
**AUS DEM INSTITUT FÜR
PHARMAKOLOGIE UND KLINISCHE PHARMAKOLOGIE DER
HEINRICH-HEINE-UNIVERSITÄT DÜSSELDORF
DIREKTOR: PROF. DR. KARSTEN SCHRÖR**

**RESENSIBILISIERUNG DES PROSTAZYKLIN-
REZEPTORS NACH HOMOLOGER LANGZEIT-
DESENSIBILISIERUNG IN VERSCHIEDENEN
ZELLKULTURSYSTEMEN**

**DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS DER MEDIZIN
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER HEINRICH-HEINE-UNIVERSITÄT DÜSSELDORF**

VORGELEGT VON

NADINE RANDEWIG

2003

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Prof.Dr.med.Dr.phil. Alfons Labisch

Referent: Prof.Dr. Karsten Schrör

Korreferent: Prof.Dr. Malte Kelm

Verwendete Abkürzungen

AC	Adenylatzyklase
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Con A	Concanavalin A
CON	Kontrolle
COX	Cyclooxygenase
GRK	G-protein-coupled Receptor Kinase
h	Stunden
hIP-R	humaner Prostazyklin-Rezeptor
IBMX	Isobutylmethylxanthin
min	Minuten
PGI ₂	Prostazyklin
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
RIA	Radioimmunoassay
rIP-R	Prostazyklin-Rezeptor der Ratte
SEM	Standard Error of the Mean
TXA ₂	Thromboxan A ₂
VSMC	Vascular Smooth Muscle Cells
β-Arr	beta-Arrestin

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Prostazyklin	1
1.1.1 Vorkommen und Biosynthese	1
1.1.2 Wirkungen	3
1.2 Der Prostazyklin-Rezeptor (IP-Rezeptor)	4
1.2.1 Aufbau	4
1.2.2 G-Protein-Kopplung und Signaltransduktion	5
1.2.3 IP-Rezeptor-Desensibilisierung	8
1.2.4 IP-Rezeptor-Resensibilisierung	10
1.3 Klinische Bedeutung	11
1.4 Ziele dieser Arbeit	14
2 Material und Methoden	15
2.1 Zellkulturmaterial	15
2.2 Herstellung stabil transfizierter COS1-Zellen	15
2.2.1 hIP-R COS1-Zellen (Wildtyp)	15
2.2.2 D318 COS1-Zellen (Mutante)	15
2.2.3 Transfektion und Selektion der Transfektanten	16
2.3 Zellkultur	16
2.3.1 Kultur stabil transfizierter COS1-Zellen	16
2.3.2 Kultur von A7r5-Zellen	16

2.4 cAMP-Bestimmung	17
2.4.1 Aussaat und Indometacin-Vorbehandlung der Zellen	17
2.4.2 Versuchsdurchführung	17
2.4.2.1 Desensibilisierungsversuche	17
2.4.2.2 Resensibilisierungsversuche	17
2.4.3 Probenaufbereitung für die cAMP-Bestimmung	18
2.4.4 cAMP-Messungen mittels Radioimmunoassay (RIA)	18
2.4.4.1 Prinzip des klassischen RIA	18
2.4.4.2 Durchführung der Messungen	19
2.5 Bestimmung der Proteinkonzentration	19
2.5.1 Proben ohne detergenzhaltige Puffer	19
2.5.2 Proben mit detergenzhaltigem Puffer	19
2.6 Zellmembranpräparation	20
2.6.1 Vorbehandlung und Ernte der Zellen	20
2.6.2 Zellaufschluss und Membranisolierung	20
2.6.3 Bestimmung der Proteinmenge	20
2.7 Western-Blot Analyse	21
2.7.1 Vorbehandlung der Zellen	21
2.7.2 Auftrennung der Proteine mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese	21
2.7.3 Transfer der aufgetrennten Proteine	21
2.7.4 Hybridisierung und Detektion der Proteine	22
2.8 Statistik und Berechnungen	22
2.9 Puffer	23
2.10 Substanzen und Chemikalien	24

3 Ergebnisse	25
3.1 Nachweis der De- und Resensibilisierung auf Rezeptorebene in den untersuchten Zelllinien	25
3.1.1 Verlauf der IP-Rezeptor-vermittelten cAMP-Bildung während dauerhafter Stimulation mit Cicaprost und nach Agonist-Entzug in hIP-R COS1-Zellen (Wildtyp)	25
3.1.2 Verlauf der IP-Rezeptor-vermittelten cAMP-Bildung während dauerhafter Stimulation mit Cicaprost und nach Agonist-Entzug in D318 COS1-Zellen (C-terminal trunkierter Rezeptor)	26
3.1.3 Verlauf der IP-Rezeptor-vermittelten cAMP-Bildung während dauerhafter Stimulation mit Cicaprost und nach Agonist-Entzug in A7r5-Zellen	28
3.1.4 Vergleich der IP-Rezeptor-vermittelten cAMP-Bildung bei humanem Wildtyp-Rezeptor und C-terminal trunkiertem Rezeptor	29
3.1.5 Vergleich der IP-Rezeptor-vermittelten cAMP-Bildung in einem natürlichen (A7r5) und einem transfizierten (hIP-R COS1) Zellsystem	30
3.2 Regulation G_{sα}-Proteins zu verschiedenen Zeitpunkten nach Agonist-Entzug nach erfolgter Agonist-Dauerstimulation	32
3.2.1 Bestimmung der G _{sα} -Proteinmenge in Zellmembranen mittels Westernblot und Messung der Aluminiumfluorid-induzierten cAMP-Synthese in hIP-R COS1-Zellen	32
3.2.2 Bestimmung der G _{sα} -Proteinmenge in Zellmembranen mittels Westernblot und Messung der Aluminiumfluorid-induzierten cAMP-Synthese in D318 COS1-Zellen	33
3.2.3 Bestimmung der G _{sα} -Proteinmenge in Zellmembranen mittels Westernblot und Messung der Aluminiumfluorid-induzierten cAMP-Synthese in A7r5-Zellen	35

3.3 Regulation der Adenylatzyklase zu verschiedenen Zeitpunkten nach Agonist-Entzug nach erfolgter Agonist-Dauerstimulation	36
3.3.1 Bestimmung der Adenylatzyklase-Proteinmenge in Zellmembranen mittels Westernblot und Messung der Forskolin-induzierten cAMP-Synthese in hIP-R COS1-Zellen	36
3.3.2 Bestimmung der Adenylatzyklase-Proteinmenge in Zellmembranen mittels Westernblot und Messung der Forskolin-induzierten cAMP-Synthese in D318 COS1-Zellen	37
3.3.3 Bestimmung der Adenylatzyklase-Proteinmenge in Zellmembranen mittels Westernblot und Messung der Forskolin-induzierten cAMP-Synthese in A7r5-Zellen	39
3.4 Einfluss von Cycloheximid auf die Resensibilisierung des IP-Rezeptors in den untersuchten Zelllinien	40
3.4.1 Hemmung der IP-Rezeptor-Resensibilisierung in hIP-R COS1-Zellen	40
3.4.2 Hemmung der IP-Rezeptor-Resensibilisierung in D318 COS1-Zellen	42
3.4.3 Hemmung der IP-Rezeptor-Resensibilisierung in A7r5-Zellen	43
3.5 Einfluss von Concanavalin A auf die Resensibilisierung des IP-Rezeptors in den untersuchten Zelllinien	44
3.5.1 Effekt in hIP-R COS1-Zellen	45
3.5.2 Effekt in D318 COS1-Zellen	46
3.5.3 Effekt in A7r5-Zellen	47
3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse	48
4 Diskussion	50
4.1 Charakteristiken der untersuchten Zellsysteme	51
4.1.1 Stabil transfizierte COS1-Zellen	51
4.1.2 Natürlich IP-R exprimierende glatte Gefäßmuskelzellen der Ratte (A7r5-Zellen)	51

4.2 Resensibilisierung des humanen IP-R auf Rezeptorebene und Bedeutung des C-Terminus	52
4.3 Vergleich der Resensibilisierung von transfizierten humanem (hIP-R COS1) und murinem (rIP-R A7r5) IP-Rezeptor	53
4.4 Regulation des $G_{s\alpha}$-Proteins und der Adenylatzyklase	54
4.5 Einfluss von Cycloheximid auf die Resensibilisierung	56
4.6 Einfluss von Concanavalin A auf die Rezeptorresensibilisierung	57
4.7 Klinischer Bezug	58
5 Zusammenfassung	60
6 Literaturverzeichnis	61
7 Anhang	69
7.1 Danksagungen	69
7.2 Lebenslauf	70
7.3 Veröffentlichungen	71

1 Einleitung

1.1 Prostazyklin

1.1.1 Vorkommen und Biosynthese

Prostazyklin (Prostaglandin I₂, (PGI₂)) gehört zur Stoffklasse der Eikosanoide (Moncada et al., 1976), welche aus mehrfach ungesättigten C₂₀-Fettsäuren – vor allem aus Arachidonsäure – in sämtlichen Geweben des menschlichen Körpers synthetisiert werden. Hauptsyntheseort des Prostazyklins ist das Gefäßendothel (Weksler et al., 1977), welches aufgrund verschiedenster physiologischer (Wachstumsfaktoren, Hormone) sowie pathologischer Auslöser (Gewebschädigungen, Entzündungsprozesse, Endotoxine) zur Bildung von Prostazyklin angeregt werden kann (Smith, 1989; Needleman, 1986).

Bei der Synthese von PGI₂ wird zunächst die in der Zellmembran als Ester vorliegende Arachidonsäure durch die Acylhydrolase Phospholipase A₂ freigesetzt. Mithilfe der Cyclooxygenasen, die in allen Zellen außer den Erythrozyten vorkommen und die in zwei Isoformen – COX 1 und COX 2 - existieren, entsteht zunächst PGG₂ und nach Reduktion durch die Hydroperoxidase schließlich das PGH₂. Diese beiden zyklischen Endoperoxide stellen die Vorstufen der Prostaglandine und des Thromboxans (TXA₂) dar und werden je nach Zelltyp zu den spezifischen biologischen Endprodukten PGE₂, PGF_{2α}, PGD₂, PGI₂ und TXA₂ metabolisiert (Abb. 1).

Während unter physiologischen Bedingungen fast ausschließlich die COX 1 die PGI₂ – Produktion bestimmt, so übernimmt diese Aufgabe in arteriosklerotisch veränderten Gefäßen hauptsächlich die COX 2 (FitzGerald et al., 1984).

Die Plasmakonzentration von PGI₂ liegt unter Ruhebedingungen bei einem gesunden Menschen bei etwa 5pg/ml. Akute Verletzungen des Gefäßendothels und die dadurch ausgelöste Aktivierung von Thrombozyten einerseits, sowie chronische Gefäßwandveränderungen wie die Atherosklerose andererseits gehen mit einer erhöhten vaskulären PGI₂-Bildung einher (FitzGerald et al., 1984). Darüber hinaus beschrieben einige Autoren bereits Anfang der 80er Jahre eine herabgesetzte Thrombozyten-Sensitivität auf PGI₂ bei Angina pectoris und KHK bei längerdauernder Anwendung

(Sinzinger et al., 1981), was rückblickend als erste Hinweise auf eine Rezeptor-Desensibilisierung gewertet werden kann.

Prostazyklin ist eine sehr instabile Substanz, deren Halbwertszeit im Blut nur etwa 6 Minuten beträgt (Orchard et al., 1981), bevor es zu 6-keto-PGF_{1α} hydrolysiert (Schrör, 1984; Negishi et al., 1993). Hieraus ergibt sich für experimentelle Untersuchungen häufig die Notwendigkeit, die bekannten chemisch stabilen Analoga Iloprost (Skuballa et al., 1987) bzw. Cicaprost (Hildebrand et al., 1990; Stürzebecher et al., 1984) zu verwenden.

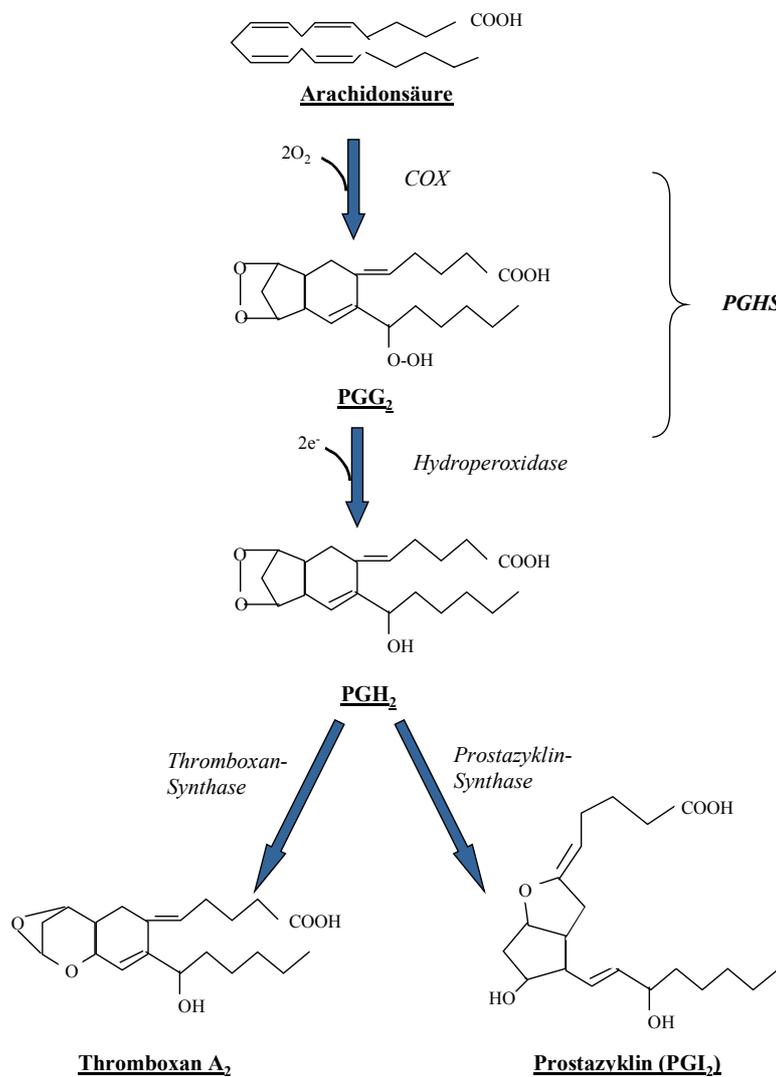


Abb.1: Biosynthese von Prostazyklin und Thromboxan A₂

1.1.2 Wirkungen

PGI₂ ist ein potenter Vasodilatator und der stärkste bekannte endogene Inhibitor der Plättchenaggregation. Physiologischer Antagonist des Prostazyklins ist Thromboxan A₂ (TXA₂), welches in Thrombozyten gebildet wird und die Induktion der Plättchenaggregation sowie Vasokonstriktion bewirkt (Hamberg et al., 1975).

Das Wirkungsspektrum von PGI₂ ist breit: Es reicht von der Regulation der renalen Durchblutung (Chaudhari et al., 1990) über eine Senkung der HCl-Produktion des Magens (Kaufmann et al., 1979) bis hin zu einer antimetastatischen Wirkung im Tierversuch (Schirner et al., 1998).

Desweiteren wird PGI₂ eine noch unzureichend definierte, jedoch zentrale Rolle bei der Nozizeption (Bley et al., 1998) und der Entzündungsantwort zugeschrieben (Murata et al., 1997). Zu den Wirkungen auf Blutbestandteile und Blutgefäße gehören die Inhibition der Adhäsion neutrophiler Granulozyten an Endothelzellen (Riva et al., 1989) sowie die antiproliferative Wirkung auf glatte Gefäßmuskelzellen (Shirotani et al., 1991).

Von großem klinischem Interesse sind zudem diejenigen Wirkungen des PGI₂, die im Zusammenhang mit der Entstehung und der Progression der Atherosklerose stehen. So geht man heutzutage davon aus, daß einem gestörten Gleichgewicht zwischen endothelialer PGI₂-Produktion einerseits und thrombozytärer TXA₂-Synthese andererseits eine bedeutende Rolle bei der Entstehung thromboembolischer Erkrankungen zukommt. Beispielsweise führt die Hemmung der PGI₂-Synthese in gesunden Probanden zu keinerlei funktionellen Störungen, wohingegen unter pathophysiologischen Bedingungen (arteriosklerotisch veränderte Gefäße) eine reduzierte PGI₂ -Produktion eine bereits bestehende Durchblutungsstörung verstärken kann. Diese Ergebnisse, sowie die Tatsache, daß anhand verschiedener Studien gezeigt werden konnte, daß stabile Prostazyklinmimetika in der Lage sind, die Bildung arteriosklerotischer Läsionen zu reduzieren (Willis et al., 1986; Braun et al., 1993) sowie die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren zu verhindern (Pomerantz et al., 1989), führten zu der Annahme, dass die Entstehung und das Fortschreiten der Arteriosklerose mit einer unzureichenden PGI₂ -Produktion und /oder PGI₂-Verfügbarkeit in Zusammenhang stehen müsse.

Auch wenn man heute weiß, daß noch viele andere vom Endothel gebildete Mediatoren (z.B. NO) an diesen Prozessen beteiligt sind und andere Veröffentlichungen eine erhöhte PGI₂ - Produktion bei Patienten mit fortgeschrittener Arteriosklerose postulieren

(FitzGerald et al., 1984), steht die bedeutende Rolle des Prostazyklins bei der Entstehung arteriosklerotischer Veränderungen inzwischen außer Frage.

In neuester Zeit wurde sie eindrucksvoll durch Studien an transgenen Mäusen, denen der spezifische IP –Rezeptor fehlt, untermauert, da bei diesen Mäusen unter anderem eine drastische Zunahme thrombotischer Gefäßverschlüsse registriert wurde (Murata et al. 1997).

1.2 Der Prostazyklin – Rezeptor (IP-Rezeptor)

1.2.1 Aufbau

Alle vorgenannten Wirkungen vermittelt Prostazyklin über seinen spezifischen, plasmamembrangebundenen Rezeptor, den sog. IP-Rezeptor. Er gehört, wie alle Prostaglandinrezeptoren, zur Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rhodopsin-Typ-Rezeptoren, die einen charakteristischen Aufbau aufweisen: Sie besitzen sieben hydrophobe Transmembrandomänen, zwischen denen sich je drei extra- und drei intrazelluläre Schleifen ausbilden (Abb.2). Die IP-Rezeptor- cDNA konnte bisher aus verschiedenen Spezies kloniert werden, so z.B. aus Maus und Mensch. Die humane cDNA codiert dabei für ein Polypeptid bestehend aus 386 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 40 956 (Boie et al., 1994 und Nakagawa et al., 1994).

Während einige hochkonservierte Sequenzen in der 7. Transmembrandomäne und der 2. extrazellulären Schleife eine wichtige Rolle bei der Erkennung der Prostaglandinstruktur spielen (Pierce et al., 1995), sind verschiedenste Abschnitte der intrazellulären Anteile für die G-Protein-Kopplung verantwortlich, so z.B. Domänen in der 2. und 3. zytoplasmatischen Schleife und im C-Terminus (Wess, 1997). Desweiteren befinden sich im C-Terminus des humanen IP-Rezeptors zwei Konsensussequenzen für eine mögliche Phosphorylierung durch die second-messenger aktivierbare Proteinkinase C (PKC) (s.Abb.2). Der murine IP-Rezeptor beinhaltet ausserdem eine Konsensussequenz für die Proteinkinase A (PKA) (Sasaki et al., 1994) in der ersten intrazellulären Domäne, die dem humanen Rezeptor jedoch fehlt (Smyth et al., 1996).

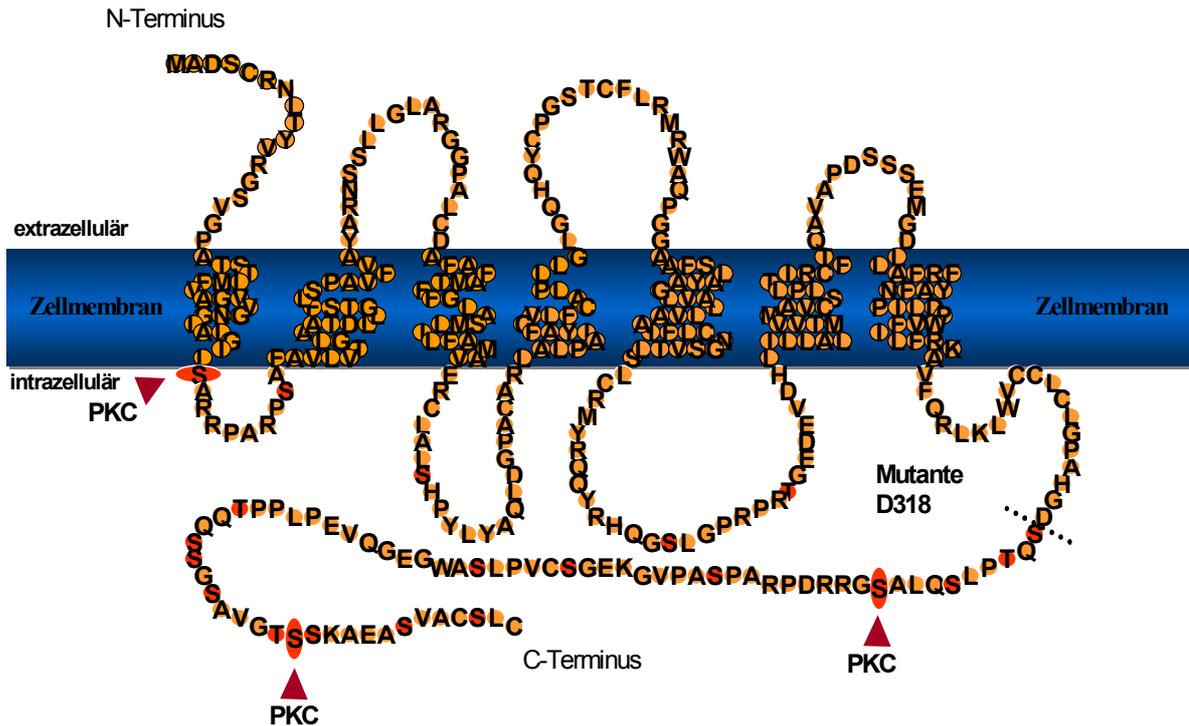


Abb.2: Aufbau des humanen IP-Rezeptors (Wildtyp) und der C-terminal trunkeerten Mutante D318 (PKC= mögliche Phosphorylierungsstellen für Proteinkinase C)

1.2.2 G-Protein-Kopplung und Signaltransduktion

Ein G-Protein (= GTP-hydrolysierendes Protein) ist ein Komplex bestehend aus drei Untereinheiten, der im Ruhezustand GDP bindet. Die drei Untereinheiten werden typischerweise mit α , β und γ bezeichnet.

Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors durch Bindung seines Agonisten induziert eine Konformationsänderung des Rezeptors, welche zu einer definierten Interaktion mit dem G-Protein führt: An der α -Untereinheit des G-Proteins wird der Austausch GDP gegen GTP katalysiert, der wiederum die Dissoziation sowohl der $G\alpha$ -Untereinheit als auch des $G\beta\gamma$ -Komplexes bewirkt. Diese nun freien $G\alpha$ - bzw. $G\beta\gamma$ -Einheiten können nun ihrerseits entweder aktivierend oder inhibierend auf verschiedene

zelluläre Effektorsysteme Einfluß nehmen, was u.a. zu einer Veränderung der intrazellulären Konzentration an sog. "second-messenger"-Botenstoffen (z.B. cAMP, Inositoltriphosphat) führt. Welche dieser Reaktionskaskaden in Gang gesetzt wird, hängt jeweils davon ab, an welche Art von G-Protein ein bestimmter Rezeptor koppelt (Metz, 1995). Eine Koppelung an G_s (= stimulatorisches G-Protein) führt über eine Aktivierung der Adenylatzyklase und dadurch zu einem Anstieg des intrazellulären cAMP, welches wiederum zu einer Aktivierung der PKA und damit zur Phosphorylierung verschiedener Substrat-Proteine führt. Eine Kopplung an G_q (= inhibitorisches G-Protein) führt dagegen zu einer Aktivierung der Phospholipase C (PLC) und damit zu einem Anstieg des intrazellulären Inositoltriphosphates ($InsP_3$) und Diacylglycerol (DAG) und auf diesem Weg zu einer Aktivierung der PKC, welche dann den IP-Rezeptor im Sinne eines negativen feed-back Mechanismus phosphorylieren kann.

Für den IP-Rezeptor wird sowohl eine G_s - als auch eine G_q -Kopplung angenommen, da eine Stimulation des Rezeptors einerseits zu einer Steigerung der cAMP-Synthese und andererseits auch zu einer vermehrten Produktion von Inositoltriphosphat führt (Namba et al., 1994; Smyth et al., 1996) (Abb.3). Im vaskulären System ist jedoch die G_s -Kopplung mit nachfolgender Aktivierung der Adenylatzyklase durch dessen α -Untereinheit maßgeblich. Die hierdurch verursachte intrazelluläre Erhöhung von cAMP führt wiederum zu einer Aktivierung der PKA, die ihrerseits in der Folge verschiedene Proteine phosphoryliert, so z.B. Membranproteine (Rezeptoren, Kaliumkanäle) oder auch Regulatoren der Genexpression wie das CREB-Protein (**c**AMP-**r**esponse-**e**lement **b**inding protein). Das aktivierte CREB-Protein bindet an das sog. CRE-Element, welches im Promotorbereich verschiedener Gene lokalisiert ist und deren Aktivität erhöhen kann (Lee, 1991). Desweiteren ist die aktivierte PKA in der Lage, in die für die intrazelluläre Signaltransduktion wichtige MAP-Kinasen-Kaskade einzugreifen (**m**itogen-**a**ctivated **p**rotein kinase), an deren Ende die Phosphorylierung verschiedener Transkriptionsfaktoren liegt, die wiederum zur Aktivierung bzw. Deaktivierung bestimmter Gene führt (Cook und McCormick, 1993). Eine solche Signalkaskade gilt heute z.B. als die Grundlage der antiproliferativen und antimitogenen Wirkung von Prostazyklin in der glatten Gefäßmuskulatur (Weber et al., 1998).

Neurdings gibt es auch Arbeiten, in denen ein "shift" in der Kopplung des IP-Rezeptors von G_s hin zu G_q bzw. G_i im Verlauf dauerhafter Agonist-Stimulation beschrieben wird (Lawler et al., 2001), auf eine ähnliche Weise wie es z.B. auch für den β_2AR bereits beschrieben ist (Daaka et al., 1997). Die Autoren beschreiben für den IP-R einen PKA-

abhängigen Mechanismus, bei dem nach initialer Rezeptor-Stimulation und anschließender G_s -vermittelter Aktivierung der Adenylatzyklase mit konsekutivem Anstieg des intrazellulären cAMP die hierdurch aktivierte PKA den IP-R an einem definierten Serin-Rest im C-Terminus phosphoryliert und so seine nachfolgende Kopplung an G_i und G_q begünstigt. Für den β_2AR hingegen wurde ebenfalls ein PKA-abhängiger "shift" in der G-Protein-Kopplung beschrieben, bei der nach erfolgter Stimulation und G_s -Kopplung der Rezeptor ebenfalls durch die PKA phosphoryliert wird, was einerseits die nachfolgende Kopplung an G_i begünstigt und zum anderen die bereits oben erwähnte MAP-Kinasen-Kaskade in Gang setzt.

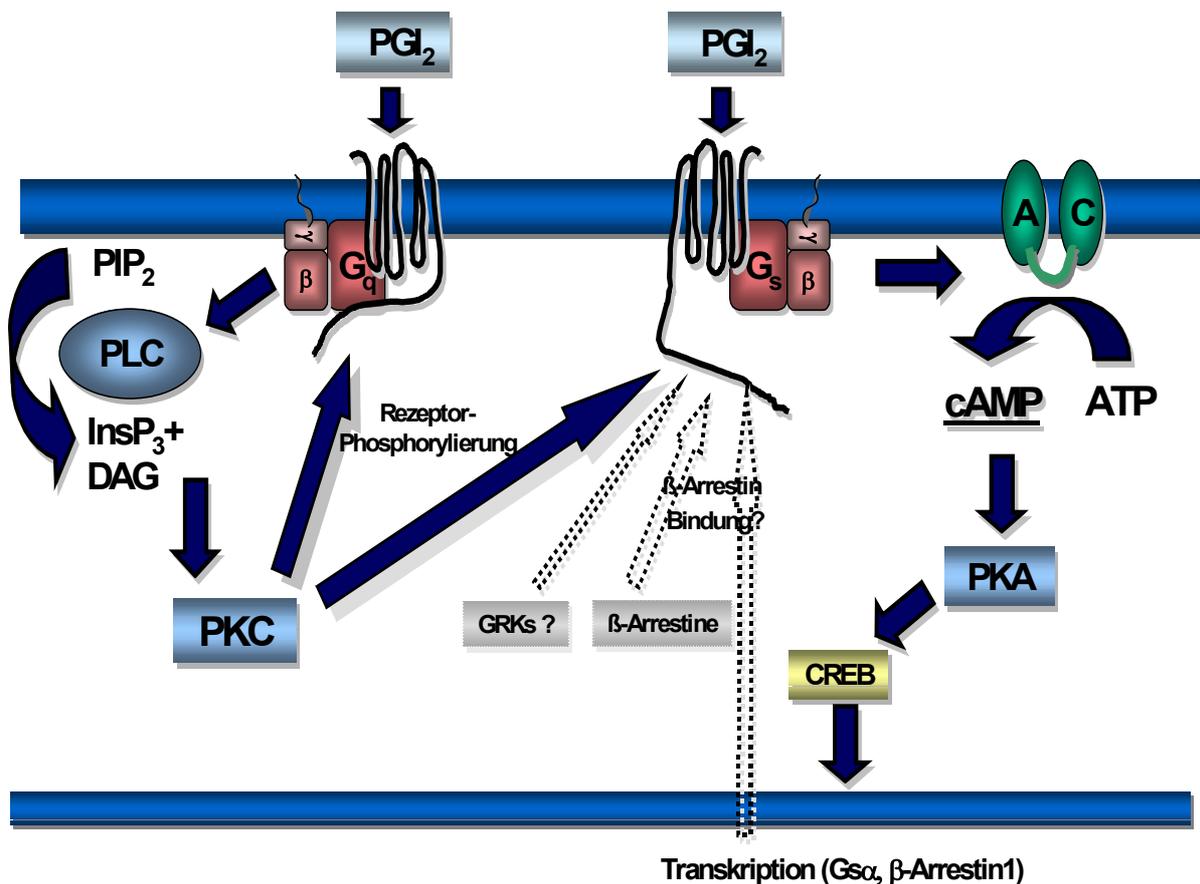


Abb. 3: Signaltransduktionswege des IP-Rezeptors

Die gefäßrelaxierende Wirkung schließlich vermittelt Prostazyklin über die IP-Rezeptor-vermittelte Öffnung membranärer Kalium-Kanäle (Siegel et al., 1991), wodurch eine Hyperpolarisation des Membranpotentials mit einem konsekutiven verminderten Einstrom von Calcium-Ionen in das Zellinnere ausgelöst wird. Die verminderte intrazelluläre Calciumkonzentration wiederum führt zur Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur (Faraci und Heistad, 1998).

1.2.3 IP-Rezeptor-Desensibilisierung

Wie auch bei anderen bekannten G-Protein gekoppelten Rezeptoren, so kann man auch im Fall des IP-Rezeptors eine Abnahme der Rezeptorantwort bei anhaltender Agonisten-Stimulation nachweisen. Dieses Phänomen, welches als (Rezeptor-)Desensibilisierung bezeichnet wird, stellt einerseits einen wichtigen physiologischen Regulationsmechanismus dar, da es die Zelle sowohl vor akuter wie auch chronischer Rezeptorüberstimulation bewahrt. Andererseits limitiert dieser Vorgang jedoch erheblich die klinisch-therapeutische Anwendbarkeit der derzeit verfügbaren synthetischen Prostazyklin-Analoga, die derzeit bei Erkrankungen wie der pulmonalen Hypertonie, der Prävention von Restenosen nach PTCA (= **P**ercutane **T**ransluminale **C**oronar-**A**ngioplastie) und zur Reduktion der Tumor-Metastasierung im Rahmen von klinischen Studien sowie im Tierversuch Anwendung finden.(s. unten)

Grundsätzlich kann man aufgrund der heutigen Erkenntnisse die Rezeptor-Desensibilisierungsvorgänge nach ihrem zugrundeliegenden Mechanismus sowie der Zeitkinetik unterscheiden. Hierbei trennt man zum einen zwischen einer Agonisten-spezifischen (sog. homologen) Desensibilisierung, die einen durch seinen Agonisten aktivierten Rezeptor voraussetzt und die bereits Sekunden bis Minuten nach Agonistenstimulation eintreten kann von einer unspezifischen, Agonisten-unabhängigen (sog. heterologen) Desensibilisierung, die durch Phosphorylierung des nicht aktivierten Rezeptors vermittelt wird, also durch andere Signaltransduktionsvorgänge ausgelöst wird. In beiden Fällen kommt es zu einer Unterbindung der Interaktion zwischen Rezeptor und G-Protein, wodurch die Signaltransduktionskette unterbrochen wird.

Aufgrund der Zeitkinetik kann man die bereits beschriebene Kurzzeitdesensibilisierung von der sog. Langzeitdesensibilisierung unterscheiden, die erst Minuten bis Stunden nach Agonistenzusatz auftritt und der eine Internalisierung des Rezeptors in das Zellinnere zugrunde liegt. Wichtig hierbei ist, dass der internalisierte Rezeptor einerseits einem "Recycling" zugeführt werden kann, oder aber in den Lysosomen degradiert und so de facto herabreguliert wird. (Abb.4)

Heute weiss man, dass vor allem 3 Gruppen von Proteinen an der Rezeptor-Desensibilisierung beteiligt sind:

-) Second-messenger abhängige Proteinkinasen (PKA, PKC)
-) G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK's)
-) Arrestine

Nach Aktivierung des Rezeptors und der dadurch ausgelösten Dissoziation des G-Proteins translozieren die GRK zur Zellmembran und phosphorylieren dort den C-Terminus des Rezeptors. Auf vergleichbare Weise führen auch PKA und PKC wie bereits beschrieben zu einer Phosphorylierung des Rezeptors, was wiederum den Rezeptor von seinem G-Protein entkoppelt. Im Anschluß an die Entkopplung binden die sog. Arrestine und verhindern zum einen eine weitere Interaktion zwischen Rezeptor und G-Protein und leiten zum anderen bereits die Internalisierung des Rezeptors ein.

Hierzu bindet das im Zytosol vorhandene Clathrin an das Arrestin und bildet die sog. Clathrin-Vesikel, in welchen der Rezeptor in die Zelle transportiert wird.

Von hier aus kann der Rezeptor zwei unterschiedliche Wege beschreiten:

Zum einen kann er in den Endosomen dephosphoryliert werden und an die Zellmembranoberfläche zurückgelangen. Dies wird durch den sauren pH-Wert der Endosomen ermöglicht, welcher zu einer Konformationsänderung des Rezeptors mit nachfolgender Dephosphorylierung führt. Zum anderen kann der internalisierte Rezeptor auch in den Lysosomen abgebaut werden, was zu einer Abnahme der Rezeptorgesamtzahl führt und eine Neusynthese von Rezeptorprotein zur Wiederherstellung des Signaltransduktionsweges erforderlich macht (König und Edwardson, 1997).

Neben diesem "klassischen" Desensibilisierungsmodell, welches am besten für den β_2 -adrenergen Rezeptor untersucht ist, werden mittlerweile eine Vielzahl modifizierter Mechanismen für andere GPCRs beschrieben, an denen die o.g. Komponenten in unterschiedlicher Gewichtung beteiligt sind, bzw. auch andere Faktoren beteiligt sind.

Für den IP-Rezeptor wurde bisher im Bereich der Kurzzeit-Desensibilisierung ein eher "klassischer" Mechanismus beschrieben (Smyth et al., 1996).

Desweiteren konnte man mittlerweile eine Reihe weiterer Proteine identifizieren, die die Rezeptoren entweder an G-Protein-unabhängige Signaltransduktionswege koppeln oder die G-Protein Spezifität und/oder Agonisten-Selektivität zu verändern scheinen (Calmodulin, Calcyon, AKAP, ATRAP etc.). Die genauen Funktionen und zellulären Interaktionsmechanismen dieser Proteine sind jedoch derzeit noch unzureichend bekannt und Gegenstand intensiver Forschung.

1.2.4 IP-Rezeptor Resensibilisierung

Für die Erhaltung der Gewebemöostase ist es von zentraler physiologischer Bedeutung, dass nach erfolgter Signaltransduktion und Desensibilisierung dieser Prozeß antagonisiert wird, da die Zelle ansonsten nicht in der Lage wäre, auf nachfolgende extrazelluläre Stimuli adäquat zu reagieren. So wie die Desensibilisierung einen Mechanismus darstellt, der die Zelle vor Überstimulation schützt, verhindert die Rezeptorresensibilisierung eine zu lang dauernde/irreversible Desensibilisierung.

Wie bereits ausführlich erörtert, ist einer der zentralen Mechanismen der Desensibilisierung die Internalisierung des aktivierten Rezeptors in ein intrazelluläres Membrankompartiment, an dem verschiedene Proteine, insb. die Arrestine, beteiligt sind. Dieser Vorgang ist absolut unerlässlich für die Resensibilisierung, da diese eine Dephosphorylierung des Rezeptors in diesem Kompartiment für ein nachfolgendes Recycling an die Zelloberfläche voraussetzt. (Barak et al., 1994)

Für den β_2 AR ist die Wichtigkeit der Internalisierung für die Resensibilisierung anhand vieler Beobachtungen belegt worden:

So beschrieben Sibley et al. 1986 bereits einen deutlich niedrigeren Anteil phosphorylierter Rezeptoren in der intrazellulären Membranfraktion im Vergleich zu Rezeptoren an der äußeren Zellmembran. Darüber hinaus wiesen sie eine erhöhte GPCR-spezifische Phosphataseaktivität in den Endosomen nach. Ebenfalls für den β_2 AR ist beschrieben, dass bestimmte Agenzien, die die Internalisierung verhindern (z.B.

Concanavalin A) einen hemmenden Effekt auf die Resensibilisierung hatten, ohne Einfluss auf die G-Protein-Kopplung oder die Desensibilisierung zu nehmen (Pippig et al., 1995; Garland et al., 1996; Hasbi et al., 2000). Desweiteren konnte für nicht internalisierende Mutanten des β_2 AR gezeigt werden, dass diese zwar desensibilisierten, aber nicht resensibilisierten (Barak et al., 1994)

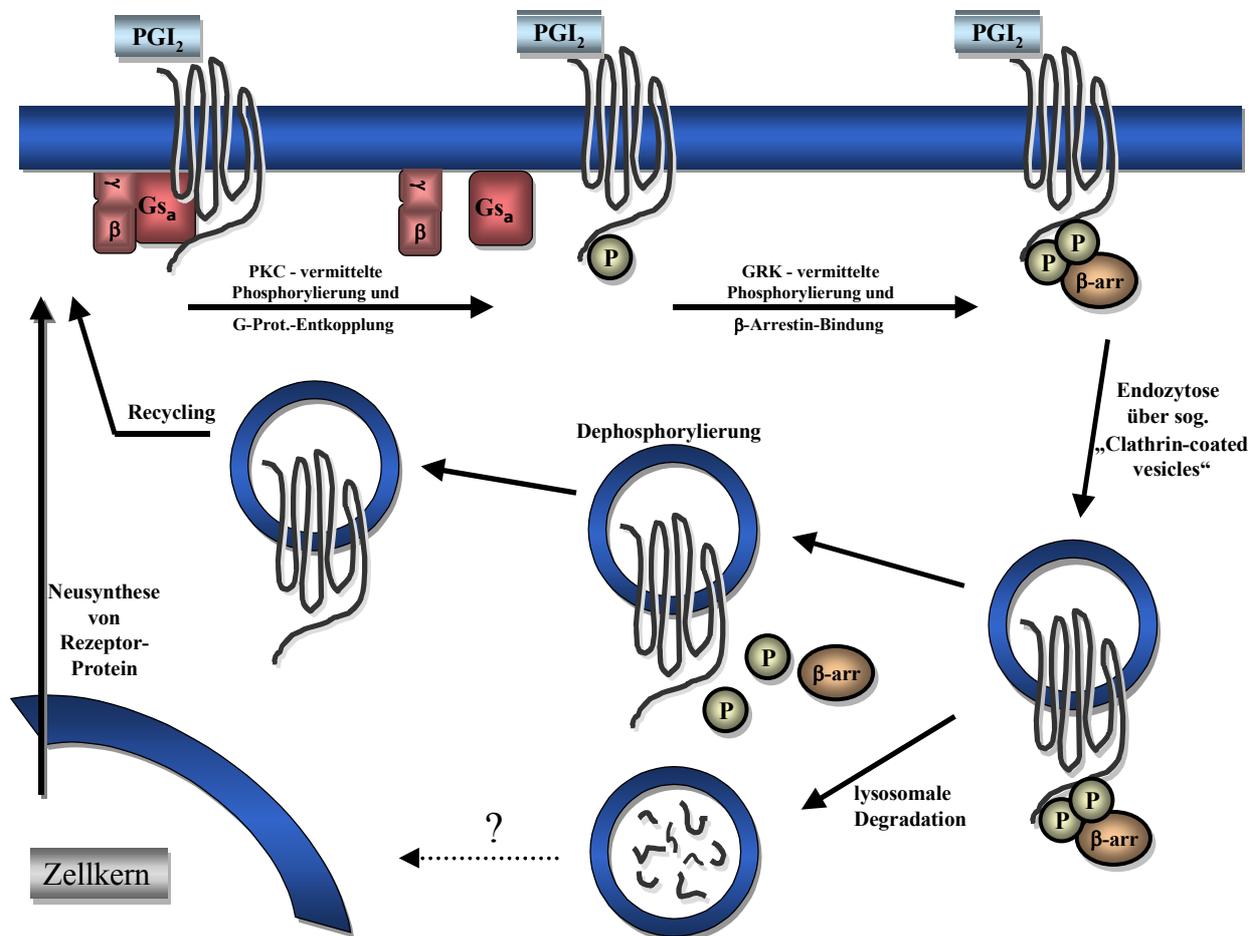


Abb.4: Mögliche Mechanismen der IP-Rezeptor Desensibilisierung und Resensibilisierung

1.3 Klinische Bedeutung

Von klinischer Relevanz sind neben dem Verständnis der molekularen Mechanismen ausserdem die Besonderheiten in der Kinetik der Resensibilisierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren:

Während die Desensibilisierung von GPCR's nur Sekunden bis Minuten dauert, erfordert die Resensibilisierung Minuten bis Stunden. Dies erklärt, warum viele GPCR-Agonisten einen reduzierten therapeutischen Langzeiteffekt haben, da die Resensibilisierung nach erfolgter Desensibilisierung langsamer verläuft und somit diese nicht adäquat kompensieren kann. Dieser Effekt wurde in verschiedenen klinischen Studien, die sich mit dem Verhalten des β_2 AR bei Herzinsuffizienz und Hypertonie beschäftigen, beschrieben (Ungerer et al., 1993; Gros et al., 1997).

