der Desensibilisierungskinetik mit Iloprost zugesetzt. Im anschließenden Assay wurde die Iloprost-induzierte cAMP-Entwicklung in den Kontrollzellen (= nicht mit Iloprost vorstimuliert, nur PMA-behandelt) durch die PMA-Behandlung nicht vermindert. Nach Voraktivierung des Rezeptors für 1 h bis 6 h mit Iloprost wurde die Desensibilisierung durch die zusätzliche PMA-Behandlung beschleunigt. Dieser additive Effekt deutet auf eine Beteiligung der PKC an der Desensibilisierung von IP-R in Fibroblasten hin. Allerdings konnte der Einsatz des PKC-Inhibitors GF 109203X die Desensibilisierung von hIP-R auf cAMP-Ebene nicht verhindern. Dies kann mit der Kopplung des Rezeptors an unterschiedliche G-Proteine erklärt werden. Die in diesem System verwendete Iloprost-Konzentration von 100 nM führt nach Stimulation des Prostacyclin-Rezeptors an die Kopplung von  $G_s$ , nicht aber an  $G_q$ . Auf diesem Wege findet *in vivo* keine PKC-Aktivierung statt. Die beobachtete homologe Desensibilisierung des Rezeptors ist daher unter den hier gewählten Versuchsbedingungen PKC-unabhängig. Daneben scheint aber ein PKC-abhängiger Weg zu existieren: wird die PKC „künstlich“ durch PMA aktiviert, so kann diese Aktivierung die Beschleunigung der Desensibilisierung des Rezeptors bewirken, auch nach Behandlung der Zellen mit nur 100 nM Iloprost. *In vivo* bedeutet dies, dass durch die Kopplung des Rezeptors an  $G_q$  bei hohen Agonistenkonzentrationen und der nachfolgenden PKC-Aktivierung ein anderer, PKC-abhängiger Weg bei der Desensibilisierung beschritten werden kann. Es stellt sich natürlich die Frage, welcher Mechanismus dem alternativen, PKC-unabhängigen Weg zugrunde liegt. Daran könnte ein Protein beteiligt sein, das nur für die Desensibilisierung des Prostacyclin-Rezeptors zuständig ist. Die muskarinergen Rezeptoren sind zur Zeit die einzigen GPCRs, bei denen die Beteiligung einer solchen Rezeptorspezifischen Kinase nachgewiesen werden konnte. Dabei handelt es sich um die Caseinkinase 1 $\alpha$  (CK1 $\alpha$ , vormals Muskarin-Rezeptor Kinase MRK), die den m3 muskarinergen Rezeptor, alternativ zu den GRKs, Agonisten-abhängig phosphorylieren kann (Tobin et al., 1997). Dieser Vorgang, der auch beim m1 muskarinergen Rezeptor gezeigt werden konnte, führt durch die Entkopplung des Rezeptors von G-Protein zu seiner Desensibilisierung (Waugh et al., 1999). Der Einfluss von CK1-Homologen auf die Desensibilisierung von GPCRs wurde auch in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen. Dort ist sie an der funktionellen Regulierung des  $\alpha$ -Faktor Pheromon-Rezeptors Ste2p beteiligt (Hicke et al., 1998). Solche Rezeptor-spezifischen Kinasen könnten, neben



second messenger Kinasen und GRKs, alternativ zu einer Desensibilisierung des Prostacyclin-Rezeptors und anderer GPCRs führen.

#### 4.6.2 Beteiligung von GRKs

GRKs sind massgeblich an der Phosphorylierung und damit an der Desensibilisierung vieler G-Protein gekoppelter Rezeptoren beteiligt. Beschrieben ist diese Art der Rezeptorphosphorylierung z.B. beim  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor (Lohse et al., 1990), dem muskarinergen Acetylcholin Rezeptor (Haga et al., 1996) und dem Secretin-Rezeptor (Shetzline et al., 1998). Für diesen recht schnell nach der Rezeptoraktivierung ablaufenden Vorgang müssen verschiedene Voraussetzungen erfüllt sein. Zunächst werden die GRKs durch die  $\beta\gamma$ -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins aktiviert, die nach Rezeptorstimulation von der  $\alpha$ -Untereinheit abdissoziiert. GRK5 ist eine membranständige Kinase, wohingegen GRK2 nach Aktivierung vom Zytoplasma zur Zellmembran transloziert (Pronin et al., 1998; Aragay et al., 1998). GRKs phosphorylieren nur den aktiven Rezeptor, wobei dies vornehmlich für GRK2 und GRK5 beschrieben ist. Dabei kann man die bisher untersuchten Rezeptoren in zwei Gruppen einteilen. Bei der einen Gruppe befinden sich die potentiellen GRK2-, bzw. GRK5-Phosphorylierungsstellen im C-Terminus des Rezeptors (Thrombin-Rezeptor, Prostaglandin EP<sub>2</sub> Rezeptor,  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -adrenerger Rezeptor), bei der anderen Gruppe in der 3. intrazellulären Domäne ( $\alpha$ -adrenerge Rezeptoren, Dopamin-Rezeptoren, muskarinerge Rezeptoren ( $m_1$  bis  $m_4$ )) (Eason et al., 1995). Verschiedene Untersuchungen zeigen die Beteiligung von GRKs an Herzerkrankungen wie Hypertonie (Gros et al., 1999), regionaler Ischämie (Ungerer et al., 1996) oder Herzinsuffizienz (Iaccarino et al., 1998). Die Existenz von sieben GRKs ist zur Zeit beschrieben, wobei GRK2, GRK3 und GRK5 hauptsächlich im Herzen exprimiert werden (Lohse, 1995). GRK2 nimmt dabei eine herausragende Position ein, da die Überexpression und -Aktivität von GRK2 zur Desensibilisierung von  $\beta_2$ AR führen kann. Die Ausschaltung des  $\beta$ -adrenergen Signalsystems führt zu einer Dysfunktion des Herzens (Koch et al., 1995; Choi et al., 1997). Mäuse, die eine heterozygote Deletion für GRK2 trugen, waren in ihrer Entwicklung nicht auffällig, die mit einer homozygoten Deletion dagegen nicht lebensfähig.

Da eine Vielzahl von Rezeptoren auf diesem Wege phosphoryliert wird, einschließlich des Prostaglandin EP<sub>2</sub>-Rezeptors, erschien es sinnvoll diesen Weg auch beim hIP-Rezeptor zu überprüfen. Dabei scheidet eine Phosphorylierung in der 3. intrazellulären Domäne von IP-R aus, da die von Eason et al. (1995) beschriebenen Erkennungssequenzen für die Phosphorylierung durch GRKs nicht vorhanden sind. Obwohl diese innerhalb der Rezeptortypen variieren, folgen bei den beschriebenen Erkennungssequenzen zwei Serin-Reste

aufeinander. IP-R weist in der 3. intrazellulären Domäne nur einen Serin-Rest (Serin 223) auf. Dagegen sind im C-Terminus verschiedener Rezeptoren auch Phosphorylierungssequenzen mit einzelnen Serinen beschrieben, die auch bei IP-R zu finden sind. Stellvertretend für die GRKs wurde die Beteiligung von GRK2 und GRK5 an der Desensibilisierung von hIP-R untersucht. Dabei zeigten sich große Unterschiede in der Expression der beiden Kinasen. Während GRK2 in allen hier untersuchten Zelllinien stark endogen exprimiert wird, ist die Expression von GRK5 in keiner der Zelllinien nachzuweisen. Entsprechend gut liess GRK5 sich im natürlichen Fibroblasten-System durch Transfektion überexprimieren. Im Falle von GRK2 konnte nur eine minimale Erhöhung der Proteinexpression erzielt werden. Bei einer Beteiligung der beiden Kinasen an der Desensibilisierung von hIP-R sollte sich dies durch ihre Überexpression in einer Beschleunigung der Desensibilisierungskinetik ausdrücken. Dies konnte aber weder durch eine Überexpression von GRK2 noch durch GRK5 erzielt werden. Betrachtet man zudem die relativ langsame Kinetik von hIP-R, aber die starke endogene Expression von GRK2, so deutet dies schon auf eine Nicht-Beteiligung der Kinase hin, da die Phosphorylierung durch die GRKs innerhalb einer kurzen Zeit nach Rezeptoraktivierung erfolgt.

#### **4.6.3 Beteiligung von Arrestinen**

Benovic et al. beschrieben 1987 erstmals, dass GRKs nicht allein an der Beendigung der Signaltransduktion von GPCRs beteiligt sind. Versuche mit isolierten  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren und retinalem („visual“) Arrestin, das an der Desensibilisierung des Rhodopsin-Rezeptors beteiligt ist, führten zur Entdeckung der Familie der Arrestinproteine. 1990 klonierten Lohse et al. das zum retinalen Arrestin homologe  $\beta$ -Arrestin. In einer weiteren Arbeit konnten sie zeigen, dass  $\beta$ -Arrestin vornehmlich bei der GRK-, nicht aber bei der PKA-vermittelten Rezeptorphosphorylierung des  $\beta_2$ AR eine Rolle spielt (Lohse et al., 1992). Arrestin ist ein zytosolisches Protein, das in mehreren Spleissvarianten vorkommt (Sterne-Marr et al., 1993). Seine Aufgabe besteht darin, zusammen mit GRKs die intrazelluläre Signalweiterleitung des Rezeptors zu beenden, indem die Wechselwirkung zwischen Rezeptor und G-Protein verhindert wird. Für diesen Vorgang wird folgendes Modell für verschiedene GPCRs beschrieben, das aus mehreren Teilschritten besteht. Die Aminosäuresequenz von Arrestin weist eine Phosphorylierungserkennungs-Domäne (P-Region) auf, mit der es die GRK-phosphorylierten Serin- / Threonin-Regionen des Rezeptors erkennt. Mit einer zweiten Domäne, der Aktivierungserkennungs-Domäne (A-Region), kann es alternativ aber auch Liganden-besetzte Rezeptoren erkennen und über die 1., bzw. 3. intrazelluläre Schleife mit dem Rezeptor in

