

**Aus dem Institut für Pharmakologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. M.J. Lohse**

Der A_{2B}-Adenosinrezeptor und MAP-Kinase Aktivität in MDA-MB-231-Brustkrebszellen

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Daniela Bieber

aus Schweinfurt

Würzburg, November 2010

Referent: Prof. Dr. rer. nat. K.-N. Klotz

Koreferent: Prof. Dr. med. J. Dietl

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung : 24.10.2011

Die Promovendin ist Ärztin.

1. Einleitung	
1.1. Adenosin_____	1
1.2. Adenosinrezeptoren_____	1
1.2.1. Pharmakologie von A _{2B} -Rezeptoren_____	3
1.2.2. Verteilung und Signaltransduktion der A _{2B} -Rezeptoren_____	4
1.3. Physiologische und pathophysiologische Bedeutung der Adenosinrezeptoren_____	5
1.4. Die MAP-Kinase Familie_____	11
1.5. Zielsetzung_____	13
2. Material	
2.1. Zelllinien_____	14
2.2. Zellkulturmedien_____	14
2.3. Chemikalien_____	14
2.3.1. Antikörper_____	15
2.3.2. Inhibitoren und Stimulantien_____	16
2.4. Geräte_____	17
3. Methoden	
3.1. Zellkultur_____	18
3.2. Proteinchemische Methoden	
3.2.1. Proteinbestimmung_____	18
3.2.2. Western Blot_____	19
3.2.3. Radioligandenbindung_____	24
3.2.4. Adenylylcyclase-Assay_____	25
3.3. MTS-Proliferationstest_____	26
4. Ergebnisse	
4.1. MDA-MB-231 Östrogenrezeptor-negative Brustkrebszelllinie	
4.1.1. Beeinflussung der ERK-1/2 Phosphorylierung durch den Adenosinrezeptor-Agonisten NECA_____	28
4.1.2. Untersuchung der basalen ERK-1/2 Phosphorylierung in MDA-MB-231	
4.1.2.1. Inhibition von Tyrosinkinase-Rezeptoren_____	29
4.1.2.2. Untersuchung eines möglichen Synergismus von src-Kinase- und Her2-Inhibition_____	31

4.1.3. cAMP-abhängige Signaltransduktion	31
4.1.4. G _q -gekoppelte Signaltransduktion	35
4.1.5. Weitere potentielle Angriffspunkte	36
4.2. Humane immortalisierte Keratinozyten (HaCaT)	
4.2.1. Zeitlicher Verlauf der ERK-1/2 Phosphorylierung nach NECA-Stimulation	38
4.2.2. Differenzierung der A ₂ AR-Subtypen	38
4.2.3. Vergleich der basalen MAPK-Aktivität in MDA-MB-231 und HaCaT	39
4.3. A _{2B} AR-transfizierte CHO-Zellen	40
4.4. Untersuchung von Wachstum und Proliferation der Östrogenrezeptor-negativen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231	41
4.5. Beobachtung der MAPK-Aktivität nach NECA-Stimulation über 24 Stunden	44
4.6. Bestimmung der A _{2B} AR-Zahl mittels Radioligandenbindung	45
4.7. Bestimmung der Adenylylcyclase-Aktivität in MDA-MB-231	46
5. Diskussion	
5.1. Einfluss von MAPK und Adenosin auf die Tumorigenese	48
5.2. Hohe basale Aktivität von MDA-MB-231-Brustkrebszellen	49
5.3. Inhibition der MAPK-Aktivität durch die Stimulation des A _{2B} -Adenosinrezeptors in MDA-MB-231-Zellen	51
5.4. Beteiligung von cAMP an der Signaltransduktion des A _{2B} -Adenosinrezeptors in MDA-MB-231-Brustkrebszellen	53
5.5. Ca ²⁺ -abhängige Signaltransduktion	55
5.6. Hemmung der Proliferation der MDA-MB-231-Brustkrebszellen durch A _{2B} -Adenosinrezeptor-Stimulation und Tyrosinkinase-Inhibition	57
5.7. Adenosinrezeptoren als potentieller Angriffspunkt zur Brustkrebstherapie?	59
5.8. Perspektiven	60
6. Zusammenfassung	62
7. Literaturverzeichnis	64
Danksagung	73
Lebenslauf	74

Abkürzungen

8-Br-cAMP	8-Bromoadenosine-3',5'-cyclic monophosphate
AC	Adenylylcyclase
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
AG 112	2-Amino-4-(4'-hydroxyphenyl)-1,1,3-tricyanobuta-1,3-diene Tyrphostin A48
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AR/ A _x AR	Adenosin-Rezeptor(en)
ASK-1	Apoptosis signal-regulating kinase-1 (MAP Kinase Kinase Kinase)
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA-AM	1,2-bis(o-Aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic Acid Tetra(acetoxymethyl) Ester
BCA	Bicinchoninic Acid
BSA	Bovines Serum Albumin
CamKII	Calcium-Calmodulin-Kinase II
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cAMP-AM	Adenosine-3',5'-cyclic monophosphate, acetoxymethyl ester
CGS 21680	2-p-(2-Carboxyethyl)phenethylamino-5'-N-ethylcarboxamidoadenosine hydrochloride
CHO	Chinesische Hamster Ovarzellen
CREB	cAMP response element-binding protein (Transkriptionsfaktor)
CSAID	cytokine-suppressive anti-inflammatory drug
CSBP	CSAID binding protein
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EC ₅₀	mittlere effective Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
Elk-1	Ets-like molecule-1 (Transkriptionsfaktor)
Emodin	6-Methyl-1,3,8-trihydroxyanthraquinone
ERK-1/2	Extracellular regulated kinase-1/2
FCS	Fetales Kälberserum
FK 506	Tacrolimus
GABA	γ-Aminobuttersäure
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
H-89	N-[2-((p-Bromocinnamyl)amino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide
HaCaT	humane immortalisierte Keratinozyten
HRP	Meerrettichperoxidase (engl.: horseradish peroxidase)
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IL	Interleukin

IP ₃	Inositol-triphosphat
JNK	c-Jun N-terminale Kinase (Januskinase)
kDa	Kilodalton
KB-R7943	2-(2-(4-(4-Nitrobenzyloxy)phenyl)ethyl)isothiourea, methane sulfonate
KN-62	1-[N,O-bis-(5-Isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MDA-MB-231	Östrogenrezeptor-negative Brustkrebszelllinie
MEF-2	Myocyte-specific enhancer factor-2 (Transkriptionsfaktor)
MEKK	MAP Kinase Kinase Kinase
MKK	MAP Kinase Kinase
MLK	MAP Kinase Kinase Kinase
NaHCO ₃	Natriumbicarbonat
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher
NECA	5'-(N-Ethylcarboxamido)adenosine
NF-κB	Transkriptionsfaktor
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphate buffered saline
PHPNECA	2-phenylhydroxypropynyl-5'-N-ethylcarboxamidoadenosine
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: rounds per minute)
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
RpcAMPS	Adenosine-2',3'-cyclic monophosphorothioate, Rp-/ endoisomer
SAPK	Stress-activated protein kinase (Januskinase)
SCH 58261	7-(2-phenylethyl)-5-amino-2-(2-furyl)-pyrazolo-[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidine
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (engl.: standard error of the mean)
SpcAMPS	adenosine-2',3'-cyclic monophosphorothioate, Sp-/ exoisomer
Src	intrazelluläre Tyrosinkinase
TAK-1	MAP Kinase Kinase Kinase
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Th-Zellen	T-Helferzellen
TNF	Tumornekrosefaktor
U-73122	1-[6-((17b-3-Methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino)hexyl]-1H-pyrrole-2,5-dione

U-73343

1-[6-((17b-3-Methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino)hexyl]-2,5-pyrrolidinedione

VEGF

Vascular endothelial growth factor

1 Einleitung

1.1 Adenosin

Das Purinnukleosid Adenosin, das aus der Base Adenin und dem Zucker D-Ribose besteht, ist einerseits ein Baustein von Nukleotiden, die sowohl als Energiequelle als auch zur DNA-Synthese genutzt werden, andererseits ein in allen Geweben und Körperflüssigkeiten vorkommendes extrazelluläres Signalmolekül. Unter physiologischen Bedingungen spielt Adenosin eine wichtige Rolle im ZNS und im Gastrointestinaltrakt und beeinflusst außerdem auch das Zellwachstum und die Zellproliferation. Andererseits kommt Adenosin beispielsweise bei Asthma bronchiale, bei Stresssituationen im kardiovaskulären System sowie als endogener Schmerzmediator eine wichtige Bedeutung zu.

Die extrazelluläre Konzentration von Adenosin, dessen Synthese stark mit der Energiebilanz der Zelle verknüpft ist, beträgt unter physiologischen Bedingungen 30-300 nM. Durch ein Missverhältnis zwischen Energieproduktion und Energieverbrauch, z.B. bei Sauerstoffmangel durch erhöhte metabolische Aktivität, kann es zu einem drastischen Anstieg der extrazellulären Adenosinkonzentration bis in den mikromolaren Bereich kommen (Schulte und Fredholm, 2003a).

Unter physiologischen Bedingungen wird Adenosin kontinuierlich sowohl intrazellulär durch Dephosphorylierung von AMP durch die 5'-Nucleotidase oder durch Hydrolyse von S-Adenosylhomocystein als auch extrazellulär durch Dephosphorylierung von ATP mittels Ektonucleotidasen gebildet. Durch die erleichterte Diffusion via eines bidirektionalen Nukleotidtransporters stellt sich ein Gleichgewicht zwischen intra- und extrazellulärer Adenosinkonzentration ein (Fredholm *et al.*, 2001).

Steigt die extrazelluläre Adenosinkonzentration aufgrund einer Hypoxie oder Ischämie an, wird Adenosin über die oben genannten Transporter in die Zellen aufgenommen und mittels Adenosinkinase zu AMP phosphoryliert oder durch das Enzym Adenosindesaminase, das auch im Extrazellulärraum vorhanden ist, zu Inosin abgebaut. Durch diese Mechanismen kann die Adenosinkonzentration im Gleichgewicht gehalten werden (Fredholm *et al.*, 2001).

1.2 Adenosinrezeptoren

Die vielfältigen Effekte von Adenosin auf die unterschiedlichen Organsysteme werden durch vier Rezeptor-Subtypen vermittelt: A₁-, A_{2A}-, A_{2B}- und A₃-Adenosinrezeptoren (A₁AR, A_{2A}AR, A_{2B}AR, A₃AR), die der Familie der G-Protein gekoppelten

Rezeptoren zuzuordnen sind. Die Expression der Rezeptor-Subtypen im Organismus ist entsprechend den vielfältigen Wirkungen des Adenosins weit verbreitet.

Das Adenosinrezeptorprotein, bestehend aus sieben transmembranen Domänen mit drei intra- und drei extrazellulären Schleifen, kann nach Ligandenbindung mit nachfolgender Konformationsänderung mit den zugehörigen heterotrimeren G-Proteinen auf der Membrannenseite, welche an weitere second-messenger Systeme gekoppelt sind, interagieren. Aktiviert das G-Protein nach Bindung eines Rezeptoragonisten zum Beispiel die Adenylylcyclase (AC), so spricht man von einem stimulatorischen G-Protein (G_s). Wird die AC inhibiert, bezeichnet man es als inhibitorisches G-Protein (G_i). G-Proteine der Familie G_q aktivieren die Phospholipase C (Feoktistov und Biaggioni, 1997; Panjehpour *et al.*, 2005).

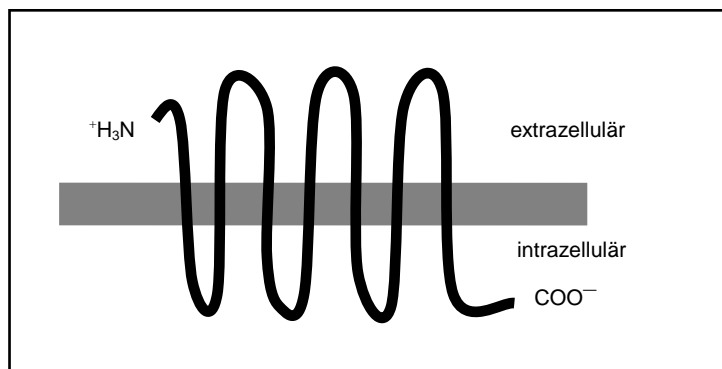


Abbildung 1: G-Protein gekoppelter Rezeptor (GPCR). Vereinfachte zweidimensionale Darstellung eines GPCR, bestehend aus extrazellulärem N-Terminus, sieben Transmembrandomänen sowie intrazellulärem C-Terminus

A_1AR und A_3AR inhibieren über die Aktivierung des Pertussistoxin-sensitiven G_i die AC und stimulieren über G_q die Phospholipase $C\beta$, wohingegen $A_{2A}AR$ und $A_{2B}AR$ via G_s zu einer Steigerung der AC-Aktivität führen (Jacobson und Gao, 2006).

Untersuchungen der Aminosäuresequenz zeigen, dass unter den menschlichen Adenosinrezeptoren die $A_{2A}AR$ und $A_{2B}AR$ mit 59% sowie die A_1AR und A_3AR mit 49% die größten Sequenzhomologien aufweisen, was auch deren Bindungsverhalten an die G-Protein-Subtypen erklären dürfte (Feoktistov und Biaggioni, 1997; Jacobson und Gao, 2006). Die molekulare Masse der AR beträgt 37 kDa mit der Ausnahme des $A_{2A}AR$, dessen molekulare Masse aufgrund eines längeren intrazellulären C-Terminus, der aber Untersuchungen zufolge keinen Einfluss auf die Aktivierung der AC hat, 45 kDa beträgt (Feoktistov und Biaggioni, 1997).

Die extrazellulären Adenosinspiegel, die zu einer Stimulation der vier Rezeptor-Subtypen führen, variieren sehr stark, abhängig von Gewebe und energetischem Zustand der Zellen, wobei zur Aktivierung des $A_{2B}AR$, der als niederaffine Variante des $A_{2A}AR$ betrachtet wird, deutlich höhere Adenosinkonzentrationen nötig sind als

zur Stimulation der anderen Rezeptor-Subtypen (Feoktistov und Biaggioni, 1997; Jacobson und Gao, 2006). Dennoch scheinen dem A_{2B} AR auch unter physiologischen Bedingungen wichtige Funktionen zuzukommen (Schulte und Fredholm, 2003b).

1.2.1 Pharmakologie von A_{2B} -Rezeptoren

Mit Ausnahme des A_{2B} AR existieren für alle Adenosinrezeptoren hochselektive und potente Agonisten. Das nicht-selektive Adenosin-Analogon NECA ist mit einem halbmaximalen Effekt der AC-Stimulation bei einer Konzentration von 2 μ M einer der bisher potentesten Agonisten am A_{2B} AR. Es aktiviert die anderen Adenosinrezeptoren jedoch schon bei deutlich niedrigeren Konzentrationen. Die Charakterisierung des A_{2B} AR findet durch Einsatz von Substanzen, die mit hoher Affinität an die anderen Rezeptor-Subtypen binden, aber keine Wirkung an A_{2B} AR zeigen, in einer Art Ausschlussverfahren statt. So zeigt zum Beispiel der Agonist CGS 21680 keine Wirkung am A_{2B} AR, ist aber bezüglich der Aktivierung des A_{2A} AR ebenso effektiv wie NECA. Ebenso zeigen A_{2B} AR nur geringe Affinität zum A_1 AR-selektiven Agonisten R-PIA ((R)- N^6 -phenylisopropyladenosin) sowie dem bei der Ratte A_3 AR-selektiven Agonisten IB-MECA (N^6 -(3-iodobenzyl)- N -methyl-5'-carbamyladenosin) (Feoktistov und Biaggioni, 1997). Außerdem zeigen funktionelle Untersuchungen am A_{2B} AR, dass PHPNECA, ein Derivat des NECA, mit einem $EC_{50} = 0,88 \mu$ M am A_{2B} AR eine dreifach stärkere Wirkung entfaltet als NECA selbst (Cristalli *et al.*, 1998).