Hieraus ergibt sich einerseits die Notwendigkeit einer genauen Klärung der Mechanismen der De- und v.a. der Resensibilisierung dieser Rezeptoren, als auch die Beschreibung der Resensibilisierungskinetik der verschiedenen Rezeptortypen, um ggf. ein Dosierungsschema zu entwickeln, welches diesen Mechanismen Rechnung trägt und somit eine optimale Dosisanpassung bei maximaler Wirksamkeit ermöglichen würde.

Klinische Einsatzgebiete von Prostazyklinmimetika, die von solchen optimierten Schemata profitieren würden, wären derzeit v.a. die Prävention von Gefäßrestenosen nach percutanen Coronarinterventionen, die Behandlung der pulmonalen Hypertonie sowie die Hemmung der Metastasierung bei soliden Tumoren. Zu all diesen Gebieten gibt es unterschiedliche Ergebnisse bezügl. des Erfolges in der experimentellen bzw. klinischen Anwendung.

So führte z.B. am Kaninchenmodell die postinterventionelle Gabe des Prostazyklinmimetikums Beraprost vier Wochen nach Coronarangioplastie zu einem signifikant größeren Gefäßdurchmesser im Vergleich zur Kontrollgruppe (Isogaya et al., 1995). Mit ähnlichem Erfolg wurde auch das Prostazyklinmimetikum Cicaprost an Kaninchen (Braun et al., 1993) und Schweinen (Banning et al., 1997) angewendet.

Ein weiterer vielversprechender tierexperimenteller Ansatz war die Beschichtung coronarer Stents mit einem Trägermaterial, welches kontinuierlich Iloprost freisetzt und das im Schaf- und Schweinmodell erfolgreich angewendet wurde (Alt et al., 2000).

In der klinischen Praxis erwiesen sich diese Ansätze jedoch als nur zum Teil erfolgreich.

Während einige Autoren eine Reduktion der Restenoserate durch kontinuierliche postinterventionelle Gabe von Ciprosten zeigen konnten (Darius et al., 1992; Raizner et al., 1993), konnte dies von anderen Arbeitsgruppen nicht bestätigt werden (Gershlick et al., 1994). Mögliche Gründe für die Divergenzen der Ergebnisse in der klinischen Anwendung gegenüber den tierexperimentellen Ansätzen könnten in einem unterschiedlichen De-/Resensibilisierungsverhalten der IP-Rezeptoren verschiedener Spezies begründet sein. Desweiteren läßt die kontinuierliche Verabreichung der Rezeptoragonisten keinerlei Spielraum für eine Rezeptorresensibilisierung, was die nach einiger Zeit deutlich verminderten Ansprechraten erklärt. Hier könnte eine Modifikation des Dosierungsschemas im Sinne einer diskontinuierlichen Applikation Vorteile bringen.

Eindrucksvoll untermauert wird diese Vermutung durch eine tierexperimentellen Studie von Schirner et al., die 1997 und 1998 die Auswirkung von Cicaprost auf die Metastasierung des Mammakarzinoms bei Ratten untersuchten. Hierbei konnte eine dosisabhängige Reduktion der Lungenmetastasen bei den Versuchstieren nachgewiesen werden, die eine einmalige, also diskontinuierliche Tagesdosis Cicaprost erhielten.

1.4 Ziele dieser Arbeit

- Nachweis der Rezeptoresensibilisierung des humanen IP-Rezeptors in einem überexprimierenden, stabil transfizierten Cos1-Zellsystem (hIP-R Cos1) nach erfolgter Desensibilisierung durch dauerhafte Agonist-Stimulation
- Nachweis der Rezeptoresensibilisierung des murinen IP-Rezeptors in einem natürlichen Zellsystem (A7r5-Zellen = VSMC der Ratte) und Vergleich mit dem humanen IP-Rezeptor
- Untersuchung des Resensibilisierungsverhaltens einer humanen C-terminal trunkierten Mutante des IP-Rezeptors in einem überexprimierenden, stabil transfizierten Cos1-Zellsystem (D318 Cos1) nach erfolgter Desensibilisierung durch dauerhafte Agonist-Stimulation und Vergleich mit Wildtyp-Rezeptoren
- Untersuchung der Regulation des $G_{s\alpha}$ -Proteins und der Adenylatzyklase während dauerhafter Agonist-Stimulation und nach Agonist-Entzug
- Untersuchung der Wirkung von Cycloheximid, einem Hemmstoff der zellulären Proteinsynthese, auf das Resensibilisierungsverhalten der 3 untersuchten Rezeptoren
- Untersuchung der Wirkung von Concanavalin A, einem Hemmstoff der Rezeptorinternalisation, auf das Resensibilisierungsverhalten der 3 untersuchten Rezeptoren

2 Material und Methoden

2.1 Zellkulturmaterial

Sämtliche für die Zellkultur verwendeten Materialien und Substanzen wurden von der Firma Gibco Life Technologies (Eggenstein, Deutschland) bezogen; lediglich die Kulturschalen stammten von Becton-Dickinson (Heidelberg, Deutschland). Sämtliche Arbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt.

2.2 Herstellung stabil transfizierter Cos 1 - Zellen

2.2.1 hIP-R Cos 1 Zellen (Wildtyp)

Ein Plasmid, welches die komplette hIP-R cDNA (hIP11/6.pcDNA1amp) enthielt, wurde freundlicherweise von Dr. M. Abramowitz (Merck Frosst Canada Inc., Quebec, Canada) zur Verfügung gestellt. Um eine Selektion in Säugetierzellen zu ermöglichen, wurde ein 1.4 kb *Eco*RI Fragment, das die gesamte codierende Sequenz enthielt, in die *Eco*RI site von pcDNA3.1Amp (Invitrogen, Groningen, Niederlande) kloniert.

2.2.2 D318 Cos 1-Zellen (Mutante)

Die C-terminal trunke Mutante D318 wurde durch Einfügen eines Stop-Codons anstelle des S319 Codons in der für den intrazellulären Abschnitt kodierenden Domäne unter Verwendung des QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) hergestellt. Die hierfür verwendeten Primer waren:

5'-GCCACGGAGACTGACAGACCCCCCTTCC-3' (sense)

5'-GGAAAGGGGTGTCTGTCAGTCTCCGTGGGC-3' (antisense)

2.2.3 Transfektion und Selektion der Transfektanten

Die Transfektion der Cos1-Zellen wurde mittels der Calcium-Phosphat-Copräzipitationsmethode nach Standard-Protokollen (Sambrook et al. 1989) durchgeführt. Die Selektion der Transfektanten wurde durch 3-wöchige Kultivierung der Zellen in G418-haltigem Medium (Calbiochem, Bad Soden, Deutschland) erreicht.

2.3 Zellkultur

2.3.1 Kultur stabil transfizierter COS1-Zellen

Affennierenzellen (COS1-Zellen) wurden nach der unter 2.2.3 beschriebenen Methode mit dem Prostacyclin-Rezeptorgen (Wildtyp oder Mutante) transfiziert.

Die Kultivierung erfolgte in Dulbecco's modified Eagle medium with Glutamax (Gibco Life Technologies, Eggenstein, Deutschland) versetzt mit 10% fetalem Kälberserum (FCS), Penicillin G (100 U/ml) und Streptomycin (0.1mg/ml) bei 37°C unter Begasung mit 5% CO₂/95% Luft, wobei etwa alle drei Tage ein Mediumwechsel erfolgte. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA (0.05%/ 0.5 mmol/l) abgelöst und passagiert.

Für alle Versuche wurden Zellen der Passagen 1-6 eingesetzt.

2.3.2 Kultur von A7r5 Zellen

Glatte Gefäßmuskelzellen der Ratte (A7r5 Zellen) wurden in Dulbecco's modified Eagle medium versetzt mit 15% fetalem Kälberserum (FCS), Penicillin G (100 U/ml) und Streptomycin (0.1mg/ml) bei 37°C unter Begasung mit 5% CO₂/95% Luft kultiviert, wobei ein Mediumwechsel etwa alle drei Tage erfolgte. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen wie unter 2.3.1. beschrieben passagiert.

2.4 cAMP – Bestimmung

2.4.1 Aussaat und Indometacin-Vorbehandlung der Zellen

Die Aussaat der Zellen erfolgte je nach Zellart 1 (Cos) bis 3 (A7r5) Tage vor dem Experiment in 6-well-Kulturschalen. Nach Erreichen einer Konfluenz von etwa 70% wurde das Medium 12 Stunden vor Versuchsbeginn abgesaugt und durch Indometacin-haltiges (1µg/ml) Medium ersetzt, um eine endogene Desensibilisierung des IP-Rezeptors durch in der Zelle gebildetes Prostazyklin zu verhindern.

2.4.2 Versuchsdurchführung

2.4.2.1 Desensibilisierungsversuche

Es erfolgte die Vorinkubation mit dem Rezeptor-Agonisten Cicaprost (200nM) für eine Zeitspanne von 30min bis 22h. Am Ende der jeweiligen Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt und die Aufbereitung der Proben für die cAMP-Bestimmung wie unter 2.4.3. beschrieben durchgeführt. Die 10-minütige Stimulation erfolgte wiederum mit Cicaprost (200nM).

2.4.2.2 Resensibilisierungsversuche

Es erfolgte eine 22-stündige Vorinkubation mit Cicaprost (200nmol/l), um eine maximale Desensibilisierung des IP-Rezeptors zu erreichen. Danach wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und Agonist-freies, Indometacin-haltiges Medium hinzugegeben, das ggf. die zu testende Substanz enthielt (z.B. Cycloheximid). Die Zellen wurden in diesem Medium für einen Zeitraum von 0 bis 22 Stunden im Brutschrank weiter inkubiert. Direkt im Anschluss erfolgte das Absaugen des Mediums und die Aufbereitung der Proben für die cAMP-Bestimmung wie unter 2.4.3. beschrieben.

2.4.3 Probenaufbereitung für die cAMP-Bestimmung

Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen zweimal mit 1ml HBSS-Waschpuffer gewaschen.

Bei den Desensibilisierungsversuchen wurden die Zellen zusätzlich mit 1ml saurer Waschlösung und noch zweimal mit 1ml HBSS-Waschpuffer gewaschen, um die Dissoziation des Agonisten vom Rezeptor zu beschleunigen und ihn so vollständig zu entfernen.

Anschließend wurden die Zellen in 1ml IBMX (3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin, 1mmol/l, Sigma, Deisenhofen), einem Phosphodiesterase-Inhibitor, bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von Cicaprost (200nmol/l), Forskolin (1µmol/l) oder Aluminiumfluorid (10µmol/l). Nach Inkubation für 10min bei 37°C wurden die Überstände abgesaugt und die Reaktion durch die Zugabe von eiskaltem 96%igem Ethanol abgestoppt. Anschließend wurde der Ethanol bei 60°C im Wärmeschrank verdampft und 1ml RIA-Puffer auf die Zellen gegeben, in dem sie 24 Stunden bei -80°C inkubiert wurden. Nach dem Auftauen wurden die Überstände zentrifugiert (10min, 12000 rpm, 4°C, Heraeus Biofuge 13) und der cAMP-Gehalt des Überstandes mittels Radioimmunoassay (RIA; Steiner et.al., 1972) bestimmt.

Auf die Zellen wurde 1ml NaOH (0.1 N) gegeben, anschließend 30 min unter Schütteln bei 37°C inkubiert und der Proteingehalt der Proben mit der Methode nach Bradford (1976) (s.u.) bestimmt.

2.4.4 cAMP – Messungen mittels Radioimmunoassay (RIA)

2.4.4.1 Prinzip des klassischen RIA

Die Probe, die das zu bestimmende Antigen in unbekannter Konzentration enthält, wird mit einer definierten Menge eines gleichartigen, radioaktiv markierten Antigens (Tracer) sowie einer geringen Menge spezifischer Antikörper bis zur Einstellung eines Gleichgewichtes inkubiert. Tracer und zu bestimmendes Antigen konkurrieren dabei um die Bindungsstellen an den spezifischen Antikörpern. Nach Gleichgewichtseinstellung

erfolgt die Trennung von freiem und gebundenem Antigen sowie die Messung der Radioaktivität in beiden Fraktionen. Die Ermittlung der ursprünglichen Antigenkonzentration in der Probe erfolgt dann anhand einer Standardkurve mit bekannten Antigenkonzentrationen.

2.4.4.2 Durchführung der Messungen

Die cAMP-Messung wurde nach erfolgter Aufarbeitung der Proben im RIA-Labor des Institutes für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie von Frau Rüter und Frau Drosten durchgeführt.

2.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

2.5.1 Proben ohne detergenzhaltige Puffer

Die Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Bradford (1976) mithilfe eines "Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent" (Bio-Rad, München) ermittelt, wobei eine mit Rinderserumalbumin erstellte Eichkurve als Standard verwendet wurde. 20 Minuten nach Zugabe des Bradfordreagenzes zu den Proben wurde die Proteinkonzentration photometrisch in einem ELISA-Reader (Bio-Rad, München) bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt.

2.5.2 Proben mit detergenzhaltigem Puffer

Bei Verwendung von detergenzhaltigen Puffern wurden die Proteinkonzentrationen mit der Methode von Lowry et.al. (1951) unter Verwendung des "Bio-Rad Dc-Protein Assay" (Bio-Rad, München) ermittelt. Als Standard diente auch hier eine Eichkurve aus Rinderserumalbumin. Die photometrische Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte 15 min nach Zugabe des Lowry-Reagenzes bei 750 nm.

2.6 Zellmembranpräparation

2.6.1 Vorbehandlung und Ernte der Zellen

Von den Kulturschalen wurde das Medium abgesaugt, 10 ml TEDEG-Puffer pro Schale hinzugegeben und die Schalen auf Eis gestellt. Die Zellen wurden sodann mit dem Zellschaber abgeschabt und die Zellsuspension in ein Falcon-Röhrchen überführt. Die Platten wurden mit weiteren 10 ml TEDEG-Puffer gespült, welcher dann ebenfalls in die entsprechenden Falcon-Röhrchen überführt wurde.

2.6.2 Zellaufschluss und Membranisolierung

Es erfolgte dann der Zellaufschluss mittels Polytron Stufe 7 jeweils 3x6 Sekunden, wonach das Homogenisat durch zwei Lagen Mull in ein neues Falcon-Röhrchen filtriert und anschließend bei 2000 rpm und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde erneut durch zwei Lagen Mull in ein Zentrifugenröhrchen filtriert und sodann bei 20.000 rpm und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml HN-Puffer resuspendiert und in zwei Portionen á 5ml je 10 mal gepottert. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 20 000 rpm und 4°C für 10 Minuten. Wiederum wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 1ml HN-Puffer resuspendiert, gepottert, im Verhältnis 3:1 mit Laemmli-Puffer versetzt und in Aliquots á 200µl bei -20°C eingefroren.

2.6.3 Bestimmung der Proteinmenge

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte, wie bereits beschrieben, mit der Methode nach Bradford (s.o.).

2.7 Western-Blot Analyse

2.7.1 Vorbehandlung der Zellen

Die Aussaat der Zellen erfolgte hierbei in d150 Schalen und nach Erreichen der Subkonfluenz wurden die Zellen für 12 Stunden vor Versuchsbeginn in Indometacin-haltigem Medium (1µmol/l) inkubiert. Anschließend erfolgte entweder nur die Vorbehandlung der Zellen mit Cicaprost für 0-22 Stunden (Desensibilisierungsversuche) oder sowohl die vorgenannte Vorbehandlung für 22 Stunden mit sich anschließender Weiterinkubation in Agonist-freiem, Indometacin-haltigem Medium für 0-6 Stunden (Resensibilisierungsversuche). Am Ende dieser Vorbehandlungsprotokolle wurden die Zellen geerntet und die Zellmembranen wie unter 2.6.1. beschrieben präpariert.

2.7.2 Auftrennung der Proteine mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die so gewonnenen Zellmembranproteine wurden mit 4x Laemmli-Puffer versetzt und 5min bei 95°C denaturiert. Die anschließende Auftrennung der Proteine (100µg/Spur) erfolgte nach dem Prinzip der diskontinuierlichen Gelelektrophorese (*Laemmli, 1970*) auf einem 8%igen (Adenylatcyclase) bzw. 12%igen (G-Protein) Polyacrylamidgel bei 40V über Nacht in einer Hoefer SE 600 Elektrophoresekammer (Hoefer Scientific Instruments, USA) in 1x Laufpuffer + 0.1% SDS. Ein vorgefärbter hochmolekularer Proteinstandard (Sigma, Deisenhof) diente hierbei als Molekulargewichtsmarker.

2.7.3 Transfer der aufgetrennten Proteine

Der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidene Difluoride Membrane (PDVF, Millipore, Immobilon P, Sigma, München) erfolgte mittels Elektroblot bei insgesamt 1200 mAh in einer Trans-Blot-Cell (Bio-Rad, München), gefüllt mit Blotpuffer.

2.7.4 Hybridisierung und Detektion der Proteine

Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurde die Membran zunächst in TBSTM über Nacht bei 4°C prähybridisiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Primärantikörper (polyklonales Antiserum rabbit anti-Gs α bzw. rabbit anti-adenylyl cyclase V, Santa Cruz, CA, USA) für 3 Stunden. Nach dreimaligem Waschen in TBST für jeweils 10min erfolgte die Hybridisierung mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (Santa Cruz, CA, USA) für 1 Stunde. Nach erneutem Waschen in TBST (s.o.) erfolgte die Detektion mit einem ECL-System (Amersham) und Visualisierung auf einem Röntgenfilm (Amersham).

2.8 Statistik und Berechnungen

Für die statistische Auswertung und die graphische Darstellung der Versuchsergebnisse wurden jeweils der Mittelwert (X) und der Standardfehler (SEM) bei n Versuchen bestimmt.

Die zelluläre cAMP-Synthese wurde jeweils in pmol cAMP/mg Protein x 10min⁻¹ und in Prozent der cAMP-Produktion unbehandelter Zellen (=100%; „CON“) angegeben.

Zur Ermittlung von Signifikanzen wurde der ungepaarte t-Test (Vergleich von zwei Gruppen) oder Ein-Weg-Varianzanalyse (Vergleich von drei Gruppen) eingesetzt.

Das Signifikanzniveau p für α wurde mit 0.05 festgelegt und in den Abbildungen mit * markiert.

Sämtliche Berechnungen inklusive der Statistik sowie alle Diagramme wurden mithilfe der GraphPad Prism-Software durchgeführt bzw. hergestellt.

2.9 Puffer

Blot Puffer

1x Laufpuffer	
Methanol	20%

HN Puffer

Hepes pH 8	20 mmol/l
NaCl	100 mmol/l
PMSF	1 mmol/l

10x Elektrophorese

Puffer

MOPS	20 mmol/l
Na Acetat	50 mmol/l
EDTA	10 mmol/l
pH 7.0	

4x Laemmli Puffer

Tris/HCl	0.25 mol/l
SDS	8%
Glycerin	40%
2-Mercaptoethanol	20%
Bromphenolblau	0.001%
DTT	100 mmol/l
pH 6.8	

10x HBSS

NaCl	1.35 mol/l
KCl	50 mmol/l
Na ₂ HPO ₄	4 mmol/l
KH ₂ PO ₄	4.5 mmol/l
MgSO ₄	8 mmol/l
NaHCO ₃	40 mmol/l
pH 7.0	

10x Laufpuffer

Tris	250 mmol/l
Glycin	1.9 mol/l

RIA Puffer

Tris/HCl	50 mmol/l
EDTA	4 mmol/l
pH 7.5	

1x HBSS Waschpuffer

1x HBSS	
CaCl ₂	1 mmol/l
Glucose	5.5 mmol/l
HEPES	10 mmol/l; pH 7.8
BSA	1 mg/ml
pH 7.6	

RIPA Puffer

Tris/HCl	150 mmol/l
NaCl	150 mmol/l
Na-Deoxycholsäure	0.5 mmol/l
NP-40	1%
SDS	0.1%

PBS		TBSTM	
NaCl	137 mmol/l	1x TBST	
KCl	2.7 mmol/l	Magermilchpulver	5%
KH ₂ PO ₄	1.5 mmol/l		
Na ₂ HPO ₄	8.3 mmol/l	TEDEG Puffer	
pH 7.4		Tris/HCl	50 mmol/l
		EDTA	5 mmol/l
4x Sammelgelpuffer		EGTA	2 mmol/l
Tris/HCl	0.5 mmol/l	PMSF	1 mmol/l
SDS	0.4%		
pH 8.8		4x Trenngelpuffer	
		Tris/HCl	1.5 mmol/l
10x TBS		SDS	0.4%
Tris/HCl	100 mmol/l	pH 8.8	
NaCl	1.5 mmol/l		
		Saure Waschlösung	
TBST		Glycin	50 mmol/l
1x TBS		NaCl	150 mmol/l
Tween 20	0.1%	pH 3.0	

2.10 Substanzen und Chemikalien

Aluminiumfluorid	Fluka
Cicaprost	Schering AG, Berlin
Concanavalin A	Sigma, Deisenhofen
Cycloheximid	Sigma, Deisenhofen
Forskolin	Sigma, Deisenhofen
IBMX	Sigma, Deisenhofen
Indometacin	Luitpold-Pharma, München

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis der De- und Resensibilisierung auf Rezeptorebene in den untersuchten Zelllinien

3.1.1 Verlauf der IP-Rezeptor-vermittelten cAMP-Bildung während dauerhafter Stimulation mit Cicaprost und nach Agonist-Entzug in hIP-R COS1-Zellen (Wildtyp)

Zum Nachweis der De- und Resensibilisierung auf der Ebene des Rezeptors wurde die Rezeptor-vermittelte cAMP-Bildung durch Neustimulation zu verschiedenen Zeitpunkten nach Dauerstimulation mit dem selektiven IP-Rezeptor Agonisten Cicaprost gemessen. Die Angabe der Ergebnisse sämtlicher cAMP-Assays wird im folgenden stets in Prozent des Kontrollwertes angegeben (100%=CON; entspricht max. cAMP-Bildung bei Stimulation mit 200 nM Cicaprost ohne vorherige Cicaprost-Vorinkubation). Dies geschieht aufgrund einer besseren Vergleichbarkeit der Versuchsreihen untereinander, da in Abhängigkeit von den verwendeten Zellpassagen und der jeweiligen Zellreihe die maximale cAMP-Produktion pro mg Protein deutliche Unterschiede aufweist. Die Absolutwerte der Kontrollwerte lagen zwischen 100 und 250 pmol cAMP/mg Protein, die Absolutwerte der Negativkontrollen (= zelluläres cAMP ohne Cicaprost-Stimulation) zwischen 15 und 40 pmol cAMP/mg Protein.