Wechselwirkung treten. Arrestin bindet im Falle eines Liganden-besetzten *und* phosphorylierten Rezeptors an beiden Domänen des Rezeptors, was eine Konformationsänderung im Arrestin bewirkt und die Affinität zum Rezeptor erhöht (Gurevich et al., 1995; Ferguson et al., 1996). Neuere Arbeiten beschreiben, dass die DRY-Sequenz, die einige GPCRs aufweisen, auch in die Arrestinbindung involviert ist (Bennett et al., 2000). Für seine weitere Aufgabe besitzt Arrestin im C-Terminus ein Clathrin-Bindemotiv. Dadurch fungiert Arrestin als Adapterprotein zwischen Rezeptor und Clathrinproteinen und kann so die Internalisierung des Rezeptors in Clathrin-beschichteten Vesikeln einleiten (Goodman et al., 1996). Eine Sonderstellung nehmen dabei die muskarinergen Acetylcholin-Rezeptoren ein. Für den humanen m2 muskarinergen Rezeptor ist die Bindung von  $\beta$ -Arrestin nach Phosphorylierung des Rezeptors beschrieben (Gurevich et al., 1993), die in der 3. intrazellulären Domäne stattfindet und GRK2-vermittelt ist (Pals-Rylaarsdam et al., 1995). Neuere Arbeiten zeigen, dass die Internalisierung des phosphorylierten m2 Rezeptors nicht nur dem Arrestin- / Clathrin-abhängigen Weg folgen kann, sondern auch ein alternativer, Arrestin-unabhängiger Weg existiert (Pals-Rylaarsdam et al., 1997). Dies bestätigte sich auch für den m1, m3 und m4 muskarinergen Rezeptor (Lee et al., 1998). Folglich muss einer Phosphorylierung durch GRKs nicht automatisch eine Arrestin-Bindung folgen. Andererseits wurde mit Hilfe einer Mutanten des  $\beta_2$ AR, bei der ein Aminosäureaustausch in der GRK-Bindedomäne vorgenommen wurde, gezeigt, dass eine Arrestin-vermittelte Internalisierung des Rezeptors auch ohne GRK-Phosphorylierung stattfinden kann. Dies beruht auf der Phosphorylierungs-unabhängigen Bindung von Arrestin an den Rezeptor, wenn auch mit einer sehr viel schwächeren Affinität (Ferguson et al., 1996).

Mit Hilfe eines GFP-fusionierten Arrestins lässt sich die Agonisten-vermittelte Translokation von Arrestin zum Rezeptor und damit seine Beteiligung an der Desensibilisierung von GPCRs sichtbar machen (Barak et al., 1997). So konnte die Beteiligung von Arrestinen an der Internalisierung vieler GPCRs gezeigt werden, wie z.B. dem Angiotensin-Rezeptor, Dopamin-Rezeptor, Endothelin Typ A-Rezeptor oder dem Neurotensin-Rezeptor (Zhang et al., 1999). Das GFP-fusionierte  $\beta$ -Arrestin2 wurde auch zur Überprüfung einer möglichen Wechselwirkung von Arrestin und hIP-R in den hier verwendeten Zellsystemen eingesetzt. Die gleichzeitige Expression von  $\beta$ -Arrestin2-GFP und hIP-R in den Fibroblasten und auch den CHO-Zellen führte zu keiner Umverteilung des Arrestins vom Zytoplasma an die Zellmembran. Zur Überprüfung des Systems zeigte eine Expression von h $\beta_2$ AR und  $\beta$ -Arrestin2-GFP in den beiden Zellentypen diese in der Literatur beschriebene Translokation von Arrestin. Dabei bildeten sich vesikuläre Strukturen an der Plasmamembran aus. Dies zeigt eindeutig die Nicht-Beteiligung von  $\beta$ -Arrestin an der Internalisierung von hIP-R.

#### 4.7 Resensibilisierung von hIP-R

Um die weitere zelluläre Signalweiterleitung zu gewährleisten, ist die „Re-Aktivierung“ von internalisierten Rezeptoren ein wichtiger Vorgang. Ein Mechanismus ist das Recycling des Rezeptors, wobei die insgesamt in der Zelle vorhandene Rezeptorzahl gleich bleibt. An diesem Vorgang ist eine G-Protein gekoppelte Rezeptor-Phosphatase, die Protein Phosphatase Typ 2A (PP-2A), beteiligt. Für  $\beta_2$ AR ist beschrieben, dass der Rezeptor nach seiner Internalisierung durch eine pH-Wert-Änderung in den Endosomen eine Konformationsänderung durchläuft, die es der PP-2A möglich macht, den Rezeptor zu dephosphorylieren. Zusätzlich kann hier auch die Dissoziation des Liganden vom Rezeptor stattfinden. Anschließend wandert der Rezeptor an die Zelloberfläche zurück und steht dort für eine erneute Aktivierung zur Verfügung (Krüger et al., 1997). Neuere Arbeiten über den Vasopressin-Rezeptor zeigen eine Variante dieses Recycling-Vorgangs. Während der Vasopressin Typ 1A-Rezeptor den vorher beschriebenen „kurzen Weg“ beschreitet, wird für den Vasopressin Typ 2-Rezeptor (V2R) ein sogenannter „langer Weg“ beschrieben. Dabei sammelt sich der internalisierte V2R zunächst in einem perinukleären Recycling-Kompartiment an, ausgelöst durch die Phosphorylierung einer speziellen „Rückhalte-Domäne“ im C-Terminus des Rezeptors. Es ist noch unbekannt, wie genau die Dephosphorylierung vonstatten geht, die für das spätere Recycling erforderliche ist (Innamorati et al., 2001).

Die Resensibilisierung durch die Neusynthese des Rezeptorproteins stellt den alternativen Weg dar. Vorausgegangen ist hier die „Down“-Regulierung des Rezeptors, die zu einer Reduzierung der Rezeptor-Gesamtzahl in der Zelle führt. Dies geschieht durch die Degradation des Rezeptors, die meist lysosomal, aber auch nach Ubiquitinierung des Rezeptors im Proteasom abläuft. Für manche Rezeptoren sind der Recyclingweg und die Neusynthese nach „Down“-Regulierung beschrieben, abhängig vom Zellsystem und der Dauer der Stimulation durch den Agonisten (Böhm et al., 1997).

Schon die langsame Resensibilisierungskinetik des IP-Rezeptors in den Fibroblasten über 24 h legt die Notwendigkeit der Rezeptor-Neusynthese zur Signalwiederherstellung nahe. Dies konnte durch den Einsatz von Cycloheximid bestätigt werden, da der Proteinsynthese-Inhibitor die Rezeptor-Resensibilisierung verhindert. Die fehlende Kurzzeit-Desensibilisierung von hIP-R spricht auch für eine „Down“-Regulierung, da diese vornehmlich nach längerer Stimulation mit dem Agonisten beobachtet wird. Im Vergleich zu vielen anderen Rezeptoren verläuft die Desensibilisierungskinetik von hIP-R recht langsam und macht somit eine längere Anwesenheit des Agonisten bis zu einer Internalisierung des Rezeptors nötig. So ist eine Internalisierung von 70 % der  $\delta$ OR-Rezeptoren nach 15-minütiger Agonistenbehandlung

gezeigt, die bis zu einer 1-stündigen Stimulation reversibel ist. Nach längerer Stimulation wird die Degradation des Rezeptors eingeleitet (Hasbi et al., 2000). Die Rezeptor-„Down“-Regulierung könnte die oft beobachtete geringere Wirksamkeit von Prostacyclinen nach ihrer mehrmaligen Anwendung erklären. So sollte die längerfristig verminderte Ansprechbarkeit des Rezeptors nach seiner Degradation bei der systemischen Gabe dieser Therapeutika berücksichtigt werden.

#### **4.8 IP-R in pulmonalem Gewebe**

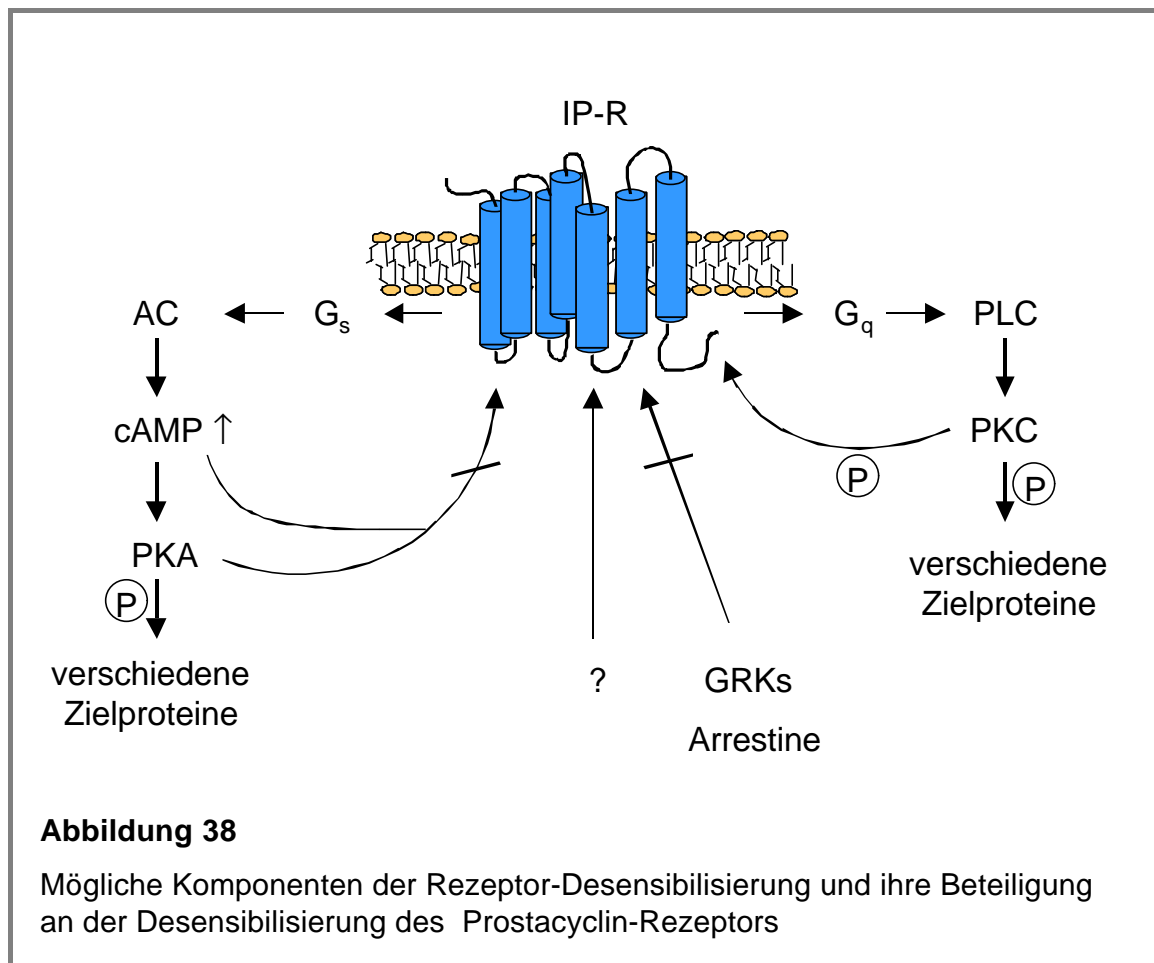
Die Pathophysiologie der pulmonalen Hypertonie beinhaltet u.a. die Vasokonstriktion der Lungengefäße und vaskuläres Remodelling, das letztlich zu irreversiblen Veränderungen der Gefäßwand führt (Archer und Rich, 2000). Therapierbar wird die Krankheit durch den Einsatz des gefäßrelaxierend und antiproliferativ wirkenden Prostacyclins. Nachteilig sind dabei unerwünschte Nebenwirkungen, kurze Wirkzeiten und die Notwendigkeit einer Dosiserhöhung nach längerer Anwendung (Grimminger et al., 1999). Daher ist für diese Krankheit das Verhalten von IP-R im pulmonalen Gewebe von großem Interesse, um durch eine effektivere Anwendung die Behandlungssituation der Patienten zu verbessern. Fortschritte konnten schon durch die Umstellung der PGI<sub>2</sub>-Applikation von intravenöser auf inhalative Verabreichung erzielt werden, da nachteilige systemische Effekte reduziert werden und Probleme in der praktischen Handhabung der Dauerkatheter wegfallen (Olschewski et al., 1996; Mikhail et al., 1997). Zudem waren bei der inhalativen Anwendung geringere Dosen (1.1 ng / kg / min bei inhalativer gegenüber 2.5 ng / kg / min bei intravenöser Applikation) notwendig (Olschewski et al., 1996).