Da die pharmakologische Rezeptor-Charakterisierung, die auf der Effizienz von Agonisten basiert, nicht nur von der Agonistenbindung an den Rezeptor, sondern auch von multiplen Prozessen der Signaltransduktion abhängig ist, sind bei der Subtypen-Identifizierung selektive Antagonisten den Agonisten vorzuziehen. Einer der älteren selektiven Antagonisten am A_{2B} AR ist das Antiasthmatikum Enprofyllin (3-n-propylxanthin). Nichtselektive, aber potentere Antagonisten sind die Verbindungen DPSPX (1,3-dipropyl-8-(p-sulfophenyl)xanthin), DPCPX (1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthin) und ZM241385 (Feoktistov, 1997; Fredholm *et al.*, 2001).

Da A_{2B} AR in den verschiedenen Geweben mit anderen Adenosinrezeptoren coexprimiert werden, bietet die Entwicklung und der Einsatz selektiver A_1 AR-, A_{2A} AR- und A_3 AR-Antagonisten in Verbindung mit dem nicht-selektiven Agonisten NECA

neue Möglichkeiten zur selektiven Stimulation von A_{2B}AR (Feoktistov und Biaggioni, 1997).

1.2.2 Verteilung und Signaltransduktion der A_{2B}-Rezeptoren

Adenosinrezeptoren sind ubiquitär im menschlichen Körper zu finden und vermitteln eine Vielzahl physiologischer Funktionen (Shryock und Belardinelli, 1997). A_{2B}AR finden sich in Neuronen, Gliazellen, Fibroblasten, Mastzellen, myokardialen, neurosekretorischen und hämatopoetischen Zellen, im intestinalen Epithel sowie im Gefäßbett unterschiedlicher Organsysteme (Feoktistov und Biaggioni, 1997).

Wie bereits erwähnt, gehört der A_{2B}AR zur Gruppe der G_s-gekoppelten Rezeptoren, die über die Aktivierung der AC zu einer cAMP-Erhöhung führen, was in allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden kann (Feoktistov und Biaggioni, 1997). Ebenfalls kommt es in der MDA-MB-231-Zelllinie durch eine Aktivierung des G_{q/11}-Signalweges zu einem PLC-vermitteltem Anstieg des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels, dem sowohl eine Ca²⁺-Freisetzung aus intrazellulären Speichern als auch ein extrazellulärer Ca²⁺-Einstrom durch Ca²⁺-Kanäle der Plasmamembran zugrunde liegt (Feoktistov und Biaggioni, 1997; Panjehpour *et al.*, 2005).

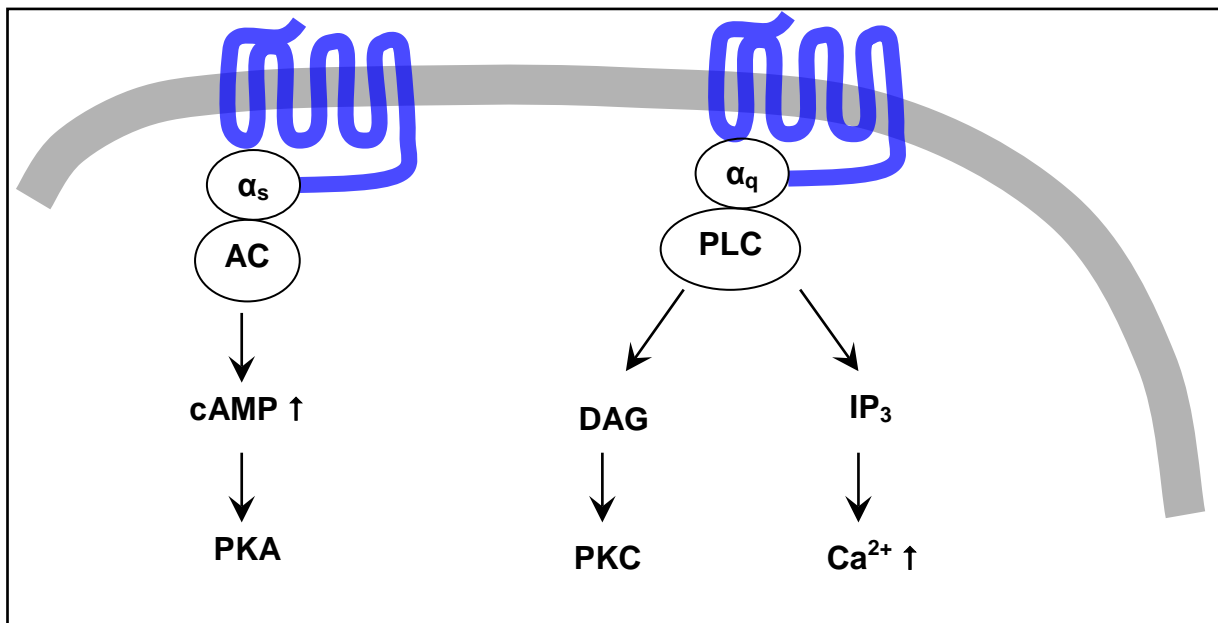


Abbildung 2: Schematische Darstellung intrazellulärer A_{2B}AR-vermittelter Signalwege. In allen untersuchten Zellen sind A_{2B}AR über G_s an AC gekoppelt. Die Aktivierung dieses Signalwegs führt zu einer Akkumulation von cAMP mit nachfolgender Stimulation der PKA. In Mastzellen und MDA-MB-231-Zellen kommt es via G_q-Kopplung des A_{2B}AR zur Aktivierung der Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C (PI-PLC), die über IP₃ zur Ca²⁺-Freisetzung aus intrazellulären Speichern führt. [Abbildung modifiziert nach Feoktistov, 1997 und Panjehpour, 2005]

1.3 Physiologische und pathophysiologische Bedeutung der Adenosinrezeptoren

Nervensystem

Adenosin, dem sowohl in der Peripherie als auch auf spinaler Ebene eine Funktion als Schmerzmodulator zukommt, kann über die Aktivierung zentraler und peripherer A₁AR antinozizeptive und über die Aktivierung peripherer A₂- und A₃AR pronozizeptive Wirkungen entfalten (Sawynok, 1998; Giffin *et al.*, 2003). Durch den in Tierversuchen nachgewiesenen inhibitorischen Effekt, den A₁AR-Agonisten auf die trigeminovaskuläre nozizeptive Transmission ausüben, könnten derartige Substanzen eines Tages in der Therapie von Migräne und Cluster-Kopfschmerz zum Einsatz kommen (Jacobson und Gao, 2006; Giffin *et al.*, 2003). Außerdem wird den A₁AR eine neuroprotektive Funktion bei Ischämie und hämorrhagischen Insulten zugeschrieben (Jacobson und Gao, 2006).

Darüber hinaus ist ein Antagonismus von A_{2A}AR und D₂-Rezeptoren bekannt, welcher regulierend auf die GABAerge Neurotransmission striatopallidaler Neurone wirkt. Die Aktivierung von A_{2A}AR führt zu einer gesteigerten GABA-Freisetzung, wodurch die Freisetzung von Dopamin inhibiert wird (Khisti *et al.*, 2000). Durch den klinischen Einsatz von A_{2A}AR-Antagonisten bei Patienten mit Morbus Parkinson konnte neben einer Besserung der Symptomatik auch eine verlangsamte Degeneration dopaminerger Neurone beobachtet werden (Xu *et al.*, 2005).

Diverse AR-Subtypen sind in die Neurotransmission und die Modulation der Gliazellfunktion involviert (Sebastião und Ribeiro, 1996; Daré *et al.*, 2007). Auf Gliazellen sind alle Subtypen exprimiert, wobei sich herausgestellt hat, dass die Aktivierung des A_{2A}-Subtyps die Reifung von Oligodendrozyten-Progenitorzellen zu Oligodendrozyten und damit die Myelinisierung fördert, woraus sich ein möglicher Einsatz A_{2A}-selektiver Agonisten bei demyelinisierenden Erkrankungen wie Multiple Sklerose ergeben könnte (Stevens *et al.*, 2002).

Die stimulatorischen Effekte von Koffein werden durch eine Blockade des A_{2A}AR vermittelt, dem unter physiologischen Bedingungen eine Schlüsselrolle im Hinblick auf die schlaf fördernde Wirkung von Adenosin zukommt (Jacobson und Gao, 2006; Feoktistov und Biaggioni, 1997; El Yacoubi *et al.*, 2000; Fredholm, 2004).

Kardiovaskuläres System

Am Herzen werden dem Adenosin wichtige elektrophysiologische Effekte zugeschrieben. So entfaltet Adenosin seine negativ chronotrope, dromotrope und inotrope Wirkung durch Stimulation von A_1 AR und inhibiert somit die stimulatorischen Katecholamin-Wirkungen (Dobson jr., 1983; Shryock und Belardinelli, 1997). Aus der negativ dromotropen Wirkung von Adenosin erklärt sich auch die Normalisierung des Rhythmus bei paroxysmaler supraventikulärer Tachykardie nach parenteraler Applikation von Adenosin (Feoktistov und Biaggioni, 1997).

Während ischämischer Phasen wird Adenosin vermehrt aus Kardiomyozyten freigesetzt und wirkt über die Aktivierung von A_1 - und A_3 AR kardioprotektiv (Sato *et al.*, 2000; Peart und Headrick, 2007).

Im Gefäßsystem vermittelt Adenosin über auf glatten Muskelzellen oder dem Endothel lokalisierte A_{2A} - und A_{2B} AR vasodilatatorische Effekte und inhibiert via A_{2A} AR die Thrombozytenaggregation (Shryock und Belardinelli, 1997; Rosales *et al.*, 2004).

Durch Stimulation der auf kardialen Fibroblasten exprimierten A_{2B} AR reduziert Adenosin das ventrikuläre Remodelling bei Myokardinsuffizienz durch Inhibition von Proliferation, Protein- und Kollagensynthese (Chen *et al.*, 2004).

Niere

Im Gegensatz zu den anderen Blutgefäßen des Körpers führt Adenosin an der Niere durch Aktivierung von A_1 AR am Vas afferens zu einer Vasokonstriktion, woraus eine Reduktion der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und des renalen Blutflusses (RBF) resultiert. Über A_1 AR im juxtaglomerulären Apparat (JGA) kann Adenosin das tubuloglomeruläre Feedback (TGF) und somit die Na^+ - und Flüssigkeitsreabsorption modulieren. Daraus ergibt sich ein möglicher Ansatz zur Therapie der Flüssigkeitsretention bei dekompensierter Herzinsuffizienz durch den Einsatz von A_1 AR-Antagonisten (Modlinger und Welch, 2003; Vallon *et al.*, 2006)

Respiratorisches System

In der Pathophysiologie des Asthma bronchiale nimmt Adenosin eine wichtige Stellung ein. So fand man in der bronchoalveolären Lavage (BAL) von Patienten mit Asthma und chronischer Bronchitis erhöhte Adenosinkonzentrationen, welche

indirekt durch eine A_{2B} AR-induzierte Mastzellaktivierung mit nachfolgender Ausschüttung diverser Entzündungsmediatoren eine Bronchokonstriktion hervorrufen können (Breschi *et al.*, 2007; Feoktistov *et al.*, 1998). Anhand von Tierversuchen an Meerschweinchen kann gezeigt werden, dass Adenosin via A_{2B} AR der glatten Atemwegsmuskulatur (ASM) eine relaxierende Wirkung entfalten kann. Durch die hohen Adenosinspiegel bei Atemwegsentzündungen kommt es jedoch zu einer Desensibilisierung dieser A_{2B} AR, wodurch die relaxierende Wirkung inhibiert wird und schließlich die bronchokonstriktorische Komponente der Mastzellaktivierung dominiert (Breschi *et al.*, 2007).

Immunsystem

Adenosin, das unter hypoxischen und inflammatorischen Bedingungen in den Extrazellulärraum freigesetzt wird, spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Immunsystems (siehe Tabelle 1; Spsychala, 2000; Haskó *et al.*, 2007; Feoktistov *et al.*, 1999).

So vermittelt Adenosin nach Stimulation von A_1 AR pro-inflammatorische Effekte durch Neutrophilen-Chemotaxis, wirkt ansonsten aber eher anti-inflammatorisch und immunsuppressiv (Feoktistov *et al.*, 1999; Spsychala, 2000). Ferner inhibiert Adenosin über A_{2A} -Aktivierung den oxidativen Burst sowie die Degranulation und Adhäsion von neutrophilen Granulozyten (Feoktistov *et al.*, 1999; Cronstein *et al.*, 1990)

Auch die Monozyten-/Makrophagen-Funktionen kann Adenosin über verschiedene AR-Subtypen regulieren: So beeinflusst Adenosin die Reifung, Proliferation und phagozytotische Aktivität von Makrophagen, inhibiert den oxidativen Burst sowie die TNF- α - und IL-12-Synthese, moduliert die NO-Synthese und steigert sowohl die Produktion von IL-10 als auch von VEGF (vascular endothelial growth factor). Letzteres lässt leicht erkennen, dass Adenosin auf diese Art und Weise sowohl die Angiogenese als auch die Proliferation von Endothelzellen begünstigt (Spsychala, 2000).

Durch die Reduktion der IL-12-Synthese nimmt Adenosin Einfluss auf die Th₁-medierte Entzündungsantwort, was einen zentralen Mechanismus der Adenosin-vermittelten anti-inflammatorischen Wirkung darstellt. Weitere anti-inflammatorische bzw. immunsuppressive Effekte entfaltet Adenosin durch die gesteigerte IL-10-Produktion via A_{2A} - und A_{2B} -Stimulation (Haskó *et al.*, 2007).

Darüber hinaus inhibiert Adenosin, v.a. mittels $A_{2A}AR$, schon in physiologischen Konzentrationen die Freisetzung von IL-1 β aus mononukleären Zellen, einem der wichtigsten Hyperthermie-induzierenden Zytokine, und dient somit zur Prävention von Hyperpyrexie (Sipka *et al.*, 2005).

Tumorpromotion

Angiogenese und Inhibition von Entzündungsreaktionen sind Teil der zytoprotektiven Funktion des Adenosins, die nicht nur bei Verletzungen, sondern auch bei Krebs eine wichtige Rolle zu spielen scheint (Spychala, 2000).

Durch ein diffuses, unkontrolliertes Wachstum und die Proliferation solider Tumore kommt es zur Sauerstoffmangelversorgung des malignen Gewebes, was ein Stimulus für die Adenosinfreisetzung ist (Merighi *et al.*, 2003). Adenosin akkumuliert in soliden Tumoren und sorgt z.B. durch Schutz vor Ischämie, Stimulation von Wachstum und Angiogenese sowie Suppression der Immunantwort für günstige Umweltbedingungen, die das Tumorstadium fördern (Blay *et al.*, 1997; Sychala, 2000). So basiert die immunsuppressive Wirkung von Adenosin einerseits auf der Inhibition von NK-Zellen und der T-Zell-Aktivierung sowie der Synthese pro-inflammatorischer Zytokine (z.B. IL-2, TNF- α , IL-12, etc.), andererseits fördert es die Synthese anti-inflammatorischer Zytokine wie IL-10 (Spychala, 2000; Haskó *et al.*, 2007).

Durch die immunsuppressive Funktion von Adenosin und dessen hoher Konzentration in soliden Tumoren ist es sehr wahrscheinlich, dass Adenosin einen wichtigen Teil der sog. „immunologischen Barriere“, die für das Scheitern einer effektiven Immunantwort gegen maligne Zellen verantwortlich ist, ausmacht. Deshalb könnte eine Verminderung der Adenosinkonzentration im Rahmen therapeutischer Interventionen, v.a. durch die Reduktion anti-inflammatorischer Prozesse und die Induktion einer effektiven Immunantwort, zu einer Tumorstoßung führen (Blay *et al.*, 1997; Sychala, 2000).

Eine schematische Darstellung des Einflusses von Adenosin auf das Tumorstadium und die Funktion des Immunsystems ist in Abbildung 3 dargestellt.

