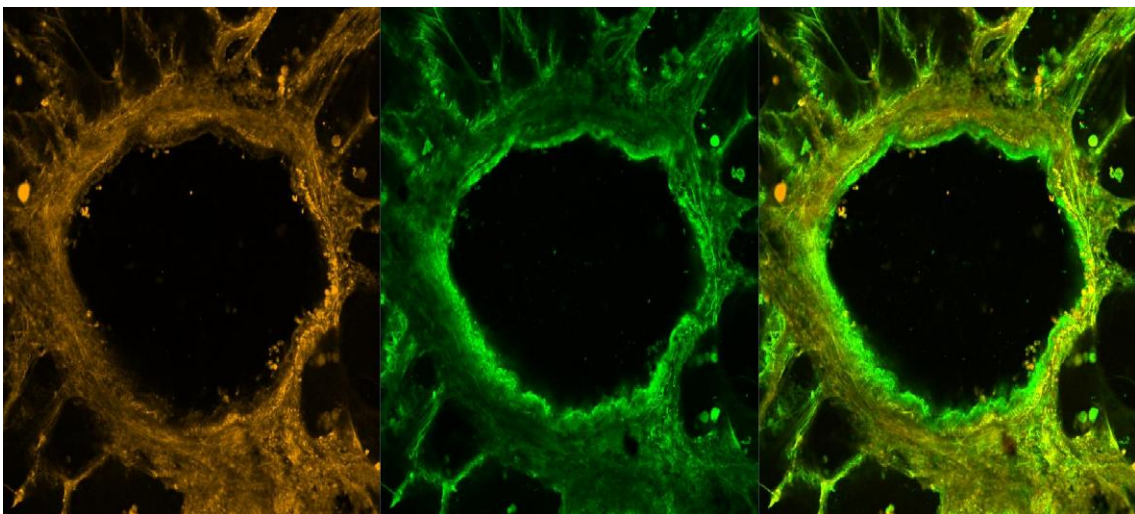


**Beta-Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid als ein neuer
Bronchodilator**

Innokentij Jurastow



Beta-Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid als ein neuer Bronchodilator

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Innokentij Jurastow
aus St. Petersburg

Gießen 2015

Aus dem Institut der Anatomie und Zellbiologie am Fachbereich Medizin
der Justus Universität Giessen
Gf.: Frau Prof. Dr. Eveline Baumgart-Vogt
Betreuer: Prof. Dr. med. Wolfgang Kummer

Erster Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Kummer
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Norbert Weißmann

Tag der Disputation: 07.06.2016

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Aufbau des Atmungsapparates	1
1.2	Innervation des Atmungstraktes	2
1.3	G-Protein gekoppelte Rezeptoren	4
1.4	Intrazelluläres Kalzium	5
1.5	Kalzium- und Membranpotenzialmessung mittels Indikatoren	6
1.6	Messungen des intrazellulären cAMP-Spiegels mittels Fluoreszenz- Resonanz-Energie-Transfer	6
1.7	Beta Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid	7
1.7.1	Allgemeines	7
1.7.2	Funktionen des β -NAD	8
1.8	Bronchokonstriktion	11
1.8.1	Entstehungsmodelle des Asthma bronchiale	11
1.8.2	Therapie des Asthma bronchiale	12
1.8.3	Entstehungsmodelle der COPD	13
1.8.4	Therapie der COPD	14
1.8.5	Schwächen der Therapie von obstruktiven Lungenerkrankungen	15
1.9	Zielsetzung der Arbeit	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Material	16
2.1.1	Tiere	16
2.1.2	Chemikalien/Pharmaka	16
2.1.3	Primäre Antikörper	19
2.1.4	Sekundäre Antikörper	19
2.1.5	Primer	20
2.1.6	Lösungen	21
2.2	Methoden	22
2.2.1	Tötung der Maus und Gewebeentnahme	22
2.2.2	Immunohistochemische Untersuchungen zur Lokalisation von CD38 und TRPM2 in der glatten Muskulatur	22
2.2.3	RT-PCR	23

2.2.4	Organbadversuche und elektrische Feldstimulation an der isolierten Trachea der Maus _____	24
2.2.5	Videomorphometrie an Lungenschnitten der Maus _____	27
2.2.6	Kalziummessungen an isolierten glatten Muskelzellen der Atemwege der Maus _____	32
2.2.7	Kalziummessungen an kultivierten glatten Muskelzellen der Atemwege der Maus _____	33
2.2.8	Kalziummessungen an kultivierten glatten Bronchialmuskelzellen des Menschen _____	34
2.2.9	Transfektion von glatten Muskelzellen des menschlichen Bronchialsystems mit einem direkt durch cAMP aktivierbaren Austauscherprotein _____	35
2.2.10	Messung der intrazellulären cAMP-Konzentration mittels FRET _____	35
2.2.11	Simultane Kalziummessungen und Messungen des Membranpotenzials an Lungenschnitten der Maus _____	36
2.2.12	Organbadexperimente an Bronchioli von Patientenzungen _____	37
2.2.13	Statistische Auswertung _____	38
3	Ergebnisse _____	39
3.1	<i>β-NAD dilatiert die glatte Muskulatur der Trachea der Maus _____</i>	39
3.2	<i>Vorkommen von CD38 und TRPM2 in der Mastrachea _____</i>	43
3.3	<i>β-NAD dilatiert Bronchi der Maus in PCLS _____</i>	45
3.4	<i>Der Effekt von β-NAD ist unabhängig von purinergen Rezeptoren _____</i>	47
3.5	<i>Der Effekt von β-NAD ist unabhängig von G_i- und G_s-Protein gekoppelten Rezeptoren sowie der PLC _____</i>	50
3.6	<i>G-Protein-unabhängige Signalwege der β-NAD-induzierten Relaxation _____</i>	55
3.7	<i>Der Effekt von β-NAD ist unabhängig von dem Konstriktor der glatten Muskulatur _____</i>	61
3.8	<i>Die durch β-NAD hervorgerufene Dilation ist vergleichbar mit dem Effekt von Salbutamol in Atemwegen der Maus _____</i>	64
3.9	<i>β-NAD führt zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration in der glatten Bronchialmuskulatur des Menschen durch die lösliche AC _____</i>	67
3.10	<i>Die β-NAD-induzierte Relaxation ist abhängig von der löslichen AC _____</i>	69
3.11	<i>β-NAD führt zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ und einer Depolarisation in glatten Atemwegmuskelzellen der Maus _____</i>	70
3.12	<i>Die durch β-NAD hervorgerufene Dilation ist vergleichbar mit dem Effekt von Salbutamol in Atemwegen des Menschen _____</i>	74

3.13	<i>β-NAD führt zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in glatten Bronchialmuskelzellen des Menschen</i>	76
4	Diskussion	77
4.1	<i>Extrazelluläres β-NAD als Botenstoff</i>	77
4.2	<i>Relaxation der glatten Muskelzellen</i>	78
4.2.1	Purinerge Rezeptoren	78
4.2.2	GPCR	81
4.2.3	NOS	84
4.2.4	PDE	85
4.2.5	Kalziumkanäle	86
4.2.6	Membranpotenzial	89
4.2.7	cAMP	90
4.3	<i>Konstriktion der glatten Muskelzellen</i>	91
4.3.1	Muskarin	91
4.3.2	KCl	92
4.3.3	Thromboxan	92
4.3.4	EFS	93
4.4	<i>Vergleich des β-NAD mit Salbutamol</i>	93
4.5	<i>β-NAD als mögliches neues Therapeutikum gegen bronchokonstriktive Lungenerkrankungen</i>	94
5	Zusammenfassung	95
6	Summary	96
7	Abkürzungsverzeichnis	97
8	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	100
8.1	<i>Abbildungen</i>	100
8.2	<i>Tabellen</i>	102
9	Literaturverzeichnis	103
10	Publikationsverzeichnis	125
11	Erklärung zur Dissertation	126
12	Danksagung	127

1 Einleitung

1.1 Aufbau des Atmungsapparates

Für den Gasaustausch sowie die äußere Atmung ist der Atmungsapparat unerlässlich. Der Atmungsapparat besteht aus oberen (Nasenhöhle und Rachen) und unteren Atemwegen, welche mit dem Kehlkopf beginnen und in den Lungen (Pulmones) und dem Bronchialsystem münden. Die zum Gasaustausch durch die Diffusion zwischen Luft und Blut notwendigen Strukturen sind die Lungenbläschen oder Alveolen, welche sich in dem distalen Abschnitt des Bronchialsystems befinden (Duncker und Kummer, 2008).

Das Lungengewebe wird bei vielen Säugetieren im Verlauf der Embryonalphase durch die Einziehung der Pleura visceralis unterteilt. Beim Menschen wird der rechte Lungenflügel wie auch bei der Maus in drei Lungenlappen unterteilt, während der linke Lungenflügel beim Menschen aus zwei Lungenlappen besteht, bei der Maus aus einem, welcher sich über die gesamte linke Pleurahöhle erstreckt (Valerius, 1996).

Der Bronchialbaum des Menschen entsteht durch wiederholtes Verzweigen (Dichotomie) während der Embryonalgenese (Boyden et al., 1975; Weibel et al., 1991). So besitzt die Luftröhre (Trachea) eine Hauptgabelung, Bifurcatio tracheae. Diese teilt sich wiederum in zwei Hauptbronchien, Bronchi principales, welche sich nach dem Eintritt in die Lunge wiederum zu Lappenbronchien, sogenannten Bronchi lobares, verzweigen. Aus diesen gehen die Segmentbronchien, Bronchi segmentales, hervor. Die Segmentbronchien zweigen sich beim Menschen in weitere fünf bis zwölf Generationen auf bis zu den Bronchioli, welche im Gegensatz zu den Generationen davor keine Knorpel Elemente besitzen und innerhalb der Lungenläppchen (Lobulus pulmonis) als letzte Äste des luftleitenden Systems, sogenannte Bronchioli terminales, enden. Daran schließt sich das respiratorische System mit seinen Bronchioli respiratorii an, welche aus Alveolen bestehen. Schließlich mündet das respiratorische System in die Alveolengänge (Ductuli alveolares; Duncker und Kummer, 2008).

Im Gegensatz dazu wird die murine Lunge in Haupt- und Nebenachsen gegliedert und als monopodial gekennzeichnet (Koblinger und Hofmann, 1988). Das heißt, das Bronchialsystem besitzt einen Stammbronchus, von welchem Nebenbronchien ersten, zweiten und dritten Ranges entspringen.

Außer in der Trachea, den beiden Stammbronchien und den Anfängen der Nebenbronchien enthalten die luftleitenden Wege der Maus im Gegensatz zum Menschen keine Knorpelspannen (Valerius, 1996).

1.2 Innervation des Atmungstraktes

Die Innervation der Atemwege besteht zum einen aus dem autonomen, efferenten System, welches aus sympathischen, postganglionär hauptsächlich durch das Noradrenalin gekennzeichneten, und parasympathischen Neuronen besteht. Postganglionär sind die parasympathischen Neurone einerseits durch den Neurotransmitter Acetylcholin (ACh) gekennzeichnet, andererseits durch die kleinemolekularen Neurotransmitter Stickstoffmonoxid (NO) und dem vasoaktiven intestinalen Peptid (VIP; Fischer et al., 1998). Weiterhin besteht die Innervation der Atemwege aus dem sensiblen System. ACh als Transmitter parasympathischer Neurone konnte durch das Vorhandensein der Acetylcholinesterase (AChE), des Abbauenzym des ACh (Mann et al., 1971), des ACh-synthetisierenden Enzyms Cholinacetyltransferase (ChAT, Canning und Fischer, 1997) und des vesikulären ACh-Transporters (VAChT, Arvidsson et al., 1997) indirekt nachgewiesen werden.

Noradrenalin als Transmitter der postganglionären sympathischen Nervenfasern ist ein Katecholamin, welches aus der Aminosäure Tyrosin synthetisiert wird.

Die präganglionären parasympathischen Neurone, welche im Nucleus ambiguus und im Nucleus dorsalis nervi vagi liegen, ziehen im N. vagus zu den Neuronen in den Atemwegen (Nickel et al., 1987) und haben als Ziel postganglionäre Neurone mit unter anderem glatten Muskelzellen und exokrinen Drüsen als Haupteffektoren (Wessler et al., 1998).

Besonders beim Menschen konnte gezeigt werden, dass AChE-positive Nervenfasern zu der glatten Muskulatur der Bronchien bis zu den terminalen Bronchioli ziehen (Partanen et al., 1982). Die präganglionären Neurone des sympathischen Systems ziehen vom Nucleus intermediolateralis und vom Nucleus intercalatus des thorakalen Rückenmarks über die Vorderwurzeln des Rückenmarks zu den paravertebralen Ganglien (Truncus sympathicus; Nickel et al., 1987) und haben als Neurotransmitter einerseits ACh (Lindh et al., 1986), andererseits NO (Blottner und Baumgarten, 1992).

ACh bindet an zwei Arten von Acetylcholinrezeptoren (AChR). Nikotinische Rezeptoren (nAChR) sind ligandengesteuerte Kationenkanäle, welche Poren aus fünf

Protein-Untereinheiten bilden. Diese öffnen sich durch die Bindung an den Liganden für Millisekunden und führen zum Einstrom von Natrium- und Kalziumionen sowie zum Ausstrom von Kaliumionen (Starke et al., 1996).

Die Gruppe der muskarinischen Acetylcholinrezeptoren (mAChR) besteht aus fünf Subtypen (mAChR1 bis mAChR5), wobei alle zu den aus sieben Transmembran-Helices bestehenden G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören (Felder, 1995). In den Atemwegen wurden die Subtypen mAChR1, mAChR2 und mAChR3 nachgewiesen (Fryer und El-Fakahany, 1990; Mak et al., 1992; Garssen et al., 1993; Hislop et al., 1998), wobei mAChR3 und mAChR2 eine Konstriktion der glatten Bronchialmuskelzellen vermitteln (Matsui et al., 2002; Struckmann et al., 2003). Außerdem ist der mAChR2 auch an der Membran der präjunktionalen Nervenendigungen lokalisiert und ist dort für eine inhibitorische Autoregulation der ACh-Freisetzung zuständig (Maclagan und Barnes, 1989). Diese scheint beim Asthma bronchiale vermindert zu sein, was eine Vagus-vermittelte Hyperreaktivität der Bronchien nach sich ziehen kann (Fryer und Jacoby, 1998). Der mAChR1 ist vorwiegend auf Epithelzellen der Atemwege lokalisiert und wird beschrieben als ein Rezeptor, dessen Stimulation zur Freisetzung bronchorelaxierender Substanzen führt (Tilley et al., 2003).

Neben den kleinmolekularen Neurotransmittern benutzen beide autonomen Systeme und auch sensorische Neurone eine Vielzahl von verschiedenen Mediatoren wie das Neuropeptid Y (NPY) oder das VIP, welche die Antworten der Systeme modulieren und verändern und dadurch viele Effekte auf den Muskeltonus der Blutgefäße, aber auch auf Entzündungsreaktionen und das Immunsystem haben (Joos et al., 2000). Diese werden in sogenannte exzitatorische nicht-adrenerge, nicht-cholinerge Mediatoren (eNANC), zu welchen Substanz P, NPY und Neurokinin A (NKA) gehören, und in inhibitorische nicht-adrenerge, nicht-cholinerge Mediatoren (iNANC) eingeteilt, zu welchen unter anderem NO und VIP gehören (Lundberg et al., 1983, 1984; Li und Rand, 1991, Fischer et al., 1998). Die Nervenendigungen, welche NO und VIP freisetzen, haben ihren Ursprung im Ösophagus und gehören zum parasympathischen System. Sie führen vor allem in der Trachea und in den Hauptbronchi zu einer Dilation der glatten Muskulatur (Canning et al., 1996; Fischer et al., 1996; Fischer et al., 1998).

NO wird unter Umwandlung von L-Arginin zu L-Citrullin und NO von drei unterschiedlichen Isoformen des Enzyms NO-Synthetase (NOS) bei Bedarf synthetisiert (Moncada et al. 1989). Es aktiviert direkt die lösliche Form der

Guanylatzyklase (sGC) und führt zu einer NO-induzierten Relaxation der glatten Muskulatur, so zum Beispiel auch der Trachealmuskulatur des Menschen (Tallet et al., 2002).

1.3 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

G-Protein gekoppelte Rezeptoren (G protein-coupled receptors, GPCR) sind an verschiedene intrazelluläre Enzymkaskaden gekoppelt.

Die α -Einheit sogenannter G_q-Proteine aktiviert die β -Isoform der Phospholipase C (PLC), welche an der Spaltung von dem an der Membrannenseite lokalisierten Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) zu Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) beteiligt ist. In manchen Fällen entstehen neben IP₃ Inositol-1,3,4,5-TetraPhosphat (IP₄), Inositol-1,3,4,5,6-PentaPhosphat (IP₅) und Inositol-1,2,3,4,5,6-Hexaphosphat (IP₆), deren Funktion noch nicht verstanden ist (Caulfield et al., 1993).

Dieses IP₃ aktiviert IP₃-Rezeptoren des endoplasmatischen Retikulums (ER) und führt so zur Erhöhung der Konzentration des intrazellulären Kalziums ($[Ca^{2+}]_i$), welcher zusammen mit DAG zu einer Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und so eine Konstriktion der glatten Muskulatur führt. Dieses geschieht einerseits durch die Hemmung der Phosphatase der leichten Kette des Myosins (MLCP) durch die PKC (Peiper et al., 1996), andererseits durch die Aktivierung der Kinase der leichten Kette des Myosins (MLCK) durch die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ und Calmodulin-Aktivierung der Calmodulin-abhängigen Kinase (CaMKII). Calmodulin (CaM) ist ein zytoplasmatisches Protein, welches vier Kalziumionen bindet und dadurch aktiviert wird.

Die α -Einheit sogenannter G_s-Proteine aktiviert die Adenylatzyklase (AC), welche aus Adenosintriphosphat (ATP) zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) herstellt. Dieses wirkt als auf die Proteinkinase A (PKA), welche die Phosphorylierung der leichten Ketten des Myosins inhibiert und so zu einer Relaxation der glatten Muskulatur führt.

Dem gegenüber steht der Effekt der α -Einheit sogenannter G_i-Proteine, welche die AC inhibiert und so zu einer geringeren Aktivierung der PKA führt. Das führt zu einer geringeren Phosphorylierung der MLCK, wodurch eine Konstriktion der glatten Muskulatur hervorgerufen wird.

1.4 Intrazelluläres Kalzium

Die Mobilisierung von zellulären Kalziumionen führt zur Konstriktion der glatten Muskelzellen der Atemwege (airway smooth muscle, ASM). Diese Ionen können sowohl aus internen Speichern als auch von außerhalb der Zelle stammen (Somlyo und Himpens, 1989). In ruhenden Zellen ist die $[Ca^{2+}]_i$ mit ungefähr 200 nM sehr niedrig (Somlyo et al., 1989). Nach Zugabe von Konstriktoren, wie zum Beispiel ACh an ASM, wurde eine biphasische Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ beobachtet, welche einerseits durch Freisetzung aus internen Speichern (schneller Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$) und andererseits durch Einstrom von außerhalb (langsamer Anstieg mit einem Plateau) zustande kommt (Sims, 1996; Murray, 1989). Die Wiederauffüllung der inneren Speicher, z.B. des ER der ASM, erfolgt über sogenannte Kalziumpumpen des sarkoplasmatischen Retikulums (sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase, SERCA), welche durch Thapsigargin, einem Pflanzenextrakt, gehemmt werden können. Dies führt zum Ausbleiben des schnellen Anstiegs $[Ca^{2+}]_i$. Weiterhin spielen sogenannte Ryanodin-Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der kalziumabhängigen Kalziumfreisetzung (Prakash et al., 1997).

Eine weitere Möglichkeit der Freisetzung des Kalziums aus inneren Speichern stellen die IP_3 -Rezeptoren dar, welche durch IP_3 einerseits, andererseits durch zyklische ADP-Ribose (cADPR) oder Nikotinsäureadeninindinukleotidphosphat (NAADP) aktiviert werden können (Mandi et al., 2006, Yusufi et al., 2001).

Der Einstrom von Kalzium kann über verschiedene Kalziumkanäle erfolgen:

Spannungsabhängige Kanäle, sogenannte voltage-operated calcium channel (VOCC), welche sich bei Depolarisation der Zellmembran öffnen, und spannungsunabhängige Kanäle, sogenannte voltage-insensitive calcium channel (VICC), welche in drei Gruppen eingeteilt werden (Fasolato et al., 1994 und Felder et al., 1994):

Rezeptor-abhängige Kalziumkanäle (receptor-operated calcium channels, ROCCs), speicherabhängige Kalziumkanäle (store-operated calcium channels, SOCCs) und schließlich Second-messenger-abhängige Kalziumkanäle (second-messenger-operated calcium channels, SMOCCs). Die SMOCCs können durch intrazelluläres Kalzium, IP_3 und möglicherweise auch IP_4 geöffnet werden (Irvine et al., 1992; Felder et al., 1995).

1.5 Kalzium- und Membranpotenzialmessung mittels Indikatoren

Es gibt verschiedene Indikatoren, welche zur Messung des $[Ca^{2+}]_i$ oder des Membranpotenzials eingesetzt werden können. In dieser Arbeit wurden die folgenden eingesetzt:

Fura-2 Acetoxymethyl-(AM)-Ester wirkt als Kalziumchelator und ist ein fluoreszierender Kalziumindikator, welcher zwei wichtige Eigenschaften besitzt: Er ist in seiner Esterform lipophil und so membrangängig. Nach der Abspaltung des Esterrestes durch Esterasen im Inneren der Zelle wird er kalziumsensitiv und außerdem hydrophil, was die Rückdiffusion aus der Zelle erschwert. Die Fluoreszenzintensität von Fura-2 steigt mit zunehmender Kalziumkonzentration bei einer Anregung mit einer Wellenlänge von 340 nm und sinkt bei einer Wellenlänge von 380 nm, sodass eine Emissionsratio der Fluoreszenzintensität von 340/380 errechnet werden kann. Die Emission des Indikators liegt zwischen 505 nm und 520 nm (Grynkiewicz et al., 1985; Tsien et al., 1989).

Calcium Orange (AM) wirkt ähnlich wie Fura-2 (AM), besitzt jedoch keine zwei Anregungswellenlängen, weswegen keine Emissionsratio errechnet werden kann. Der Kalziumindikator wird bei 549 nm angeregt und hat bei 576 nm seine Emissionswellenlänge. Die Emissionsintensität nimmt bei Bindung eines Kalziumions um das Dreifache zu (Eberhard et al., 1991; Mütze et al., 2012).

Bis-(1,3-Dibutylbarbitursäure)Trimethine Oxonol (DIBAC₄(3)) wird zur Messung des Membranpotenzials der Zellmembran genutzt. Es dringt als ein potenzialsensitiver Stoff in depolarisierte Zellen ein, wo es an intrazelluläre Proteine bindet und so erhöhte Fluoreszenz ausstrahlt. Bei hyperpolarisierten Zellen kommt es zum erhöhten Ausstrom aus der Zelle, wodurch die Fluoreszenzintensität sinkt. Der Indikator für das Membranpotenzial wird bei 490 nm angeregt und die Emission bei 516 nm gemessen (Kwan Hy, 2009).

1.6 Messungen des intrazellulären cAMP-Spiegels mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer

Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) beschreibt ein Phänomen, dass ein Fluorophor (Donor) Energie auf ein anderes Fluorophor (Akzeptor) abgibt (Jares-Erijman und Jovin, 2003). Dieses geschieht am effizientesten, wenn Donor und

Akzeptor weniger als 10 nm von einander entfernt sind (Jares-Erijman und Jovin, 2003). So kann eine Überlappung der Emissionsspektren der Fluorophore berechnet werden und daraus geschlossen werden, wie nah Donor und Akzeptor von einander entfernt sind. Fluorophore können auch fluoreszierende Proteine sein, welche gentechnisch erzeugt, durch Transfektion in Zellen eingebracht und so exprimiert werden können (Griffin et al., 1998). Beispiele fluoreszierender Proteine sind GFP (grünfluoreszierendes Protein; Shimomura et al., 1962), CFP (cyan fluorescent protein; blaufluoreszierendes Protein; Rizzo et al., 2004) und YFP (yellow fluorescent protein; gelbfluoreszierendes Protein; Nagai et al., 2002). In dieser Arbeit wurden dynamische FRET-Experimente durchgeführt, bei denen EPAC (exchange protein directly activated by cAMP; direkt durch cAMP aktivierbares Austauscherprotein) eingesetzt wurde, dessen Gensequenz gentechnologisch mit dem FRET-Donor CFP und dem FRET-Akzeptor YFP versehen war (Nikolaev, 2004). Durch eine Konformationsänderung des Proteins nach Bindung von cAMP verringert sich die Distanz des Donor zum Akzeptor und das FRET-Signal ändert sich. So können Rückschlüsse auf Änderung der cAMP-Konzentration gezogen werden. Eine genauere Beschreibung der Durchführung und Auswertung der FRET-Experimente findet sich im Methodenteil (2.2.9 und 2.2.10).

1.7 Beta Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid

1.7.1 Allgemeines

Beta Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (β -NAD) ist ein endogenes Coenzym und in manchen Stoffwechselprozessen auch Cosubstrat, welches in allen lebenden Zellen vorkommt. Es ist vor allem an Redoxreaktionen der Zellen beteiligt, bei welchen es als oxidierendes Agenz gleichzeitig Elektronen und Protonen von anderen Molekülen aufnimmt und somit reduziert wird. So spielt es eine wichtige Rolle bei der Herstellung des Energieträgers ATP, insbesondere durch Bereitstellung von Elektronen in der Atmungskette innerhalb der Mitochondrien. Außerdem ist es ein Elektronendonator für Glutathion, welches oxidativem Stress in der Zelle entgegenwirkt, und Cosubstrat für β -NAD-abhängige Enzyme wie Mono-ADP-Ribose-Transferasen (MARTs), Poly-ADP-Ribose-Transferasen (PARPs), zyklische ADP-Ribose-Synthasen (cADPrS) und den Sirtuinen. Sirtuine sind Schlüsselenzyme bei der Regulation des Energiestoffwechsels, besonders bei der Fettsäure- β -Oxidation. Ferner beeinflussen sie die Lebenszeit der Zelle (Haigis et al., 2010; Imai et al., 2010; Nakamura et al., 2012).

Die Synthese von β -NAD erfolgt auf zwei Wegen: Einerseits wird es aus den Aminosäuren Tryptophan oder Asparginsäure de novo synthetisiert (Preiss-Handler Pathway). Außerdem kann es aus dem in der Nahrung vorkommenden Vitamin B3 Niacin entstehen (salvage pathway; Belenky et al., 2007; Pollak et al., 2007; Magni et al., 1999). Hier spielt unter anderem Nicotinamid Phosphoribosyltransferase (Nampt) eine wichtige Rolle (Rivollo et al., 2004; Imai et al., 2011). Dieses Enzym ist der limitierende Faktor im salvage pathway der Säugetiere und wird durch Stress und den zirkadianen Transkriptionsfaktor (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput, CLOCK) reguliert (Hsu et al., 2009).

1.7.2 Funktionen des β -NAD

Sogenannte Silent-information-regulator 2 (Sir2) Proteine, auch Sirtuine, sind β -NAD-abhängige Proteindeacetylasen. Sie sind in allen Organismen, vom Bakterium bis hin zum Menschen, sehr konserviert erhalten. In Säugetieren sind 7 Sirtuine bekannt (SIRT1-7), wobei SIRT1 das am besten untersuchte ist (Blander et al., 2004). SIRTs spielen bei vielen Prozessen eine wichtige Rolle (Brian et al., 2004), so zum Beispiel bei dem programmierten Zelltod, der Apoptose (Caballero et al., 2012; Verdin, 2010), oder bei der Alterung des Organismus (Braidy et al., 2012). Außerdem sollen SIRTs einen Schutz vor einigen Erkrankungen bieten. Einige Beispiele dafür sind die Alzheimer Erkrankung, der Diabetes mellitus und die koronare Herzkrankheit (Yamamoto et al., 2011; Turan et al., 2012).

Weitere Enzyme, die β -NAD umwandeln, sind die Glycohydrolasen Cluster of Differentiation-(CD)-38 und CD157 (bone marrow stromal cell antigen 1, BST-1), ADP-Ribosyltransferasen (ARTs) und PARPs. Während PARPs und SIRTs in der Zelle lokalisiert sind, kommen ARTs und CD38 auf der äußeren Zellmembran vor (Malavasi, 2009). CD38 ist ein 45-kDa Typ II-Transmembranprotein und mobilisiert als Ectoenzym Kalzium durch die Hydrolyse von β -NAD zu cADPR oder NAADP.

CD157 ist ein GPI-Anker-Protein mit einer extrazellulären Domäne, welches ähnlich wie das CD38 als β -NAD hydrolisierendes Enzym beschrieben wird (Ortolani et al., 2002). Es reguliert wie CD38 auch die intrazelluläre Kalziumkonzentration, ist mit dem CD11b/CD18-Komplex assoziiert (Lavagno et al., 2007) und ist beteiligt an der Superoxidproduktion sowie an der Regulation der Chemotaxis (Funaro et al., 2004). CD38 ist in seiner Enzymaktivität 100fach effizienter als CD157 (Ortolani et al., 2002).

Das vom CD38 generierte cADPR führt nicht nur zur Freisetzung von Kalziumionen aus dem ER der glatten Muskelzellen der Atemwege, sondern aktiviert auch Transiente-Rezeptorpotenzial-Kanäle vom Subtyp M2 (TRPM2; Kolisek, 2005). Nach in vivo-Versuchen mit CD38-defizienten Mäusen wird angenommen, dass CD38 an der Entstehung der bronchialen Hyperreaktivität beteiligt ist (Guedes und Jude, 2008). Außerdem konnte gezeigt werden, dass CD38 durch Interleukin 13 (IL-13) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) induziert wird (Deshpande et al., 2004) und einen asthmatischen Phänotyp hervorrufen kann (Jude et al., 2012). Neben der enzymatischen Funktion ist CD38 involviert bei der Herstellung von Zell-Zell-Kontakten (Dianzani et al., 1994) und der Initiierung von Transmembran-Kommunikation (Lund et al., 2006; Zubiaur et al., 2002). In der jüngsten Vergangenheit ist CD38 als ein Marker in der Diagnose von Leukämie, HIV und Diabetes mellitus Typ II in den Fokus der Forschung geraten (Morabito et al., 2006; Czura et al., 2006; Savarino, 2000; Ikehata et al., 1998). ARTs katalysieren Reaktionen, durch die eine Änderung an Zielproteinen hervorgerufen wird. Sie sind in Zellen des Immunsystems vorhanden, so in T-Zellen (Koch et al., 1990), B-Zellen (Terashima, 2009), Monozyten (Grahner et al., 2002) und Granulozyten (Donnell et al., 1996). Hier dient β -NAD als Substrat für eine post-translationale Proteinmodifikation, die ADP-Ribosylierung (Okazaki, 1996; Ueda et al., 1985).

Sowohl ARTs als auch CD38 und CD157 sind extrazellulär lokalisiert und können so extrazelluläres β -NAD umsetzen. Unter physiologischen Bedingungen liegt die extrazelluläre Konzentration von β -NAD im submikromolaren Bereich, während die zelluläre Konzentration 1 mM beträgt (Adriouch et al., 2007). Zu höheren extrazellulären Konzentrationen von β -NAD kann es als Konsequenz einer Zellyse im Rahmen von Gewebsverletzungen oder durch Immunreaktionen kommen (Donnelly et al., 1996). Außerdem wird vermutet, dass aus Connexin 43 aufgebaute Hemikanäle nach mechanischem Stress oder elektrischer Stimulation der Zellen β -NAD freisetzen (Bruzzone et al., 2001; Romanello et al., 2002; Smyth et al., 2004).

β -NAD und seine durch die oben beschriebenen Enzyme entstandenen Metabolite cADPR und NAADP wirken auf verschiedene Rezeptoren. So aktivieren cADPR und NAADP Ryanodin-Rezeptoren des ER. Außerdem werden intrazelluläre Anteile der TRPM2-Kanäle durch diese Metaboliten aktiviert. Dieser Kanal wird vor allem im Gehirn, der Milz und der Lunge und auch auf Zellen des Immunsystems exprimiert

(Heiner et al., 2003 und Kraft et al., 2004). Die genaue Funktion dieses Rezeptors ist noch nicht vollkommen geklärt.

Ferner wird beschrieben, dass die durch ARTs vermittelte ADP-Ribosylierung purinerge P2X7-Rezeptoren aktiviert (Seman et al., 2003; Adriouch et al., 2008). Auch das β -NAD selber ist in der Lage, Kalzium durch Aktivierung verschiedener Rezeptoren zu mobilisieren (Ishii et al., 2006; Klein et al., 2009; Mutafova-Yambolieva, 2007; Moreschi et al., 2006). Folgende Rezeptoren wurden als Bindungsstelle des β -NAD beschrieben:

P1-Adenosindiphosphat-(ADP)-Rezeptoren (Bortell et al., 2001) und P2-Adenosintriphosphat-(ATP)-Rezeptoren (Mutafova-Yambolieva et al., 2007; Moreschi et al., 2006). Als erste wurden ionotrope P2X-Rezeptoren, genauer P2X1, P2X2 und P2X7, in diesem Zusammenhang ermittelt, da nach Behandlung mit β -NAD ein Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in humanen Monozyten hervorgerufen werden konnte (Gerth et al., 2004). Später gerieten P2Y-Rezeptoren in den Fokus, welche zu den GPCRs gehören. Besondere Bedeutung wurde dem P2Y11-Rezeptor zugesprochen, da dieser sowohl an ein G_q -Protein als auch an ein G_s -Protein gekoppelt ist. So konnte die Erhöhung des $[Ca^{2+}]_i$ durch die Aktivierung der PLC und nachfolgend der IP_3R , also G_q -Protein-abhängig einerseits (Ishii et al., 2006) und G_s -Protein-abhängig andererseits (Moreschi et al., 2006) erklärt werden. Besonders Mutafova-Yambolieva und ihre Arbeitsgruppe hatte 2007 den Nachweis erbracht, dass β -NAD nach elektrischer Stimulation der Nerven am glatten Muskel des menschlichen Gastrointestinaltraktes freigesetzt wird und hemmende Potenziale bewirkt (Mutafova-Yambolieva et al., 2007). Diese führen zu einer Relaxation oder einer Aufhebung der Kontraktion der Darmmuskulatur. Ferner konnte gezeigt werden, dass β -NAD in der Lunge der Maus als antiinflammatorischer Mediator agiert und die Wirkung des von Bakterien freigesetzten Lipopolysaccharids (LPS) herabsenkt. Dadurch und durch die Erhöhung der Zellintegrität nach Zugabe von β -NAD konnte insbesondere der akuten Lungenschädigung (acute lung injury, ALI) entgegengewirkt werden (Umapathy et al., 2010; Umapathy et al., 2012). Durch die dargestellten Zusammenhänge wird extrazelluläres β -NAD als ein möglicher neuer Neurotransmitter diskutiert (Mutafova-Yambolieva et al., 2007).

1.8 Bronchokonstriktion

Die Bronchokonstriktion oder die generelle Obstruktion der Atemwege hat eine große Bedeutung bei Erkrankungen des Menschen. Die wichtigsten Beispiele obstruktiver Atemwegserkrankungen stellen das Asthma bronchiale und die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (Chronic obstructive lung disease; COPD) dar. Im Folgenden soll die Bronchokonstriktion am Beispiel von Asthma bronchiale und der COPD näher erläutert werden.

1.8.1 Entstehungsmodelle des Asthma bronchiale

Asthma bronchiale gehört zu den chronisch entzündlichen Atemwegserkrankungen und ist unter anderem durch eine bronchiale Hyperreaktivität (airway hyperreactivity, AHR) und anfallartigen Husten mit teilweise vorkommendem Auswurf von zähem Schleim charakterisiert (Lemanske und Busse, 2010).

Die genaue Genese ist nicht vollständig geklärt, es wird jedoch von einigen Autoren angenommen, dass Asthma bronchiale vorzugsweise im Kindesalter entsteht. Als Auslösefaktor werden unter anderem nicht ausgeheilte Bronchitiden angenommen. Zu den Kennzeichen des Asthma bronchiale werden Luftnot, Husten und Schwäche ohne Vorliegen einer Erkältung gezählt, wobei besonders lang andauernde Hustenanfälle in der Nacht oder bei nur geringer Belastung gehäuft auftreten (Hofmann et al., 1983; Hoffmann, 1997; Reinhardt et al., 1995; WHO, 2012).

Eine Entzündungsreaktion der Bronchialschleimhaut spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Asthma. Hierbei spielen allergen-spezifische Typ 2-T-Helferzellen (T_H2 -Lymphozyten), welche sich in den Lungen der meisten Asthma-Patienten befinden, besonders bei den Patienten mit allergischem Asthma eine wichtige Rolle (Robinson et al., 1992). Diese produzieren verschiedene Zytokine, wobei IL-4 die Synthese von Immunglobulin E (IgE), IL-5 das Rekrutieren von Eosinophilen, IL-9 das Rekrutieren und das Wachstum von Mastzellen und IL-13 bronchiale Hyperreaktivität hervorruft (Holgate et al., 2008). Das Rekrutieren der Basophilen, Eosinophilen und Mastzellen führt wiederum zu einer erhöhten Aktivierung der T_H2 -Zellen. Ferner exprimieren basophile Granulozyten hochaffine IgE-Rezeptoren, welche nach Aktivierung zu einer Freisetzung von Histamin und IL-4 führen.

Nach Aktivierung von Eosinophilen setzen diese verschiedene inflammatorische Zytokine frei, darunter Interferon γ sowie IL-2 (wichtige T_H1-Zell-Aktivatoren) und IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 und TNF- α .

Mastzellen schließlich sind den Basophilen ähnlich und setzen nach Aktivierung durch IgE Histamin, sowie IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-16, TNF- α und transforming growth factor- β (TGF- β) frei (Barrett et al., 2009).

Besonders Histamin, aber auch die anderen Mediatoren führen zu einer bronchialen Obstruktion durch Bronchospasmus und zu einer Schleimhautschwellung durch eine entzündliche Infiltration. Die hinzukommende erhöhte Schleimbildung führt zu einer Verlegung der Atemwege und zu dem Gefühl der akuten Atemnot.

Ursachen der erhöhten Produktion von IgE bei Asthmatikern können eine erhöhte Neigung zur Entwicklung multipler Allergien durch eine genetische Disposition sein und häufiger Kontakt mit allergieauslösenden Stoffen wie Pollen, Tierhaaren, Nahrungsmitteln, Hausstaubmilben oder Chemikalien in Möbeln und Teppichen. Andere Triggerfaktoren des Asthmaanfalls können unspezifische Auslöser wie beispielsweise verschiedene Medikamente, Kälte, Anstrengung, Staub, starke Gerüche, Reizstoffe oder auch Erschütterung, vor allem aber Zigarettenrauch sein. Das macht diese Volkserkrankung, an welcher weltweit ungefähr 300 Millionen Menschen erkrankt sind, zu einem multifaktoriellen Geschehen, bei welchem mehrere Risikofaktoren als Ursache gesehen werden (WHO, 2012). Asthma wird ferner in drei Formen unterteilt: allergisch, nicht allergisch und intrinsisch. Bei manchen Patienten können diese Formen auch alle gleichzeitig vorkommen.

Auch Hyperplasie und Hypertrophie der glatten Muskulatur wird als Kennzeichen von Asthma gesehen (Ebina et al., 1993). Es kommt zu einem Remodelling des Muskels durch Erhöhung der Masse und dadurch zu einem Verengen der Atemwege, hervorgerufen vor allem durch TGF- β , epidermal growth factor (EGF) und platelet-derived growth factor (PDGF, Walker et al., 1998; Stewart et al., 1994)

1.8.2 Therapie des Asthma bronchiale

Asthma hat eine sehr komplexe Ätiologie und es gibt heute keine spezifische, kurative Therapie. Es gibt jedoch präventive Maßnahmen auch in akuten Episoden des Asthmaanfalls. So hat die Deutsche Atemwegsliga ein Behandlungskonzept in vier Stufen entwickelt (Nationale Versorgungsleitlinie Asthma, 2011), bei welchem die

Asthmatherapie abhängig von der Schwere der Erkrankung behandelt wird. Hauptsächlich beinhaltet sie eine anti-inflammatorische Komponente durch Kortikosteroide und eine bronchorelaxierende Komponente durch kurz- oder langwirksame β -Adrenozeptoragonisten (Fanta et al., 2009).

Ein Anteil an Asthmatikern (~10 %) reagiert nicht auf die Kortikosteroidtherapie (Schwartz et al., 1968; Adcock et al., 2008), so wurden erfolgreich neuere Aspekte in der Asthmatherapie betrachtet. Zum Beispiel wurden Anti-IgE-Antikörper wie das Omalizumab entwickelt, welche an die Domäne des IgE binden, welche den hochaffinen IgE-Rezeptor der Mast- und basophilen Zellen aktivieren. Dadurch kann die Degranulierung der Zellen verhindert werden (Milgrom et al., 1999).

Weiterhin wurden Leukotrien-Rezeptor-Antagonisten (LTRA), wie das Montelukast, entwickelt, welches Leukotriene C₄, D₄ und E₄ an der Aktivierung des Cystein-Leukotrien-Rezeptors hemmt (Drazen et al., 1999; Lazarus et al., 2007).

Als weitere therapeutische Ansätze wurden erprobt ein löslicher IL-4-Rezeptor (Borish, 1999), Suplatast-Tosilat als Inhibitor der Produktion von IL-4 und IL-5 der T_H2-Zellen (Tamaoki, 2000)), Etanercept oder Infliximab, welche die Aktion des TNF- α inhibieren und so die AHR im asthmatischen Phänotyp herabsetzen (Erin, 2006; Howarth, 2005; Berry, 2006) sowie Roflumilast als ein Phosphodiesterase (PDE4)-Inhibitor, welcher das immunsuppressive cAMP erhöht (Bousquet, 2006).

1.8.3 Entstehungsmodelle der COPD

COPD ist eine chronisch obstruktive Lungenerkrankung, die sich im fortgeschrittenen Stadium zu einer Systemerkrankung erweitern kann und im Gegensatz zu Asthma bronchiale durch eine nicht komplett reversible Atemwegsobstruktion, vor allem durch den Bronchialschleim und durch Krampfzustände der Bronchialmuskulatur, gekennzeichnet wird. Die chronisch obstruktive Bronchitis und das Lungenemphysem werden mit in die COPD eingeschlossen.

Weltweit sind ungefähr 600 Mio Menschen an COPD erkrankt, dabei stellt diese Erkrankung die vierthäufigste Todesursache dar (WHO, 2014). Leitsymptome bei dieser Krankheit sind Husten, Auswurf und Atemnot, dieses insbesondere bei Belastung. Bei anhaltender chronischer obstruktiver Bronchitis kann es zur Schädigung der Alveolen und schlussendlich zu einem Lungenemphysem kommen (Clark et al., 2000). COPD entsteht durch sowohl endogene als auch exogene Risikofaktoren (Wirtz et al., 2005).

Die Hauptursache der COPD ist das Tabakrauchen. Außerdem sind Luftverschmutzung oder eine berufliche Exposition durch Stäube, ein niedriger sozioökonomischer Status, hyperreagible Atemwege und ein alpha1-Antitrypsin-Mangel (Biedermann und Köhnlein, 2006; American Thoracic Society, 1995) wichtige Risikofaktoren. Durch diese Risikofaktoren kommt es zu gestörten Schutzmechanismen gegenüber inhalativen Noxen. Histologisch ist die Lunge geprägt von Entzündungszellen. Sowohl die Schleimdrüsen als auch epitheliale Becherzellen und die Atemwegsmuskulatur sind hypertrophiert und sowohl die Becherzellen als auch Fibroblasten weisen eine Hyperplasie auf. Ferner sind zugrunde gegangenen Zilien zu erkennen und ein verdicktes Plattenepithel. Der Entzündungsprozess entsteht durch ein Ungleichgewicht der proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokine (Dentener et al., 2001). So kommt es bei COPD-Patienten zu einer Erhöhung von Entzündungsmarkern wie dem C-reaktiven Protein (CRP), dem Fibronektin, TNF- α , IL-6 und IL-8 (DeGodoy et al., 1996; Di Francia et al., 1994; Schols et al., 1996; Yende et al., 2006).

Diese Entzündungsreaktion führt zu systemischen Erkrankungen wie Kachexie, Depression, Osteoporose und auch zu einer deutlich erhöhten kardiovaskulären Morbidität mit Komplikationen wie Schlaganfall oder koronarer Herzerkrankung (Danesh et al., 1998; Di Napoli et al., 2001; Pradhan et al., 2002; Sin et al., 2003).

1.8.4 Therapie der COPD

Das Therapiekonzept der COPD richtet sich nach dem Schweregrad der Erkrankung, welcher sich wiederum durch die Lungenfunktion und Beschwerden (Husten, Auswurf, Atemnot) in fünf Schweregrade (0-V) einteilen lässt. Diese Einteilung wurde von der Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) veröffentlicht und entspricht den aktuellen Richtlinien der Deutschen Atemwegsliga aus dem Jahr 2007 (Rabe et al., 2007). Besonders sogenannte Exazerbationen stellen bei der COPD einen wichtigen krankheitsverschlimmernden Faktor dar. Eine Exazerbation ist eine akute Verschlechterung der Erkrankung, welche sich in einer Zunahme von Atemnot, Husten, Auswurf, Obstruktion und einer thorakalen Beklemmung äußert und eine Änderung der Behandlung erforderlich macht. Sie tritt besonders in Stadien II und III der COPD auf und wird meist von kalten Temperaturen getriggert (Seemungal et al., 1998). Die Therapie besteht aus einem nicht-medikamentösen und einem medikamentösen Teil. Es sollen zuerst das Rauchen aufgeben und Risikofaktoren (s.o.) vermieden werden.

Medikamentös besteht die Therapie aus kurzwirksamen und langwirksamen Bronchodilatoren, Antimuskarinika und inhalativen Steroiden. Weiterhin kann systemischen Symptomen entgegengewirkt werden, zum Beispiel durch eine Ernährungstherapie zur Vermeidung der Kachexie und Lungensport (Hui et al., 2003; Miyahara et al., 2000).

1.8.5 Schwächen der Therapie von obstruktiven Lungenerkrankungen

Die Variation an unterschiedlichen Therapeutika zeigt, dass Asthma und COPD noch immer nicht vollständig behandelbar sind und dass auch heute noch nach verbesserten Therapiemöglichkeiten gesucht wird. Weiterhin kommt es besonders bei β -Adrenozeptoragonisten wie dem Salbutamol häufig zur sogenannten Tachyphylaxie, d.h. einer schnellen Toleranzentwicklung gegenüber dem Medikament nach längerer Einnahme (Barnes, 1995). Außerdem wird vermutet, dass ungefähr 20 % der Patienten auf gängige Medikamente der Therapie nicht reagieren (Pearce, 2009). Diese Schwächen der Therapie machen es dringend notwendig, neue Therapeutika zu entwickeln.

1.9 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit soll das β -NAD in seiner Wirkung auf die glatte Muskulatur der Atemwege betrachtet werden. Es wurde in Organbadversuchen der Effekt des β -NAD auf die Trachealmuskulatur der Maus sowie auf die Bronchioli des Menschen betrachtet. Ferner wurde dieser Effekt in videomorphometrischen Experimenten an vitalen Lungenschnitten der Maus untersucht. Zur Klärung der zugrunde liegenden Mechanismen wurden Veränderungen der Konzentration des $[Ca^{2+}]_i$, des intrazellulären cAMP-Spiegels und des Membranpotenzials in glatten Muskelzellen der Atemwege sowohl der Maus als auch des Menschen gemessen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tiere

Die Untersuchungen wurden an spezifiziert pathogenfreien Mäusen der Zuchtlinie C57Bl6N unterschiedlichen Geschlechts im Alter von 8-20 Wochen mit einem Gewicht zwischen 20 und 35 g durchgeführt, die im zentralen Tierlabor der Justus-Liebig-Universität Gießen gehalten wurden. Die Tiere wurden in Makrolonkäfigen unter Standardbedingungen (Wasser- und Futtersversorgung ad libitum und 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus) gehalten. Die Versuche wurden von den örtlichen Behörden genehmigt (Regierungspräsidium Giessen, Deutschland; #A5/2010, #A61/2012).