Die in der Arbeit untersuchten Primärkulturen hpSMC und hpAdv aus Arterien der menschlichen Lunge exprimieren IP-R endogen. Die Iloprost-vermittelte cAMP-Bildung ist etwas geringer als in den Fibroblasten-Zelllinien NF29 und CRL1635. Auch in den pulmonalen Zellen durchläuft IP-R eine Agonisten-abhängige homologe Desensibilisierung. Die Zeitkinetik ist mit der in den Fibroblasten-Zelllinien NF29 und CRL1635 vergleichbar, wobei in den pulmonalen Zelllinien die Desensibilisierung in den ersten zwei Stunden schneller verläuft. Dies könnte in einer geringeren Rezeptorzahl auf der Zelloberfläche begründet sein, die möglicherweise auch zu einer geringeren cAMP-Bildung führt. Die Resensibilisierung benötigt auch im pulmonalen Gewebe eine Zeitdauer von 24 h. Der Einsatz von Cycloheximid zeigte, dass wiederum nur die Neusynthese des Rezeptors eine erneute Signaltransduktion über IP-R möglich macht. Dieses De- und Resensibilisierungsverhalten von hIP-R kann besonders bei der Erstellung eines Anwendungsprotokolls für die inhalative PGI<sub>2</sub>-Therapie von Interesse sein. Durch eine zeitlich kurzgehaltene Applikation mit entsprechender Möglichkeit des Rezeptors

zur Resensibilisierung ist eine wirksamere Anwendung von Prostacyclin bei der pulmonalen Hypertonie denkbar. In der Erprobung ist zur Zeit ein Inhalationsschema, das eine Verteilung von 100-150 µg Iloprost auf sechs Tagesdosen vorsieht, wobei eine Inhalation ca. 15 Minuten dauert. Das Inhalationsintervall ist unmittelbar begleitet von einem verbesserten Herzminutenvolumen, einem drastischen Abfall des mittleren pulmonal-arteriellen Blutdruckes und einer Verbesserung des Gasaustausches durch den gleichzeitigen Anstieg der arteriellen Sauerstoffsättigung. Diese Effekte bilden sich im Verlauf der nächsten 1-2 Stunden langsam zurück. Zusätzlich wird während der Nacht eine mehrstündige Inhalationspause eingehalten (Grimminger et al., 1999). In einer neuen Studie kommt die Arbeitsgruppe von Kleber zu einem ähnlichen Schluss, wobei aber auf das Problem der diskontinuierlichen Verabreichung und Wirkung von Prostacyclin aufgrund der kurzen Halbwertszeit hingewiesen wird (Wensel et al., 2000). Insgesamt aber erscheint diese Anwendungsform sinnvoll, da sie durch kurze Inhalationszeiten nicht zu einer vollständigen Rezeptor-Desensibilisierung führt und zusätzlich durch Inhalationspausen eine regelmäßige Resensibilisierung des Rezeptors möglich wird.

#### **4.9 Bedeutung des Prostacyclin-Rezeptors für die therapeutische Anwendung von Prostacyclin und seinen Mimetika**

Für die Therapie verschiedener Erkrankungen wie der Restenose, Durchblutungsstörungen und der pulmonalen Hypertonie bietet sich der Einsatz des vasodilatierend, antimitogen und antiproliferativ wirkenden Prostacyclins an. Vermittelt werden die Effekte durch den Prostacyclin-Rezeptor, dessen veränderte zelluläre Signalweiterleitung nach beständiger Aktivierung ein möglicher Grund für unbefriedigende Therapieergebnisse sein könnte. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Prostacyclin-Rezeptor eine Agonisten-abhängige, homologe Langzeit-Desensibilisierung durchläuft (Nilius et al., 2000). Dabei zeichnet sich hIP-R dadurch aus, dass er nicht dem „klassischen“ Desensibilisierungsmodell folgt, wie es für viele GPCRs beschrieben ist. Es konnte weder eine Beteiligung von Arrestin, noch von GRKs nachgewiesen werden. Dazu scheint die Desensibilisierung über verschiedene Wege abzulaufen, abhängig von der Konzentration des Agonisten (Abb. 38).



Besonders die nach der Rezeptor-Internalisierung stattfindende „Down“-Regulierung führt zu einer längeren „Lücke“ in der Signaltransduktion durch den IP-Rezeptor. Hier könnten gezielte Behandlungspausen, die der Resensibilisierung des Rezeptors dienen, zu einer wirksameren Anwendung von Prostacyclin beitragen. Allerdings tritt bei manchen Erkrankungen, auch bei der pulmonalen Hypertonie, die verminderte Ansprechbarkeit von IP-R durch seinen Agonisten erst nach einer längeren Anwendungszeit auf. Möglicherweise führt eine beständige Desensibilisierung mit nicht ausreichend langen Resensibilisierungsphasen längerfristig zum weitgehenden Verlust des Rezeptors auf der Zellmembran.

Verschiedene Ansätze sind denkbar, um Prostacyclin und seine Analoga effizienter anzuwenden. Zum einen wäre die gezielte Hemmung von beteiligten Komponenten der Desensibilisierungsmaschinerie denkbar. Dazu wäre es notwendig, zukünftig mit Hilfe der Epitop-fusionierten IP-Rezeptoren oder der Two Hybrid-Methode neue Proteine zu identifizieren, die mit dem Rezeptor in Wechselwirkung treten.

Bei der Entwicklung neuer Rezeptor-Agonisten wurde bisher die Möglichkeit einer Desensibilisierung des Rezeptors wenig berücksichtigt. Daher bietet sich der Einsatz partieller Rezeptor-Agonisten an. Partielle Agonisten unterscheiden sich in ihrer sogenannten „intrinsischen Aktivität“ vom reinen Agonisten. Dabei erzielt der partielle Agonisten zwar die gleiche Wirkung, seine intrinsischen Aktivität ist aber geringer. Dies ist bedingt durch die Konformationsänderung, die ein Rezeptor durchläuft, um nach seiner Stimulation in den aktivierten Zustand zu gelangen. Der partielle Agonist verschiebt das Gleichgewicht der Rezeptor-Konformation nicht so stark zum aktiven Zustand hin, wie dies durch den reinen Agonisten geschehen würde (Clark et al., 1999). Der Vorteil in der therapeutischen Anwendung wäre, dass die Desensibilisierung des Rezeptors langsamer verlaufen würde. Dies konnte für den  $\mu$  Opioid-Rezeptor (Kovoor et al., 1998) und für den Dopamin-Rezeptor gezeigt werden, bei dem der Einsatz von partiellen Agonisten die Desensibilisierung um 50 % reduzierte, verglichen mit dem reinen Agonisten Dopamin (Lewis et al., 1998).

