

Aus dem Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Die β -adrenergen und muskarin-cholinergen Rezeptoren im
Respirationstrakt des Pferdes:
Vergleichende Untersuchungen zwischen gesunden und kranken Pferden
mit chronisch obstruktiver Bronchitis**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Claudia Kottke
aus Leisnig

Leipzig, 2005

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Professor Dr. Karsten Fehlhaber

Betreuer: Professor Dr. Fritz Rupert Ungemach
Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Gutachter: Professor Dr. Fritz Rupert Ungemach
Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Professor Dr. Gerald Fritz Schusser
Medizinische Tierklinik
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Professor Dr. Stefan Dhein
Klinik für Herzchirurgie
Herzzentrum Leipzig GmbH – Universitätsklinik Leipzig

Tag der Verteidigung: 08. November 2005

Berichte aus der Veterinärmedizin

Claudia Kottke

**Die β -adrenergen und muskarin-cholinergen
Rezeptoren im Respirationstrakt des Pferdes:
Vergleichende Untersuchungen
zwischen gesunden und kranken Pferden mit
chronisch obstruktiver Bronchitis**

Shaker Verlag
Aachen 2006

Bibliografische Information der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

Zugl.: Leipzig, Univ., Diss., 2005

Copyright Shaker Verlag 2006

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 3-8322-4858-7

ISSN 0945-103X

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen
Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9
Internet: www.shaker.de • eMail: info@shaker.de

MEINEN ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
2	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1	Chronisch obstruktive Bronchitis (COB).....	3
2.2	β -adrenerge Rezeptoren	4
2.2.1	Klassifizierung	4
2.2.2	Mechanismen der Signalübertragung β -adrenerger Rezeptoren.....	6
2.2.3	Mechanismen zur Regulation von β -adrenergen Rezeptoren	8
2.2.4	Lokalisation und Funktion β -adrenerger Rezeptoren im Respirationstrakt	10
2.2.5	Bedeutung β -adrenerger Rezeptoren beim Asthma bronchiale des Menschen und der COB des Pferdes	13
2.3	Muskarin-cholinerge Rezeptoren	16
2.3.1	Klassifizierung	16
2.3.2	Mechanismen der Signalübertragung muskarin-cholinergerezeptoren.....	18
2.3.3	Mechanismen zur Regulation von muskarin-cholinergerezeptoren	20
2.3.4	Lokalisation und Funktion muskarin-cholinergerezeptoren im Respirationstrakt.....	20
2.3.5	Bedeutung muskarin-cholinergerezeptoren beim Asthma bronchiale des Menschen und der COB des Pferdes.....	22
3	TIERE, MATERIALIEN UND METHODEN	25
3.1	Tiere	25
3.2	Materialien	27
3.2.1	Lösungen und Puffersysteme	27
3.2.2	Chemikalien	28
3.2.3	Einmalartikel	29
3.2.4	Geräte	30
3.3	Methoden.....	30
3.3.1	Gewinnung des Organmaterials	30
3.3.2	Präparation der Rohmembranfraktion	31
3.3.3	Proteinbestimmung.....	31
3.3.4	Radioligandbindungsstudien	32
3.3.5	Bestimmung der Aktivität der Adenylatzyklase	40
3.3.6	Bestimmung der Aktivität der Phospholipase C	42
3.3.7	Statistik.....	44