2.1.2 Chemikalien/Pharmaka

Pharmakon	Firma	Funktion	Ziel	Gelöst in	Endkonzentration
Beta-Nikotin-adenindinukleotid (β-NAD)	Sigma Aldrich			Ampuwa®	100 μM – 5 mM
Muskarin	Sigma Aldrich	Agonist	muskarinische Rezeptoren	Ampuwa®	1 – 10 μM
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma Aldrich	Agonist	purinerge Rezeptoren	Ampuwa®	100 μM
Salbutamol	Santa Cruz	Agonist	β2- Adrenozeptoren	Ampuwa®	100 μM
Isoproterenol	Santa Cruz	Agonist	β2- Adrenozeptoren	Ampuwa®	10 μM
U 73122	Tocris	Inhibitor	PLC	DMSO	10 μM

Pharmakon	Firma	Funktion	Ziel	Gelöst in	Endkonzentration
Suramin	Sigma Aldrich	Genereller Antagonist	purinerge Rezeptoren	Ampuwa®	100 µM
4-[(E)-{4-formyl-5-hydroxy-6-methyl-3-[(phosphonooxy)methyl]pyridin-2-yl}diazanyl]benzene-1,3-disulfonic acid (PPADS)	Santa Cruz	Genereller Antagonist	purinerge Rezeptoren	Ampuwa®	10 µM
MRS 2179	Santa Cruz	Antagonist	P2Y1-Rezeptoren	Ampuwa®	10 µM
Flufenaminsäure	Santa Cruz	Antagonist	TRPM2-Kanäle	Ethanol	100 µM
8-Bromo-cADP-Ribose (8-Br-cADPr)	Santa Cruz	Antagonist	cADPr	Ampuwa®	10 µM
L-N ^G -Nitroarginine methylester (L-NAME)	Santa Cruz	Inhibitor	Neuronale, endotheliale und induzierbare NO- Synthase	Ampuwa®	100 µM
Choleratoxin von Vibrio Cholerae (CTX)	Santa Cruz	Inhibitor	Gs-Protein	Ampuwa®	2 ng/ml
Iberiotoxin	Santa Cruz	Inhibitor	Kalzium abhängige Kaliumkanäle (BK- Kanäle)	Ampuwa®	10 nM
Pertussistoxin von Bordetella Pertussis (PTX)	Sigma Aldrich	Inhibitor	Gi-Protein	Ampuwa®	5 ng/ml

Pharmakon	Firma	Funktion	Ziel	Gelöst in	Endkonzentration
KH7	Sigma Aldrich	Inhibitor	Lösliche Adenylatzyklase	DMSO	30 µM
Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA)	Merck	Komplexbildner	Kalzium	Ampuwa®	100 mM
Apamin	Santa Cruz	Inhibitor	Kalzium- abhängige Kaliumkanäle (SK- Kanäle)	Ampuwa®	10 µM
1-(5-Iodonaphthalen-1- sulfonyl)-1H-hexahydro-1,4- diazepine hydrochlorid (ML-7)	Santa Cruz	Inhibitor	Myosin- leichtketten- Kinase	Dimethyl- sulfoxid (DMSO)	10 µM
A-7 Hydrochlorid	Santa Cruz	Antagonist	Calmodulin	DMSO	10 µM
Rp-cAMPs	Santa Cruz	Inhibitor	Proteinkinase A	Ampuwa®	100 µM
Rolipram	Santa Cruz	Inhibitor	PDE-4	DMSO	100 µM
γ-27632 Dihydrochlorid	Santa Cruz	Inhibitor	ROCK	Ampuwa®	10 µM
8(p-Sulfophenyl)theophylline (8-SP-T)	Santa Cruz	Antagonist	Adenosinrezeptor	DMSO	10 µM
U-46619	Santa Cruz	Analgon	Thromboxan	DMSO	1 µM
FPL 64176	Santa Cruz	Agonist	Non- dihydropyridin- Ca ²⁺ -Kanäle	Ampuwa®	10 µM

Pharmakon	Firma	Funktion	Ziel	Gelöst in	Endkonzentration
Mecamylamin	Sigma Aldrich	Antagonist	nicotinische Acetylcholin- Rezeptoren	Ampuwa®	10 µM

Tab. 2.1 Liste der verwendeten Pharmaka

2.1.3 Primäre Antikörper

Antigen	Wirt	Verdünnung	Code/Klon	Firma
CD38 (H-170)	Kaninchen, polyklonal	1:200	sc-15382	Santa Cruz
α-Smooth muscle actin	Maus, monoklonal, FITC-konjugiert	1:1000	1A4	Sigma Aldrich
TRPM-2	Ziege, polyklonal	1:100	sc-19198	Santa Cruz

Tab. 2.2 Liste der verwendeten Primärantikörper

2.1.4 Sekundäre Antikörper

Antigen	Wirt	Konjugat	Verdünnung	Firma
Ratten-IgG	Esel	Cy3	1:1000	Dianova
Ziegen-IgG	Esel	Cy3	1:800	Chemicon

Tab. 2.3 Liste der verwendeten Sekundärantikörper

2.1.5 Primer

Die qualitative Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) wurde mittels intronspannender Oligonukleotide durchgeführt, welche von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert wurden.

Gen	Sequenz (5'→3')	Basenpaarlänge (bp)	Gendatenbanknummer
cd38	Fwd: ctgggctacattgctgatga rev gactccacacttccaaagg	234	NM_007646
trpm2	Fwd: tgaccgtgccacacatcaag rev tgtgtctcaaactcgtctgcc	285	NM_138301
β2-Mikroglobulin	fwd: attcaccctcactgagactg rev: gctatttcttctgcgtgcat	192	NM_009735

Tab. 2.4 Liste der verwendeten Oligonukleotide für qualitative RT-PCR

Fwd = forward: Sequenzabfolge des Vorwärtsstranges

Rev = reverse: Sequenzabfolge des Rückwärtsstranges

2.1.6 Lösungen

Aqua ad injectabilia (Ampuwa® (B. Braun, Melsungen, Deutschland)).

Wasser zum Aliquotieren der Substanzen

HEPES-Ringer Puffer

KCl 5,6 mM, NaCl 136,4 mM, MgCl₂*6H₂O 1 mM, CaCl₂*2H₂O 2,2 mM, Glucose 11 mM, HEPES 10 mM; alle Reagenzien von Sigma-Aldrich; eingestellt auf pH 7,4 mit 1 M NaOH (Merck)

Physiological salt solution (PSS)-Lösung

NaCl 120 mM, KCl 5 mM, CaCl 2 mM, MgSO₄ 1mM, HEPES 10 mM, Glucose 10 mM; alle Reagenzien von Sigma-Aldrich; eingestellt auf pH 7,4 mit 1 M NaOH (Merck)

Phosphate buffered saline (PBS)

NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Gesamt-Phosphat 12 mM (NaCl 8 g, KCl 0,2 g, Na₂HPO₄ 1,42 g, KH₂PO₄ 0,27 g auf einen Liter destilliertes H₂O); alle Reagenzien von Sigma-Aldrich; eingestellt auf pH 7,4 mit 1 M NaOH (Merck)

Paraformaldehyd (PFA) 4 % in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,2-7,4

40 g Paraformaldehyd auf 500 ml destilliertes H₂O wurden langsam auf 70°C erhitzt. Dann mit einigen Tropfen 2 M NaOH zu einer klaren Lösung gebracht. Nach Erkalten wurden 500 ml 0,2 M PP dazugegeben und der pH auf 7,4 eingestellt. Alle Reagenzien von Merck.

Histoblocklösung

Schweineserum (10 %), Rinderserum (BSA) (0,1 %) und Tween 20 (0,5 %; alle von Merck) wurden in PBS werden gelöst.

Gepuffertes Glycerol

Glycerol und Puffer (50 ml 0,5 M Natriumhydrogencarbonatlösung, mit 0,5 M Dinatriumcarbonat auf pH 8,6 eingestellt; alle Reagenzien von Sigma Aldrich) werden im Verhältnis 2:1 gemischt.

2.2 Methoden

2.2.1 Tötung der Maus und Gewebeentnahme

Für die PCR-, Organbad- und immunohistochemischen Experimente sowie für die Messungen des intrazellulären Kalziums in isolierten beziehungsweise kultivierten Zellen erfolgte die Tötung der Maus durch Inhalation einer Überdosis des Narkosemittels Isofluran (Baxter Deutschland GmbH, München, Deutschland). Daraufhin wurde das Fell der Maus längst aufgeschnitten, die Brust- und Bauchhöhle eröffnet und die Bauchaorta durchtrennt, um das Ausbluten der Maus zu gewährleisten. Es wurden dann die Trachea, die Lunge, die Milz und der Thymus entnommen.

2.2.2 Immunhistochemische Untersuchungen zur Lokalisation von CD38 und TRPM2 in der glatten Muskulatur

Nach Entnahme der Milz, der Trachea und der Lunge wurden diese jeweils in Tissue-Tek® O.C.T.™ (Sakura, Zoeterwoude, Holland) eingebettet, mit Filterpapier bedeckt, im schmelzenden Isopentan (Fluka, Sigma, Taufkirchen, Deutschland) auf Stickstoff schockgefroren und bis zum Gebrauch bei -80° C gelagert.

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden von dem Gewebe 10 µm dicke Schnitte mit einem Kryostaten (Leica CM 1900, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland) bei -20° C angefertigt, die auf speziell mit einer Adhäsionslösung beschichteten Objektträgern (SuperFrost Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen wurden. Nach einstündiger Trocknung bei Raumtemperatur wurden die unspezifischen Proteinbindungsstellen für eine Stunde durch die Histoblocklösung abgedeckt. Nun wurden die Schnitte mit den primären Antikörpern in entsprechender Verdünnung für eine Nacht bei Raumtemperatur inkubiert (siehe Tab. 2.2). Am nächsten Tag wurden die Schnitte 3x10 min in PBS gewaschen und mit den sekundären Antikörpern für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert (siehe Tab. 2.3). Nach weiteren 3x10 min Waschen in PBS wurden die Objektträger für zehn Minuten in 4 % PFA-Lösung getaucht, um so die Bindungen zwischen primären und sekundären Antikörpern zu fixieren. Abschließend wurden die Objektträger nochmals für zehn Minuten gewaschen, mit karbonatgepuffertem Glycerol

(pH 8,6) eingedeckelt und bei 4° C bis zur Ansicht unter dem Fluoreszenzmikroskop mit passenden Filtern (Axioplan 2, Zeiss, Jena, Deutschland) gelagert.

2.2.3 RT-PCR

Nach Tötung der Maus wurden der Thymus, die Trachea sowie die Lunge sorgfältig heraus präpariert und in Lysispuffer (RLT-Puffer, Qiagen, Hilden, Deutschland) mit 1 % β -Mercaptoethanol (Invitrogen) überführt. Anschließend wurde das Gewebe durch eine Kugelmühle (MM 300, Retsch, Haan) 3 min lang bei 30 bps (Schüttelschritte pro Sekunde) zerkleinert. Die RNA der Zellen wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers isoliert und fotometrisch bestimmt, um sie auf 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ mit Ampuwa[®] zu verdünnen.

Um genomische DNA zu zerstören, wurde ein DNase-Verdau durchgeführt. Hierzu wurde 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ der isolierten RNA mit 1 μl DNase-I (1 U/ μl , Invitrogen), 1 μl 10x DNase I Reaction Buffer (Invitrogen) und 8 μl Ampuwa[®] für 15 min bei 25° C inkubiert und anschließend 1 μl Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA; 25 mM, pH 8,0, Invitrogen) zugegeben, um die DNase für 10 min bei 65° C zu inaktivieren.

Die mRNA wurde nun in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde der Ansatz mit 1 μl Oligo-dTS (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, Eurofins MWG Operon) versetzt und für 10 min bei 65° C inkubiert. Nach fünfminütigem Kühlen auf Eis wurden 4 μl 5x First Strand Buffer (Qiagen) hinzugegeben, sowie 1 μl dNTP-Mix (10 mM, Qiagen) und 2 μl Dithiothreitol (DTT, 0,1 M; Invitrogen). Dieses Gemisch wurde für 2 min auf 42° C erhitzt, anschließend 1 μl Superscript II Reverse Transkriptase (200 U/ μl , Qiagen) zugegeben und für 50 min bei 42° C inkubiert. Um die reverse Transkriptase zu inaktivieren, wurde der Ansatz zum Schluss für 10 min bei 72° C erhitzt und bis zur weiteren Behandlung bei -20°C gelagert.

Zum Herstellen der gesuchten DNA-Fragmente wurde jeweils 1 μl cDNA mit 0,5 μl eines intronspannenden Forward- und Reverseprimerpaars gemischt (siehe Tab 2.4). Weiterhin kamen noch 0,5 μl 10x PCR Buffer II, 2 μl MgCl_2 , 0,5 μl dNTPs (10 mM), 0,1 μl AmpliTaq (5 U/ μl , alle verwendeten Reagenzien von Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) und 17,9 μl H_2O in einem 200 μl Reaktionsgefäß hinzu. Die Amplifikation erfolgte in einem Thermocycler (Eppendorf Mastercycler Personal, Hamburg) mit folgendem Protokoll: Zuerst wurde die Doppelstrang-DNA durch Erhitzen

auf 95°C für 12 min geschmolzen und das Enzym AmpliTaq Gold Polymerase aktiviert. Dann wurden 40 Zyklen mit dem folgenden Ablauf und den folgenden Temperaturen durchlaufen: 30 s bei 95°C zum Schmelzen der Doppelstrang-DNA, 30 s bei 58-61° C (für jedes Primerpaar spezifische Anlagerungstemperatur), 30 s bei 72° C zur Synthese neuer DNA-Fragmente. Nach Beenden der Zyklen wurde die Temperatur für 7 min auf 72° C gehalten, um die noch nicht abgeschlossene Synthese von DNA-Fragmenten zu vollenden. Die Größe der PCR-Produkte wurde durch Elektrophorese in einem 2 % TRIS-Azetat-EDTA-Agarose-Gel (20 g/l Agarose (Genagarose L.E.; iNNO-TRAIN Diagnostik GmbH, Kronberg, Deutschland), 482 g/l TRIS (USB, Cleveland, USA), 104,2 ml/l Eisessig (Merck, Darmstadt, Deutschland), 200 ml/l 0,5 M EDTA (Invitrogen), ad 1 l H₂O), pH 8,0 mit einem Zusatz von 8 µl/l Ethidiumbromid (1 %; Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) überprüft. Fünfundzwanzig µl der PCR-Produkte wurden mit 5 µl Ladepuffer (0,1 g Orange G dye; (Sigma), 5,88 ml 87 %iges Glycerol (Sigma), 250 µl TRIS-HCL-Puffer (pH 8,0), 1 ml EDTA-Lösung (pH 8,0; Sigma), ad 10 ml H₂O) gemischt und in das Gel aufgetragen. Die PCR-Produkte wurden durch eine horizontale Elektrophorese in einer Peqlab Kammer, Modell 40-1410 (Peqlab, Erlangen) aufgetrennt. Als Marker wurde 10 µl 100 bp DNA Ladder (Invitrogen) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte mit einer Spannung von 150 V über 45 min. Die PCR-Fragmente wurden im Gel unter UV-Licht (Renner, Darmstadt) detektiert. Zur Kontrolle wurde einerseits Wasser statt cDNA zugegeben, um Verunreinigung der o.g. AmpliTaq-Lösung auszuschließen, andererseits wurde die Reaktion ohne Zugabe von der reversen Transkriptase durchgeführt. Um den Erfolg der RNA-Isolierung und cDNA-Synthese nachzuprüfen, wurden Reaktionen mit einem Primerpaar für β₂-Mikroglobulin durchgeführt.

2.2.4 Organbadversuche und elektrische Feldstimulation an der isolierten Trachea der Maus

Nach Tötung und Ausbluten der Maus wurde die Trachea herauspräpariert. Da sich die Wandverhältnisse durch den geringen Knorpelanteil für die Untersuchungen der Kontraktilität der Atemwege hier am besten eignet, wurde der Tracheenabschnitt zwischen der fünften und zehnten Knorpelspange entnommen und in MEM (minimal essential medium) mit 100 U/ml Penicillin und 100 g/ml Streptomycin überführt. Das Organbad (Radnoti LLC, Monrovia, USA) bestand aus einem 15 ml fassenden

doppelwandigem Glaszylinder, in dessen innerer Kammer die Trachea an Häkchen aufgespannt wurde. Die Temperatur wurde konstant auf 37° C gehalten, indem die äußere Kammer ständig mit 37° warmem Wasser durchspült wurde. Die innere Kammer wurde durch Durchsprudeln mit 21 % O₂/79 % N₂ oxygeniert (Abb. 2.1). Die durch das Innere der Luftröhre gezogenen Häkchen waren an Kraftaufnehmer (PowerLAB 8/30; ADInstruments, Bella Vista, Australien) gekoppelt, wodurch die Kontraktionskraft gemessen, aufgezeichnet und ausgewertet werden konnte (Labchart, ADInstruments, Bella Vista, Australien). Optional konnten elektrische Platten an beiden Seiten der Trachea angebracht werden. Diese wurden an eine Spannung (10 Hertz (Hz), 10 Volt (V), 2 Millisekunden (ms)) angeschlossen wodurch gewährleistet werden konnte, dass Strom von einer zur anderen Platte floss und die dazwischen liegende Trachea durch dieses elektrische Stromfeld stimuliert wurde (elektrische Feldstimulation = EFS). Dies führt zu einer Erregung der Nervenfasern mit nachfolgender Transmitterfreisetzung.

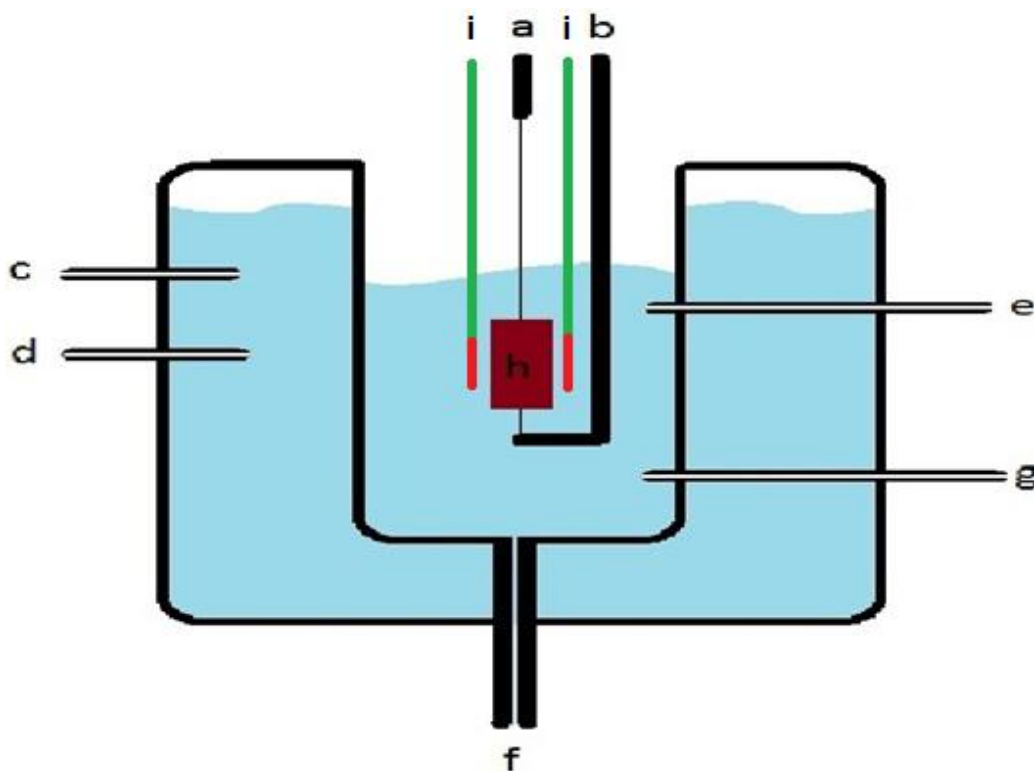


Abb. 2.1 Schematischer Aufbau eines Glaszylinders für die Organbadversuche

Die Trachea (h) ist an einem Kraftmesser (a) und einem Haken (b) befestigt und kann durch das Medium gespült werden (e und f), welches mit dem Gasgemisch (g) durchsprudelt wird. Die äußere Kammer wird durch 37° C warmes Wasser durchspült (c und d). Für EFS-Versuche wurden zwei Platten neben der Trachea platziert (i).

Nach dem Aufhängen der Luftröhrenabschnitte wurde einige Minuten unter normalen Bedingungen (nicht stimuliert) der Basiswert der Trachealwandspannung ermittelt. Hierbei befindet sich die Luftröhrenmuskulatur in einem entspannten Zustand.

Zuerst wurde 5 mM β -NAD auf die unbehandelten Trachealspangen gegeben, um zu ermitteln, ob β -NAD einen Einfluss auf eine nicht vorkontrahierte glatte Muskulatur hat. Anschließend wurde durch Zugabe von 10 μ M Muskarin die Intaktheit und Kontraktionsfähigkeit der Trachealspangen gezeigt (Abb. 2.2).



Abb. 2.2 Versuchsaufbau zur Prüfung des Einflusses von β -NAD auf nicht vorkontrahierte glatte Muskulatur der Trachealspangen der Maus

In allen weiteren Versuchen wurden die Trachealsegmente nach Versuchsstart durch 10 μ M Muskarin zur Kontraktion gebracht und zunächst mit β -NAD in verschiedenen Konzentrationen behandelt (Abb. 2.3).

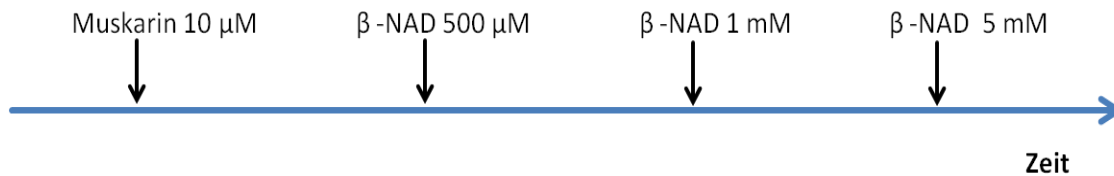


Abb. 2.3 Versuchsaufbau zur Feststellung der Dosis-Wirkungsbeziehung von β -NAD auf vorkontrahierte glatte Muskulatur der Trachealspangen der Maus

Daraufhin wurde versucht, die durch das β -NAD entstehende Dilatation mittels verschiedener Substanzen zu verhindern, um herausfinden zu können, durch welchen Signalweg die Dilatation vermittelt wird (Abb. 2.4).

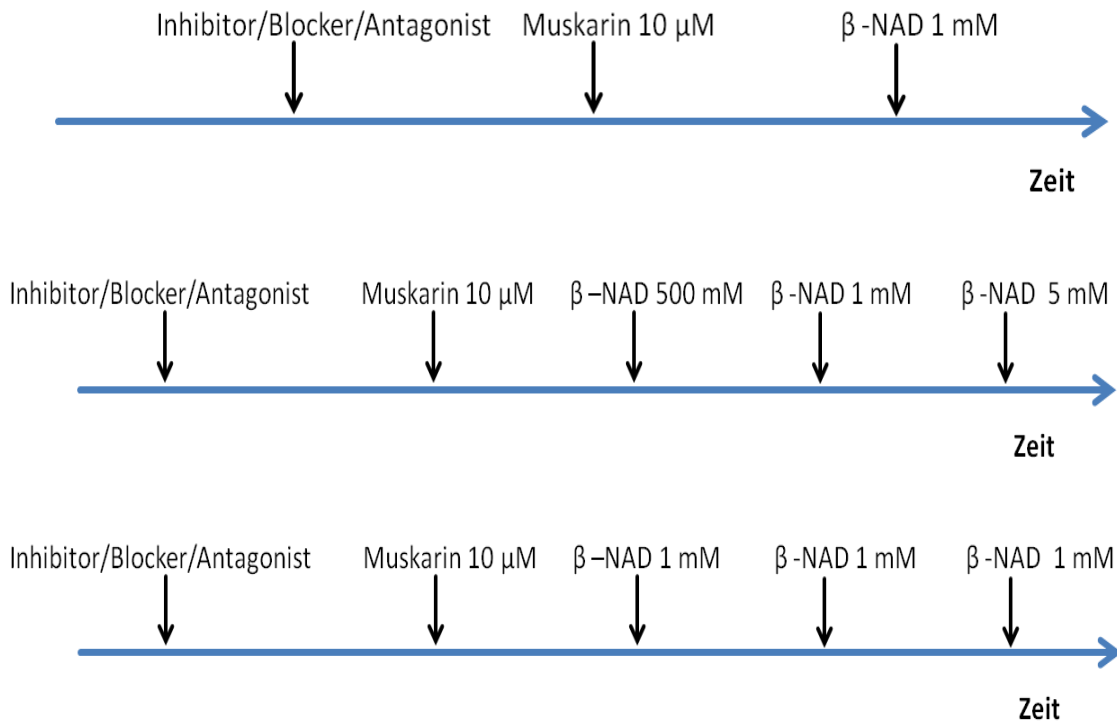


Abb. 2.4 Versuchsaufbau zur Feststellung des Signalweges der β-NAD-induzierten Dilation der vorkontrahierten glatten Muskulatur der Trachealspangen der Maus

Zum Vergleich mit einem β₂-Adrenozeptoragonisten wurde nach der Zugabe von 10 µM Muskarin Salbutamol in den Konzentrationen 1 µM, 10 µM und 100 µM (maximal effektive Dosis) hinzugegeben (Abb. 2.5).

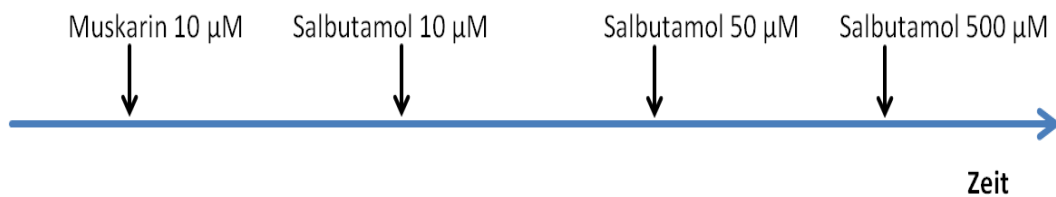


Abb. 2.5 Versuchsaufbau zur Feststellung der Wirkung von Salbutamol auf die vorkontrahierte glatte Muskulatur der Trachealspangen der Maus

2.2.5 Videomorphometrie an Lungenschnitten der Maus

Die Tötung der Maus erfolgte durch Genickbruch mit Hilfe einer großen Pinzette. Daraufhin wurde die Maus in Rückenlage auf einem Styroporbrett fixiert und folgendermaßen präpariert:

Das Fell wurde in Längsrichtung vom Nabel bis zum Kinn aufgeschnitten, die Bauchhöhle wurde eröffnet und die Bauchorta wurde durchtrennt, damit ein vollständiges Ausbluten der Maus gewährleistet werden konnte. Nach einem Schnitt durch das Zwerchfell und einem daraus resultierenden Kollabieren der Lunge wurde der Thorax links vom Sternum eröffnet und auseinander gespreizt, sodass die Lunge gut einsehbar wurde. Zum Schluss wurde die Trachea freipräpariert und locker mit einem Ligaturfaden fixiert. Durch eine Inzision zwischen den Knorpeln oberhalb des Fadens wurde eine 1,5 %ige Agaroselösung (certified low melt agarose, Bio-Rad, München) durch die Plastikmanschette einer Venenverweilkanüle mittels einer 2 ml Einwegspritze bis zum vollständigen Entfalten der Lungenlappen eingefüllt. Dann wurde die Trachea mit dem Faden geschlossen, die Kanüle herausgezogen und die Lunge mit Herz mittels einer Pinzette an der Trachea ziehend herauspräpariert. Um die Agaroselösung auszuhärten, wurde das Thoraxpaket in eine HEPES-Lösung eingetaucht.

Mit Hilfe eines Vibratoms (Vibratome VT1000S, Leica) wurden 200 µm dicke Lungenschnitte hergestellt. Dazu wurde ein Zylinder mit HEPES-Lösung gefüllt, welche konstant auf 4° C gehalten wurde. In der Mitte des Zylinders wurde ein Objektträger platziert, auf dem ein kompletter Lungenlappen mit der facies diaphragmatica an einen Korken geklebt wurde. Der Lungenlappen konnte so durch eine Rasierklinge nach folgender Einstellung geschnitten werden: Schnittdicke 200 µm, Geschwindigkeit 8 m/s, Frequenz 10 Hz. Es wurden pro Lappen ungefähr 30 Schnitte angefertigt, welche bis zum Ende des Schneidevorgangs in der kalten HEPES-Lösung belassen wurden.

Nach dem Schneiden wurden die Lungenschnitte mit Hilfe einer Pinzette in ein Becherglas mit MEM, 100 U/ml Penicillin und 100 g/ml Streptomycin überführt. Dieses wurde in einem 37° C warmen Inkubationsschrank erwärmt und mit einem Normoxie-Gasgemisch (73,7 % Stickstoff, 21 % Sauerstoff, 5,3 % Kohlendioxid) begast, sodass die Agaroselösung aus den Schnitten herausgewaschen werden konnte.

Nach zwei bis drei Stunden wurden die Lungenschnitte in die dafür vorgesehenen Inkubationskammern (Hugo Sachs Elektronik, March, Deutschland), gefüllt mit HEPES-Lösung, überführt, welche auf 37°C aufgewärmt wurde. Hier wurden die Schnitte mit einem Metallbügel fixiert und mit verschiedenen Substanzen behandelt. Über ein Pumpsystem wurden diese außerdem kontinuierlich mit einer Flüssigkeitsmenge von 0,5 ml/min gewaschen, sodass das Volumen in den Kammern konstant bei 1,5 ml blieb (Abb. 2.6). Bei jeder Zugabe von Substanzen über eine Pipette

wurde die Pumpe abgestellt, um eine gleichbleibende Substanzkonzentration zu gewährleisten.

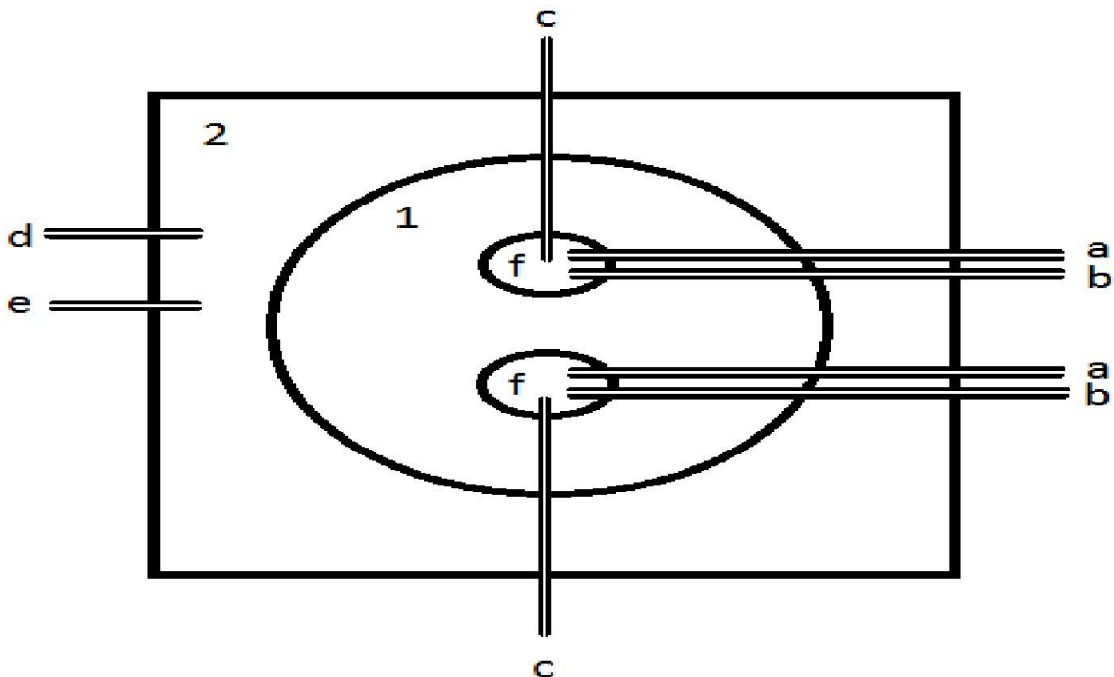


Abb. 2.6 Schematische Darstellung der Inkubationskammer

Die Lungenschnitte wurden durch einen Metallbügel in der oberen der beiden Kammern (f) platziert, welche durch auf 37° C erwärmtes Hepes gespült werden konnte (a und b). Ferner konnte die Kammer manuell durch eine Spritze geleert werden (c). Die Plexiglaskammern waren im Wasserbad (2) positioniert, welches auf 37° C erwärmt wurde (d und e)

Die Bildaufzeichnung der Bronchi erfolgte durch eine an das inverse Mikroskop (Leica) angeschlossene Kamera (Stemmer Imaging, Puchheim, Deutschland) bei 10-facher Objektivvergrößerung. Jede Minute wurde dabei ein Foto gemacht (Abb. 2.7). Zu den Auswahlkriterien der zu untersuchenden Bronchi gehörten die Intaktheit des umliegenden Gewebes sowie das Fehlen von Agaroseresten. Außerdem musste der Bronchus eine Größe von 150-250 µm aufweisen sowie mit mindestens 20 %iger Reduktion der Fläche auf 10 µM Muskarin reagieren. Zwischen den Applikationen der unterschiedlichen Substanzen wurde die Spülgeschwindigkeit erhöht, so dass die Pharmaka innerhalb von 15 min ausgewaschen waren.

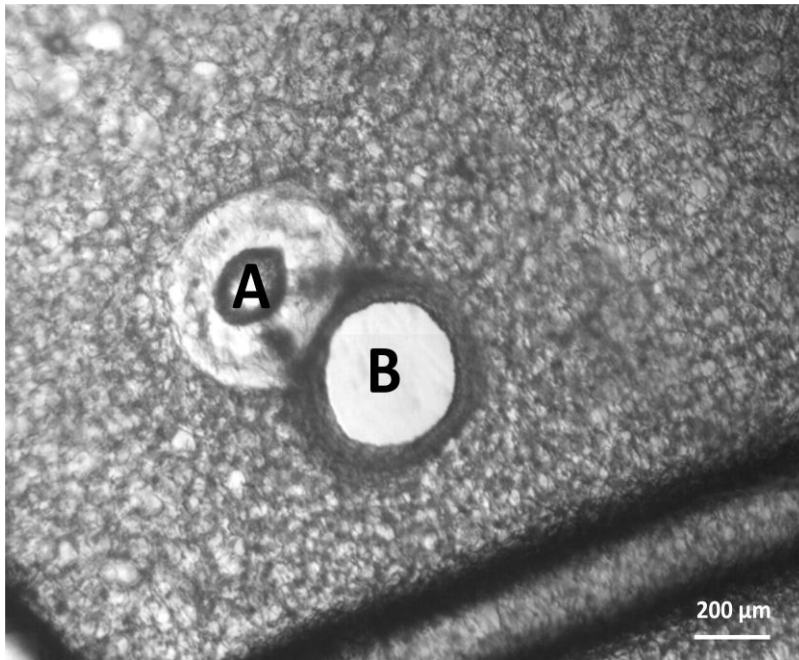


Abb. 2.7 Aufnahme eines 200 µm dicken Lungenschnittes.

Zu sehen sind ein quer geschnittener peripherer Bronchus (B) und eine benachbarte Pulmonalarterie (A). In der Umgebung befinden sich angeschnittene Alveolen

Die Bildauswertung erfolgte mithilfe des Optimas-Programms (Version 6.5, Stemmer, Puchheim, Deutschland). Dabei diente das erste Bild ohne jegliche Behandlung als Referenzbild, bei welchem die Fläche des Bronchus 100 % gleichgesetzt wurde und mit den darauffolgenden Bildern zum Verhältnis gesetzt wurde.

Zur Prüfung des Einflusses von β -NAD auf unbehandelte Bronchi wurde β -NAD in verschiedenen Konzentrationen zu den Lungenschnitten gegeben. Um zu prüfen, ob die Lungenschnitte intakt waren, wurde vor und nach dieser Behandlung 60 mM KCl hinzugefügt mit darauf folgenden Waschvorgängen (Abb. 2.8).

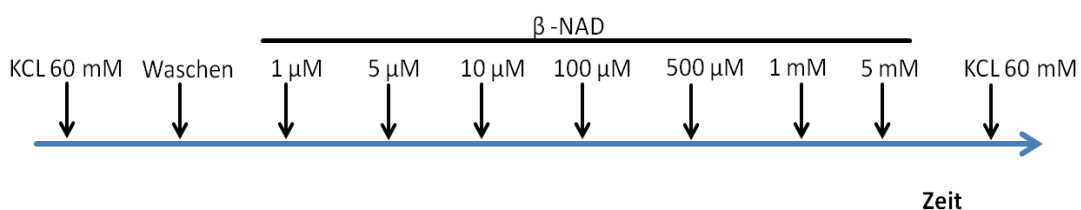


Abb. 2.8 Versuchsaufbau zur Prüfung des Einflusses von β -NAD auf unbehandelte Bronchi der Maus

Daraufhin wurden nach Zugabe von 10 μM Muskarin verschiedene Konzentrationen β -NAD hinzugegeben, wodurch eine von der Dosis abhängige Wirkungsbeziehung geprüft werden sollte (Abb. 2.9).

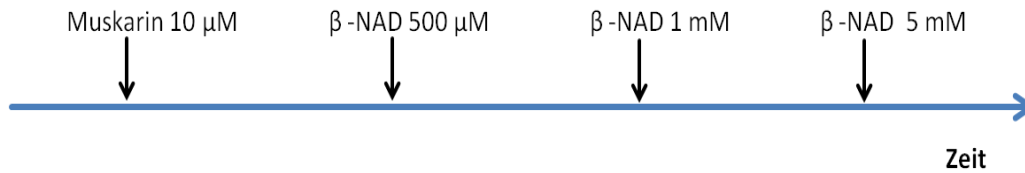


Abb. 2.9 Versuchsaufbau zur Feststellung der Dosis-Wirkungsbeziehung von β -NAD auf vorkontrahierte glatte Muskulatur der Bronchi der Maus

Ferner wurden auch hier verschiedene Inhibitoren eingesetzt, um den Signalweg zu untersuchen, welcher zur β -NAD-induzierten Dilation führt (Abb. 2.10).

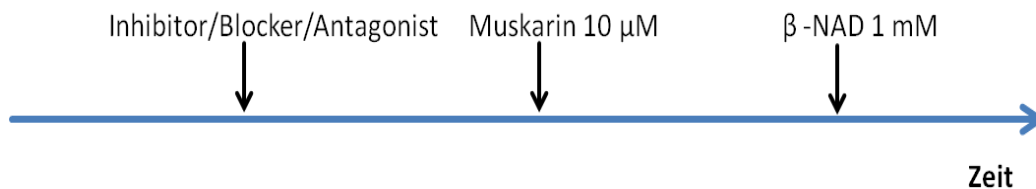


Abb. 2.10 Versuchsaufbau zur Feststellung des Signalweges der β -NAD-induzierten Dilation auf die vorkontrahierte glatte Muskulatur der Bronchi der Maus

Zum Schluss wurde die Wirkung eines vergleichbaren Bronchodilators, dem β_2 -Adrenozeptoragonisten Salbutamol, nach der Zugabe von 10 μM Muskarin untersucht (Abb. 2.11).

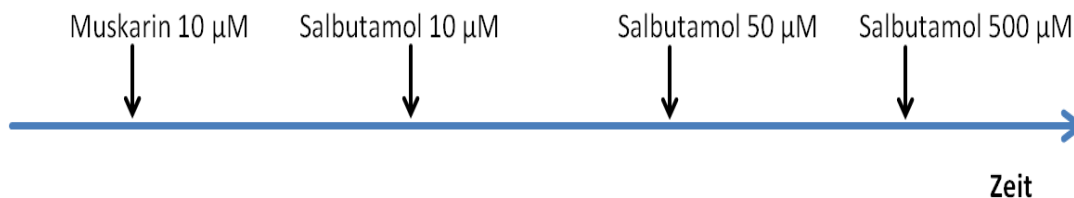


Abb. 2.11 Versuchsaufbau zum Vergleich der Wirkungen von Salbutamol und β -NAD auf die vorkontrahierte glatte Muskulatur der Bronchi der Maus

2.2.6 Kalziummessungen an isolierten glatten Muskelzellen der Atemwege der Maus

Alle im Folgenden benutzten Reagenzien wurden von Sigma Aldrich bezogen. Die Trachea mit den Hauptbronchi wurde wie oben beschrieben freipräpariert. Hiernach wurde die Trachea mittig längst aufgeschnitten, um so den Blick auf den hinten liegenden Trachealmuskel zu bekommen. Um möglichst die reine glatte Muskulatur des hinteren Anteils der Trachea im Folgenden ausschneiden zu können, wurden mit einem Wattestäbchen vorsichtig die Epithelzellen abgestrichen. Jetzt wurde der Muskel herausgeschnitten und in die folgende erste Verdauungslösung überführt: Papain 7 mg/ml, BSA 2 mg/ml, DTT; 0,5 mg/ml, 10 µl L-Cystein in 1 ml PSS.

Das Gewebe wurde für 30 min bei 37°C inkubiert und dann mit 1 ml PSS und 2 µl Leupeptin versetzt, um das Papain zu inaktivieren. Nach weiteren drei Waschvorgängen, bei welchen jeweils der Überstand entnommen und nach Zentrifugieren bei 600 Runden pro min (rounds per minute; rpm) für eine min 1 ml PSS hinzugegeben wurde, wurde die Probe erneut für 2 min bei 600 rpm zentrifugiert und in eine zweite Verdauungslösung überführt: Kollagenase II 2 mg/ml, BSA 2 mg/ml, DTT 1 mg/ml in 1 ml PSS. Dieses Gemisch wurde mit dem Gewebe für 1 h bei 37° C inkubiert und dann nochmals 3x mit eiskaltem PSS nach dem oben beschriebenen Procedere gewaschen. Abschließend wurde das Gewebe mit einer Glaspipette trituiert, bis das Gemisch trüb war, und der Überstand nach letztmaligem Zentrifugieren für 5 min bei 600 rpm abgenommen, um es mit einer Nährlösung (300 µl RPMI + 10 % fetales Kälberserum (fetal calf serum; FCS) + 1 % Penicillin/Streptomycin) zu mischen. Je 50 µl der Lösung mit den Zellen wurde auf Deckgläschen, beschichtet mit 1 mg/ml Fibronectin, ausgesät und in einer 24-Well-Platte für 24 h im Inkubator bei 37° C und 5 % CO₂ belassen. So konnten sich die Zellen auf den Deckgläschen absetzen. Am Folgetag wurden die Zellen mit PSS gewaschen und mit 10 µM Fura-2-AM-Ester (Invitrogen) und 100 µM Sulfbromphthalein (Merck) in 200 µl PSS beladen. Sulfbromphthalein wurde zur Verhinderung des Efflux des Farbstoffes aus den Zellen eingesetzt. Zuvor wurde Fura-2-AM-Ester mit DMSO auf 1 mM verdünnt. Nach 20 minütiger Inkubation der Zellen in dem Gemisch wurden diese in einem mit 1,5 ml PSS gefüllten Delta-T-Dish überführt und mit einem hufeisenförmigen Gewicht fixiert. Während des ganzen Experiments wurden die Zellen mit vorgewärmter PSS-Lösung durch eine Pumpe (Gilson minipuls 2; Gilson, Limburg-Offheim) gewaschen. Die

Messungen wurden bei einer Temperatur von etwa 30°C durchgeführt, welche durch einen Thermostaten (Bioprotechs Inc., Butler, USA) gewährleistet wurde. Nach jeder Zugabe einer Substanz wurde ein fünfminütiger Waschschrift durchgeführt. Die Substanzen wurden vor den Versuchen mit PSS auf eine endgültige Gebrauchslösung gebracht.

Aufgenommen wurde mit einem 20x Wasserimmersionsobjektivs eines Lichtmikroskops (Olympus BX50WI, Olympus, Hamburg, Deutschland) durchgeführt, an welchem sich oberhalb des Okulars ein slow-scan charged-coupled device Kamerasystem mit einem schnellen Monochromator (Kamera IMAGO, TiLL Photonics, Gräfelfing, Deutschland) befand. Dieses nahm Bilder vom optischen System in bestimmten Frequenzen auf und übertrug diese an den angeschlossenen Computer. Die Auswertung erfolgte mit der Imaginganalysesoftware „TiLLVision“ (TiLL Photonics) sowie mit Microsoft Office 2003 Excel.

Da versucht wurde, die Zunahme der intrazellulären Kalziumkonzentration vor allem in glatten Muskelzellen zu messen, wurde nach den Versuchen eine immunohistochemische Markierung mit dem monoklonalen Antikörper gegen α -Smooth-muscle-actin, gekoppelt an Fluoresceinisothiocyanat (FITC), durchgeführt, um die Zellen zu charakterisieren.

Die Messungen wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt (Abb. 2.12):

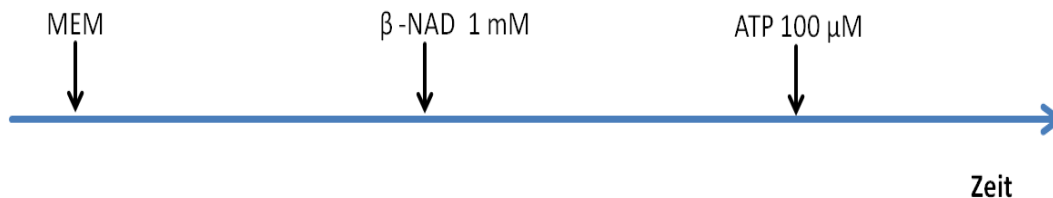


Abb. 2.12 Versuchsaufbau zu Versuchen der Kalziummessung an isolierten glatten Muskelzellen der Atemwege der Maus

2.2.7 Kalziummessungen an kultivierten glatten Muskelzellen der Atemwege der Maus

Nach Tötung und Ausbluten der Maus wurde die Trachea freipräpariert, entnommen und in MEM mit 100 U/ml Penicillin and 100 g/ml Streptomycin überführt. Um zu gewährleisten, dass möglichst viele glatte Muskelzellen kultiviert werden, wurden das

Epithel und das Bindegewebe entfernt. Ferner wurde der Trachealmuskel herausgeschnitten, auf ein Well einer 6-Well-Platte überführt und durch einen Tropfen RPMI + 10 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin an den Boden des Wells gedrückt. Nach einer Stunde wurden 2 ml RPMI + 10 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin hinzugegeben und die Kulturplatte in einen 37° C warmen Inkubator gelegt. Nach einer Woche, in der zweitägig das Medium gewechselt wurde, wurden die Zellen durch 0,1 % Trypsin dissoziiert und auf Deckgläschen überführt. Ferner wurde eine immunohistochemische Untersuchung mit einem monoklonalen Antikörper gegen α -Smooth-muscle-actin durchgeführt, um die Ausbeute an glatten Muskelzellen zu bestimmen. Die Kalziummessungen wurden mit dem gleichen Protokoll durchgeführt wie mit den isolierten Zellen (Abb. 2.12).