Eine weitere Chance bietet die Gentherapie, bei der gezielt bestimmte Gene in Geweben oder Organen überexprimiert werden. Zur Behandlung von Thrombosen sollte die Expression von antikoagulativen und fibrinolytisch wirkenden Genen erhöht werden. So könnten Stents mit Zellen bestückt werden, in denen zuvor *in vitro* der Gentransfer durchgeführt wurde. Nach Implantation der Stents entfalten die modifizierten Zellen in der Gefäßwand ihre antithrombotische Wirkung (Vassalli und Dichek, 1997). Diesem Zweck dient auch die Überexpression von Genen, die zu einer Erhöhung des endogenen Prostacyclinspiegels führen. Die Produkte des COX-1-Gens und Prostacyclin-Synthasegens sind an der PGI<sub>2</sub>-Synthese beteiligt und die Aktivität der Enzyme stellt dabei einen limitierenden Faktor dar. Das COX-1-Gen wurde bereits durch adenoviralen Gentransfer nach Durchführung einer Angioplastie in Arterien des Schweins überexprimiert. Im Verlauf von 10 Tagen wurde eine 4-fach erhöhte Prostacyclin-Synthese in den Arterien nachgewiesen und daraus folgend eine geringere Thrombusentstehung (Zoldhelyi et al., 1996). Gute Ergebnisse erzielte man auch bei Überexpression des COX-1-Gens in der Lunge von Kaninchen, wo eine durch Endotoxin künstlich ausgelöste pulmonale Hypertonie durch die erhöhte PGI<sub>2</sub>-Synthese supprimiert werden konnte (Conary et al., 1994). Eine andere Möglichkeit den Prostacyclinspiegel zu erhöhen liegt in der Überexpression des PGI<sub>2</sub>-Synthasegens. Dies führte in glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte zu einer verminderten DNA-Synthese (Hara et al., 1995). Todaka et al. (1999) konnten in Arterien der Ratte zeigen, dass durch die Überexpression des PGI<sub>2</sub>-Synthasegens nach Angioplastie die Proliferation der glatten Muskelzellen und damit die Neointima-Bildung signifikant vermindert wurde. In einer neuen Arbeit aus der Arbeitsgruppe



von Wu (Shyue et al., 2001) wurden erstmals das COX-1-Gen und das PGI<sub>2</sub>-Synthasegen zusammen in der Endothel-Zelllinie HUVEC überexprimiert. Wichtig für die Effizienz der Co-Transfektion war das Mengenverhältnis COX-1-Gen / PGI<sub>2</sub>-Synthasegen, das bei einer Ratio von 2 : 1 zu einer maximalen PGI<sub>2</sub>-Bildung führte. Andere Mengenverhältnisse erhöhten zwar auch den PGH<sub>2</sub>-Spiegel, aber eine maximale PGI<sub>2</sub>-Bildung wurde nur durch eine ausreichende Menge an PGI<sub>2</sub>-Synthase erreicht. Allerdings wurde in den Arbeiten nicht die Auswirkung des erhöhten PGI<sub>2</sub>-Spiegels auf die Signalweiterleitung durch den Rezeptor untersucht. Wie in dieser Arbeit an dem künstliche CHO-Zellsystem gezeigt wurde, kann eine vollständige Desensibilisierung vermutlich durch eine massive Überexpression des Rezeptors verhindert werden. Daher erscheint es für zukünftige Arbeiten von Interesse, die Überexpression des PGI<sub>2</sub>-Rezeptors zu untersuchen um eine mögliche Desensibilisierung des Rezeptors durch die erhöhten PGI<sub>2</sub>-Spiegel zu umgehen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Prostacyclin ( $\text{PGI}_2$ ) gehört zur Gruppe der Prostaglandine, die im Gewebe nach unterschiedlichen Stimuli aus Arachidonsäure entstehen und freigesetzt werden.  $\text{PGI}_2$  wirkt u.a. vasodilatierend und beeinflusst so die lokale Durchblutung. Vermittelt wird die biologische Wirkung von  $\text{PGI}_2$  durch den Prostacyclin-Rezeptor (IP-R), der zur Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) gehört. Nach Stimulation von IP-R führt die Kopplung an ein stimulatorisches G-Protein ( $G_s$ ) zur Aktivierung der Adenylatzyklase und nachfolgend zur cAMP-Erhöhung und Proteinkinase A (PKA)-Aktivierung. Durch die antimitogene Wirkung werden  $\text{PGI}_2$  und seine Mimetika zur Therapie, z.B. von Restenosen oder der pulmonalen Hypertonie, eingesetzt, wobei aber unterschiedliche Behandlungserfolge erzielt werden. Diese deuten darauf hin, dass eine beständige Stimulation von IP-R seine Signaltransduktion vermindert, d.h. zu seiner Desensibilisierung führt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Desensibilisierung des humanen (h) IP-R und daran beteiligte Mechanismen untersucht. Die Experimente wurden in Zelllinien durchgeführt, die hIP-R endogen exprimieren (humane Fibroblasten und glatte Gefäßmuskelzellen) und an Transfektionssystemen (CHO-, COS1-Zellen).

Nach Überprüfung der Rezeptorexpression mittels RT-PCR wurde die funktionelle Aktivität von hIP-R durch Messung der Rezeptor-vermittelten cAMP-Bildung bestimmt. Diese war nach Vorinkubation der Zellen mit den Rezeptor-Agonisten Iloprost, bzw. Cicaprost in Abhängigkeit vom Zelltyp und von der Dauer der Vorinkubation vermindert. Durch die C-terminale Fusion eines Green Fluorescence Proteins (GFP) an hIP-R wurde die Membranlokalisation und anschließend die Agonisten-abhängige Translokation des Rezeptors in vesikulären Strukturen in das Zytoplasma nachgewiesen. Im folgenden Teil der Arbeit wurde die Beteiligung verschiedener Proteine an der Desensibilisierung von hIP-R untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass weder die Proteinkinase A (PKA), noch G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs) die Rezeptor-Desensibilisierung beeinflussen. Eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) dagegen beschleunigte die Desensibilisierungskinetik. Mit Hilfe eines GFP-fusionierten  $\beta$ -Arrestin2 wurde nachgewiesen, dass die Internalisierung von hIP-R Arrestin-unabhängig verläuft. Anschließend stellte sich die Frage nach der Wiederherstellung der Signalweiterleitung durch hIP-R. Eine Resensibilisierung fand innerhalb von 24 h statt und wurde durch den Einsatz des Proteinsynthese-Inhibitors Cycloheximid verhindert, was für eine Neusynthese des Rezeptors spricht. Abschließend wurde überprüft, ob eine solche Desensibilisierung auch im pulmonalen Gewebe abläuft, da der IP-R dort eine wichtige Rolle bei der Behandlung der pulmonalen Hypertonie spielt. Auch hier konnte eine Agonisten-abhängige homologe Desensibilisierung von hIP-R nachgewiesen werden, die nur durch Neusynthese des Rezeptors kompensiert werden konnte und eine erneute Stimulierbarkeit ermöglichte.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- Alt E, Hähnel I, Beilharz C, Prietzel K, Preter D, Stemberger A, Flidner T, Erhardt W, Schomig A: Inhibition of neointima formation after experimental coronary artery stenting: a new biodegradable stent coating releasing hirudin and the prostacyclin analogue iloprost. *Circulation* 101:1453-1458, 2000
- Aragay AM, Ruiz-Gomez A, Penela P, Sarnago S, Elorza A, Jimenez-Sainz MC, Mayor F: G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2): mechanisms of regulation and physiological functions. *FEBS Lett* 430:37-40, 1998
- Archer S, Rich S: Primary pulmonary hypertension - A vascular biology and translational research "work in progress". *Circulation* 102:2781-2791, 2000
- Aubin R, Weinfeld M, Paterson MC: Polybrene/DMSO-Assisted Gene Transfer. In: Murray EJ: *Methods in Molecular Biology, Vol.7: Gene Transfer and Expression Protocols*, Clifton, NJ: The Humana Press Inc., 1991:35
- Banning A, Brewer L, Wendt M, Groves PH, Cheadle H, Penny WJ, Crawford N: Local delivery of platelets with encapsulated iloprost to balloon injured pig carotid arteries: effect on platelet deposition and neointima formation. *Thromb Haemost* 77:190-196, 1997
- Barak LS, Ferguson SS, Zhang J, Caron MG: A beta-arrestin/green fluorescent protein biosensor for detecting G protein-coupled receptor activation. *J Biol Chem* 272:27497-27500, 1997
- Barak LS, Ferguson SS, Zhang J, Martenson C, Meyer T, Caron MG: Internal trafficking and surface mobility of a functionally intact beta2-adrenergic receptor-green fluorescent protein conjugate. *Mol Pharmacol* 51:177-184, 1997
- Barst RJ, Rubin LJ, McGoon MD, Caldwell EJ, Long WA, Levy PS: Survival in primary pulmonary hypertension with long-term continuous intravenous prostacyclin. *Ann Intern Med* 121:409-415, 1994
- Belton O, Byrne D, Kearney D, Leahy A, Fitzgerald DJ: Cyclooxygenase-1 and -2-dependent prostacyclin formation in patients with atherosclerosis. *Circulation* 102:840-845, 2000
- Bennett TA, Maestas DC, Prossnitz ER: Arrestin binding to the G protein-coupled N-formyl peptide receptor is regulated by the conserved "DRY" sequence. *J Biol Chem* 275:24590-24594, 2000
- Benovic JL, Kuhn H, Weyand I, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ: Functional desensitization of the isolated beta-adrenergic receptor by the beta-adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein). *Proc Natl Acad Sci* 84:8879-8882, 1987
- Birnboim HC, Doly J: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-1523, 1979
- Blair IA, Leigh PJ, MacDermot J: Desensitization of prostacyclin receptors in a neuronal hybrid cell line. *Br J Pharmacol* 77:121-127, 1982
- Bohm SK, Grady EF, Bunnett NW: Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors. *Biochem J* 322:1-18, 1997
- Boie Y, Rushmore TH, Darmon-Goodwin A, Grygorczyk R, Slipetz DM, Metters KM, Abramovitz M: Cloning and expression of a cDNA for the human prostanoid IP receptor. *J Biol Chem* 269:12173-12178, 1994
- Bornfeldt KE, Krebs EG: Crosstalk between protein kinase A and growth factor receptor signaling pathways in arterial smooth muscle. *Cell Signal* 11:465-477, 1999