II

4	ERGEBNISSE.....	45
4.1	Profil der β -adrenergen Rezeptoren im Respirationstrakt gesunder Pferde.....	45
4.1.1	Gesamtrezeptorzahl.....	45
4.1.2	Bestimmung der Stereoselektivität durch Verdrängung der ICYP-Bindung mit (-)-Propranolol und (+)-Propranolol	48
4.1.3	Subtypisierung β -adrenerger Rezeptoren.....	48
4.1.4	Rangfolge der pharmakologischen Wirkungsstärke von Isoprenalin, Adrenalin und Noradrenalin.....	50
4.1.5	Kopplungseffizienz der β -adrenergen Rezeptoren an G-Protein	54
4.1.6	Adenylatzyklase-Aktivität.....	56
4.2	Das pulmonale β -adrenerge Rezeptor- G_s -Protein-Adenylatzyklase-System bei der COB.....	58
4.2.1	Gesamtrezeptorzahl bei der COB.....	58
4.2.2	Anteil der Rezeptorsubtypen bei der COB.....	60
4.2.3	Kopplungsvermögen der β -adrenergen Rezeptoren an G_s -Protein bei der COB.....	61
4.2.4	Aktivität der pulmonalen Adenylatzyklase bei der COB.....	63
4.3	Profil der muskarin-cholinergen Rezeptoren im Respirationstrakt gesunder Pferde	66
4.3.1	Gesamtrezeptorzahl.....	66
4.3.2	Subtypisierung muskarin-cholinergere Rezeptoren.....	68
4.3.3	Kopplungsvermögen der muskarin-cholinergen Rezeptoren an heterotrimere G-Proteine	72
4.3.4	Hemmung der Adenylatzyklase durch muskarin-cholinerge Rezeptoren.....	74
4.3.5	Aktivität der Phospholipase C.....	74
4.4	Das pulmonale muskarin-cholinerge-System bei der COB	76
4.4.1	Gesamtrezeptorzahl muskarin-cholinergere Rezeptoren bei der COB.....	76
4.4.2	Verteilung muskarin-cholinergere Subtypen bei der COB.....	78
4.4.3	Kopplungsvermögen muskarin-cholinergere Rezeptoren an G-Proteine bei der COB.....	78
4.4.4	Hemmung der Adenylatzyklase durch muskarin-cholinerge Rezeptoren bei der COB.....	80
4.4.5	Stimulation der Phospholipase C durch muskarin-cholinerge Rezeptoren bei der COB.....	81

5	DISKUSSION	83
5.1	Identifizierung und Charakterisierung β -adrenerger Rezeptoren im Respirationstrakt gesunder Pferde.....	83
5.2	Identifizierung und Charakterisierung muskarin-cholinerger Rezeptoren im Respirationstrakt gesunder Pferde.....	87
5.3	Expression und Funktion β -adrenerger Rezeptoren im Respirationstrakt bei der COB des Pferdes	93
5.4	Expression und Funktion muskarin-cholinerger Rezeptoren im Respirations trakt bei der COB des Pferdes	97
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	101
7	SUMMARY	103
8	LITERATURVERZEICHNIS	105

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Schematische Darstellung des Signaltransduktionsweges β -adrenerger Rezeptoren.....	7
Abbildung 2:	Schematische Darstellung der Regulationsmechanismen β -adrenerger Rezeptoren.....	10
Abbildung 3:	Schematische Darstellung der Signalübertragung muskarin-cholinergere Rezeptoren.....	19
Abbildung 4:	Schematische Darstellung von Gesamt-, unspezifischer und spezifischer Bindung	33
Abbildung 5:	Schematische Darstellung einer Sättigungskurve und deren Linearisierung nach Scatchard.....	34
Abbildung 6:	Schematische Darstellung einer monophasisch verlaufenden Verdrängungskurve	36
Abbildung 7:	Schematische Darstellung einer biphasisch verlaufenden Verdrängungskurve	36
Abbildung 8:	Repräsentative Sättigungsexperimente mit ICYP	46
Abbildung 9:	Spezifische ICYP-Bindung und deren Transformation nach Scatchard	47
Abbildung 10:	Verdrängung der ICYP-Bindung durch (-)- und (+)-Propranolol.....	49
Abbildung 11:	Verdrängung der ICYP-Bindung mit dem β_1 -selektiven Antagonisten CGP 20712A und dem β_2 -selektiven Antagonisten ICI 118,551.....	51
Abbildung 12:	Hemmung der ICYP-Bindung durch (-)-Isoprenalin, (-)-Adrenalin und (-)-Noradrenalin.	52
Abbildung 13:	Hemmung der spezifischen ICYP-Bindung durch (-)-Isoprenalin in An- und Abwesenheit von 100 $\mu\text{mol/l}$ GTP.....	55
Abbildung 14:	AZ-Aktivität.....	57
Abbildung 15:	Vergleich der spezifischen ICYP-Bindung zwischen Kontrollpferden und an COB erkrankten Pferden.	59
Abbildung 16:	Vergleichende Darstellung des Anteils β_2 -adrenerger Rezeptoren zwischen der Kontrollgruppe und der COB-Gruppe.....	60
Abbildung 17:	Vergleichende Darstellung des Anteils hochaffiner Rezeptoren bei Verdrängungsexperimenten mit (-)-Isoprenalin in Abwesenheit von GTP zwischen der Kontroll- und der COB-Gruppe.	61