Bereits nach 2-stündiger Cicaprost-Stimulation sank die cAMP-Bildung auf $59.8 \pm 8.6\%$ (n=5) ihres Ausgangswertes. Ihr Minimum erreichte die cAMP-Bildung mit $26.5 \pm 2.8\%$ (n=5) des Ausgangswertes nach 22-stündiger Cicaprost-Stimulation. (Abb.5)

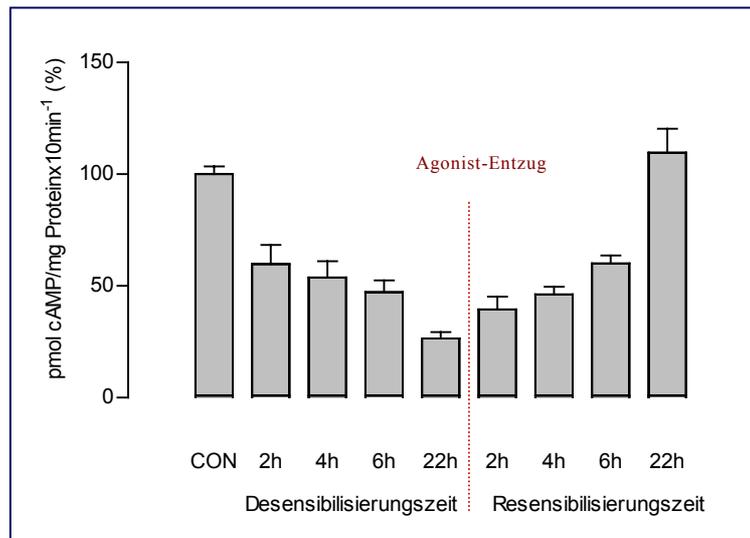


Abb.5: Verlauf der IP-Rezeptor-vermittelten cAMP-Bildung in hIP-R COS1-Zellen (Wildtyp) (n=5)

Nach Agonist-Entzug stieg die cAMP-Produktion bereits nach 2 Stunden wieder auf $39.6 \pm 5.6\%$ (n=5), erreichte nach 6 Stunden $60.0 \pm 3.6\%$ (n=5) und erreichte nach 22-stündigem Agonist-Entzug schließlich erneut den Kontrollwert mit $109.6 \pm 10.7\%$ (n=5). (Abb.5)

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde für sämtliche nachfolgenden Versuche zur Resensibilisierung eine Cicaprost-Vorinkubationszeit von 22 Stunden festgelegt, da nach dieser Zeit von einer vollständigen Rezeptor-Desensibilisierung ausgegangen werden kann.

3.1.2 Verlauf der IP-Rezeptor-vermittelten cAMP-Bildung während dauerhafter Stimulation mit Cicaprost und nach Agonist-Entzug in D318 COS1-Zellen (C-terminal trunkierter Rezeptor)

Auf gleiche Weise wie unter 3.1.1 beschrieben wurde der zeitliche Verlauf der IP-Rezeptor-vermittelten cAMP-Bildung in D318 COS1-Zellen untersucht. Im Gegensatz zum Wildtyp-Rezeptor fehlt diesem C-terminal trunkierten Rezeptor der größte Anteil des intrazellulären C-Terminus und damit zwei potentielle PKC-

Phosphorylierungsstellen. Dieser Umstand ermöglicht es, die Rolle dieser PKC-Phosphorylierungsstellen bei der De- bzw. der Resensibilisierung zu untersuchen.

Nach einer Cicaprost-Dauerstimulation von zwei Stunden sank auch in diesem Zelltyp die cAMP-Produktion deutlich ab, und zwar auf $60.0 \pm 5.5\%$ ($n=5$) des Ausgangswertes (=CON; entspricht max. cAMP-Bildung bei Stimulation mit 200nM Cicaprost ohne vorherige Cicaprost-Vorinkubation) (Abb.6). Das Minimum von $31.1 \pm 7.3\%$ ($n=5$) wurde auch hier nach 22 Stunden erreicht, so dass auch bei diesem Zelltyp die Vorinkubationszeit für künftige Versuche zur Resensibilisierung mit 22 Stunden festgelegt wurde.

Nach Agonist-Entzug war auch hier ein Wiederanstieg der IP-Rezeptor-vermittelten cAMP-Bildung zu verzeichnen. Bereits nach zwei Stunden stiegen die Werte auf $52.7 \pm 6.4\%$ ($n=5$), nach sechs Stunden auf $78.6 \pm 5.3\%$ ($n=5$) und erreichten ebenfalls nach 22-stündigem Agonist-Entzug mit $98.6 \pm 10.8\%$ ($n=5$) in etwa den Ausgangswert (Abb.6).

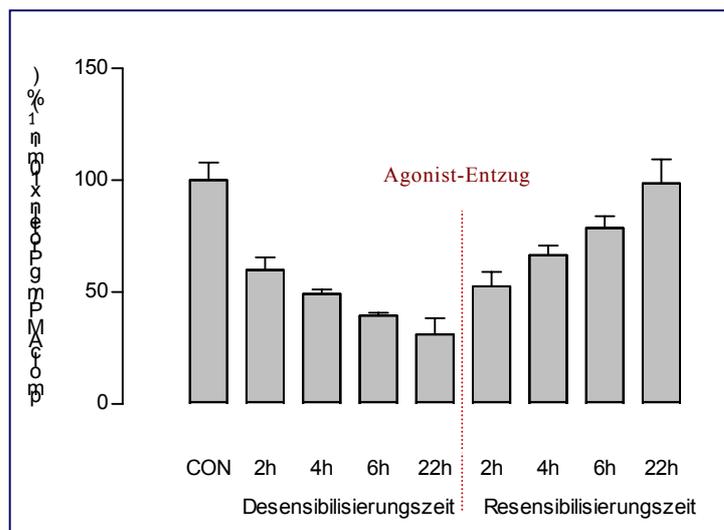


Abb.6: Verlauf der IP-Rezeptor-vermittelten cAMP-Bildung in D318 COSI-Zellen (C-terminal trunkierter Rezeptor) ($n=5$)

3.1.3 Verlauf der IP-Rezeptor-vermittelten cAMP-Bildung während dauerhafter Stimulation mit Cicaprost und nach Agonist-Entzug in A7r5-Zellen

Dieses natürliche Zellsystem aus vaskulären Ratten-Gefäßmuskelzellen wurde genau wie die beiden vorgenannten, mit dem humanen Rezeptor transfizierten Zelltypen auf seine IP-Rezeptor-vermittelte cAMP-Bildung während dauerhafter IP-Rezeptor-Stimulation mit Cicaprost bzw. nach Agonist-Entzug hin untersucht. Hier zeigte sich nach zwei Stunden bereits ein drastischer Rückgang der cAMP-Produktion auf nur noch $23.8 \pm 1.3\%$ ($n=5$) des Ausgangswertes (=CON; entspricht max. cAMP-Bildung bei Stimulation mit 200 nM Cicaprost ohne vorherige Cicaprost-Vorinkubation). Während nach 6-stündiger Inkubation die Rezeptor-Antwort noch bei $10.7 \pm 0.7\%$ ($n=5$) lag, sank sie im Verlauf von 22 Stunden schließlich auf $2.9 \pm 1.0\%$ ($n=5$) ab und erreichte damit ihr Minimum (Abb.7). Hieraus folgte, dass auch für dieses Zellsystem die Vorinkubationszeiten für die Resensibilisierungsversuche auf 22 Stunden festgesetzt wurde.

Nach Agonist-Entzug zeigten auch die A7r5-Zellen einen erneuten Anstieg der IP-Rezeptor-vermittelten cAMP-Produktion: Nach zwei Stunden lag die Rezeptor-Antwort bereits wieder bei $10.3 \pm 1.3\%$ ($n=5$), nach sechs Stunden bei $54.0 \pm 19.4\%$ ($n=5$) und erreichte nach 22 Stunden mit $111.7 \pm 15.4\%$ ($n=5$) wieder Kontrollwerte (Abb.7).

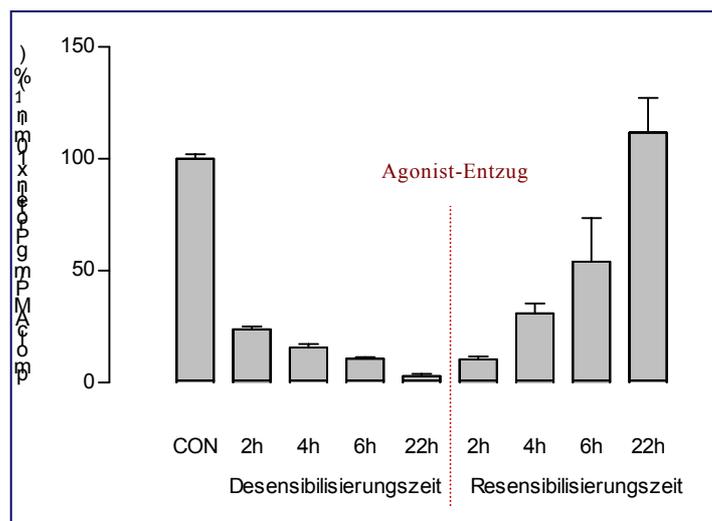


Abb.7: Verlauf der IP-Rezeptor-vermittelten cAMP-Bildung in A7r5-Zellen (VSMC der Ratte) ($n=5$)

3.1.4 Vergleich der IP-Rezeptor vermittelten cAMP-Bildung bei humanem Wildtyp-Rezeptor und C-terminal trunkiertem Rezeptor

Grundsätzlich zeigen, wie bereits oben beschrieben, sowohl der humane Wildtyp-IP-Rezeptor (hIP-R) als auch die C-terminal trunkierte Mutante D318 im Verlauf einer dauerhaften Stimulation mit Cicaprost eine deutliche Abnahme der IP-Rezeptor-vermittelten cAMP-Bildung im Sinne einer Rezeptor-Desensibilisierung. Ebenso zeigen beide Rezeptoren nach Agonist-Entzug einen Wiederanstieg der Rezeptor-Antwort auf Höhe der Ausgangswerte im Verlauf von 22 Stunden (Tab.1).

Obwohl es im Verlauf der Desensibilisierung keinerlei signifikante Abweichungen zwischen den beiden Rezeptoren festzustellen gibt, so weichen die Werte während der Resensibilisierung zumindest an zwei Punkten signifikant voneinander ab: Während zwei Stunden nach Agonist-Entzug bereits zu erkennen war, dass die Mutante (D318) höhere cAMP-Werte aufwies als der Wildtyp (hIP), so war der Unterschied 4h nach Agonist-Entzug mit $46.3 \pm 3.3\%$ (hIP) vs. $66.5 \pm 4.4\%$ (D318) bereits signifikant unterschiedlich ($p=0.0064$). Ebenfalls signifikant unterschieden sich die Werte 6h nach Agonist-Entzug: $60.0 \pm 3.6\%$ (hIP) ($n=5$) vs. $78.6 \pm 5.3\%$ (D318) ($n=5$), ($p=0.0203$). Die Endpunkte der beiden Kurven wichen jedoch mit $109.6 \pm 10.7\%$ (hIP) ($n=5$) bzw. $98.6 \pm 10.8\%$ (D318) ($n=5$) nicht mehr signifikant voneinander ab.

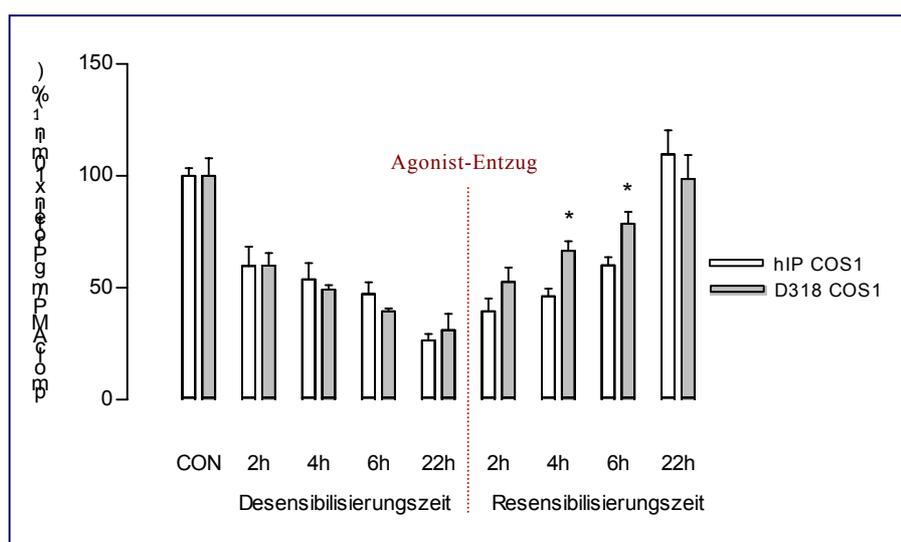


Abb.8: Vergleich der IP-Rezeptor-vermittelten cAMP-Bildung in hIP-R COS1-Zellen (Wildtyp) und D318 COS1-Zellen (C-terminal trunkiert) ($n=5$)

**Tab.1: Vergleich hIP-R COS1- und D318COS1-Zellen:
cAMP-Werte in % der Ausgangswerte (=CON)**

	hIP COS1			D318 COS1			Signif.
	X (%)	SEM (%)	N	X (%)	SEM (%)	N	
CON	100,0	3,5	5	100,0	8,0	5	/
2h	59,8	8,6	5	60,0	5,5	5	ns
4h	53,8	7,3	5	49,2	2,0	5	ns
6h	47,3	5,2	5	39,5	1,3	5	ns
22h	26,5	2,8	5	31,1	7,3	5	ns
Agonist-Entzug							
2h	39,5	5,6	5	52,7	6,4	5	ns
4h	46,3	3,3	5	66,5	4,4	5	p=0,0064
6h	60,0	3,6	5	78,6	5,3	5	p=0,0203
22h	109,6	10,7	5	98,6	10,8	5	ns

3.1.5 Vergleich der IP-Rezeptor-vermittelten cAMP-Bildung in einem natürlichen (A7r5) und einem transfizierten (hIP-R COS1) Zellsystem

Beim Vergleich der IP-Rezeptor-vermittelten cAMP-Bildung im Verlauf dauerhafter Agonist-Stimulation mittels Cicaprost und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Agonist-Entzug fanden sich deutliche Unterschiede zwischen natürlichem (A7r5) und transfiziertem (hIP-R COS1) Zellsystem: Während der Agonisten-Stimulation zeigten die A7r5-Zellen zu allen Zeitpunkten einen signifikant stärkeren Rückgang der IP-Rezeptor-vermittelten cAMP-Bildung als die hIP-R COS1-Zellen und auch das absolute Ausmaß der Desensibilisierung war im natürlichen Zellsystem signifikant größer. (Werte s. Tab.2 u. Abb.9)

Auch der Wiederanstieg der cAMP-Antwort nach Agonist-Entzug verlief bei den A7r5-Zellen schneller als im transfizierten Zellsystem der hIP-R COS1-Zellen, jedoch nur innerhalb der ersten vier Stunden nach Agonist-Entzug. Sechs Stunden nach Agonist-Entzug zeigte das Ausmaß der cAMP-Produktion in beiden Zelltypen bereits ähnliche Werte, um schließlich nach 22h auf einem nahezu identischen, leicht überbasalen Level sich einzupendeln. (Werte s. Tab.2 u. Abb.9)

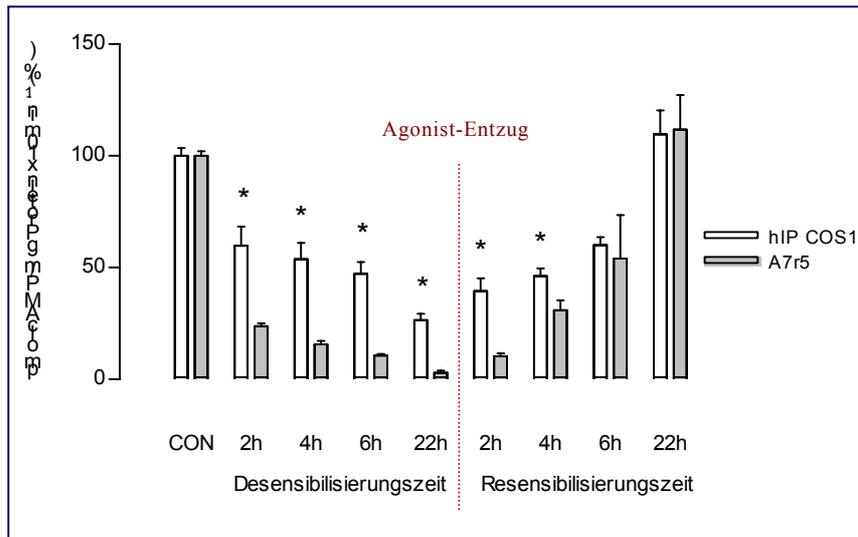


Abb.9: Vergleich der IP-Rezeptor-vermittelten cAMP-Bildung in hIP-R COS1-Zellen (Wildtyp) und A7r5-Zellen (n=5)

Tab.2: Vergleich hIP-R COS1- und A7r5-Zellen:
cAMP-Werte in % der Ausgangswerte (=CON);
ns= nicht signifikant

	hIP-R Cos1			A7r5			Signif.
	X (%)	SEM (%)	N	X (%)	SEM (%)	N	
CON	100,0	3,5	5	100,0	2,0	5	ns
2h	59,8	8,6	5	23,7	1,3	5	p=0,0032
4h	53,8	7,3	5	15,7	1,6	5	p=0,0009
6h	47,3	5,2	5	10,7	0,7	5	p=0,0001
22h	26,5	2,8	5	2,9	1,0	5	p<0,0001
Agonist-Entzug							
2h	39,5	5,6	5	10,3	1,3	5	p=0,0010
4h	46,3	3,3	5	30,9	4,5	5	p=0,0251
6h	60,0	3,6	5	54,0	19,4	5	ns
22h	109,6	10,7	5	111,7	15,4	5	ns

3.2 Regulation des $G_{s\alpha}$ -Proteins zu verschiedenen Zeitpunkten nach Agonist-Entzug nach erfolgter Agonist-Dauerstimulation

3.2.1 Bestimmung der $G_{s\alpha}$ -Proteinmenge in Zellmembranen mittels Westernblot und Messung der Aluminiumfluorid-induzierten cAMP-Synthese in hIP-R COS1-Zellen

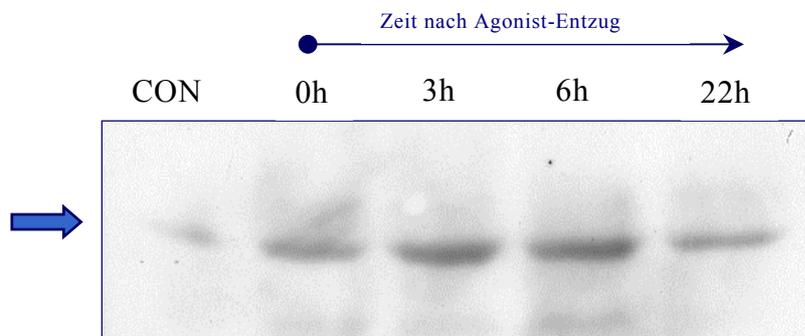


Abb.10: $G_{s\alpha}$ -Proteinmenge zu verschiedenen Zeitpunkten nach Agonist-Entzug in hIP-R COS1 Zellmembranen (CON= unbehandelte Zellen) (n=3)

Nach Entzug des Agonisten kommt es in hIP-R COS1 Zellmembranen zu keiner deutlichen Zu- oder Abnahme der $G_{s\alpha}$ -Proteinmenge im Verlauf von 0-6h, jedoch sieht man 22h nach Agonist-Entzug eine leichte Abnahme der Proteinmenge. Deutlich hingegen sieht man auch hier die durch die Cicaprost-Vorinkubation bedingte, insgesamt Zunahme der membrangebundenen $G_{s\alpha}$ -Proteine (CON<0h).