2.2.8 Kalziummessungen an kultivierten glatten Bronchialmuskelzellen des Menschen

Glatte Muskelzellen des menschlichen Bronchialsystems (PromoCell) wurden nach folgendem Protokoll kultiviert: Die Zellen wurden im Zellkultur-Behälter mit 9 ml des dafür vorgesehenen Nährmediums (Smooth Muscle Cell Growth Medium 2; PromoCell) in einem Inkubator platziert und bei 37°C und 5 % CO₂ für einen Tag belassen. Nach mindestens 24 h wurde das Medium gewechselt. Vor den Versuchen wurde das Medium durch 1 % Trypsin ersetzt, um die Zellen vom Untergrund des Zellkulturbehälters zu lösen. Nach 10 min wurden die Zellen in ein 10 ml Falcon-Röhrchen (Omnilab) überführt und für 5 min zentrifugiert (600 rpm). Der Überstand wurde daraufhin abgenommen und das Pellet wurde im MEM gelöst. Im Weiteren wurde so vorgegangen, wie im Kapitel „2.2.6 Kalziummessungen an isolierten glatten Muskelzellen des Atemweges der Maus“ beschrieben wurde. Das Protokoll der Experimente mit den Bronchialzellen ist in Abb. 2.12 dargestellt.

2.2.9 Transfektion von glatten Muskelzellen des menschlichen Bronchialsystems mit einem direkt durch cAMP aktivierbaren Austauschprotein

Die Transfektion der primären glatten Muskelzellen des menschlichen Bronchialsystems erfolgte durch Elektrophorese mit einer DNA in Form eines Plasmids, welches das Protein EPAC kodiert (2 µg pro 1×10^6 Zellen). Dieses DNA-Konstrukt wurde mittels PCR synthetisiert und beinhaltet ein Fusionsprotein basierend auf dem EPAC1-Gen des Menschen (GenBank™-Nummer AF103905) mit YFP sowie CFP (Clontech) jeweils an den beiden Enden. Die Transfektion wurde mit einem Nukleofektionskit für primäre Säugetierzellen (Lonza) und der dazugehörigen Apparatur, Nucleofector device II (Lonza), nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 48 h in Kultur gebracht, um die Effizienz der Transfektion sicherzustellen.

2.2.10 Messung der intrazellulären cAMP-Konzentration mittels FRET

Die FRET-Messungen wurden bei Raumtemperatur (20-24°C) mit einem inversen Mikroskop (Eclipse Ti, Nikon, Düsseldorf), ausgestattet mit einem 100x Objektiv (Plan Apo VC 100x/1,40 Öl ∞/0,17 Dic N2, Nikon, Düsseldorf), durchgeführt. Als Lichtquelle wurde ein schnellschaltendes, auf Lichtbogen basiertes Xenon-Lichtsystem genutzt, das mit den folgenden Filtern ausgestattet war (alle von Chroma, Olching): ET 430/24x (CFP-Anregung) oder 500/40x (YFP-Anregung), T455LP (zur Sammlung der kombinierten Fluoreszenz von CFP und YFP) und CFP/YFP-Lichtspaltsystem, sowie CFP/YFP Emissions-Filter (Croma, 59017bs und 59017m), z488/800–1064rpc (zur Teilung der CFP- bzw. YFP-Emission), ET 480/40 (CFP-Emission) und HC 534/20 (YFP-Emission). Die drei letztgenannten Filter wurden an ein Optosplit II (Cairn Research, Faversham, UK) angeschlossen, um mit einer schnellaufnehmenden Kamera (Evolve512, Roper Scientific, Martinsried) simultan CFP- und YFP-Fluoreszenz messen zu können. Mikroskop, Kamera und DG-4 wurden mit NIS-ElementsAR (Laboratory Imaging, Prag, Tschechien) kontrolliert.

Die Zellen wurden kontinuierlich mit einem Puffer gespült (137 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1mM MgCl₂ und 10 mM Hepes, pH 7,3) oder mit Agonisten, welche im Puffer enthalten waren. Während der FRET-Messungen wurden CFP-(488 ± 20 nm)-

und YFP-(534 ± 10 nm)-Fluoreszenzen simultan aufgenommen, während die Zellen mit 430 nm angeregt wurden. Abhängig von der Lichtintensität wurde die Belichtungszeit auf 20-40 ms gesetzt und die Bilder in einem Intervall von 500 ms oder 2 s aufgenommen. Die berechnete Fluoreszenz aus CFP und YFP resultierte in der „FRET ratio“. Agonisten für die Messungen waren 1 mM β -NAD und 10 μ M Isoproterenol, das Versuchsprotokoll ist in Abb 2.13 dargestellt.



Abb. 2.13 Versuchsaufbau zu Versuchen der cAMP-Messung an glatten Muskelzellen des menschlichen Bronchialsystems

Um herauszufinden aus welcher Quelle das gebildete cAMP stammt, wurde KH7 als Inhibitor der löslichen AC genutzt, welcher 5 Minuten vor der Zugabe des β -NAD zugegeben wurden (Abb 2.14).

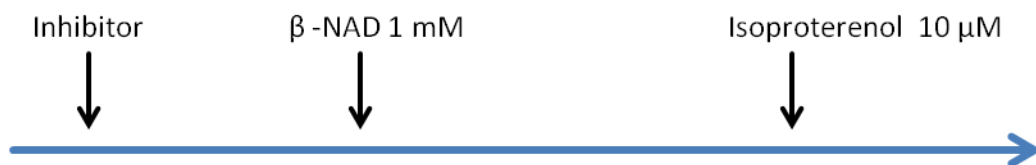


Abb. 2.14 Versuchsaufbau zu Versuchen der cAMP-Messung mit KH7 zur Evaluation der Entstehung des intrazellulären cAMP in glatten Muskelzellen des menschlichen Bronchialsystems

2.2.11 Simultane Kalziummessungen und Messungen des Membranpotenzials an Lungenschnitten der Maus

Die Lungenschnitte wurden wie im Abschnitt „Videomorphometrie“ beschrieben angefertigt. Daraufhin wurde jeweils der zu untersuchende Schnitt in ein Well einer 24-Well-Platte überführt und mit 10 μ M Kalziumindikator Calcium Orange (AM) Ester (Invitrogen) und 100 μ M Sulfobromamphthalein (Invitrogen) in 300 ml MEM sowie

[Bis-(1,3-dibutylbarbituric acid)trimethine oxonol] (DiBAC(4)3) für 40 min im Inkubator versetzt. Für die Versuche wurde jeweils ein Schnitt auf ein Deckgläschen gelegt und mit einem beschwerten Netzchen bestückt, um durch die Zugabe verschiedener Substanzen induzierte Bewegungen der Schnitte zu verhindern. Die Deckgläschen wurden dann auf einen Metallhalter gelegt und auf dem Objektisch unter dem Konfokalen Laser Scan Mikroskop (CLSM; Leica-TCS SP2 AOBS; Leica, Mannheim) platziert. Der Objektisch wurde auf 37° C erwärmt, Ferner konnten die Schnitte zwischen den Zugaben von Substanzen mittels einer Pumpe mit einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/min gespült werden. Die Aufnahmen sowie die Auswertung wurden mit Hilfe der Software ZEN 11 (Carl Zeiss) durchgeführt. Die Versuche zu Messungen der Kalziumkonzentration simultan mit Messungen des Membranpotenzials und der Fläche wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt (Abb. 2.15):



Abb. 2.15 Versuchsaufbau zur simultanen Messung der Kalziumkonzentration, des Membranpotenzials und der Fläche des Bronchiolumens

2.2.12 Organbadexperimente an Bronchioli von Patientenerlungen

Lungensegmente von an COPD oder pulmonaler Hypertonie erkrankten Patienten wurden im Rahmen der Behandlung von Prof. Dr. Walter Klepetko (Confraternität-Privatklinik Josefstadt, Wien, Österreich) oder von Prof. Dr. Winfried Padberg bzw. Prof. Dr. Johannes Bodner (Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax-, Transplantations- und Kinderchirurgie, Universitätsklinikum Gießen und Marburg Standort Gießen, Deutschland) entnommen. Die Versuche wurden von den örtlichen Behörden genehmigt (111/08 des Europäischen IPF Registers (eurIPFreg)). Es wurde versucht, in den gesunden Bereichen der Segmente möglichst distale Anteile des Bronchialsystems, Bronchioli mit einem Durchmesser von 1-2 mm und einer Länge von ungefähr 5 mm,

heraus zu präparieren. Diese wurden für Organbadexperimente zwischen Häkchen platziert und, wie im Kapitel „2.2.4 Organbadexperimente an der isolierten Trachea der Maus“ beschrieben, behandelt. Das Protokoll dieser Experimente ist in Abb. 2.16 für die Überprüfung der Wirkung des β -NAD an der glatten Muskulatur des menschlichen Bronchialsystems bzw. in Abb. 2.17 für die Überprüfung der Wirkung des Salbutamols an der glatten Muskulatur des menschlichen Bronchialsystems dargestellt.

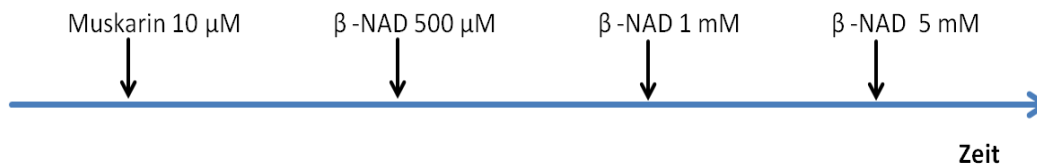


Abb. 2.16 Versuchsaufbau zur Feststellung der Dosis-Wirkungsbeziehung von β -NAD auf die vokontrahierte glatte Muskulatur der Bronchioli des Menschen

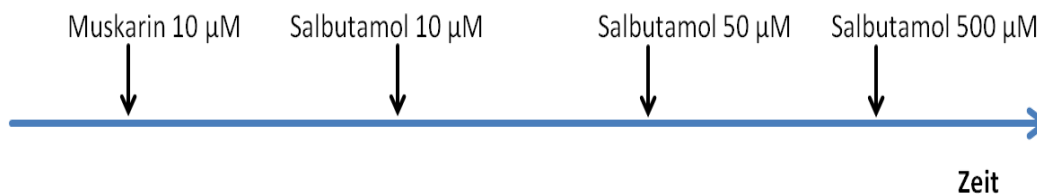


Abb. 2.17 Versuchsaufbau zur Feststellung der Dosis-Wirkungsbeziehung von Salbutamol auf die vokontrahierte glatte Muskulatur der Bronchioli des Menschen

2.2.13 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test bei gepaarten und ungepaarten Stichproben, wobei folgende Signifikanzniveaus gewählt wurden: * \triangleq $p=0,05$, ** \triangleq $p=0,01$, *** \triangleq $p=0,001$. Die Diagramme werden als Mittelwerte (\bar{x}) der einzelnen Versuche (Stichproben= n) dargestellt mit den dazugehörigen Standardabweichungen (standard deviation=S.D.). Die Programme zur Auswertung waren SPSS (IBM Corporation, New York, USA) oder Excel (Microsoft).

3 Ergebnisse

3.1 β -NAD dilatiert die glatte Muskulatur der Trachea der Maus

β -NAD hatte in nicht vorkontrahierten Trachealsegmenten keinen dilativen Effekt (Abb. 3.1).

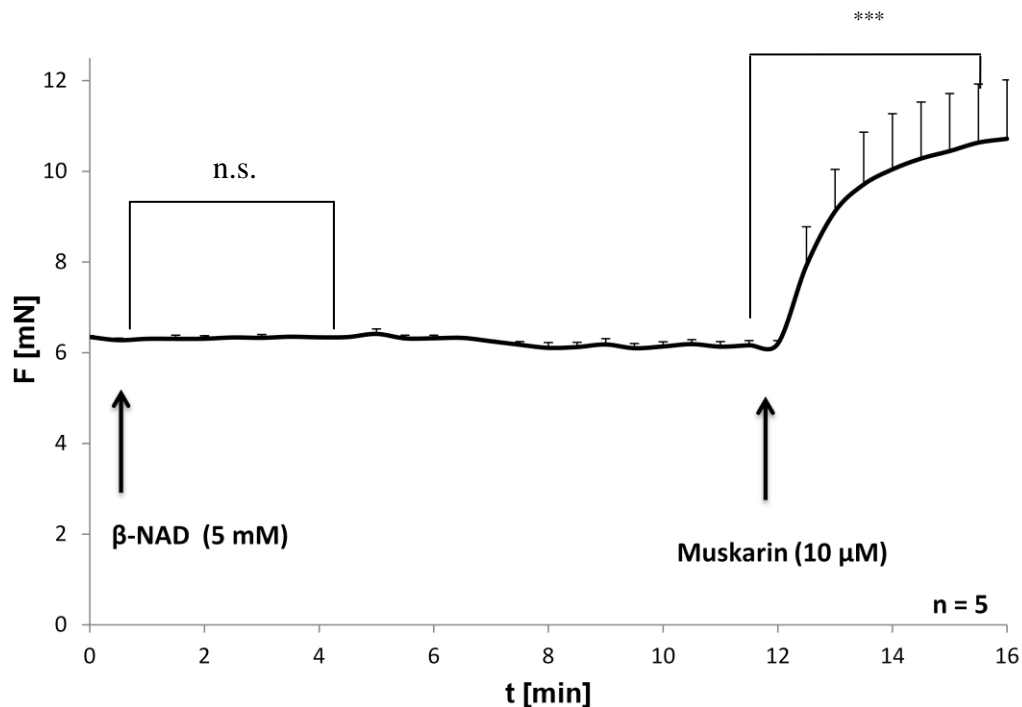


Abb. 3.1 Organbadversuche an Trachealsegmenten der Maus

Nach Hinzugabe von 5 mM β -NAD auf nicht vorkontrahierte Trachealsegmente der Maus gab es keinen Effekt. Die Zugabe von 10 μ M Muskarin fchrte zu einer Kontraktion der Muskulatur (Erh6hung der Kraft im Organbadversuch). Die Stichprobenanzahl (n) gibt die Anzahl der benutzten Tracheen an. N.s. bedeutet nicht signifikant; *** entspricht einem p-Wert von < 0,001 (ungepaarter t-Test).

In vorkontrahierten Trachealsegmenten kam es nach Zugabe von β -NAD in steigender Konzentration zu steigender Dilation mit einem Maximum von 100 % bei einer Konzentration von 7 mM (Abb. 3.2).

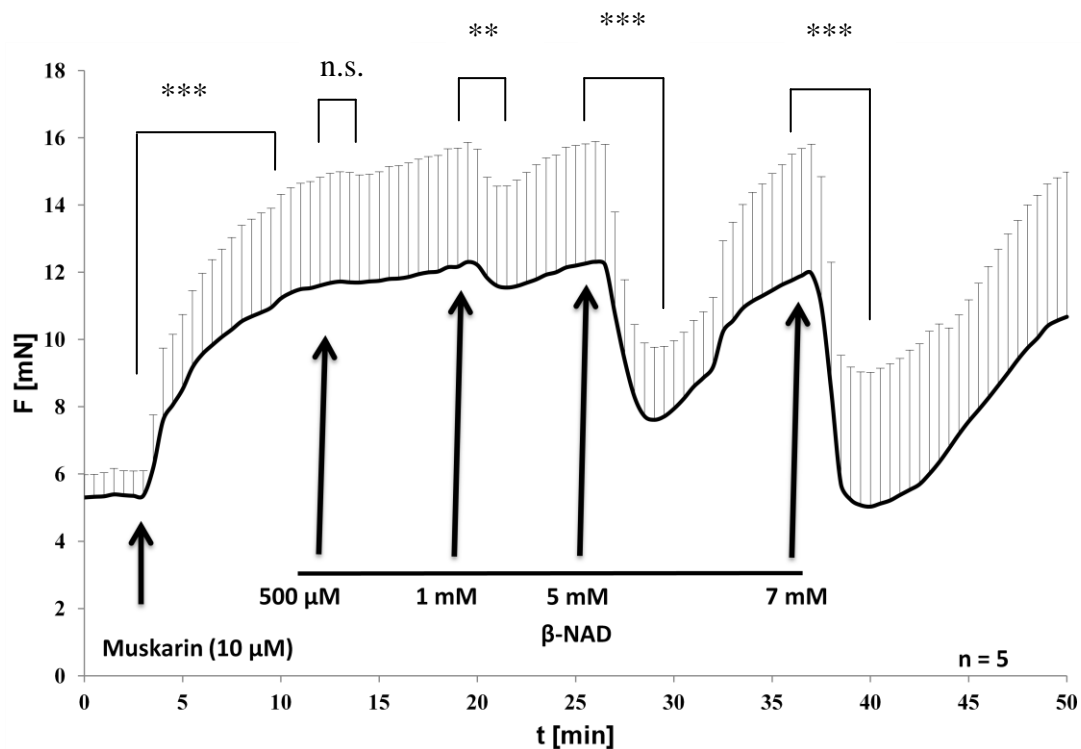


Abb. 3.2 Organbadversuche an Trachealsegmenten der Maus

Nach der Zugabe von $10 \mu\text{M}$ Muskarin kam es zu einer Kontraktion der Trachealsegmente. Die Hinzugabe von $\beta\text{-NAD}$ führte zu einer dosisabhängigen Dilation, welche bei der Konzentration von 7 mM 100 % der Muskarin-induzierten Kontraktion aufhob. Die Stichprobenanzahl (n) gibt die Anzahl der benutzten Tracheen an. N.s. bedeutet nicht signifikant; ** entspricht einem p -Wert von $<0,01$; *** entspricht einem p -Wert von $< 0,001$ (ungepaarter t -Test).

Die $\beta\text{-NAD}$ -induzierte Dilation der Trachealmuskulatur wurde gefolgt von einer Kontraktion. Diese Kontraktion wurde durch Vorbehandlung mit 8-Bromo-cADPR vermindert (Abb. 3.3). Außerdem wurde diese Kontraktion auch durch die Zugabe von Flufenaminsäure vermindert (Abb. 3.4). Schließlich verringerte auch die Durchführung der Experimente in einem mit EDTA versetzten Medium die Kontraktion (Abb. 3.5).

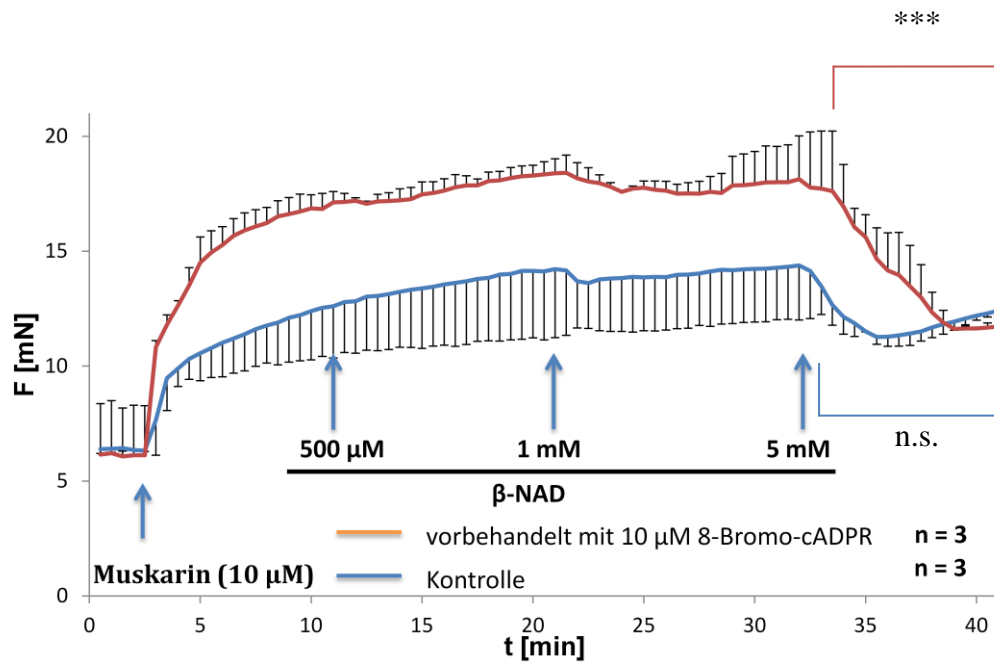


Abb. 3.3 Organbadversuche an Trachealsegmenten der Maus

Nach der Zugabe von $10 \mu\text{M}$ Muskarin kam es zu einer Kontraktion der Trachealmuskulatur, welcher $\beta\text{-NAD}$ dosisabhängig entgegenwirkte. Durch die Vorbehandlung mit dem cADPR-Antagonisten 8-Bromo-cADPR ($10 \mu\text{M}$) 15 min vor der Zugabe von Muskarin war die $\beta\text{-NAD}$ -induzierte Kontraktion vermindert. Die Stichprobenanzahl (n) gibt die Anzahl der benutzten Tracheen an. N.s. bedeutet nicht signifikant; *** entspricht einem p -Wert von $< 0,001$ (ungepaarter t -Test).

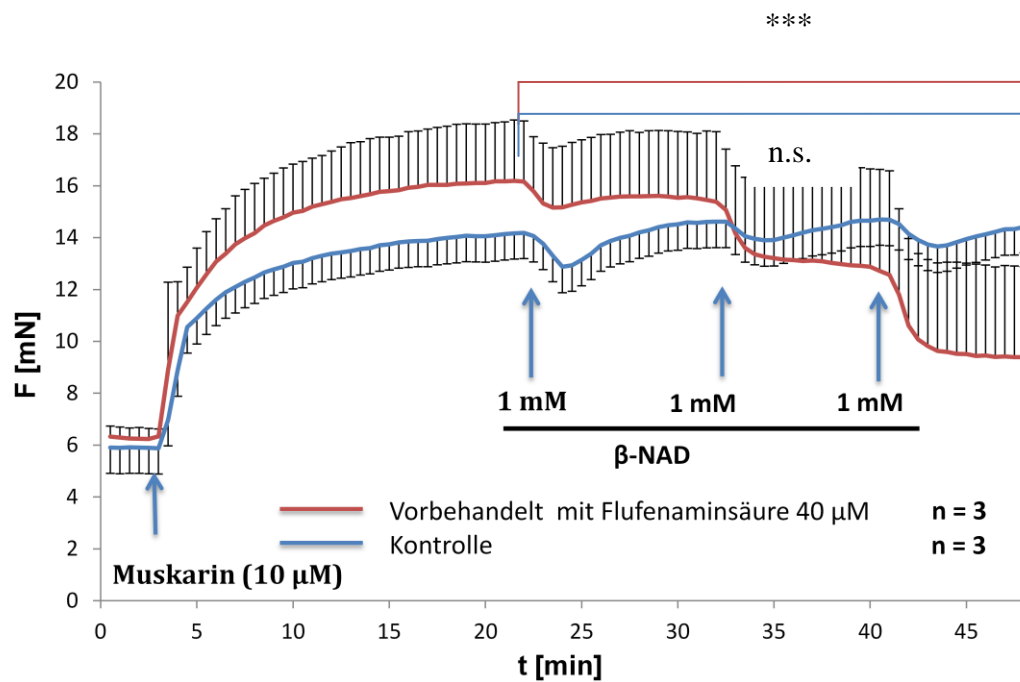


Abb. 3.4 Organbadversuche an Trachealsegmenten der Maus

Nach der Zugabe von $10 \mu\text{M}$ Muskarin kam es zu einer Kontraktion der Trachealmuskulatur, welcher $\beta\text{-NAD}$ mit einer repetitiven Dosis von 1 mM entgegenwirkte. Durch die Vorbehandlung mit dem TRPM2-Blocker Flufenaminsäure ($40 \mu\text{M}$) 15 min vor der Zugabe von Muskarin war die $\beta\text{-NAD}$ -induzierte Kontraktion vermindert. Die Stichprobenanzahl (n) gibt die Anzahl der benutzten Tracheen an. N.s. bedeutet nicht signifikant; *** entspricht einem p -Wert von $< 0,001$ (ungepaarter t -Test).

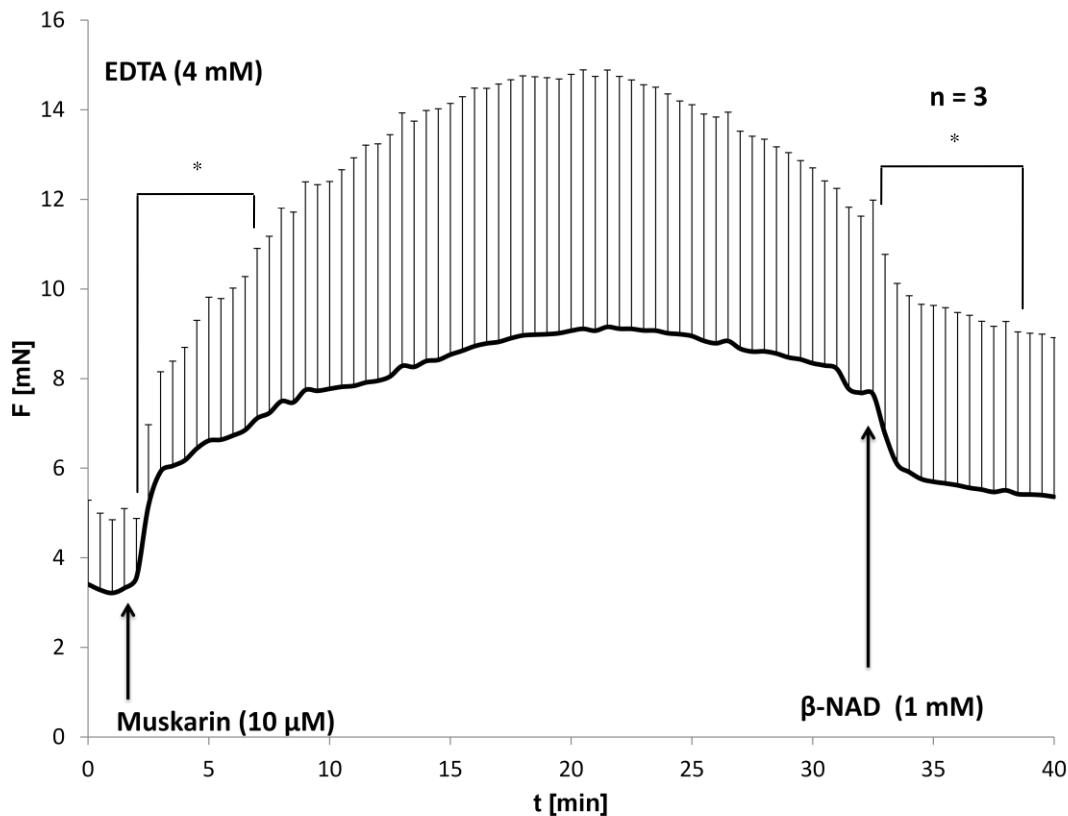


Abb. 3.5 Organbadversuche an Trachealsegmenten der Maus

Das Medium wurde vor den Versuchen mit 4 mM EDTA versetzt. Nach der Zugabe von 10 µM Muskarin kam es zu einer Kontraktion der Trachealmuskulatur, welcher 1 mM β-NAD entgegenwirkte. Die Muskarin-induzierte Kontraktion fiel geringer aus als in Versuchen in einem EDTA-freiem Medium. Die Stichprobenanzahl (n) gibt die Anzahl der benutzten Tracheen an. * entspricht einem p-Wert von < 0,05 (ungepaarter t-Test).

3.2 Vorkommen von CD38 und TRPM2 in der Maustrachea

Die Maustrachea wurde immunhistochemisch auf das Vorkommen von CD38 und TRPM2 untersucht. CD38-Immunreaktivität wurde im Epithel und in der glatten Muskulatur, die durch Doppelmarkierung mit einem Antikörper für α-Smooth muscle actin identifiziert wurde, beobachtet. Dabei war die Markierungsstärke der glatten Muskulatur höher als die des Epithels (Abb. 3.6). Eine Spezifitätskontrolle durch Präabsorption war nicht möglich, da das korrespondierende Peptid nicht zur Verfügung stand.

TRPM2-Immunreaktivität wurde ebenfalls im Epithel und in der glatten Muskulatur, die durch Doppelmarkierung mit einem Antikörper für α -Smooth muscle actin identifiziert wurde, beobachtet. Dabei war die Markierungsstärke im Epithel höher als in der glatten Muskulatur (Abb. 3.7). Auch hier war eine Spezifitätskontrolle durch Präabsorption nicht möglich, da das korrespondierende Peptid nicht zur Verfügung stand.

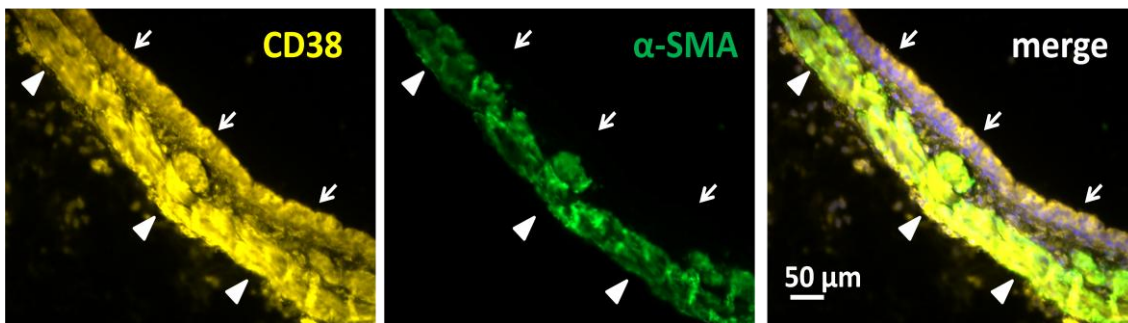


Abb. 3.6 Doppel-Immunfluoreszenz, Maustrachea

CD38-Immunreaktivität im Epithel (Pfeile) und der durch α -SMA-Antikörper dargestellten glatten Muskulatur (Pfeilköpfe)

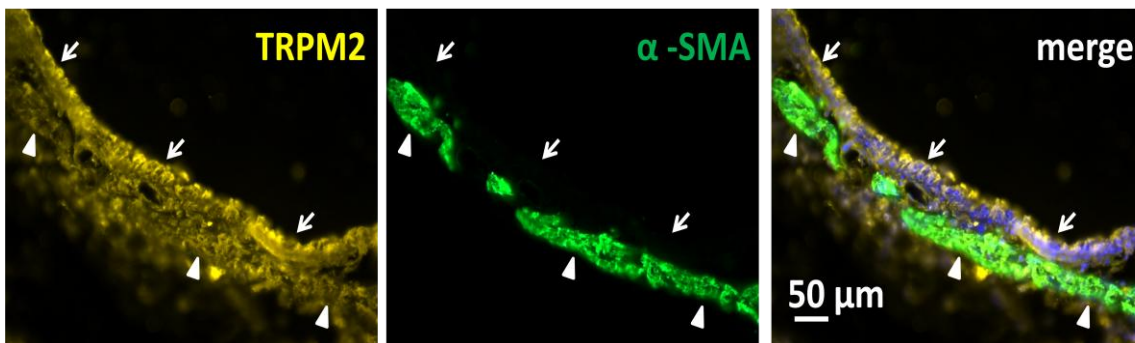


Abb. 3.7 Doppel-Immunfluoreszenz, Maustrachea

TRPM2-Immunreaktivität im Epithel (Pfeile) und der durch α -SMA-Antikörper dargestellten glatten Muskulatur (Pfeilköpfe)

Abbildung 3.8 zeigt die Agarosegele der RT-PCR. Sowohl in dem einzeln ausgeschnittenen Trachealmuskel als auch in der Milz und dem Thymus konnte mit Primern gegen CD38, TRPM2 und β -MG jeweils ein Produkt nachgewiesen werden. Im Trachealmuskel wurde für TRPM2 nur eine schwache Bande detektiert. In Ansätzen ohne Zugabe von Reverser Transkriptase konnte kein Produkt amplifiziert werden. In den Proben mit Zugabe von Wasser anstatt von cDNA, die zur Kontrolle auf eine

Verunreinigung mit genomischer DNA durchgeführt wurden, wurden keine Produkte amplifiziert.

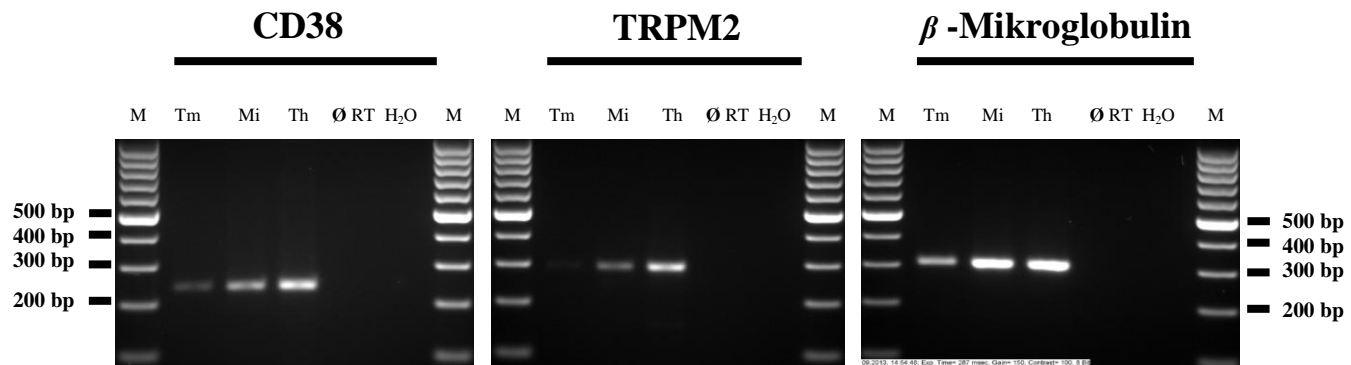


Abb. 3.8 RT-PCR, Agarose-Gelelektrophorese.

100 Basenpaar-(bp)-Marker (M), Trachealmuskel (Tm), Milz (Mi), Thymus (Th), Reverse Transkriptase Kontrolle (Durchführung der RT-PCR ohne Reverse Transkriptase; Ø RT), Wasserkontrolle (Durchführung der RT-PCR mit destilliertem Wasser statt der cDNA; H₂O).

3.3 β -NAD dilatiert Bronchi der Maus in PCLS

In videomorphometrischen Versuchen blieb der Tonus nicht vorkontrahierter Bronchi durch Zugabe von β -NAD unbeeinflusst (Abb. 3.9), während β -NAD durch 10 μ M Muskarin vorkontrahierte kleine Atemwege dosisabhängig dilatierte (Abb. 3.10).

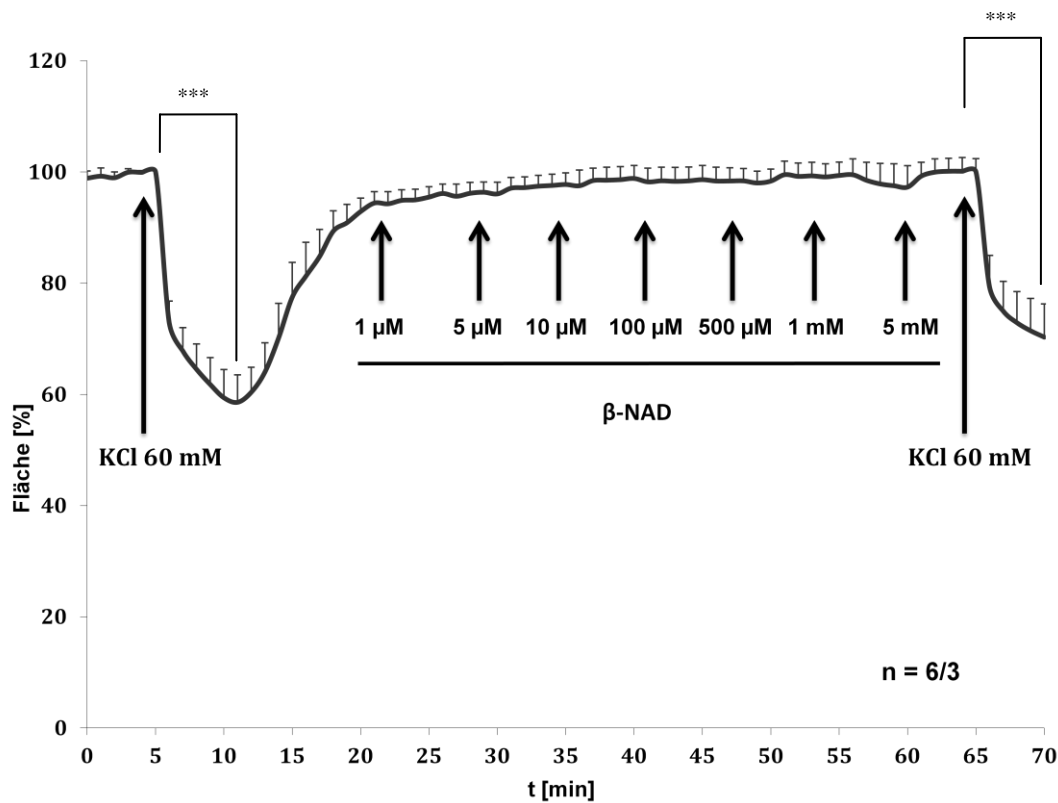


Abb. 3.9 Videomorphometrische Versuche an Bronchi der Maus in PCLS

Die Zugabe von 60 mM KCl zeigte die Kontraktionsfähigkeit der Bronchi vor und nach der Zugabe von β -NAD. Die Zugabe von β -NAD in verschiedenen Konzentrationen hatte keinen Einfluss auf den Tonus der glatten Muskulatur, welcher indirekt durch die Fläche der Bronchi gemessen wird. Stichprobenanzahl (n): Anzahl der verwendeten Schnitte/Anzahl der verwendeten Mäuse. *** entspricht einem p -Wert von $< 0,001$ (ungepaarter t -Test).

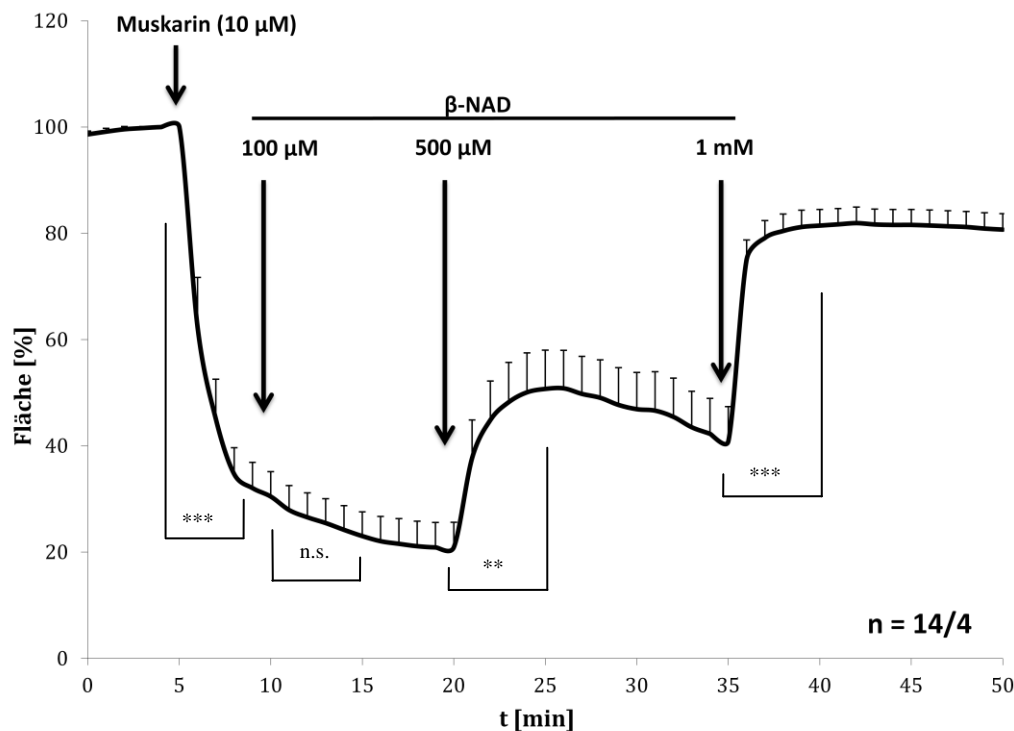


Abb. 3.10 Videomorphometrische Versuche an Bronchi der Maus in PCLS

Die Zugabe von 10 µM Muskarin führte zu einer Kontraktion der Bronchi, welche sich in einer Verringerung der Fläche äußerte. Die Zugabe von β-NAD führte zu einer Dilation der Bronchi, welche bei einer Dosis von 5 mM die Muskarin-induzierte Kontraktion fast vollständig aufhebt. Stichprobenanzahl (n): Anzahl der Schnitte/Anzahl der Tiere. N.s. bedeutet nicht signifikant; ** entspricht einem p-Wert von <0,01; *** entspricht einem p-Wert von < 0,001 (ungeparter t-Test).

3.4 Der Effekt von β-NAD ist unabhängig von purinergen Rezeptoren

In Organbad- und in videomorphometrischen Experimenten verminderten die hier benutzten Antagonisten der purinergen Rezeptoren die Wirkung von β-NAD sowohl in der Trachea als auch in den kleinen Atemwegen der Maus nicht. Es wurden sowohl der selektive Inhibitor MRS2179 als auch die nicht selektiven Inhibitoren PPADS und Suramin eingesetzt. Zum Nachweis der Wirkung dieser Blocker wurden 100 µM ATP eingesetzt. Die eingesetzten Blocker inhibierten die Wirkung von ATP, während die Wirkung von β-NAD unbeeinflusst blieb (Abb. 3.11 und Abb. 3.12).

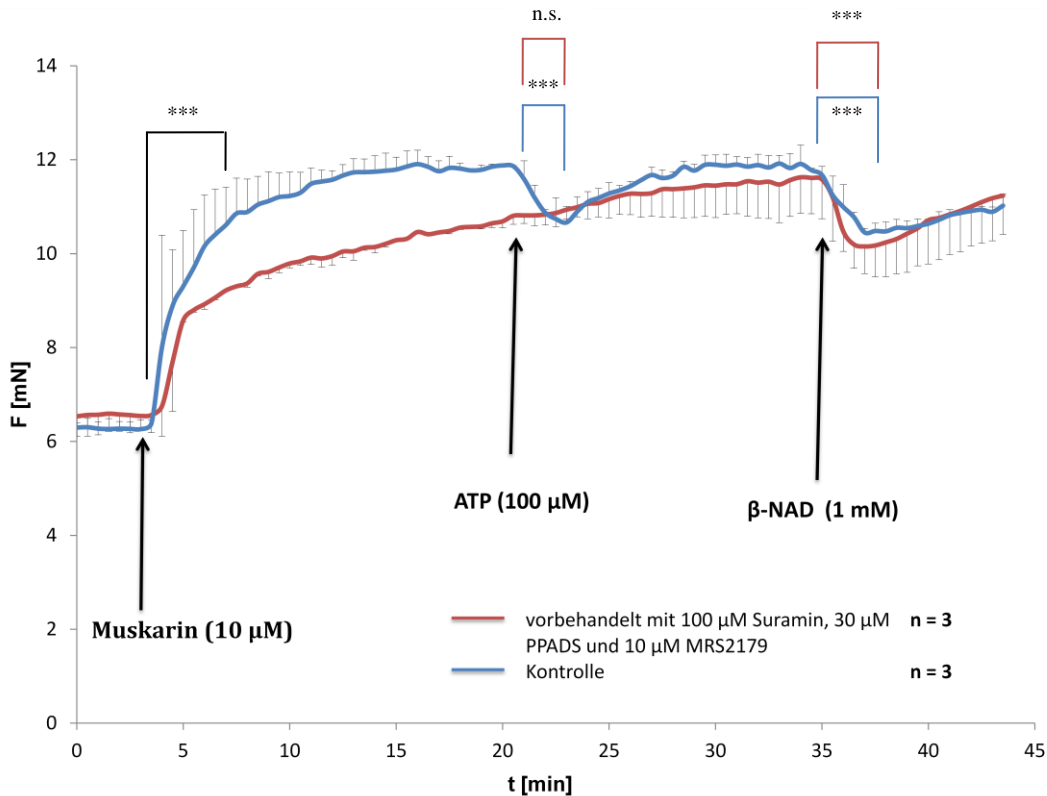


Abb. 3.11 Organbadversuche an Trachealsegmenten der Maus

Nach der Zugabe von 10 μM Muskarin kam es zu einer Kontraktion der Trachealmuskulatur, welcher sowohl 1 mM β-NAD als auch 100 μM ATP entgegenwirkten. Durch die Vorbehandlung mit den Inhibitoren von purinergen Rezeptoren 100 μM Suramin, 30 μM PPADS und 10 μM MRS2179 15 min vor der Zugabe von Muskarin konnte die ATP-induzierte Dilation gehemmt werden, während der Effekt von β-NAD konstant blieb. Stichprobenanzahl (n) gibt die Anzahl der benutzten Tracheen an. N.s. bedeutet nicht signifikant; *** entspricht einem p-Wert von < 0,001 (ungeparter t-Test).

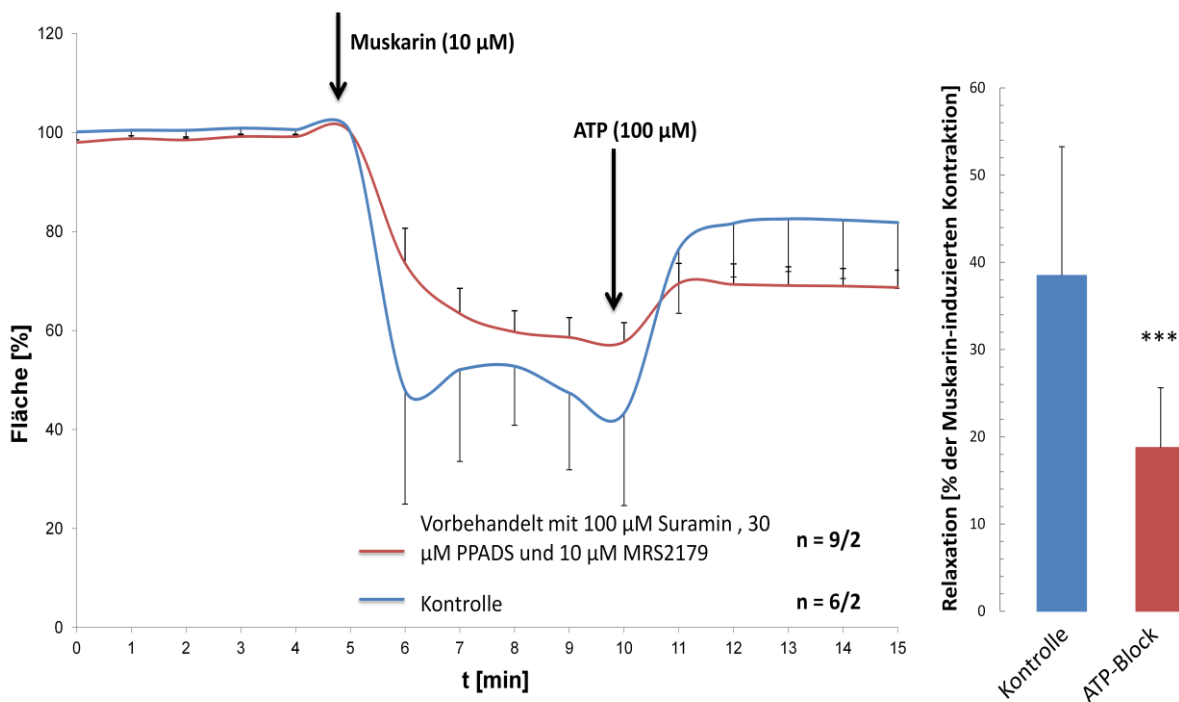
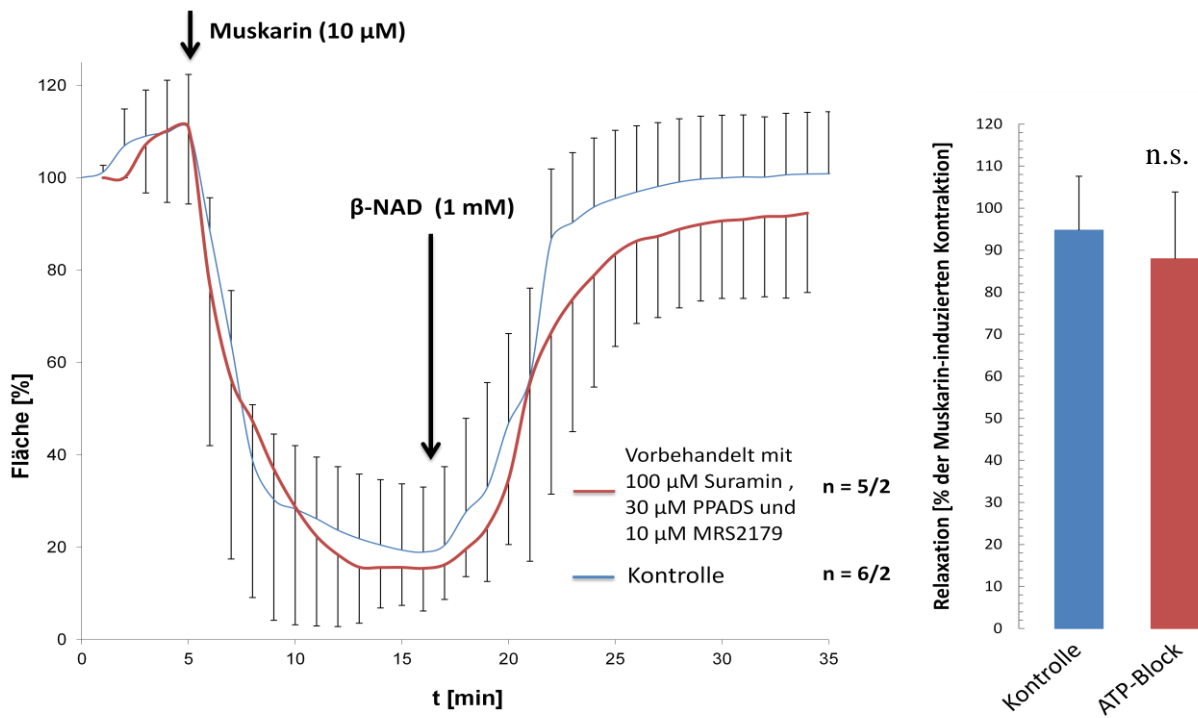


Abb. 3.12 Videomorphometrische Versuche an Bronchi der Maus in PCLS

Nach Zugabe von 10 µM Muskarin kam es zu einer Kontraktion, welcher 100 µM ATP entgegenwirkte. Die Vorbehandlung mit selektiven und nicht selektiven Inhibitoren von purinergen Rezeptoren 15 min vor dem Versuchsstart führte zu einer signifikanten Herabsetzung der ATP-Wirkung (unteres Diagramm), während die Wirkung von β -NAD

nicht vermindert wurde (oberes Diagramm). Die Balkendiagramme zeigen die statistische Auswertung, bei der die maximale Dilation der vorkontrahierten Bronchi bei dem jeweiligen Relaxans mit und ohne der Inhibitoren gegeneinander getestet wurde (ungepaarter *t*-Test; *N.s.* bedeutet nicht signifikant; *** entspricht einem *p*-Wert von $< 0,001$. Die Stichprobenanzahl (*n*): Anzahl der Schnitte/Anzahl der Tiere; ATP-Block war 100 μM Suramin, 30 μM PPADS und 10 μM MRS2179).