Abbildung 18:	Vergleichende Darstellung der AZ-Aktivität zwischen gesunden und an COB erkrankten Pferden.	64
Abbildung 19:	Repräsentative Sättigungsexperimente mit [³ H]-NMS	67
Abbildung 20:	Spezifische [³ H]-NMS-Bindung und deren Transformation nach Scatchard	68
Abbildung 21:	Hemmung der [³ H]-NMS-Bindung durch Atropin, Scopolamin, Pirenzepin, Telenzepin, Himbacin, Methoctramin, 4-DAMP und Tropicamid	70
Abbildung 22:	Hemmung der [³ H]-NMS-Bindung durch Carbachol in An- und Abwesenheit von 1 µmol/l GTP	73
Abbildung 23:	Aktivität der PLC	75
Abbildung 24:	Vergleich der spezifischen [³ H]-NMS-Bindung zwischen Kontrollpferden und an COB erkrankten Pferden.	77
Abbildung 25:	Vergleichende Darstellung des Anteils hochaffiner Rezeptoren, die aus Carbachol-Verdrängungskurven berechnet wurden, zwischen der Kontroll- und der COB-Gruppe.	78
Abbildung 26:	Hemmende Wirkung von Carbachol auf die Isoprenalin-induzierte cAMP-Produktion bei kranken und gesunden Pferden	80
Abbildung 27:	Aktivität der Phospholipase C von gesunden und kranken Pferden.	82

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Pharmakologische Eigenschaften β -adrenerger Rezeptoren.....	5
Tabelle 2:	Verteilung der Subtypen β -adrenerger Rezeptoren im Respirationstrakt verschiedener Spezies	11
Tabelle 3:	Verteilung und Funktion β -adrenerger Rezeptoren im Respirationstrakt.....	12
Tabelle 4:	Eigenschaften der Subtypen muskarin-cholinerg Rezeptoren	17
Tabelle 5:	Lokalisation und Funktion muskarin-cholinerg Rezeptoren.....	21
Tabelle 6:	Kenndaten der Versuchspferde	26
Tabelle 7:	Versuchsansatz für AZ-Assay	41
Tabelle 8:	Versuchsansatz für PLC-Assay	43
Tabelle 9:	Affinitäten β -adrenerger Agonist- und Antagonistliganden	53
Tabelle 10:	Gesamtrezeptorzahl β -adrenerger Rezeptoren und Affinität in drei Segmenten der Kontrollpferde und der an COB erkrankten Pferde.	60
Tabelle 11:	Affinitäten β -adrenerger Agonist- und Antagonistliganden im Respirationstrakt der Kontroll- und COB-Pferde.....	62
Tabelle 12:	AZ-Aktivität im Respirationstrakt gesunder und COB-kranker Pferde.....	65
Tabelle 13:	Affinitäten muskarin-cholinerg Antagonisten.....	71
Tabelle 14:	Affinität des muskarin-cholinerg Agonisten Carbachol.....	72
Tabelle 15:	Einfluss von Carbachol auf die Aktivität der Isoprenalin + GTP-stimulierten AZ.....	74
Tabelle 16:	Gesamtrezeptorzahl und Affinität muskarin-cholinerg Rezeptoren in drei Segmenten des Respirationstraktes bei Kontroll- und COB-Pferden.	76
Tabelle 17:	Affinitäten muskarin-cholinerg Antagonisten und des Agonisten Carbachol im Respirationstrakt der Kontroll- und COB-Pferde.....	79
Tabelle 18:	Hydrolytische Aktivität der Phospholipase C bei gesunden und COB-kranken Pferden an Membranen von Lungenparenchym, Bronchien und Trachea.....	81