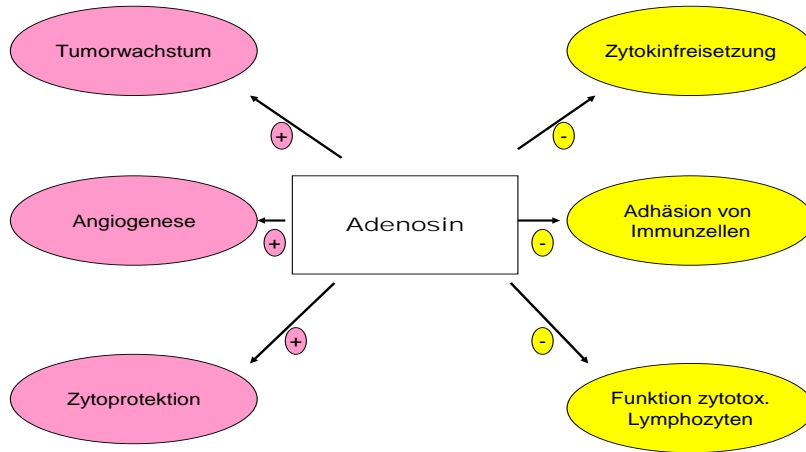


Abbildung 3: Effekte von Adenosin auf die Tumorpromotion und das Immunsystem (Abb. modifiziert nach Spsychala, 2000)

Rezeptor	Lokalisation	Effekte bei Aktivierung
A₁AR	ZNS	ischämische Präkonditionierung ¹ Antinozizeption ² Glutamat-Freisetzung Astrozyten ↓ ³ Proliferation Oligodendrozyten ↓ ³
	Kardiomyozyten	negativ chronotrop, dromotrop, inotrop; ‚anti-adrenerg‘ ⁴ ischämische Präkonditionierung ^{5,6}
	Niere	Vasokonstriktion Vas afferens ⁷
	Pankreas	Insulin-Freisetzung ↓ ⁸
	Immunsystem	Neutrophilen-Chemotaxis ↑ ⁹
A_{2A}AR	ZNS	Freisetzung Dopamin ↓ ¹⁰ Freisetzung Ach, Glutamat, Aspartat, Noradrenalin ↑ ¹¹ Myelinisierung Oligodendrozyten ¹²
	PNS	Pronozizeption ^{2,13}
	Koronarien	Vasodilatation ⁴
	Thrombozyten	Aggregation ↓ ^{9,14}
	Pankreas	Glukagonfreisetzung ↑ ¹⁵
	Immunsystem	Proliferation ↓, pro-inflammatorische Zytokine ↓, anti-inflammatorische Zytokine ↑, T-Zell-Aktivierung ↓ ¹⁶ Wundheilung ↑ ¹⁷ Neutrophile: oxidativer Burst, Degranulation, Adhäsion ↓ ⁹ Makrophagen: IL-10 ↑, VEGF ↑ ¹⁸
A_{2B}AR	Angiogenese ^{17,19}	
	Kardiale Fibroblasten	Proliferation, Protein- & Kollagensynthese ↓ ²⁰
	glatte Muskelzellen	Relaxation Atemwegsmuskulatur ²¹
	Glucosemetabolismus	Glykogenolyse ↑, Glukoneogenese ↑ ²²
	Gastrointestinaltrakt	Cl ⁻ Sekretion ↑ ¹⁴
	Immunsystem	Mastzell-Degranulation ↑ ²¹ Makrophagen: IL-10 ↑ ¹⁸
A₃AR	PNS	Pronozizeption ²
	Kardiomyozyten	ischämische Präkonditionierung ^{5,6}
	glatte Muskelzellen	Bronchospasmus ²¹
	Immunsystem	Eosinophilen-Chemotaxis ↓ ⁹

Tabelle 1: Lokalisation und physiologische Bedeutung der Adenosinrezeptoren

[Ref.: 1) Jacobson und Gao, 2006, 2) Giffin *et al.* 2003, 3) Daré *et al.*, 2007, 4) Shryock und Belardinelli, 1997, 5) Sato *et al.*, 2000, 6) Peart und Headrick, 2007, 7) Modlinger und Welch, 2003, 8) Hillaire-Buys, 1994, 9) Feoktistov *et al.*, 1999, 10) Khisti *et al.*, 2003, 11) Sebastião und Ribeiro, 1996, 12) Stevens *et al.*, 2003, 13) Sawynok, 1998, 14) Rosales *et al.*, 2004, 15) Chapal *et al.*, 1985, 16) Spsychala, 2000, 17) Merighi *et al.*, 2003, 18) Haskó *et al.*, 2007, 19) Feoktistov *et al.*, 2003, 20) Chen *et al.*, 2004, 21) Breschi *et al.*, 2007, 22) Yasuda *et al.*, 2003]

1.4 Die MAP-Kinase-Familie

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs), die in allen Eukaryonten vorkommen, sind die mit am gründlichsten untersuchten Systeme der Signaltransduktion von der Zelloberfläche zum Zellkern, die an einer Vielzahl zellulärer Funktionen, wie z.B. Zelldifferenzierung, Zellproliferation, Zellteilung sowie Apoptose, beteiligt sind und in drei Hauptgruppen untergliedert werden können (Schaeffer und Weber, 1999; English und Cobb, 2002):

- ERK1/2-Kaskade (extracellular signal-regulated kinase 1 and 2)
- JNK-Kaskade (c-Jun N-terminal kinase)
- p38-MAPK-Kaskade.

Die Aktivierung der MAPK durch kleine G-Proteine wie Ras und Rac kann sowohl durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) als auch durch die Stimulation von G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) erfolgen. Dabei erfolgt der Signalfuss nicht nur linear vom Rezeptor zum Zellkern, sondern ist in ein komplexes Netzwerk von Signalkaskaden integriert, die miteinander interagieren können (Schulte und Fredholm, 2003a; Fredholm *et al.*, 2001; Schaeffer und Weber, 1999; Goldsmith und Dhanasekaran, 2007; Seger und Krebs, 1995).

Die MAPK-Kaskade setzt sich aus drei Kinasen zusammen, die ihre Substrate jeweils durch Phosphorylierung aktivieren. An der Spitze der MAPK-Kaskade steht die MAP3Kinase, eine Serin/Threonin-Kinase, welche die MAP2Kinase durch Phosphorylierung von Serin- bzw. Threonin-Resten aktiviert. Die MAP2Kinase, eine dualspezifische Kinase, die neben Serin/Threonin auch Tyrosin phosphorylieren kann, aktiviert MAP-Kinasen, die im phosphorylierten Zustand die Kernmembran passieren und durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie CREB, Elk-1, MEF-2, NF- κ B die Genexpression der Zelle und somit z.B. Proliferation, Apoptose etc. beeinflussen können (Schulte und Fredholm, 2003a; Schaeffer und Weber, 1999; English und Cobb, 2002; Goldsmith und Dhanasekaran, 2007).

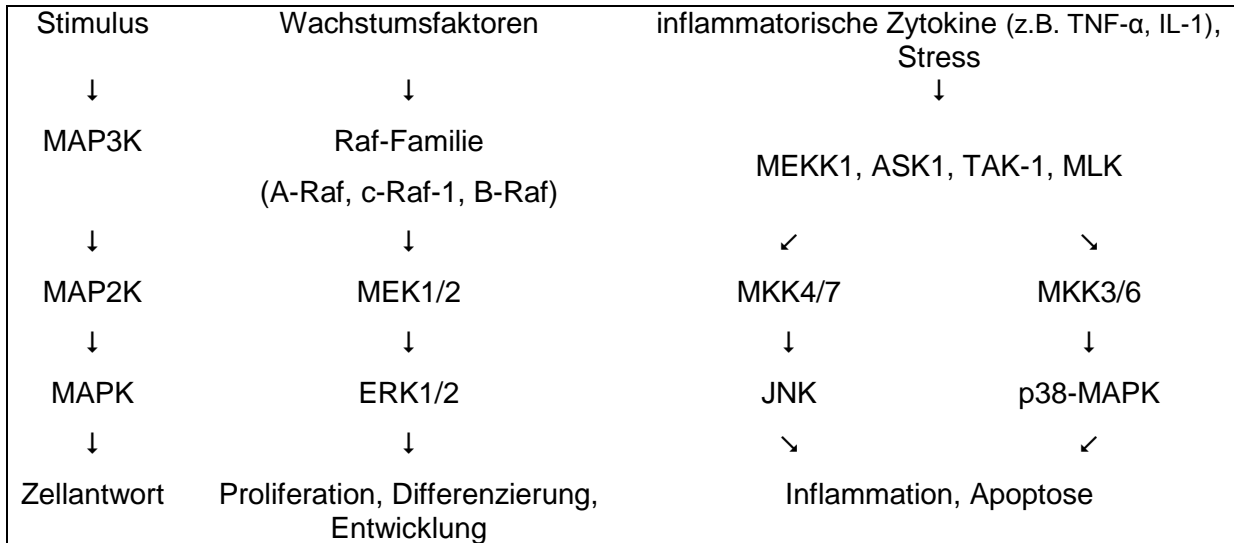


Abbildung 4: MAPK-Kaskade (Schaeffer und Weber, 1999; English und Cobb, 2002; Chang und Karin, 2001)
Der Weg Ras-Raf-MAP2K-MAPK fördert das Überleben der Zelle und inhibiert Apoptose (Bonni *et al.*, 1999).

MAPK-Familien	MAPK-Subtyp	andere Namen
ERK	ERK1 ERK2	MAPK1, p44 MAPK MAPK2, p42 MAPK
JNK	JNK1 JNK2 JNK3	SAPK1 γ SAPK1 α SAPK1 β
p38-MAPK	p38 α p38 β p38 γ p38 δ	SAPK2a, CSBP SAPK2b SAPK3, ERK6 SAPK4

Tabelle 2: Mitglieder der MAPK-Familie [modifizierte Abbildung English und Cobb, 2002]. SAPK = Stress-activated protein kinase, CSBP = CSAID binding protein (CSAID = zytokinsuppressive antiinflammatorische Substanz)

1.5 Zielsetzung

Da Vorarbeiten von Yadav und Klotz (unveröffentlicht) gezeigt haben, dass eine Stimulation von A_{2B} -Adenosinrezeptoren, die in der Regel zu einer Aktivierung der MAPK-Kaskade führt, in der MDA-MB-231 Östrogenrezeptor-negativen Brustkrebszelllinie eine zeitabhängige Inhibition der ERK-1/2-Phosphorylierung bewirkt, sollen im Rahmen dieser Arbeit folgende Punkte geklärt werden:

- 1.) Welcher Mechanismus ist ursächlich für die hohe basale MAPK-Aktivität der MDA-MB-231-Brustkrebszellen?
- 2.) Welche Signaltransduktionsmechanismen führen zur Hemmung der MAPK-Aktivität nach Stimulation des A_{2B} -Adenosinrezeptors?
- 3.) Zeigt eine Stimulation des A_{2B} AR in HaCaT und CHO- A_{2B} -Zellen den gleichen Signalverlauf wie in der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231?
- 4.) Kann in der Östrogenrezeptor-negativen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 durch Stimulation des A_{2B} AR eine Proliferationshemmung erreicht werden?

2 Material

2.1 Zelllinien

MDA-MB-231	Östrogenrezeptor-negative Brustkrebszelllinie	Institut für Zellbiologie und Tumorforschung, Universitätsklinik Essen
HaCaT	humane, immortalisierte Keratinocyten	Rudolf-Virchow-Zentrum, Universität Würzburg
CHO-A _{2B}	A _{2B} AR-transfizierte Chinesische Hamster Ovarzellen	Institut für Pharmakologie, Universität Würzburg

2.2 Zellkulturmedien

DMEM 1g/l Glucose	PAN Biotech
DMEM 4,5g/l Glucose, ohne Glutamin	PAN Biotech
DMEM/ F12	PAN Biotech
DPBS ohne Calcium und Magnesium	PAN Biotech
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma
Geneticin-Sulfat (G418)	Gibco
L-Glutamin	PAN Biotech
Penicillin/ Streptomycin	PAN Biotech
Trypsin/ EDTA	PAN Biotech

2.3 Chemikalien

Acrylamidstammlösung/ Bisacrylamid (30%/0,8%)	Roth
Ammoniumperoxodisulfat	Sigma
ATP	BM
[α - ³² P]ATP	Hartmann
BCA Protein Assay	Pierce Biotechnologies
Benzamidin	Sigma
cAMP	BM
CellTiter96®Aqueous One Solution (MTS)	Promega
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Di-Natriumhydrogenphosphat	Sigma
EDTA	Roth
Ethanol J.T.	Baker
Fuji medical X-Ray Film	Fuji
Glycin	Applichem
GBX Entwickler	Kodak
GBX Fixierer	Kodak

GTP	BM
Kaliumchlorid	Sigma
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Kreatinkinase	Roche
Roti [®] -Load 4x (Laemmli-Puffer)	Roth
Luminol	Applichem
Magermilchpulver	Applichem
Magnesiumchlorid	Merck
Methanol	J.T. Baker
Natriumazid	Applichem
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	Applichem
Natriumfluorid	Merck
Natrium-Laurylsulfat ("SDS")	Applichem
Natriumorthovanadat	Sigma
Natronlauge 1M	Merck
Nonidet-NP-40	Applichem
Kopierfolien	Xerox
p-Cumarsäure	Fluka
peqGOLD Protein-Marker	peqLab
Phosphokreatin	Roche
PMSF	Sigma
PVDF-Membranen (Immobilion P)	Millipore
Rinderserumalbumin (BSA)	Applichem
Salzsäure	Applichem
TEMED	Applichem
Tetra-Natriumdiphosphat-10-hydrat	Merck
Tris	Applichem
TritonX 100	Sigma
Trypsininhibitor (Sojabohne)	Gibco BRL
Tween-20	Applichem
Wasserstoffperoxid 30%ig	Merck
Zinkacetat	Merck

2.3.1 Antikörper

Phospho-p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204) Antibody	Cell Signaling
p44/42 MAP Kinase Antibody	Cell Signaling
goat anti-rabbit-Antikörper	Dianova

2.3.2 Inhibitoren & Stimulantien

NECA	Sigma
PHPNECA	G. Cristalli
CGS21680	RBI
SCH58261	RBI
Genistein	Calbiochem
AG112	Calbiochem
Emodin	Calbiochem
PP2	Calbiochem
Forskolin	Tocris
cAMP-AM	BioLog
8-Br-cAMP	BioLog
Rolipram	BioLog
SpcAMPs	BioLog
RpcAMPs	BioLog
KT-5720	Calbiochem
H89-dihydrochlorid	Calbiochem
Wortmannin	Sigma
Triciribine (Akt-Inhibitor-V)	Calbiochem
U-73122	Calbiochem
U-73343	Calbiochem
BAPTA-AM	Calbiochem
Staurosporine	Sigma
KN-62	Calbiochem
KB-R7943	Calbiochem
FK506 (Tacrolimus)	Sigma
Cyclosporin A	Calbiochem

2.4 Geräte

Alumina-Säulen	Sigma, Biorad
β-Counter	Typ: 1450 MicroBeta Trilux, Wallac
Brutschrank	Typ: BBD 6220, Heraeus
Elektrophorese-Gerät	PS 500XT, Hoefer Scientific Industries
FLUOstar OPTIMA	BMG Labtechnologies
Lichtmikroskop	Typ: Labovert, Leitz
Photometer	Spectrophotometer 1601, Shimadzu
Schüttler	Typ: WT12, Biometra
Sterilbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH
Thermomixer 5436	Eppendorf
UltraTurrax T25	Janke & Kunkel
Vakuumpumpe	Typ: Laboport, KNF Neuberger
Vortex Genie 2	Hoefer Scientific Industries
Wasserbad	Typ: 1004, GFL
Wet Blotter	Typ: Blue Power 200, Serva
Zentrifugen	Typ: Universal 16R, Hettich
	Typ: Eppendorf Zentrifuge 5417, Eppendorf
	Typ: Avanti J25, Beckman
	Typ: LE-70 Ultrazentrifuge, Beckman

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Die adhärennten Zelllinien MDA-MB-231 und HaCaT werden auf Petrischalen im jeweiligen Nährmedium bei 37°C und einem Luft-CO₂(7%)-Gemisch kultiviert, wobei dem DMEM-Standardmedium der MDA-MB-231-Zelllinie, bestehend aus 1 g/l Glucose, stabilem Glutamin, Natrium Pyruvat und 3,7 g/l NaHCO₃, 10% FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt werden. Dem Standardmedium der HaCaT-Zelllinie, welches 4,5 g/l Glucose, Natrium Pyruvat und 3,7 g/l NaHCO₃ enthält, werden 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin hinzugefügt.