3.5 Der Effekt von β -NAD ist unabhängig von G_i - und G_s -Protein gekoppelten Rezeptoren sowie der PLC

In Organbadversuchen wurde der Effekt von β -NAD von CTX, einem Blocker der Alpha-Einheit von G_s -Protein gekoppelten Rezeptoren, und PTX, einem Blocker der Alpha-Einheit von G_i -Protein gekoppelten Rezeptoren, nicht beeinflusst (Abb. 3.13). Die Effektivität des CTX wurde anhand der Hemmung der Wirkung von Salbutamol, einem β_2 -Adrenozeptor-Agonisten, welcher bevorzugt G_s -Proteine aktiviert, kontrolliert (Abb. 3.14). Der Effekt von β -NAD wurde auch von 5 μM U-73122, einem PLC-Inhibitor, nicht beeinflusst (Abb. 3.15). Die PLC ist ein wichtiger Bestandteil des Signalweges von G_q -Protein gekoppelten Rezeptoren. So konnte die Wirksamkeit des Blockers durch eine geringere Muskarin-induzierte Kontraktion der Trachealsegmente nach Inkubation mit U-73122 geprüft werden, da angenommen werden kann, dass die geringere Kontraktion auf die Inhibition der mAChR₃ zurückzuführen ist, welche hauptsächlich für die cholinerge Kontraktion der glatten Muskulatur der Atemwege verantwortlich ist. Für die Kontraktion der Trachealsegmente in diesen Versuchen blieben unter anderem vorrangig mAChR₂, welche zu den G_i -Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören. Dieses wurde in Versuchen zum Nachweis der Wirkung von PTX ausgenutzt, da PTX G_i -Protein gekoppelte Rezeptoren inhibiert. Der gleichzeitige Einsatz von PTX und CTX führte zu einer noch geringeren Muskarin-induzierten Kontraktion der Trachealsegmente (Abb. 3.16).

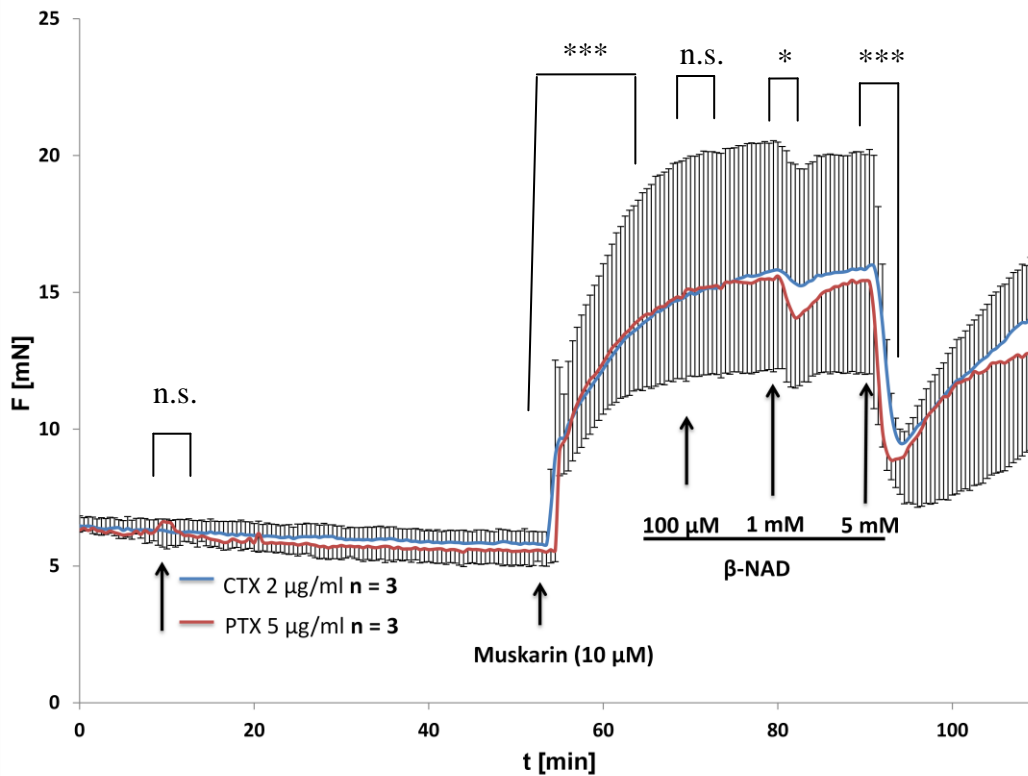


Abb. 3.13 Organbadversuche an Trachealsegmenten der Maus

Die Zugabe von 10 µM Muskarin führte zu einer Kontraktion der Trachealsegmente, welcher β-NAD abhängig von der Dosis entgegenwirkte. Die Behandlung sowohl mit 2 µg/ml CTX (blaue Kurve) als auch mit 5 µg/ml PTX (rote Kurve) beeinflusste die β-NAD-induzierte Dilation nicht. Stichprobenanzahl (n) gibt die Anzahl der benutzten Tracheen an. Statistische Auswertung gilt für beide Gruppen. N.s. bedeutet nicht signifikant; * entspricht einem p-Wert von < 0,05; *** entspricht einem p-Wert von < 0,001 (ungepaarter t-Test).

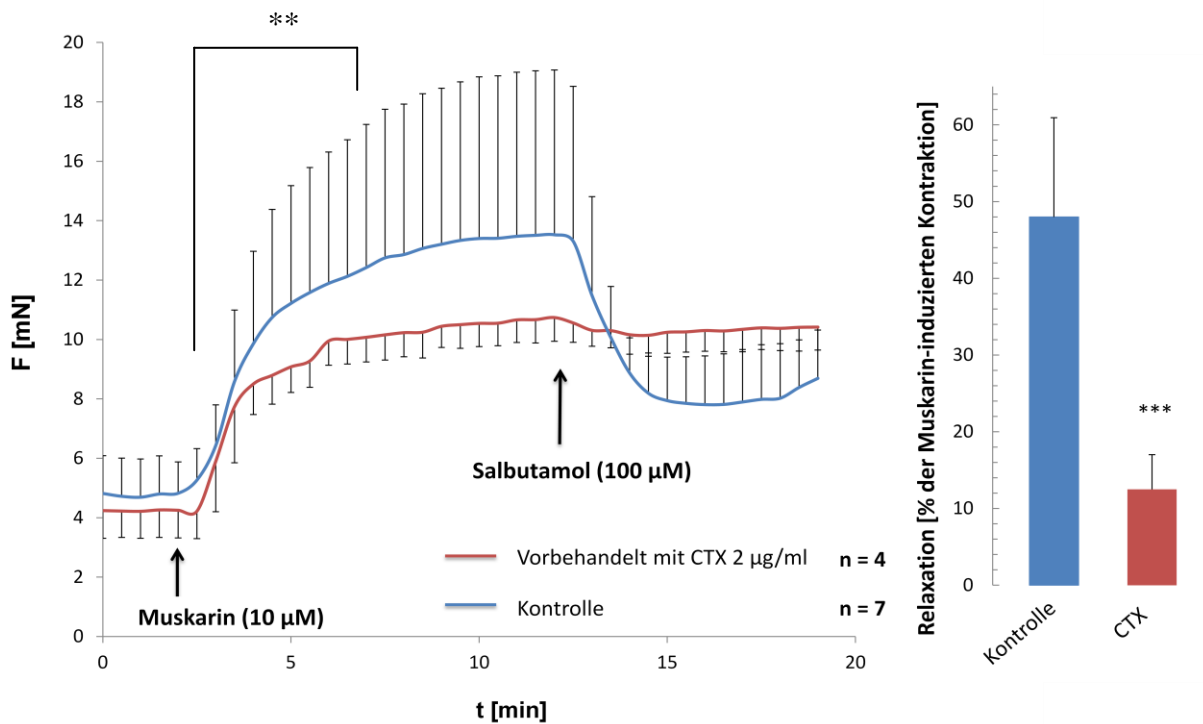


Abb. 3.14 Organbadversuche an Trachealsegmenten der Maus

Um die Wirksamkeit von CTX zu zeigen, wurde die Salbutamol-induzierte Dilation geblockt. Das Balkendiagramm zeigt die statistische Auswertung, bei der jeweils die maximale Salbutamol-induzierte Dilation mit (roter Balken) und ohne CTX-Vorbehandlung (blauer Balken) gegeneinander getestet wurde. Die Salbutamol-induzierte Dilation der vorkontrahierten Trachealsegmente war nach Zugabe von CTX signifikant vermindert. Stichprobenanzahl (n) gibt die Anzahl der benutzten Tracheen an. N.s. bedeutet nicht signifikant; ** entspricht einem p-Wert von $< 0,01$; *** entspricht einem p-Wert von $< 0,001$ (ungepaarter t-Test).

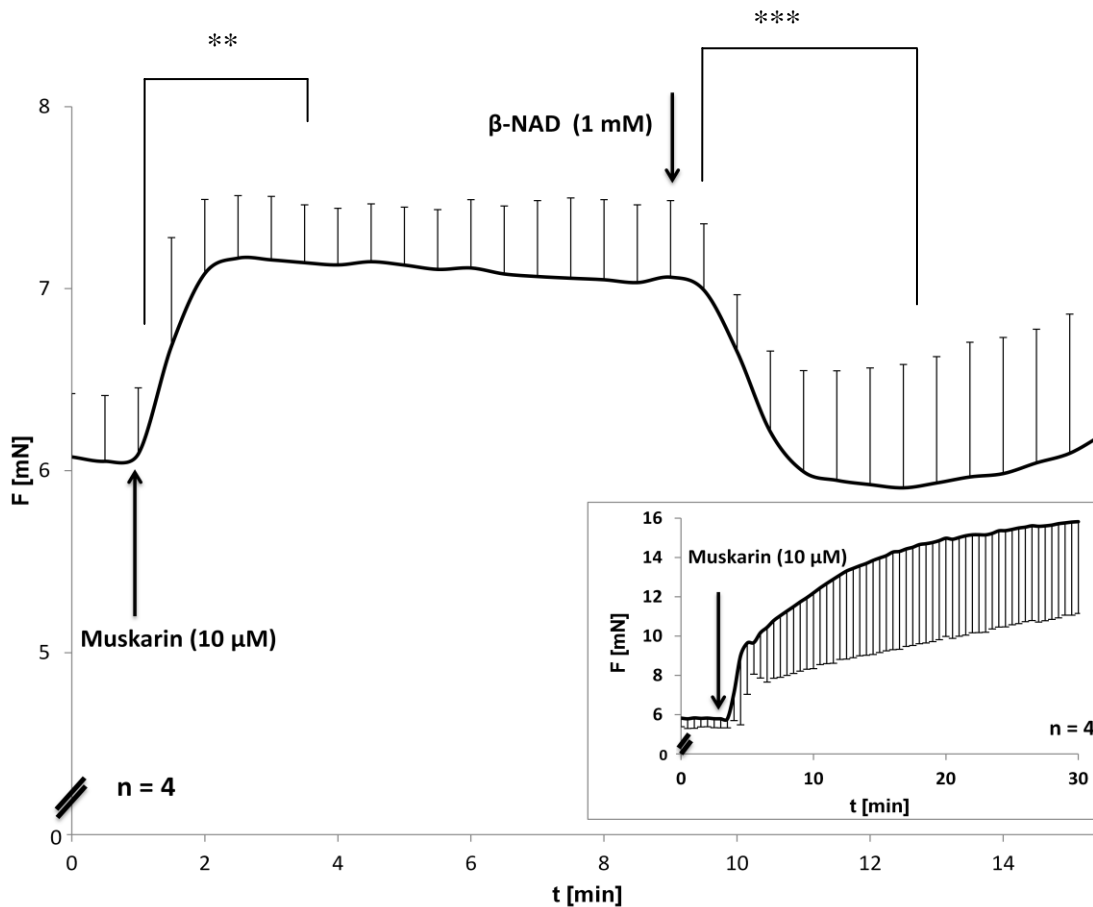


Abb. 3.15 Organbadversuche an Trachealsegmenten der Maus

Dargestellt sind Versuche mit Trachealsegmenten, welche 20 min vor der Zugabe von 10 μM Muskarin mit 5 μM U-73122 inkubiert wurden. Der Kraftanstieg nach Zugabe von 10 μM Muskarin betrug in Kontrollen ohne Inkubation mit U-73122 ~8-10 mN (Inset). Die nur sehr geringe Kontraktion durch Muskarin zeigte die Wirkung dieses Blockers. Der Effekt von 1 mM β-NAD war nach Zugabe von U-73122 stabil. Stichprobenanzahl (n) gibt die Anzahl der benutzten Tracheen an. ** entspricht einem p-Wert von < 0,01; *** entspricht einem p-Wert von < 0,001 (ungepaarter t-Test).

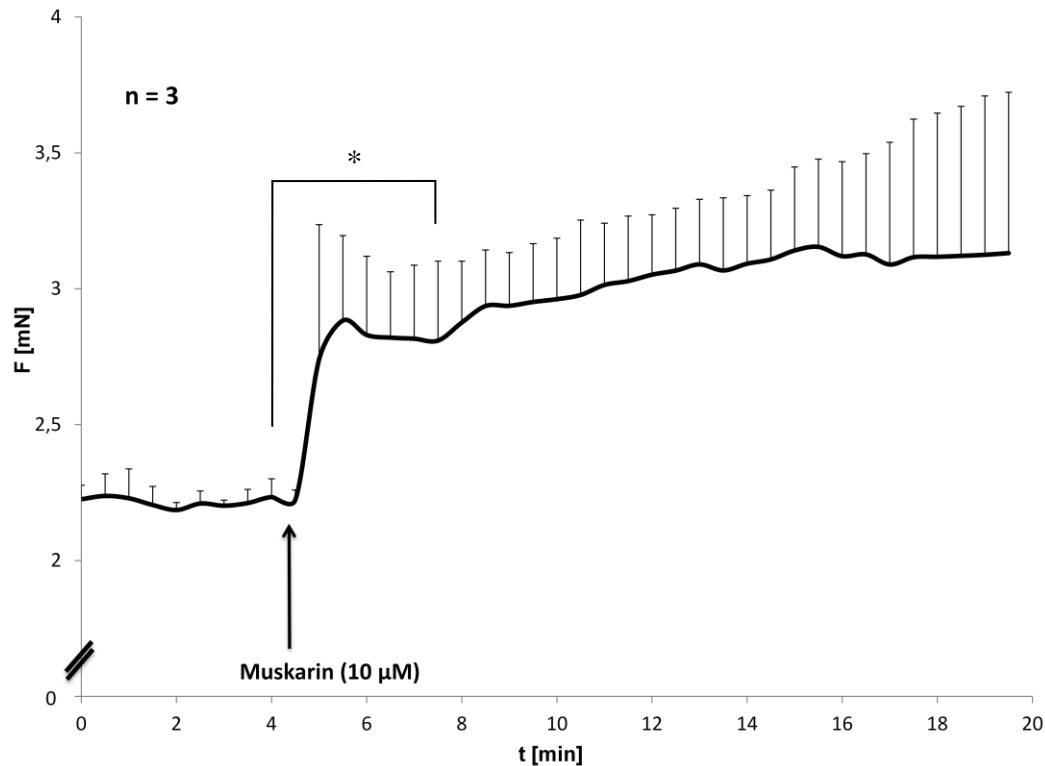


Abb. 3.16 Organbadversuche an Trachealsegmenten der Maus

Zum Nachweis der Wirksamkeit von PTX wurden 5 µg/ml PTX 1 h und U-73122 (5 µM) 15 min vor der Zugabe des Muskarins hinzugegeben. Die Muskarin-induzierte Kontraktion konnte dadurch stark gemindert werden im Vergleich zu nicht behandelten Trachealsegmenten (vergl. Inset in Abb. 3.15). Stichprobenanzahl (n) gibt die Anzahl der benutzten Tracheen an. * entspricht einem p-Wert von < 0,05 (ungepaarter t-Test).

Des Weiteren wurden in Organbadversuchen der generelle Adenosin-Rezeptor-Antagonist (A_1 und A_{2A}) 8-sPT, der Inhibitor der PKA, (RP)-cAMPS, und der Inhibitor der kalziumabhängigen Kaliumkanäle von geringer Leitfähigkeit, sogenannter SK-Kanäle, Apamin, eingesetzt. Auch in diesen Versuchen dilatierte β -NAD die Atemwege unverändert (Abb. 3.19).

3.6 G-Protein-unabhängige Signalwege der β -NAD-induzierten Relaxation

In Organbadversuchen beeinflusste der NO-Synthase-Inhibitor L-NAME die β -NAD-induzierte Dilatation nicht (Abb. 3.17).

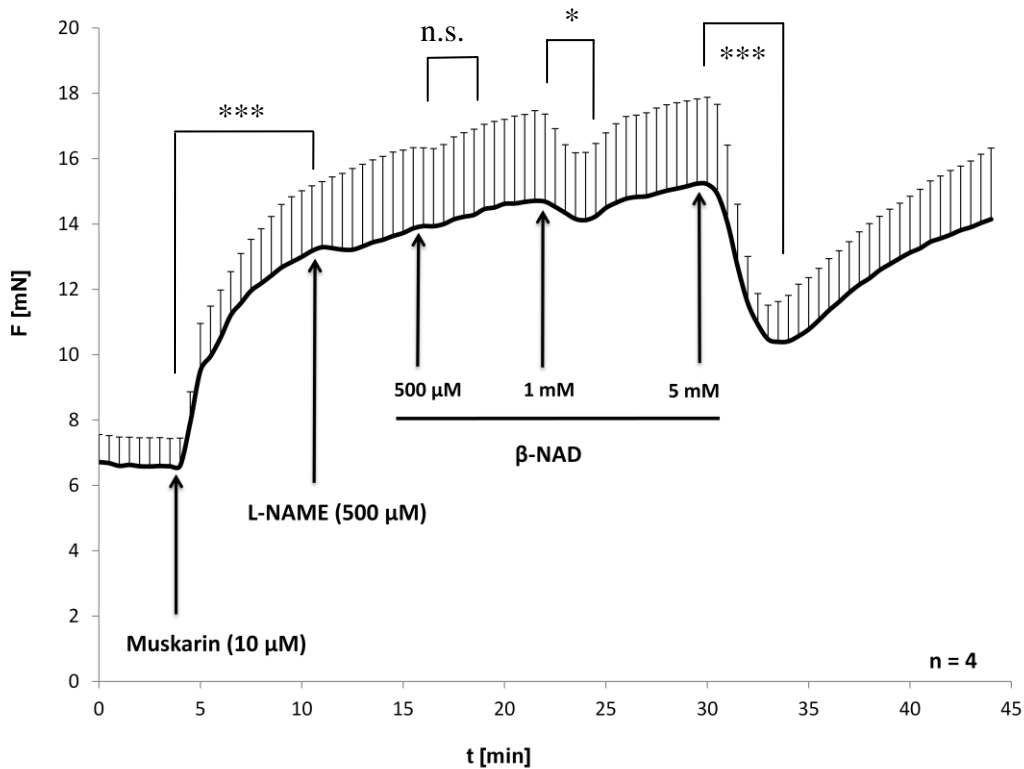


Abb. 3.17 Organbadversuche an Trachealsegmenten der Maus

Die Wirkung von β -NAD war nach Zugabe von L-NAME stabil. Stichprobenanzahl (n) gibt die Anzahl der benutzten Tracheen an. N.s. bedeutet nicht signifikant; * entspricht einem p -Wert von $< 0,05$; *** entspricht einem p -Wert von $< 0,001$ (ungepaarter t -Test).

In weiteren Experimenten fiel auf, dass die β -NAD-induzierte Dilatation nach der Zugabe des PDE-4-Blockers Rolipram (100 µM; Abb. 3.18) signifikant stärker ausfiel.

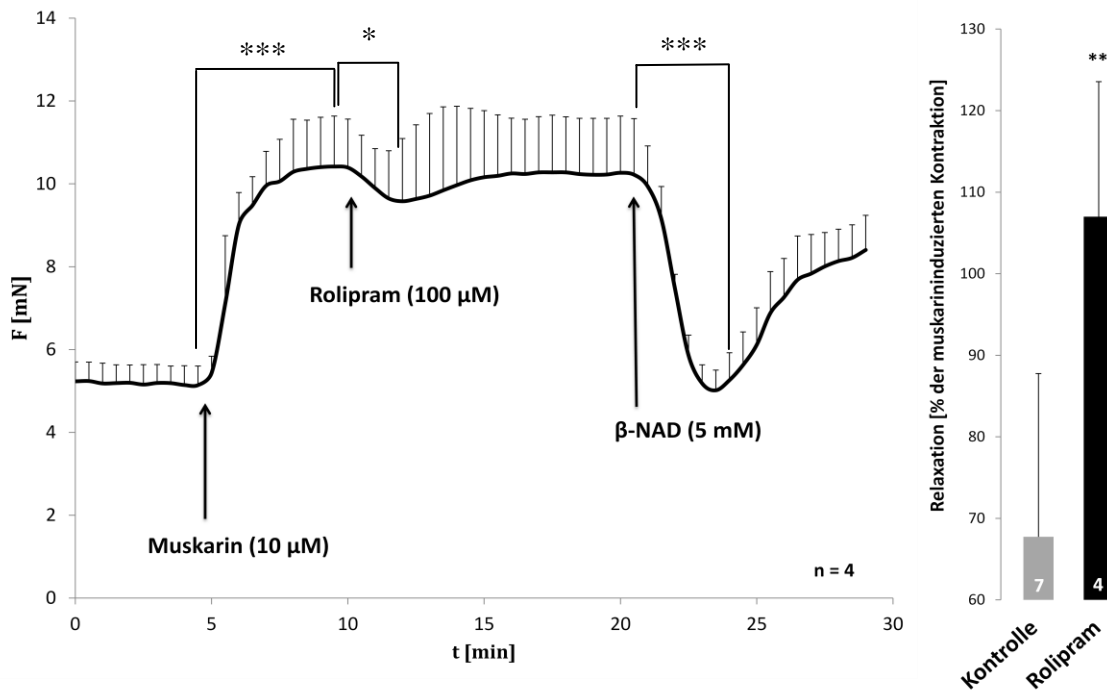


Abb. 3.18 Organbadversuche an Trachealsegmenten der Maus

Die Zugabe von Rolipram ($100 \mu\text{M}$) führte zu einer Dilation der durch Muskarin vorkontrahierten Trachealsegmente. Die Wirkung von 5 mM $\beta\text{-NAD}$ wurde in Anwesenheit des Roliprams nicht inhibiert. Das Balkendiagramm zeigt, dass 5 mM $\beta\text{-NAD}$ in Anwesenheit des Roliprams (schwarzer Balken) die Tracheen signifikant stärker dilatierte als in Abwesenheit des Roliprams im System (grauer Balken). Stichprobenanzahl (n im Kurvendiagramm, bzw. weiße Zahlen innerhalb der Balken) gibt die Anzahl der benutzten Tracheen an. * entspricht einem p -Wert von $< 0,05$; ** entspricht einem p -Wert von $< 0,01$; *** entspricht einem p -Wert von $< 0,001$ (ungepaarter t -Test).

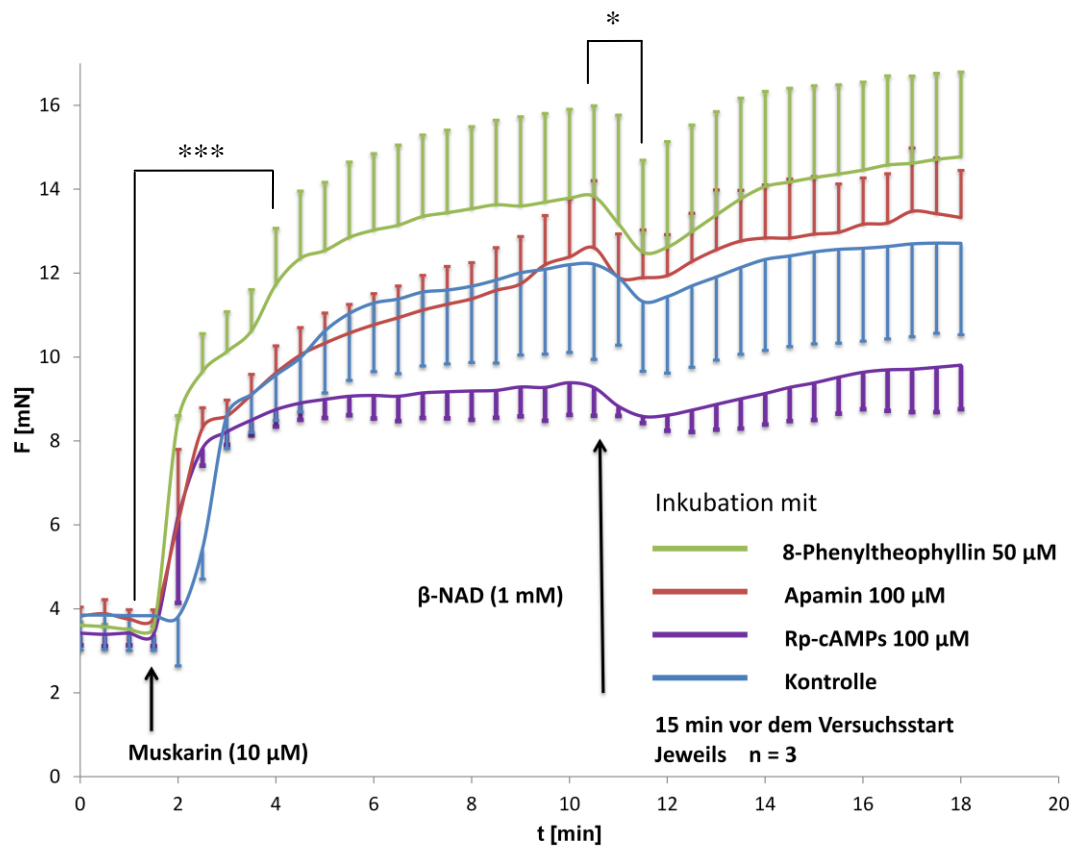


Abb. 3.19 Organbadversuche an Trachealsegmenten der Maus

Die Inkubation der Trachealsegmente mit 50 µM 8-Phenyltheophyllin, 100 µM Apamin und 100 µM Rp-cAMPs 15 min vor der Zugabe von 10 µM Muskarin führte zu keinem Unterschied der Wirkung von β-NAD im Vergleich zu unbehandelten Trachealsegmenten (blaue Kurve). Stichprobenanzahl (n) gibt die Anzahl der benutzten Tracheen an. * entspricht einem p-Wert von < 0,05; *** entspricht einem p-Wert von < 0,001 (ungepaarter t-Test), gilt für alle Gruppen.

Weiterhin konnte ein potenter Calmodulininhibitor, A-7-Hydrochlorid, der Dilation durch β-NAD nicht entgegenwirken. Da CaM einen wichtigen Bestandteil des Signalwegs der Kontraktion in glatten Muskelzellen darstellt, war die Muskarin-induzierte Kontraktion durch A-7-Hydrochlorid stark gehemmt (Abb. 3.20).

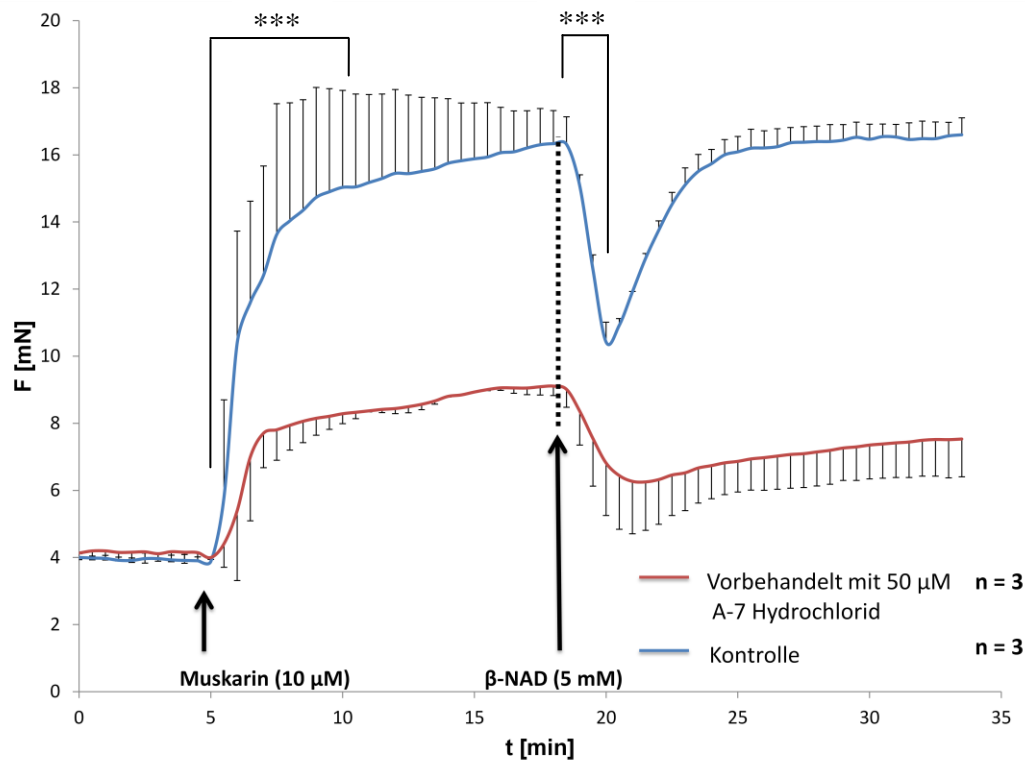


Abb. 3.20 Organbadversuche an Trachealsegmenten der Maus

Im Vergleich zu den unbehandelten Trachealsegmenten führte die Inkubation der Trachealsegmente mit 50 µM A-7-Hydrochlorid 15 min vor der Zugabe von 10 µM Muskarin zu einer Hemmung der Muskarin-induzierten Kontraktion, jedoch nicht der Dilation, welche durch 5 mM β-NAD zustande kam. Stichprobenanzahl (n) gibt die Anzahl der benutzten Tracheen an. Statistische Auswertung gilt für beide Gruppen. *** entspricht einem p-Wert von < 0,001 (ungepaarter t-Test).

Zum Einsatz kamen auch ML-7, ein potenter, ATP-kompetitiver und selektiver Inhibitor der Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK), und y-27632, ein Inhibitor der Rho-assoziierten Proteinkinase. Beide Blocker inhibierten wichtige Glieder im Signalweg der Muskarin-induzierten Kontraktion, wodurch diese geringer ausfiel. Die Dilation durch β-NAD blieb jedoch stets stabil (Abb. 3.21).

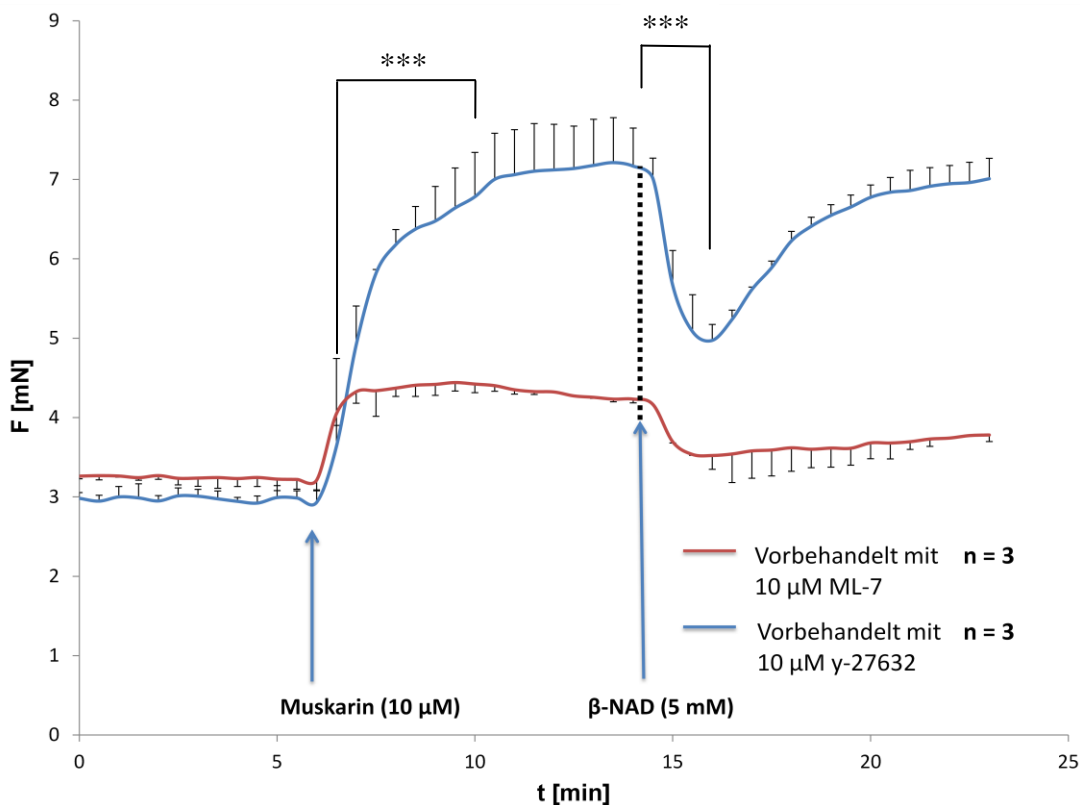


Abb. 3.21 Organbadversuche an Trachealsegmenten der Maus

Nach Inkubation der Trachealsegmente mit 10 μM ML-7 und γ -27632 war die durch 10 μM Muskarin induzierte Kontraktion vermindert (der Kraftanstieg nach Zugabe von 10 μM Muskarin beträgt in Kontrollen $\sim 8\text{-}10$ mN; vgl. Inset in Abb. 3.15), die Dilation nach Zugabe von β -NAD blieb erhalten. Stichprobenanzahl (n) gibt die Anzahl der benutzten Tracheen an. Statistische Auswertung gilt für beide Gruppen. *** entspricht einem p -Wert von $< 0,001$ (ungepaarter t -Test).

Der Effekt der benutzten Inhibitoren sowohl auf die mittels Muskarin induzierte Kontraktion der Tracheen als auch auf die β -NAD-induzierte Relaxation vorkontrahierter Tracheen wurde schließlich zusammenfassend betrachtet. Dazu wurde ein Algorithmus erstellt (Abb. 3.22), bei dem die Muskarin-induzierte Kontraktion in Anwesenheit von dem jeweiligen Inhibitor mit der Kontraktion ohne Inhibitoren in Relation gesetzt wurde (Abb. 3.23). Auch die β -NAD-induzierte Relaxation vorkontrahierter Tracheen wurde mit und ohne Inhibitoren verglichen (Abb. 3.24).

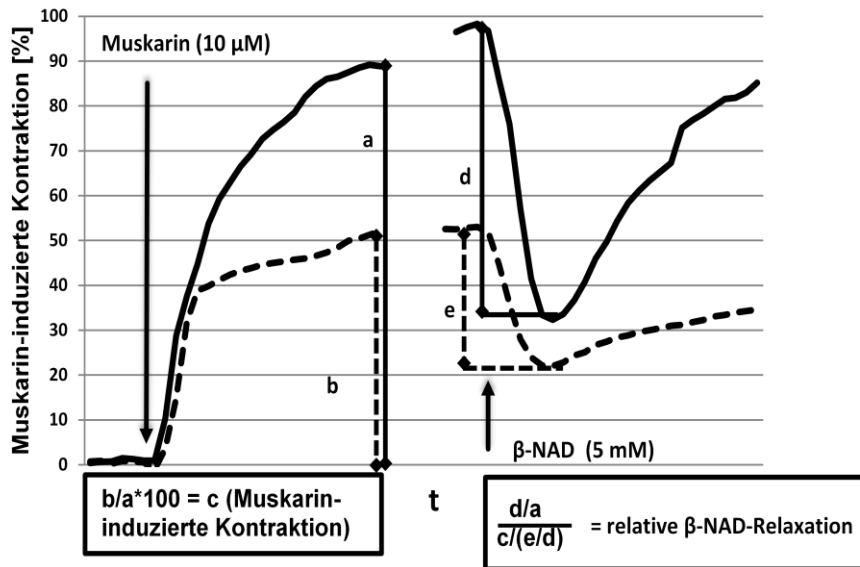


Abb. 3.22 Algorithmus zur Berechnung der relativen Muskarin-induzierten Kontraktion und der relativen β -NAD-induzierten Relaxation von Tracheen in Organbadversuchen.

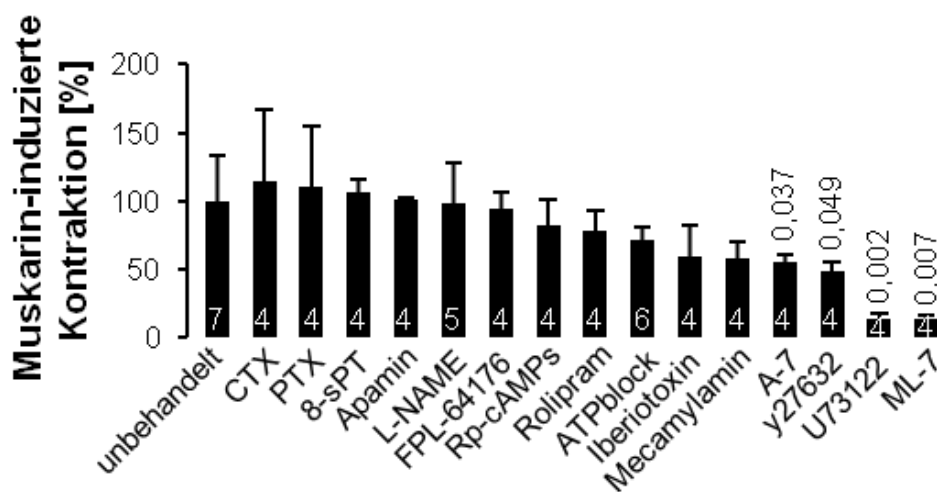


Abb. 3.23 Effekt der benutzten Substanzen auf die Muskarin-induzierte Kontraktion der Tracheen in Organbadversuchen.

Die relative Kontraktion nach Zugabe von 10 μ M Muskarin wurde als 100 % gesetzt (unbehandelt; siehe auch Abb. 3.22) Inhibition der MLCK durch ML-7, des Calmodullins durch A-7-Hydrochlorid, der Rho-Kinase durch y-27632 und der PKA durch rp-cAMPs reduzierte die Muskarin-induzierte Kontraktion signifikant. Die eingesetzten Konzentrationen der Substanzen sind in Tab 2.1 beschrieben; „ATPblock“

steht für die Substanzen PPADS, Suramin und MRS2179. Die P-Werte < 0,05 sind über den jeweiligen Säulen, die Stichprobenzahl in Weiß innerhalb der Säulen dargestellt.

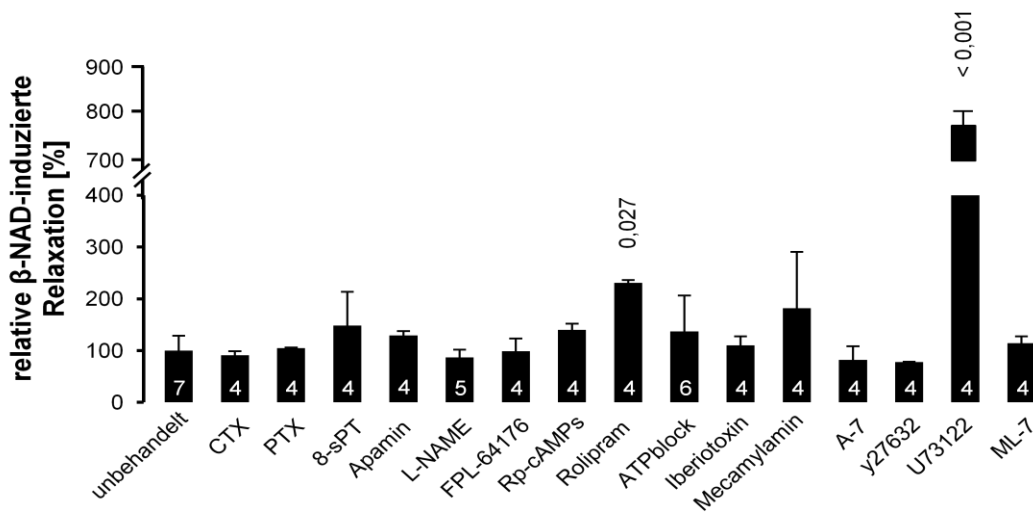


Abb. 3.24 Effekt der benutzten Substanzen auf die β -NAD-induzierte Relaxation auf vorkontrahierte Tracheen in Organbadversuchen.

Die relative Relaxation nach der Zugabe von 5 mM β -NAD wurde als 100 % gesetzt (unbehandelt; siehe auch Abb. 3.22). Rolipram und U73122 verstärkten die β -NAD-induzierte Relaxation signifikant. Die Konzentrationen der Substanzen sind in Tab 2.1 beschrieben; „ATPblock“ steht für die Substanzen PPADS, Suramin und MRS2179. Die P-Werte sind über den jeweiligen Blöcken, die Stichprobenzahl ist in Weiß innerhalb der Blöcke dargestellt.

3.7 Der Effekt von β -NAD ist unabhängig von dem Konstriktor der glatten Muskulatur

Um zu überprüfen, ob die relaxierende Wirkung von β -NAD abhängig von dem Konstriktor der glatten Muskulatur ist, wurden die Trachealsegmente in Organbadversuchen statt durch Zugabe von Muskarin durch Stimulation der ACh-Freisetzung aus den Nervenfasern mittels EFS zur Kontraktion gebracht (Abb. 3.25). In weiteren Versuchen wurde 60 mM KCl als Konstriktor genutzt, der über eine direkte Depolarisation der Muskulatur wirkt (Abb. 3.26). Es wurde jeweils β -NAD hinzugegeben, um die Segmente wieder zu dilatieren. Außerdem wurden Bronchien von Lungenschnitten in videomorphometrischen Experimenten mit 1 μ M U46619, einem

Agonisten des Thromboxan A₂-Rezeptors, zur Kontraktion gebracht. Auch die dadurch kontrahierten Bronchi konnten mittels β -NAD dilatiert werden (Abb. 3.27).

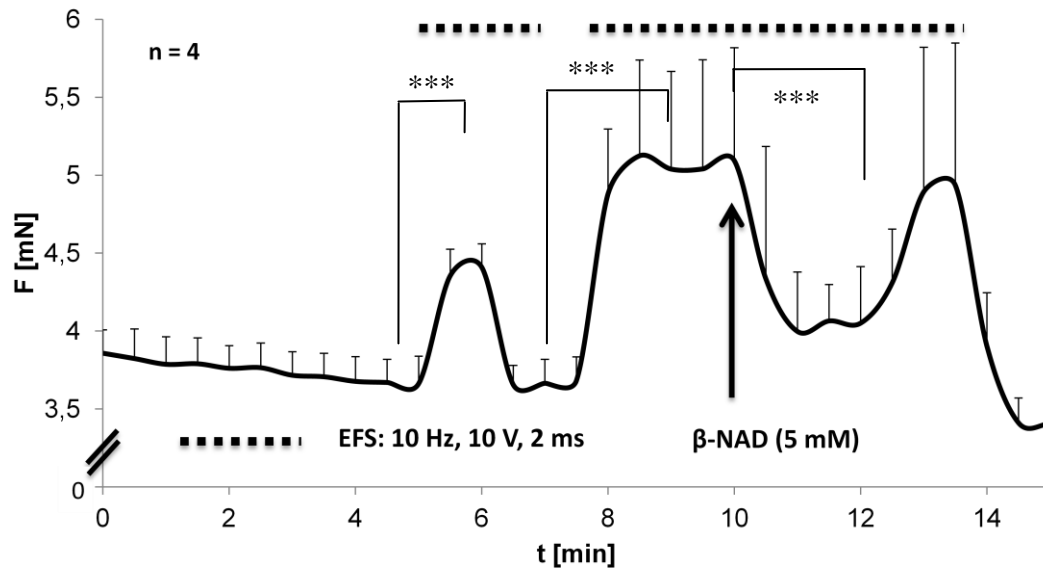


Abb. 3.25 Organbadversuche an Trachealsegmenten der Maus

Zum Sicherstellen der Muskelkontraktilität der Trachealsegmente wurden diese für eine Minute mittels EFS (10 Hz, 10 V, 2 ms) vorstimuliert. Nachfolgend wurden die Segmente für eine Dauer von 6 min stimuliert. Während der Stimulation wurde 1 mM β -NAD hinzugegeben, welches eine Dilation bewirkte. Stichprobenanzahl (n) gibt die Anzahl der benutzten Tracheen an. *** entspricht einem p-Wert von < 0,001 (ungepaarter t-Test).