Diese Ergebnisse finden jedoch nur teilweise eine fassbare Entsprechung im cAMP-Assay: Während nach Agonist-Entzug (0-22h) ebenfalls keinerlei signifikante Veränderungen der Aluminiumfluorid-induzierten cAMP-Synthese nachzuweisen sind, fehlt hier jedoch der Nachweis einer insgesamt, funktionellen G-Protein-Erhöhung durch Cicaprost-Vorinkubation (CON=0h).(Abb.11)

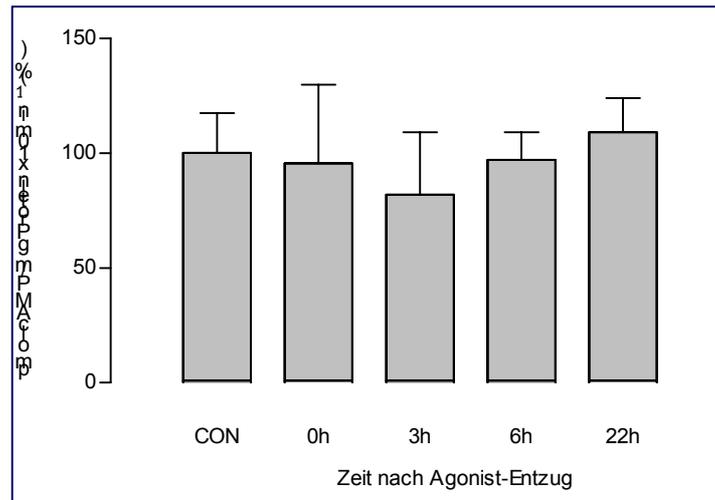
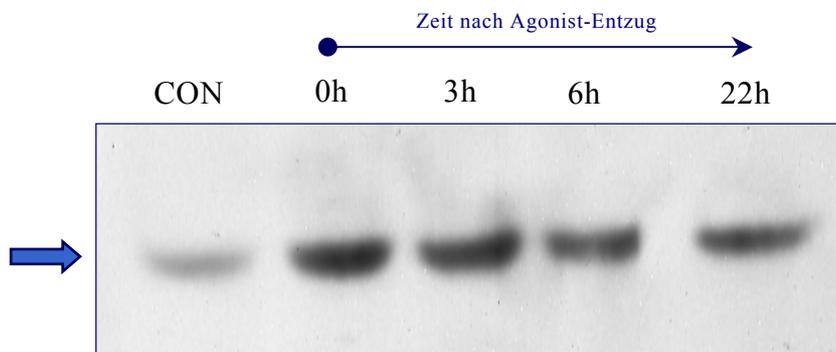


Abb.11: Aluminiumfluorid-induzierte cAMP-Synthese zu verschiedenen Zeitpunkten nach Agonist-Entzug in hIP-R COS1-Zellmembranen (CON= unbehandelte Zellen) (n=5)

3.2.2 Bestimmung der $G_s\alpha$ -Proteinmenge in Zellmembranen mittels Westernblot und Messung der Aluminiumfluorid-induzierten cAMP-Synthese in D318 COS1-Zellen



Agonist-Entzug in D318 COS1-Zellmembranen (CON= unbehandelte Zellen) (n=3)

Während es im Verlauf der Agonist-Entzugsphase (0-22h) zu keiner erkennbaren Veränderung der $G_{s\alpha}$ -Proteinmenge kam, so konnte man jedoch stets die bereits mehrfach erwähnte, insgesamte Zunahme der Proteinmenge in den Cicaprost-vorinkubierten gegenüber den unbehandelten Zellen (CON) beobachten.(Abb.12)

Im cAMP-Assay war zwar eine tendenzielle Erhöhung der cAMP-Produktion nach Aluminiumfluorid-Stimulation nachweisbar, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (Abb.13).

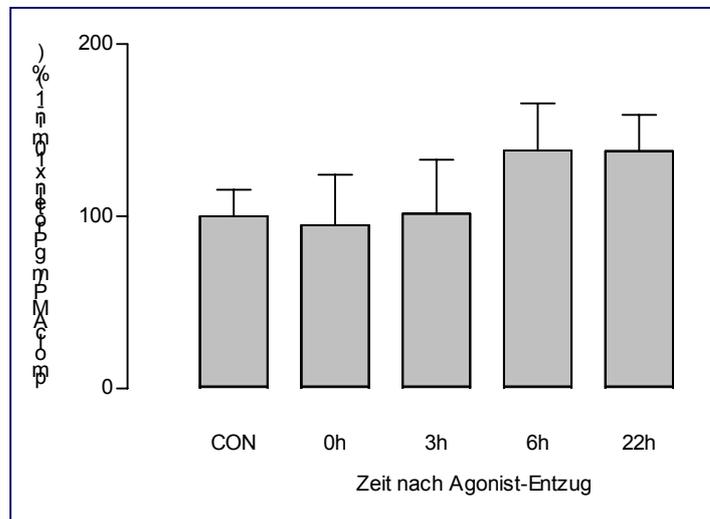


Abb.13: Aluminiumfluorid-induzierte cAMP-Synthese zu verschiedenen Zeitpunkten nach Agonist-Entzug in D318 Cos1-Zellen (CON= unbehandelte Zellen)n=5

3.2.3 Bestimmung der $G_s\alpha$ -Proteinmenge in Zellmembranen mittels Westernblot und Messung der Aluminiumfluorid-induzierten cAMP-Synthese in A7r5-Zellen

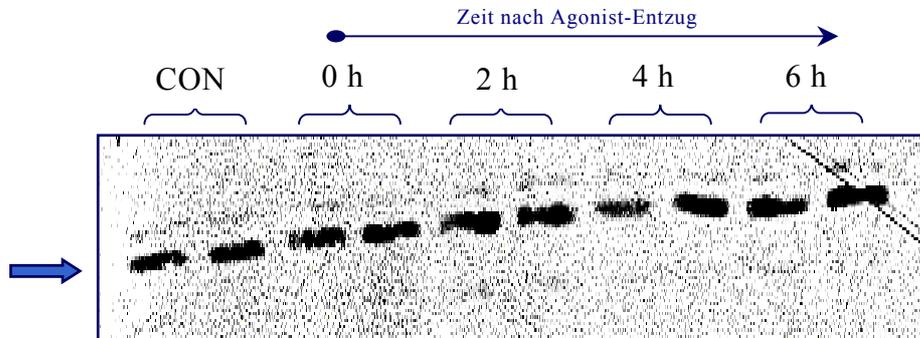


Abb.14: $G_s\alpha$ -Proteinmenge zu verschiedenen Zeitpunkten nach Agonist-Entzug in A7r5-Zellmembranen (CON= unbehandelte Zellen) (n=3)

Auch zu verschiedenen Zeitpunkten nach Agonist-Entzug kam es zu keiner messbaren Veränderung des $G_s\alpha$ -Proteingehaltes der Zellmembran in A7r5-Zellen (Abb.14) (n=3). Auch im cAMP-Assay konnte keine signifikante Veränderung der Aluminiumfluorid-induzierten cAMP-Synthese nachgewiesen werden (Abb.15) (n=5).

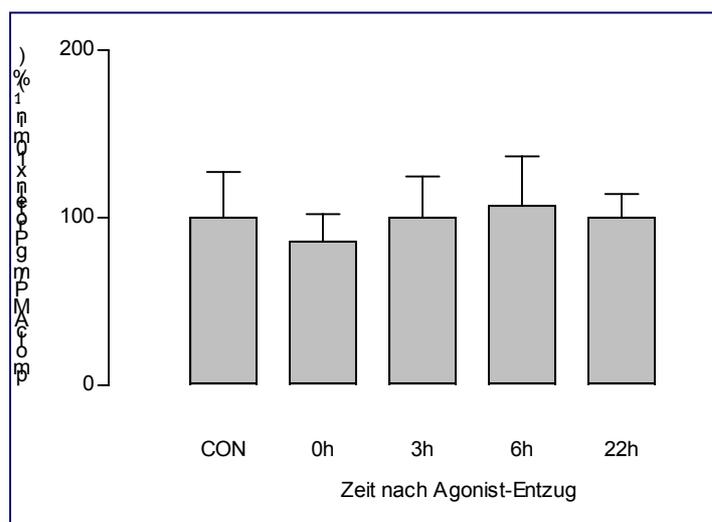


Abb.15: Aluminiumfluorid-induzierte cAMP-Synthese in A7r5-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Agonist-Entzug (CON= unbehandelte Zellen) (n=5)

3.3 Regulation der Adenylatzyklase zu verschiedenen Zeitpunkten nach Agonist-Entzug nach erfolgter Agonist-Dauerstimulation

3.3.1 Bestimmung der Adenylatzyklase-Proteinmenge in Zellmembranen mittels Westernblot und Messung der Forskolin-induzierten cAMP-Synthese in hIP-R COS1 Zellen

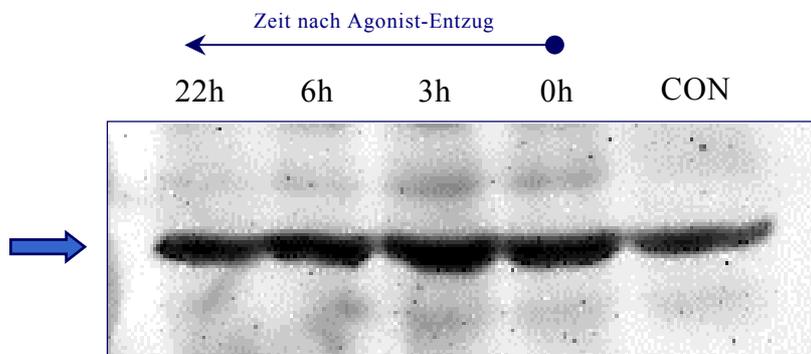


Abb.16: Adenylatzyklase-Proteinmenge zu verschiedenen Zeitpunkten nach Agonist-Entzug in hIP-R Cos1 Zellen (CON=unbehandelte Zellen) (n=3)

In hIP-R COS1-Zellmembranen zeigten sich im Verlauf einer Zeitspanne von 22h nach Agonist-Entzug keine erkennbaren Veränderungen im Gehalt an Adenylatzyklase-Protein. Allerdings fand sich stets eine gleichmäßige, geringgradige Zunahme der Proteinmenge in den behandelten Zellen gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen (Abb.16).

Auch im cAMP-Assay fand sich eine Tendenz zur Erhöhung der Adenylatzyklase in den mit Cicaprost vorinkubierten Zellen, die allerdings nicht signifikant war (Abb.17).

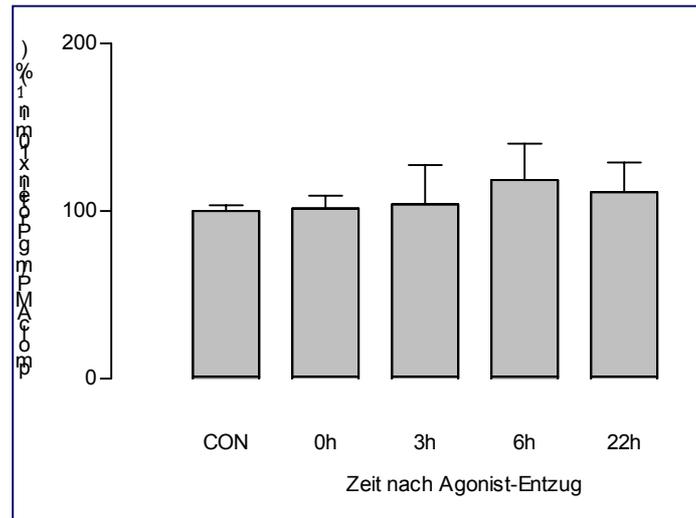


Abb.17: Forskolin-induzierte cAMP-Synthese in hIP-R COS1-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Agonist-Entzug (CON= unbehandelte Zellen) (n=5)

3.3.2 Bestimmung der Adenylatzyklase-Proteinmenge in Zellmembranen mittels Westernblot und Messung der Forskolin-induzierten cAMP-Synthese in D318 COS1 Zellen

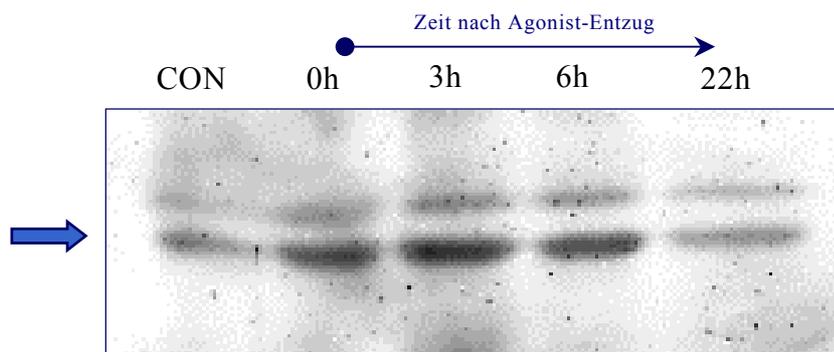


Abb.18: Adenylatzyklase-Proteinmenge zu verschiedenen Zeitpunkten nach Agonist-Entzug in D318 Cos1 Zellen (CON=unbehandelte Zellen) (n=3)

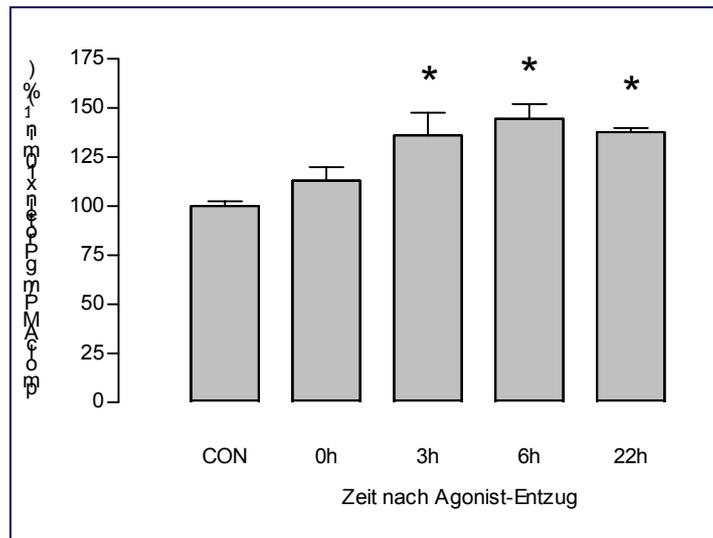


Abb.19: Forskolin-induzierte cAMP-Synthese in D318 COS1-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Agonist-Entzug (CON= unbehandelte Zellen) (n=5)

Tab.3: Forskolin-induzierte cAMP-Produktion in D318 Cos1-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Agonist-Entzug (CON=unbehandelte Zellen)

D318 Cos1	X (%)	SEM (%)	N	Signif.
CON	100,0	2,5	5	/
0h	113,0	6,9	5	ns
2h	136,1	11,4	5	p=0,0135
4h	144,5	7,4	5	p=0,0003
6h	137,7	2,2	5	p<0,0001

Im Westernblot zeigte sich in D318 Cos1-Zellmembranen nach Agonist-Entzug zunächst eine Zunahme der Adenylatzyklase-Proteinmenge, die 3-6h nach Agonist-Entzug ihr Maximum erreichte (Abb.19). Im Verlauf von 22h nach Agonist-Entzug sank sie schließlich wieder auf etwa basale Werte ab (=CON). Weiterhin konnte auch hier die bereits mehrfach erwähnte Steigerung der Proteinmenge in den Cicaprost-vorinkubierten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle festgestellt werden.

Diese Beobachtungen fanden Bestätigung in den Ergebnissen der cAMP-Assays: Hier zeigte sich eine funktionelle Erhöhung der Adenylatzyklase in Form einer gesteigerten cAMP-Produktion nach Forskolin-Stimulation, die 3 bzw. 6h nach Agonist-Entzug signifikant gesteigert war (Tab.3 und Abb.19). Dieser Anstieg war 22h nach Agonist-Entzug zwar bereits wieder rückläufig, wies jedoch immer noch signifikante Werte im

Vergleich zur Kontrolle auf (Tab.3). Auch im cAMP-Assay konnte eine Erhöhung der Adenylatzyklase-Aktivität infolge der Cicaprost-Vorinkubation festgestellt werden (0h>CON), wengleich die Werte nicht signifikant waren.

3.3.3 Bestimmung der Adenylatzyklase-Proteinmenge in Zellmembranen mittels Westernblot und Messung der Forskolin-induzierten cAMP-Synthese in A7r5-Zellen

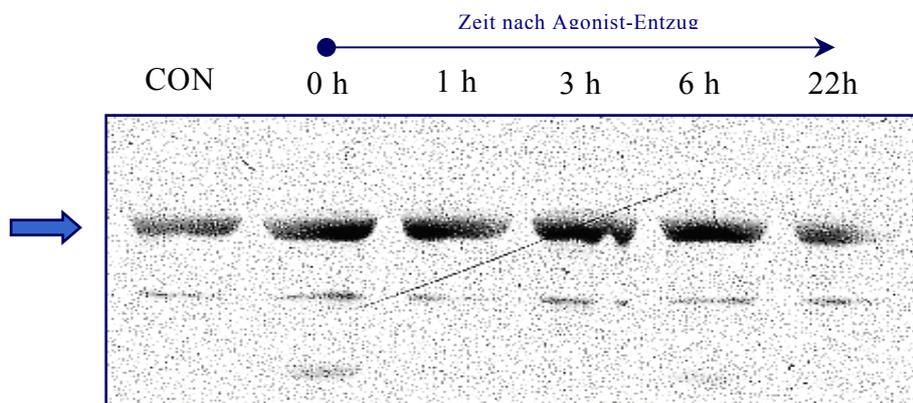


Abb.20: Adenylatcyclase-Proteinmenge zu verschiedenen Zeitpunkten nach Agonist-Entzug in A7r5-Zellmembranen (CON= unbehandelte Zellen) (n=3)

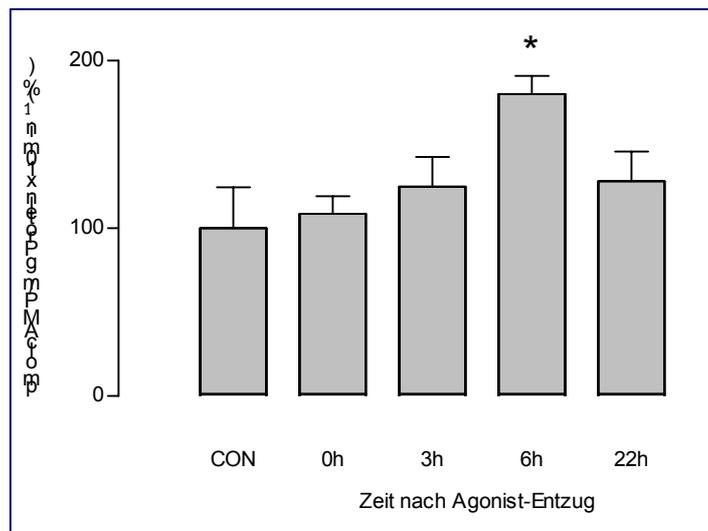


Abb.21: Forskolin-induzierte cAMP-Synthese in A7r5-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Agonist-Entzug (CON= unbehandelte Zellen) (n=5)

In A7r5-Zellmembranen (Abb.20) zeigt sich bereits zum Zeitpunkt 0 nach Agonist-Entzug eine Zunahme des Adenylatzyklase-Proteins, d.h. dass auch hier die Vorinkubation mit dem Agonist Cicaprost eine solche Veränderung induziert. Diese Protein-Mengenzunahme findet ihren Höhepunkt etwa 3-6h nach Agonist-Entzug, um nach etwa 22h wieder abzusinken.

Konform mit diesen Ergebnissen im Westernblot gehen die im cAMP-Assay gewonnenen Daten bezüglich der Forskolin-induzierten cAMP-Synthese zu verschiedenen Zeitpunkten nach Agonist-Entzug (Abb.21): Ebenfalls bereits zum Zeitpunkt 0 findet sich hier eine tendenzielle Erhöhung der cAMP-Produktion, die 6h nach Agonist-Entzug einen signifikanten Anstieg auf $180.1 \pm 10.8\%$ ($n=5$; $p=0.0211$) des Ausgangswertes (=CON) aufweist. Auch hier im cAMP-Assay findet sich ein Abfall der cAMP-Synthese nach 22h auf $128.1 \pm 17.6\%$ ($n=5$) der Kontrolle.

3.4 Einfluss von Cycloheximid auf die Resensibilisierung des IP-Rezeptors in den untersuchten Zelllinien

3.4.1 Hemmung der IP-Rezeptor-Resensibilisierung in hIP-R Cos1-Zellen

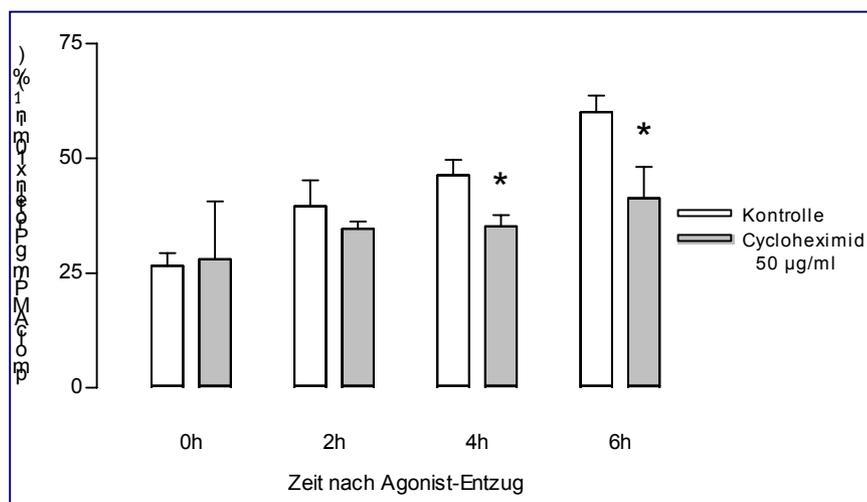


Abb.22: IP-Rezeptor-Resensibilisierung in Anwesenheit von Cycloheximid (50µg/ml) in hIP-R Cos1 Zellen ($n=5$)

Tab.4: Einfluss von Cycloheximid auf die IP-Rezeptor-Resensibilisierung in hIP-R COS1 Zellen: Werte in Prozent der Ausgangswerte (=CON=unbehandelte Zellen)

hIP-R COS1	Kontrolle			+ Cycloheximid (50µg/ml)			Signif.
	X (%)	SEM (%)	N	X (%)	SEM (%)	N	
CON	100,0	2,7	5	100,0	2,5	5	ns
0h	26,5	2,8	5	28,0	12,5	5	ns
2h	39,6	5,6	5	34,6	1,6	5	ns
4h	46,3	3,3	5	35,2	2,4	5	p=0,0269
6h	60,0	3,6	5	41,3	6,2	5	p=0,0415

Zum Zeitpunkt des jeweiligen Agonist-Entzuges wurde den Zellen Cycloheximid, ein Hemmstoff der Proteinbiosynthese, zugesetzt. Bereits 2h nach Agonist-Entzug kam es zu einer messbaren, aber noch nicht signifikanten Verringerung der IP-Rezeptor-vermittelten cAMP-Synthese in den behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle (=CON; unbehandelte, nicht vorinkubierte Zellen) (Abb.22). 4h nach Agonist-Entzug bestand dann eine signifikante Differenz von $46.3 \pm 3.3\%$ (n=5) vs. $35.2 \pm 2.4\%$ (n=5; p=0.0269), die auch 6h nach Entzug bestehen blieb ($60.0 \pm 3.6\%$ vs. $41.3 \pm 6.8\%$ (n=5; p=0.0415). Längere Zeiträume nach Agonist-Entzug zu untersuchen war leider nicht möglich, da Cycloheximid bei Inkubationszeiten jenseits von 6h deutliche zytotoxische Effekte aufwies, die zum Versuchsabbruch zwangen.