Ebenfalls bei 37°C und einem Luft-CO₂(5%)-Gemisch werden die mit einem A_{2B}AR stabil transfizierten CHO-Zellen kultiviert. Das CHO-Standardmedium DMEM/F12, welches L-Glutamin, 15 mM HEPES und 1,2 g/l NaHCO₃ beinhaltet, muss zusätzlich mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin sowie mit 0,2 mg/ml Geneticin-Sulfat (G418) angereichert werden. Das Antibiotikum G418 dient zur Selektion A_{2B}AR tragender Zellen, die neben dem A_{2B}AR-Gen auch ein G418-Resistenz-Gen tragen.

Zwei- bis dreimal pro Woche werden die Zellen passagiert, um sie durch das Entfernen von ausgeschiedenen Stoffwechselprodukten und die Erneuerung der Medien in einem teilungsfähigen Zustand zu erhalten. Hierfür werden die Zellkulturen zweimal mit DPBS gewaschen, durch die Zugabe von Trypsin von der Unterlage gelöst und im Verhältnis variierend von 1:2 bis 1:12 passagiert.

Für die Versuche werden die Zellen im Verhältnis 1:14 in 6-Well-Platten übertragen und drei Tage in einem Diätmedium, bestehend aus dem DMEM-Standardmedium, allerdings ohne FCS-Zusatz, kultiviert.

3.2 Proteinchemische Methoden

3.2.1 Proteinbestimmung

Proteinbestimmung mittels BCA-Methode

Das Prinzip des Tests beruht auf der Reduktion von Cu²⁺, das in alkalischer Lösung einen Komplex mit dem Protein bildet und zu Cu⁺, welches mit Bicinchonininsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex bildet, reduziert wird (Smith *et al.*, 1985; Wiechelman *et al.*, 1988).

Die Proben, deren Proteingehalt bestimmt werden soll, werden 1:10 verdünnt. Je 25 µl der Verdünnung werden auf Mikrotiterplatten aufgetragen. Anschließend werden 200 µl Farbreagenz zugesetzt und die Platten 20-30 Minuten in den 37°C warmen Brutschrank gestellt. Danach wird die Extinktion bei $\lambda = 562$ nm im ELISA-Reader bestimmt. Die Proteinkonzentration ergibt sich aus dem Vergleich der Proben mit einer BSA-Standardkurve, wofür nach gleichem Prinzip Konzentrationen zwischen 1500 µg/ml und 31 µg/ml aufgetragen werden. Der Proteingehalt von Probe und BSA-Standard wird als Mittelwert aus jeweils drei Wells bestimmt. Entsprechend des Proteingehalts können die Proben mit Laemmli-Puffer so verdünnt werden, dass jeweils gleiche Proteinmengen auf das Elektrophorese-Gel aufgetragen werden.

Farbreagenz: Fa. Pierce Biotechnologies 1:50-Verdünnung Reagenz A + Reagenz B

Proteinbestimmung nach Bradford

Eine weitere Möglichkeit der Proteinbestimmung, die in dieser Arbeit eingesetzt wird, ist die photometrische Bestimmung mit der Biorad Protein-Assay-Reagenz nach Bradford (1976). Diese Methode beruht darauf, dass es nach Bindung von Coomassie Blue G 250 an Proteine zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm kommt. Die Extinktion wird nach Zugabe von 1 ml einer 1:5 mit bidestilliertem H₂O verdünnten Reagenz bei 595 nm gemessen. Die Proteinkonzentration wird anhand einer mit BSA erstellten Eichkurve ermittelt.

3.2.2 Western Blot

Der Western Blot ist ein Verfahren zum spezifischen Nachweis von Proteinen durch Antikörper. In einem ersten Schritt erfolgt die Proteinauftrennung beispielsweise durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, anschließend werden die aufgetrennten Proteine auf eine Membran transferiert, welche durch Antikörper-Reaktionen visualisiert werden. Alle in dieser Arbeit dargestellten Western Blots zeigen jeweils eine repräsentative Abbildung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Proteinaufbereitung

Die drei Tage im FCS-freien Medium inkubierten Zellen werden mit verschiedenen Substanzen stimuliert - mit oder ohne Vorinkubation mit einem Inhibitor (siehe unten). Die eingesetzten Konzentrationen der Inhibitoren entsprechen, soweit nicht anders angegeben, der 10-fachen Konzentration der vom Hersteller angegebenen IC₅₀-Werte. Soweit nicht anders angegeben, erfolgt die Stimulation mit 10 µM des unselektiven Adenosinagonisten NECA. Die Reaktion wird nach 0, 5, 10, 15 und 30 Minuten gestoppt, indem die Zellen auf Eis gelegt, mit eiskaltem Phosphatpuffer (PBS) gewaschen und durch Zugabe von 400 µl Lysepuffer lysiert werden. Das Zelllysate wird bei 4°C und 14000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, um unlösliches Material zu entfernen. Jeweils 150 µl des Überstandes werden mit 50 µl Laemmli-Puffer versetzt, um die Proteine zu denaturieren.

10x PBS	26,8 mM KCl 1,4 M NaCl 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ 1,4 mM KH ₂ PO ₄
10x Phosphataseinhibitormix	500 mM NaF 50 mM Na ₄ P ₂ O ₇ 1 mM Na ₃ VO ₄ 0,02% NaN ₃
2x TSE	100 mM Tris pH 7,4 600 mM NaCl 10 mM EDTA 0,02% NaN ₃
100x Proteaseinhibitormix	76,63 mM Benzamidin 4 mg/ml Trypsininhibitor (7000 U/mg) jeweils in 50 mM Tris pH 7,4
Lysispuffer	20 ml 2x TSE 4 ml 10x Phosphataseinhibitormix 1% Triton-X 100 1 mM PMSF in 100% Ethanol (frisch zugeben) 1 mM Proteaseinhibitormix

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese ist ein Verfahren, das zur Auftrennung von Proteinfractionen nach ihrem Molekulargewicht eingesetzt wird. Das Detergens SDS, das negative Ladungen besitzt und die Proteine denaturiert, wird von vielen Proteinen in einem konstanten Verhältnis von 1,4 g SDS/ g Protein gebunden, wodurch die Netto-Ladung der Proteine maskiert wird und die Auftrennung des Proteingemisches einzig unter dem Aspekt der molaren Massen erfolgen kann. Hierfür werden die Proteinproben auf ein Gel aufgetragen, wobei im Sammelgel die Proteinmenge gebündelt wird, bevor im Trenngel bei einer konstanten Stromstärke von 70 mA die Auftrennung der Proteinfractionen nach ihrem Molekulargewicht erfolgt.

4x upper buffer (Puffer für Sammelgel)	0,5 M Tris pH 6,8 0,4% SDS
4x lower buffer (Puffer für Trenngel)	1,5 M Tris pH 8,8 0,4% SDS
Sammelgel (12 ml)	7,5 ml destilliertes H ₂ O 3 ml 4x upper buffer 1,5 ml Acrylamid/ Bisacrylamid (30%/0,8%) 12 µl TEMED 120 µl APS (10%)
Trenngel (30 ml)	10,5 ml destilliertes H ₂ O 7,5 ml 4x lower buffer 12 ml Acrylamid/ Bisacrylamid (30%/0,8%) 15 µl TEMED 195 µl APS (10%)
10x SDS-Laufpuffer	250 mM Tris 1,92 M Glycin 1% SDS

Elektrophoretischer Transfer

Um die Proteine den Antikörpern zugänglich zu machen und sie zu immobilisieren, werden sie im Wet-Blot-Verfahren bei einer Spannung von 100V und einer Dauer

von 75 Minuten auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran transferiert. Hierfür wird das Gel in einem Sandwich aus zwei Lagen Blotting-Papier, PVDF-Membran, Gel sowie zwei weiteren Lagen Blotting-Papier eingebettet, wobei das Sandwich so angebracht werden muss, dass die Membran zur Anode und das Gel zur Kathode ausgerichtet sind, damit die negativ geladenen Proteine vom Gel auf die Membran wandern können. Nach dem Transfer wird die Membran 90-120 Minuten in Blocking-Puffer gelegt, um überschüssige Bindungsstellen der Membran zu saturieren und unspezifische Bindungen der Nachweisreagenzien zu verhindern. Danach wird die Membran mehrfach mit PBS gewaschen und über Nacht bei 4°C auf dem Schwenktisch mit phospho-p44/42-Antikörper in einer 1:1000-Verdünnung im Antikörper-Puffer inkubiert. Am nächsten Tag wird die Membran mehrfach mit TPBS gewaschen, bevor sie 60 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler mit einem 1:10000 verdünnten Zweitantikörper (goat anti-rabbit HPR-gekoppelter Antikörper) inkubiert wird.

Transfer-Puffer	20 mM Tris 150 mM Glycin 20% Methanol
Blocking-Puffer	10 mM Tris pH 7,4 100 mM NaCl 0,1% Tween-20 5% Milchpulver
Waschpuffer (TPBS)	1x PBS 0,1% Tween-20
Antikörper-Puffer	50 mM Tris pH 7,6 150 mM NaCl 0,25% BSA 0,2% Nonidet-NP-40

Chemilumineszenz

Nach der Inkubation mit dem Zweitantikörper wird die Membran nochmals gewaschen. Die Membran wird in der Dunkelkammer in eine Visualisierungslösung, bestehend aus Luminol und Wasserstoffperoxid, gelegt. Die Peroxidase des zweiten Antikörpers oxidiert Luminol, wodurch Energie in Form von Licht freigesetzt wird.

Wenn man die Membran zwischen zwei transparente Kunststofffolien und einem Röntgenfilm darüber in eine Filmkassette legt, erzeugt die Lichtreaktion eine Schwarzfärbung des Röntgenfilms an der Stelle des durch den Erstantikörper markierten Proteins. Zur Visualisierung der Proteinbanden auf dem Röntgenfilm wird dieser zuerst in eine 1:5 verdünnte Entwickler-Lösung gelegt, anschließend kurz in ein Wasserbad gelegt, danach in eine 1:5 verdünnte Fixierer-Lösung gegeben und schließlich nochmals mit Wasser abgespült.

Die Chemilumineszenzreaktion ermöglicht die Exposition mehrerer Filme nacheinander, wobei zu Beginn Belichtungszeiten von 15-30 Sekunden ausreichend sind, die sich durch die Abnahme der Lichtemission im zeitlichen Verlauf auf bis zu 30 Minuten verlängern können.

Luminollösung	90 mM p-Cumarsäure
	250 mM Luminol
	100 mM Tris pH 8,3
	kurz vor dem Versuch: 30%ige H ₂ O ₂ -Lösung im Verhältnis 1:3000 zugeben

„Strippen“ der PVDF-Membran

Nach der Durchführung eines Western Blots können die eingesetzten Antikörper nahezu vollständig von der PVDF-Membran entfernt werden, ohne dabei die geblotteten Proteine zu destruieren damit anschließend durch Inkubation mit einem anderen Antikörper beispielsweise die Menge an aufgetragenem Protein bestimmt werden kann.

Hierfür wird die Membran in Methanol reaktiviert und anschließend 30-45 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler in Stripping-Puffer inkubiert, um die Antikörper des ersten Blots zu zerstören. Danach wird die Membran gründlich mit TPBS gewaschen, bevor sie schließlich für ca. 90-120 Minuten in Blocking-Puffer gelegt wird. Die restlichen Schritte entsprechen denen des Western Blots.

Stripping-Puffer	100 mM Glycin pH 2,5
	0,1% SDS

3.2.3 Radioligandenbindung

Membranpräparation

Die auf Petrischalen mit 14 cm Ø konfluent gewachsenen MDA-MB-231-Zellen werden zweimal mit CMF-PBS gewaschen, in 5 ml 5/2 Puffer auf Eis gelegt, mit einem Gummischaber von der Petrischale abgelöst und zweimal 15 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit mit dem Ultra-Turrax lysiert. Durch die 10-minütige Zentrifugation (Beckmann JA 17 Rotor) der Proben bei 3.200 rpm bei 4°C werden grobe Zellbestandteile abgetrennt. Anschließend wird der Überstand vorsichtig in Ultrazentrifugenröhrchen dekantiert und bei 37000 rpm für 40 Minuten bei 4°C ultrazentrifugiert (Beckmann Ti70 Rotor), wodurch Cytosol und Zellmembranen getrennt werden. Das Membranpellet wird in ca. 200 µl Tris-Puffer resuspendiert und in einer Spritze homogenisiert. Für Bindungsstudien können die Membranen nach der Präparation aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert werden.

5/2 Puffer	5 mM Tris 2 mM EDTA pH 7,4
Tris-Puffer	50 mM Tris pH 7,4

Proteinbestimmung nach Bradford

Siehe 3.2.1

Bindungsassay

Die Radioligandenbindung wurde in der vorliegenden Arbeit zur Bestimmung der Rezeptorzahl eingesetzt.

Ansatz:

50 µl	Puffer (TM10 + 0,1% BSA pH 7,4) für TB (totale Bindung)
	NECA Ec.: 300 µM für UB (unspezifische Bindung)
50 µl	Puffer
50 µl	[³ H] ZM 241385 Ec.: 20 nM
50 µl	Membranprotein (80 µg)

Im Bindungsexperiment werden der A₂AR-selektive Radioligand [³H]ZM241385 in einer Endkonzentration von 20 nM und 80 µg MDA-MB-231 Membranprotein eingesetzt. Das Gesamtvolumen beträgt 200 µl. Außerdem müssen der Membran 5 µl 10%ige Adenosindesaminase (ADA) pro ml Membranansatz zugefügt werden.

Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung (UB) wird der Agonist NECA in einer Endkonzentration von 300 µM verwendet. Diese Überschusskonzentration führt dazu, dass der nicht radioaktive Rezeptorligand NECA vor allem die spezifischen Bindungsstellen besetzt, während der Radioligand [³H]ZM241385 in erster Linie die unspezifischen Bindungsstellen besetzt. Für die Bestimmung der totalen Bindung wird NECA durch den Versuchspuffer TM10 + 0,1% BSA pH 7,4 ersetzt.

Die Ansätze werden für 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend über einen in kaltem Puffer eingeweichten Glasfaserfilter (GF/B Millipore) abgesaugt. Jeder Filter wird, nachdem er zweimal mit 3 ml Puffer gewaschen worden ist, in ein Zählgefäß überführt, welches mit 4 ml Szintillatorflüssigkeit gefüllt wird. Nach 3-stündiger Equilibration wird die gebundene Radioaktivität im β-Counter bestimmt.

TM 10 Puffer 50 mM Tris pH 7,4
 10 mM MgCl₂

3.2.4 Adenylylcyclase-Assay

Membranpräparation

Für diesen Funktionstest müssen die Membranen am Tag des Assays frisch präpariert werden. Die auf 14 cm Ø Petrischalen konfluent gewachsenen MDA-MB-231-Zellen werden auf Eis zweimal mit CMF-PBS gewaschen, mit 5 ml 5/2 Puffer versetzt und anschließend mit einem Gummischaber abgelöst, bevor sie zweimal 15 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit mit Hilfe des Ultra-Turrax zerkleinert werden. Anschließend erfolgt eine 25-minütige Ultrazentrifugation bei 27000 rpm und 4°C. Danach werden die Pellets in 50 mM Tris resuspendiert, im Glaspotter homogenisiert und mit 10%-iger Adenosindesaminase versetzt.

Stimulation der Adenylylcyclase**Ansatz:**

10 µl	H ₂ O = basal		
	NECA Ec.: 100 µM = Agonist-Stimulation		
10 µl	H ₂ O		
30 µl	Membranprotein (40-80 µg in Tris-Puffer suspendiert)		
50 µl	2x REA-Mix	400 µl	5x REA-Mix
		5,9 mg/ml	Phosphokreatin
		0,8 mg/ml	Kreatinkinase
	[α- ³² P]ATP ca. 200.000 Counts/ Probe mit H ₂ O ad 1 ml		

Der Reaktionsansatz wird nach gründlichem Mischen 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wird die Reaktion gestoppt indem die Proben auf Eis gestellt werden. Der Zugabe von 400 µl Zinkacetat (125 mM) und 500 µl Na₂CO₃ (144 mM) folgt erneut eine 10-minütige Inkubation. Hierbei kommt es zur Bildung eines Zn₂CO₃-Niederschlags, welcher sich durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 14000 rpm absetzt. Anschließend werden 800 µl des Überstandes auf Alumina-Säulen, welche zuvor mit zweimal 5 ml 100 mM Tris pH7,4 äquilibriert worden sind, aufgetragen. Nach der Elution mit zweimal 2 ml 100 mM Tris pH7,4 werden die Proben 5 Minuten im β-Counter (Wallac, 1450 MicroBeta Trilex) gezählt.