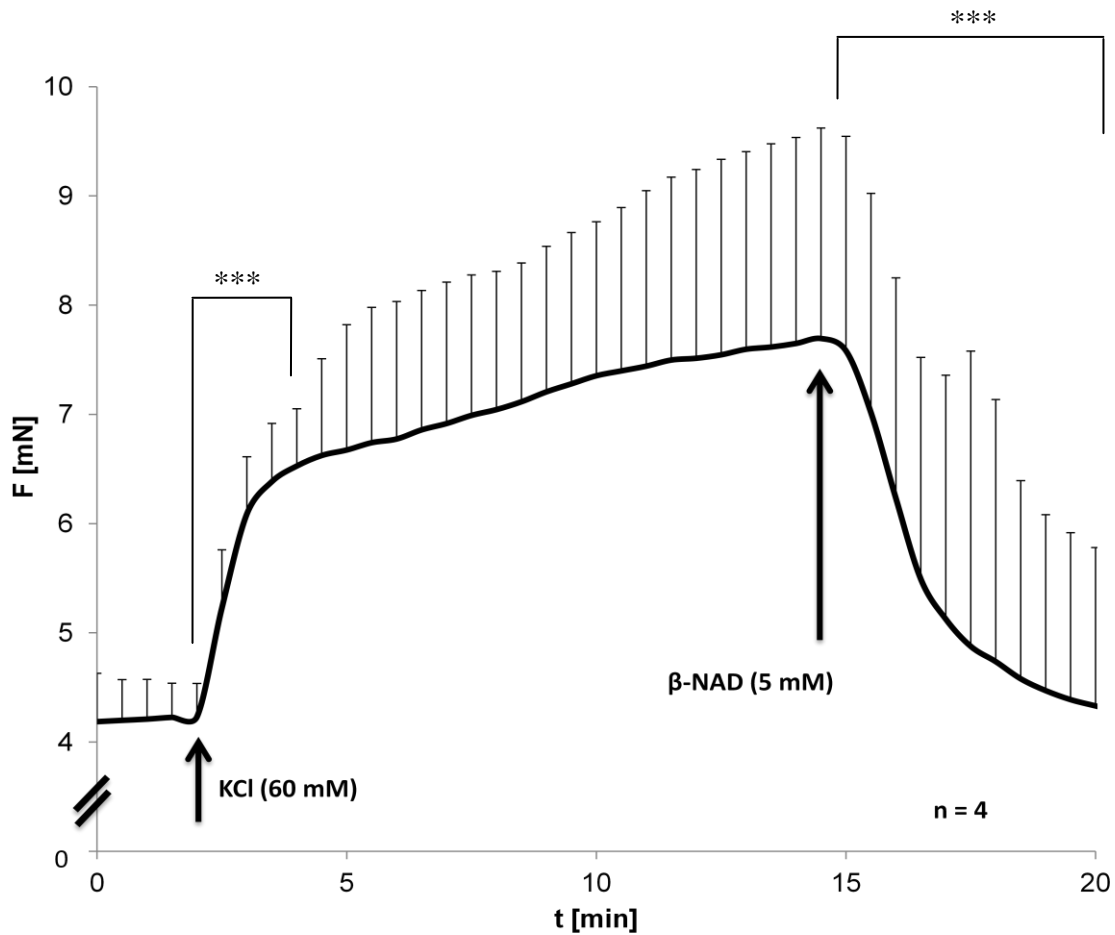


Abb. 3.26 Organbadversuche an Trachealsegmenten der Maus

Nach der Zugabe von 60 mM KCl kam es zu einer Kontraktion der Trachealsegmente. 5 mM β-NAD dilatierte diese. Stichprobenanzahl (n) gibt die Anzahl der benutzten Tracheen an. *** entspricht einem p-Wert von < 0,001 (ungepaarter t-Test).

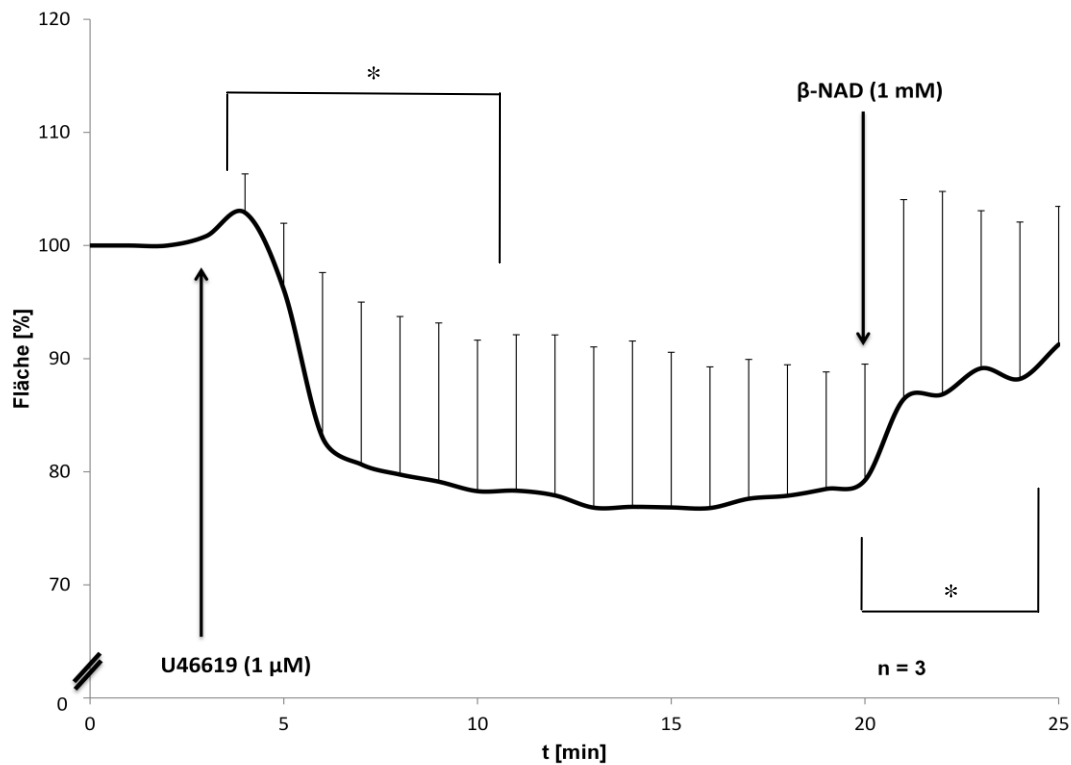


Abb. 3.27 Videomorphometrische Versuche an Bronchi der Maus

Nach der Zugabe von 1 µM U46619 kam es zu einer Kontraktion der Bronchi. 1 mM β-NAD dilatierte diese. Die Stichprobenanzahl (n) gibt die Anzahl der benutzten Tracheen an. * entspricht einem p-Wert von < 0,05 (ungepaarter t-Test).

3.8 Die durch β-NAD hervorgerufene Dilation ist vergleichbar mit dem Effekt von Salbutamol in Atemwegen der Maus

Salbutamol ist ein kurzwirksamer β₂-Adrenozeptoragonist und wird als Spasmolytikum der glatten Muskulatur bei Asthma bronchiale und COPD eingesetzt (Cullum et al., 1969). Die Wirkung dieses auf β₂-Adrenorezeptoren einwirkenden Therapeutikums wurde mit dem dilatierenden Effekt von β-NAD sowohl in Organbadversuchen an Trachealsegmenten (Abb. 3.28) als auch in videomorphometrischen Versuchen an Bronchi von Lungenschnitten jeweils in der maximal effektiven Dosis verglichen (Abb. 3.29). Hier zeigte sich, dass 7 mM β-NAD die durch 10 µM Muskarin vorkontrahierte Trachealmuskulatur vergleichbar stark dilatierte wie 500 µM Salbutamol. In Bronchi von Lungenschnitten ist der Effekt von 1 mM β-NAD potenter als der Effekt von 100 µM

Salbutamol. Zusätzlich trat die Dilatation nach 100 μM Salbutamol langsamer ein als nach 1 mM $\beta\text{-NAD}$.

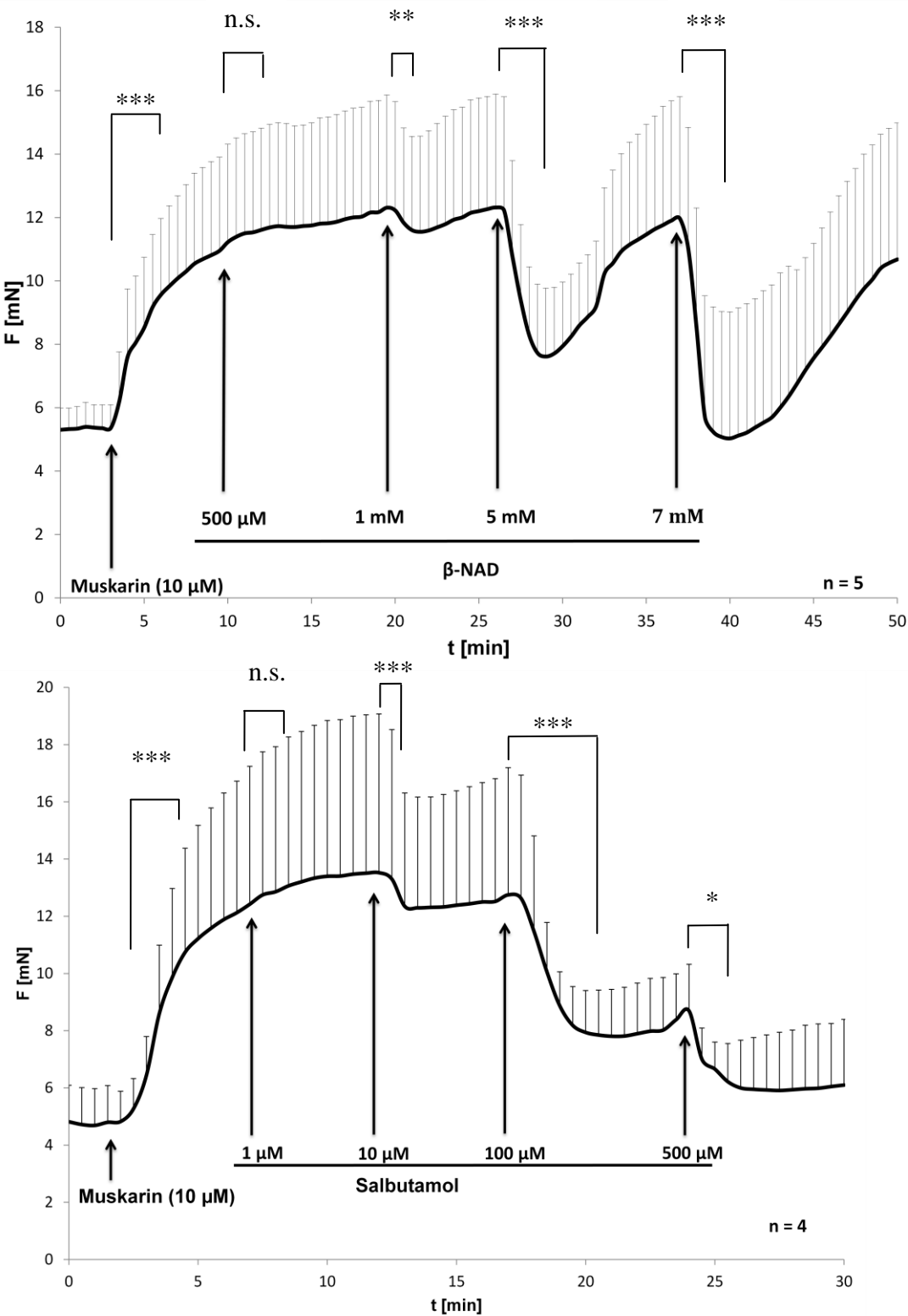


Abb. 3.28 Organbadversuche an Trachealsegmenten der Maus

Nach der Zugabe von 10 μM Muskarin kam es zu einer Kontraktion der Trachealsegmente. Die Zugabe $\beta\text{-NAD}$ (oberes Diagramm), beziehungsweise Salbutamol (unteres Diagramm) in verschiedenen Konzentrationen führte zur Dilation. Die $\beta\text{-NAD}$ -induzierte Relaxation erreichte den Zustand vor der Kontraktion durch Muskarin, relaxierte die Tracheen also komplett, während die Salbutamol induzierte Relaxation 87 % der Muskarin-induzierten Kontraktion betrug. Die Stichprobenanzahl (n) gibt die Anzahl der benutzten Tracheen an. N.s. bedeutet nicht signifikant; * entspricht einem p -Wert von $< 0,05$; ** entspricht einem p -Wert von $< 0,01$; *** entspricht einem p -Wert von $< 0,001$ (ungepaarter t -Test).

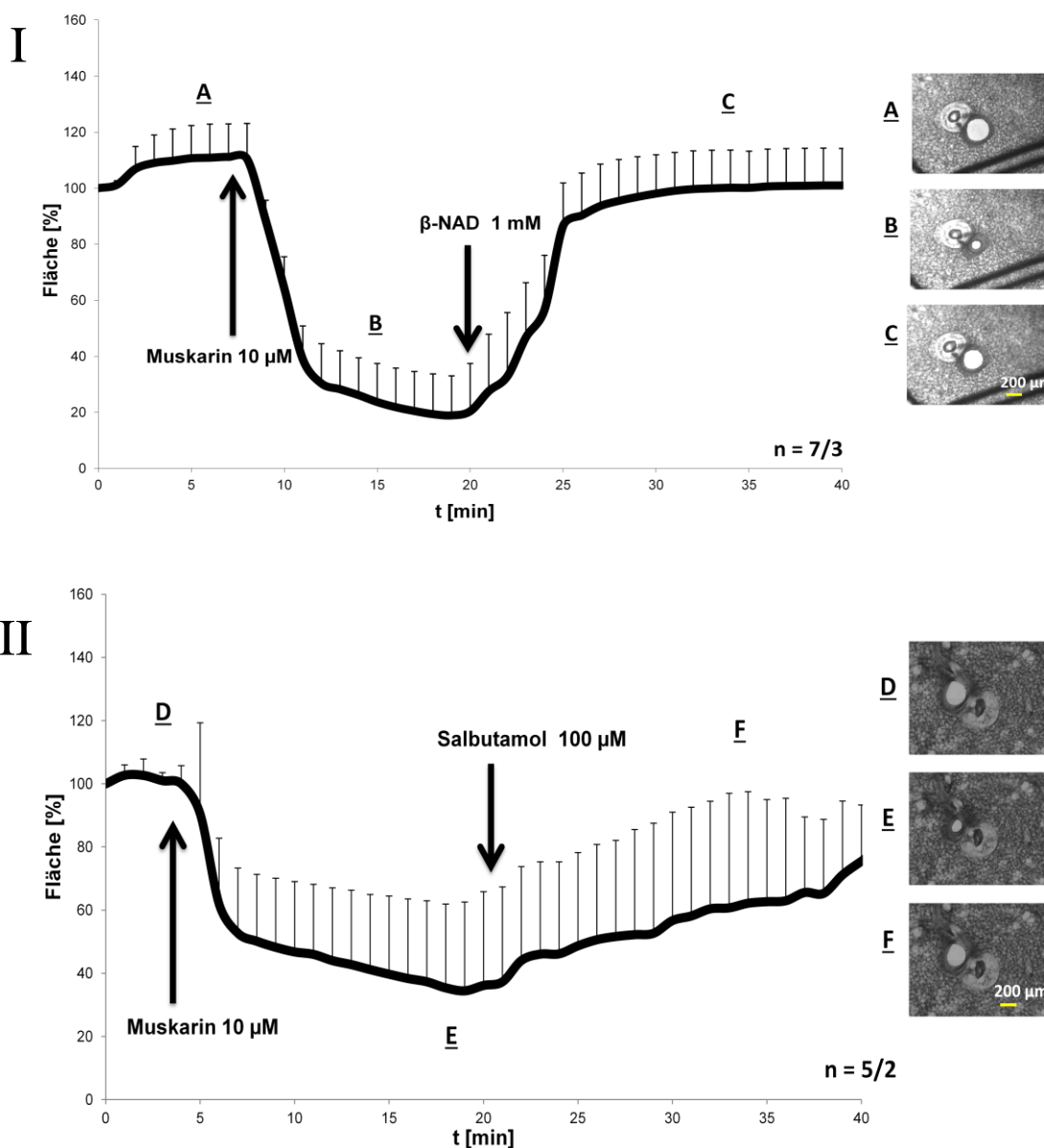


Abb. 3.29 Videomorphometrische Versuche an Bronchi der Maus in PCLS

I zeigt die Dilation der durch 10 μM Muskarin vorkontrahierten Bronchi nach der Zugabe von 1 mM $\beta\text{-NAD}$. Die Aufnahmen A-C zeigen einen dilatierten Bronchus vor

der Zugabe von 10 μM Muskarin (A), welcher nach der Zugabe von 10 μM Muskarin kontrahierte (B) und nach der Zugabe von 1 mM $\beta\text{-NAD}$ komplett dilatiert wurde (C).

II zeigt die Dilation der durch 10 μM Muskarin kontrahierten Bronchi nach Zugabe von 100 μM Salbutamol. Dieser Effekt trat langsamer ein als der durch 1 mM $\beta\text{-NAD}$ induzierte. Die Aufnahmen D-F zeigen einen dilatierten Bronchus vor der Zugabe von 10 μM Muskarin (A), welcher nach der Zugabe von 10 μM Muskarin kontrahiert (B) und nach der Zugabe von 100 μM Salbutamol komplett dilatiert wurde (F).

3.9 $\beta\text{-NAD}$ führt zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration in der glatten Bronchialmuskulatur des Menschen durch die lösliche AC

Zur Klärung des Signalweges von $\beta\text{-NAD}$ wurden FRET-Messungen an mit einem cAMP-Sensor transfizierten glatten Muskelzellen des menschlichen Atemtraktes durchgeführt. In diesen Versuchen kam es nach der Zugabe von $\beta\text{-NAD}$ zu einem Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels (Abb. 3.30). Nach Zugabe des β_2 -Adrenozeptoragonisten Isoproterenol, welche als Positivkontrolle eingesetzt wurde, kam es zu einer additiven Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels.

Der Einsatz von KH7 (30 μM), eines Inhibitors der löslichen AC, konnte den $\beta\text{-NAD}$ -induzierten Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels aufheben, während Isoproterenol weiterhin einen Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels bewirkte (Abb. 3.31).

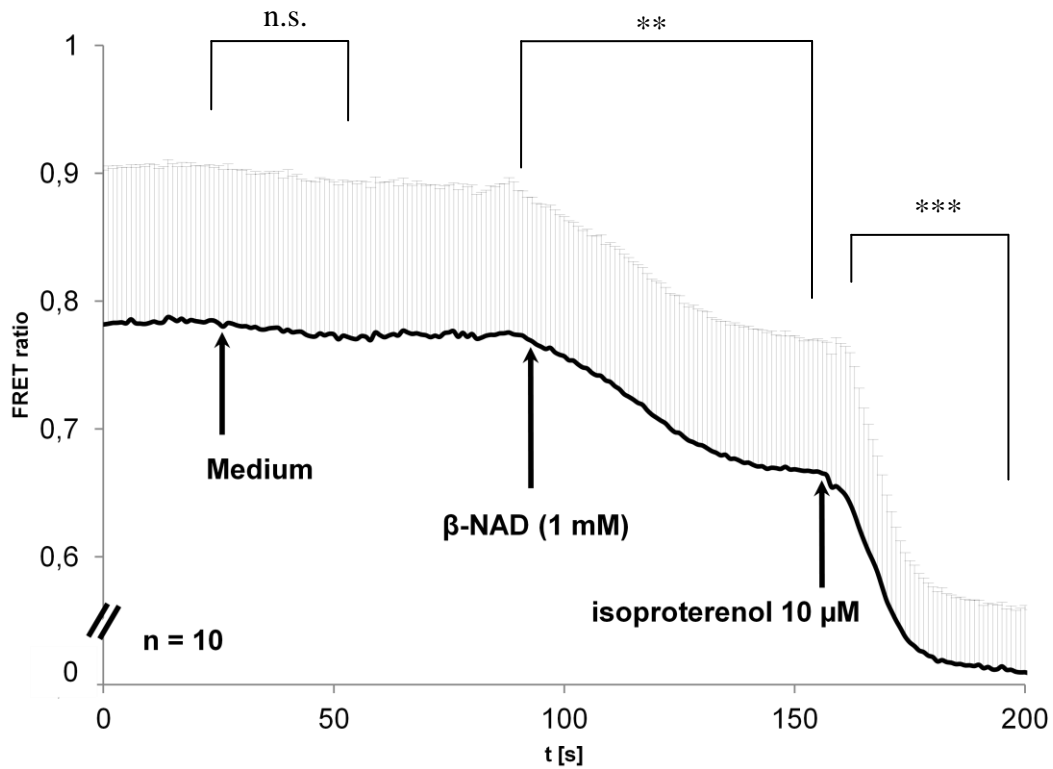


Abb. 3.30 *cAMP-Messungen in glatten Muskelzellen des menschlichen Bronchialsystems*

Die Zugabe von β -NAD führte zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration. Als Negativkontrolle diente das Medium, in welchem das β -NAD gelöst wurde, als Positivkontrolle diente Isoproterenol. Stichprobenanzahl (n): Anzahl der gemessenen Zellen. N.s. bedeutet nicht signifikant; ** entspricht einem p -Wert von $< 0,01$; *** entspricht einem p -Wert von $< 0,001$ (ungepaarter t -Test).

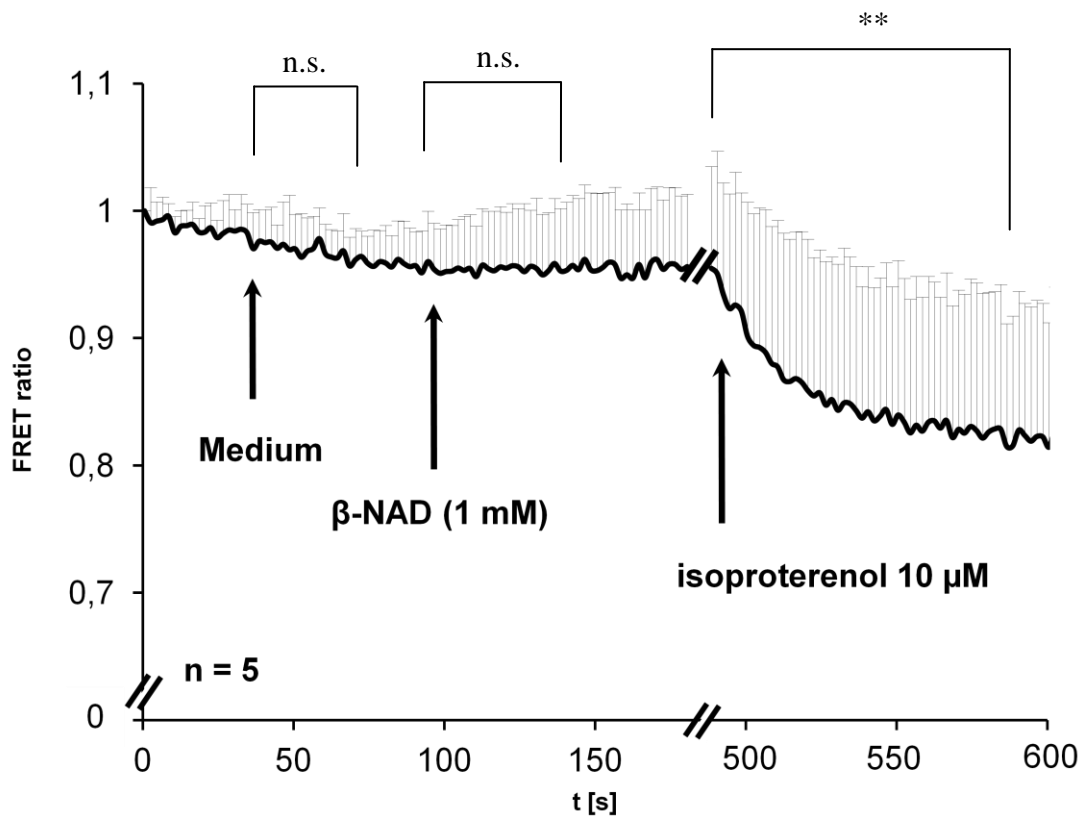


Abb. 3.31 *cAMP-Messungen in glatten Muskelzellen des menschlichen Bronchialsystems nach Zugabe von KH7 (30 μ M)*

Die Zugabe von β -NAD führte zu keiner Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration, während die Konzentrationserhöhung des intrazellulären cAMP nach Zugabe des Isoproterenols noch bestand. Als Negativkontrolle diente das Medium, in welchem das β -NAD gelöst wurde. Die Stichprobenanzahl (n): Anzahl der gemessenen Zellen. N.s. bedeutet nicht signifikant; ** entspricht einem p-Wert von $<0,01$ (ungepaarter t-Test).

3.10 Die β -NAD-induzierte Relaxation ist abhängig von der löslichen AC

Um zu überprüfen, ob die lösliche AC an der Relaxation der glatten Muskelzellen in Mastracheen beteiligt ist, wurden Organbadversuche in Anwesenheit von KH7, einem Inhibitor der löslichen AC, durchgeführt. In diesen Versuchen zeigte sich tatsächlich eine signifikant reduzierte β -NAD-induzierte Relaxation der Mastracheen. Die Salbutamol-induzierte Relaxation wurde hingegen von KH7 nicht beeinflusst (Abb. 3.32).

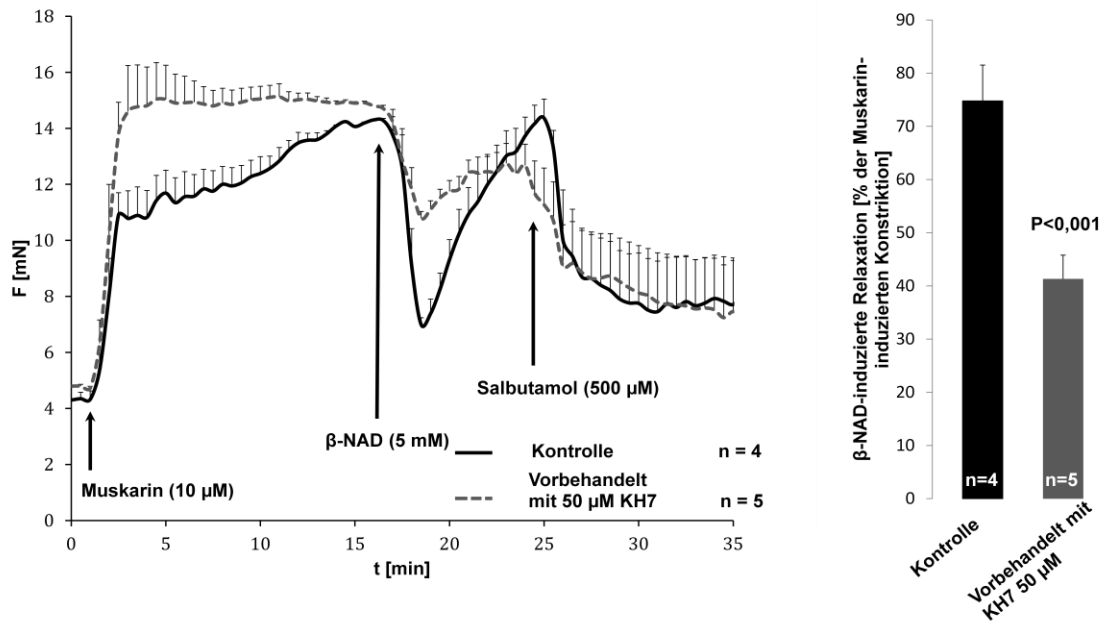


Abb. 3.32 Organbadversuche an Trachealsegmenten der Maus

In Anwesenheit von 50 μM KH7 ist die β -NAD-induzierte Relaxation signifikant reduziert im Vergleich zu der Kontrollgruppe, während die Salbutamol-induzierte Relaxation unbeeinflusst bleibt. Das Balkendiagramm zeigt, dass 5 mM β -NAD in Anwesenheit von KH7 (grauer Balken) die Tracheen signifikant schwächer relaxierte als in Abwesenheit des Inhibitors (schwarzer Balken). Stichprobenanzahl (n im Kurvendiagramm, bzw. weiße Zahlen innerhalb der Balken) gibt die Anzahl der benutzten Tracheen an.

3.11 β -NAD führt zu einer Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und einer Depolarisation in glatten Atemwegmuskelzellen der Maus

Zur weiteren Abklärung des Signalweges der β -NAD-induzierten Dilation wurden Messungen des intrazellulären Kalziums in glatten Muskelzellen der Atemwege durchgeführt. Außerdem wurden simultane Messungen des intrazellulären Kalziums, des Membranpotenzials und der luminalen Fläche an der glatten Muskulatur der Bronchi in Lungenschnitten durchgeführt. In diesen Versuchen zeigte sich, dass eine Zugabe von β -NAD zu einem Anstieg des intrazellulären Kalziums in isolierten und kultivierten glatten Muskelzellen der Maustrachea führte (Abb. 3.33 und Abb. 3.34).

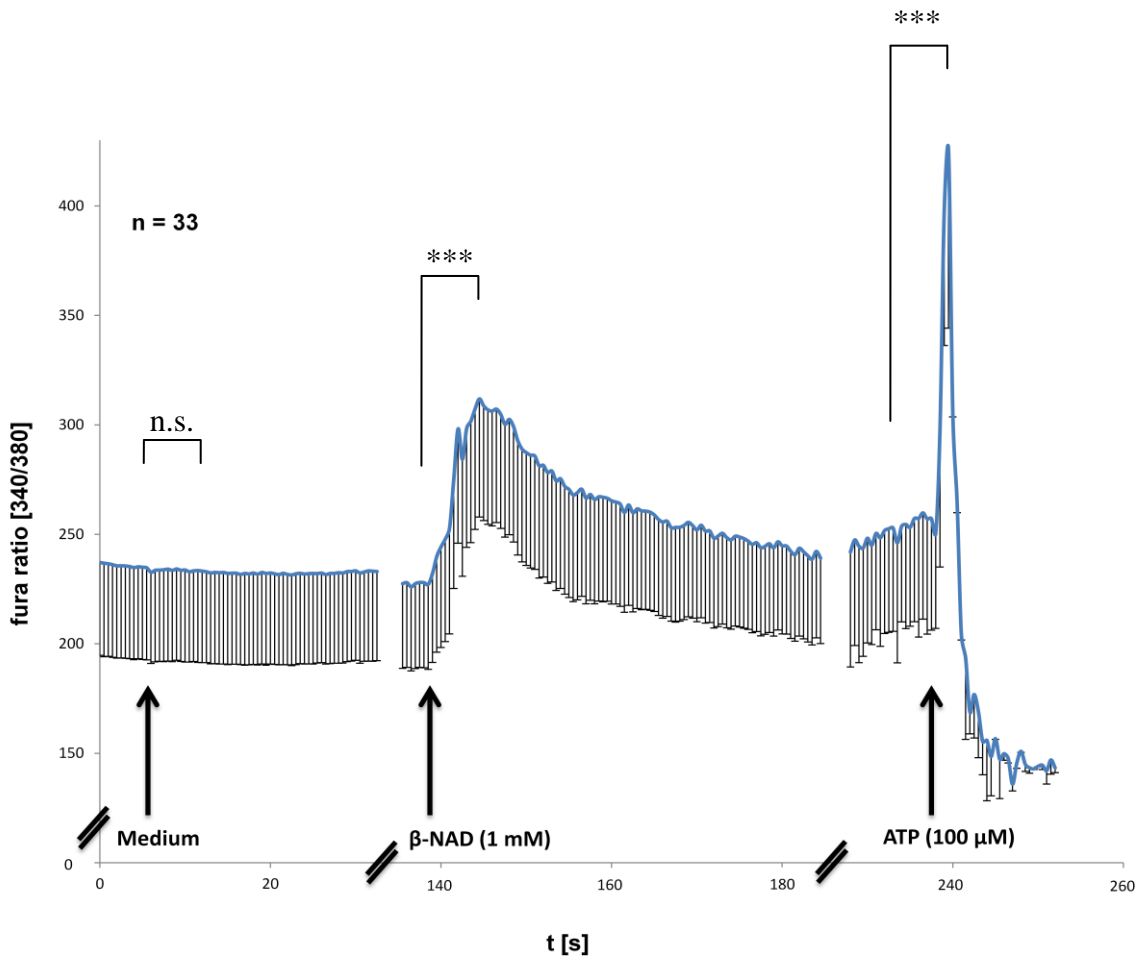


Abb. 3.33 Kalziummessungen in isolierten glatten Muskelzellen der Maustrachea

Die Zugabe von β -NAD führte zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$. Als Negativkontrolle diente das Medium, in welchem das β -NAD gelöst wurde, als Positivkontrolle dienten $100 \mu\text{M}$ ATP. Stichprobenanzahl (n): Anzahl der reagierenden Zellen. N.s. bedeutet nicht signifikant; *** entspricht einem p -Wert von $< 0,001$ (ungepaarter t -Test).

Die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ erfolgte in drei unterschiedlichen Mustern: Von 26 Zellen reagierten acht auf die Zugabe von 1 mM β -NAD mit einer raschen Erhöhung, welche schnell nachließ, 12 Zellen zeigten eine langsame Zunahme des $[Ca^{2+}]_i$, welche nach einem Plateau wieder nachließ, und wiederum 6 hatten eine zweigeteilte Erhöhung, zuerst eine schnelle, dann eine langsame (Abb. 3.34).

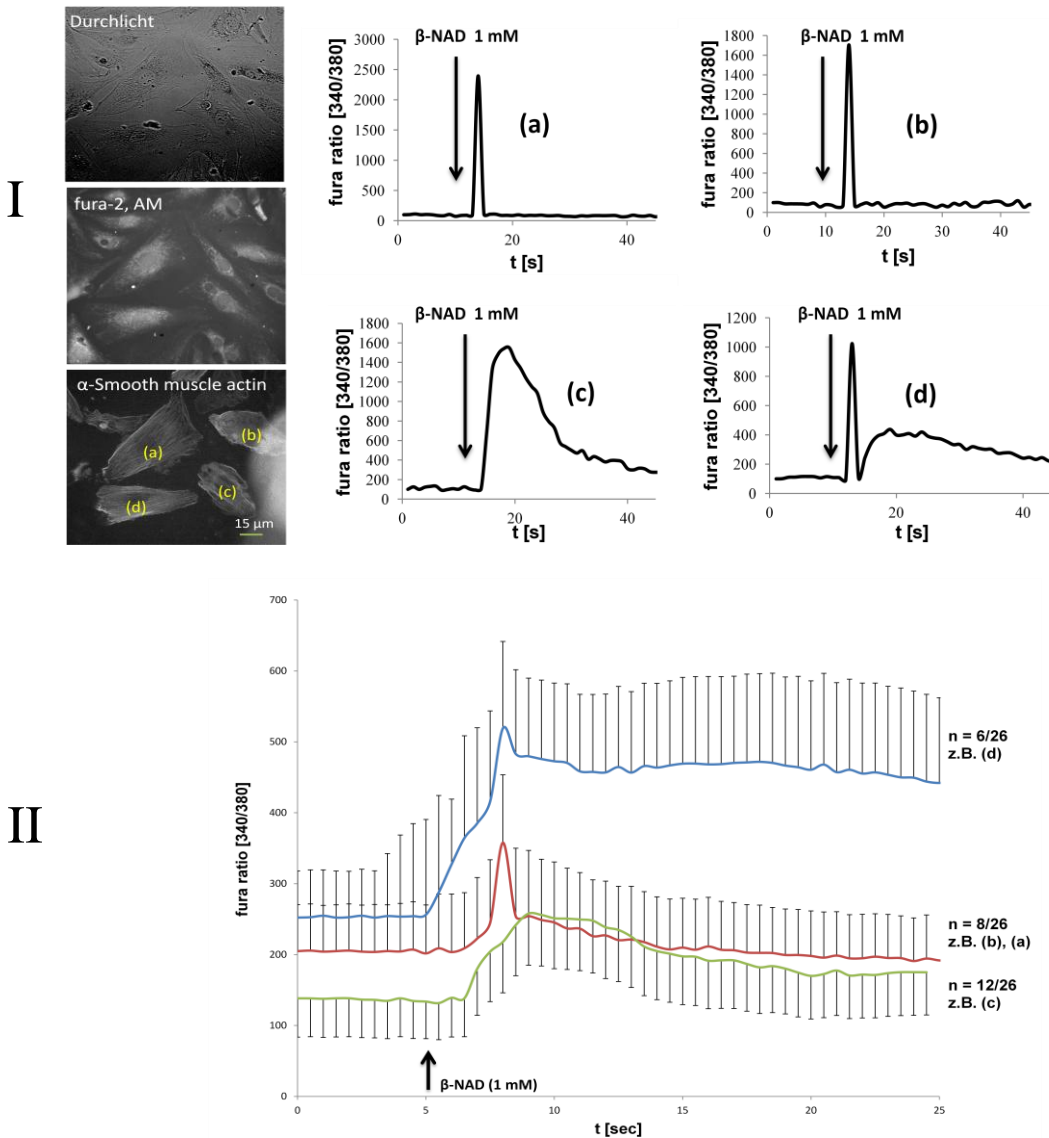


Abb. 3.34 Kalziummessungen an kultivierten glatten Muskelzellen der murinen Trachea

Dargestellt sind unterschiedliche Profile der Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ nach der Zugabe von 1 mM β -NAD in verschiedenen Fraktionen der Zellen. In den Mikroskopie-Bildern sind beispielhaft Zellen gezeigt, welche trotz Nähe und keines sichtbaren Unterschieds im Phänotyp unterschiedliche Profile der $[Ca^{2+}]_i$ -Veränderungen aufweisen (I Einzelkurven für die einzelnen Zellen a-d; II zusammenfassende Kurven mehrerer Zellen). Eine immunhistochemische Untersuchung der Zellen mit einem Antikörper gegen α -Smooth muscle actin wurde nach dem Versuch durchgeführt, um zu überprüfen, ob es sich um glatte Muskelzellen handelt (Mikroskopie-Bilder in I). Stichprobenanzahl (n): Anzahl der reagierenden Zellen/Gesamtanzahl der Zellen

Ferner konnte gezeigt werden, dass die β -NAD-induzierte Dilation der Bronchialmuskulatur gleichzeitig mit einer Erhöhung des Membranpotenzials und des intrazellulären Kalziums geschieht (Abb. 3.35): Nach Zugabe von Muskarin kam es zu einer Verringerung der Fläche der Bronchi in PCLS. Diese Konstriktion ging mit einem schnellen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ einher, die nach kurzer Zeit wieder sank, jedoch nicht ihren Ausgangspunkt erreichte. Außerdem induzierte die Muskarin-gabe eine Depolarisation der Zellmembran glatter Muskelzellen derselben PCLS, welche kurz anhielt und sich wieder zurückbildete.

Die Zugabe von β -NAD induzierte eine langsame Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$, welche länger anhielt und sich zu dem Ausgangspunkt vor der β -NAD-Gabe zurück bildete. Gleichzeitig mit der Erhöhung des Kalziums kam es zu einer Depolarisation der Zellmembran, welche einen Höhepunkt erreichte und diesen im Messzeitraum nicht wieder verließ. Während der β -NAD-induzierten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ und der gleichzeitigen Depolarisation der Zellen kam es im Gegensatz zu dem Effekt nach Zugabe von Muskarin zu einer Dilation der Bronchi in PCLS.

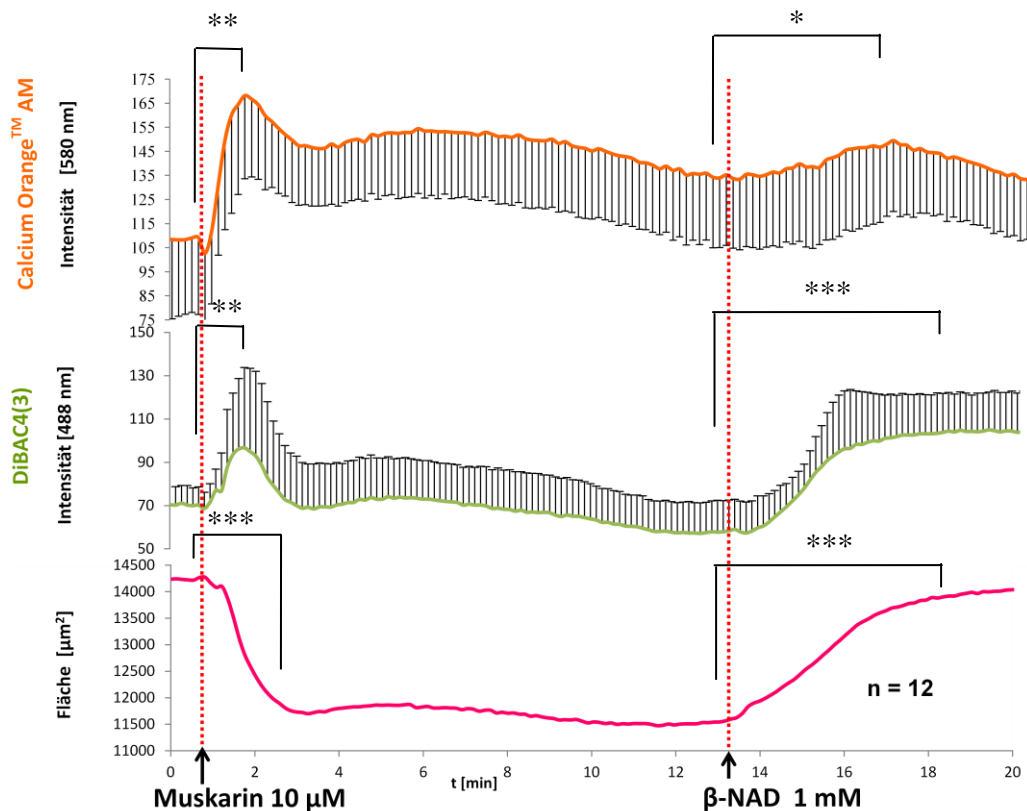


Abb. 3.35 Gleichzeitige Messungen von Kalzium, Membranpotenzial und der Fläche der Bronchi der Maus in PCLS, CLSM-Analyse

Die rosa Kurve zeigt den Verlauf der Flächenänderung, ähnlich dem in videomorphometrischen Versuchen. Die orange Kurve zeigt die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ und die grüne Kurve stellt die Änderung des Membranpotenzials in der glatten Muskulatur des Atemweges der Maus dar. Sowohl die Zugabe von Muskarin als auch die Zugabe von β -NAD führt zu einer Depolarisation der Zellmembran und einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$, obwohl die Zugabe von β -NAD, im Gegensatz zu dem Muskarin, zu einer Dilation der Bronchi führt. N.s. bedeutet nicht signifikant; * entspricht einem p-Wert von $< 0,05$; ** entspricht einem p-Wert von $< 0,01$; *** entspricht einem p-Wert von $< 0,001$ (ungepaarter t-Test).

3.12 Die durch β -NAD hervorgerufene Dilation ist vergleichbar mit dem Effekt von Salbutamol in Atemwegen des Menschen

β -NAD relaxiert Bronchioli aus menschlichen Lungensegmenten (Abb. 3.36). Dieser relaxierende Effekt ist vergleichbar mit dem des Salbutamols und bleibt im Gegensatz

zu dem Effekt in Tracheen der Maus stabil, ohne eine darauf folgende Konstriktion nach sich zu ziehen.

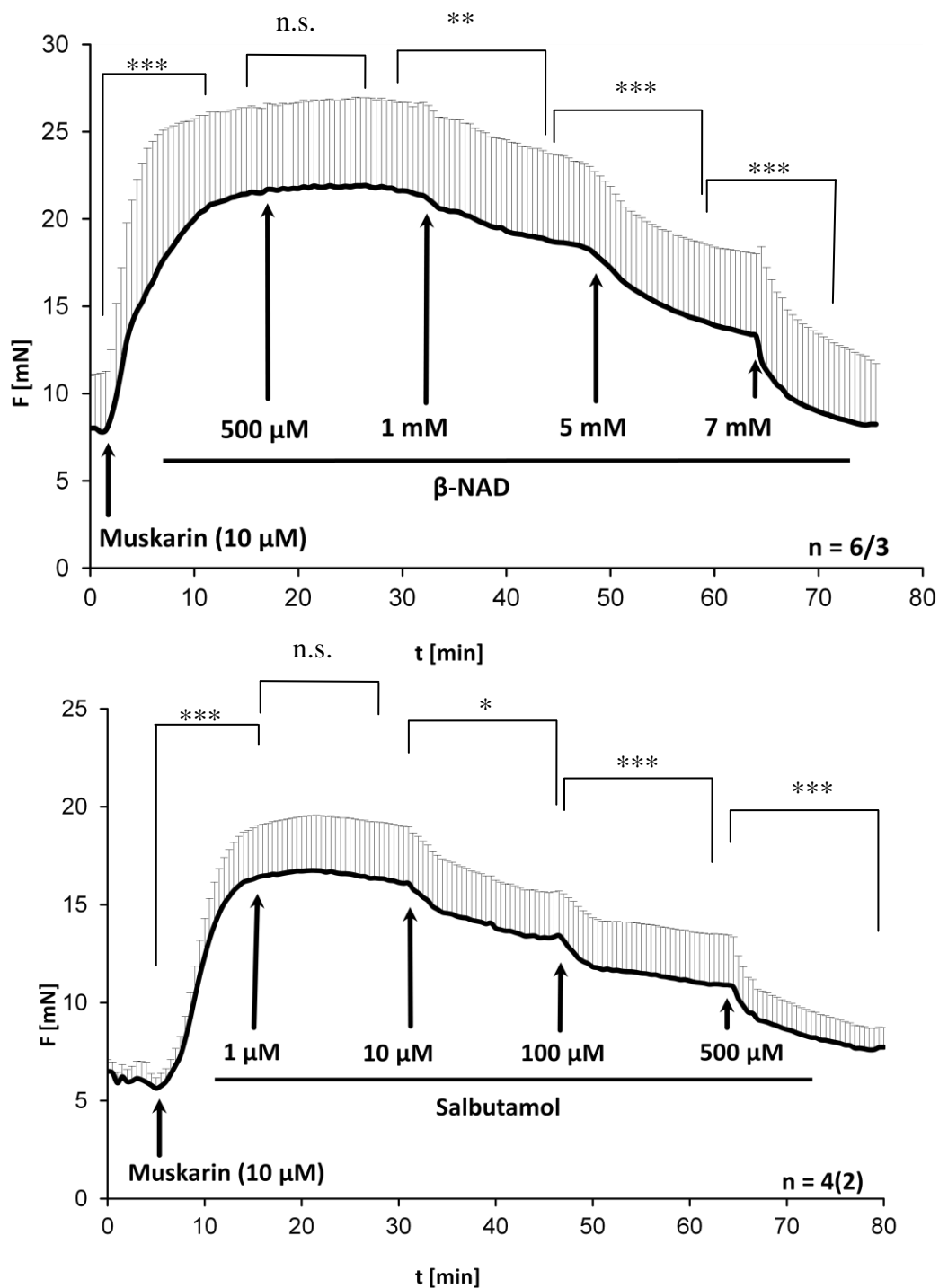


Abb. 3.36 Organbadversuche an Bronchi aus Lungensegmenten des Menschen

Nach der Zugabe von 10 µM Muskarin kommt es zu einer Kontraktion der Bronchioli. Die Zugabe von β-NAD (obere Kurve), beziehungsweise Salbutamol (untere Kurve) in verschiedenen Konzentrationen führt zur Dilation, welche in beiden Fällen beinahe 100

% der Kontraktion beträgt. Die Stichprobenanzahl (n): Anzahl der Bronchi/Anzahl der Patientenlungen. N.s. bedeutet nicht signifikant; * entspricht einem p-Wert von <0,05; ** entspricht einem p-Wert von <0,01; *** entspricht einem p-Wert von <0,001 (ungepaarter t-Test).