3.4.2 Hemmung der IP-Rezeptor-Resensibilisierung in D318 Cos1-Zellen

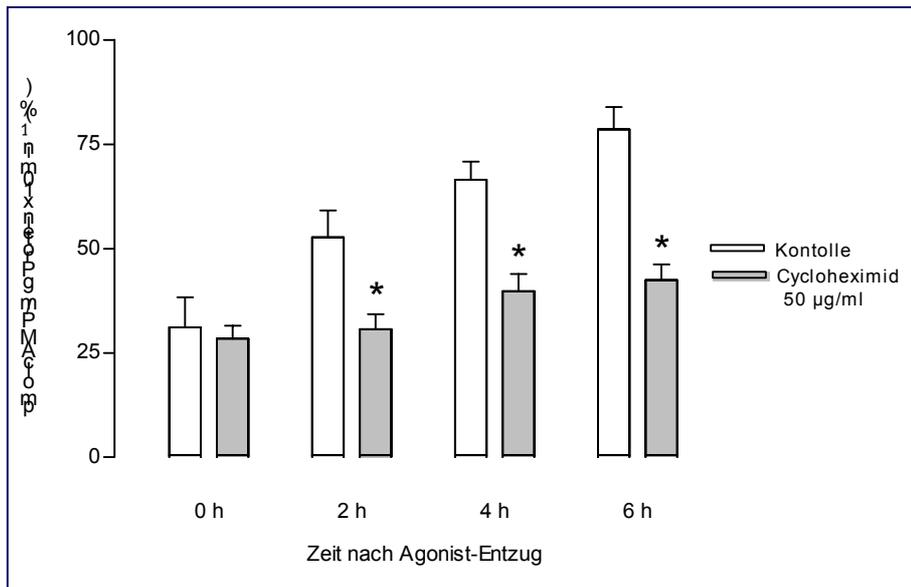


Abb.23: IP-Rezeptor-Resensibilisierung in Anwesenheit von Cycloheximid (50µg/ml) in D318 COS1 Zellen (n=5)

Tab.5: Einfluss von Cycloheximid auf die IP-Rezeptor-Resensibilisierung in D318 COS1 Zellen: Werte in Prozent der Ausgangswerte (CON=unbehandelte Zellen)

D318 COS1	Kontrolle			+ Cycloheximid (50µg/ml)			Signif.
	X (%)	SEM (%)	N	X (%)	SEM (%)	N	
CON	100,0	4,7	5	100,0	2,9	5	ns
0h	31,1	7,3	5	28,4	3,1	5	ns
2h	52,7	6,4	5	30,7	3,6	5	p=0,0174
4h	66,5	4,4	5	39,8	4,2	5	p=0,0023
6h	78,6	5,3	5	42,4	3,8	5	p=0,0005

Auch hier wurde den Zellen zum jeweiligen Zeitpunkt des Agonist-Entzuges der Proteinbiosynthesehemmer Cycloheximid in einer Konzentration von 50µg/ml zugesetzt. Wie im Fall des Wildtyp-Rezeptors so zeigt sich auch bei der C-terminal trunkierten Mutante ein deutlicher Effekt von Cycloheximid auf die Resensibilisierung des IP-Rezeptors: Bereits 2h nach Agonist-Entzug besteht eine signifikante Differenz von $52.7 \pm 6.4\%$ vs. $30.7 \pm 3.6\%$ ($n=5$; $p=0.0174$) der Ausgangswerte (=CON; unbehandelte, nicht vorinkubierte Zellen), die im gesamten Beobachtungszeitraum erhalten bleibt und schließlich 6h nach Agonist-Entzug mit $78.6 \pm 5.3\%$ vs. $42.5 \pm 3.8\%$ ($n=5$; $p=0.0005$)

ihren größten Wert erreicht. Auch hier war die Untersuchung längerer Zeiträume aufgrund der Zytotoxizität von Cycloheximid leider nicht möglich.

3.4.3 Hemmung der IP-Rezeptor-Resensibilisierung in A7r5-Zellen

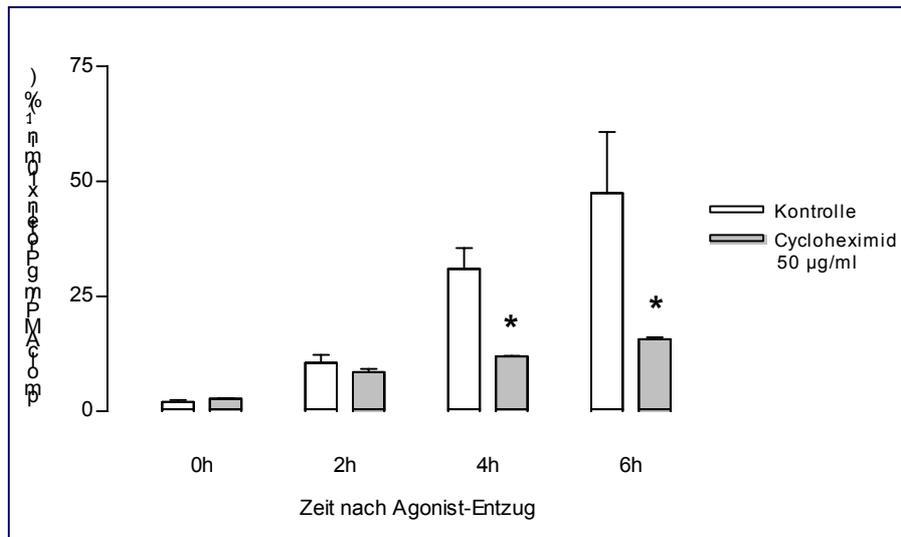


Abb.24: IP-Rezeptor-Resensibilisierung in Anwesenheit von Cycloheximid (50µg/ml) in A7r5-Zellen (n=5)

Tab.6: Einfluss von Cycloheximid auf die IP-Rezeptor-Resensibilisierung in A7r5-Zellen: Werte in Prozent der Ausgangswerte (=CON=unbehandelte Zellen)

A7r5	Kontrolle			+ Cycloheximid (50µg/ml)			Signif.
	X (%)	SEM (%)	N	X (%)	SEM (%)	N	
CON	100,0	1,4	5	100,0	0,6	5	ns
0h	2,0	0,5	5	2,8	0,1	5	ns
2h	10,6	1,7	5	8,5	0,7	5	ns
4h	30,9	4,5	5	11,9	0,1	5	p=0,0028
6h	47,4	13,2	5	15,7	0,4	5	p=0,0432

Auch hier erfolgte der Zusatz von Cycloheximid zum Zeitpunkt des Agonist-Entzuges und auch in diesem natürlichen Zellsystem war der hemmende Effekt dieser Substanz auf die IP-Rezeptor-Resensibilisierung zu beobachten: Nachdem die 0- und 2h-Werte mit und ohne Cycloheximid nahezu identisch waren, zeigte sich erstmals 4h nach Agonist-Entzug eine signifikante Differenz von $30.9 \pm 4.5\%$ vs. $11.9 \pm 0.1\%$ ($n=5$; $p=0.0028$) die sich 6h nach Entzug auf $47.4 \pm 13.2\%$ vs. $15.7 \pm 0.4\%$ ($n=5$; $p=0.0432$) noch vergrößerte. Auch hier waren keine Untersuchungen über diesen Zeitraum hinaus möglich.

3.5 Einfluss von Concanavalin A auf die Resensibilisierung des IP-Rezeptors in den untersuchten Zelllinien

Den Zellkulturmedien wurde in diesen Versuchsreihen sowohl während der Stimulationsphase mit Cicaprost als auch im Zeitraum nach Agonist-Entzug Concanavalin A in den jeweils angegebenen Konzentrationen zugesetzt, um so die Bedeutung der Internalisierung für die Rezeptor-Resensibilisierung zu untersuchen. Sowohl die Agonist-Vorinkubationsphase als auch die maximale untersuchte Agonist-Entzugsphase betrug hierbei nur jeweils 4h, da alle Zelltypen eine mehr als 8-stündige Einwirkzeit von Concanavalin A, insbesondere in höheren Konzentrationen, nicht tolerierten.

3.5.1 Effekt in hIP-R Cos1-Zellen

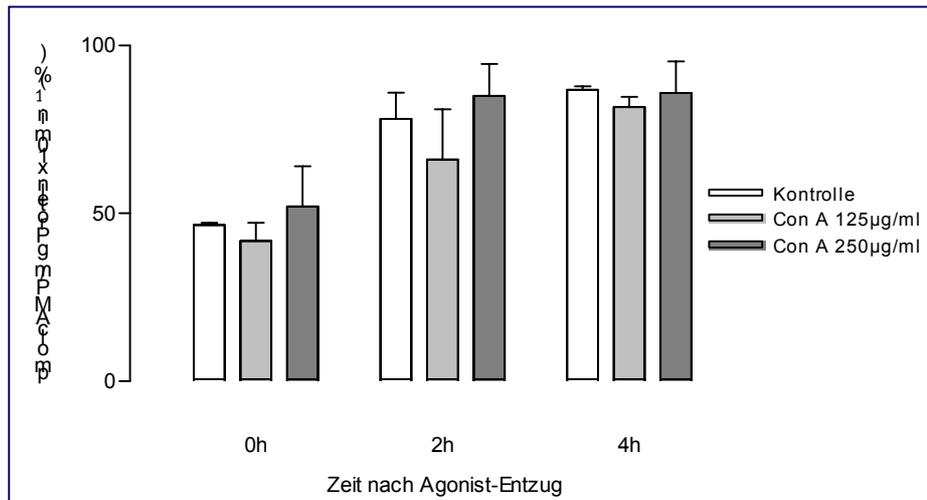


Abb.25: Effekt von Concanavalin A auf die IP-Rezeptor-Resensibilisierung in hIP-R COS1-Zellen (n=4)

Tab.7: Effekt von Concanavalin A auf die IP-Rezeptor-Resensibilisierung in hIP-R COS1-Zellen: Werte in Prozent der Ausgangswerte (CON= unbehandelte Zellen)

hIP-R Cos1	Kontrolle			Con A 125µg/ml			Con A 250µg/ml		
	X (%)	SEM (%)	N	X (%)	SEM (%)	N	X (%)	SEM (%)	N
CON	100,0	3,4	4	100,0	4,3	4	100,0	8,0	4
0h	46,5	0,7	4	41,8	5,5	4	52,0	12,0	4
2h	78,1	7,8	4	66,1	15,0	4	85,0	9,5	4
4h	86,8	1,1	4	81,6	3,1	4	85,9	9,4	4

Wie sowohl aus der Abb.25 als auch der Tab.7 hervorgeht, war im Fall des humanen IP-Rezeptor-Wildtyps in Cos1-Zellen mit Concanavalin A kein Effekt auf die Rezeptor-Resensibilisierung nach vorheriger Desensibilisierung zu erzielen. Weder das Ausmaß der De- noch der Resensibilisierung zeigte an irgendeinem Messpunkt signifikante Abweichungen von der Kontrolle (=CON= ohne Con A).

3.5.2 Effekt in D318 COS1-Zellen

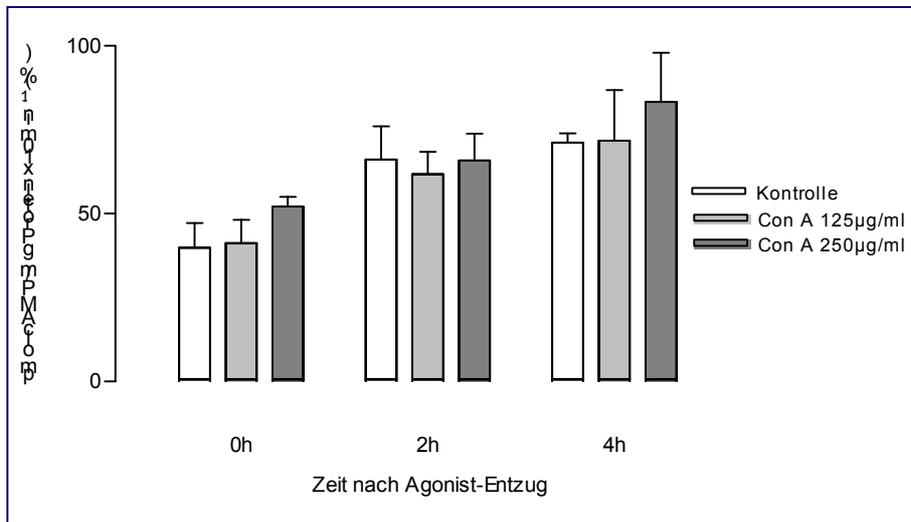


Abb.26: Effekt von Concanavalin A auf die IP-Rezeptor-Resensibilisierung in D318 COS1-Zellen (n=4)

Tab.8: Effekt von Concanavalin A auf die IP-Rezeptor-Resensibilisierung in D318 COS1-Zellen: Werte in Prozent der Ausgangswerte (CON= unbehandelte Zellen)

D318 Cos1	Kontrolle			Con A 125µg/ml			Con A 250µg/ml		
	X (%)	SEM (%)	N	X	SEM (%)	N	X (%)	SEM (%)	N
CON	100,0	2,7	4	100,0	5,1	4	100,0	8,7	4
0h	46,5	0,7	4	41,8	5,5	4	52,0	12,0	4
2h	78,1	7,8	4	66,1	15,0	4	85,0	9,5	4
4h	86,8	1,1	4	81,6	3,1	4	85,9	9,4	4

Auch im Fall der C-terminal trunkierten IP-Rezeptor-Mutante D318 in Cos1-Zellen konnte kein signifikanter Effekt von Concanavalin A auf die IP-Rezeptor-Resensibilisierung nachgewiesen werden. Lediglich das Ausmaß der Desensibilisierung wurde bei höheren ConA-Konzentrationen messbar, jedoch nicht signifikant gehemmt.(Abb.26 → 0h)

3.5.3 Effekt in A7r5-Zellen

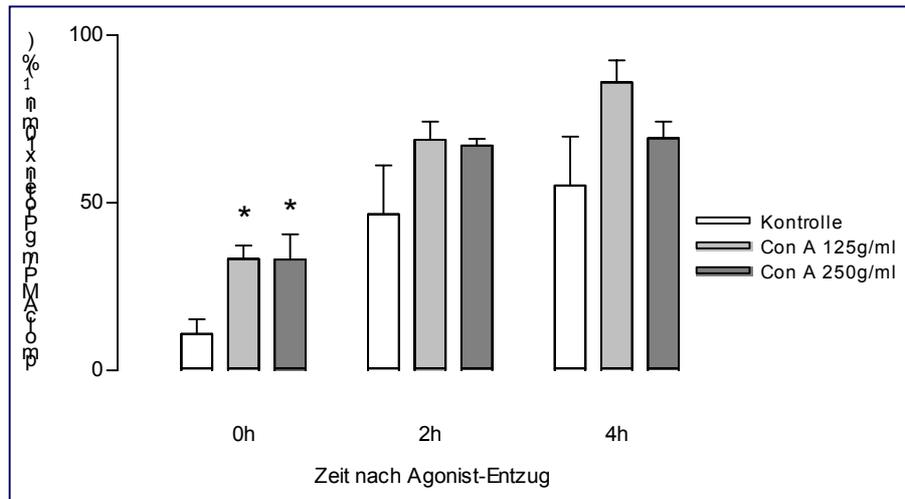


Abb.27: Effekt von Concanavalin A auf die IP-Rezeptor-Resensibilisierung in A7r5-Zellen (n=4)

Tab.9: Effekt von Concanavalin A auf die IP-Rezeptor-Resensibilisierung in A7r5-Zellen: Werte in Prozent der Ausgangswerte (CON= unbehandelte Zellen)

A7r5	Kontrolle			Con A 125µg/ml			Con A 250µg/ml			Signif.
	X (%)	SEM (%)	N	X (%)	SEM (%)	N	X (%)	SEM (%)	N	
CON	100,0	1,6	4	100,0	3,7	4	100,0	5,7	4	/
0h	10,9	4,4	4	33,2	4,1	4	33,1	7,6	4	p=0,0295
2h	46,6	14,6	4	68,8	5,4	4	67,1	2,1	4	ns
4h	55,2	14,6	4	86,0	6,6	4	69,3	4,9	4	ns

Auch in A7r5-Zellen konnte mithilfe von Concanavalin A kein signifikanter Effekt auf die IP-Rezeptor-Resensibilisierung nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich sehr wohl ein signifikanter Effekt im Hinblick auf die Rezeptor-Desensibilisierung: Nach Abschluss der 4-stündigen Cicaprost-Vorinkubationsphase war die IP-Rezeptor-vermittelte cAMP-Synthese in den Kontrollzellen (ohne Con A) signifikant stärker abgesunken als in den mit 125 bzw 250µg/ml Concanavalin A-behandelten Zellen. (Abb.27 und Tab.9) Der ermittelte p-Wert betrug hierbei 0.0295. Concanavalin A zeigte also in A7r5-Zellen einen hemmenden Effekt auf die IP-Rezeptor Desensibilisierung, nicht aber auf die IP-Rezeptor Resensibilisierung.

3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

- Sowohl in den überexprimierenden, transfizierten Zellsystemen (hIP-R Cos1>humaner Wildtyp-Rezeptor; D318 Cos1>humane C-terminal trunkeerte Mutante) als auch im natürlichen Zellsystem (A7r5> VSMC der Ratte) konnte infolge dauerhafter Agonist-Stimulation (Cicaprost) eine Rezeptor-Desensibilisierung und nach Agonist-Entzug eine Rezeptor-Resensibilisierung nachgewiesen werden.
- Während sich Wildtyp und Mutante in ihrem De- und Resensibilisierungsverhalten nicht nennenswert unterschieden, zeigte der Vergleich zwischen transfiziertem und natürlichem Zellsystem sowohl eine signifikant schnellere und vollständigere Desensibilisierung als auch eine schnellere Resensibilisierung des natürlichen Zellsystems.
- Auf der Ebene des G-Proteins kam es bei beiden transfizierten Zellsystemen zu einer Heraufregulation der membranären Proteinmenge während dauerhafter Agonist-Stimulation (0-22h). In der Phase nach Agonist-Entzug kam es im Verlauf von 3-6h noch zu einer weiteren Zunahme der Proteinmenge, die jedoch innerhalb von 22h nach Agonist-Entzug wieder rückläufig wurde. Derartige Veränderungen konnten im natürlichen Zellsystem nicht nachgewiesen werden. In allen drei Systemen fand sich keine signifikante funktionelle Erhöhung des G-Proteins im cAMP-Assay.
- Auf der Ebene der Adenylatzyklase kam es zu einer leichten Heraufregulation der membranären Proteinmenge in den transfizierten Zellen im Zuge dauerhafter Cicaprost-Stimulation, die im Fall der Mutante 22 Stunden nach Agonist-Entzug wieder rückläufig war. Im natürlichen Zellsystem kam es hingegen einer starken Zunahme der Proteinmenge, die 22h nach Agonist-Entzug ebenfalls wieder zurückging. Im cAMP-Assay zeigte sich sowohl bei der Mutante als auch bei den natürlichen Zellen eine signifikant erhöhte Ansprechbarkeit der Adenylatzyklase, die im Verlauf des Agonist-Entzugs zunächst zu- und schließlich wieder abnahm.

- Cycloheximid zeigte in allen Zelllinien eine signifikante Hemmung der Rezeptor-Resensibilisierung, die im natürlichen Zellsystem am ausgeprägtesten war.
- Concanavalin A zeigte in keinem Zellsystem einen Effekt auf die IP-Rezeptor-Resensibilisierung, jedoch in A7r5-Zellen eine signifikante Hemmung der IP-Rezeptor-Desensibilisierung.

4 Diskussion

Aufgrund seiner antimitogenen und gefäßrelaxierenden Eigenschaften und des potenziell daraus resultierenden, vielschichtigen klinischen Wirkungsspektrums sind Prostazyklin und seine Analoga Gegenstand intensiver Forschungen.

Erfolgslimitierend wirkte in der klinischen Anwendung oftmals die Tatsache, dass mit zunehmender Anwendungsdauer der Substanzen eine Wirkungsabschwächung eintritt, die durch eine Dosiserhöhung kompensiert werden musste. Häufig dabei auftretende Nebenwirkungen wie Flushs, Tachykardien und Blutdruckabfälle setzten den angepassten Dosierungsschemata Grenzen. Beobachtungen dieser Art haben im Verlauf der letzten Jahre zu der Hypothese geführt, dass für den IP-Rezeptor –in Analogie zu anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren- eine Desensibilisierung im Verlauf dauerhafter Agonist-Stimulation stattfinden müsse. Diese Vermutung ist mittlerweile durch experimentelle Untersuchungen gut belegt worden und es konnten eine Reihe zentraler Mechanismen und Effektorsysteme identifiziert werden, die am Prozess der Desensibilisierung beteiligt sind (König et al., 1997; Nilius et al., 2000).