5x REA-Mix	42,5 ml H ₂ O
	25 ml 250 mM Tris pH 7,4
	5 ml 0,5 mM cAMP
	10 ml 1% BSA
	5 ml 50 µM GTP
	5 ml 0,5 mM ATP
	5 ml 5 mM MgCl ₂
	2,5 ml 2,5 mM RO-201724

3.3 MTS-Proliferationstest

Für den kolorimetrischen MTS-Proliferationstest werden die Zellen in eine 96-Well-Platte übertragen, wobei je Well 3.000 Zellen in 100 µl Standard- bzw. Hungermedium ausgesät werden.

Die Zellzahl wird mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Hierzu legt man ein leicht angefeuchtetes Deckglas auf die Zählkammer, bis die sog. Newton-Ringe sichtbar werden. Anschließend wird ein Tropfen gut durchmischter Zellsuspension an den Rand der Kammer gehalten und durch Kapillarkräfte unter das Deckglas gesaugt. Um die Zellzahl pro ml zu ermitteln, wird der Mittelwert aus vier ausgezählten Quadraten gebildet und mit 10^4 multipliziert.

Nach 1½-tägigem Anwachsen werden die Zellen mit verschiedenen Substanzen inkubiert. Die Messung der Proliferation erfolgt zu verschiedenen Zeitpunkten (siehe 4.4) durch Zugabe von 20 µl CellTiter96[®]AQ_{ueous} One Solution (MTS) pro Well 30 Minuten vor Messung der Absorption.

MTS wird in metabolisch aktiven Zellen durch Dehydrogenasen zu einer photometrisch quantifizierbaren Formazanverbindung reduziert, die von einem Mikrotiterplatten-Lesegerät bei einer Wellenlänge von 490 nm erfasst wird und in einem direkt proportionalen Verhältnis zur Anzahl lebender Zellen steht.

4 Ergebnisse

4.1 MDA-MB-231-Östrogenrezeptor-negative Brustkrebszelllinie

4.1.1 Beeinflussung der ERK-1/2-Phosphorylierung durch den Adenosinrezeptor-Agonisten NECA

Die Östrogenrezeptor-negative Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 zeigt eine starke Expression des A_{2B}AR-Subtyps, welcher außerdem der einzige von diesen Zellen exprimierte AR ist (Panjehpour *et al.*, 2005).

Die Stimulation des A_{2B}AR mit 10 µM des unselektiven Agonisten NECA führt, ausgehend von einer hohen basalen Aktivität, zu einer zeitabhängigen Inhibition der ERK-1/2-Phosphorylierung. Interessanterweise kann durch eine 10-minütige Vorbehandlung der Zellen mit 10% FCS keine weitere Steigerung der basalen MAPK-Aktivität erzielt werden. Jedoch kommt es auch nach der Vorstimulation der Brustkrebszellen mit 10% FCS zu einer zeitabhängigen Inhibition der ERK-1/2-Phosphorylierung unter der Stimulation mit NECA (Abbildung 5). Als Ladekontrolle wird der ERK-1/2-(p44/42 MAPK-) Antikörper eingesetzt, der sowohl phosphoryliertes als auch unphosphoryliertes ERK-1/2 detektiert.

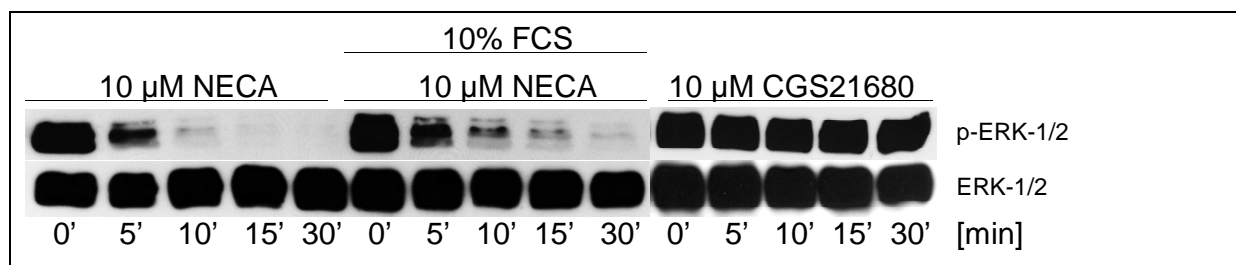


Abbildung 5: Agonisteffekt auf die ERK-1/2-Phosphorylierung ohne bzw. mit vorheriger FCS-Stimulation

Die fehlende Hemmung der MAPK-Aktivität nach der Stimulation der Brustkrebszellen mit dem AR-Agonisten CGS21680 (Abbildung 5), welcher in der eingesetzten Konzentration von 10 µM, mit Ausnahme des A_{2B}AR, an alle AR-Subtypen bindet (Fredholm *et al.*, 2001), sowie die vollständige Inhibition der NECA-induzierten Hemmung der ERK-1/2-Phosphorylierung nach der Vorinkubation mit dem A₁-/A_{2B}AR-Antagonisten DPCPX (Yadav und Klotz, unveröffentlicht) bestätigt die alleinige Vermittlung des beobachteten Effekts durch den A_{2B}AR-Subtyp in dieser Zelllinie.

4.1.2 Untersuchung der basalen ERK-1/2-Phosphorylierung in MDA-MB-231

4.1.2.1 Inhibition von Tyrosinkinase-Rezeptoren

Zur Eruierung der hohen basalen MAPK-Aktivität in MDA-MB-231 Brustkrebszellen, die durch die Stimulation von Wachstumsfaktor-Rezeptoren mittels FCS oder EGF nicht weiter gesteigert werden kann, sind die Zellen vor der Stimulation des A_{2B}AR mit verschiedenen Tyrosinkinase-Inhibitoren inkubiert worden.

Der unspezifische Tyrosinkinase-Inhibitor Genistein wird dabei in Konzentrationen von 10 bzw. 100 µM (Klein und McCarthy, 1997) für 4 und 16 Stunden inkubiert, bevor die Östrogenrezeptor-negativen Brustkrebszellen für 0, 5, 10, 15, 30 und 60 Minuten mit 10 µM NECA stimuliert werden. Wie Abbildung 6 zu entnehmen ist, zeigt Genistein weder eine Inhibition der basalen ERK-1/2-Phosphorylierung noch eine Beeinflussung der NECA-induzierten Hemmung der ERK-1/2-Phosphorylierung.

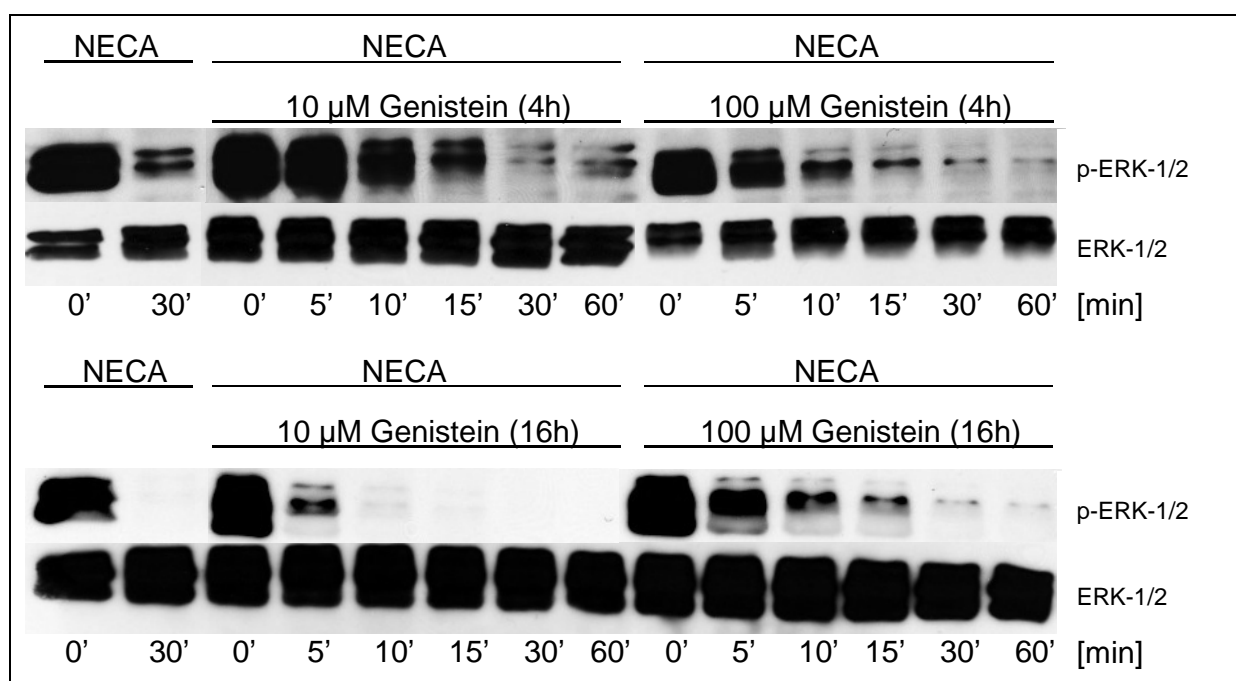


Abbildung 6: Auswirkungen des unspezifischen Tyrosinkinase-Inhibitors Genistein auf die MAPK-Aktivität. Die MDA-MB-231-Brustkrebszellen wurden 4 Stunden bzw. 16 Stunden mit 10 oder 100 µM Genistein inkubiert und dann für die angegebene Zeit mit 10 µM NECA stimuliert.

Anschließend ist der Einfluss des spezifischen EGFR-Inhibitors AG112 untersucht worden. Hierfür werden die Zellen mit 1 µM bzw. 10 µM des Inhibitors AG112 versetzt, bevor sie 60 Minuten später wieder im Zeitintervall von 0, 5, 10, 15 und 30 Minuten mit NECA stimuliert werden. Abbildung 7 zeigt, dass AG112 in den eingesetzten Konzentrationen von 1 µM und 10 µM weder das basale p-ERK-Signal noch die NECA-induzierte MAPK-Hemmung beeinflusst.

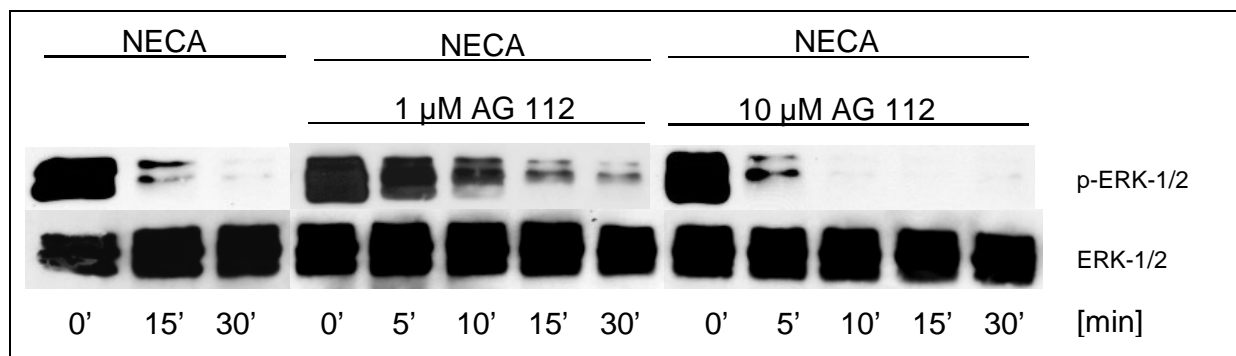


Abbildung 7: Zeitverlauf der NECA-vermittelten Hemmung der ERK-1/2-Phosphorylierung nach der Inkubation mit 1 μ M bzw. 10 μ M des EGFR-Inhibitors AG112

Abbildung 8 zeigt den Einfluss verschiedener Konzentrationen des EGFR-Inhibitors AG 112 auf die basale ERK-Aktivität in MDA-MB-231-Zellen, wobei erst durch eine Konzentration von 100 μ M AG112 eine vollständige Hemmung der basalen MAPK-Aktivität erreicht werden kann. Diese liegt jedoch deutlich höher als die vom Hersteller angegebene $IC_{50} = 125$ nM.

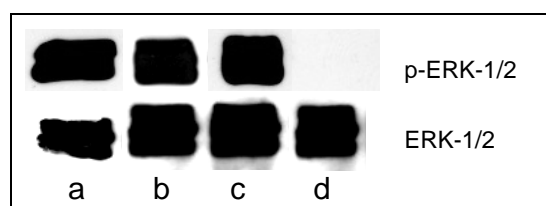


Abbildung 8: Vergleich des basalen p-ERK-Signals nach 60-minütiger Behandlung der MDA-MB-231-Zellen mit AG 112
a unbehandelte MDA-MB-231-Zellen
b 1 μ M AG 112
c 10 μ M AG 112
d 100 μ M AG 112.

In einem weiteren Versuch ist der Her2-Rezeptor, ein Subtyp des EGFR, sowie die src-Kinase, eine intrazelluläre Tyrosinkinase, inhibiert worden. Nach 30-minütiger Inkubation mit 30 μ M des Her2-Inhibitors Emodin bzw. 10 μ M des src-Kinase-Inhibitors PP2 werden die MDA-MB-231 Zellen für 0, 5, 10, 15 und 30 Minuten mit NECA stimuliert. Die Bande zum Zeitpunkt 0 zeigt, dass sowohl Emodin als auch PP2 eine Hemmung der hohen basalen MAPK-Aktivität in dieser Brustkrebszelllinie bewirken (Abbildung 9).

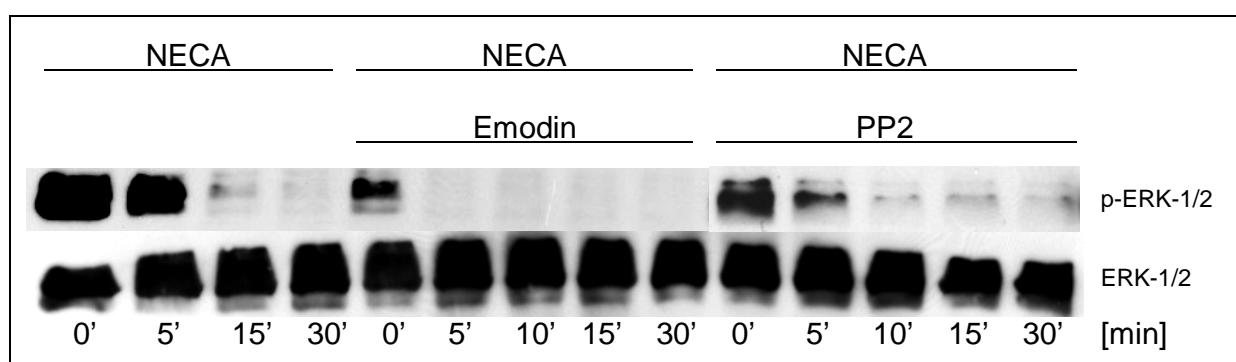


Abbildung 9: Inhibition der basalen ERK-1/2-Phosphorylierung durch die Behandlung der Zellen mit dem HER2-Inhibitor Emodin bzw. dem src-Kinase-Inhibitor PP2

4.1.2.2 Untersuchung eines möglichen Synergismus von src-Kinase- und Her2-Inhibition

Ausgehend von den Resultaten, die mit 30 μM Emodin bzw. 10 μM PP2 erzielt werden konnten, sind die Östrogenrezeptor-negativen MDA-MB-231 Zellen jeweils 30 Minuten mit unterschiedlichen Konzentrationen des Her2-Inhibitors Emodin bzw. des src-Kinase-Inhibitors PP2 sowie einer Kombination beider Substanzen inkubiert worden, um einerseits die niedrigsten wirksamen Konzentrationen von Emodin bzw. PP2 und andererseits einen denkbaren Synergismus der beiden Inhibitoren festzustellen. Neben einer unbehandelten Kontrolle (K) werden die Zellen mit 10, 30 und 100 μM Emodin bzw. 3, 10 und 30 μM PP2 sowie einer Kombination aus 30 μM Emodin und 10 μM PP2 bzw. 10 μM Emodin und 3 μM PP2 versetzt. Wie aus Abbildung 10 zu ersehen ist, führen 30 und 100 μM Emodin, 10 und 30 μM PP2 sowie die Kombination von 30 μM Emodin und 10 μM PP2 zu einer vollständigen Hemmung des p-ERK-1/2-Signals, wohingegen 10 μM Emodin sowie 3 μM PP2 alleine nur einen minimalen Einfluss auf die basale MAPK-Aktivität zeigen. Die Kombination aus 10 μM Emodin und 3 μM PP2 zeigt allenfalls eine schwach ausgeprägte Hemmung der basalen ERK-1/2-Phosphorylierung.