- Böer U, Neuschäfer-Rube F, Möller U, Püschel GP: Requirement of N-glycosylation of the prostaglandin E-2 receptor EP3 beta for correct sorting to the plasma membrane but not for correct folding. *Biochem J* 350:839-847, 2000
- Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254, 1976
- Braun M, Hohlfeld T, Kienbaum P, Weber A-A, Sarbia M, Schrör K: Antiatherosclerotic effects of oral cicaprost in experimental hypercholesterolemia in rabbits. *Atherosclerosis* 103:93-105, 1993
- Bremnes T, Paasche JD, Mehllum A, Sandberg C, Bremnes B, Attramadal H: Regulation and intracellular trafficking pathways of the endothelin receptors. *J Biol Chem* 275:17596-17604, 2000
- Breyer MD, Jacobson HR, Breyer RM: Functional and molecular aspects of renal prostaglandin receptors. *J Am Soc Nephrol* 7:8-17, 1996
- Burger M, Burger JA, Hoch RC, Oades Z, Takamori H, Schraufstatter IU: Point mutation causing constitutive signaling of CXCR2 leads to transforming activity similar to Kaposi's sarcoma herpesvirus-G protein-coupled receptor. *J Immunol* 163:2017-2022, 1999
- Bünemann M, Lee KB, Pals-Rylaarsdam R, Roseberry AG, Hosey MM: Desensitization of G-protein-coupled receptors in the cardiovascular system. *Annu Rev Physiol* 61:169-192, 1999
- Cannon CS, Tang J: Modification of the Laemmli sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis procedure to eliminate artifacts on reducing and nonreducing gels. *Anal Biochem* 246:146-148, 1997
- Chen Y, Harry A, Li J, Smit MJ, Bai X, Magnusson R, Pieroni JP, Weng G, Iyengar R: Adenylyl cyclase 6 is selectively regulated by protein kinase A phosphorylation in a region involved in Galphas stimulation. *Proc Natl Acad Sci* 94:14100-14104, 1997
- Choi DJ, Koch WJ, Hunter JJ, Rockman HA: Mechanism of beta-adrenergic receptor desensitization in cardiac hypertrophy is increased beta-adrenergic receptor kinase. *J Biol Chem* 272:17223-17229, 1997
- Chun M, Liyanage UK, Lisanti MP, Lodish HF: Signal transduction of a G protein-coupled receptor in caveolae: colocalization of endothelin and its receptor with caveolin. *Proc Natl Acad Sci* 91:11728-11732, 1994
- Clark RB, Knoll BJ, Barber R: Partial agonists and G protein-coupled receptor desensitization. *Trends Pharmacol Sci* 20:279-286, 1999
- Conary JT, Parker RE, Christman BW, Faulks RD, King GA, Meyrick BO, Brigham KL: Protection of rabbit lungs from endotoxin injury by in vivo hyperexpression of the prostaglandin G/H synthase gene. *J Clin Invest* 93:1834-1840, 1994
- Cook SJ, McCormick F: Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf. *Science* 262:1069-1072, 1993
- Darius H, Hossmann V, Schrör K: Antiplatelet effects of intravenous iloprost in patients with peripheral arterial obliterative disease. A placebo-controlled dose-response study. *Klin Wochenschr* 64:545-551, 1986
- Darius H, Nixdorff U, Zander J, Rupprecht HJ, Erbel R, Meyer J: Effects of ciprostone on restenosis rate during therapeutic transluminal coronary angioplasty. *Agents Actions Suppl* 37:305-311, 1992
- Davies P, Bailey PJ, Goldenberg MM, Ford-Hutchinson AW: The role of arachidonic acid oxygenation products in pain and inflammation. *Annu Rev Immunol* 2:335-357, 1984

- de Weerd WF, Leeb-Lundberg LM: Bradykinin sequesters B2 bradykinin receptors and the receptor-coupled Galpha subunits Galphaq and Galphai in caveolae in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *J Biol Chem* 272:17858-17866, 1997
- Defer N, Best-Belpomme M, Hanoune J: Tissue specificity and physiological relevance of various isoforms of adenylyl cyclase. *Am J Physiol Renal Physiol* 279:F400-F4162000
- Eason MG, Moreira SP, Liggett SB: Four consecutive serines in the third intracellular loop are the sites for beta-adrenergic receptor kinase-mediated phosphorylation and desensitization of the alpha 2A-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 270:4681-4688, 1995
- Ewert R, Opitz C, Wensel R, Winkler J, Höffken G, Frank W, Berger F, Kleber FX, Hetzer R: Iloprost as inhalative or intravenous long-term treatment of patients with primary pulmonary hypertension. Register of the Berlin Study Group for Pulmonary Hypertension. *Z Kardiol* 89:987-999, 2000
- Faraci FM, Heistad DD: Regulation of the cerebral circulation: role of endothelium and potassium channels. *Physiol Rev* 78:53-97, 1998
- Ferguson SS, Barak LS, Zhang J, Caron MG: G-protein-coupled receptor regulation: role of G-protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Can J Physiol Pharmacol* 74:1095-1110, 1996
- Ferguson SS, Downey WE, Colapietro AM, Barak LS, Menard L, Caron MG: Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. *Science* 271:363-366, 1996
- Ferguson SS, Zhang J, Barak LS, Caron MG: Role of beta-arrestins in the intracellular trafficking of G-protein-coupled receptors. *Adv Pharmacol* 42:420-424, 1998
- Feron O, Smith TW, Michel T, Kelly RA: Dynamic targeting of the agonist-stimulated m2 muscarinic acetylcholine receptor to caveolae in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 272:17744-17748, 1997
- FitzGerald GA, Smith B, Pedersen AK, Brash AR: Increased prostacyclin biosynthesis in patients with severe atherosclerosis and platelet activation. *N Engl J Med* 310:1065-1068, 1984
- Fredericks ZL, Pitcher JA, Lefkowitz RJ: Identification of the G protein-coupled receptor kinase phosphorylation sites in the human beta2-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 271:13796-13803, 1996
- Gershlick AH, Spriggins D, Davies SW, Syndercombe-Court YD, Timmins J, Timmis AD, Rothman MT, Layton C, Balcon R: Failure of epoprostenol (prostacyclin, PGI2) to inhibit platelet aggregation and to prevent restenosis after coronary angioplasty: results of a randomised placebo controlled trial. *Br Heart J* 71:7-15, 1994
- Grimminger F, Olschewski H, Seeger W: [Vasotropic therapy and artificial respiration for pulmonary hypertension] Vasotrope Therapie und Beatmung bei pulmonaler Hypertonie. *Internist* 40:747-755, 1999
- Gros R, Tan CM, Chorazyczewski J, Kelvin DJ, Benovic JL, Feldman RD: G-protein-coupled receptor kinase expression in hypertension. *Clin Pharmacol Ther* 65:545-551, 1999
- Gurevich VV, Richardson RM, Kim CM, Hosey MM, Benovic JL: Binding of wild type and chimeric arrestins to the m2 muscarinic cholinergic receptor. *J Biol Chem* 268:16879-16882, 1993
- Gurevich VV, Dion SB, Onorato JJ, Ptasienski J, Kim CM, Sterne-Marr R, Hosey MM, Benovic JL: Arrestin interactions with G protein-coupled receptors. Direct binding studies of wild type and mutant arrestins with rhodopsin, beta 2-adrenergic, and m2 muscarinic cholinergic receptors. *J Biol Chem* 270:720-731, 1995

- Habib A, Vezza R, Creminon C, Maclouf J, FitzGerald GA: Rapid, agonist-dependent phosphorylation in vivo of human thromboxane receptor isoforms. Minimal involvement of protein kinase C. *J Biol Chem* 272:7191-7200, 1997
- Haga K, Kameyama K, Haga T, Kikkawa U, Shiozaki K, Uchiyama H: Phosphorylation of human m1 muscarinic acetylcholine receptors by G protein-coupled receptor kinase 2 and protein kinase C. *J Biol Chem* 271:2776-2782, 1996
- Hanahan D: Techniques for transformation of E.coli. DNA cloning; A practical approach, Washington D.C.: IRL Press, 1985
- Hara S, Morishita R, Tone Y, Yokoyama C, Inoue H, Kaneda Y, Ogihara T, Tanabe T: Overexpression of prostacyclin synthase inhibits growth of vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 216:862-867, 1995
- Hasbi A, Allouche S, Sichel F, Stanasila L, Massotte D, Landemore G, Polastron J, Jauzac P: Internalization and recycling of delta-opioid receptor are dependent on a phosphorylation-dephosphorylation mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* 293:237-247, 2000
- Hayes JS, Lawler OA, Walsh MT, Kinsella BT: The prostacyclin receptor is isoprenylated. Isoprenylation is required for efficient receptor-effector coupling. *J Biol Chem* 274:23707-23718, 1999
- Hibbs TA, Lu B, Smock SL, Vestergaard P, Pan LC, Owen TA: Molecular cloning and characterization of the canine prostaglandin E receptor EP2 subtype. *Prostaglandins* 57:133-147, 1999
- Hicke L, Zanolari B, Riezman H: Cytoplasmic tail phosphorylation of the alpha-factor receptor is required for its ubiquitination and internalization. *J Cell Biol* 141:349-358, 1998
- Higenbottam T, Wheeldon D, Wells F, Wallwork J: Long-term treatment of primary pulmonary hypertension with continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin). *Lancet* 1:1046-1047, 1984
- Horstmeyer A, Cramer H, Sauer T, Müller-Esterl W, Schroeder C: Palmitoylation of endothelin receptor A. Differential modulation of signal transduction activity by post-translational modification. *J Biol Chem* 271:20811-20819, 1996
- Höper MM, Olschewski H, Ghofrani HA, Wilkens H, Winkler J, Borst MM, Niedermeyer J, Fabel H, Seeger W: A comparison of the acute hemodynamic effects of inhaled nitric oxide and aerosolized iloprost in primary pulmonary hypertension. German PPH study group. *J Am Coll Cardiol* 35:176-182, 2000
- Hsu SL, Chou YH, Yin SC, Liu JY: Differential effects of phorbol ester on growth and protein kinase C isoenzyme regulation in human hepatoma Hep3B cells. *Biochem J* 333:57-64, 1998
- Hurley JH: Structure, mechanism, and regulation of mammalian adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 274:7599-7602, 1999
- Iaccarino G, Tomhave ED, Lefkowitz RJ, Koch WJ: Reciprocal in vivo regulation of myocardial G protein-coupled receptor kinase expression by beta-adrenergic receptor stimulation and blockade. *Circulation* 98:1783-1789, 1998
- Iacovelli L, Sallese M, Mariggio S, de Blasi A: Regulation of G-protein-coupled receptor kinase subtypes by calcium sensor proteins. *FASEB J* 13:1-8, 1999
- Inglese J, Freedman NJ, Koch WJ, Lefkowitz RJ: Structure and mechanism of the G protein-coupled receptor kinases. *J Biol Chem* 268:23735-23738, 1993