Weit weniger untersucht als die zellulären Mechanismen der IP-Rezeptor-Desensibilisierung sind die der IP-Rezeptor-Resensibilisierung. Dabei ist es jedoch von zentraler Bedeutung, auf welche Weise und innerhalb welcher Zeitspanne ein durch dauerhafte Agonist-Stimulation desensibilisierter Rezeptor wieder resensibilisiert, d.h. für die erneute Signaltransduktion zur Verfügung steht. Mechanismen und Kinetik haben hierbei Bedeutung für verschiedenste klinisch-praktische Aspekte: Ihre Kenntnis ermöglicht beispielsweise das Entwerfen diskontinuierlicher Dosierungsschemata, deren medikamentenfreie Intervalle genau an die Resensibilisierungskinetik des IP-Rezeptors in dem zu behandelnden Gewebe angepasst werden könnten.

Andererseits ergäbe sich die Möglichkeit, auf bestimmte Schritte der Resensibilisierungsmechanismen pharmakologisch Einfluss zu nehmen und sie z.B. zu beschleunigen bzw. zu optimieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher grundlegende Mechanismen der humanen vs. murinen IP-Rezeptor-Resensibilisierung in verschiedenen Zellsystemen untersucht und miteinander verglichen.

Hierzu wurde im ersten Teil der Arbeit zunächst der Nachweis der De- und Resensibilisierung auf IP-Rezeptorebene in den untersuchten Zellsystemen geführt und das Ausmaß und die Geschwindigkeit der IP-Rezeptorresensibilisierung miteinander verglichen. Im zweiten Teil wurde dann der Effekt von Cycloheximid, einem Hemmstoff der zellulären Proteinbiosynthese und von Concanavalin A, einem Hemmstoff der Rezeptorinternalisierung, auf das Resensibilisierungsverhalten des IP-R in den verwendeten Zellsystemen untersucht und diese wiederum miteinander verglichen.

4.1 Charakteristiken der untersuchten Zellsysteme

4.1.1 Stabil transfizierte COS1-Zellen

COS1-Zellen (Affennierenzellen) wurden wie unter 3.2.3 beschrieben stabil mit dem humanen IP-Rezeptor (Wildtyp bzw. Mutante) transfiziert.

Der Wildtyp-Rezeptor stellte hierbei den unveränderten humanen IP-Rezeptor dar, während die Mutante durch einen weitgehend fehlenden C-Terminus gekennzeichnet war (s. 3.2.2 und Abb.2), wodurch ihr u.a. 2 von 3 möglichen PKC-Phosphorylierungsstellen fehlten.

Der Vergleich dieser beiden Zellsysteme sollte klären, inwiefern der C-Terminus für die Resensibilisierung von Bedeutung ist.

4.1.2 Natürlich IP-R exprimierende glatte Gefäßmuskelzellen der Ratte (A7r5-Zellen)

A7r5-Zellen exprimieren natürlicherweise IP-R in einem solchen Maß, dass bei Rezeptorstimulation ausreichend große cAMP-Differenzen gemessen werden können. Desweiteren bietet dieses natürliche Zellsystem den großen Vorteil, dass alle an der Signaltransduktionskaskade beteiligten Proteine in einem natürlichen stöchiometrischen Verhältnis zueinander vorhanden sind, was in einem künstlichen, überexprimierenden System wie den oben beschriebenen COS1-Zellen nicht der Fall ist und somit nur annähernd die natürlichen Gegebenheiten repräsentieren kann. Der Vergleich zwischen natürlichem Zellsystem und überexprimierendem, künstlichen System sollte die Frage klären, inwiefern

die natürliche Stöchiometrie der beteiligten Proteine Einfluss auf das Resensibilisierungsverhalten von IP-R hat.

4.2 Resensibilisierung des humanen IP-R auf Rezeptorebene und Bedeutung des C-Terminus

In allen untersuchten Zellsystemen kam es nach Agonist-induzierter Desensibilisierung des IP-Rezeptors nach Agonist-Entzug zu einer kompletten Resensibilisierung innerhalb von 22 Stunden, messbar am Wiederanstieg der cAMP-Produktion im cAMP-Assay. Interessanterweise fand sich hierbei ein signifikanter Unterschied zwischen hIP-R Wildtyp und Mutante im Bezug auf die Geschwindigkeit der Resensibilisierung bei nahezu gleichförmiger Desensibilisierungskinetik:

Bereits 4 Stunden nach Agonist-Entzug waren im Fall der Mutante signifikant höhere cAMP-Werte messbar als beim Wildtyp-Rezeptor, was einer schnelleren Resensibilisierung entspricht.

Diese Beobachtung deckt sich mit Befunden am μ Opioid Rezeptor (Wolf et al., 1999) bzw. β_2 AR und Vasopressin 2-Rezeptor (Oakley et al., 1999), wo durch Mutagenese am C-Terminus bzw. Austausch der C-Termini nachgewiesen wurde, dass dadurch die Geschwindigkeit der Resensibilisierung im C-Terminus reguliert wird. Wolf et al. zeigten hierbei für den MOR1B-Rezeptor, dass der Verlust von C-terminal lokalisierten Phosphorylierungsstellen mit einer beschleunigten Resensibilisierung einhergeht. Oakley et al. machten eine ähnliche Beobachtung, als sie das Resensibilisierungsverhalten des β_2 AR und des V2R sowie von 2 Rezeptor-Chimären untersuchten, bei denen sie die C-Termini der beiden Rezeptoren gegeneinander austauschten. Sie fanden heraus, dass das Resensibilisierungsverhalten vom jeweils vorhandenen C-Terminus abhängt, unabhängig vom Rest des Rezeptors. Sie wiesen mittels GFP-markierten Arrestinen nach, dass das Vorhandensein bestimmter, C-terminal lokalisierter und während der Desensibilisierung phosphorylierter Serin-Reste bewirkt, dass die Arrestine nicht unmittelbar unterhalb der Plasmamembran vom C-Terminus abdissoziieren, sondern mit dem C-Terminus verbunden bleiben und so die Aufnahme des phosphorylierten Rezeptors in sog. "frühe Endosomen" bewirkt.

Während dieser Mechanismus der Aufnahme in die sog. frühen Endosomen nach Agonist-Aktivierung schon länger bekannt und für verschiedene GPCRs beschrieben ist (Ferguson et al., 1996; von Zastrow und Kobilka, 1994), war lange Zeit völlig unklar, welche Mechanismen bewirken, ob ein in ein solches Endosom aufgenommener Rezeptor dephosphoryliert und recycled oder weiter in ein Lysosom transportiert und degradiert wird.

Untersuchungen dazu am β_2 AR weisen bislang darauf hin, dass hierbei die Wechselwirkung zwischen der sog. PDZ-Domäne und einer bestimmten Proteinfamilie (EBP50) eine große Rolle spielt. Insbesondere von Bedeutung erscheint hierbei die Tatsache, dass diese Interaktion durch Phosphorylierung eines bestimmten Serin-Restes im C-Terminus des β_2 AR verhindert werden kann (Cao et al., 1999).

Desweiteren spielt der C-Terminus eine bedeutende Rolle bei der G-Protein-Kopplung, insbesondere beim sog. "shift" in der Kopplung von G_s zu G_i bzw. G_q im Verlauf dauerhafter Agonist-Stimulation wie bereits eingangs erwähnt. Hierbei ist insbesondere interessant, dass gezeigt werden konnte, dass dieser "shift" konzentrationsabhängig ist: Oberhalb einer Stimulationskonzentration von 1 nM Cicaprost beschrieben Lawler et al. (2001) einen konzentrationsabhängigen Abfall der cAMP-Bildung in verschiedenen, Forskolin-vorinkubierten murinen Zelllinien. Auch dieser shift-Mechanismus wird C-terminal reguliert, indem die nach initialer Rezeptorstimulation aktivierte PKA einen bestimmten Serin-Rest im C-Terminus des IP-R phosphoryliert.

Zusammenfassend kann also zunächst festgestellt werden, dass -in Analogie zu anderen bekannten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren- für den IP-Rezeptor eine Resensibilisierung nachgewiesen werden konnte, deren Geschwindigkeit offensichtlich ebenfalls durch Sequenzen im C-Terminus reguliert wird.

4.3 Vergleich der Resensibilisierung von transfiziertem humanem (hIP-R COS1) und murinem (rIP-R A7r5) IP-Rezeptor

Beim Vergleich zwischen humanem Wildtyp-Rezeptor und murinem IP-R fiel bereits während der Desensibilisierungsphase ein signifikanter Unterschied bzgl. der Kinetik auf:

Der im natürlichen A7r5-Zellsystem exprimierte rIP-R desensibilisierte nicht nur schneller, sondern auch vollständiger (Abb.9). So war nach 22-stündiger Agonisten-Stimulation die

minimale cAMP-Produktion in A7r5-Zellen auf 2,9% des Kontrollwertes abgesunken, während sie in hIP-RCOS1-Zellen bei 26,5% lag.

Nach Agonist-Entzug konnte in A7r5-Zellen eine signifikant schnellere Resensibilisierung nachgewiesen werden, die 22 Stunden nach Agonist-Entzug in beiden Zellsystemen vollständig war. Eine mögliche Ursache für diese Diskrepanz könnte in der Tatsache liegen, dass hIP-RCos1-Zellen ein künstliches, überexprimierendes Zellsystem darstellen, in dem u.U. nicht alle an den Vorgängen beteiligten Proteine vorhanden sind, bzw. nicht in einem natürlichen stöchiometrischen Verhältnis zueinander stehen. Es gilt als unstrittig, dass die Stöchiometrie der Komponenten bestimmter Signalwege verschiedene Vorgänge beeinflussen kann. Die Relation der einzelnen Komponenten kann dabei in unterschiedlichen Zellsystemen durchaus erheblich differieren (Ostrom et al., 2000), so dass Versuchsdaten aus modifizierten Zellsystemen nicht notwendigerweise die *in vivo* Verhältnisse repräsentieren können und somit ein Vergleich mit einem natürlichen Zellsystem hilfreich sein kann.

Im vorliegenden Fall sei hierbei jedoch kritisch angemerkt, dass festgestellte Unterschiede natürlich auch ggf. Spezies-bedingt sein könnten. Zur Klärung dieser Problematik müsste dann in weitergehenden Untersuchungen ein direkter Vergleich zweier natürlich exprimierender Systeme vorgenommen werden.

4.4 Regulation des $G_s\alpha$ -Proteins und der Adenylatzyklase

Im Verlauf dauerhafter Agonist-Stimulation bzw. in der Phase nach Agonist-Entzug ist es natürlich auch denkbar, dass es nicht nur zur Herab- bzw. Heraufregulation auf der Ebene des Rezeptors kommt. So ist z.B. auch zu erwägen, dass eine veränderte zelluläre cAMP-Produktion zumindest zum Teil durch eine veränderte Aktivität einer der anderen Komponenten des Signalweges begründet sein kann. Aus diesem Grund wurde vor und unmittelbar nach Agonist-Stimulation sowie zu verschiedenen Zeitpunkten nach Agonist-Entzug die membranäre $G_s\alpha$ - und Adenylatzyklase-Proteinmenge mittels Western blotting sowie die funktionelle Aktivität der beiden Proteine mittels direkter Stimulation im cAMP-Assay ermittelt.

Auf der Ebene des $G_s\alpha$ -Proteins kam es bei beiden transfizierten Zellsystemen zu einer Heraufregulation der membranär-assoziierten Proteinmenge während dauerhafter Agonist-

Stimulation. In der Phase nach Agonist-Entzug kam es im Verlauf von 3-6h noch zu einer weiteren Zunahme der Proteinmenge, die jedoch innerhalb von 22h nach Agonist-Entzug wieder rückläufig war. Derartige Veränderungen konnten im natürlichen Zellsystem nicht nachgewiesen werden. In allen drei Systemen fand sich keine signifikante funktionelle Erhöhung der $G_s\alpha$ -Aktivität im cAMP-Assay nach direkter Stimulation mit Aluminiumfluorid. Obwohl also eine Erhöhung der membranären $G_s\alpha$ -Proteinmenge nachweisbar ist, welche vermutlich nicht auf einer Neusynthese sondern am ehesten auf einer vermehrten "Rekrutierung" von zellulärem $G_s\alpha$ -Protein in die Zellmembran beruht, fehlt eine vermehrte funktionelle Ansprechbarkeit. Dies ist am ehesten damit zu begründen, dass im künstlichen hIP-RCOS1-Zellsystem wie bereits ausgeführt, die Stöchiometrie der beteiligten Proteine nicht physiologisch ist, so dass die Vermehrung einer Komponente nicht unbedingt Einfluss auf die Signalkaskade ausübt. Desweiteren wird in der Literatur das Verhältnis von Rezeptor : G-Protein : Adenylatzyklase in unterschiedlichen Zelltypen mit 1 : 100 : 3 angegeben, so dass ohnehin die maximale Effizienz des Systems von Rezeptor und Adenylatzyklase abhängt (Ostrom et al., 2000).

Auf der Ebene der Adenylatzyklase kam es zu einer leichten Heraufregulation der membranären Proteinmenge in den transfizierten Zellen im Zuge dauerhafter Cicaprost-Stimulation, die im Fall der Mutante 22 Stunden nach Agonist-Entzug wieder rückläufig war. Im natürlichen Zellsystem kam es hingegen zu einer starken Zunahme der Proteinmenge, die 22h nach Agonist-Entzug ebenfalls wieder zurückging.

Im cAMP-Assay zeigte sich sowohl bei der Mutante als auch bei den natürlichen Zellen eine signifikant erhöhte, funktionelle Ansprechbarkeit der Adenylatzyklase im Verlauf der Agonist-Stimulation, die im Verlauf des Agonist-Entzugs zunächst zu- und schließlich wieder abnahm. Diese Beobachtung ist am ehesten als gegenregulatorischer Effekt während dauerhafter Agonist-Stimulation und dadurch induzierter Rezeptordesensibilisierung zu werten und ist für verschiedene andere G_s - und G_i -gekoppelte Rezeptoren bekannt und beschrieben (Okusa et al., 1997; Kaplan et al., 1998).

Diese Gegenregulation ist allerdings wie gezeigt nicht in der Lage, die stattfindende Rezeptordesensibilisierung funktionell zu antagonisieren bzw. die Resensibilisierung zu beschleunigen.

4.5 Einfluss von Cycloheximid auf die Resensibilisierung

Cycloheximid, ein Hemmstoff der zellulären Proteinbiosynthese, zeigte in allen Zelllinien eine signifikante Hemmung der Rezeptor-Resensibilisierung, die im natürlichen Zellsystem am ausgeprägtesten war.

Hierdurch konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Resensibilisierung des IP-Rezeptors in den untersuchten Zellsystemen zumindest anteilig auf Rezeptor-Neusynthese beruht. Sowohl der humane Wildtyp-Rezeptor als auch die C-terminal trunke Mutante zeigten unter Zusatz von Cycloheximid eine signifikant verminderte Resensibilisierung. Aufgrund der Tatsache, dass die Mutante jedoch ohne Inhibitorzusatz normalerweise schneller resensibilisiert, hätte man erwarten können, dass –unter der Vorstellung einer verminderten lysosomalen Degradation aufgrund des fehlenden C-Terminus- die Auswirkung von Cycloheximid auf die Resensibilisierung bei der Mutante geringer ausgeprägt ist. Dies war jedoch nicht der Fall, so dass hier ein anderer Mechanismus zu diskutieren wäre, der zu der beschleunigten Resensibilisierung führt.

Im Fall der A7r5-Zellen war die Hemmung der Resensibilisierung am deutlichsten nachweisbar, so dass hierdurch gezeigt werden konnte, dass in diesem natürlichen Zellsystem der überwiegende Anteil des Resensibilisierungsprozesses auf Rezeptorneusynthese beruht.

Interessant war in diesem Zusammenhang auch noch die v.a. in hIP-R und A7r5-Zellen nachweisbare Beobachtung, dass innerhalb der ersten zwei Stunden nach Agonist-Entzug die Resensibilisierungsgeschwindigkeit mit und ohne Cycloheximid nicht signifikant voneinander abweicht, d.h. dass in diesem Zeitraum der "Kurzzeit-Resensibilisierung" der Mechanismus des Rezeptor-Recyclings führend ist und erst im weiteren Verlauf die Neusynthese an Bedeutung gewinnt. Grundsätzlich muss in diesem Zusammenhang natürlich auch bedacht werden, dass in der vorliegenden Arbeit ausschließlich die IP-Rezeptorresensibilisierung nach vorheriger Langzeit-Desensibilisierung untersucht wurde. Wie eingangs jedoch bereits erwähnt, unterscheiden sich die Mechanismen der Desensibilisierung in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer deutlich: Während im Zuge der Kurzzeit-Desensibilisierung (Sekunden bis Minuten) vor allem die Entkopplung des Rezeptors vom G-Protein eine Rolle spielt, gewinnen mit zunehmender Stimulationsdauer Mechanismen wie Internalisierung, Dephosphorylierung und -bei Langzeitstimulation- auch lysosomale Degradation an Bedeutung. Hieraus lässt sich ableiten, warum Cycloheximid als Hemmstoff der Proteinbiosynthese erwartungsgemäß einen deutlich hemmenden Einfluss auf die Rezeptorresensibilisierung in allen untersuchten Zellsystemen hatte, denn bei der

zugrundegelegten Vorinkubationszeit von 22 Stunden konnte von einer weitreichenden Downregulation der IP-Rezeptoren ausgegangen werden. Da eine Rezeptorresensibilisierung dann zum überwiegenden Teil nur noch über den Weg der Neusynthese erfolgen kann, zeigte Cycloheximid diesen ausgeprägten Effekt.

4.6 Einfluss von Concanavalin A auf die Rezeptorresensibilisierung

Concanavalin A, in Hemmstoff der Rezeptorinternalisierung, zeigte in keinem Zellsystem einen Effekt auf die IP-Rezeptor-Resensibilisierung, jedoch in A7r5-Zellen eine signifikante Hemmung der IP-Rezeptor-Desensibilisierung. Diese Befunde decken sich wiederum mit etlichen Beschreibungen in der Literatur bezüglich der unterschiedlichen Wirkung von Con A auf das De- und Resensibilisierungsverhalten verschiedener G-Protein-gekoppelter Rezeptoren: So ist z.B. für den β_2 AR eine Hemmung der Resensibilisierung ohne Einfluss auf die Desensibilisierung beschrieben worden (Pippig et al., 1995; Hasbi et al., 2000). Der gleiche Effekt wurde für den A2A Adenosin-Rezeptor (Mundell et al., 1998) und den Neurokinin-Rezeptor (Garland et al., 1996) beschrieben. Für den Secretin-Rezeptor wurde hingegen auch eine selektive Hemmung der Desensibilisierung beschrieben (Mundell et al., 1998).

Da es unstrittig ist, dass der IP-Rezeptor nach Agonist-Stimulation internalisiert wird (Nilius et al., 2000), stellt sich die Frage nach dem Internalisierungs-/ Recyclingmechanismus, der offensichtlich im Fall von IP-R durch Con A nicht zu beeinflussen ist.

In Bezug auf die vorliegende Versuchsreihe muss außerdem bedacht werden, dass die untersuchten Zelllinien Inkubationszeiten von mehr als 8 Stunden mit Concanavalin A nicht tolerierten. Dies bedeutet, dass sowohl die Desensibilisierungs- wie auch die Resensibilisierungsphasen nur jeweils 4 Stunden betragen. Einerseits ist aus diesem Grund keine Aussage bezüglich der Langzeitauswirkungen eines Internalisierungshemmstoffes möglich. Andererseits ist hierdurch auch keine exakte Vergleichbarkeit mit den anderen Versuchsreihen gegeben.

4.7 Klinischer Bezug

In der vorliegenden Arbeit wurden grundlegende Mechanismen der humanen versus murinen IP-Rezeptorresensibilisierung nach vorheriger Langzeitdesensibilisierung untersucht.

Obwohl bekannt ist, dass verschiedene zelluläre Mechanismen in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer und -konzentration zur Desensibilisierung des IP-Rezeptors führen und somit davon auszugehen ist, dass auch der Resensibilisierung in Abhängigkeit von Vorinkubationsdauer und -konzentration unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen müssen, wurde bewusst der Schwerepunkt auf die Langzeit-Mechanismen gelegt. Dies geschah unter der Vorstellung, dass sowohl unter normalen physiologischen, wie auch vor allem unter pathologischen und klinisch-therapeutischen Bedingungen im speziellen Fall des Prostazyklins die Langzeitmechanismen und -auswirkungen ungleich bedeutender sind als die Kurzzeitmechanismen. Während es beim β -adrenergen Rezeptor aufgrund der physiologischerweise schnellen Ausschüttung, Anflutung und des schnellen Wirkungseintritts von großer Bedeutung ist, sowohl die Kurzzeit- als auch die Langzeit-Regulationsmechanismen zu untersuchen, ist es aufgrund der Physiologie des Prostazyklins bzw. seiner therapeutischen Indikationen von größerer Wichtigkeit, die Langzeit-Effekte zu erforschen. Bei chronischen Erkrankungen wie der pulmonalen Hypertonie, der Hypercholesterinämie und der Atherosklerose zum Beispiel, könnte die genaue Kenntnis der Resensibilisierungsvorgänge und -kinetik die Entwicklung optimierter, diskontinuierlicher Dosierungsschemata ermöglichen, die den zugrundeliegenden Mechanismen Rechnung tragen und so eine maximale Wirksamkeit des therapeutisch verabreichten Prostazyklins bzw. seiner Analoga ermöglichen würde.