ABKÜRZUNGEN

ADA	Adenosindeaminase
AF-DX 384	<i>N</i> -[2-[2-[(Dipropylamino)methyl]-1-piperidinyl]ethyl]-5,6-dihydro-6-oxo-1 <i>H</i> -pyrido[2,3- <i>b</i>][1,4]benzodiazepine-11-carboxamide
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
AZ	Adenylatzyklase
βARK	β-Adrenozeptorkinase
B _{max}	maximale Rezeptorzahl
BRL-37344	Natrium-4-(2'-[2-hydroxy-2-(3-chloro-phenyl)ethylamino]-propyl)phenoxyacetat
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-Monophosphat
CGP 12177	(±)-4-(3-Tertiärbutylamino-2-hydroxypropoxy)-benzimidazol-2-ol
CGP 20712A	1-[2-((3-Carbamoyl-4-hydroxy)phenoxy)ethylamino]-3-[4-(1-methyl-4-trifluoromethyl-imidazolyl)-phenoxy]-2-propanol
CL-316243	Dinatrium-5-[(2 <i>R</i>)-2-[[2 <i>R</i>)-2-(3-chlorophenyl)-2-hydroxyethyl]amino]propyl]-1,3-benzodioxol-2,2-dicarboxylat
COB	chronisch obstruktive Bronchitis
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
cpm	counts per minute
DAG	1,2-Diacylglycerol
4-DAMP	4-Diphenylacetoxy- <i>N</i> -methylpiperidin-methiodid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(β-aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetylsäure
FG	Freiheitsgrad
GB	Gesamtbindung
GDP	Guanindiphosphat
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase
GTP	Guanintriphosphat
GTPγS	Guanosin-5'-[γ-thio]triphosphat
HEPES	<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)piperazin- <i>N'</i> -(2-ethansulfonsäure)
Hill	Hill-Koeffizient
³ H-NMS	[³ H]- <i>N</i> -Methylscopolamin

VIII

15-HPETE	15-Hydroperoxyarachidonsäure
ICI 118,551	Erythro-(+/-)-1-(7-methylindan-4-yloxy)-3-isopropylaminobutan-2-ol
ICYP	(-)-[¹²⁵ I]-Iodocyanopindolol
IL-1 β	Interleukin-1 β
Iso	Isoprenalin
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
K _D	Dissoziationskonstante
K _I	Inhibitionskonstante
K _{IH}	Inhibitionskonstante für hochaffine Bindungsstellen
K _{IL}	Inhibitionskonstante für niederaffine Bindungsstellen
MBP	Major Basic Protein
MLCK	Myosin Light Chain Kinase
MQ	mittleres Abweichungsquadrat
MT-3	Mamba-Toxin 3
n	Anzahl der Messwerte/Versuche
NaF	Natriumfluorid
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PIP ₂	Phosphoinositol-4,5-biphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
pK _I	negativer Logarithmus der Inhibitionskonstante
PLC	Phospholipase C
RAO	Recurrent Airway Obstruction
RG	Reagenzgemisch
R _H	Anteil hochaffiner Rezeptoren
SB	spezifische Bindung
SDS	Natriumdodecylsulfat
S.E.M.	Standard error of the mean (Standardfehler)
SR 59230A	3-(2-Ethylphenoxy)-1-[[[(1S)-1,2,3,4-tetrahydronaphth-1-yl]amino]- (2S)-2-propanol-oxalat
TGF- β ₁	Transforming Growth Factor- β ₁
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UB	unspezifische Bindung

vs.

versus

ZD-7114

((S)-4-[2-[(2-hydroxy-3-phenoxypropyl)amino]ethoxy]-N-(2-methoxyethyl)phenoxyacetamid