3.13 β -NAD führt zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in glatten Bronchialmuskelzellen des Menschen

Wie in den glatten Muskelzellen der Atemwege der Maus, wurden auch in kultivierten menschlichen Bronchialmuskelzellen Messungen der $[Ca^{2+}]_i$ durchgeführt. Auch in diesen Zellen führte β -NAD zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ (Abb. 3.37).

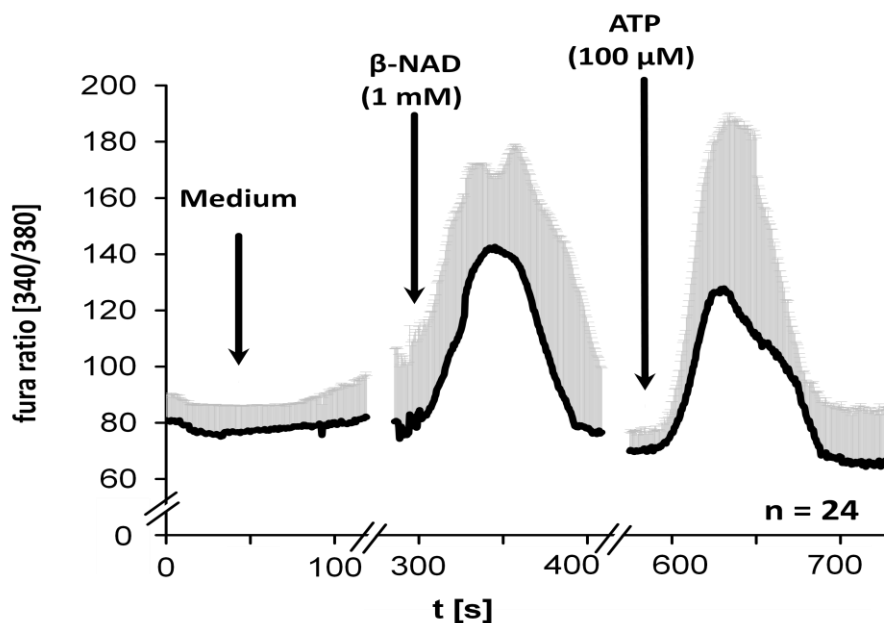


Abb. 3.37 Kalziummessungen in glatten Bronchialmuskelzellen des Menschen

Die Zugabe von β -NAD führte zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$. Als Negativkontrolle diente das Medium, in welchem das β -NAD gelöst wurde, als Positivkontrolle diente ATP. Stichprobenanzahl (n): Anzahl der Zellen.

4 Diskussion

Diese Arbeit zeigt erstmals eine relaxierende Wirkung des β -NAD in den Atemwegen sowohl der Maus als auch des Menschen, die gleichzeitig mit der Erhöhung des intrazellulären Kalziums und des intrazellulären cAMP-Spiegels einhergeht und zu einer Depolarisation der Zellmembran führt. Kausal für diese Dilation scheint die lösliche AC verantwortlich zu sein.

4.1 Extrazelluläres β -NAD als Botenstoff

Von den zwei möglichen Diastomeren, welche durch eine unterschiedliche Position des Nikotinamids am Kohlenstoffatom entstehen können, ist es das β -NAD, welches im Organismus vorkommt (Pollak et al., 2007). Es kann aus Aminosäuren de novo oder durch das Wiederverwerten vorgeformter Komponenten, wie dem Nikotinamid, synthetisiert werden (Belenky et al., 2007; Katoh et al., 2006; Foster und Moat 1980) und spielt eine wichtige Rolle im Stoffwechsel des Menschen. Insbesondere wirkt es als ein Koenzym in Redoxreaktionen, bei denen es Elektronen von einem Molekül zum anderen überträgt (Billington et al., 2006; Smyth et al., 2004). Bedeutende Beispiele sind die Glukoneogenese (Sistare und Haynes, 1985), die Fettsäuresynthese (Nicholis und Ferguson, 2002), die ATP-Synthese im Zitratzyklus (Rich, 2003) und die Herstellung verschiedener Aminosäuren, zum Beispiel im Malat-Aspartat-Shuttle der Mitochondrien (Bakker et al., 2001).

Eine weitere Funktion des β -NAD ist die ADP-Ribosylierung (Diefenbach und Bürkle, 2005). Dadurch werden viele Prozesse in der Zelle gesteuert (Berger et al., 2004; Corda und Di Girolamo, 2003). Hervorzuheben dabei ist die Reparatur der DNA (Bürkle, 2005).

Ferner wird das β -NAD durch CD38 und CD157 zum cADPr umgewandelt und führt so als ein second messenger zu einer Mobilisierung von Kalzium (Guse, 2004). Dieses geschieht durch das Aktivieren von Ryanodin-Rezeptoren des ER (Guse, 2005). Schließlich führt es durch SIRTs (North und Verdin, 2004) unter anderem zu einer Regulierung der Transkription (Blander und Guarente, 2004) und spielt so eine wichtige Rolle im Prozess der Alterung (Trapp und Jung, 2006).

Erst später konnte das β -NAD auch extrazellulär nachgewiesen und wurde als ein Bestandteil der Zell-Zell-Kommunikation erkannt (Billington et al., 2006; Ziegler und

Niere, 2004; Koch et al., 2011). Außerdem wird es aus Nervenfasern in Blutgefäßen (Smyth et al., 2004), der Blase (Breen et al., 2006) und dem Intestinaltrakt (Mutafova-Yambolieva et al., 2007) freigesetzt und führt hier zu einer Relaxation der glatten Muskulatur, weshalb es einem Neurotransmitter gleichgesetzt wird (Hwang et al., 2011; Yamboliev et al., 2009).

Diese Arbeit zeigt eine dosisabhängige β -NAD-induzierte Relaxation auch in den ASM sowohl der Maus als auch des Menschen. Die durch Muskarin vorkontrahierten Tracheen der Maus konnten durch die Zugabe von 5 mM β -NAD vollständig dilatiert werden. In einer Konzentration von 1 mM konnte β -NAD ferner der kompletten Konstriktion der kleinen Atemwege der Maus entgegenwirken. β -NAD dilatiert auch menschliche Bronchioli. So wurde nach Zugabe von 7 mM β -NAD die vorkontrahierte Muskulatur komplett dilatiert, wobei diese Dilation über die Zeit stabil blieb. Um zu überprüfen, welcher Signalweg für die β -NAD-induzierte Relaxation verantwortlich ist, wurden verschiedene Komponenten der Signaltransduktion einer Relaxation beziehungsweise einer Konstriktion glatter Muskelzellen geblockt oder angeregt. Diese werden im Folgenden dargestellt.

4.2 Relaxation der glatten Muskelzellen

4.2.1 Purinerge Rezeptoren

Die β -NAD-induzierte Relaxation der glatten Muskulatur im Intestinaltrakt (Mutafova-Yambolieva et al., 2007) wird durch purinerge Rezeptoren, namentlich dem P2Y₁₁ vermittelt. Die Gruppe der purinergen Rezeptoren wurde erstmals durch Burnstock (1978) in P₁- (Adenosinrezeptoren; zugehörig den GPCR) und P₂-Rezeptoren unterteilt. Gleichzeitig wurden zwei P₂-Rezeptor-Subtypen beschrieben (van Calker et al., 1979; Londos et al., 1980), zum einen die P_{2X}-Rezeptoren (durch Liganden gesteuerte Ionenkanäle), zum anderen die P_{2Y}-Rezeptoren (GPCR; Burnstock, 1995). Sowohl die P₁-Rezeptoren (Olah und Stiles 2000; Fredholm et al. 2001; Yaar et al. 2005) als auch beide Untergruppen der P₂-Rezeptoren (Valera et al., 1994, Buell et al., 1996, Abbraccio et al., 2003, 2006) werden in weitere Subklassen unterteilt.

4.2.1.1 P1-Rezeptoren

Die Adenosinrezeptoren werden in vier Subtypen unterteilt: A1, A2A, A2B und A3 (Olah und Stiles 2000; Fredholm et al. 2001; Yaar et al. 2005), welche alle zur Proteingruppe der GPCR gehören. Sie unterscheiden sich in der Signaltransduktion durch die Kopplung an entweder ein G_i- oder ein G_s-Protein (Ralevic und Burnstock, 1998) und kommen in vielen Geweben des Körpers vor (siehe Tab. 4.1).

Rezeptor	A1	A2A	A2B	A3
G-Protein	G _i	G _s	G _s	G _i
Verteilung im Körper	Gehirn, Adipozyten, Herz, Niere, Lungen, Hoden	Gehirn, Leber, Lunge, Herz, Niere	Caecum, Dickdarm, Harnblase, Gehirn, Fibroblasten, Herz, Lunge	Leber, Lunge, Gehirn, Herz, Hoden, Niere

Tab. 4.1 Verteilung der Adenosinrezeptorsubtypen im Körper. (modifiziert nach Dunwiddie und Masino, 2001; Fredholm et al., 2003; Fuxe et al., 2001; Ralevic und Burnstock, 1998)

Insbesondere die Aktivierung des Adenosin-A1-Rezeptors führt zu einer Kontraktion der glatten Muskulatur des Respirationstraktes (Fredholm und Hedqvist, 1980). So ist er Ziel von Theophyllin bei der Therapie von Erkrankungen des Respirationstraktes, die mit einer Bronchokonstriktion einhergehen, wie es bei Asthma oder der COPD der Fall ist (Polosa, 2002). Insbesondere im Status asthmaticus, welcher sich dadurch auszeichnet, dass der Patient eine anhaltende schwere Asthmasymptomatik über einen Zeitraum von 24 Stunden zeigt (Ali et al., 1992; Donnelly und Rogers, 2003), ist Theophyllin ein wichtiges Therapeutikum. Da Theophyllin zusätzlich zu seiner inhibitorischen Wirkung auf A1- und A2-Adenosinrezeptoren auch als nichtselektiver Antagonist der PDE wirkt (Barnes 2003), wurde in dieser Arbeit das 8-SP-T eingesetzt, um zu überprüfen, ob die β -NAD-induzierte Relaxation durch Adenosinrezeptoren gesteuert wird. Hier konnte gezeigt werden, dass die Relaxation nach Zugabe von β -NAD stabil bleibt. Also ist die Klasse der Adenosinrezeptoren als Vermittler der β -NAD-induzierten Relaxation nicht wahrscheinlich.

4.2.1.2 P2-Rezeptoren

Die Gruppe der P2-Rezeptoren wird unterteilt in ionotrope P2X-Rezeptoren und metabotrope P2Y-Rezeptoren (van Calcar et al., 1979; Londos et al., 1980). P2X-Rezeptoren sind Liganden-gesteuerte Ionenkanäle, welche vor allem nach Aktivierung durch ATP für Kalzium-, Kalium- und Natriumionen durchlässig sind (Valera et al., 1994). Sie lassen sich wiederum in homomere und heteromere P2X-Rezeptoren gruppieren, die entweder ein homomeres Trimer bilden, oder aus zwei verbundenen Trimeren ein heteromeres Hexamer bilden (Nicke et al., 1998; North 2002). So sind sechs homomere (P2X1, P2X2, P2X3, P2X4, P2X5 und P2X7) und sechs heteromere (P2X1/2, P2X1/4, P2X1/5, P2X2/3, P2X2/6 und P2X4/6) P2X-Rezeptoren bekannt (Burnstock 2007). Auch diese Rezeptorgruppe kommt in vielen Geweben des Körpers vor und ist für eine Reihe von Prozessen verantwortlich: synaptische Übertragung (North, 2002; Burnstock, 2000), Kontraktion der Herz- und Skelettmuskulatur sowie der glatten Muskulatur im Intestinaltrakt, in der Harnblase und im Samenleiter (Hoyle et al., 1989; Mulryan et al., 2000; Valera et al., 1994; Burnstock und Knight 2004). Außerdem wird besonders der P2X7-Rezeptor von immunkompetenten Zellen exprimiert und ist beteiligt an der Freisetzung von Cytokinen (Ferrari et al., 1997; Mehta et al., 2001). Hier wird ein Zusammenhang mit entzündlichen Prozessen vermutet (Chakfe et al., 2002; Le Feuvre et al., 2002; Parvathenani et al., 2003).

Die Gruppe der P2Y-Rezeptoren gehört zu den GPCRs. Momentan sind acht humane P2Y-Subtypen bekannt (Abbraccio et al., 2003, 2006), welche an unterschiedliche G-Proteine gekoppelt sind und dadurch unterschiedliche Signalwege anregen: P2Y1-, P2Y2-, P2Y4- und P2Y6-Rezeptoren führen zu einer Mobilisierung des Kalziums aus internen Speichern durch eine Aktivierung der PLC via G_q -Proteine (Ralevic und Burnstock, 1998). P2Y12, P2Y13 und P2Y14 senken die intrazelluläre cAMP-Konzentration durch eine Hemmung der AC via G_i -Proteine (Jin et al., 2001). Der P2Y11-Rezeptor kann sowohl an ein G_q - als auch an ein G_s -Protein gekoppelt sein (Communi et al., 1999; van der Weyden et al., 2000). Dieser Rezeptor ist im menschlichen Intestinaltrakt für die Relaxation der glatten Muskelzellen verantwortlich (Mutafova-Yambolieva et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die β -NAD-induzierte Relaxation der Atemwege der Maus nicht durch purinerge Rezeptoren vermittelt wird. Es wurden gängige selektive und unselektive Antagonisten der P2X- und P2Y-Rezeptoren eingesetzt: MRS2179 (Baurand und

Gachet, 2003), PPADS (Shehnaz et al., 2000) und Suramin (Charlton et al., 1996). Da das ATP zu einer Relaxation der glatten Muskelzellen führt (Farah et al., 2009), konnte die Wirkung der Antagonisten durch die Hemmung dieser Reaktion gezeigt werden. Da die β -NAD-induzierte Relaxation der Trachealsegmente trotz der Blocker stabil war, konnten purinerge Rezeptoren als Vermittler des Signalweges ausgeschlossen werden. Anzumerken ist, dass das Gewebe, in welchem die β -NAD-induzierte Relaxation bisher auf purinerge Rezeptoren zurückgeführt wird, menschliches Gewebe ist (Smyth et al., 2004; Breen et al., 2006; Mutafova-Yambolieva et al., 2007; Hwang et al., 2011). Hier ist es der P2Y₁₁-Rezeptor, welcher die Signalübertragung vermittelt (Mutafova-Yambolieva et al., 2007). Interessanterweise ist dieser Rezeptor nicht im Genom der Maus oder der Ratte kodiert (Brautigam et al., 2005), auch wenn einige Firmen Antikörper zur Verfügung stellen (Abcam: ab180739; Merck: AB9590; OriGene: TA322990), bei denen eine Kreuzreaktivität mit dem P2Y₁₁-Rezeptor der Maus behauptet wird.

Es wurden im Rahmen dieser Arbeit zwar auch Versuche mit den o.g. Inhibitoren der purinergen Signaltransduktion an menschlichen Bronchioli durchgeführt, die Stichprobenzahl ist jedoch noch sehr gering, sodass keine abschließende Aussage über das Ergebnis getroffen werden kann. Dieses sollte demnach in näherer Zukunft vervollständigt werden.

4.2.2 GPCR

Purinerge Rezeptoren vom P2Y- und auch vom P1-Subtyp gehören zur Gruppe der GPCR, deren Sequenzen ungefähr 2 % des humanen Genoms einnehmen (Fredriksson et al., 2003; Vassilatis et al., 2003). Gemeinsames Strukturelement aller GPCRs ist eine die Plasmamembran durchspannende Faltung in sieben α -helikale transmembranäre Domänen (TM-I bis TM-VII; Unger et al., 1997; Palczewski et al., 2000), welche nach Aktivierung durch verschiedene Liganden ihre Konformation ändern (Bourne, 1997; Farrens et al., 1996). Abhängig von der intrazellulär gelegenen C-terminalen Domäne und dem Liganden wird ein spezifischer nachgeschalteter Signaltransduktionsweg angeregt. Die GPCR-Superfamilie wird in fünf Hauptfamilien unterteilt (Bockaert und Pin, 1999): Zu der Familie 1 gehören die Duft- und Geschmackstoff-Rezeptoren sowie Rhodopsin. Familie 2 beinhaltet die Sekretin/Glukagon-Rezeptorfamilie. Die Familie 3 setzt sich zusammen aus den metabotropen Glutamat-Rezeptoren, GABA-Rezeptoren

und einer Gruppe von ca. 100 Pheromon-Rezeptoren. Zu der Familie 4 werden weitere Pheromon-Rezeptoren gezählt und Familie 5 beinhaltet Rezeptoren der Embryonalentwicklung. Abhängig von der α -Untereinheiten haben G-Proteine unterschiedliche Signaltransduktionswege (Hildebrandt, 1997; Hamm und Gilchrist, 1996). So kommt es nach Aktivierung eines G-Proteins zu einer Freisetzung von GDP und zu einem Austausch zu GTP an der α -Untereinheit des G-Proteins (Sprang, 1997). Dadurch dissoziieren sowohl das α -GTP als auch die $\beta\gamma$ -Einheit des G-Proteins und führen zu verschiedener Modulierung unterschiedlicher zellulärer Effektorsysteme wie z.B. der AC oder der PLC (Sprang, 1997; Sternweis, 1994; Hamm und Gilchrist, 1996). Für die Vermittlung der Relaxation oder Konstriktion der glatten Muskulatur gibt es eine sehr große Zahl von GPCRs.

Die durch einen GPCR-vermittelte Konstriktion sei hier kurz am Beispiel des mAChR3 erläutert (Zaagsma et al., 1997; Fryer und Jacoby, 1998): Dieser ist ein an G_q -Protein gekoppelter Rezeptor (Lambert et al., 1992; Felder, 1995) und schaltet nach Aktivierung durch ACh die PLC an (Berridge, 1993). Dadurch kommt es nach Bildung von IP_3 und DAG aus PIP_2 zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$, was durch eine Aktivierung des CaM eine Kontraktion der glatten Muskelzelle nach sich zieht (Roffel et al., 1990; Halayko et al., 1999; Stengel et al., 2000).

Ferner kann eine Kontraktion der glatten Muskelzellen auch durch die Aktivierung sogenannter heterotrimerer G-Proteine vermittelt werden ($G_{12/13}$). Diese werden von beispielsweise Thrombin, Sphingolysin, Serotonin oder Endothelin (Riobo und Manning, 2005; Greenberg et al., 2003; Katoh et al., 1996; Hains et al., 2006) angeregt und stimulieren sogenannte RhoGEF-Proteine (Guanine nucleotide exchange factor; Guanin-Austauschfaktor; Fukuhara et al., 2001; Dutt et al., 2004). Diese wiederum haben Rho-Kinasen (ROCK) als Ziel (Narumiya et al., 1997; Treisman et al., 1998), welche ihrerseits durch Hemmung der MLCP eine Kontraktion hervorrufen (Riento und Ridley, 2003).

Die Vermittlung der Relaxation der glatten Muskelzellen durch einen GPCR sei am Beispiel des β_2 -adrenergen Rezeptors erläutert (Nagatsu und Stjaerne, 1998): Dieser ist an ein G_s -Protein gekoppelt und schaltet nach Aktivierung durch Katecholamine die AC an, was einen Anstieg des intrazellulären cAMP zur Folge hat (Fraser und Venter, 1990). Das cAMP aktiviert seinerseits die PKA, welche die MLCK inhibiert. Dadurch kommt es zu einer Relaxation der glatten Muskelzellen (Torphy, 1994).

Um die Beteiligung der GPCRs bei der β -NAD-induzierten Relaxation zu überprüfen, wurden PTX, CTX und das U73122 eingesetzt. Das PTX ist ein hexamer Protein, das vom Keuchhustenerreger *Bordetella pertussis* synthetisiert wird (Colmes und Pittman, 1989). Es katalysiert die ADP-Ribosylierung der α -Einheit des G_i -Proteins (Burns, 1988) und entkoppelt es so von seinem Rezeptor, wodurch es zu einer Hemmung des Rezeptors kommt (Kopf und Woolkalis, 1991). Der Einsatz dieses Toxins konnte jedoch die β -NAD-induzierte Relaxation nicht hemmen.

Das U73122 wurde als ein Inhibitor der PLC entwickelt (Jin et al., 1994). Die PLC ist wie oben dargestellt in den Signaltransduktionsweg der G_q -Protein gekoppelten Rezeptoren integriert (Hamm und Gilchrist, 1996). So konnte durch den Einsatz von U73122 indirekt die Gruppe der G_q PCRs und direkt die PLC als Mitglied des Signalweges der β -NAD-induzierten Relaxation ausgeschlossen werden. Da die glatte Muskulatur in den Organbadversuchen mittels Muskarin zur Konstriktion gebracht wurde, also hauptsächlich durch die Aktivierung von PLC über den mAChR3 (Fryer und Jacoby, 1998), ist die geringere Konstriktion gleichzeitig ein guter Hinweis auf die Wirksamkeit des U73122. Die Muskarin-induzierte Konstriktion konnte durch das U73122 aber nicht vollständig geblockt werden, da die Konstriktion der Bronchialmuskelzellen unter anderem auch auf eine Aktivierung der mAChR2 zurückzuführen ist (Matsui et al., 2002; Struckmann et al., 2003). Dieser ist ein G_i PCR und inhibiert die AC (Reinheimer et al., 2000). Durch die geringere Synthese von cAMP wird die PKA, welche die MLCP inhibiert, nicht aktiviert. Es kommt zu einer Kontraktion (Buckley et al., 2001). Um die Wirksamkeit des oben genannten PTX nachzuweisen, wurde dieser Umstand ausgenutzt. So wurden sowohl das U73122 als auch das PTX im Organbad eingesetzt, um die Muskarin-induzierte Konstriktion zu inhibieren. Hier fiel die Konstriktion zwar noch geringer aus, war aber noch immer vorhanden. Vermutlich liegt das an der oben erwähnten Konstriktion durch heterotrimere G-Proteine, welche unter anderem auch durch Muskarin aktiviert werden können (Lee et al., 2013). Dieses konnte in dieser Arbeit auch gezeigt werden. Hier wurde untersucht, ob die β -NAD-induzierte Relaxation durch heterotrimere G-Proteine vermittelt wird. Dieses konnte durch den Einsatz von Y-27632, einem Blocker der ROCK (Duess et al., 2013, Yoshii et al., 1999), ausgeschlossen werden. Y-27632 verringerte aber die Muskarin-abhängige Konstriktion, was auf eine Beteiligung heterotrimerer G-Proteine hinweist.

Als letzte Gruppe der GPCR wurden die G_s -Protein gekoppelten Rezeptoren blockiert, um zu überprüfen, ob sie an der β -NAD-induzierte Relaxation mitwirken. Dazu wurde

das CTX genutzt (Andreopoulos et al., 2003). Dieses von dem Bakterium *Vibrio cholerae* produzierte Exotoxin (Sanches und Holmgren, 2011) ist ein hexameres Protein, welches die GTPase-Aktivität von AC-stimulierenden GPCRs hemmt. So bleibt der GPCR permanent im aktiven Zustand, wodurch er erschöpft und durch Agonisten nicht mehr erneut aktiviert werden kann (Andreopoulos et al., 2003). Während dieses Toxin die dilatierende Wirkung des Salbutamols, eines Agonisten an β_2 -Adrenozeptoren (Evans et al., 1971), effektiv inhibierte, blieb die β -NAD-induzierte Relaxation in Anwesenheit des CTX stabil.

Zusammengefasst konnte in dieser Arbeit die Beteiligung der GPCRs an der β -NAD-induzierten Relaxation des Atemtraktes der Maus ausgeschlossen werden.

4.2.3 NOS

Die Stickstoffmonoxid/zyklisches Guanosinmonophosphat (NO/cGMP)-vermittelte Signaltransduktionskaskade ist bei Säugetieren an verschiedenen physiologischen Regulationsprozessen beteiligt, insbesondere bei der Relaxation glatter Muskelzellen (Diamond, 1978). Stickstoffmonoxid wird von verschiedenen NOS-Isoformen synthetisiert (Iyengar et al., 1987; Marletta et al., 1988) und stimuliert nach Diffusion in die Zelle die GC (Mergia et al., 2006). Es sind drei Isoformen der NOS bekannt: die endotheliale (eNOS), die neuronale (nNOS) und die induzierbare (iNOS; Förstermann et al., 1991; Nathan, 1992).

Die GC wiederum bildet cGMP, welches unter anderem nach Stimulation der PKG in glatter Muskulatur zur Relaxation führt (Mergia et al., 2006). Insbesondere im peripheren Nervensystem fungiert NO als Neurotransmitter in der glatten Muskulatur des Respirations-, Gastrointestinal- und Urogenitaltraktes (Bult et al., 1990; Sanders und Ward, 1992). Um zu überprüfen, ob die β -NAD-induzierte Relaxation über NO vermittelt wird, wurde der in der Literatur oft benutzte Inhibitor L-NAME eingesetzt (Bunbupha et al., 2014; Bernátová et al., 1999). Dieser Inhibitor konnte die β -NAD-induzierte Relaxation nicht hemmen. Die β -NAD-induzierte Relaxation der ASM der Maus wird daher nicht über eine Aktivierung der NOS vermittelt.

4.2.4 PDE

Die PDEs spielen bei der Relaxation glatter Muskelzellen eine wichtige Rolle. So verkürzen sie die Relaxationszeit glatter Muskelzellen, indem sie das cAMP bzw. das cGMP aufspalten, so dass diese ihre Zielenzyme, die PKA bzw. die PKG, nicht mehr aktivieren können. Die PKA und die PKG stellen ihrerseits wiederum wichtige Bausteine der Endstrecke dar, welche zur Relaxation der glatten Muskulatur führt (Fredholm et al., 1979; Omori und Kotera, 2007). Es wurden mittlerweile mindestens elf PDE-Isoenzyme entdeckt, welche teilweise wiederum in mehrere unterschiedliche Isoformen unterteilt vorkommen. So ist wohl eine der bekanntesten die PDE vom Typ 5, welche cGMP-spezifisch ist und hauptsächlich in der glatten Muskulatur der Blutgefäße des Peniswellkörpers, aber auch in der Lunge lokalisiert ist. Sildenafil ist der Inhibitor dieser PDE-5 und wird erfolgreich gegen die erektile Dysfunktion eingesetzt (Maggi et al., 2000; Nehra et al., 2001). Spezifischer für die Lunge ist die PDE-4, welche cAMP-spezifisch ist und als Angriffspunkt bei obstruktiven Lungenerkrankungen durch die Medikamente Roflumilast oder Rolipram inhibiert wird (Fan Chung, 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach Zugabe von Rolipram zu vorkontrahierten Tracheen die darauf folgende β -NAD-induzierte Relaxation immer noch stabil bleibt und sogar signifikant stärker ausfällt. Das führte zu der Hypothese, dass cAMP, welches von der PDE-4 abgebaut wird, zu der β -NAD-induzierten Relaxation der Atemwege beiträgt.

Nach Hemmung der oben dargestellten Komponenten der Relaxation in glatten Muskelzellen, konnte bisher der genaue Signalweg der β -NAD-induzierten Relaxation nicht geklärt werden, jedoch konnten einige Bausteine des Signalweges ausgeschlossen werden (Abb. 4.1).

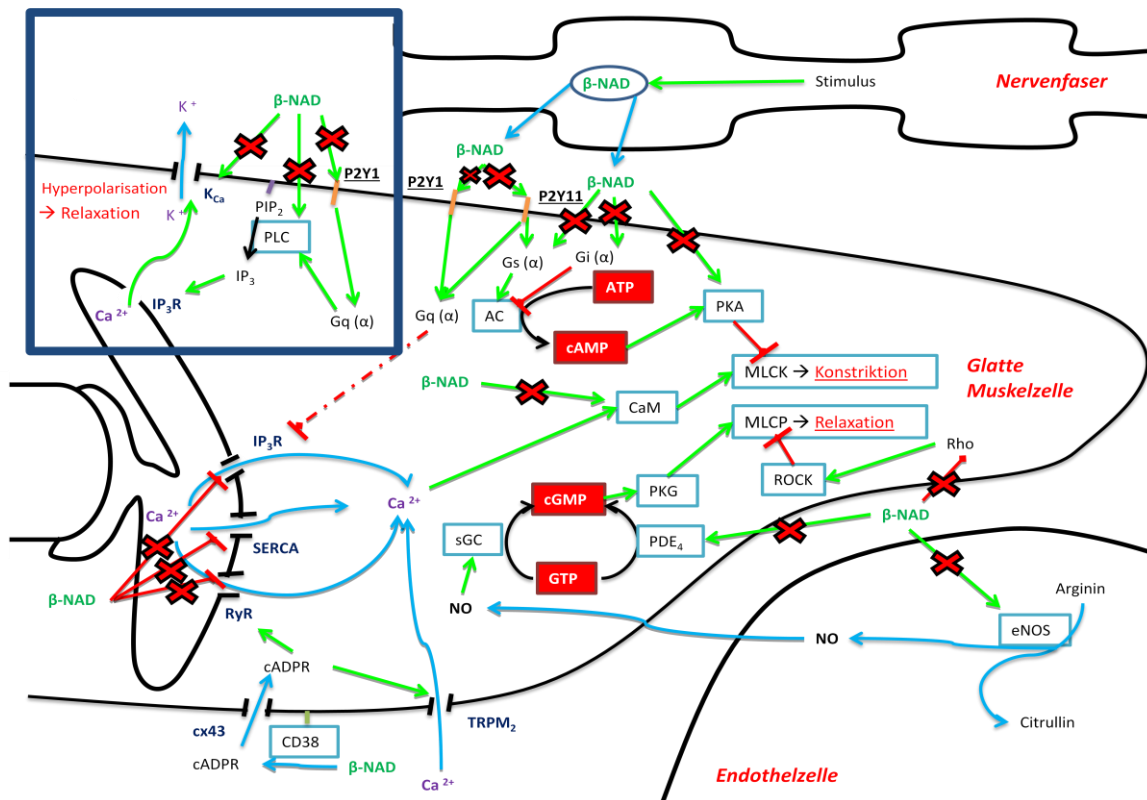


Abb. 4.1 Signalweg der Kontraktion bzw. der Dilation einer glatten Muskelzelle mit Beispielen von Enzymen, Rezeptoren und Kanälen, die in dieser Arbeit geblockt wurden.

4.2.5 Kalziumkanäle

Wie in der Einleitung schon dargestellt, führt der Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ zur Konstriktion der ASM. Kalzium kann sowohl aus internen Speichern als auch von außerhalb der Zelle stammen (Somlyo und Himpens, 1989). Je nach Ursprung wurden unterschiedliche Profile der Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ beobachtet, einerseits ein schneller Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ durch Freisetzung aus internen Speichern, andererseits ein langsamer Anstieg mit einem Plateau durch Einstrom von außerhalb (Sims, 1996 und Murray, 1989). Die internen Speicher stellen das ER, die Mitochondrien und die Lysosomen dar (Prakash, 1997). Insbesondere das ER verfügt über mehrere Kanäle, die den Kalziumstrom vermitteln, so z.B. die SERCA, die RyR und die IP_3 -Rezeptoren (Mandi, 2006; Yusufi, 2001).

Um zu prüfen, ob die $[Ca^{2+}]_i$ bei der Signaltransduktion der β -NAD-induzierten Relaxation eine Rolle spielt, wurden in dieser Arbeit zwei Methoden der Kalziummessung angewandt: Zur Messung der $[Ca^{2+}]_i$ in isolierten und kultivierten

ASM der Maus und des Menschen wurde eine im Labor etablierte Kalziummessung mit dem Kalziumindikator Fura 2 (AM) genutzt (Mikulski et al., 2010). Zur Messung der $[Ca^{2+}]_i$ in PCLS wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Methode etabliert, welche am CLSM mit Hilfe von Calcium Orange (AM) durchgeführt wurde (Desireddi et al., 2010). Es wurde auf diese Methode zugegriffen, da es mit dem CLSM, im Gegensatz zu einem normalen Mikroskop, möglich war Muskelzellen in PCLS im Gewebeverbund einer Ebene zu betrachten. Außerdem konnten dadurch gleichzeitige Messungen der $[Ca^{2+}]_i$, der Fläche des Bronchiallumens und des Membranpotenzials (s.u.) durchgeführt werden.

Diese Messungen zeigten, dass die Zugabe von β -NAD eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ induziert. Diese Erhöhung konnte sowohl in isolierten und kultivierten Muskelzellen des Respirationstrakts der Maus als auch in kultivierten humanen glatten Bronchialmuskelzellen gezeigt werden, wobei sie unterschiedliche Profile aufwies: Die meisten Zellen reagierten mit einem langsamen Anstieg des Kalziums. Es gab aber auch einige, die einen schnellen Anstieg oder eine Mischform aus diesen beiden Profilen zeigten.

Ein durch β -NAD-induzierter Kalziumanstieg in der Zelle wurde schon mehrfach beschrieben (de Flora et al., 2004; Wang et al., 2012; Lee und Aarhus, 1991, Bruzzone et al., 2006). Hier metabolisieren die Enzyme CD38 und CD157 das β -NAD zu cADPR, welches IP_3 -Rezeptoren des ER anregt und so zu einer Freisetzung des Kalziums aus dem ER führt (Franco et al., 2001). Dieser Mechanismus würde den schnellen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in der Messung erklären. Ferner führt das cADPR zu einer höheren Expression des TRPM2 (Kolisek, 2005), welcher seinerseits Kalzium von außen in die Zelle transportiert (Kolisek, 2005). Dieser Kanal könnte den langsamen Anstieg des Kalziums bei den Messungen erklären (Sims, 1996; Murray, 1989).

Da ein Anstieg der Kalziumkonzentration normalerweise eine Konstriktion der glatten Muskulatur bewirkt (David et al., 2011; Jiang und Stephens, 1994; Adelstein und Sellers, 1987), entsteht ein Widerspruch: Zum einen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass β -NAD auf nicht vorkontrahierte ASM der Maus keinen kontraktile Einfluss hat. Außerdem konnte beobachtet werden, dass gleichzeitig mit dem β -NAD-induzierten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ eine Dilation der Bronchi der Maus in PCLS stattfindet. Der Anstieg des $[Ca^{2+}]_i$ würde jedoch erklären, dass es zeitversetzt zu einer Kontraktion der glatten Muskulatur kommt, welche nach der β -NAD-induzierten Relaxation der vorkontrahierten Mastracheen beobachtet werden konnte. Zudem konnte die Existenz

sowohl des Enzyms CD38 als auch von TRPM2-Kanälen in der ASM der Maus in dieser Arbeit gezeigt werden. Die immunhistochemischen Daten alleine sind hierbei nicht beweisend, da für beide Antikörper das entsprechende Peptid für eine Präabsorptionskontrolle nicht zur Verfügung stand. Insofern kommt den stützenden Ergebnissen der RT-PCR besondere Bedeutung zu. Ferner konnte funktionell in Organbadversuchen die Kontraktion nach der β -NAD-abhängigen Relaxation durch den Einsatz des Kalziumchelators EDTA, des Inhibitors der TRPM2-Kanäle, Flufenaminsäure (Nazioglu et al., 2007), oder durch den Antagonisten der cADPR, Br-cADPR (Xie et al., 2005), verhindert werden. Währenddessen blieb die Kontraktion nach der β -NAD-abhängigen Relaxation in vorkontrahierten menschlichen Bronchioli jedoch komplett aus.

Es bestehen einige Ansätze, um diese widersprüchlichen Ergebnisse zu erklären:

1. Eine kalziumabhängige Relaxation ist schon in der Literatur beschrieben (Nelson et al., 1995; Baker und Weiner, 1997; Climent et al., 2014). In diesem Fall geht man von einem lokalen Anstieg der Kalziumkonzentration aus, welcher auf noch ungeklärtem Weg relaxierende Signalwege aktiviert. Verantwortlich dafür sind kalziumabhängige Kaliumkanäle vom BK-, IK- und SK-Kanälen (big, small, intermediate; Vergara, 1997; Robitaille et al., 1993). Diese werden durch eine intrazelluläre Kalziumerhöhung aktiviert und führen zu einer Änderung des Membranpotenzials, was unter anderem eine Relaxation der glatten Muskulatur induziert (Mori et al., 2000). Tatsächlich konnte eine Änderung des Membranpotenzials glatter Muskelzellen des murinen Respirationstraktes nach Zugabe des β -NAD im Rahmen dieser Arbeit beobachtet werden. In Organbadversuchen wurden jedoch sowohl BK-Kanäle durch Iberiotoxin (Reinhart und Levitan, 1995) als auch SK-Kanäle durch Apamin (Köhler et al., 1996) geblockt. Auch in diesen Experimenten konnte die β -NAD-induzierte Relaxation nicht gehemmt werden.

2. Weiterhin besteht die Theorie, dass es nur in bestimmten Zellarealen zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ kommt. In diesen Kompartimenten der Zelle führt dieser Anstieg durch einen noch ungeklärten Signalweg zu einer Relaxation (Flemming et al., 2002). Insbesondere Bitterstoffe wurden in diesem Zusammenhang als Dilatatoren beschrieben. Diese führen zu einer Relaxation der glatten Muskelzellen, trotz einer Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ (Desphande et al., 2010). Der Signalweg dieser Relaxation geht über sogenannte Taste-(Geschmacks)-Rezeptoren, welche an G-Proteine gekoppelt sind

und durch Stimulation einen intrazellulären Kalziumanstieg durch die PLC zur Folge haben (Desphande et al., 2010; Prakash, 2013).

Dieser Signalweg konnte für das β -NAD ausgeschlossen werden, da nach Hemmung der GPCR die β -NAD-induzierte Relaxation stabil blieb. Ferner wurden auch weitere Bestandteile des Signalweges der Bitterstoff-induzierten Relaxation inhibiert, so die BK-Kanäle durch Apamin und Kalziumkanäle des L-Typs durch FPL-64176 (Liu et al., 2003). Auch bei diesen Versuchen blieb der β -NAD-induzierte Effekt unbeeinflusst.

3. Die gleichzeitige Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ mit der Relaxation könnte bedeuten, dass diese zwei Prozesse gleichzeitig ablaufen, jedoch nicht voneinander abhängig sind. So könnte die Erhöhung des Kalziums einen kontraktionsfördernden Weg aktivieren, gleichzeitig aber β -NAD einen quantitativ überwiegenden relaxierenden Weg. So käme es netto zu einer Relaxation.

In dieser Arbeit konnte der genaue Zusammenhang zwischen dem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ und der β -NAD-induzierten Relaxation nicht geklärt werden.

4.2.6 Membranpotenzial

Da auch das Membranpotenzial eine wichtige Rolle bei den Funktionen glatter Muskelzellen spielt (Allen et al., 2002; Liu et al., 2005; Palant et al., 1989), wurde untersucht, ob auch β -NAD Änderungen dieses Parameters hervorruft. Dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Methode etabliert, mit welcher die gleichzeitige Messung der $[Ca^{2+}]_i$, der Fläche des Bronchiallumens und des Membranpotenzials möglich ist. Diese Methode beruht auf der Messung der drei Variablen innerhalb einer bestimmten Ebene (Z-Achse) von PCLS mittels CLSM und ist durch den gleichzeitigen Einsatz des Kalziumindikators Calcium Orange (Takeda et al., 2009) und des DiBAC₄(3), eines Indikators für das Membranpotenzial (Debets et al., 2014), möglich. In diesen Experimenten konnte beobachtet werden, dass es gleichzeitig mit einer β -NAD-induzierten Relaxation zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ und des Membranpotenzials kommt. Der Zusammenhang der Erhöhung des β -NAD-induzierten Membranpotenzials der glatten Muskulatur konnte in dieser Arbeit nicht erklärt werden, aber auch dieser Prozess kann entweder gleichzeitig mit der Relaxation einhergehen, oder die Relaxation beeinflussen.

4.2.7 cAMP

Weil im Rahmen dieser Arbeit beobachtet wurde, dass es in Anwesenheit des Roliprams, eines PDE-4-Inhibitors, zu einer signifikant verstärkten β -NAD-induzierten Relaxation der Atemwege der Maus kam, wurde untersucht, ob β -NAD eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels induziert. Intrazelluläres cAMP ist einer der wichtigsten Mediatoren der Relaxation glatter Muskelzellen (Torella et al., 2009; Billington et al., 2013; Stone et al., 2012). Es aktiviert unter anderem die PKA, welche durch Hemmung der MLCK zur Relaxation führt (Omori und Kotera, 2007). Außerdem ist auch beschrieben, dass cAMP EPAC aktiviert, welches ebenfalls die Relaxation glatter Muskulatur vermittelt (Hayashi et al., 2015; Roberts und Dart, 2014). Es wird angenommen, dass die PKA und EPAC durch cAMP unterschiedlichen Ursprungs aktiviert werden. So soll die PKA hauptsächlich durch cAMP aktiviert werden, welches durch eine membranständige AC, aktiviert durch GPCRs, gebildet wird (Gupta et al., 2015; Billington et al., 2013), während EPAC hauptsächlich durch cAMP der löslichen AC aktiviert werden soll (Ivonnet et al., 2015; Sands et al., 2006). Insbesondere die relaxierende Funktion der β_2 -Adrenozeptoragonisten wird hauptsächlich durch cAMP vermittelt, welches durch die membranständige AC hergestellt wird und die PKA aktiviert (Goncharova et al., 2012; Wang et al., 2009).

FRET-Versuche an humanen glatten Muskelzellen des Bronchialsystems zeigten in dieser Arbeit nach Zugabe von β -NAD eine signifikante Zunahme der intrazellulären cAMP-Konzentration. In Organbadversuchen konnte durch das Ausschalten der PKA mittels rp-cAMPs, eines Inhibitors der PKA (Komai et al., 2014), keine Hemmung der β -NAD-induzierten Relaxation erzielt werden. Außerdem hatte die Zugabe von Isoproterenol in FRET-Versuchen eine weitere - auf die β -NAD-induzierte-cAMP-Erhöhung additive - cAMP-Erhöhung zur Folge. Schließlich war in videomorphometrischen Experimenten die Salbutamol-induzierte Relaxation auch additiv zur β -NAD-induzierten Relaxation. Dies lässt schließen, dass die β -NAD-induzierte cAMP-Erhöhung in der Zelle - anders als die Isoproterenol-induzierte Erhöhung des cAMPs - durch die Aktivierung der löslichen AC entsteht. Das durch die Zugabe von β -NAD gebildete cAMP würde dann die EPAC aktivieren und so zur Relaxation führen. Um diese Hypothese zu testen, wurde in weiteren Versuchen KH7 eingesetzt, welches die lösliche AC effektiv hemmt (Kumar et al., 2014). KH7 verhinderte tatsächlich die β -NAD-induzierte Zunahme der intrazellulären cAMP-

Konzentration in glatten Muskelzellen, reduzierte in geringem Maße jedoch auch die Erhöhung des Isoproterenol-induzierten cAMP-Spiegels. Dieses lässt sich dadurch erklären, dass das KH7 unspezifisch auch die membranständige AC hemmt, jedoch nicht in dem Maße wie die lösliche AC (Dey et al., 2014). Ferner konnte in Organbadversuchen in Anwesenheit des KH7 eine signifikant reduzierte β -NAD-induzierte Relaxation der Muskulatur in Mastracheen gezeigt werden. Da die Salbutamol-induzierte Relaxation vorwiegend über die membranständige AC und die PKA vermittelt wird (Goncharova et al., 2012), konnte diese in den Organbadversuchen an Mastracheen nicht durch KH7 beeinflusst werden.

Zusammenfassend induziert β -NAD durch Aktivierung der löslichen AC die Erhöhung des cAMP-Spiegels in glatten Muskelzellen des Menschen. Als Aktivatoren der löslichen AC sind bisher das Bikarbonat und das CO₂ sowie das ATP bekannt (Kleinboelting et al., 2014). Da β -NAD und ATP Liganden an gleichen Rezeptoren, darunter auch den purinergen Rezeptoren, sind (Mutafova-Yambolieva und Durnin, 2014; Friebe et al., 2014; Durnin et al., 2013), liegt die Annahme nahe, dass auch β -NAD direkt die lösliche AC aktivieren kann.

4.3 Konstriktion der glatten Muskelzellen

4.3.1 Muskarin

Wie in der Einleitung schon beschrieben, ziehen AChE-positive Nervenfasern bis zu der glatten Muskulatur der terminalen Bronchioli, insbesondere beim Menschen (Partanen et al., 1982). Diese Nervenfasern setzen ACh frei, wodurch verschiedene Signalwege aktiviert werden (Starke, 1996). An der glatten Muskulatur sind vorwiegend muskarinische AChR vom Subtyp mAChR2 und mAChR3 für die Konstriktion verantwortlich (Matsui et al., 2002; Struckmann et al., 2003). Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Konstriktion der glatten Muskelzellen sowohl an Mastracheen als auch bei Lungenschnitten der Maus und auch bei Bronchioli des Menschen hauptsächlich Muskarin genutzt, welches als ein potenter Agonist der mAChR bekannt ist (Hahn, 1986; Wills und Douglas, 1988). So wurde die β -NAD-induzierte Relaxation anfangs an durch Muskarin kontrahierten ASM beobachtet. Da das β -NAD ferner an nicht vorkontrahierten ASM keinen Effekt vermittelte, wurde untersucht, ob das β -NAD

möglicherweise als Antagonist an mAChR oder auf Komponenten des mAChR-abhängigen Signalwegs wirkt. Ein prototypischer mAChR-Antagonist ist das Atropin (Nadel, 1974). Um zu überprüfen, ob das β -NAD auch durch andere Konstriktoren vorkontrahierte ASM dilatiert, wurden das KCl, das Thromboxan und die EFS genutzt.

4.3.2 KCl

Kaliumchlorid führt zu einer Konstriktion der glatten Muskulatur (Webb-Peploe und Shemherd, 1969; Cooke und Chase, 1971). Diese Konstriktion ist unabhängig von GPCRs und beruht auf einer Änderung des Membranpotenzials und der daraus resultierenden Mobilisierung des intrazellulären Kalziums (Toma et al., 1996; Di Fulvio et al., 2001). Dieses Kalzium führt zu einer Aktivierung des CaM, welches durch Aktivierung der MLCK eine Kontraktion glatter Muskelzellen vermittelt (Diamond und Holmes, 1975). Nach Zugabe von KCl zu ASM der Maus in Organbadversuchen konnte eine Kontraktion induziert werden, welche durch 5 mM β -NAD komplett aufgehoben werden konnte.

4.3.3 Thromboxan

Thromboxan (Thromboxan- A_2 ; TXA_2) ist ein mit Prostaglandinen verwandtes Biomolekül, welches hauptsächlich in Thrombozyten vorkommt und durch Cyclooxygenasen aus dem Vorprodukt Arachidonsäure entsteht (Hanasaki et al., 1990). Neben seiner Mitwirkung an der Thrombozytenaggregation (Ajayi et al., 1995; Tohgi et al., 1992) vermittelt TXA_2 über Thromboxan-Rezeptoren, welche zur Gruppe der PLC-aktivierbaren GPCR gehören, durch Mobilisierung von Kalzium eine Konstriktion glatter Muskeln an Gefäßen und Atemwegen (Wilson et al., 2005; Dorn und Becker, 1993). Um diese Konstriktion zu imitieren, wurde das Analogon des TXA_2 , das U46619 (Zhao und Foegh, 1997; Dorn et al., 1987), an PCLS in Videomorphometrie-Experimenten eingesetzt. Hier konnte gezeigt werden, dass β -NAD auch die durch U46619-vorkontrahierten Bronchi relaxieren konnte.

4.3.4 EFS

Durch die EFS an Trachealsegmenten der Maus werden Nervenendigungen stimuliert und zum Freisetzen verschiedener Mediatoren gebracht (Fedan et al., 2001; Lu et al., 2005; Fischer et al., 1993). Darunter befindet sich vor allem das ACh, welches an der Bronchialmuskulatur einen konstriktorischen Effekt hat (Fedan et al., 2001). Auch dieser Konstriktion konnte β -NAD entgegenwirken.