Darüber hinaus wäre natürlich auch denkbar, dass auf der Grundlage solcher Erkenntnisse Pharmaka entwickelt werden können, die in diese Prozesse gezielt eingreifen; entweder, indem sie die Rezeptordesensibilisierung ganz bzw. teilweise hemmen oder indem sie die Rezeptorresensibilisierung beschleunigen. Dies würde eine kontinuierliche Verabreichung gleichbleibender Stärke ermöglichen, was auch im Sinne einer damit verbundenen, erhöhten Patienten-Compliance von zusätzlichem Vorteil wäre.

Insgesamt erscheint jedoch nach momentanem Wissensstand eine pharmakologische Beeinflussung der Rezeptordesensibilisierungsvorgänge erfolgversprechender als eine Einflussnahme auf die Rezeptorresensibilisierung:

Da in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass unter physiologischen (und damit Langzeit-) Bedingungen die IP-Rezeptorresensibilisierung vor allem auf Rezeptorneusynthese

beruht, ist eine Beschleunigung mit pharmakologischen Mitteln kaum möglich, so dass hier bis zur Verfügbarkeit klinisch einsetzbarer, spezifischer Hemmstoffe der IP-R Desensibilisierung zunächst die Entwicklung optimierter Dosierungsschemata im Vordergrund stehen sollte.

5 Zusammenfassung

Prostazyklin (PGI_2) gehört zu der Stoffgruppe der Prostaglandine und wird in verschiedenen Geweben nach unterschiedlichen Stimuli freigesetzt. PGI_2 besitzt antimitogene, vasodilatatorische sowie antiaggregatorische Eigenschaften. Seine Wirkungen vermittelt PGI_2 über den Prostazyklin-Rezeptor (IP-R), der zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehört. Klinisch zum Einsatz kommen PGI_2 bzw. seine Mimetika z.B. bei der Atherosklerose, der pulmonalen Hypertonie und bei peripheren Durchblutungsstörungen. In der therapeutischen Anwendung zeigte sich eine Wirkungsabschwächung bei Dauerapplikation, die zur kontinuierlichen Dosiserhöhung oder zu diskontinuierlichen Dosierungsschemata zwang. Dies deutet auf eine IP-R Desensibilisierung mit nachfolgender Resensibilisierung im Agonist-freien Intervall hin. In der vorliegenden Arbeit wurden grundsätzliche Mechanismen der IP-Rezeptorresensibilisierung nach homologer Langzeit-Desensibilisierung untersucht. Die Versuche wurden an endogen IP-R exprimierenden Zellen (A7r5) sowie an einem Transfektionssystem (COS1) untersucht.

Hierbei zeigte sich in allen untersuchten Zelllinien eine vollständige Rezeptorresensibilisierung 22h nach Agonist-Entzug, die durch Cycloheximid hemmbar war, was für eine Neusynthese des IP-R spricht. Das natürliche Zellsystem desensibilisierte vollständiger und zeigte eine schnellere Resensibilisierungskinetik, was auf eine optimale Stöchiometrie der beteiligten Komponenten zurückgeführt wurde. Es zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen humanem Wildtyp-Rezeptor und C-terminal trunkierter Mutante, was gegen eine zentrale Rolle des C-Terminus in Bezug auf die IP-R-Resensibilisierung nach Langzeit-Desensibilisierung spricht. Eine funktionelle Regulation der Adenylatzyklase und des $G_{s\alpha}$ -Proteins im Verlauf der Resensibilisierung konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Concanavalin A zeigte in keinem Zellsystem einen Effekt auf die IP-Rezeptorresensibilisierung, was gegen einen Internalisierungs-abhängigen Prozess spricht.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass unter physiologischen (Langzeit-) Bedingungen die IP-R Resensibilisierung v.a. auf Rezeptorneusynthese beruht. Eine pharmakologische Beschleunigung dieses Prozesses ist kaum möglich, so dass die Entwicklung klinisch einsetzbarer, spezifischer Hemmstoffe der IP-R Desensibilisierung sowie optimierter Dosierungsschemata im Vordergrund stehen sollte.

6 Literaturverzeichnis

Alt E, Hähnel I, Beilharz C, Prietzel K, Preter D, Stemberger A, Fliedner 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* 2000; 101:1453-1458

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* 1997;77: 190-196

Barak LS, Tiber M, Freedman NJ, Kwatra MM, Lefkowitz RJ, Caron MG: A highly conserved tyrosine residue in G protein-coupled receptors is required for agonist-mediated β 2-adrenergic receptor sequestration. *J Biol Chem* 1994; 269:2790-2795

Bley, KR.; Hunter, JC.; Eglon, RM.; Smith, JAM.: The role of IP prostanoid receptors in inflammatory pain. *TIPS* 1998; 19: 141-147

Boie Y, Rushmore TH, Darmon-Goodwin A, Grygorczyk R, Slipetz DM, Metters KM, Abramowitz M: Cloning and expression of a cDNA for the human prostanoid IP receptor. *J Biol Chem* 1994; 269:12173-12178

Bradford M: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254

Braun, M.; Hohlfeld, T.; Kienbaum, P.; Weber, A-A.; Sarbia, M.; Schrör, K.: Antiatherosclerotic effects of oral cicaprost in experimental hypercholesterolemia in rabbits. *Atherosclerosis* 1993; 103: 93-105

Cao TT: A kinase-regulated PDZ-domain interaction controls endocytic sorting of the β 2-adrenergic receptor. *Nature* 1999; 401: 286-290

Chaudhari, A.; Gupta, S.; Kirschenbaum, M.: Biochemical evidence for PGI₂ and PGE₂ receptors in the rabbit renal preglomerular microvasculature. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1053: 156-161

Cheng Y, Austin SC, Rocca B, Koller BH, Coffman TM, Grosser T, Lawson JA, FitzGerald GA: Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxan A₂. *Science* 2002, 296(5567): 539-41

Cook SJ, Mc Cormick F: Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf. *Science* 1993; 262:1069-1072

Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ: Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* 1997; 390(6655):88-91

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* 1992; 37:305-311

Faraci FM, Heistad DD: Regulation of the cerebral circulation: Role of endothelium and potassium channels. *Physiol Rev* 1998; 78:53-97

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* 1996; 271:363-366

FitzGerald, GA.; Smith, B.; Pedersen, A.; Brash, AR.: Increased prostacyclin biosynthesis in patients with severe atherosclerosis and platelet activation. *N Engl J Med* 1984; 310: 1065-1068

Garland AM, Grady EF, Lovett M, Vigna SR, Frucht MM, Krause JE, Bunnett NW: Mechanisms of desensitization and resensitization of G-protein-coupled neurokinin1 and neurokinin2 receptors. *Mol Pharmacol* 1996; 49:438-446

Gershlick AH, Spriggins D, Davies SW, Syndercombe-Court YD, Timmins J, Timmins 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* 1994; 71: 7-15

Gluzman Y: SV40-Transformed Simian Cells Support the Replication of Early SV40 Mutants. *Cell* 1981; 23:175-182

Gros R, Tan CM, Chorazyczewski J, Kelvin DJ, Benovic JL, Feldman RD: G-Protein coupled receptor kinase expression in hypertension. *Clin Pharmacol Ther* 1999; 65:545-551

Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B: Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci* 1975; 72(8):2994-2998

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* 2000; 293:237-247

Hildebrand, M.; Staks, T.; Nieuweboer, B.: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cicaprost in healthy volunteers after oral administration of 5 to 20 µg. *Eur J Clin Pharmacol* 1990; 39: 149-153

Isogaya M, Yamada N, Koike H, Ueno Y, Kumagai H, Ochi Y, Okazaki S, Nishio S: Inhibition of restenosis by beraprost sodium (a prostaglandin I₂ analogue) in the atherosclerotic rabbit artery after angioplasty. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 25:947-952

Kaplan GB, Sethi RK, McClelland EG, Leite-Morris KA: Regulation of G protein-mediated adenylyl cyclase in striatum and cortex of opiate-dependent and opiate withdrawing mice. *Brain Res* 1998; 788(1-2):104-110

Kaufmann, GL.; Whittle, BJR.; Aures, D.; Vane, JR.; Grossman, MI.: Effects of prostacyclin and a stable analogue, 6b- PGI₁, on gastric acid secretion, mucosal blood flow and blood pressure in conscious dogs. *Gastroenterology* 1979; 77: 1301-1306

König JA, Edwardson JM: Endocytosis and recycling of G protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1997; 18:276-287

Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685

Lawler OA, Miggin SM, Kinsella BT: Protein kinase A-mediated phosphorylation of Serine 357 of the mouse prostacyclin receptor regulates its coupling to G_s-, G_i, and to G_q-coupled effector signaling. *J Biol Chem* 2001; 276(36):33596-33607

Lee K: Transcriptional regulation by cAMP. *Curr Opin Cell Biol* 1991; 3:953-959

Lowry OH: Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-275

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* 1976; 263:663-665

Mundell SJ, Kelly E: The effect of inhibitors of receptor internalization on the desensitization and resensitization of three Gs-coupled receptor responses. *Br j Pharmacol* 1998; 125(7):1594-1600

Murata, T.; Ushikubi, F.; Matsuoka, T.; Hirata, M.; Yamasaki, A.; Sugimoto, Y.; Ishikawa, A.; Aze, Y.; Tanaka, T.; Yoshida, N.; Ueno, A.; Oh-ishi, S.; Narumiya, S.: Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. *Nature* 1997; 388: 678-682

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* 1994; 90:1643-1647

Namba T, Oida H, Sugimoto Y, Kakizuka A, Negishi M, Ishikawa A, Narumiya S: cDNA cloning of a mouse prostacyclin receptor. Multiple signaling pathways and expression in thymic medulla. *J Biol Chem* 1994; 269:9986-9992

Negishi M, Sugimoto J, Ichikawa A: Prostanoid receptors and their biological actions. *Prog Lipid Res* 1993; 32:417-434

Nilius SM, Hasse A, Kuger P, Schrör K, Meyer-Kirchrath J: Agonist-induced long-term desensitization of the human prostacyclin receptor. *FEBS Lett* 2000; 484:211-216

Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, Caron MG: Association of beta-arrestin with G-Protein-coupled receptors during clathrin mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J Biol Chem* 1999;274:32248-32257

Okusa MD, Huang L, Momose-Hotokezaka A, Huynh LP, Mangrum AJ: Regulation of adenylyl cyclase in polarized renal epithelial cells by G protein-coupled receptors. *Am J Physiol* 1997; 273(6):F883-91

Orchard, MA.; Robinson, C.: Stability of prostacyclin in human plasma and whole blood: studies on the protective effect of albumin. *Thromb Haemost* 1981; 46: 645-647

Ostrom RS, Post SR, Insel PA: Stoichiometry and compartmentation on G protein-coupled receptor signaling: implications for therapeutic interventions involving G(s). *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 294:407-412

Pierce KL, Gil DW, Woodward DF, Regan JW: Cloning of human prostanoid receptors. Trends Pharmacol Sci 1995; 16(8):253-256

Pippig S, Andexinger S, Lohse MJ: Sequestration and recycling of β_2 -adrenergic receptors permit resensitization. Mol Pharmacol 1995;47:666-676

Pomerantz, KB.; Hajjar, DP.: Eicosanoids in regulation of vascular smooth muscle cell phenotype, proliferative capacity and cholesterol metabolism. Arteriosclerosis 1989; 9: 413-429

Raizner AE, Hollman J, Abukhalil J, Demke DC: Ciprostone for restenosis revisited: Quantitative analysis of angiograms. J Am Coll Cardiol 1993; 21

Riva, CM.; Morganroth, ML.; Marks, RM.; Todd, RF.; Ward, PA.; Boxer, LA.: Iloprost inhibits activated human neutrophil (PMN) adherence to endothelial cells via increased cyclic- AMP. Clin Res 1989; 37: 949A

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Press, 1989

Sasaki Y, Usui T, Tanaka I, Nakagawa O, Sando T, Takahashi T, Namba T, Narumiya, Nakao K: Cloning and expression of a cDNA for rat prostacyclin receptor. Biochim Biophys Acta 1994; 1224:601-605

Schirner M, Schneider MR: Inhibition of metastasis by Cicaprost in rats with established SMT2A mammary carcinoma growth. Cancer Detect Prev 1997; 21: 44-50

Schirner, M.; Kraus, C.; Lichtner, RB.; Schneider, MR.; Hildebrand, M.: Tumor metastasis inhibition with the prostacyclin analogue cicaprost depends on discontinuous plasma peak levels. Prostaglandin Leukotriessenz Fatty Acids 1998; 58: 311-317

Schrör K: Prostaglandine und verwandte Verbindungen. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1984

Shirotani, M.; Yui, Y.; Hattori, R.; Kawai, M.: U-61,431F, a stable prostacyclin analogue, inhibits the proliferation of bovine vascular smooth muscle cells with little antiproliferative effect on endothelial cells. *Prostaglandins* 1991; 41: 97-110

Sibley DR, Strasser RH, Benovic JL, Daniel K, Lefkowitz RJ: Phosphorylation/Dephosphorylation of the beta-adrenergic receptor regulates its functional coupling to adenylate cyclase and subcellular distribution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986, 83(24):9408-12

Siegel G, Walter A, Schnalke F, Schmidt A, Buddecke E, Loirand G, Stock G: Potassium channel activation, hyperpolarisation and vascular relaxation. *Z Kardiol* 1991; 80 Suppl 7:9-24

Sinzingr H, Schernthaner G, Kaliman J: Sensitivity of platelets to prostaglandins in coronary heart disease and angina pectoris. *Prostaglandins* 1981; 22:773-781

Skuballa, W.; Radüchel, B.; Vorbrüggen, H.: Chemistry of stable prostacyclin analogues: synthesis of iloprost. In: *Prostacyclin and its stable analogue iloprost*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 17-24, 1987.

Smyth EM, Nestor PV, FitzGerald GA: Agonist-dependent phosphorylation of an epitope-tagged human prostacyclin receptor. *J Biol Chem* 1996; 271:33698-33704

Steiner AL, Parker CW, Kipnis DM: Radioimmunoassay for cyclic nucleotides. I. Preparation of antibodies and iodinated cyclic nucleotides. *J Biol Chem* 1972; 247:1106-1113

Sturzebecher S, Haberey M, Muller B, Schillinger E, Schroder G, Skuballa W, Stock G, Vorbrüggen H, Witt W: Pharmacological profile of a novel carbacyclin derivative with high metabolic stability and oral activity in the rat. *Prostaglandins* 1986, 31(1):95-109

Ungerer M, Kessebohm K, Kronsben K, Lohse MJ, Richardt G: Activation of beta-adrenergic receptor kinases during myocardial ischemia. *Circ Res* 1996; 79:455-460

von Zastrow M, Kobilka BK: Antagonist-dependent and –independent steps in the mechanism of adrenergic receptor internalization. *J Biol Chem* 1994; 269:18448-18452

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* 1998; 93 Suppl 3: 54-57

Weksler, BB.; Marcus AJ.; Jaffe, EA.: Synthesis of prostaglandin I₂ (prostacyclin) by cultured human and bovine endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 3922-3928

Wess J: G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. *FASEB J* 1997; 11(5):346-354

Willis, AL.; Smith, DL.; Vigo, C.: Suppression of principal atherosclerotic mechanisms by prostacyclin and other eicosanoids. *Prog Lipid Res* 1986; 25: 645-666

Wolf R, Koch T, Schulz S, Klutzny M, Schroeder H, Raulf E, Buhling F, Hollt V: Replacement of threonine³⁹⁴ by alanine facilitates internalization and resensitization of the rat mu opioid receptor. *Mol Pharmacol* 1999; 55:263-268

7 Anhang

7.1 Danksagungen

Herrn Prof. Dr. **KARSTEN SCHRÖR** möchte ich sehr herzlich für die Aufnahme in das Institut, für die Überlassung dieses Themas sowie für die hilfreiche Betreuung und Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit danken.

Besonderer Dank gilt vor allem Herrn Dr. **ANDREAS HASSE**, der mich in alle experimentellen Techniken, die zur Durchführung der Arbeit nötig waren, äußerst gründlich und ausführlich eingewiesen hat, der zu jeder Zeit auf Fragen, Anregungen und Kritik meinerseits einging und diese Arbeit insgesamt mit viel Engagement betreute.

Desweiteren gilt mein spezieller Dank Frau **RÜTER** und Frau **DROSTEN** für die stets prompte Durchführung meiner unzähligen cAMP-Bestimmungen.

Frau **PETRA KUGER** möchte ich ebenfalls herzlich für das Einscannen sämtlicher Autoradiogramme danken, sowie Herrn Dr. **ARTUR-ARON WEBER** für seine Tipps bezüglich der statistischen Auswertung der Experimente.

Besondere Erwähnung verdient an dieser Stelle auch Herr Dipl.-Ing. **CHRISTIAN STÜDEMANN**, der mir bei allen computertechnischen Problemfällen immer mit Rat und Tat zur Seite stand und dessen Reparaturgeschick es zu verdanken ist, dass die während der Niederschrift überzufällig häufig aufgetretenen Hard- und Softwareprobleme mich letztlich weder in den Wahnsinn noch in den finanziellen Ruin treiben konnten.

Herrn FA **HOLGER BREUER** danke ich für die erduldete Belagerung seines Arbeitszimmers sowie Frau Dr. **GABRIELE PETSCH** für die unermüdliche Motivation und das stets effektive, unkomplizierte Krisenmanagement in der Schlussphase dieser Arbeit.

Abschließend möchte ich noch den Herstellerfirmen für die Überlassung der Substanzen danken.

7.2 Lebenslauf

14. August 1974	geboren als Tochter der Eheleute Rolf und Ursula Randewig, geb. Schick, in Essen
1981-1985	Kath. Ludgerus-Grundschule in Ratingen
1985-1993	Theodor-Heuss-Gymnasium Ratingen
Mai 1993	Abitur
Oktober 1993	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
März 1996	Ärztliche Vorprüfung
März 1997	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1998 – 1999	Experimenteller Teil der Promotionsarbeit am Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bei Prof. Dr. Karsten Schrör
März 2000	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April - August 2000	PJ – Tertian (Chirurgie) am Cabrini Medical Center, New York City, USA
August – Dezember 2000	PJ – Tertian (Gynäkologie & Geburtshilfe) am Rob Ferreira Hospital, Nelspruit, South Africa
Januar- April 2001	PJ – Tertian (Innere Medizin) an der Universitätsklinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Juni 2001	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Juli 2001- Dezember 2002	ÄiP in der Chirurgischen Abteilung des Evangelischen Krankenhauses in Mettmann
seit Januar 2003	Assistenzärztin in der Chirurgischen Abteilung des Evangelischen Krankenhauses in Mettmann

Mettmann, im Januar 2003

7.3 Veröffentlichungen

Randewig N, Hasse A, Schrör K: Veränderungen von Rezeptor, Gs α und Adenylatzyklase in glatten Gefäßmuskelzellen nach dauerhafter Stimulation mit Prostazyklin. Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol 1999; Suppl.2 , 359(3), R21

Hasse A, Randewig N, Schrör K: Different mechanisms are involved in short- and long-term-desensitization of transfected human prostacyclin receptor in COS1-cells. Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol 1999; Suppl.2 , 359(3), R21

"Resensibilisierung des Prostazyklinrezeptors nach homologer Langzeit-Desensibilisierung in verschiedenen Zellkultursystemen"

von: Nadine Randewig

Prostazyklin (PGI₂) gehört zu der Stoffgruppe der Prostaglandine und wird in verschiedenen Geweben nach unterschiedlichen Stimuli freigesetzt. PGI₂ besitzt antimitogene, vasodilatatorische sowie antiaggregatorische Eigenschaften. Seine Wirkungen vermittelt PGI₂ über den Prostazyklin-Rezeptor (IP-R), der zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehört. Klinisch zum Einsatz kommen PGI₂ bzw. seine Mimetika z.B. bei der Atherosklerose, der pulmonalen Hypertonie und bei peripheren Durchblutungsstörungen. In der therapeutischen Anwendung zeigte sich eine Wirkungsabschwächung bei Dauerapplikation, die zur kontinuierlichen Dosiserhöhung oder zu diskontinuierlichen Dosierungsschemata zwang. Dies deutet auf eine IP-R Desensibilisierung mit nachfolgender Resensibilisierung im Agonist-freien Intervall hin. In der vorliegenden Arbeit wurden grundsätzliche Mechanismen der IP-Rezeptorresensibilisierung nach homologer Langzeit-Desensibilisierung untersucht. Die Versuche wurden an endogen IP-R exprimierenden Zellen (A7r5) sowie an einem Transfektionssystem (COS1) untersucht.

Hierbei zeigte sich in allen untersuchten Zelllinien eine vollständige Rezeptorresensibilisierung 22h nach Agonist-Entzug, die durch Cycloheximid hemmbar war, was für eine Neusynthese des IP-R spricht. Das natürliche Zellsystem desensibilisierte vollständiger und zeigte eine schnellere Resensibilisierungskinetik, was auf eine optimale Stöchiometrie der beteiligten Komponenten zurückgeführt wurde. Es zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen humanem Wildtyp-Rezeptor und C-terminal trunkierter Mutante, was gegen eine zentrale Rolle des C-Terminus in Bezug auf die IP-R-Resensibilisierung nach Langzeit-Desensibilisierung spricht. Eine funktionelle Regulation der Adenylatzyklase und des G_{sα}-Proteins im Verlauf der Resensibilisierung konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Concanavalin A zeigte in keinem Zellsystem einen Effekt auf die IP-Rezeptorresensibilisierung, was gegen einen Internalisierungs-abhängigen Prozess spricht. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass unter physiologischen (Langzeit-) Bedingungen die IP-R Resensibilisierung v.a. auf Rezeptorneusynthese beruht. Eine pharmakologische Beschleunigung dieses Prozesses ist kaum möglich, so dass die Entwicklung klinisch einsetzbarer, spezifischer Hemmstoffe der IP-R Desensibilisierung sowie optimierter Dosierungsschemata im Vordergrund stehen sollte.