- Innamorati G, Le Gouill C, Balamotis M, Birnbaumer M: The long and the short cycle. Alternative intracellular routes for trafficking of G-protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 276:13096-13103, 2001
- Isogaya M, Yamada N, Koike H, Ueno Y, Kumagai H, Ochi Y, Okazaki S, Nishio S: Inhibition of restenosis by beraprost sodium (a prostaglandin I<sub>2</sub> analogue) in the atherosclerotic rabbit artery after angioplasty. *J Cardiovasc Pharmacol* 25:947-952, 1995
- Iwami G, Kawabe J, Ebina T, Cannon PJ, Homcy CJ, Ishikawa Y: Regulation of adenylyl cyclase by protein kinase A. *J Biol Chem* 270:12481-12484, 1995
- Kallal L, Benovic JL: Using green fluorescent proteins to study G-protein-coupled receptor localization and trafficking. *Trends Pharmacol Sci* 21:175-180, 2000
- Kapural L, Fein A: Suppression of the voltage-gated K<sup>+</sup> current of human megakaryocytes by thrombin and prostacyclin. *Biochim Biophys Acta* 1355:331-342, 1997
- Katsuyama M, Sugimoto Y, Namba T, Irie A, Negishi M, Narumiya S, Ichikawa A: Cloning and expression of a cDNA for the human prostacyclin receptor. *FEBS Lett* 344:74-78, 1994
- Kedzie KM, Donello JE, Krauss HA, Regan JW, Gil DW: A single amino-acid substitution in the EP<sub>2</sub> prostaglandin receptor confers responsiveness to prostacyclin analogs. *Mol Pharmacol* 54:584-590, 1998
- Kenimer JG, Habig WH, Hardegree MC: Monoclonal antibodies as probes of tetanus toxin structure and function. *Infect Immun* 42:942-948, 1983
- Knudtson ML, Flintoft VF, Roth DL, Hansen JL, Duff HJ: Effect of short-term prostacyclin administration on restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 15:691-697, 1990
- Kobayashi T, Kiriyama M, Hirata T, Hirata M, Ushikubi F, Narumiya S: Identification of domains conferring ligand binding specificity to the prostanoid receptor. Studies on chimeric prostacyclin/prostaglandin D receptors. *J Biol Chem* 272:15154-15160, 1997
- Koch T, Schulz S, Schröder H, Wolf R, Raulf E, Hollt V: Carboxyl-terminal splicing of the rat mu opioid receptor modulates agonist-mediated internalization and receptor resensitization. *J Biol Chem* 273:13652-13657, 1998
- Koch WJ, Rockman HA, Samama P, Hamilton RA, Bond RA, Milano CA, Lefkowitz RJ: Cardiac function in mice overexpressing the beta-adrenergic receptor kinase or a beta ARK inhibitor. *Science* 268:1350-1353, 1995
- Kovoor A, Celver JP, Wu A, Chavkin C: Agonist induced homologous desensitization of mu-opioid receptors mediated by G protein-coupled receptor kinases is dependent on agonist efficacy. *Mol Pharmacol* 54:704-711, 1998
- Kovoor A, Celver J, Abdryashitov RI, Chavkin C, Gurevich VV: Targeted construction of phosphorylation-independent beta-arrestin mutants with constitutive activity in cells. *J Biol Chem* 274:6831-6834, 1999
- König JA, Edwardson JM: Endocytosis and recycling of G protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 18:276-287, 1997
- Krane A, MacDermot J, Keen M: Desensitization of adenylyl cyclase responses following exposure to IP prostanoid receptor agonists. Homologous and heterologous desensitization exhibit the same time course. *Biochem Pharmacol* 47:953-959, 1994

- Krupnick JG, Benovic JL: The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:289-319, 1998
- Krüger KM, Daaka Y, Pitcher JA, Lefkowitz RJ: The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. Regulation of beta2-adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification. *J Biol Chem* 272:5-8, 1997
- Kuschel M, Zhou YY, Spurgeon HA, Bartel S, Karczewski P, Zhang SJ, Krause EG, Lakatta EG, Xiao RP: beta2-adrenergic cAMP signaling is uncoupled from phosphorylation of cytoplasmic proteins in canine heart. *Circulation* 99:2458-2465, 1999
- Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685, 1970
- Lederer ED, Jacobs AA, McLeish KR: Desensitization by protein kinase C activation differentially uncouples formyl peptide receptors from effector enzymes in HL-60 granulocytes. *Cell Signal* 5:735-745, 1993
- Lee K: Transcriptional regulation by cAMP. *Curr Opin Cell Biol* 3:953-959, 1991
- Lee KB, Pals-Rylaarsdam R, Benovic JL, Hosey MM: Arrestin-independent internalization of the m1, m3, and m4 subtypes of muscarinic cholinergic receptors. *J Biol Chem* 273:12967-12972, 1998
- Lefkowitz RJ: G protein-coupled receptor kinases. *Cell* 74:409-412, 1993
- Lefkowitz RJ, Pitcher J, Krüger K, Daaka Y: Mechanisms of beta-adrenergic receptor desensitization and resensitization. *Adv Pharmacol* 42:416-420, 1998
- Lewis MM, Watts VJ, Lawler CP, Nichols DE, Mailman RB: Homologous desensitization of the D1A dopamine receptor: efficacy in causing desensitization dissociates from both receptor occupancy and functional potency. *J Pharmacol Exp Ther* 286:345-353, 1998
- Li JG, Luo LY, Krupnick JG, Benovic JL, Liu CL: U50,488H-induced internalization of the human kappa opioid receptor involves a beta-arrestin- and dynamin-dependent mechanism. Kappa receptor internalization is not required for mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* 274:12087-12094, 1999
- Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ: beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* 248:1547-1550, 1990
- Lohse MJ, Benovic JL, Caron MG, Lefkowitz RJ: Multiple pathways of rapid beta 2-adrenergic receptor desensitization. Delineation with specific inhibitors. *J Biol Chem* 265:3202-3211, 1990
- Lohse MJ, Andexinger S, Pitcher J, Trukawinski S, Codina J, Faure JP, Caron MG, Lefkowitz RJ: Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase dependence and receptor specificity of beta-arrestin and arrestin in the beta 2-adrenergic receptor and rhodopsin systems. *J Biol Chem* 267:8558-8564, 1992
- Lohse MJ: G-Protein-coupled receptor kinases and the heart. *Trends Cardiovasc Med* 5:63-68, 1995
- Marsh M, McMahon HT: The structural era of endocytosis. *Science* 285:215-220, 1999
- Mhaouty-Kodja S, Barak LS, Scheer A, Abuin L, Diviani D, Caron MG, Cotecchia S: Constitutively active alpha-1b adrenergic receptor mutants display different phosphorylation and internalization features. *Mol Pharmacol* 55:339-347, 1999



- Mikhail G, Gibbs J, Richardson M, Wright G, Khaghani A, Banner N, Yacoub M: An evaluation of nebulized prostacyclin in patients with primary and secondary pulmonary hypertension. *Eur Heart J* 18:1499-1504, 1997
- Milton AS, Wendlandt S: A possible role for prostaglandin E1 as a modulator for temperature regulation in the central nervous system of the cat. *J Physiol Lond* 207:76P-77P, 1970
- Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR: An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 263:663-665, 1976
- Moncada S, Vane JR: Prostacyclin: its biosynthesis, actions and clinical potential. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 294:305-329, 1981
- Moro O, Lameh J, Sadee W: Serine- and threonine-rich domain regulates internalization of muscarinic cholinergic receptors. *J Biol Chem* 268:6862-6865, 1993
- Müller B, Maass B, Stürzebecher S, Skuballa W: Antifibrillatory action of the stable orally active prostacyclin analogues iloprost and ZK 96 480 in rats after coronary artery ligation. *Biomed Biochim Acta* 43:S175-S178, 1984
- Mukherjee C, Lefkowitz RJ: Desensitization of beta-adrenergic receptors by beta-adrenergic agonists in a cell-free system: resensitization by guanosine 5'-(beta, gamma-imino)triphosphate and other purine nucleotides. *Proc Natl Acad Sci* 73:1494-1498, 1976
- Murata T, Ushikubi F, Matsuoka T, Hirata M, Yamasaki A, Sugimoto Y, Ichikawa A, Aze Y, Tanaka T, Yoshida N, Ueno A, Oh iS, Narumiya S: Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. *Nature* 388:678-682, 1997
- Nakagawa O, Tanaka I, Usui T, Harada M, Sasaki Y, Itoh H, Yoshimasa T, Namba T, Narumiya S, Nakao K: Molecular cloning of human prostacyclin receptor cDNA and its gene expression in the cardiovascular system. *Circulation* 90:1643-1647, 1994
- Namba T, Oida H, Sugimoto Y, Kakizuka A, Negishi M, Ichikawa A, Narumiya S: cDNA cloning of a mouse prostacyclin receptor. Multiple signaling pathways and expression in thymic medulla. *J Biol Chem* 269:9986-9992, 1994
- Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F: Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 79:1193-1226, 1999
- Negishi M, Sugimoto Y, Ichikawa A: Prostanoid receptors and their biological actions. *Prog Lipid Res* 32:417-434, 1993
- Neuschäfer-Rube F, Oppermann M, Möller U, Böer U, Püschel GP: Agonist-induced phosphorylation by G protein-coupled receptor kinases of the EP4 receptor carboxyl-terminal domain in an EP3/EP4 prostaglandin E(2) receptor hybrid. *Mol Pharmacol* 56:419-428, 1999
- Neville DM Jr: Molecular weight determination of protein-dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system. *J Biol Chem* 246:6328-6334, 1971
- Nilius SM, Hasse A, Kuger P, Schrör K, Meyer-Kirchrath J: Agonist-induced long-term desensitization of the human prostacyclin receptor. *FEBS Lett* 484:211-216, 2000
- Nishigaki N, Negishi M, Ichikawa A: Two Gs-coupled prostaglandin E receptor subtypes, EP2 and EP4, differ in desensitization and sensitivity to the metabolic inactivation of the agonist. *Mol Pharmacol* 50:1031-1037, 1996