Zusätzlich zu der Induktion der Konstriktion glatter Muskelzellen durch verschiedene Effektoren wurden einzelne Komponenten des Signalweges, welcher die Konstriktion vermittelt, gehemmt. Darunter war die MLCK, welche durch das ML-7 (Kelley et al., 2000), und das CaM, welches durch A-7 Hydrochlorid (Tao-Cheng et al., 2014) gehemmt wurde. Beide Blocker konnten die Muskarin-induzierte Konstriktion erwartungsgemäß hemmen, jedoch nicht die β -NAD-induzierte Relaxation.

Zusammenfassend fand die β -NAD-induzierte Relaxation unabhängig vom Konstriktor statt. Es induziert deshalb sehr wahrscheinlich einen eigenständigen Signaltransduktionsweg.

4.4 Vergleich des β -NAD mit Salbutamol

β_2 -Adrenozeptoragonisten sind wichtige Bausteine in der Therapie von Asthma und COPD. Diese sind zur Zeit die stärksten Bronchodilatoren (Davis et al., 1980) und haben sich bei bronchokonstriktiven Erkrankungen als Mittel der ersten Wahl etabliert (Ziment, 1995). Ihre Wirkung beruht auf der reversiblen Bindung an β_2 -Rezeptoren, welche zur Klasse der G_s PCR gehören. Durch Aktivierung dieser Rezeptoren kommt es zu einer Bildung von cAMP, hauptsächlich durch die membranständige AC (Goncharova et al., 2012). Das cAMP aktiviert die PKA und führt so zu einer Hemmung der konstriktiv wirkenden MLCK (Wang et al., 2009). Nachteil dieser Therapeutika ist die Tachyphylaxie (Barnes, 1995; Davis und Conolly, 1980), d.h. eine schnelle Toleranzentwicklung gegenüber dem Medikament nach längerer Einnahme.

Die β -NAD-induzierte Relaxation wurde in dieser Arbeit mit der Salbutamol-induzierten Relaxation verglichen, da Salbutamol zur Gruppe der schnell wirksamen β_2 -Adrenozeptoragonisten (Tukiainen et al., 1988; Coupe et al., 1987) gezählt wird. Die komplette Relaxation der vorkontrahierten großen Atemwege der Maus sowie auch der

vorkontrahierten Bronchioli des Menschen wurde jeweils durch 500 μ M Salbutamol und 7 mM β -NAD erreicht. Außerdem konnte beobachtet werden, dass die Wirkung des Salbutamols in den kleinen Atemwegen der Maus erst später maximal ausgeprägt war als die β -NAD-induzierte Relaxation. Die Wirkung des β -NAD bedarf daher zwar höherer Wirkstoffkonzentration, tritt aber schneller ein..

4.5 β -NAD als mögliches neues Therapeutikum gegen bronchokonstriktive Lungenerkrankungen

β -NAD dilatierte in dieser Arbeit vorkontrahierte Atemwege der Maus und auch des Menschen effektiv. Der Signalweg ist noch nicht in Gänze geklärt, beruht aber mitunter auf einer Aktivierung der löslichen AC. Extrazelluläres β -NAD spielt auch physiologisch eine wichtige Rolle bei der Genese des Asthma bronchiale, da eine hohe Expression des CD38 durch Degradierung des β -NAD nachweislich einen asthmatischen Phänotyp induziert (Jude et al., 2012; 2011). Wenn es bei dieser Erkrankung zu einer Verminderung des endogenen β -NAD kommt, könnte es zum Beispiel inhaliert werden, um so dem asthmatischen Phänotyp endgegenzuwirken.

Im Vergleich mit Salbutamol, welches das Mittel der 1. Wahl bei bronchokonstriktiven Erkrankungen ist, war die dilatierende Wirkung des β -NAD vergleichbar. Es gibt jedoch Anzeichen für einen weiteren Vorteil des β -NAD. So wurde gezeigt, dass es eine antiinflammatorische Komponente aufweist (Umaphy et al., 2012). Insbesondere bei der akuten Lungeninsuffizienz konnte im Tiermodell eine protektive Wirkung des β -NAD nachgewiesen werden. Es dämpft den Anstieg entzündlicher Mediatoren wie dem TNF- α und dem IL-1 sowie dem IL-4 und IL-13, welche insbesondere beim allergischen Asthma eine wichtige Rolle spielen (Grunewald et al., 1998), und führt zu einem besseren Erhalt der Zellintegrität in der Lunge (Umaphy et al., 2012).

So könnte dieses Molekül gleichzeitig ein Mittel gegen die Konstriktion und die Entzündungsreaktion darstellen, beides wichtige Faktoren bei der Entstehung insbesondere von Asthma bronchiale (Holgate, 2008; Hofmann, 1997), aber auch der COPD (DeGodoy et al., 1996; Di Francia et al., 1994).

5 Zusammenfassung

β -NAD wurde als möglicher Neurotransmitter beschrieben, welcher die glatte Muskulatur im menschlichen Intestinaltrakt relaxiert. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob es auch in Atemwegen der Maus und des Menschen relaxierend wirkt und, falls ja, über welchen Signalweg diese Relaxation vermittelt wird. Atemwegskontraktion wurde in Organbadexperimenten (Maus, Mensch) und videomorphometrisch in lebenden Lungenschnittpräparationen (precision-cut lung slices = PCLS) der Maus gemessen. Mittels einer in dieser Arbeit neu etablierten Methode konnte in Lungenschnitten parallel zur Bronchusfläche gleichzeitig Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ und der Membranpotenziale bestimmt werden. An kultivierten glatten Muskelzellen wurden Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ und, durch FRET-Experimente, der $[cAMP]_i$ nach Gabe von β -NAD untersucht.

β -NAD relaxiert vorkontrahierte Atemwege sowohl der Maus als auch des Menschen. Dieser Effekt war vergleichbar mit der Relaxation nach Gabe von Salbutamol, einem β_2 -Adrenozeptoragonisten. Im Gegensatz zu der Relaxation im Intestinaltrakt, welche durch purinerge Rezeptoren vermittelt wurde, war der relaxierende Effekt durch Antagonisten purinergere Rezeptoren nicht hemmbar. Außerdem war diese Relaxation unabhängig von der Hemmung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren und vieler anderer Blocker der Dilation glatter Muskelzellen. In kultivierten Zellen und in glatten Muskelzellen der Bronchi in PCLS konnte eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ beobachtet werden, welche simultan mit einer Depolarisation und einer Relaxation einherging. Da von den eingesetzten Blockern einzig bei Rolipram, einem Blocker der PDE-4, eine Veränderung in der Relaxationskinetik, nämlich eine Verstärkung, beobachtet wurde, wurde cAMP mittels FRET gemessen. Hier zeigte sich eine β -NAD-induzierte Erhöhung der $[cAMP]_i$, welche durch einen Blocker der löslichen AC gehemmt werden konnte, der auch in Organbadversuchen die β -NAD-induzierte Relaxation signifikant hemmte.

Diese Ergebnisse zeigen β -NAD als einen neuen Bronchodilator, welcher durch Aktivierung der löslichen AC und durch die Erhöhung der $[cAMP]_i$ zu einer Relaxation glatter Muskelzellen führt. Durch die hier gezeigte relaxierende Wirkung an glatten Muskelzellen der Atemwege und die in anderen Arbeiten gezeigte antiinflammatorische Komponente stellt β -NAD möglicherweise ein neues Therapeutikum bei bronchokonstriktiven Erkrankungen dar.

6 Summary

β -NAD has been reported as a sympathetic neurotransmitter relaxing intestinal smooth muscle. We here address its ability to relax airway smooth muscle and the underlying mechanisms. Force development of murine trachea and human bronchioli was investigated in organ bath experiments, bronchoconstriction of murine intrapulmonary airways by videomicroscopic analysis of precision-cut lung slices. Further calcium measurements were made in isolated and cultivated smooth muscle cells from mouse trachea and human airways. Changes in $[Ca^{2+}]_i$ were recorded simultaneously with changes in membrane potential and luminal area in intact bronchial smooth muscle in precision cut lung slices via a newly established method. Finally, β -NAD-induced changes in intracellular cAMP were measured via FRET experiments.

β -NAD dose-dependently relaxed murine and human airways precontracted with muscarine by up to 100 %, being as potent as salbutamol, a β_2 -adrenoceptor agonist. In contrast to its reported action via purinergic receptors in intestinal smooth muscle, the airway relaxing effect of β -NAD was resistant to purinergic inhibitors. β -NAD-induced relaxation was unaffected by inhibition of G-protein coupled receptors and several other blockers of smooth muscle relaxation which were used in our experiments. Isolated airway smooth muscle cells and bronchial smooth muscle in precision-cut lung slices responded to β -NAD with increase in $[Ca^{2+}]_i$ and depolarization of the cell membrane while relaxing. In FRET-experiments, β -NAD induced an increase in intracellular cAMP, which could be blocked by an inhibitor of the soluble adenylyl cyclase. This blocker could further significantly reduce the β -NAD-induced relaxation.

These results identify β -NAD as a novel bronchodilator acting via the soluble adenylyl cyclase and increase in intracellular cAMP. Because of this relaxant effect and the anti-inflammatory effect of β -NAD, which could be shown by other groups, it potentially represents a new therapeutic tool against bronchoconstrictory lung diseases.

7 Abkürzungsverzeichnis

[Ca²⁺]_i (intrazelluläre Kalziumkonzentration)
[cAMP]_i (intrazelluläre cAMP-Konzentration)
AC (Adenylatzyklase)
ACh (Acetylcholin)
AChE (Acetylcholinesterase)
AChR (Acetylcholinrezeptoren)
ADP (Adenosindiphosphat)
Airway hyperreactivity, AHR (Bronchiale Hyperreaktivität)
ART (ADP-Ribosyltransferasen)
ASM (airway smooth muscle; glatte Muskelzellen der Atemwege)
ATP (Adenosintriphosphat)
bpm (beats per minute; Schläge pro Minute)
BSA (bovine serum albumin; Rinderalbumin)
BST (Bone marrow stromal cell antigen)
cADPR (zyklische ADP-Ribose)
cADPrS (zyklische ADP-Ribose Synthasen)
CaM (Calmodulin)
CaMKII (Calmodulin-abhängige Kinase)
cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat)
CD (Cluster of differentiation)
CFP (Cyan fluorescent protein; blaufluoreszierendes Protein)
cGMP (zyklisches Guaninmonophosphat)
ChAT (Cholinacetyltransferase)
DAG (Diacylglycerol)
d.h. (das heißt)
DTT (Dithiotreitol)
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)
EFS (Elektrische Feldstimulation)
EGF (epidermal growth factor)
eNANC (exzitatorisches nicht-adrenerges, nicht-cholinerges System)
eNOS (endotheliale NO-Synthase)
ER (endoplasmatisches Retikulum)
FCS (Fetales Kalbserum)
FITC (Fluoresceinisothiocyanat)
FRET (Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer)
GC (Guanylatcyclase; Guanylatzyklase)
GFP (grünfluoreszierendes Protein)
GPCR (G protein-coupled receptors; G-Protein gekoppelte Rezeptoren)
Grad Celsius (C°)

GTP (Guanintriphosphat)
Hz (Hertz)
Ig (Immunglobulin)
IL (Interleukin)
iNANC (inhibitorisches nicht-adrenerges, nicht-cholinerges System)
iNOS (induzierbare NO-Synthase)
IP₃ (Inositol-1,4,5-Trisphosphat)
IP₄ (Inositol-1,3,4,5-Tetraphosphat)
IP₅ (Inositol-1,3,4,5,6-Pentaphosphat)
IP₆ (Inositol-1,2,3,4,5,6-Hexaphosphat)
LPS (Lipopolysaccharid)
mAChR (Muskarinischer Acetylcholinrezeptor)
MARTs (Mono-ADP-Ribose Transferasen)
ms (Millisekunde)
min (Minuten)
MLCK (myosine light chain kinase; Kinase der leichten Kette des Myosins)
MLCP (myosine light chain kinase; Phosphatase der leichten Kette des Myosins)
NAADP (Nikotinsäureadenindinukleotidphosphat)
nAChR (Nikotinischer Rezeptor)
NKA (Neurokinin A)
nm (Nanometer)
NO (Stickstoffmonoxyd)
NOS (NO-Synthetase)
nNOS (neuronale NO-Synthase)
NPY (Neuropeptid Y)
PARPs (Poly-ADP-Ribose Transferasen)
PDGF (platelet derived growth factor)
Phosphodiesterase (PDE)
PIP₂ (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat)
PKA (Proteinkinase A)
PKC (Proteinkinase C)
PLC (Phospholipase C)
PPAR (Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor)
RhoGEF (Rho Guanine nucleotide exchange factor; Guanin Austauschfaktor)
ROCC (receptor-operated calcium channels; Rezeptor-abhängige Kalziumkanäle)
ROCK (Rho Kinase)
rpm (rounds per minute; Umdrehungen in der Minute)
RPMI (Zellmedium; Benannt nach dem Entstehungsort (Roswell Park Memorial Institute))
s (Sekunde)

Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase, SERCA (Calciumpumpen des sarcoplasmatischen Retikulums)

SIRT (Sirtuine)

SMOCC (second-messenger-operated calcium channels; Second-messenger-abhängige Kalziumkanäle)

SOCC (store-operated calcium channels; speicherabhängige Kalziumkanäle)

TGF- β (Transforming growth factor- β)

T_H2-Lymphozyten (Typ2-T-Helferzellen)

TNF- α (Tumornekrosefaktor- α)

TRP-Kanäle (Transiente Rezeptor Potential Kanäle)

TXA₂ (Thromboxan A₂)

V (Volt)

VACHT (Vesikulärer ACh-Transporter)

VICC (voltage-insensitive calcium channel; Spannungsunabhängige Kalziumkanäle)

VIP (Vasoaktives Intestinales Peptid)

VOCC (voltage-operated calcium channel; Spannungsabhängige Kalziumkanäle)

YFP (Yellow fluorescent protein; gelbfluoreszierendes Protein)

z.B. (zum Beispiel)

β -NAD (Beta Nikotinamid adenin dinukleotid)

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

8.1 Abbildungen

Abb. 2.1 Schematischer Aufbau eines Glaszylinders für die Organbadversuche

Abb. 2.2 Versuchsaufbau zur Prüfung des Einflusses von β -NAD auf nicht vorkontrahierte glatte Muskulatur der Trachealspangen der Maus

Abb. 2.3 Versuchsaufbau zur Feststellung der Dosis-Wirkungsbeziehung von β -NAD auf vorkontrahierte glatte Muskulatur der Trachealspangen der Maus

Abb. 2.4 Versuchsaufbau zur Feststellung des Signalweges der β -NAD-induzierten Dilation der vorkontrahierten glatten Muskulatur der Trachealspangen der Maus

Abb. 2.5 Versuchsaufbau zur Feststellung der Wirkung von Salbutamol auf die vorkontrahierte glatte Muskulatur der Trachealspangen der Maus

Abb. 2.6 Schematische Darstellung der Inkubationskammer

Abb. 2.7 Aufnahme eines 200 μ m dicken Lungenschnittes

Abb. 2.8 Versuchsaufbau zur Prüfung des Einflusses von β -NAD auf unbehandelte Bronchi der Maus

Abb. 2.9 Versuchsaufbau zur Feststellung der Dosis-Wirkungsbeziehung von β -NAD auf vorkontrahierte glatte Muskulatur der Bronchi der Maus

Abb. 2.10 Versuchsaufbau zur Feststellung des Signalweges der β -NAD-induzierten Dilation auf die vorkontrahierte glatte Muskulatur der Bronchi der Maus

Abb. 2.11 Versuchsaufbau zum Vergleich der Wirkungen von Salbutamol und β -NAD auf die vorkontrahierte glatte Muskulatur der Bronchi der Maus

Abb. 2.12 Versuchsaufbau zu Versuchen der Kalziummessung an isolierten glatten Muskelzellen der Atemwege der Maus

Abb. 2.13 Versuchsaufbau zu Versuchen der cAMP-Messung an glatten Muskelzellen des menschlichen Bronchialsystems

Abb. 2.14 Versuchsaufbau zu Versuchen der cAMP-Messung mit KH7 zur Evaluation der Entstehung des intrazellulären cAMP in glatten Muskelzellen des menschlichen Bronchialsystems

Abb. 2.15 Versuchsaufbau zur simultanen Messung der Kalziumkonzentration, des Membranpotenzials und der Fläche des Bronchiallumens

Abb. 2.16 Versuchsaufbau zur Feststellung der Dosis-Wirkungsbeziehung von β -NAD auf die vorkontrahierte glatte Muskulatur der Bronchioli des Menschen

Abb. 2.17 Versuchsaufbau zur Feststellung der Dosis-Wirkungsbeziehung von Salbutamol auf die vorkontrahierte glatte Muskulatur der Bronchioli des Menschen

Abb. 3.1 Organbadversuche an Trachealsegmenten der Maus

Abb. 3.2-Abb. 3.5 Organbadversuche an Trachealsegmenten der Maus

Abb. 3.6-Abb. 3.7 Doppel-Immunfluoreszenz

Abb. 3.8 RT-PCR, Agarose-Gelelektrophorese

Abb. 3.9-Abb. 3.10 Videomorphometrische Versuche an Bronchi der Maus in PCLS

Abb. 3.11 Organbadversuche an Trachealsegmenten der Maus

Abb. 3.12 Videomorphometrische Versuche an Bronchi der Maus in PCLS

Abb. 3.13-Abb. 3.21 Organbadversuche an Trachealsegmenten der Maus

Abb. 3.22 Algorithmus zur Berechnung der relativen Muskarin-induzierten Kontraktion und der relativen β -NAD-induzierten Relaxation von Tracheen in Organbadversuchen.

Abb. 3.23 Effekt der benutzten Substanzen auf die Muskarin-induzierte Kontraktion der Tracheen in Organbadversuchen.

Abb. 3.24 Effekt der benutzten Substanzen auf die β -NAD-induzierte Relaxation auf vorkontrahierte Tracheen in Organbadversuchen.

Abb. 3.25-Abb. 3.26 Organbadversuche an Trachealsegmenten der Maus

Abb. 3.27 Videomorphometrische Versuche an Bronchi der Maus

Abb. 3.28 Organbadversuche an Trachealsegmenten der Maus

Abb. 3.29 Videomorphometrische Versuche an Bronchi der Maus in PCLS

Abb. 3.30 cAMP-Messungen in glatten Muskelzellen des menschlichen Bronchialsystems

Abb. 3.31 cAMP-Messungen in glatten Muskelzellen des menschlichen Bronchialsystems nach Zugabe von KH7 (30 μ M)

Abb. 3.32 Organbadversuche an Trachealsegmenten der Maus

Abb. 3.33 Kalziummessungen in isolierten glatten Muskelzellen der Maustrachea

Abb. 3.34 Kalziummessungen an kultivierten glatten Muskelzellen der murinen Trachea

Abb. 3.35 Gleichzeitige Messungen von Kalzium, Membranpotenzial und der Fläche der Bronchi der Maus in PCLS, CLSM-Analyse

Abb. 3.36 Organbadversuche an Bronchi aus Lungensegmenten des Menschen

Abb. 3.37 Kalziummessungen in glatten Bronchialmuskelzellen des Menschen

Abb. 4.1 Signalweg der Kontraktion bzw. der Dilation einer glatten Muskelzelle mit Beispielen von Enzymen, die in dieser Arbeit geblockt wurden.

8.2 Tabellen

Tab. 2.1 Liste der verwendeten Pharmaka

Tab. 2.2 Liste der verwendeten Primärantikörper

Tab. 2.3 Liste der verwendeten Sekundärantikörper

Tab. 2.4 Liste der verwendeten Oligonukleotide für qualitative RT-PCR

Tab. 4.1 Verteilung der Adenosinrezeptorsubtypen im Körper

9 Literaturverzeichnis

1. Abbracchio MP, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Miras-Portugal MT, King BF, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA, Burnstock G: Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y₁₄ receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends Pharmacol Sci.* 24(2):52-5, 2003
2. Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Knight GE, Fumagalli M, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA: International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev.* 58(3):281-341, 2006
3. Adcock IM, Barnes PJ: Molecular mechanisms of corticosteroid resistance. *Chest* 134(2):394-401, 2008
4. Adelstein RS, Sellers JR: Effects of calcium on vascular smooth muscle contraction. *Am J Cardiol* 30;59(3):4B-10B, 1987
5. Adriouch S, Bannas P, Schwarz N, Fliegert R, Guse AH, Seman M, Haag F, Koch-Nolte F: ADP-ribosylation at R125 gates the P2X₇ ion channel by presenting a covalent ligand to its nucleotide binding site. *FASEB J* 22(3):861-9. 2008
6. Adriouch S, Hubert S, Pechberty S, Koch-Nolte F, Haag F, Seman M: NAD⁺ released during inflammation participates in T cell homeostasis by inducing ART2-mediated death of naive T cells in vivo. *J Immunol* 1;179(1):186-94, 2007
7. Ajayi AA, Mathur R, Halushka PV: Testosterone increases human platelet thromboxane A₂ receptor density and aggregation responses. *Circulation* 1;91(11):2742-7, 1995
8. Ali S, Mustafa SJ, Metzger WJ: Adenosine-induced bronchoconstriction in an allergic rabbit model: antagonism by theophylline aerosol. *Agents Actions.* 37(3-4):165-7, 1992
9. Allen T, Iftinca M, Cole WC, Plane F: Smooth muscle membrane potential modulates endothelium-dependent relaxation of rat basilar artery via myo-endothelial gap junctions. *J Physiol* 15;545(Pt 3):975-86, 2002
10. Andreopoulos S, Li PP, Siu KP, Kish SJ, Warsh JJ: Altered CTX-catalyzed and endogenous [32P]ADP-ribosylation of stimulatory G protein alpha isoforms in postmortem bipolar affective disorder temporal cortex. *J Neurosci Res* 1;72(5):638-45, 2003
11. Arvidsson U, Riedl M, Elde R, Meister B: Vesicular acetylcholine transporter (VACHT) protein: a novel and unique marker for cholinergic neurons in the central and peripheral nervous systems. *J Comp Neurol* 24;378(4):454-67, 1997
12. Baker AJ, Weiner MW: Force decline during muscle relaxation promotes calcium release to the cytosol. *Am J Physiol* 273(1 Pt 1):C85-91, 1997
13. Bakker BM, Overkamp KM, Kötter P, Luttik MA, Pronk JT: Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 25 (1): 15–37, 2001
14. Barnes PJ: Theophylline: new perspectives for an old drug. *Am J Respir Crit Care Med.* 15;167(6):813-8, 2003
15. Barnes NC: The clinical relevance of tachyphylaxis to beta 2 agonists. *Br J Clin Pract Suppl* 81:18-9

16. Barrett NA, Austen KF: Innate cells and T helper 2 cell immunity in airway inflammation *Immunity* 18;31(3):425-37, 2009
17. Baurand A, Gachet C: The P2Y(1) receptor as a target for new antithrombotic drugs: a review of the P2Y(1) antagonist MRS-2179. *Cardiovasc Drug Rev Spring*;21(1):67-76, 2003
18. Belenky P, Racette FG, Bogan KL, McClure JM, Smith JS, Brenner C: Nicotinamide riboside promotes Sir2 silencing and extends lifespan via Nrk and Urh1/Pnp1/Meu1 pathways to NAD+. *Cell* 4;129(3):473-84, 2007
19. Berger F, Ramírez-Hernández MH, Ziegler M: The new life of a centenarian: signaling functions of NAD(P). *Trends Biochem. Sci.* 29 (3): 111–8 2004
20. Bernátová I, Pechánová O, Simko F: Effect of captopril in L-NAME-induced hypertension on the rat myocardium, aorta, brain and kidney. *Exp Physiol* 84(6):1095-105, 1999
21. Berridge MJ: Inositol triphosphat and calcium signaling. *Nature* 28;361(6410):315-25, 1993
22. Berry MJ, Adair NE, Rejeski WJ: Use of peak oxygen consumption in predicting physical function and quality of life in COPD patients. *Chest* 129(6):1516-22, 2006
23. Biedermann A, Köhnlein T: Alpha-1-Antitrypsin-Mangel. *Dtsch Ärztbl* 26: 1828-183, 2006
24. Billington CK, Ojo OO, Penn RB, Ito S: cAMP regulation of airway smooth muscle function. *Pulm Pharmacol Ther* 26(1):112-20, 2013
25. Billington RA, Bruzzone S, De Flora A, Genazzani AA, Koch-Nolte F, Ziegler M, Zocchi E: Emerging functions of extracellular pyridine nucleotides. *Mol Med.* 12 (11–12): 324–7, 2006
26. Blander G, Guarente L: The Sir2 family of protein deacetylases. *Annu Rev Biochem*73:417-35, 2004
27. Blottner D, Baumgarten HG: Insulin-like growth factor-I counteracts bFGF-induced survival of nitric oxide synthase (NOS)-positive spinal cord neurons after target-lesion in vivo. *J Neurosci Res* 32(4):471-80, 1992
28. Bockaert J, Pin JP: Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J* 1;18(7):1723-9, 1999
29. Borish LC, Nelson HS, Lanz MJ, Claussen L, Whitmore JB, Agosti JM, Garrison L: Interleukin-4 receptor in moderate atopic asthma. A phase I/II randomized, placebo-controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 160(6):1816-23, 1999
30. Bortell R, Moss J, McKenna RC, Rigby MR, Niedzwiecki D, Stevens LA, Patton WA, Mordes JP, Greiner DL, Rossini AA: Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) and its metabolites inhibit T lymphocyte proliferation: role of cell surface NAD glycohydrolase and pyrophosphatase activities. *J Immunol* 15;167(4):2049-59, 2001
31. Bourne HR: Pieces of the true grail: a G protein finds its target. *Science* 12;278(5345):1898-9, 1997
32. Bousquet J, Dahl R, Khaltaev N: GARD (Global Alliance against chronic Respiratory Diseases). *Rev Mal Respir* 23(4 Pt 2):10S73-10S75, 2006
33. Braidy N, Jayasena T, Poljak A, Sachdev PS: Sirtuins in cognitive ageing and Alzheimer's disease. *Curr Opin Psychiatry* 25(3):226-30, 2012

34. Bruzzone S, Dodoni G, Kaludercic N, Basile G, Millo E, De Flora A, Si Lisa F, Zocchi E: Mitochondrial dysfunction induced by a cytotoxic adenine dinucleotide produced by ADP-ribosyl cyclases from cADPR. *J Biol Chem* 16;282(7):5045-52, 2007
35. Bruzzone S, Guida L, Zocchi E, Franco L, De Flora A: Connexin 43 hemi channels mediate Ca²⁺-regulated transmembrane NAD⁺ fluxes in intact cells. *FASEB J* 15(1):10-12, 2001
36. Buckley KA, Wagstaff SC, McKay G, Gaw A, Hipskind RA, Bilbe G, Gallagher JA, Bowler WB: Parathyroid hormone potentiates nucleotide-induced [Ca²⁺]_i release in rat osteoblasts independently of G_q activation or cyclic monophosphate accumulation. A mechanism for localizing systemic responses in bone. *J Biol Chem* 23;276(12):9565-71, 2001
37. Buell G, Collo G, Rassendren F: P2X receptors: an emerging channel family. *Eur J Neurosci*, 8(10):2221-8, 1996
38. Bult H, Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Jordaens FH, Van Maercke YM, Herman AG: Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature* 24;345(6273):346-7, 1990
39. Bunbupha S, Pakdeechote P, Kukongviriyapan U, Prachaney P, Kukongviriyapan V: Asiatic acid reduces blood pressure by enhancing nitric oxide bioavailability with modulation of eNOS and p47phox expression in L-NAME-induced hypertensive rats. *Phytother Res* 28(10):1506-12, 2014
40. Bürkle A: Poly(ADP-ribose). The most elaborate metabolite of NAD⁺. *FEBS J.* 272 (18): 4576–89 2005
41. Burns DL, Hausman SZ, Witvliet MH, Brennan MJ, Poolman JT, Manclark CR: Biochemical properties of pertussis toxin. *Tokai Exp Clin Med* 13 Suppl:181-5, 1988
42. Burnstock G, Knight GE: Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol* 240:31-304, 2004
43. Burnstock G: A basis for distinguishing two types of purinergic receptors. R. W. Straub, Bolis, L. [ed.], *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach*. Raven Press, New York. Pp. 107-118, 1978
44. Burnstock G: Current state of purinoceptor research. *Pharm Acta Helv*, 69(4):231-42, 1995
45. Burnstock G: P2X receptors in sensory neurons. *Anaesth* 84(4):476-88, 2000
46. Burnstock G: Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* 64(12):1471-83, 2007
47. Caballero J, Frenette G, D'Amours O, Dufour M, Oko R, Sullivan R: ATP-binding cassette transporter G2 activity in the bovine spermatozoa is modulated along the epididymal duct and at ejaculation. *Biol Reprod* 14;86(6), 2012
48. Canning BJ, Fischer A: Localization of cholinergic nerves in lower airways of guinea pigs using antisera to choline acetyltransferase. *Am J Physiol* 272: L731-L738, 1997
49. Caulfield MP.: Muscarinic receptors--characterization, coupling and function. *Pharmacol Ther* 58(3):319-79, 1993
50. Chakfe Y, Seguin R, Antel JP, Morissette C, Malo D, Henderson D, Séguéla P: ADP and AMP induce interleukin-1beta release from microglial cells through activation of ATP-primed P2X7 receptor channels. *J Neurosci* 15;22(8):3061-9, 2002

51. Charlton SJ, Brown CA, Weisman GA, Turner JT, Erb L, Boarder MR: PPADS and suramin as antagonists at cloned P2Y- and P2U-purinoceptors. *Br J Pharmacol* 118(3):704-10, 1996
52. Clark DJ, Grove A, Cargill RI, Lipworth BJ: Comparative adrenal suppression with inhaled budesonide and fluticasone propionate in adult asthmatic patients. *Thorax* 51(3):262-6, 2000
53. Climent B, Moreno L, Martinez P, Contreras C, Sánchez A, Pérez-Vizcaino F, Garcia-Sacristán A, Rivera L, Prieto D: Upregulation of SK3 and IK1 channels contributes to the enhanced endothelial calcium signaling and the preserved coronary relaxation in obese Zucker rats. *PLoS One* 10;9(19):e109432, 2014
54. Cohn LH, Boyden CM, Collins JJ Jr: Improved long-term survival after aortocoronary bypass for advanced coronary artery disease. *Am J Surg.*129(4):380-5, 1975
55. Colmes WF, Pittman QJ: Presynaptic inhibition by neuropeptide Y and baclofen in hippocampus: insensitivity to pertussis toxin treatment. *Brain Res* 25;498(1):99-104, 1989
56. Communi D, Paindavoine P, Place GA, Parmentier M, Boeynaems JM: Expression of P2Y receptors in cell lines derived from the human lung. *Br J Pharmacol* 127(2):562-8, 1999
57. Cooke PH, Chase RH: Potassium chloride-insoluble myofilaments in vertebrate smooth muscle cells. *Exp Cell Res* 66(2):417-25, 1971
58. Corda D, Di Girolamo M: New Embo Member's Review: Functional aspects of protein mono-ADP-ribosylation. *EMBO J.* 22 (9): 1953–8, 2003
59. Coupe MO, Guly U, Brown E, Barnes PJ: Nebulized adrenaline in acute severe asthma: comparison with salbutamol. *Eur J Respir Dis* 71(4):227-32, 1987
60. Czura AW, Czura CJ: CD38 and CD157: biological observations to clinical therapeutic targets. *Mol Med* 12(11-12):309-11, 2006
61. Danesh J, Appleby P: Persistent infection and vascular disease: a systematic review. *Expert Opin Investig Drugs* 7(5):691-713, 1998
62. Davis C, Conolly ME: Tachyphylaxis to beta-adrenoceptor agonists in human bronchial smooth muscle: studies in vitro. *Br J Pharmacol* 10(5):417-23, 1980
63. Davis C, Conolly ME, Greenacre JK: Beta-adrenoceptors in human lung, bronchus and lymphocytes. *Br J Pharmacol* 10(5):425-32, 1980
64. De Flora A, Zocchi E, Guida L, Franco L, Bruzzone S: Autocrine and paracrine calcium signaling by the CD38/NAD⁺/cyclic ADP-ribose system. *Ann N Y Acad Sci* 1028:176-91, 2004
65. De Godoy I, Donahoe M, Calhoun WJ, Mancino J, Rogers RM: Elevated TNF-alpha production by peripheral blood monocytes of weight-losing COPD patients. *Am J Respir Crit Care Med* 153(2):633-7, 1996
66. Debets MF, Prins JS, Merks D, van Berkel SS, van Delft FL, van Hest JC, Rutjes FP: Synthesis of DIBAC analogues with excellent SPAAC rat constants. *Org Biomol Chem* 21;12(27):5031-7, 2014
67. Dentener MA, Creutzberg EC, Schols AM, Mantovani A, van't Veer C, Buurman WA, Wouters EF: Systemic anti-inflammatory mediators in COPD: increase in soluble interleukin 1 receptor II during treatment of exacerbations. *Thorax* 56(9):721-6, 2001

68. Deshpande DA, Dogan S, Walseth TF, Miller SM, Amrani Y, Panettieri RA, Kannan MS: Modulation of calcium signaling by interleukin-13 in human airway smooth muscle: role of CD38/cyclic adenosine diphosphate ribose pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31(1):36-42, 2004
69. Deshpande DA, Wang WC, McIlmoyle EL, Robinett KS, Schillinger RM, An SS, Sham JS, Liggett SB: Bitter taste receptors on airway smooth muscle bronchodilate by localized calcium signaling and reverse obstruction. *Nat Med* 16(11):1299-304, 2010
70. Desireddi JR, Farrow KN, Marks JD, Waypa GB, Schumacker PT: Hypoxia increases ROS signaling and cytosolic Ca²⁺ in pulmonary smooth muscle cells of mouse lung slices. *Antioxid Redox Signal* 1;12(5):595-602, 2010
71. Dey S, Roy D, Majumder GC, Bhattacharyya D: Extracellular regulation of sperm transmembrane adenylyl cyclase by a forward motility stimulating protein. *PLoS One* 28;9(10):e110669, 2014
72. Di Francia M, Barbier D, Mege JL, Orehek J: Tumor necrosis factor-alpha levels and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 150(5 Pt 1):1453-5, 1994
73. Di Fulvio M, Lincoln TM, Lauf PK, Adragna NC: Protein kinase G regulates potassium chloride cotransporter-4 [corrected] expression in primary cultures of rat vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 15;276(24):21046-52, 2001
74. Di Napoli M, Papa F: Inflammation, statins, and outcome after ischemic stroke. *Stroke* 32(10):2446-7, 2001
75. Diamond J: Role of cyclic nucleotides in control of smooth muscle contraction. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 9:327-40, 1978
76. Diamond J, Holmes TG: Effects of potassium chloride and smooth muscle relaxants on tension and cyclic nucleotide levels in rat myometrium. *Can J Physiol Pharmacol* 53(6):1099-107, 1975
77. Dianzani U, Funaro A, DiFranco D, Garbarino G, Bragardo M, Redoglia V, Buonfiglio D, De Monte LB, Pileri A, Malavasi F: Interaction between endothelium and CD4+CD45RA+ lymphocytes. Role of the human CD38 molecule. *J Immunol* 1;153(3):952-9, 1994
78. Diefenbach J, Bürkle A: Introduction to poly(ADP-ribose) metabolism. *Cell. Mol. Life Sci.* 62 (7–8): 721–30 2005
79. Donnelly LE, Rogers DF: Therapy for chronic obstructive pulmonary disease in the 21st century. *Drugs.* 63(19):1973-98, 2003
80. Donnelly LE¹, Rendell NB, Murray S, Allport JR, Lo G, Kefalas P, Taylor GW, MacDermot J: Arginine-specific mono(ADP-ribosyl)transferase activity on the surface of human polymorphonuclear neutrophil leucocytes. *Biochem J* 15;315 (Pt 2):635-41, 1996
81. Dorn GW 2nd, Becker MW: Thromboxane A2 stimulated signal transduction in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 265(1):447-56, 1993
82. Dorn GW 2nd, Sens D, Chaikhouni A, Mais D, Halushka PV: Cultured human vascular smooth muscle cells with functional thromboxane A2 receptors: measurement of U46619-induced calcium efflux. *Circ Res* 60(6):952-6, 1987
83. Drazen JM, Israel E, O'Byrne PM: Treatment of asthma with drugs modifying the leukotriene pathway. *N Engl J Med* 21;340(3):197-206, 1999

84. Duess JW, Fujiwara N, Corcionivoschi N, Puri, Thompson J. ROCK inhibitor (y-27632) disrupts somitogenesis in chick embryos. *Pediatr Surg Int* 29(1):13-8, 2013
85. Duncker HR, Kummer W: Atemsystem. In: *Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie, Band 1*. Hrsg: Benninghoff A.; Drenckhahn D. Urban & Fischer, München, 2008
86. Dunwiddie TV, Masino SA: The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 24:31-55, 2001
87. Durnin L, Sanders KM, Mutafova-Yambolieva VN: Differential release of NAD⁺ and ATP upon activation of enteric motor neurons in primate and murine colons. *Neurogastroenterol Motil* 25(3):e194-204, 2013
88. Dutt P, Nguyen N, Toksoz D: Role of Lbc RhoGEF in Galpha12/13-induced signals to Rho GTPase. *Cell Signal* 16(2):201-9, 2004
89. Eberhard M, Erne P: Calcium binding to fluorescent calcium indicators: calcium green, calcium orange and calcium crimson. *Biochem Biophys Res Commun* 15;180(1):209-15, 1991
90. Ebina M, Takahashi T, Chiba T, Motomiya M: Cellular hypertrophy and hyperplasia of airway smooth muscles underlying bronchial asthma. A 3-D morphometric study. *Am Rev Respir Dis* 148(3):720-6, 1993
91. Erin EM, Leaker BR, Zacharasiewicz A, Higgins LA, Nicholson GC, Boyce MJ, de Boer P, Jones RC, Durham SR, Barnes PJ, Hansel TT: Effects of a reversible beta-tryptase and trypsin inhibitor (RWJ-58643) on nasal allergic responses. *Clin Exp Allergy* 36(4):458-64, 2006
92. Evans ME, Paterson JW, Richards AJ, Walker SR: Pharmacokinetics of inhaled salbutamol in asthmatic patients. *Br J Pharmacol* 43(2):466p-467p, 1971
93. Fan Chung K: Phosphodiesterase inhibitors in airways disease. *Eur J Pharmacol.* 8;533(1-3):110-7, 2006
94. Fanta CH: Asthma. *N Engl J Med* 5;360(10):1002-14, 2009
95. Farah OR, Li D, McInyre BA, Pan J, Belik J: Airway epithelial-derived factor relaxes pulmonary vascular smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 296(1):L115-20, 2009
96. Farrens DL, Altenbach C, Yang K, Hubbell WL, Khorana HG: Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin. *Science* 1;274(5288):768-70, 1996
97. Fasolato C, Innocenti B, Pozzan T: Receptor-activated Ca²⁺ influx: how many mechanisms for how many channels? *Trends Pharmacol Sci* 15(3):77-83, 1994
98. Fedan JS, Van Scott MR, Johnston RA: Pharmacological techniques for the in vitro study of airways. *J Pharmacol Toxicol Methods* Mar-45(2):159-74, 2001
99. Felder CC, Singer-Lahat D, Mathes C: Voltage-independent calcium channels. Regulation by receptors and intracellular calcium stores. *Biochem Pharmacol* 29;48(11):1997-2004, 1994 Nov
100. Felder CC: Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. *FASEB J* 9(8):619-25, 1995
101. Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Dal Susino M, Melchiorri L, Baricordi OR, Di Virgilio F: Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2z receptor of human macrophages. *J Immunol* 1;159(3):1451-8, 1997

102. Fischer A, Mundel P, Mayer B, Preissler U, Philippin B, Kummer W: Nitric oxide Synthase in guinea pig lower airway innervations. *Neurosci* 12;149(2):157-60, 1993
103. Fisher JT, Vincent SG, Gomeza J, Yamada M, Wess J: Loss of vagally mediated bradycardia and bronchoconstriction in mice lacking M2 or M3 muscarinic acetylcholine receptors. *FASEB J* 18: 711-713, 2004.
104. Flemming R, Cheong A, Dedman AM, Beech DJ: Discrete store-operated calcium influx into an intracellular compartment in rabbit arteriolar smooth muscle. *J Physiol* 1;543(Pt 2):455-64, 2002
105. Förstermann U, Schmidt HH, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD, Nakane M, Murad F: Isoforms of nitric oxide Synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol* 24;42(10):1849-57, 1991
106. Foster JW, Moat AG: Nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis and pyridine nucleotide cycle metabolism in microbial systems. *Microbiol. Rev.* 44 (1): 83–105, 1980
107. Franco L, Bruzzone S, Song P, Guida L, Zocchi E, Walseth TF, Crimi E, Usai C, De Flora A, Brusasco V: Extracellular cyclic ADP-ribose potentiates ACh-induced contraction in bovine tracheal smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280(1):L98-L106, 2001
108. Fraser CM, Venter JC: Beta-adrenergic receptors. Relationship of primary structure, receptor function, and regulation. *Am Rev Respir Dis* 141(2 Pt 2):22-30, 1990
109. Fredholm BB, Brodin K, Strandberg K: On the mechanism of relaxation of tracheal muscle by theophylline and other cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*. 45(5):336-44, 1979
110. Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J: International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev*, 53(4):527-52, 2001
111. Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin LG, Schiöth HB: The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 63(6):1256-72, 2003
112. Friebe D, Yang T, Schmidt T, Borg N, Steckel B, Ding Z, Schrader J: Purinergic signaling on leukocytes infiltrating the LPS-injured lung. *PLoS One* 18;9(4):e95382, 2014
113. Fryer AD, el-Fakahany EE: Identification of three muscarinic receptor subtypes in rat lung using binding studies with selective antagonists. *Life Sci* 47(7):611-8, 1990
114. Fryer AD, Jacoby DB: Muscarinic receptors and control of airway smooth muscle. *Am J Respir Crit Care Med* 158(5 Pt 3):S154-60, 1998
115. Funaro A, Ortolan E, Ferranti B, Gargiulo L, Notaro R, Luzzatto L, Malavasi F: CD157 is an important mediator of neutrophil adhesion and migration. *Blood* 15;104(13):4269-78, 2004
116. Fukuhara S, Chikumi H, Gutkind JS: RGS-containing RhoGEFs: the missing link between transforming G proteins and Rho? *Oncogene* 26;20(13):1661-8, 2001
117. Fuxe K, Strömberg I, Popoli P, Rimondini-Giorgini R, Torvinen M, Ogren SO, Franco R, Agnati LF, Ferré S: Adenosine receptors and Parkinson's disease. Relevance of antagonistic adenosine and dopamine receptor interactions in the striatum. *Adv Neurol* 86:345-53, 2001

118. Garssen J, Van Loveren H, Gierveld CM, Van der Vliet H, Nijkamp FP: Functional characterization of muscarinic receptors in murine airways. *Br J Pharmacol* 109(1):53-60, 1993
119. Gebhard A, Gebert A: Brush cells of the mouse intestine possess a specialized glycocalyx as revealed by quantitative lectin histochemistry. Further evidence for a sensory function. *J Histochem Cytochem.* 47(6):799-808, 1999
120. Gerth A, Nieber K, Oppenheimer NJ, Hauschildt S: Extracellular NAD⁺ regulates intracellular free calcium concentration in human monocytes. *Biochem J* 15;382(Pt 3):849-56, 2004
121. Goncharova EA, Goncharov DA, Zhao H, Penn RB, Krymskaya VP, Panettieri RA Jr: β -adrenergic receptor agonists modulate human airway smooth muscle cell migration via vasodilator-stimulated phosphoprotein. *Am J Respir Cell Mol Biol* 46(1):48-54, 2012
122. Grahner A, Friedrich M, Pfister M, Haag F, Koch-Nolte F, Hauschildt S: Mono-ADP-ribosyltransferases in human monocytes: regulation by lipopolysaccharide. *Biochem J* 362(Pt 3):717-23, 2002
123. Grahner A, Klein C, Schilling E, Wehrhahn J, Hauschildt S: NAD⁺: a modulator of immune functions. *Innate Immun* 17(2):212-33, 2011
124. Greenberg DL, Mize GJ, Takayama TK: Protease-activated receptor mediated RhoA signaling and cytoskeletal reorganization in LNCaP cells. *Biochemistry* 28;42(3):702-9, 2003
125. Griffin BA, Adams SR, Tsien RY: Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. *Science* 281:269-272, 1998
126. Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY: A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 25;260(6):3440-50, 1985
127. Guedes AG, Jude JA, Paulin J, Kita H, Lund FE, Kannan MS: Role of CD38 in TNF- α -induced airway hyperresponsiveness. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294(2):L290-9, 2008
128. Gupta MK, Asosingh K, Aronica M, Comhair S, Cao G, Erzurum S, Panettieri RA Jr, Naga Prasad SV: Defective Resensitization in Human Airway Smooth Muscle Cells Evokes β -Adrenergic Receptor Dysfunction in Severe Asthma. *PLoS One* 29;10(5):e0125803, 2015
129. Guse AH: Biochemistry, biology, and pharmacology of cyclic adenosine diphosphoribose (cADPR). *Curr. Med. Chem.* 11 (7): 847–55 2004
130. Guse AH: Regulation of calcium signaling by the second messenger cyclic adenosine diphosphoribose (cADPR). *Curr. Mol. Med.* 4 (3): 239–48 2004
131. Guse AH: Second messenger function and the structure-activity relationship of cyclic adenosine diphosphoribose (cADPR). *FEBS J.* 272(18):4590-7, 2005
132. Hahn HL: Role of the parasympathetic nervous system and of cholinergic mechanisms in bronchial hyperreactivity. *Bull Eur Physiopathol Respir* 22 Suppl 7:112-42, 1986
133. Haigis MC, Sinclair DA: Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu Rev Pathol* 5:253-95, 2010
134. Hains MD, Wing MR, Maddileti S, Siderovski DP, Harden TK: α 12/13- and rho-dependent activation of phospholipase C-epsilon by lysophosphatidic acid and thrombin receptors. *Mol Pharmacol* 69(6):2068-75, 2006

135. Halayko AJ, Camoretti-Mercado B, Forsythe SM, Vieira JE, Mitchell RW, Wylam ME, Hershenson MB, Solway J: Divergent differentiation paths in airway smooth muscle culture: induction of functionally contractile myocytes. *Am J Physiol* 276(1 Pt 1):L197-206, 1999
136. Hamm HE, Gilchrist A: Heterotrimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol* Apr;8(2):189-96, 1996
137. Hanasaki K, Nakano T, Arita H: Receptor-mediated mitogenic effect of thromboxane A₂ in vascular smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol* 1;40(11):2535-42, 1990
138. Hayashi M, Kajioka S, Itsumi M, Takahashi R, Shahab N, Ishigami T, Takeda M, Masuda N, Yamaguchi A, Naito S: Actions of cyclic 3'5'-adenosine monophosphate (cAMP) on calcium sensitisation in human detrusor smooth muscle contraction. *BJU Int* 15, 2015
139. Heiner I, Eisfeld J, Halaszovich CR, Wehage E, Jüngling E, Zitt C, Lückhoff A: Expression profile of the transient receptor potential (TRP) family in neutrophil granulocytes: evidence for currents through long TRP channel 2 induced by ADP-ribose and NAD. *Biochem J* 1;371(Pt 3):1045-53, 2003
140. Hildebrandt JD: Role of subunit diversity in signaling by heterotrimeric G proteins. *Biochem Pharmacol* 1;54(3):325-39, 1997
141. Hislop AA, Mak JC, Reader JA, Barnes PJ, Haworth SG: Muscarinic receptor subtypes in the porcine lung during postnatal development. *Eur J Pharmacol* 23;359(2-3):211-21, 1998
142. Hofman FM, Yanagihara E, Byrne B, Billing R, Baird S, Frisman D, Taylor CR: Analysis of B-cell antigens in normal reactive lymphoid tissue using four B-cell monoclonal antibodies. *Blood* 62(4):775-83, 1983
143. Hoffman J, Swiebocka E: Evaluation of combined therapy efficacy with disodium cromoglycate and salmeterol in children with atopic bronchial asthma. *Pol Merkur Lekarski* 3(16):168-70, 1997
144. Holgate ST, Polosa R: Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat Rev Immunol* 8(3):218-30, 2008
145. Holgate ST: Are long-acting beta₂-agonists safe in the treatment of asthma? *Pol Arch Med Wewn* 118(9):460-1, 2008
146. Howarth PH, Persson CG, Meltzer EO, Jacobson MR, Durham SR, Silkoff PE: Objective monitoring of nasal airway inflammation in rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 115(3 Suppl 1):S414-41, 2005
147. Hoyle CH, Chaple C, Burnstock G: Isolated human bladder: evidence for an adenine dinucleotide acting on P₂X-purinoreceptors and for purinergic transmission. *Eur J Pharmacol* 12;174(1):115-8, 1989
148. Hsu CP, Oka S, Shao D, Hariharan N, Sadoshima J: Nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates cell survival through NAD⁺ synthesis in cardiac myocytes. *Circ Res* 28;105(5):481-91, 2009
149. Hui KP, Hewitt AB: A simple pulmonary rehabilitation program improves health outcomes and reduces hospital utilization in patients with COPD: *Chest* 124(1):94-7, 2003
150. Ikehata F, Satoh J, Nata K, Tohgo A, Nakazawa T, Kato I, Kobayashi S, Akiyama T, Takasawa S, Toyota T, Okamoto H: Autoantibodies against CD38 (ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose

- hydrolase) that impair glucose-induced insulin secretion in noninsulin- dependent diabetes patients. *J Clin Invest* 15;102(2):395-401, 1998
151. Imai S: Dissecting systemic control of metabolism and aging in the NAD World: the importance of SIRT1 and NAMPT-mediated NAD biosynthesis. *FEBS Lett* 6;585(11):1657-62, 2011
 152. Imai S: Toward productive aging: SIRT1, systemic NAD biosynthesis, and the NAD world. *Cornea* 29 Suppl 1:S7-12, 2010
 153. Irvine RF: Is inositol tetrakisphosphate the second messenger that controls Ca²⁺ entry into cells? *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 26:161-85,1992
 154. Ishii M, Shimizu S, Hagiwara T, Wajima T, Miyazaki A, Mori Y, Kiuchi Y: Extracellular-added ADP-ribose increases intracellular free Ca²⁺ concentration through Ca²⁺ release from stores, but not through TRPM2-mediated Ca²⁺ entry, in rat beta-cell line RIN-5F. *J Pharmacol Sci* 101(2):174-8, 2006
 155. Ivonnet P, Salathe M, Conner GE: Hydrogen peroxide stimulation of CFTR reveals an Epac-mediated, soluble AC-dependent cAMP amplification pathway common to GPCR signalling. *Br J Pharmacol* 172(1):173-84, 2015
 156. Iyengar R, Stuehr DJ, Marletta MA: Macrophage synthesis of nitrite, nitrate and N-nitrosamines: precursors and role of the respiratory burst. *Proc Natl Acad Sci USA* 84(18):6369-73, 1987
 157. Jares-Erijman EA, Jovin TM: FRET imaging. *Nat biotechnol* Nov;21(11):1387-95, 2003
 158. Jiang H, Stephens NL: Calcium and smooth muscle contraction. *Mol Cell Biochem* 15;135(1):1-9, 1994
 159. Jin J, Tomlinson W, Kirk IP, Kim YB, Humphries RG, Kunapuli SP: The C6-2B glioma cell P2Y(AC) receptor is pharmacologically and molecularly identical to the platelet P2Y(12) receptor. *Br J Pharmacol* 133(4):521-8, 2001
 160. Jin W, Lo TM, Loh HH, Thayer SA: U73122 inhibits phospholipase C-dependent calcium mobilization in neuronal cells. *Brain Res* 11;642(1-2):237-43, 1994
 161. Jude JA, Dileepan M, Panettieri RA Jr, Walseth TF, Kannan MS: Altered CD38/Cyclic ADP-Ribose Signaling Contributes to the Asthmatic Phenotype. *J Allergy (Cairo)* 2012:289468, 2012
 162. Jude JA, Panettieri RA Jr, Walseth TF, Kannan MS: TNF- α regulation of CD38 expression in human airway smooth muscle: role of MAP kinases and NF- κ B. *Adv Exp Med Biol* 691:449-59, 2011
 163. Katoh A, Uenohara K, Akita M, Hashimoto T: Early Steps in the Biosynthesis of NAD in Arabidopsis Start with Aspartate and Occur in the Plastid. *Plant Physiol.* 141 (3): 851–7, 2006
 164. Katoh H, Negishi M, Ichikawa A: Prostaglandin E receptor EP3 subtype induces neurite retraction via small GTPase Rho. *J Biol Chem* 22;271(47):29780-4, 1996
 165. Kelley SJ, Thomas R, Dunham PB: Candidate inhibitor of the volume-sensitive kinase regulating K-Cl cotransport: the myosin light chain kinase inhibitor ML-7. *J Membr Biol* Nov 1;178(1):31-41, 2000
 166. Kennedy C: ATP as a cotransmitter in the autonomic nervous system. *Auton Neurosci* 25, 2015

167. Klein C, Grahner A, Abdelrahman A, Müller CE, Hauschildt S: Extracellular NAD(+) induces a rise in [Ca(2+)](i) in activated human monocytes via engagement of P2Y(1) and P2Y(11) receptors. *Cell Calcium* 46(4):263-72, 2009
168. Kleinboetling S, Diaz A, Moniot S, van den Heuvel J, Weyand M, Levin LR, Buck J, Steegborn C: Crystal structures of human soluble adenylyl cyclase reveal mechanisms of catalysis and of its activation through bicarbonate. *Proc Natl Acad Sci USA* 111(10):3727-32, 2014
169. Koblinger L, Hoffmann W: Stochastic morphological model of the rat lung. *Anat Rec* 221: 533-9, 1988
170. Koch F, Haag F, Thiele HG: Nucleotide and deduced amino acid sequence for the mouse homologue of the rat T-cell differentiation marker RT6. *Nucleic Acids Res* 18(12):3636, 1990
171. Koch-Nolte F, Fischer S, Haag F, Ziegler M: Compartmentation of NAD⁺-dependent signalling. *FEBS Lett.* 585 (11): 1651–6, 2011
172. Köhler M, Hirschberg B, Bond CT, Kinzie JM, Marrion NV, Maylie J, Adelman JP: Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science* Sep 20;273(5282):1709-14, 1996
173. Kolisek M, Beck A, Fleig A, Penner R: Cyclic ADP-ribose and hydrogen peroxide synergize with ADP-ribose in the activation of TRPM2 channels. *Mol Cell* 1;18(1):61-9, 2005
174. Komai AM, Brännmark C, Musovic S, Olofsson CS: PKA-independent cAMP stimulation of white adipocyte exocytosis and adipokine secretion: modulations by Ca²⁺ and ATP. *J Physiol* 1;592(Pt 23):5169-86, 2014
175. Kopf GS, Woolkalis MJ: ADP-ribosylation of G proteins with pertussis toxin. *Methods Enzymol* 195:257-66, 1991
176. Kraft R, Grimm C, Grosse K, Hoffmann A, Sauerbruch S, Kettenmann H, Schultz G, Harteneck C. Hydrogen peroxide and ADP-ribose induce TRPM2-mediated calcium influx and cation currents in microglia. *Am J Physiol Cell Physiol* 286(1):C129-37, 2004
177. Krasteva G, Canning BJ, Hartmann P, Veres TZ, Papadakis T, Mühlfeld C, Schliecker K, Tallini YN, Braun A, Hackstein H, Baal N, Weihe E, Schütz B, Kotlikoff M, Ibanez-Tallon I, Kummer W: Cholinergic chemosensory cells in the trachea regulate breathing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 7;108(23):9478-83, 2011
178. Krasteva G, Canning BJ, Papadakis T, Kummer W: Cholinergic brush cells in the trachea mediate respiratory responses to quorum sensing molecules. *Life Sci.* 27;91(21-22):992-6, 2012
179. Kumar S, Appukuttan A, Maghnouj A, Hahn S, Peter Reusch H, Ladilov Y: Suppression of soluble adenylyl cyclase protects smooth muscle cells against oxidative stress-induced apoptosis. *Apoptosis* 19(7):1069-79, 2014
180. Kummer W, Fischer A, Kurkowski R, Heym C: The sensory and sympathetic innervation of guinea-pig lung and trachea as studied by retrograde neuronal tracing and double-labelling immunohistochemistry. *Neuroscience* 49: 715-737, 1992
181. Kummer W, Fischer A, Mundel P, Mayer B, Hoba B, Philippin B, Preissler U: Nitric oxide synthase in VIP-containing vasodilator nerve fibres in the guinea-pig. *Neuroreport* 3(7):653-5, 1992

182. Kwan HY, Huang Y, Yao XQ, Leung FP: Role of cyclic nucleotides in the control of cytosolic Ca²⁺ levels in vascular endothelial cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 36(9):857-66, 2009
183. Lambert DG, Wojcikiewicz RJ, Safrany ST, Whitham EM, Nahorski SR: Muscarinic receptors, phosphoinositide metabolism and intracellular calcium in neuronal cells. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 16(3):253-70, 1992
184. Lavagno L, Ferrero E, Ortolan E, Malavasi F, Funaro A: CD157 is part of a supramolecular complex with CD11b/CD18 on the human neutrophil cell surface. *J Biol Regul Homeost Agents* 21(1-2):5-11, 2007
185. Lazarus SC, Chinchilli VM, Rollings NJ, Boushey HA, Cherniack R, Craig TJ, Deykin A, DiMango E, Fish JE, Ford JG, Israel E, Kiley J, Kraft M, Lemanske RF Jr, Leone FT, Martin RJ, Pesola GR, Peters SP, Sorkness CA, Szeffler SJ, Wechsler ME, Fahy JV; National Heart Lung and Blood Institute's Asthma Clinical Research Network: Smoking affects response to inhaled corticosteroids or leukotriene receptor antagonists in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 175(8):783-90, 2007
186. Le Feuvre Ra, Brough D, Iwakura Y, Takeda K, Rothwell NJ: Priming of macrophages with lipopolysaccharide potentiates P2X7-mediated cell death via a caspase-1-dependent mechanism, independently of cytokine production. *J Biol Chem* Feb 1;277(5):3210-8, 2002
187. Lee HC, Aarhus R: ADP-ribosyl cyclase: an enzyme that cyclizes NAD⁺ into a calcium-mobilizing metabolite. *Cell Regul* 2(3):203-9, 1991
188. Lee MC, Yang YC, Chen YC, Huang SC: Muscarine receptor M3 mediates human gallbladder contraction through voltage-gated Ca²⁺ channels and rho kinase. *Scand J Gastroenterol* 48(2):205-12, 2013
189. Lemanske RF Jr, Busse WW: Asthma: clinical expression and molecular mechanisms. *J Allergy Clin Immunol* 125(2 Suppl 2):S95-102, 2010
190. Li CG, Rand MJ: Evidence that part of the NANC relaxant response of guinea-pig trachea to electrical field stimulation is mediated by nitric oxide. *Br J Pharmacol* 102(1):91-4, 1991
191. Lindh B, Hökfelt T, Elfvin LG, Terenius L, Fahrenkrug J, Elde R, Goldstein M: Topography of NPY-, somatostatin-, and VIP-immunoreactive, neuronal subpopulations in the guinea pig celiac-superior mesenteric ganglion and their projection to the pylorus. *J Neurosci* 6(8):2371-83, 1986
192. Lindh B, Staines W, Hökfelt T, Terenius L, Salvaterra PM: Immunohistochemical demonstration of choline acetyltransferase-immunoreactive preganglionic nerve fibers in guinea pig autonomic ganglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(14):5316-20, 1986
193. Liu C, Zuo J, Pertens E, Helli PB, Janssen LJ: Regulation of Rho/ROCK signaling in airway smooth muscle by membrane potential an [Ca²⁺]_i. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289(4):L574-82, 2005
194. Liu L, Gonzalez PK, Barret CF, Rittenhouse AR: The calcium channel ligand FPL 64176 enhances L-type but inhibits N-type neuronal calcium currents. *Neuropharmacology* 45(2):281-92, 2003
195. Londos C, Cooper DM, Wolff J: Subclasses of external adenosine receptors. *Proc. Natl Acad Sci USA*, 77(5):2551-4, 1980

196. Lu YB, Chen Z, Lai XY, Gao Y: Inhibition of acetamide-45 on airway smooth muscle contraction induced by electric field stimulation and methacholine in vitro. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 34(2):137-40, 2005
197. Lund FE, Muller-Steffner H, Romero-Ramirez H, Moreno-García ME, Partida-Sánchez S, Makris M, Oppenheimer NJ, Santos-Argumedo L, Schuber F: CD38 induces apoptosis of a murine pro-B leukemic cell line by a tyrosine kinase-dependent but ADP-ribosyl cyclase- and NAD glycohydrolase-independent mechanism. *Int Immunol* 18(7):1029-42, 2006
198. Lundberg JM, Hemsén A, Rudehill A, Harfstrand A, Larsson O, Sollevi A, Saria A, Hökfelt T, Fuxe K, Fredholm BB: Neuropeptide Y- and alpha-adrenergic receptors in pig spleen: localization, binding characteristics, cyclic AMP effects and functional responses in control and denervated animals. *Neuroscience* 24: 659-672, 1988
199. Lundberg JM, Hökfelt T, Anggård A, Lundblad L, Saria A, Fahrenkrug J, Terenius L.: Neuropeptides with vascular activity: VIP, PHI, NPY and substance P. *Bibl Cardiol* (38):60-9, 1984
200. Lundberg JM, Terenius L, Hökfelt T, Goldstein M: High levels of neuropeptide Y in peripheral noradrenergic neurons in various mammals including man. *Neurosci Lett.* 42(2):167-72, 1983
201. MacLagan J, Barnes PJ: Muscarinic pharmacology of the airways. *Trends Pharmacol Sci Suppl*:88-92, 1989
202. Maggi M, Filippi S, Ledda F, Magini A, Forti G: Erectile dysfunction: from biochemical pharmacology to advances in medical therapy. *Eur J Endocrinol.* 143(2):143-54, 2000
203. Magni G, Amici A, Emanuelli M, Raffaelli N, Ruggieri S: Enzymology of NAD⁺ synthesis. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 73:135-82, 1999
204. Mak JC, Baraniuk JN, Barnes PJ: Localization of muscarinic receptor subtype mRNAs in human lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7: 344-348, 1992
205. Malavasi L, Tealdi C, Ritter C: In situ time-resolved neutron diffraction investigation during oxygen exchange in layered cobaltite cathode materials. *Angew Chem Int Ed Engl* 48(45):8539-42, 2009
206. Mándi M, Tóth B, Timár G, Bak J: Ca²⁺ release triggered by NAADP in hepatocyte microsomes. *Biochem J* 15;395(2):233-8, 2006
207. Mann SP: The innervations of mammalian bronchial smooth muscle: the localization of catecholamines and cholinesterases. *Histochem J* 4(5):319-31, 1971
208. Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R, Leaf CD, Wishnok JS: Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry* 29;27(24):8706-11, 1988
209. Matsui M, Motomura D, Fujikawa T, Jiang J, Takahashi S, Manabe T, Taketo MM: Mice lacking M2 and M3 muscarinic acetylcholine receptors are devoid of cholinergic smooth muscle contractions but still viable. *J Neurosci* 15;22(24):10627-32, 2002
210. Mergia E, Friebe A, Dangel O, Russwurm M, Koesling D: Spare guanylyl cyclase NO receptors ensure high NO sensitivity in the vascular system. *J Clin Invest* 116(6):1731-7, 2006

211. Metha VB, Hart J, Wewers MD: ATP-stimulated release of interleukin (IL)-1beta and IL-18 requires priming by lipopolysaccharide and is independent of caspase-1 cleavage. *J Biol Chem* 9;276(6):3820-6, 2001
212. Milgrom H, Fick RB Jr, Su JQ, Reimann JD, Bush RK, Watrous ML, Metzger WJ: Treatment of allergic asthma with monoclonal anti-IgE antibody. rhuMAB-E25 Study Group. *N Engl J Med* 23;341(26):1966-73, 1999
213. Miyahara S, Komori T, Fujiwara R, Shizuya K, Yamamoto M, Ohmori M, Okazaki Y: Effects of repeated stress on expression of interleukin-6 (IL-6) and IL-6 receptor mRNAs in rat hypothalamus and midbrain. *Life Sci* 66(6):PL93-8, 2000
214. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA: Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol* 38(11):1709-15, 1989
215. Morabito F, Damle RN, Deaglio S, Keating M, Ferrarini M, Chiorazzi N: The CD38 ectoenzyme family: advances in basic science and clinical practice. *Mol Med* 12(11-12):342-4, 2006
216. Moreschi I, Bruzzone S, Bodrato N, Usai C, Guida L, Nicholas RA, Kassack MU, Zocchi E, De Flora A: NAADP+ is an agonist of the human P2Y11 purinergic receptor. *Cell Calcium* 43(4):344-55, 2006
217. Mori Y, Wakamori M, Oda S, Fletcher CF, Sekiguchi N, Mori E, Copeland NG, Jenkins NA, Matsushita K, Matsuyama Z, Imoto K: Reduced voltage sensitivity of activation of P/Q-type Ca²⁺ channels is associated with the ataxic mouse mutation rolling Nagoya (tg(rol)). *J Neurosci* 20(15):5654-62, 2000
218. Mulryan K, Gitterman DP, Lewis CJ, Vial C, Leckie BJ, Cobb AL, Brown JE, Conley EC, Buell G, Pritchard CA, Evans RJ: Reduced vas deferens contraction and male infertility in mice lacking P2X1 receptors. *Nature* ;403(6765):86-9, 2000
219. Murray RK, Bennett CF, Fluharty SJ, Kotlikoff MI: Mechanism of phorbol ester inhibition of histamine-induced IP3 formation in cultured airway smooth muscle. *Am J Physiol* 257(4 Pt 1):L209-16, 1989
220. Mutafova-Yambolieva VN, Durnin L: The purinergic neurotransmitter revisited: a single substance or multiple players? *Pharmacol Ther* 144(2):162-91, 2014
221. Mutafova-Yambolieva VN, Hwang SJ, Hao X, Chen H, Zhu MX, Wood JD, Ward SM, Sanders KM: Beta-nicotinamide adenine dinucleotide is an inhibitory neurotransmitter in visceral smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 9;104(41):16359-64, 2007
222. Mütze J, Iyer V, Macklin JJ, Colonell J, Karsh B, Petrášek Z, Schwille P, Looger LL, Lavis LD, Harris TD: Excitation spectra and brightness optimization of two-photon excited probes. *Biophys J* 22;102(4):934-44, 2012
223. Nadel JA: Parasympathetic nervous control of airway smooth muscle. *Ann NY Acad Sci* 221:99-102, 1974
224. Nagai T, Ibata K, Park ES, Kubota M, Mikoshiba K, Miyawaki A: A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol* 20:87-90, 2002

225. Nagatsu T, Stiaerne L: Catecholamine synthesis and release. Overview. *Adv Pharmacol* 42:1-14, 1998
226. Nakamura M, Bhatnagar A, Sadoshima J: Overview of pyridine nucleotides review series. *Circ Res* 17;111(5):604-10, 2012
227. Narumiya S, Ishizaki T, Watanabe N: Rho effectors and reorganization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett* 23;410(1):68-72, 1997
228. Nathan C: Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6(12):3051-64, 1992
229. Naziroglu M, Lückhoff A, Jüngling E: Antagonist effect of flufenamic acid on TRPM2 cation channels activated by hydrogen peroxide. *Cell Biochem Funct* 25(4):383-7, 2007
230. Nehra A, Colreavy F, Khandheria BK, Chandrasekaran K: Sildenafil citrate, a selective phosphodiesterase type 5 inhibitor: urologic and cardiovascular implications. *World J Urol.* 19(1):40-5, 2001
231. Nelson MT, Cheng H, Rubart M, Santana LF, Bonev AD, Knot HJ, Lederer WJ: Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science* Oct 27;270(5236):633-7, 1995
232. Nicke A, Bäumert HG, Rettinger J, Eichele A, Lambrecht G, Mutschler E, Schmalzing G: P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J* 17(11):3016-28, 1998
233. Nickel RS, Schummer A, Seiferle E: *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*. Paul Bary, Berlin, Hamburg, 1987
234. Nikolaev VO: Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *J Biol Chem* 279:37215-37218, 2004
235. North BJ, Verdin E: Sirtuins: Sir2-related NAD-dependent protein deacetylases. *Genome Biol* 5 (5): 224 2004
236. North RA: Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 82(4):1013-67, 2002
237. Okazaki IJ, Kim HJ, McElvaney NG, Lesma E, Moss J: Molecular characterization of a glycosylphosphatidylinositol-linked ADP-ribosyltransferase from lymphocytes. *Blood* 1;88(3):915-21, 1996
238. Olah ME, Stiles GL: The role of receptor structure in determining adenosine receptor activity. *Pharmacol Ther*, 85(2):55-75, 2000
239. Omori K, Kotera J: Overview of PDEs and their regulation. *Circ Res* 16;100(3):309-27, 2007
240. Ortolani P, Solinas E, Guastaroba P, Marino M, Casella G, Manari A, Piovaccari G, Ottani F, Varani E, Campo G, Marzocchi A, Merlini PA, Caminiti C, De Palma R, Ardissino D: Relevance of gender in patients with acute myocardial infarction undergoing coronary interventions. *J Cardiovasc Med* 14(6):421-9, 2002
241. Palant CE, Stern N, Meyer A, Tuck ML, Lee DB, yanagawa N: Modulation of aortic smooth muscle cell membrane potential by extracellular calcium. *Hypertension* 14(5):549-55, 1989
242. Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M: Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289(5480):739-45, 2000

243. Partanen M, Laitinen A, Hervonen A, Toivanen M, Laitinen LA: Catecholamine- and acetylcholinesterase-containing nerves in human lower respiratory tract. *Histochemistry* 76: 175-188, 1982
244. Parvathenani LK, Tertysnikova S, Greco CR, Roberts SB, Robertson B, Posmantur R: P2X7 mediates superoxide production in primary microglia and is up-regulated in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 278(15):13309-17, 2003
245. Pearce MB, Jayaraman A, Pappas C, Belser JA, Zeng H, Gustin KM, Maines TR, Sun X, Raman R, Cox NJ, Sasisekharan R, Katz JM, Tumpey TM: Pathogenesis and transmission of swine origin A(H3N2)v influenza viruses in ferrets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(10):3944-9, 2009
246. Peiper U, Knipp SC, Thies B, Henke R: Activation of protein kinase C accelerates contraction kinetics of airway smooth muscle. *Pflugers Arch* 432(3 Suppl):R47-52, 1996
247. Perez-Zoghbi JF, Bai Y, Sanderson MJ: Nitric oxide induces airway smooth muscle cell relaxation by decreasing the frequency of agonist-induced Ca²⁺ oscillations. *J Gen Physiol.* 135(3):247-59, 2010
248. Pollak N, Niere M, Ziegler M: NAD kinase levels control the NADPH concentration in human cells. *J Biol Chem* 16;282(46):33562-71, 2007
249. Polosa R: Adenosine-receptor subtypes: their relevance to adenosine-mediated responses in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 20(2):488-96, 2002
250. Pradhan AD, Ridker PM: Do atherosclerosis and type 2 diabetes share a common inflammatory basis? *Eur Heart J* 23(11):831-4, 2002
251. Prakash YS, Kannan MS, Sieck GC: Regulation of intracellular calcium oscillations in porcine tracheal smooth muscle cells. *Am J Physiol* 272(3 Pt 1):C966-75, 1997
252. Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, Fukuchi Y, Jenkins C, Rodriguez-Roisin R, van Weel C, Zielinski J; Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease: Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med* 15;176(6):532-55, 2007
253. Ralevic V, Burnstock G: Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50(3):413-92, 1998
254. Reddy GR, Subramanian H, Birk A, Milde M, Nikolaev VO, Bünemann: Adenylyl cyclases 5 and 6 underlie PIP3-dependent regulation. *FASEB J* 30, 2015
255. Reinhardt RR, Chin E, Zhou J, Taira M, Murata T, Manganiello VC, Bondy CA: Distinctive anatomical patterns of gene expression for cGMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Clin Invest* 95(4):1528-38, 1995
256. Reinhart PH, Levitan IB: Kinase and phosphatase activities intimately associated with a reconstituted calcium-dependent potassium channel. *J Neurosci* 15(6):4572-9, 1995
257. Rheinheimer T, Möhlig T, Zimmermann S, Höhle KD, Wessler I: Muscarinic control of histamine release from airways. Inhibitory M1-receptors in human bronchi but absence in rat trachea. *Am J Respir Crit Care Med* 162(2 Pt 1):534-8, 2000

258. Rich PR: The molecular machinery of Keilin's respiratory chain. *Biochem. Soc. Trans.* 31 (Pt 6): 1095–105 2003
259. Richardson RL, Weiss RB: Small cell carcinoma of the lung presenting as bilateral hilar adenopathy. *South Med J* 70(6):763-5, 1977
260. Riento K, Guasch RM, Garg R, Jin B, Ridley AJ: RhoE binds to ROCK I and inhibits downstream signaling. *Mol Cell Biol* 23(12):4219-29, 2003
261. Riobo NA, Manning DR: Receptors coupled to heterotrimeric G proteins of the G12 family. *Trends Pharmacol Sci* 26(3):146-54, 2005
262. Rizzo MA, Springer GH, Granada B, Piston DW: An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. *Nat Biotechnol* 22:445-449, 2004
263. Roberts OL, Dart C: cAMP signalling in the vasculature: the role of Epac (exchange protein directly activated by cAMP). *Biochem Soc Trans* 42(1):89-97, 2014
264. Robitaille R, Garcia ML, Kaczorowski GJ, Charlton MP: Functional colocalization of calcium and calcium-gated potassium channels in control of transmitter release. *Neuron* 11(4):645-55, 1993
265. Roffel AF, Elzinga CR, Zaagsma J: Muscarinic M3 receptors mediate contraction of human central and peripheral airway smooth muscle. *Pulm Pharmacol* 3(1):47-51, 1990
266. Romanello M, Bicego M, Pirulli D, Crovella S, Moro L, D'Andrea P: Extracellular NAD⁺: a novel autocrine/paracrine signal in osteoblast physiology. *Biochem Biophys Res Commun* 6;299(3):424-31, 2002
267. Sanders KM, Ward SM: Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. *Am J Physiol* 262(3 Pt 1):G379-92, 1992
268. Sands WA, Woolson HD, Mine GR, Rutherford C, Palmer TM: Exchange protein activated by cyclic AMP (Epac)-mediated induction of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS-3) in vascular endothelial cells. *Mol Cell Biol* 26(17):6333-46, 2006
269. Savarino A, Bottarel F, Malavasi F, Dianzani U: Role of CD38 in HIV-1 infection: an epiphenomenon of T-cell activation or an active player in virus/host interactions? *AIDS* 16;14(9):1079-89, 2000
270. Savineau JP, Marthan R: Modulation of the calcium sensitivity of the smooth muscle contractile apparatus: molecular mechanisms, pharmacological and pathophysiological implications. *Fundam Clin Pharmacol* 1997;11(4):289-99, 1997
271. Schols AM, Buurman WA, Staal van den Brekel AJ, Dentener MA, Wouters EF: Evidence for a relation between metabolic derangements and increased levels of inflammatory mediators in a subgroup of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 51(8):819-24, 1996
272. Schwartz HJ, Lowell FC, Melby JC: Steroid resistance in bronchial asthma. *Ann Intern Med* 69(3):493-9, 1968
273. Seemungal TA, Donaldson GC, Paul EA, Bestall JC, Jeffries DJ, Wedzicha JA: Effect of exacerbation on quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 157(5 Pt 1):1418-22, 1998

274. Seman M, Adriouch S, Scheuplein F, Krebs C, Freese D, Glowacki G, Deterre P, Haag F, Koch-Nolte F: NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor. *Immunity* 19(4):571-82, 2003
275. Semple RK, Chatterjee VK, O'Rahilly S: PPAR gamma and human metabolic disease. *J Clin Invest.* 116(3):581-9, 2006
276. Shenaz D, Torres B, Baboa MA, Insel PA: Pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonate (PPADS), a putative P2Y(1) receptor antagonist, blocks signaling at a site distal to the receptor in Madin-Darby canine kidney-D(1) cells. *J Pharmacol Exp Ther* 292(1):346-50, 2000
277. Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y: Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 59:223-239, 1962
278. Sims SM, Jiao Y, Zheng ZG: Intracellular calcium stores in isolated tracheal smooth muscle cells. *Am J Physiol* 271(2 Pt 1):L300-9, 1996
279. Sin DD, Man SF: Inhaled corticosteroids in the long-term management of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Drugs Aging* 20(12):867-80, 2003
280. Sistare FD, Haynes RC: The interaction between the cytosolic pyridine nucleotide redox potential and gluconeogenesis from lactate/pyruvate in isolated rat hepatocytes. Implications for investigations of hormone action. *J. Biol. Chem.* 260 (23): 12748–53, 1985
281. Smyth LM, Bobalova J, Mendoza MG, Lew C, Mutafova-Yambolieva VN: Release of beta-nicotinamide adenine dinucleotide upon stimulation of postganglionic nerve terminals in blood vessels and urinary bladder. *J Biol Chem* 19;279(47):48893-903, 2004
282. Somlyo AP, Himpens B: Cell calcium and its regulation in smooth muscle. *FASEB J* 3(11):2266-76, 1989
283. Stone JD, Narine A, Tulis DA: Inhibition of vascular smooth muscle growth via signaling crosstalk between AMP-activated protein kinase and cAMP-dependent protein kinase. *Front Physiol* 29;3:409, 2012
284. Sprang SR: G protein mechanisms: insights from structural analysis. *Annu Rev Biochem* 66:639-78, 1997
285. Starke K: Grundlagen der Pharmakologie des Nervensystems. *Pharmakologie und Toxikologie*. Spektrum, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1996
286. Steegborn: Structure, mechanism, and regulation of soluble adenylyl cyclases - similarities and differences to transmembrane adenylyl cyclases. *Biochem Biophys Acta* 1842(12 Pt B):2535-47, 2014
287. Stengel PW, Gomez J, Wess J, Cohen ML: M(2) and M(4) receptor knockout mice: muscarinic receptor function in cardiac and smooth muscle in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 292(3):877-85, 2000
288. Sternweis PC: The active role of beta gamma in signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 6(2):198-203, 1994
289. Stewart AG, Grigoriadis G, Harris T Mitogenic actions of endothelin-1 and epidermal growth factor in cultured airway smooth muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 21(4):277-85, 1994

290. Struckmann N, Schwering S, Wiegand S, Gschnell A, Yamada M, Kummer W, Wess J, Haberberger V: Role of muscarinic receptor subtypes in the constriction of peripheral airways: studies on receptor-deficient mice. *Mol Pharmacol* 64: 1444-1451, 2003
291. Takeda A, Itoh H, Nagayoshi A, Oku N: Abnormal Ca²⁺ mobilization in hippocampal slices of epileptic animals fed a zinc-deficient diet. *Epilepsy Res* 83(1):73-80, 2009
292. Tallet D, Del Soldato P, Oudart N, Burgaud JL: NO-steroids: potent anti-inflammatory drugs with bronchodilating activity in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 290(1):125-30, 2002
293. Tamaoki J, Kondo M, Nakata J, Nagano Y, Isono K, Nagai A: Effect of a thromboxane A(2) antagonist on sputum production and its physicochemical properties in patients with mild to moderate asthma. *Chest* 118(1):73-9, 2000
294. Tao-Cheng JH, Yang Y, Bayer KU, Reese TS, Dosemeci A: NMDA-induced accumulation of Shank at the postsynaptic density is mediated by CaMKII. *Biochem Biophys Res Commun* 450(1):808-11, 2014
295. Terashima M, Takahashi M, Shimoyama M, Tanigawa Y, Urano T, Tsuchiya M: Glycosylphosphatidylinositol-anchored arginine-specific ADP-ribosyltransferase 7.1 (Art7.1) on chicken B cells: the possible role of Art7 in B cell receptor signalling and proliferation. *Mol Cell Biochem* 320(1-2):93-100, 2009
296. Thai TL, Fellner SK, Arendshorst WJ: ADP-ribosyl cyclase and ryanodine receptor activity contribute to basal renal vasomotor tone and agonist-induced renal vasoconstriction in vivo. *Am J Physiol Renal Physiol* 293(4):F1107-14, 2007
297. Tilley SL, Hartney JM, Erikson CJ, Jania C, Nguyen M, Stock J, McNeisch J, Valancius C, Panettieri RA Jr, Penn RB, Koller BH: Receptors and pathways mediating the effects of prostaglandin E2 on airway tone. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284(4):L599-606, 2003
298. Tohgi H, Konno S, Tamura K, Kimura B, Kawano K: Effects of low-to-high doses of aspirin on platelet aggregability and metabolites of thromboxane A2 and prostacyclin. *Stroke* 23(10):1400-3, 1992
299. Toma C, Greenwood IA, Helliwell RM, Large WA: Activation of potassium currents by inhibitors of calcium-activated chloride conductance in rabbit portal vein smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 118(3):513-20, 1996
300. Torella D, Gasparri C, Ellison GM, Curcio A, Leone A, Vicinanza C, Galuppo V, Mendicino I, Sacco W, Aquila I, Surace FC, Luposella M, Stillo G, Agosti V, Cosentino C, Avvedimento EV, Indolfi C: Differential regulation of vascular smooth muscle and endothelial cell proliferation in vitro and in vivo by cAMP/PKA-activated p85alphaPI3K. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297(6):H2015-25, 2009
301. Torphy TJ: Beta-adrenoceptors, cAMP and airway smooth muscle relaxation: challengers to the dogma. *Trends Pharmacol Sci* 15(10):370-4, 1994
302. Trapp J, Jung M: The role of NAD⁺ dependent histone deacetylases (sirtuins) in ageing. *Curr Drug Targets* 7 (11): 1553–60 2006
303. Treisman R, Alberts AS, Sahai E: Regulation of SRF activity by Rho family GTPases. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 63:643-51, 1998

304. Tsien RY: Fluorescence ratio imaging of dynamic intracellular signals. *Acta Physiol Scand Suppl*582:6, 1989
305. Tukiainen H, Jaakkola J, Torkko M, Terho EO: Comparison between oral procaterol and salbutamol in patients with bronchial asthma. *Curr Med Res Opin* 11(4):236-41, 1988
306. Turan B, Tuncay E, Vassort G: Resveratrol and diabetic cardiac function: focus on recent in vitro and in vivo studies. *J Bioenerg Biomembr* 44(2):281-96, 2012
307. Ueda K, Hayaishi O: ADP-ribosylation. *Annu Rev Biochem* 54:73-100, 1985
308. Umaphathy NS, Gonzales J, Fulzele S, Kim KM, Lucas R, Verin AD: β -Nicotinamide adenine dinucleotide attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory effects in a murine model of acute lung injury. *Exp Lung Res* 38(5):223-32, 2012
309. Umaphathy NS, Zemskov EA, Gonzales J, Gorshkov BA, Sridhar S, Chakraborty T, Lucas R, Verin AD: Extracellular beta-nicotinamide adenine dinucleotide (beta-NAD) promotes the endothelial cell barrier integrity via PKA- and EPAC1/Rac1-dependent actin cytoskeleton rearrangement. *J Cell Physiol* 223(1):215-23, 2010
310. Unger VM, Hargrave PA, Baldwin JM, Schertler GF: Arrangement of rhodopsin transmembrane α -helices. *Nature* 11;389(6647):203-6, 1997
311. Valera S, Hussy N, Evans RJ, Adami N, North RA, Surprenant A, Buell G: A new class of ligand-gated ion channel defined by P2Y receptor for extracellular ATP. *Nature*, 6;371(6497):516-9, 1994
312. Valerius KP: Size-dependent morphology of the conductive bronchial tree in four species of myomorph rodents. *J Morphol* 230: 291-297, 1996
313. Van Calker D, Müller M, Hamprecht B.: Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J Neurochem*, Nov;33(5):999-1005, 1979
314. Van der Weyden L, Adams DJ, Luttrell BM, Conigrave Ad, Morris MB: Pharmacological characterization of the P2Y₁₁ receptor in stably transfected haematological lines. *Mol Cell Biochem* 213(1-2):75-81, 2000
315. Vassilatis DK, Hohmann JG, Zeng H, Li F, Ranchalis JE, Mortrud MT, Brown A, Rodriguez SS, Weller JR, Wright AC, Bergmann JE, Gaitanaris GA: The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc Nat Acad Sci USA* 15;100(8):4903-8, 2003
316. Verdin E, Hirschey MD, Finley LW, Haigis MC: Sirtuin regulation of mitochondria: energy production, apoptosis, and signaling. *Trends Biochem Sci* 35(12):669-75, 2010
317. Vergara L, Rojas E, Stojilkovic SS: A novel calcium-activated apamin-insensitive potassium current in pituitary gonadotrophs. *Endocrinology* 138(7):2658-64, 1997
318. Walker R, Adam J: Time-sensitive clinical management: a case study of acute asthma care. *Soc Sci Med* 46(4-5):539-47, 1998
319. Wang SH, Liao XM, Liu D, Yin YY, Wang JZ, Zhu LQ: NGF promotes long-term memory formation by activating poly(ADP-ribose)polymerase-1. *Neuropharmacology* ;63(6):1085-92, 2012
320. Wang WC, Mhiblachler KA, Brunnet AC, Liggett SB: Targeted transgenesis reveals discrete attenuator functions of GRK and PKA in airway beta₂-adrenergic receptor physiologic signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1;106(35):15007-12, 2009

321. Webb-Peploe MM, Shepherd JT: Beta-receptor mechanisms in the superficial limb veins of the dog. *J Clin Invest* 48(7):1328-35, 1969
322. Weibel ER: Fractal geometry: a design principle for living organisms. *Am J Physiol* 261: L361-9, 1991
323. Wessler I, Kirkpatrick CJ, Racke K: The cholinergic 'pitfall': acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26: 198-205, 1999
324. Wilson DP, Susnjar M, Kiss E, Sutherland C, Warlsh MP: Thromboxane A₂-induced contraction of rat caudal arterial smooth muscle involves activation of Ca²⁺ entry and Ca²⁺ sensitization: Rho-associated kinase-mediated phosphorylation of MYPT1 at Thr-855, but not Thr-697. *Biochem J* 1;389(Pt 3):763-74, 2005
325. Wills M, Douglas JS: Aging and cholinergic responses in bovine trachealis muscle. *Br J Pharmacol* 93(4):918-24, 1988
326. Wirtz HR: Chronic bronchitis, COPD. *Internist* 46(2):175-91, 2005
327. Xie GH, Rah SY, Kim SJ, Nam TS, Ha KC, Chae SW, Im MJ, Kim UH: ADP-ribosyl cyclase couples to cyclic AMP signaling in the cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 20;330(4):1290-8, 2005
328. Yaar R, Jones MR, Chen JF, Ravid K: Animal models for the study of adenosine receptor function. *J Cell Physiol*, 202(1):9-20, 2005
329. Yamamoto M, Takahashi-Nakaguchi A, Matsushima-Hibiya Y, Nakano T, Totsuka Y, Imanishi S, Mitsuhashi J, Watanabe M, Nakagama H, Sugimura T, Wakabayashi K: Nucleotide sequence and chromosomal localization of the gene for pierisin-1, a DNA ADP-ribosylating protein, in the cabbage butterfly *Pieris rapae*. *Genetica* 139(10):1251-8, 2011
330. Yamboliev IA, Smyth LM, Durnin L, Dai Y, Mutafova-Yambolieva VN: Storage and secretion of beta-NAD, ATP and dopamine in NGF-differentiated rat pheochromocytoma PC12 cells. *Eur. J. Neurosci.* 30 (5): 756–68 2009
331. Yende S, Waterer GW, Tolley EA, Newman AB, Bauer DC, Taaffe DR, Jensen R, Crapo R, Rubin S, Nevitt M, Simonsick EM, Satterfield S, Harris T, Kritchevsky SB: Inflammatory markers are associated with ventilatory limitation and muscle dysfunction in obstructive lung disease in well functioning elderly subjects. *Thorax* 61(1):10-6, 2006
332. Yoshii A, Iizuka K, Dobashi K, Horie T, Harada T, Nakazawa T, Mori M: Relaxation of contracted rabbit tracheal and human bronchial smooth muscle by Y-27632 through inhibition of Ca²⁺ sensitization. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 20(6):1190-200, 1999
333. Yusufi AN, Cheng J, Thompson MA, Chini EN, Grande JP: Nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate (NAADP) elicits specific microsomal Ca²⁺ release from mammalian cells. *Biochem J* 353(Pt 3):531-6, 2001
334. Zaagsma J, Roffel AF, Meurs H: Muscarinic control of airway function. *Life Sci* 60(13-14):1061-8, 1997
335. Zbigniew M, Hartmann P, Jositsch J, Zbigniew Z, Lips KS, Pfeil U, Kurzen H, Lohmeyer J, Clauss WG, Grau V, Fronius M, Kummer W: Nicotinic receptors on rat alveolar macrophages dampen ATP-induced increase in cytosolic calcium concentration. *Respir Res* 11(1):133, 2010

336. Zhao Y, Foegh ML: Angiopeptin, a somatostatin analogue, inhibits rat coronary artery and aorta smooth muscle cell proliferation induced by the thromboxane A2 mimetic U46619. *Prostaglandins* 54(5):781-93, 1997
337. Ziegler M, Niere M: NAD⁺ surfaces again. *Biochem. J.* 382 (Pt 3): e5–6, 2004
338. Ziment I: The beta-agonist controversy. Impact in COPD. *Chest*107(5 Suppl):198S-205S, 1995
339. Zippin JH, Chen Y, Straub SG, Hess KC, Diaz A, Lee D, Tso P, Holz GG, Sharp GW, Levin LR, Buck J: CO₂/HCO₃⁽⁻⁾- and calcium-regulated soluble adenylyl cyclase as a physiological ATP sensor. *J Biol Chem* Nov 15;288(46):33283-91, 2013
340. Zubiaur M, Fernández O, Ferrero E, Salmerón J, Malissen B, Malavasi F, Sancho J: CD38 is associated with lipid rafts and upon receptor stimulation leads to Akt/protein kinase B and Erk activation in the absence of the CD3-zeta immune receptor tyrosine-based activation motifs. *J Biol Chem* 4;277(1):13-22, 2002

10 Publikationsverzeichnis

Veröffentlichungen:

Originalarbeit:

- **Chemical coding and chemosensory properties of cholinergic brush cells in the mouse gastrointestinal and biliary tract;** Burkhard Schütz, **Innokentij Jurastow**, Sandra Bader, Cornelia Ringer, Jakob von Engelhardt, Vladimir Chubanov, Thomas Gudermann, Wolfgang Kummer, Martin Diener, Gabriela Krasteva-Christ, Eberhard Weihe, *Frontiers in physiology*, **03/2015; 6(87), 2015**
- **Optical control of acetylcholinesterase with a tacrine switch;** Broichhagen J, **Jurastow I**, Iwan K, Kummer W, Trauner D, *Angewandte Chemie*, **53;29:7657-7660, 2014**
- **Bitter triggers acetylcholine release from polymodal urethral chemosensory cells and bladder reflexes;** Deckmann K, Filipski K, Krasteva-Christ G, Fronius M, Althaus M, Rafiq A, Papadakis T, Renno L, **Jurastow I**, Wessels L, Schütz B, Weihe E, Chubanov V, Gudermann T, Klein J, Bschleipfer T, Kummer W, *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, **111;22:8287-8292, 2014**

Abstract:

- **β -Nicotinamide adenine dinucleotide: a novel bronchodilator inducing increase in intracellular cAMP** Innokentij Jurastow, Gabriela Krastewa-Christ, Sandra Engel, Silke Wiegand, Amir Rafiq, Anna Zakrzewicz, Veronika Grau, Christina Nassenstein, Markus Bünemann, Wolfgang Kummer, *Pneumologie*, **69-A19, 2015**
- **β -Nicotinamide adenine dinucleotide (β -NAD): A novel bronchodilator; Innokentij Jurastow**, Gabriela Krasteva-Christ, Wolfgang Kummer, *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, **177;1 p45-46, 2013**

Posterbeitrag:

- Meeting of the “Anatomische Gesellschaft”, September 2015, Würzburg
- DZL Annual Meeting, Januar 2013, Bad Nauheim,
- ATS International Conference, Mai 2013, Philadelphia, Pennsylvania
- ISAN-EFAS, Juli/August 2013, Giessen
- Munich Lung Conference, October 2013, München
- DZL Annual Meeting, Januar 2014, Heidelberg, Germany
- ATS International Conference, Mai 2014, San Diego, Kalifornien
- 109th Meeting of the “Anatomische Gesellschaft”, September 2014, Salzburg, Österreich

Vorträge:

- **Tissue slices in the study of lung metabolism and pharmacology**, DZL Meeting Platform Imaging (PLI) Juni 2013
- **Beta-NAD: A New Bronchodilator**, UGMLC Meeting Mai 2013

Auszeichnungen:

- **International PhD/MD travel award**, International DZL Conference, Oktober 2013 München
- **Best Poster Award**, International DZL Conference, Juni 2015 Heidelberg

11 Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

12 Danksagung

Zu allererst möchte ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. Wolfgang Kummer, für die Überlassung des Themas und die unermüdliche Unterstützung sowohl in der Forschung, als auch im Studium danken. Vielen Dank insbesondere für die intensive Betreuung und die vielen Tipps in der Durchführung korrekter wissenschaftlicher Arbeit! Durch ihn habe ich die Forschung lieben gelernt.

PD Dr. Gabriella Krasteva-Christ danke ich für die fachlichen Gespräche, die mich so oft inspiriert und zu weiteren Ideen gebracht haben und für das freundschaftliche Verhältnis.

Allen Mitarbeitern der Labore des Instituts für Anatomie und Zellbiologie des Fachbereichs Humanmedizin der JLU Giessen, Martin Bodenbrenner, Tamara Papadakis, Silke Wiegand, Anna Goldenberg, Dr. Uwe Pfeil, Dr. Renate Paddenberg und Dr. Christina Nassenstein danke ich für die stetige Mithilfe bei der Vielzahl von Methoden, der Planung von Versuchen und die Geduld, insbesondere zu Beginn meiner Dissertation aber auch darüber hinaus.

Frau Patricia Berger und Frau Karola Michael danke ich insbesondere für die Hilfe in bürokratischen und grafischen Angelegenheiten.

Großer Dank gebührt auch Dr. Amir Rafiq und Stefanie Wiederhold, die mir gute Freunde geworden sind und nicht nur wissenschaftlich hilfreich waren, sondern mich auch privat sehr unterstützten. Danke für die vielen Gespräche und Taten, durch die Ihr mich immer ein großes Stück weiter gebracht habt!

Der Arbeitsgruppe um Prof. Bünemann, besonders Sandra Engel, danke ich herzlich für die FRET-Experimente an glatten Muskelzellen!

Besonderer Dank geht an meine Schwester, Maria Jurastova, und meine Mutter, Irina Jurastow: für die Unterstützung in allen Lebenslagen und für den Antrieb, den ich oft gebraucht habe. Vor allem Danke dafür, dass ihr beharrlich meinen Werdegang zum Arzt und zum Forscher gefördert und bestärkt habt!

Schließlich danke ich meiner wundervollen Frau Xenia Jurastow vom ganzen Herzen. Sie hat mich in guten und schlechten Zeiten immer motiviert, ob es um das Schreiben der Dissertation oder um das Lernen für das Studium ging. Es ist schön zu wissen dass Du immer hinter mir stehst, mich in schweren Zeiten auffängst und mich auf Dinge aufmerksam machst, die das Erreichen eines Zieles leichter machen. Für die Unterstützung und die Ratschläge. Vielen Dank!

Ihr alle habt mich geformt und aus mir den Menschen gemacht, der ich bin.