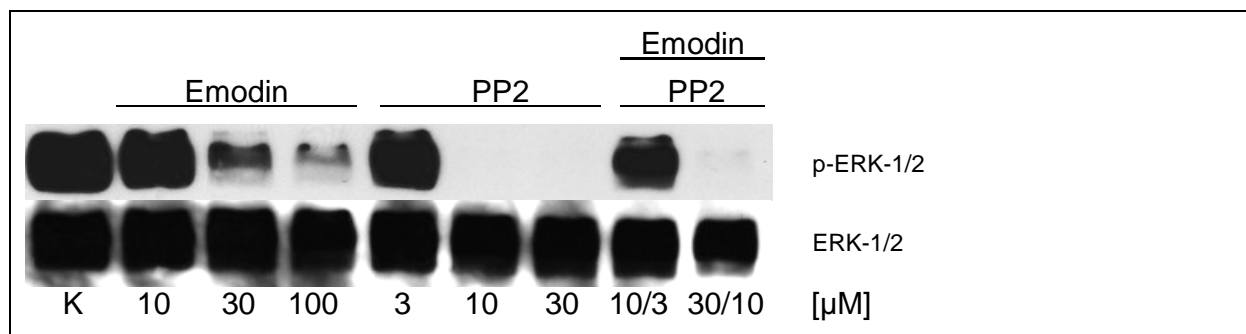


Abbildung 10: Untersuchung der Inhibition des basalen p-ERK-1/2 Signals durch verschiedene Konzentrationen des Her2-Inhibitors Emodin bzw. des src-Kinase-Inhibitors (30 Minuten): Die Kombination aus 10 μM PP2 und 30 μM Emodin führt zur vollständigen Inhibition des p-ERK-Signals, während die Kombination aus 3 μM PP2 und 10 μM Emodin nur eine leichte Hemmung der basalen MAPK-Aktivität induziert.

4.1.3 cAMP-abhängige Signaltransduktion

Da der $A_{2B}AR$ der Gruppe der G_S -gekoppelten Rezeptoren angehört, welche über eine Aktivierung der AC zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration führen, ist ein möglicher Einfluss des cAMP auf die Hemmung der ERK-1/2-Phosphorylierung geprüft worden.

Durch die Stimulation der Zellen mit 10 μM Forskolin, das als Aktivator der AC die Produktion von cAMP fördert, wird ähnlich der Stimulation mit 10 μM NECA eine zeitabhängige Inhibition des p-ERK-1/2-Signals erzielt (Abbildung 11).

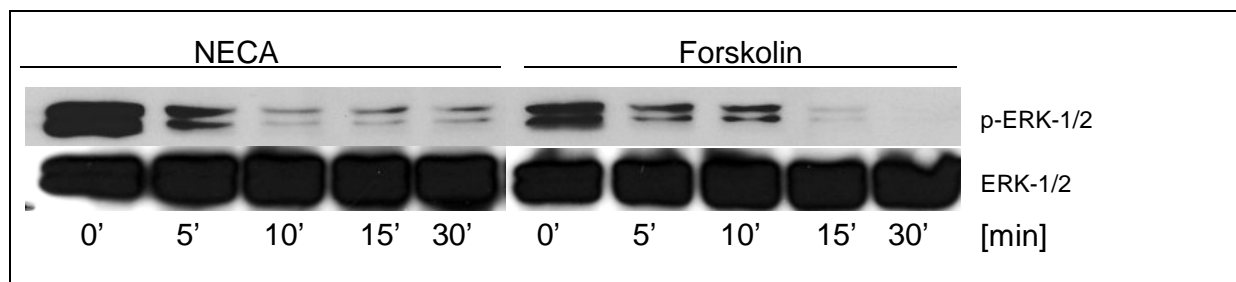


Abbildung 11: Vergleich der NECA- bzw. Forskolin-induzierten Hemmung der ERK-1/2-Phosphorylierung

Um eine mögliche Beteiligung von cAMP an der Signaltransduktion des A_{2B} AR zu verifizieren, sind die Zellen mit 100 μ M des membranpermeablen cAMP-AM behandelt worden. Dieses cAMP-Derivat wird intrazellulär zu cAMP hydrolysiert, was dann rasch durch die Phosphodiesterase inaktiviert wird. Die alleinige Behandlung der Zellen mit cAMP-AM führt zu keiner Inhibition der MAPK-Aktivität. Geht der Stimulation der Zellen mit 100 μ M cAMP-AM allerdings eine 10-minütige Inkubation mit 10 μ M Rolipram, das die PDE4, eine cAMP-spezifische Phosphodiesterase inhibiert voraus, so kommt es ebenfalls zur zeitabhängigen Hemmung des p-ERK-1/2-Signals, weshalb man von einer Beteiligung von cAMP an der Signaltransduktion des A_{2B} AR ausgehen kann (MacKenzie und Houslay, 2000). Den gleichen Effekt auf die MAPK-Aktivität, allerdings schwächer ausgeprägt, zeigt die alleinige Behandlung der MDA-MB-231-Zellen mit 10 μ M des PDE4-Inhibitors Rolipram sowie mit dem metabolisch stabilen, zellpermeablen cAMP-Analogen 8-Br-cAMP in einer Konzentration von 500 μ M (Abbildung 12).

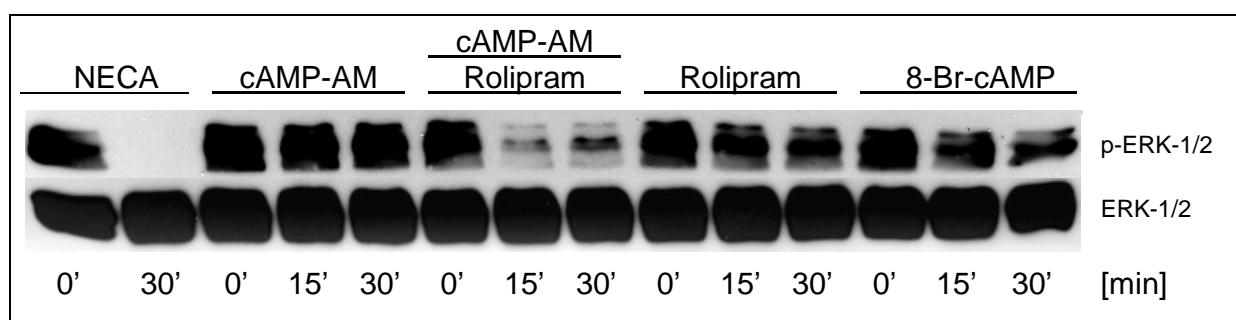


Abbildung 12: Die intrazelluläre cAMP-Konzentration beeinflusst die MAPK-Aktivität in MDA-MB-231-Brustkrebszellen.

Angesichts der Beteiligung des cAMP an der A_{2B} -vermittelten Inhibition der MAPK-Aktivität ist der Einfluss von PKA und Epac, die beide durch cAMP aktivierbar sind, überprüft worden.

Um den Stellenwert der PKA, die über eine Rap-1-Aktivierung zu einer Inhibition der Raf-1-ERK-Kaskade führt, zu explorieren, werden MDA-MB-231 Zellen mit den

spezifischen PKA-Inhibitoren H-89 und KT5720 behandelt. Die Zellen werden 60 Minuten mit 1 μM H-89 bzw. 18 Stunden mit 10 μM KT5720 inkubiert, bevor sie zu den Zeitpunkten 0, 5, 10, 15 und 30 Minuten mit NECA stimuliert werden (Chijiwa *et al.*, 1990; Gadbois *et al.*, 1992). Jedoch persistiert die Hemmung der ERK-1/2-Phosphorylierung auch in Anwesenheit dieser beiden PKA-Inhibitoren (Abbildung 13).

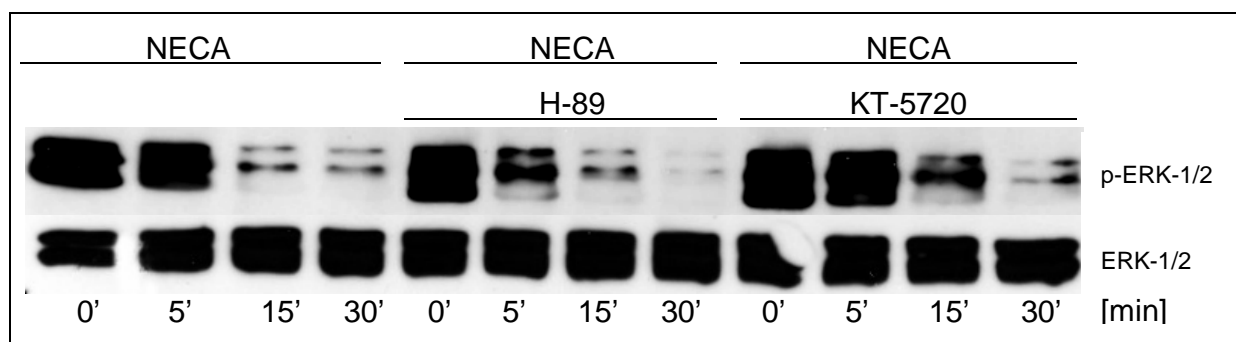


Abbildung 13: NECA-induzierte Inhibition der ERK-Phosphorylierung nach Inhibition der PKA mittels H-89 und KT-5720

Außerdem werden die Zellen 30 Minuten mit dem PKA-Aktivator Sp-cAMPS (300 μM) sowie mit dem PKA-Inhibitor Rp-cAMPS (300 μM) inkubiert (Pérez-Vallina *et al.*, 1997). Danach erfolgt die Stimulation der Zellen mit 10 μM NECA. Als Negativkontrolle dienen mit DMSO, dem Lösungsmittel von NECA, behandelte Zellen.

Eine Vorbehandlung der Zellen mit dem PKA-Aktivator Sp-cAMPS führt zu einer gleichmäßigen Inhibition des p-ERK-1/2-Signals, unabhängig davon, ob die Zellen mit NECA oder DMSO behandelt werden.

Nach der Inkubation der Zellen mit dem PKA-Inhibitor Rp-cAMPS hingegen bleibt bei den mit DMSO behandelten Kontrollzellen das p-ERK-1/2-Signal im zeitlichen Verlauf unverändert, wohingegen eine 30-minütige Stimulation mit dem Agonisten NECA wieder zu einer Hemmung der MAPK-Aktivität führt (Abbildung 14).

Daraus ergibt sich, dass durch die Aktivierung der PKA eine Hemmung der ERK-1/2-Phosphorylierung erzielt wird, andererseits aber eine der A_{2B} AR-Stimulation vorausgehende Inhibition der PKA die zeitabhängige A_{2B} AR-vermittelte MAPK-Hemmung nicht inhibiert.

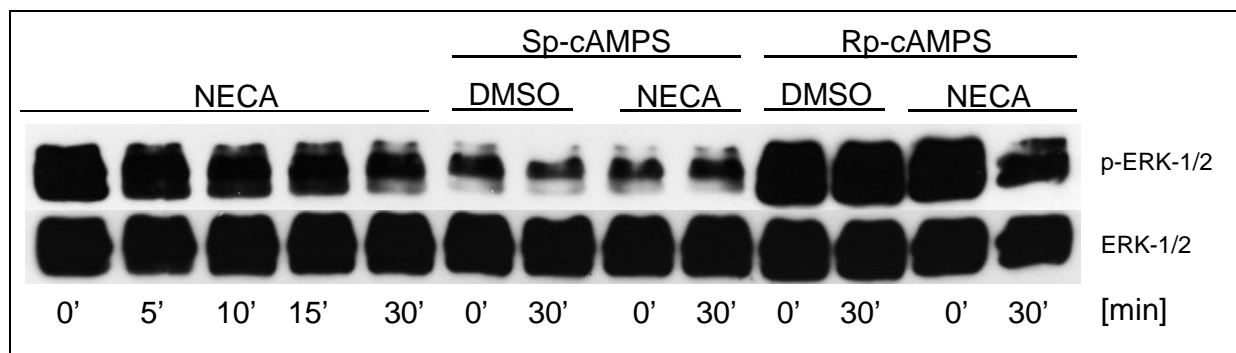


Abbildung 14: Einfluss des PKA-Aktivators Sp-cAMPS sowie des PKA-Inhibitors Rp-cAMPS auf die MAPK-Aktivität nach Stimulation mit 10% DMSO oder mit 10 μ M NECA

Je nach Zelllinie kann cAMP via EPAC die ERK-1/2-Phosphorylierung aktivieren oder inhibieren, weshalb MDA-MB-231 Zellen mit dem cAMP-Analogen 8-CPT-2'-O-Me-cAMP stimuliert werden, welches EPAC selektiv aktiviert. Jedoch zeigt sich in diesem Experiment keine Veränderung des basalen MAPK-Signals im zeitlichen Verlauf, weshalb in dieser Brustkrebszelllinie eine Beteiligung von EPAC an der Signaltransduktion des $A_{2B}AR$ ausgeschlossen werden kann (Yadav und Klotz, unveröffentlicht).

Des Weiteren ist bekannt, dass die PI3K, die sowohl durch cAMP als auch durch RTKs aktiviert werden kann, über eine Aktivierung der PKB eine Inhibition der Raf-1-ERK-Kaskade vermitteln kann (Schulte und Fredholm, 2003b; Lowes *et al.*, 2002; Cass *et al.*, 1999). Deshalb werden in einem weiteren Experiment die Zellen vor der Stimulation des $A_{2B}AR$ via NECA 60 Minuten mit 100 nM des PI3K-Inhibitors Wortmannin bzw. 20 μ M des PKB-Inhibitors Akt-Inhibitor-V (Triciribine) inkubiert (Elia *et al.*, 2005). Beide Inhibitoren zeigen jedoch keinen Einfluss auf die NECA-induzierte Hemmung des p-ERK-1/2 Signals (Abbildung 15).

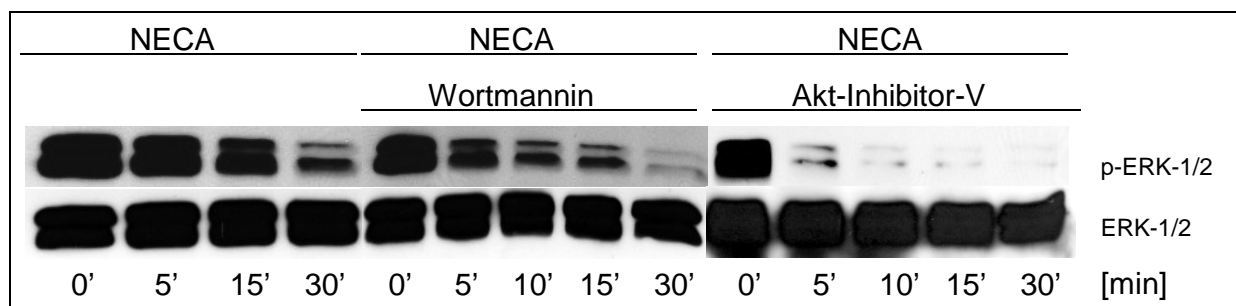


Abbildung 15: Einfluss des PI3K-Inhibitors Wortmannin sowie des PKB-Inhibitors Akt-Inhibitor-V auf die NECA-vermittelte Hemmung der ERK-Aktivität

4.1.4 G_q-gekoppelte Signaltransduktion

Da bereits aus früheren Studien Hinweise auf eine G_q-gekoppelte Signaltransduktion des A_{2B}AR vorliegen (Panjehpour *et al.*, 2005), ist dieser Signalweg näher betrachtet worden.