- O'Dowd BF, Hnatowich M, Caron MG, Lefkowitz RJ, Bouvier M: Palmitoylation of the human beta 2-adrenergic receptor. Mutation of Cys341 in the carboxyl tail leads to an uncoupled nonpalmitoylated form of the receptor. *J Biol Chem* 264:7564-7569, 1989
- Ogawa Y, Tanaka I, Inoue M, Yoshitake Y, Isse N, Nakagawa O, Usui T, Itoh H, Yoshimasa T, Narumiya S, et al: Structural organization and chromosomal assignment of the human prostacyclin receptor gene. *Genomics* 27:142-148, 1995
- Oka M, Negishi M, Nishigaki N, Ichikawa A: Two types of prostacyclin receptor coupling to stimulation of adenylate cyclase and phosphatidylinositol hydrolysis in a cultured mast cell line, BNU-2c13 cells. *Cell Signal* 5 :643-650, 1993
- Okamoto T, Schlegel A, Scherer PE, Lisanti MP: Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J Biol Chem* 273:5419-5422, 1998
- Olschewski H, Walmrath D, Schermuly R, Ghofrani A, Grimminger F, Seeger W: Aerosolized prostacyclin and iloprost in severe pulmonary hypertension. *Ann Intern Med* 124:820-824, 1996
- Olschewski H, Ghofrani HA, Walmrath D, Temmesfeld-Wollbrück B, Grimminger F, Seeger W: Recovery from circulatory shock in severe primary pulmonary hypertension (PPH) with aerosolization of iloprost. *Intensive Care Med* 24:631-634, 1998
- Olschewski H, Ghofrani HA, Walmrath D, Schermuly R, Temmesfeld-Wollbrück B, Grimminger F, Seeger W: Inhaled prostacyclin and iloprost in severe pulmonary hypertension secondary to lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 160:600-607, 1999
- Olschewski H, Seeger W, Grimminger F: [Physiology and pathophysiology of the pulmonary circulation] Physiologie und Pathophysiologie der pulmonalen Zirkulation. *Internist* 40:696-709, 1999
- Ostrom RS, Post SR, Insel PA: Stoichiometry and compartmentation in G protein-coupled receptor signaling: implications for therapeutic interventions involving G(s). *J Pharmacol Exp Ther* 294:407-412, 2000
- Otto JC, Smith WL: Prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2. *J Lipid Mediat Cell Signal* 12:139-156, 1995
- Pals-Rylandsdam R, Xu Y, Witt-Enderby P, Benovic JL, Hosey MM: Desensitization and internalization of the m2 muscarinic acetylcholine receptor are directed by independent mechanisms. *J Biol Chem* 270:29004-29011, 1995
- Pals-Rylandsdam R, Gurevich VV, Lee KB, Ptasiński JA, Benovic JL, Hosey MM: Internalization of the m2 muscarinic acetylcholine receptor. Arrestin-independent and -dependent pathways. *J Biol Chem* 272:23682-23689, 1997
- Parent JL, Labrecque P, Orsini MJ, Benovic JL: Internalization of the TXA2 receptor alpha and beta isoforms. Role of the differentially spliced cooh terminus in agonist-promoted receptor internalization. *J Biol Chem* 274:8941-8948, 1999
- Parkinson PA, Parfenova H, Leffler CW: Phospholipase C activation by prostacyclin receptor agonist in cerebral microvascular smooth muscle cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 223:53-58, 2000
- Pronin AN, Carman CV, Benovic JL: Structure-function analysis of G protein-coupled receptor kinase-5. Role of the carboxyl terminus in kinase regulation. *J Biol Chem* 273:31510-31518, 1998
- Raines EW, Ross R: Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. *Br Heart J* 69:S30-S37, 1993

- Raizner AE, Hollman J, Abukhalil J, Demke DfCi: Ciprostone for restenosis revisited: Quantitative analysis of angiograms. *J Am Coll Cardiol* 21:1993
- Raychowdhury MK, Yukawa M, Collins LJ, McGrail SH, Kent KC, Ware JA: Alternative splicing produces a divergent cytoplasmic tail in the human endothelial thromboxane A2 receptor. *J Biol Chem* 269:19256-19261, 1994
- Rimarachin JA, Jacobson JA, Szabo P, Maclouf J, Creminon C, Weksler BB: Regulation of cyclooxygenase-2 expression in aortic smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb* 14:1021-1031, 1994
- Ross R: Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-126, 1999
- Rousell J, Haddad EB, Mak JC, Barnes PJ: Transcriptional down-regulation of m2 muscarinic receptor gene expression in human embryonic lung (HEL 299) cells by protein kinase C. *J Biol Chem* 270:7213-7218, 1995
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 74:5463-5467, 1977
- Santini F, Penn RB, Gagnon AW, Benovic JL, Keen JH: Selective recruitment of arrestin-3 to clathrin coated pits upon stimulation of G protein-coupled receptors. *J Cell Sci* 113:2463-2470, 2000
- Sasaki Y, Usui T, Tanaka I, Nakagawa O, Sando T, Takahashi T, Namba T, Narumiya S, Nakao K: Cloning and expression of a cDNA for rat prostacyclin receptor. *Biochim Biophys Acta* 1224:601-605, 1994
- Scheer A, Fanelli F, Costa T, deBenedetti PG, Cotecchia S: Constitutively active mutants of the alpha 1B-adrenergic receptor: role of highly conserved polar amino acids in receptor activation. *EMBO J* 15:3566-3578, 1996
- Schirner M, Schneider MR: Inhibition of metastasis by cicaprost in rats with established SMT2A mammary carcinoma growth. *Cancer Detect Prev* 21:44-50, 1997
- Schirner M, Kraus C, Lichtner RB, Schneider MR, Hildebrand M: Tumor metastasis inhibition with the prostacyclin analogue cicaprost depends on discontinuous plasma peak levels. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 58:311-317, 1998
- Schröder H, Schrör K: Prostacyclin-dependent cyclic AMP formation in endothelial cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 347:101-104, 1993
- Schrör K, Moncada S, Ubatuba FB, Vane JR: Formation of prostacyclin (PGX) causes decrease in the coronary vascular resistance during application of arachidonic acid in the rabbit isolated heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol Suppl* 297:R31, 1977
- Schrör K, Darius H, Matzky R, Ohlendorf R: The antiplatelet and cardiovascular actions of a new carbacyclin derivative (ZK 36 374)--equipotent to PGI<sub>2</sub> in vitro. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 316:252-255, 1981
- Schrör K: Prostaglandine und verwandte Verbindungen, Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1984
- Schrör K, Verheggen R: Use of human post-mortem cerebral blood vessels to study vasospasm. *Trends Pharmacol Sci* 9:71-74, 1988
- Schrör K: Prostacyclin (Prostaglandin I<sub>2</sub>) and Atherosclerosis. In: Rubanyi G.M., Dzau V.J: *The Endothelium in Clinical Practice*, New York: Marcel Dekker, Inc., 1997

- Schrör K, Weber A-A: Roles of vasodilatory prostaglandins in mitogenesis of vascular smooth muscle cells. *Agents Actions Suppl* 48:63-91, 1997
- Schwamer I, Seifert R, Schultz G: The prostacyclin analogues, cicaprost and iloprost, increase cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration in the human erythroleukemia cell line, HEL, via pertussis toxin-insensitive G-proteins. *Eicosanoids* 5 Suppl:S10-S12, 1992
- Scott JP, Higenbottam T, Wallwork J: The acute effect of the synthetic prostacyclin analogue iloprost in primary pulmonary hypertension. *Br J Clin Pract* 44:231-234, 1990
- Seamon KB, Padgett W, Daly JW: Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc Natl Acad Sci* 78:3363-3367, 1981
- Shaul PW, Anderson RG: Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction. *Am J Physiol* 275: L843-L851, 1998
- Shetzline MA, Premont RT, Walker JK, Vigna SR, Caron MG: A role for receptor kinases in the regulation of class II G protein-coupled receptors. Phosphorylation and desensitization of the secretin receptor. *J Biol Chem* 273:6756-6762, 1998
- Shyue S, Tsai M, Liou J, Willerson JT, Wu KK: Selective augmentation of prostacyclin production by combined prostacyclin synthase and cyclooxygenase-1 gene transfer. *Circulation* 103:2090-2095, 2001
- Siegel G, Walter A, Schnalke F, Schmidt A, Buddecke E, Loirand G, Stock G: Potassium channel activation, hyperpolarization, and vascular relaxation. *Z Kardiol* 80 Suppl 7:9-24, 1991
- Siegel G, Emden J, Wenzel K, Mironneau J, Stock G: Potassium channel activation in vascular smooth muscle. *Adv Exp Med Biol* 311:53-72, 1992
- Sinzinger H, Schernthaner G, Kaliman J: Sensitivity of platelets to prostaglandins in coronary heart disease and angina pectoris. *Prostaglandins* 22:773-781, 1981
- Sinzinger H, Zidek T, Fitscha P, O'Grady J, Wagner O, Kaliman J: Prostaglandin I<sub>2</sub> reduces activation of human arterial smooth muscle cells in-vivo. *Prostaglandins* 33:915-918, 1987
- Smith WL: Prostaglandin biosynthesis and its compartmentation in vascular smooth muscle and endothelial cells. *Annu Rev Physiol* 48:251-262, 1986
- Smyth EM, Nestor PV, FitzGerald GA: Agonist-dependent phosphorylation of an epitope-tagged human prostacyclin receptor. *J Biol Chem* 271:33698-33704, 1996
- Smyth EM, Li WH, FitzGerald GA: Phosphorylation of the prostacyclin receptor during homologous desensitization. A critical role for protein kinase c. *J Biol Chem* 273:23258-23266, 1998
- Smyth EM, Austin SC, Reilly MP, FitzGerald GA: Internalization and sequestration of the human prostacyclin receptor. *J Biol Chem* 275:32037-32045, 2000
- Steiner AL, Parker CW, Kipnis DM: Radioimmunoassay for cyclic nucleotides. I. Preparation of antibodies and iodinated cyclic nucleotides. *J Biol Chem* 247:1106-1113, 1972
- Sterne-Marr R, Gurevich VV, Goldsmith P, Bodine RC, Sanders C, Donoso LA, Benovic JL: Polypeptide variants of beta-arrestin and arrestin3. *J Biol Chem* 268:15640-15648, 1993
- Sugden PH, Bogoyevitch MA: Intracellular signalling through protein kinases in the heart. *Cardiovasc Res* 30:478-492, 1995