Eine 30-minütige Vorbehandlung der Zellen mit dem PLC-Inhibitor U-73122 in einer Konzentration von 10 µM zeigt bei einer nachfolgenden Stimulation des A_{2B}AR eine Inhibition der NECA-induzierten Hemmung der MAPK-Aktivität. Als Negativkontrolle wird U-73343, das inaktive Analogon des PLC-Inhibitors, ebenfalls in einer Konzentration von 10 µM eingesetzt, welches die A_{2B}-vermittelte Inhibition der ERK-1/2-Phosphorylierung nicht beeinflusst (Abbildung 16).

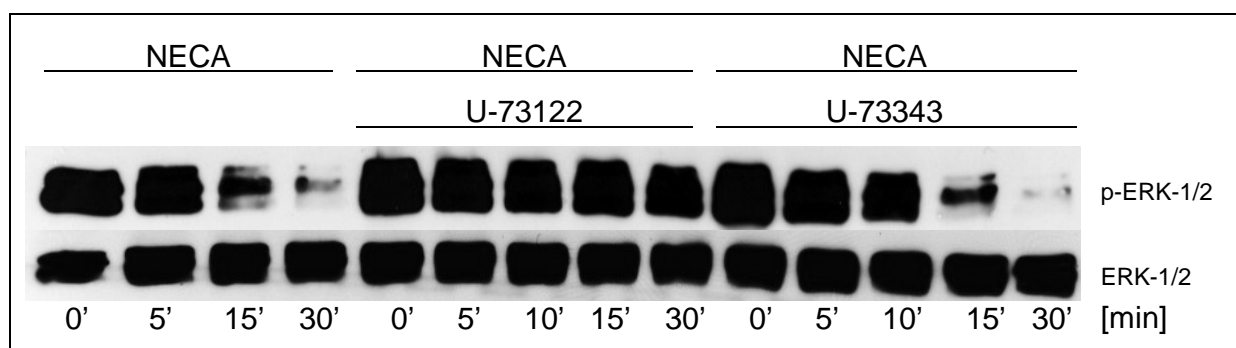


Abbildung 16: Der PLC-Inhibitor U-73122 hebt die NECA-induzierte Hemmung der ERK-1/2-Phosphorylierung auf.

Anschließend ist der Einfluss des Ca²⁺-Chelatbildners BAPTA-AM auf das p-ERK-1/2-Signal untersucht worden, da Ca²⁺ ein wichtiges Signalmolekül für die Signaltransduktion G_q-gekoppelter Rezeptoren ist. Nach einer 10-minütigen Inkubation der Zellen mit 10 µM oder 100 µM BAPTA-AM (Tang *et al.*, 2007) und der nachfolgenden A_{2B}-Stimulation mittels 10 µM NECA kann eine eingesetzte Konzentration von 100 µM BAPTA-AM eine Hemmung der MAPK bewirken (Abbildung 17).

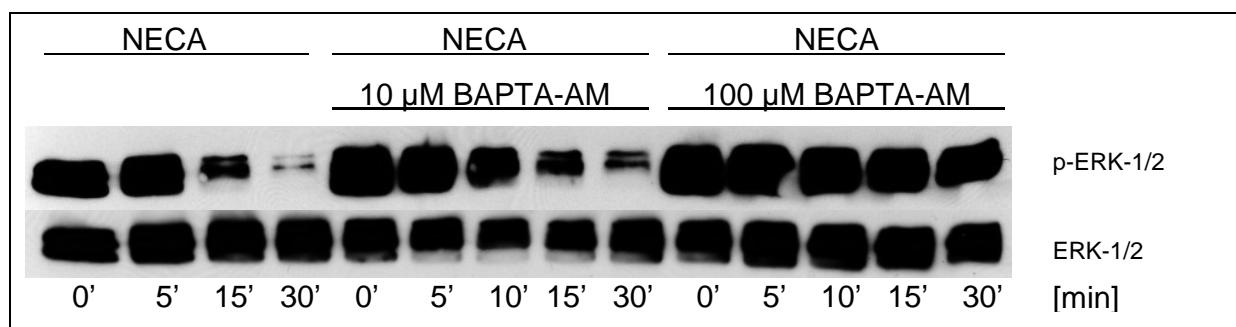


Abbildung 17: Beeinflussung der NECA-induzierten p-ERK-1/2-Inhibition durch den Ca²⁺-Chelator BAPTA-AM

Basierend auf diesen Ergebnissen ist eine denkbare Beteiligung der CamKII, die sowohl eine Aktivierung als auch eine Hemmung der MAPK-Kaskade verursachen kann, an der G_q-gekoppelten Signaltransduktion des A_{2B}AR untersucht worden. Hierfür werden die Zellen 30 Minuten mit dem CamKII-Inhibitor KN-62 (10 µM; Choi *et al.*, 2007) vorbehandelt, bevor die Stimulation des A_{2B}AR zu den Zeiten 0, 5, 10, 15 und 30 Minuten erfolgt. Jedoch hat die Inhibition der CamKII keinen Einfluss auf die A_{2B}-vermittelte Inhibition der ERK-1/2-Phosphorylierung (Abbildung 18).

Ein weiteres Zielmolekül der PLC ist die PKC, die in der Lage ist, die MAPK-Kaskade zu aktivieren. Deshalb werden die MDA-MB-231 Östrogenrezeptor-negativen Brustkrebszellen 30 Minuten mit 10 nM (hier nicht gezeigt) und 100 nM des PKC-Inhibitors Staurosporine inkubiert. Doch auch dieser Inhibitor zeigt keinerlei Einfluss auf den zeitlichen Verlauf des p-ERK-1/2-Signals (Abbildung 18).

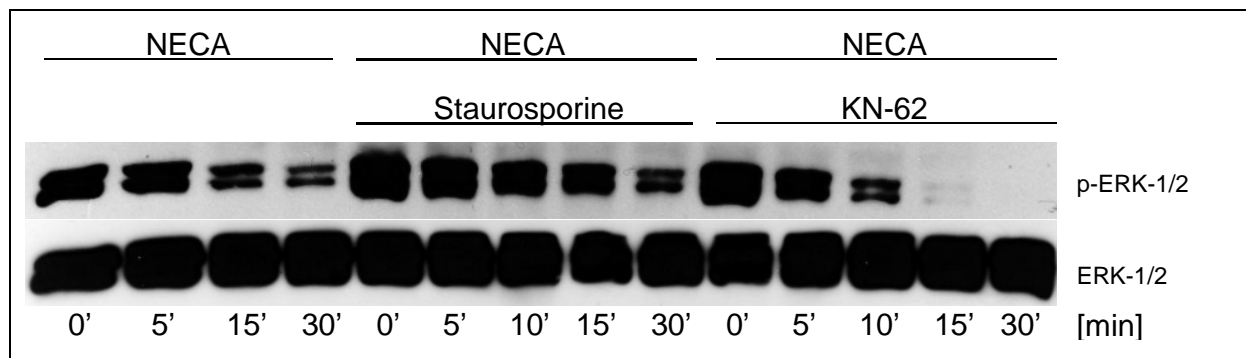


Abbildung 18: Einfluss des PKC-Inhibitors Staurosporine und des CamKII-Inhibitors KN-62 auf die NECA-vermittelte Inhibition der MAPK-Aktivität

4.1.5 Weitere potentielle Angriffspunkte

Ausgehend von der Beteiligung der PLC und von Ca²⁺ an der Signaltransduktion des A_{2B}AR in MDA-MB-231 Zellen werden die Zellen 10 Minuten mit 10 µM bzw. 100 µM KB-R7943 inkubiert (Iwamoto *et al.*, 2001). Ursprünglich hat man KB-R7943 als Inhibitor eines Na⁺/Ca²⁺-Austauschers eingesetzt. KB-R7943 ist aber auch in der Lage, TRP-Ca²⁺-Kanäle zu inhibieren, welche sowohl durch Substrate als auch durch Abbauprodukte der PLC aktiviert werden können (Lemmonier *et al.*, 2007). Jedoch zeigt KB-R7943 keinen Einfluss auf die A_{2B}AR-vermittelte Inhibition der ERK-1/2-Phosphorylierung (Abbildung 19).

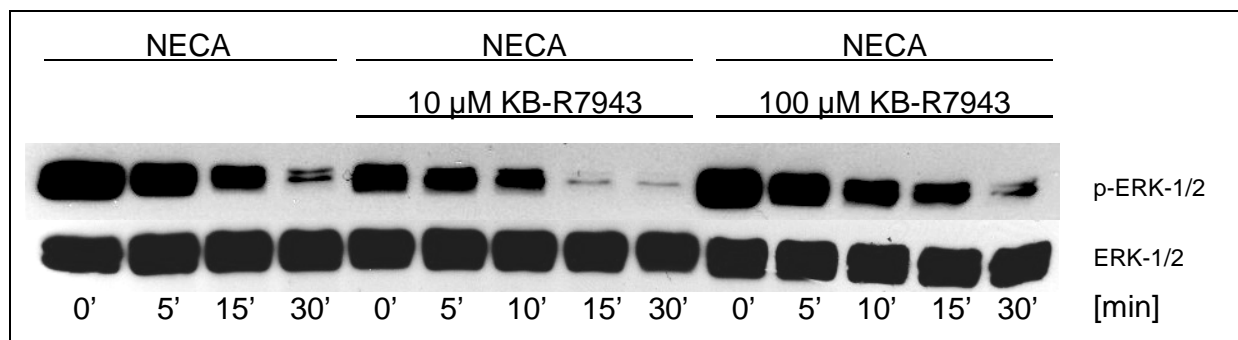


Abbildung 19: Wirkung des NCX-Inhibitors KB-R7943 auf NECA-induzierte Hemmung des p-ERK-Signals

Um eine mögliche Rolle von Phosphatasen, insbesondere der Proteinphosphatase 2, an der MAPK-Signaltransduktion des $A_{2B}AR$ zu überprüfen, werden die Zellen 4 Stunden mit den Calcineurin-Inhibitoren FK 506 (10 μM) bzw. Cyclosporin A (50 μM) vorbehandelt, bevor der $A_{2B}AR$ für 0, 5, 10, 15 und 30 Minuten mit NECA stimuliert wird (Kang *et al.*, 2007). Beide Substanzen zeigen jedoch keinen Einfluss auf die NECA-induzierte Inhibition der MAPK-Aktivität. Allerdings führt die Behandlung der Zellen mit 50 μM Cyclosporin A zu einer Hemmung des basalen p-ERK-1/2-Signals (Abbildung 20).

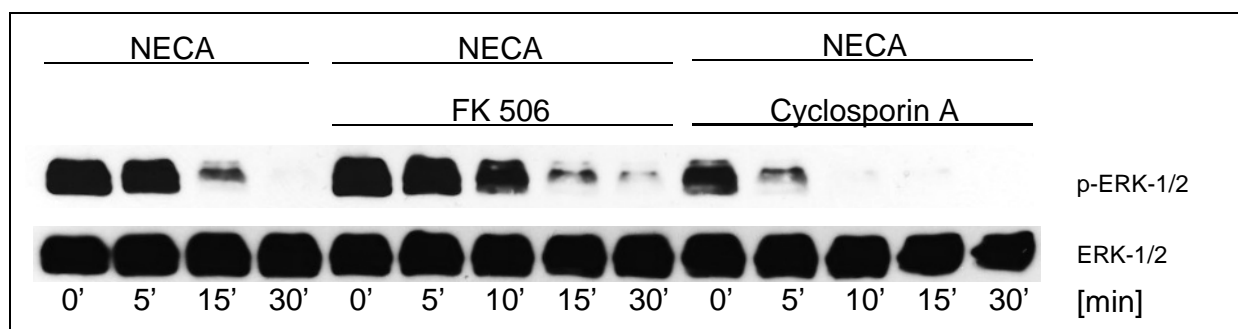


Abbildung 20: Einfluss der Phosphatase-Inhibitoren FK 506 und Cyclosporin A auf die MAPK-Aktivität

4.2 Humane immortalisierte Keratinozyten (HaCaT)

4.2.1 Zeitlicher Verlauf der ERK-1/2-Phosphorylierung nach NECA-Stimulation

Da der Adenosin-Agonist NECA in der Östrogenrezeptor-negativen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 zu einer zeitabhängigen Inhibition der MAPK-Aktivität führt, soll nun untersucht werden, ob dies in allen den A_{2B}AR exprimierenden Zelllinien der Fall ist bzw. ob ein ähnlicher Signalverlauf durch die maximale Stimulation der Zellen mittels FCS und die nachfolgende NECA-Stimulation erreicht werden kann.

Die Stimulation der HaCaT-Keratinozyten mit dem unspezifischen AR-Agonisten NECA führt zu einem transienten Verlauf des p-ERK-1/2-Signals. Ausgehend von einem schwachen basalen Signal kommt es zu einem Anstieg der MAPK-Aktivität mit einem Maximum zum Zeitpunkt 5-10 Minuten und einem anschließenden Abfall der Signalintensität (Abbildung 21).

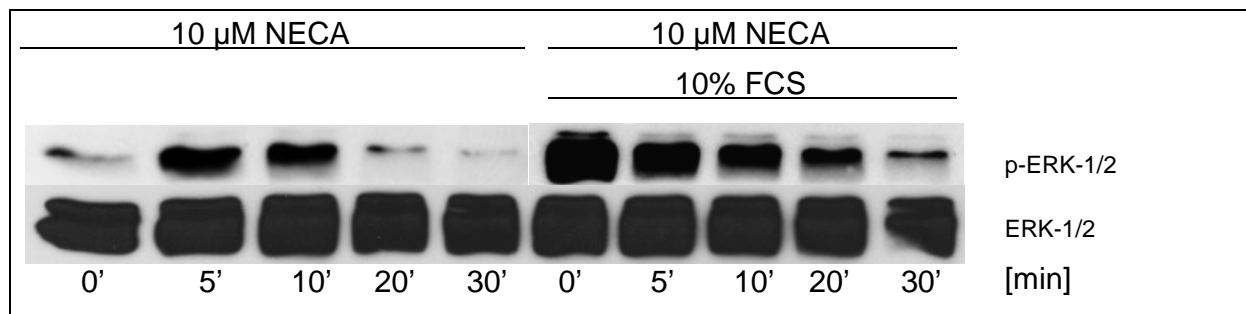


Abbildung 21: Zeitlicher Verlauf der ERK-1/2-Phosphorylierung nach A_{2B}AR-Stimulation in HaCaT ohne und mit vorheriger Stimulation der Zellen mit 10% FCS

Durch eine 10-minütige Vorbehandlung der Zellen mit 10% FCS kann eine deutliche Steigerung der basalen MAPK-Aktivität erzielt werden. Die nachfolgende Stimulation der Zellen mit dem Agonisten NECA führt bei den humanen immortalisierten Keratinozyten ebenso wie bei den MDA-MB-231 Östrogenrezeptor-negativen Brustkrebszellen zu einer zeitabhängigen Inhibition der ERK-1/2-Phosphorylierung (Abbildung 21). Allerdings weisen einige Experimente darauf hin, dass es nach der 10-minütigen FCS-Vorbehandlung auch ohne Stimulation des Adenosinrezeptors zu einem schwächer ausgeprägten zeitabhängigen Verlust des p-ERK-1/2-Signals kommt.

4.2.2 Vergleich der basalen MAPK-Aktivität in MDA-MB-231 und HaCaT

Im folgenden Experiment wird das absolute basale MAPK-Signal der MDA-MB-231-Brustkrebszellen mit dem der HaCaT-Keratinocyten verglichen.

Hierfür werden beide Zelllinien mit 10 μ M NECA stimuliert. Außerdem wird eine 10-minütige Stimulation der beiden Zelllinien mit 10% FCS durchgeführt, um zu sehen, ob die jeweils vorhandene basale ERK-1/2-Phosphorylierung noch gesteigert werden kann.

Wie in Abbildung 23 zu erkennen ist, bewirkt die Stimulation der MDA-MB-231-Zellen eine zeitabhängige Inhibition des p-ERK-1/2-Signals. Auch eine Stimulation der Zellen mit FCS hat keine Erhöhung der basalen MAPK-Aktivität zur Folge, was für eine maximale basale ERK-Aktivität in MDA-MB-231 Brustkrebszellen spricht.