- Takechi H, Matsumura K, Watanabe Y, Kato K, Noyori R, Suzuki M: A novel subtype of the prostacyclin receptor expressed in the central nervous system. *J Biol Chem* 271:5901-5906, 1996
- Thiemermann C: Biosynthesis and interaction of endothelium-derived vasoactive mediators. *Eicosanoids* 4:187-202, 1991
- Tobin AB, Totty NF, Sterlin AE, Nahorski SR: Stimulus-dependent phosphorylation of G-protein-coupled receptors by casein kinase 1alpha. *J Biol Chem* 272:20844-20849, 1997
- Todaka T, Yokoyama C, Yanamoto H, Hashimoto N, Nagata I, Tsukahara T, Hara S, Hatae T, Morishita R, Aoki M, Ogihara T, Tanabe T: Gene transfer of human prostacyclin synthase prevents neointimal formation after carotid balloon injury in rats. *Stroke* 30:419-426, 1999
- Ungerer M, Kessebohm K, Kronsbein K, Lohse MJ, Richardt G: Activation of beta-adrenergic receptor kinase during myocardial ischemia. *Circ Res* 79:455-460, 1996
- Vassalli G, Dichek DA: Gene therapy for arterial thrombosis. *Cardiovasc Res* 35:459-469, 1997
- Walker JK, Premont RT, Barak LS, Caron MG, Shetzline MA: Properties of secretin receptor internalization differ from those of the beta(2)-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 274:31515-31523, 1999
- Walmrath D, Schneider T, Pilch J, Grimminger F, Seeger W: Aerosolised prostacyclin in adult respiratory distress syndrome. *Lancet* 342:961-962, 1993
- Walsh MT, Foley JF, Kinsella BT: The alpha, but not the beta, isoform of the human thromboxane A2 receptor is a target for prostacyclin-mediated desensitization. *J Biol Chem* 275:20412-20423, 2000
- Waugh MG, Challiss RA, Berstein G, Nahorski SR, Tobin AB: Agonist-induced desensitization and phosphorylation of m1-muscarinic receptors. *Biochem J* 338:175-183, 1999
- Weber A-A, Zucker TP, Hasse A, Bönisch D, Wittpoth M, Schrör K: Antimitogenic effects of vasodilatory prostaglandins in coronary artery smooth muscle cells. *Basic Res Cardiol* 93 Suppl 3:54-57, 1998
- Weiss HJ, Turitto VT: Prostacyclin (prostaglandin I2, PGI2) inhibits platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium. *Blood* 53:244-250, 1979
- Wensel R, Opitz CF, Ewert R, Bruch L, Kleber FX: Effects of iloprost inhalation on exercise capacity and ventilatory efficiency in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation* 101:2388-2392, 2000
- Werbonat Y, Kleutges N, Jakobs KH, Van Koppen CJ: Essential role of dynamin in internalization of M2 muscarinic acetylcholine and angiotensin AT1A receptors. *J Biol Chem* 275:21969-21974, 2000
- Whittaker N, Bunting S, Salmon J, Moncada S, Vane JR, Johnson RA, Morton DR, Kinner JH, Gorman RR, McGuire JC, Sun FF: The chemical structure of prostaglandin X (prostacyclin). *Prostaglandins* 12:915-928, 1976
- Yoon SH, Jin W, Spencer RJ, Loh HH, Thayer SA: Desensitization of delta-opioid-induced mobilization of Ca<sup>2+</sup> stores in NG108-15 cells. *Brain Res* 802:9-18, 1998
- Zhang FL, Casey PJ: Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem* 65:241-269, 1996
- Zhang J, Ferguson SSG, Barak LS, Menard L, Caron MG: Dynamin and beta-arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. *J Biol Chem* 271:18302-18305, 1996

Zhang J, Ferguson SS, Barak LS, Bodduluri SR, Laporte SA, Law PY, Caron MG: Role for G protein-coupled receptor kinase in agonist-specific regulation of mu-opioid receptor responsiveness. Proc Natl Acad Sci 95:7157-7162, 1998

Zhang J, Barak LS, Anborgh PH, Laporte SA, Caron MG, Ferguson SS: Cellular trafficking of G protein-coupled receptor/beta-arrestin endocytic complexes. J Biol Chem 274:10999-11006, 1999

Zoldhelyi P, McNatt J, Xu XM, Loose MD, Meidell RS, Clubb FJ Jr, Buja LM, Willerson JT, Wu KK: Prevention of arterial thrombosis by adenovirus-mediated transfer of cyclooxygenase gene. Circulation 93:10-17, 1996

Zucker TP, Bönisch D, Hasse A, Grosser T, Weber A-A, Schrör K: Tolerance development to antimitogenic actions of prostacyclin but not of prostaglandin E1 in coronary artery smooth muscle cells. Eur J Pharmacol 345:213-220, 1998

## 7 VERÖFFENTLICHUNGEN

im Rahmen der Arbeit

### **Kurzartikel (Abstracts) für Tagungen und Kongresse**

Meyer-Kirchrath J, Kuger P, Nilius SM, Hasse A, Schrör K

Chimeric EP<sub>3</sub>-IP receptors: G-protein coupling and desensitization; Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol 359 (Suppl): R21 (1999)

40. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, 9.-11. März 1999, Mainz

Nilius SM, Hasse A, Meyer-Kirchrath J, Schrör K

Short- and long-term mechanisms of the desensitization of human prostacyclin receptor; Bas Res Cardiol 94: 350 (1999)

1. European Meeting of Vascular Biology and Medicine, 29. Sept-1. Okt 1999, Nürnberg

Nilius SM, Meyer-Kirchrath J, Schrör K

Desensitization of the human prostacyclin receptor: which mechanisms are involved?; Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol 361 (Suppl): R21 (2000)

41. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, 21.-23. März 2000, Mainz

Nilius SM, Schrör K, Meyer-Kirchrath J

Desensitization of the prostacyclin receptor: arrestin-independent internalization is followed by degradation; Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol 362 (Suppl): R23 (2000)

6. Int. Dahlem Symposium, Molecular Pharmacology, 27.-30. Sept. 2000, Berlin

Nilius SM, Schrör K, Meyer-Kirchrath J

Agonist-induced internalization of prostacyclin receptor is  $\beta$ -arrestin 2 independent and involves degradation of the receptor; Circulation 102 (Suppl): II-274 (2000)

American Heart Scientific Sessions, 12.-15. Nov. 2000, New Orleans, USA

**Veröffentlichungen in Fachzeitschriften**

Nilius SM, Hasse A, Kuger P, Schrör K und Meyer-Kirchrath J

Agonist-induced long-term desensitization of the human prostacyclin receptor; FEBS Lett 484: 211-216 (2000)

Meyer-Kirchrath J, Nilius SM, Rose F und Schrör K (in Vorbereitung)

Role of human prostacyclin receptor in pulmonary hypertension

Blindt R, Bosserhoff A, Nilius SM, vom Dahl J, Hanrath P, Schrör K, Hohlfeld T und Meyer-Kirchrath (in Vorbereitung)

Iloprost inhibits migration of CHO cells expressing the human PGI<sub>2</sub> (IP) receptor



## 8 DANKSAGUNG

Prof. Dr. Karsten Schrör danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit. Viele anregende Gespräche brachten neue Denkansätze und Sichtweisen hervor. Besonders bedanken möchte ich mich für die Möglichkeit an verschiedenen wissenschaftlichen Kongressen teilnehmen zu können und die damit verbundene großzügige Unterstützung.

Prof. Dr. Cornelis Hollenberg danke ich herzlich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Dr. Jutta Meyer-Kirchrath danke ich für die Betreuung der Arbeit. Hilfreich waren die Einarbeitung in Thema und Methodik und zahlreiche anregende Diskussionen und Meinungsaustausche.

Dr. Andreas Hasse danke ich für die Vorarbeiten zu diesem Thema, seine Unterstützung bei der konfokalen Lasermikroskopie und hilfreiche Gespräche.

Dr. Artur-Aron Weber und Dr. Marina Braun danke ich für zahlreiche beratende und unterstützende Gespräche, die einige Probleme lösen konnten.

Erika Lohmann und Karin Montag danke ich für die Organisation des Institutslebens und die stets hilfsbereite Unterstützung bei Problemen jeglicher Art.

Petra Kuger danke ich für so manche hilfreiche Zusammenarbeit und Gespräche über Methoden, Computer und alle anderen Probleme, die so im täglichen (Labor-) Leben anfallen.

Bärbel Reupert und Irmhild Rüter danke ich sehr herzlich für die Mithilfe bei zahlreichen Experimenten.

Ein Dank geht auch an Christine Machunsky und Beate Weyrauther für die Unterstützung in der Zellkultur und an Jürgen Springer, der so manches Gerät wieder zum Laufen brachte.

Allen Kollegen und besonders den Doktoranden, die die Zeit mit mir teilten, danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre am Institut. Jegliche Hilfe, sei es durch Gespräche, Materialien oder durch aufmunternde Worte haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Besonders danken möchte ich auch meiner ganzen Familie und Carsten. Susanne und Erich, Jürgen und Regina haben mich in vieler Hinsicht unterstützt. Vor allem aber meine Eltern, die mir stets seelisch und moralisch (und auch materiell) zur Seite standen.

## **9 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Doktorschrift selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt, den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe, und das diese Doktorschrift an keiner anderen Fakultät eingereicht worden ist.

Düsseldorf, den 3. Mai 2001

## 10 LEBENSLAUF

Sigrid Nilius

geboren am 04.07.1967 in Duisburg

### Schulausbildung

---

August 1978 - Juni 1986                      Besuch des Otto-Pankok-Gymnasiums in Mülheim,  
Abschluß mit dem Abitur

### Ausbildung und beruflicher Werdegang

---

August 1986 - Juli 1988                      Ausbildung zur Chemisch-Technischen Assistentin  
(CTA) an den Technischen Unterrichtsanstalten in  
Mülheim

August 1988 - September 1992              Anstellung als CTA bei der Rheinisch-Westfälischen  
Wasserwerksgesellschaft mbH in Mülheim

### Studium und Promotion

---

Oktober 1992 – Dezember 1997              Biologiestudium an der Heinrich-Heine-Universität in  
Düsseldorf, Hauptfach Mikrobiologie  
Diplomarbeit im Institut für Mikrobiologie bei Prof. J.  
Heinisch (Thema: Isolierung von Mutanten im  
Proteinkinase C- vermittelten Signaltransduktionsweg der  
Hefe *Saccharomyces cerevisiae*)

Januar 1998 – Juni 2001                      Promotionsarbeit am Institut für Pharmakologie und  
Klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität  
in Düsseldorf bei Prof. K. Schrör  
(Thema: Regulation des Prostacyclin-Rezeptors in  
humanen glatten Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten)

Düsseldorf, den 03.Mai 2001