Eine Stimulation der HaCaT-Keratinocyten mit NECA hingegen erzeugt, ausgehend von einem schwach ausgeprägten basalen MAPK-Signal, einen transienten Signalverlauf, wobei in dieser Zelllinie durch 10% FCS die MAPK-Aktivität deutlich gesteigert werden kann. Ebenso kann durch dieses Experiment gezeigt werden, dass bei gleicher Proteinkonzentration der aufgetragenen Proben das basale MAPK-Signal in HaCaT-Keratinocyten schwächer ausgeprägt ist als in MDA-MB-231-Brustkrebszellen.

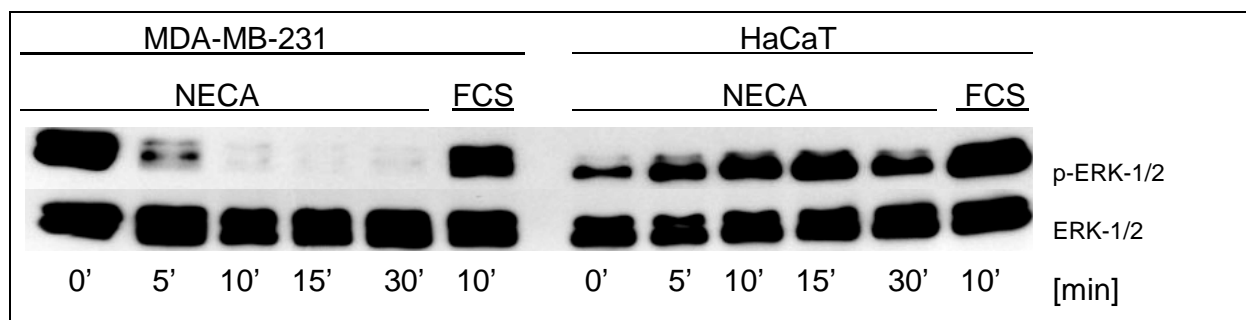


Abbildung 23: Vergleich des p-ERK-1/2-Signals in MDA-MB-231 und HaCaT nach der Stimulation mit NECA; zum Vergleich wurden beide Zelllinien 10 Minuten mit 10% FCS stimuliert.

4.3 A_{2B}AR-transfizierte CHO-Zellen

Zur Untersuchung des MAPK-Signals nach AR-Stimulation mittels NECA werden zum Vergleich zusätzlich zu den humanen immortalisierten Keratinozyten CHO-Zellen herangezogen, welche mit humanen A_{2B}AR stabil transfiziert worden sind (Klotz *et al.*, 1998).

Die Stimulation von CHO-A_{2B}-Zellen mit 10 µM NECA induziert ebenfalls einen transienten Verlauf des p-ERK-1/2-Signals mit einem Signalmaximum nach einer 5-minütigen Inkubation mit dem Agonisten NECA. Eine Stimulation der CHO-Zellen mit 10 µM NECA im Anschluss an eine 10-minütige Vorbehandlung mit 10% FCS verursacht keine deutliche Hemmung des p-ERK-1/2 Signals (Abbildung 24).

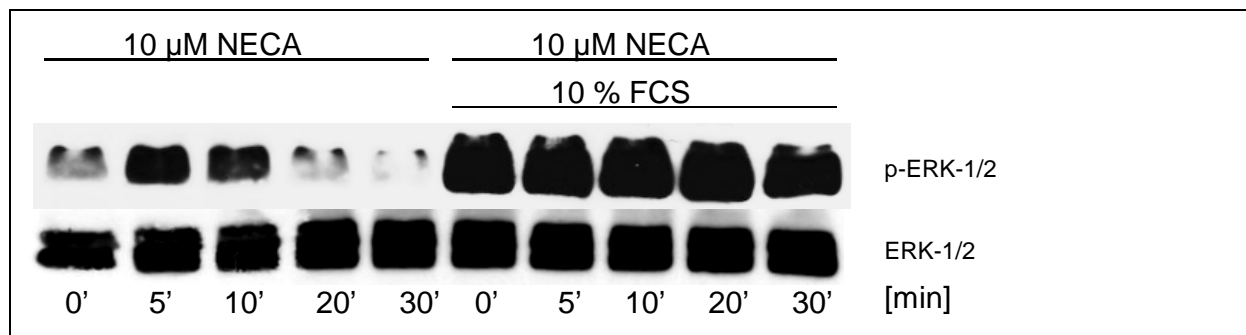


Abbildung 24: Einfluss des A_{2B}Agonisten NECA auf die ERK-1/2-Phosphorylierung in CHO-A_{2B}-Zellen ohne bzw. mit vorheriger FCS-Stimulation

4.4 Untersuchung von Wachstum und Proliferation der Östrogenrezeptor-negativen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231

Da MAPK das Wachstum und die Proliferation von Zellen beeinflussen (Schaeffer, 1999), wird nun untersucht, ob verschiedene Substanzen, die im Western Blot eine Hemmung des p-ERK-1/2-Signals zeigen, zu einer Proliferationshemmung der MDA-MB-231-Brustkrebszelllinie führen können.

Die Proliferationsrate der Zellen wird mittels MTS-Assay bestimmt (siehe 3.3). Mit Ausnahme der FCS-freien Kontrolle (Negativkontrolle) werden alle Zellen im DMEM-Standardmedium für MDA-MB-231-Brustkrebszellen, welches 10% FCS enthält, 36 Stunden angezüchtet, bevor sie entweder mit den AR-Agonisten NECA bzw. PHPNECA, den Tyrosinkinase-Inhibitoren Emodin bzw. PP2 oder einer Kombination aus Tyrosinkinase-Inhibitoren und AR-Agonisten inkubiert werden. Als Positivkontrolle dienen MDA-MB-231-Zellen, welche ebenfalls im Vollmedium angezüchtet worden sind, aber unbehandelt bleiben. Die Proliferationsrate der Zellen

wird 2, 4, 8 und 24 Stunden nach der Inkubation mit den jeweiligen Substanzen gemessen.

Abbildung 25A zeigt die Wachstumsrate der Positivkontrolle (Zellen in 10% FCS) sowie der Negativkontrolle (FCS-frei) im Vergleich zu Brustkrebszellen, die mit 30 μM NECA bzw. 10 μM PHPNECA behandelt worden sind. Vor allem zum Zeitpunkt 4 Stunden kann durch NECA eine signifikante Proliferationshemmung gegenüber der Positivkontrolle erzielt werden. Überraschenderweise zeigt sich unter dem Einfluss des potenteren AR-Agonisten PHPNECA in einer Konzentration von 10 μM eine geringere Inhibition des Wachstums als unter NECA. Um einen möglichen Wirkungsverlust aufgrund eines Abbaus der Agonisten auszuschließen, werden zu den mit NECA bzw. PHPNECA stimulierten Zellen zu den Zeitpunkten 4 und 8 Stunden erneut 10 μM des jeweiligen Agonisten zugegeben, wodurch die Proliferationsrate allerdings nicht mehr beeinflusst wird.

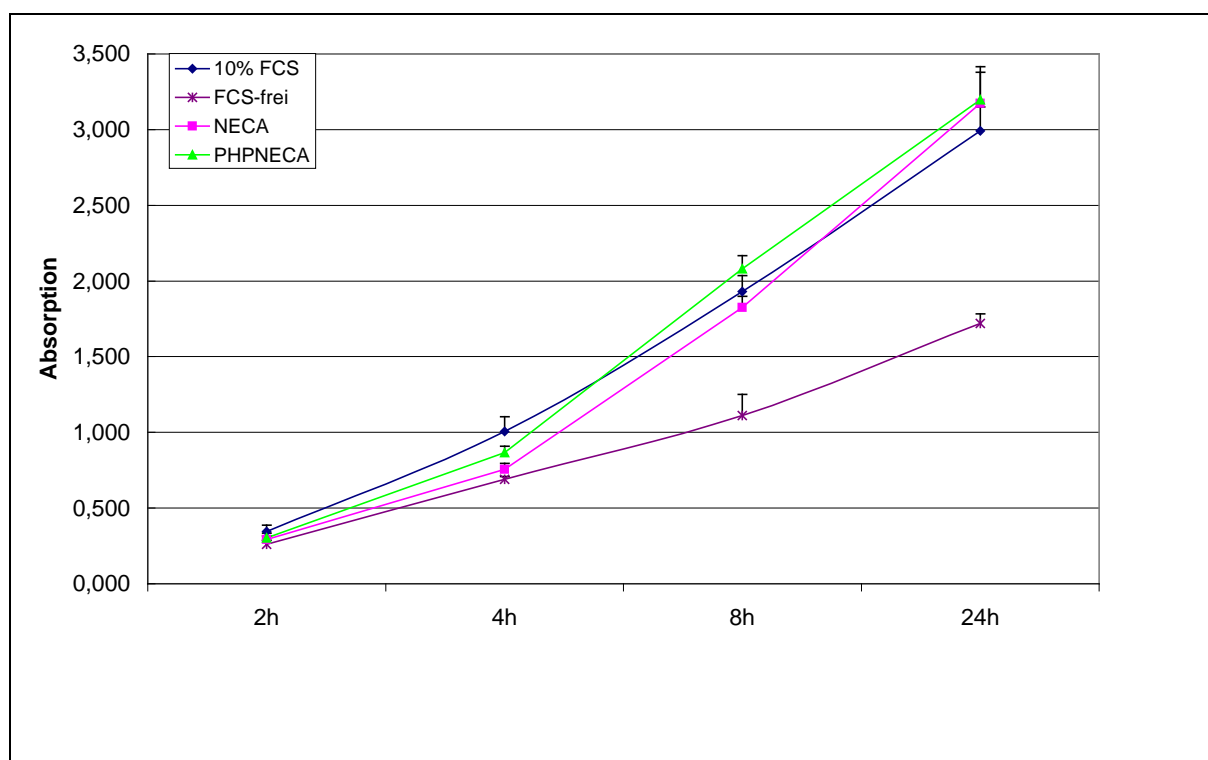


Abbildung 25A: Proliferationshemmung in MDA-MB-231-Brustkrebszellen nach Inkubation mit den Agonisten NECA und PHPNECA; zum Vergleich ist die Proliferationsrate von Zellen, welche im Vollmedium (10% FCS) bzw. im FCS-freien Medium angezüchtet worden sind, dargestellt. Die Absorption gibt die photometrisch quantifizierte Formazanverbindung an, die in einem direkten Verhältnis zur Anzahl lebender Zellen steht (s. Kap. 3.3). Die Daten sind Mittelwerte aus n=5 Experimenten \pm SEM.

Da der Her2-Rezeptor bei Brustkrebs eine wichtige Rolle spielt und in unseren proteinchemischen Untersuchungen eine Behandlung der MDA-MB-231-Brustkrebszellen zu einer nahezu vollständigen Hemmung des basalen p-ERK-1/2-

Signals führt, wird die Proliferationsrate von Zellen, die mit 30 μM NECA, 30 μM Emodin oder einer Kombination aus 30 μM Emodin und 30 μM NECA behandelt worden sind, verglichen. In Abbildung 25B ist die relative Proliferation der behandelten Zellen in Abhängigkeit von der Positivkontrolle dargestellt. Die relative Proliferation spiegelt die Proliferationsrate der behandelten Zellen bezogen auf die Positivkontrolle (10% FCS) wider, deren Proliferationsrate gleich 100% gesetzt ist. Wie Abbildung 25B zu entnehmen ist, kommt es 4 Stunden nach der Inkubation mit NECA bzw. der Kombination aus Emodin und NECA zu einer signifikanten Wachstumshemmung. Nach 8 Stunden weisen zusätzlich zu den Brustkrebszellen, welche die Kombinationsbehandlung erfahren haben, auch die alleine mit Emodin behandelten Zellen eine signifikante Inhibition der Proliferationsrate auf. Der AR-Agonist NECA nimmt zu diesem Zeitpunkt keinen signifikanten Einfluss mehr auf die Proliferation der Brustkrebszellen. Auch in diesem Experiment wird zu allen Zellen, die mit NECA behandelt worden sind, zu den Zeitpunkten 4 und 8 Stunden nochmals 10 μM NECA zugefügt.

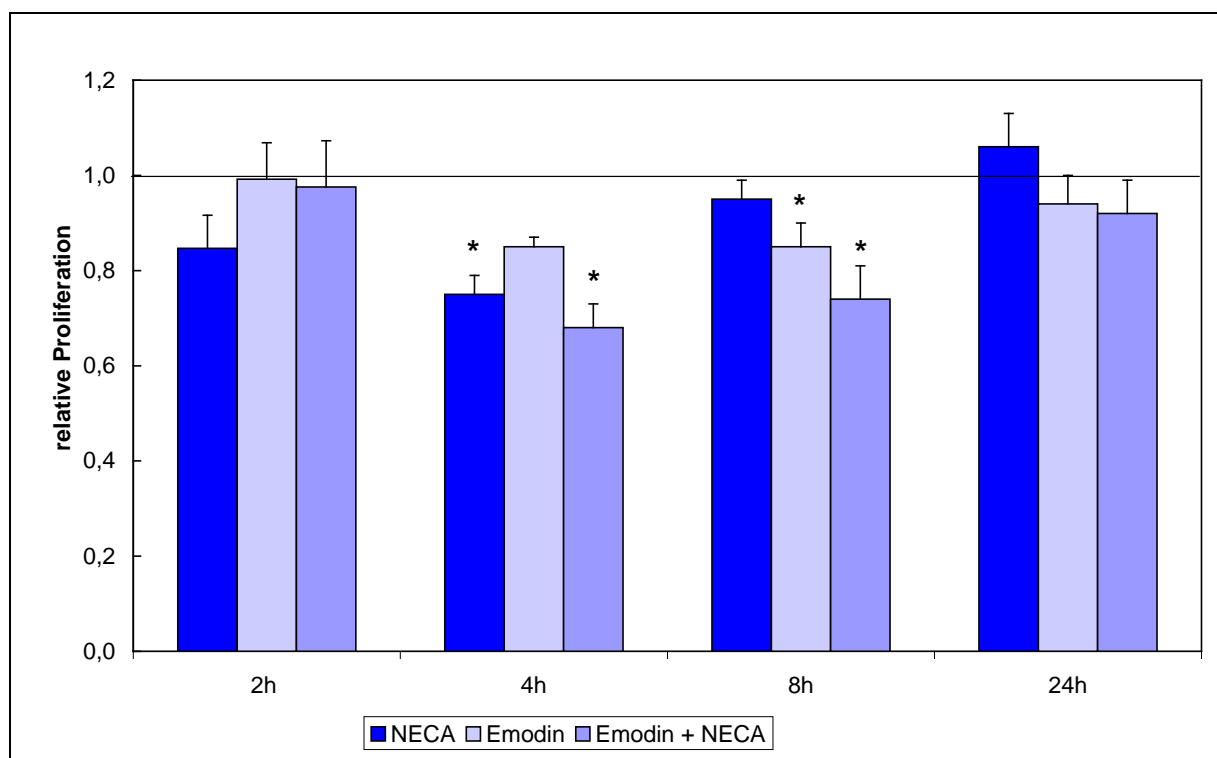


Abbildung 25B: Relative Proliferation der MDA-MB-231-Zellen nach der Behandlung mit NECA, Emodin sowie einer Kombination aus Emodin & NECA. Die Daten sind Mittelwerte aus n=5 Experimenten \pm SEM. Die Inhibition der Proliferation ist signifikant (*) bei $p \leq 0,05$ (ermittelt mit gepaartem, zweiseitigen *t*-Test).

In einem weiteren Experiment werden die Zellen mit 30 μM NECA, 10 μM des src-Kinase-Inhibitors PP2 sowie einer Kombination aus 10 μM PP2 und 30 μM NECA

inkubiert. Auch hier erfahren die Brustkrebszellen durch alle Behandlungen eine Wachstumshemmung, die jedoch über die Zeitspanne von 24 Stunden wieder verschwindet. So kommt es 4 Stunden nach der Inkubation der Brustkrebszellen mit 30 μ M NECA, 10 μ M PP2 sowie der Kombination aus PP2 und NECA zu einer signifikanten Proliferationshemmung. Durch die Kombination aus PP2 und NECA kann die signifikante Wachstumshemmung etwas verlängert werden, da sie auch noch 8 Stunden nach der Inkubation persistiert (Abbildung 25C).

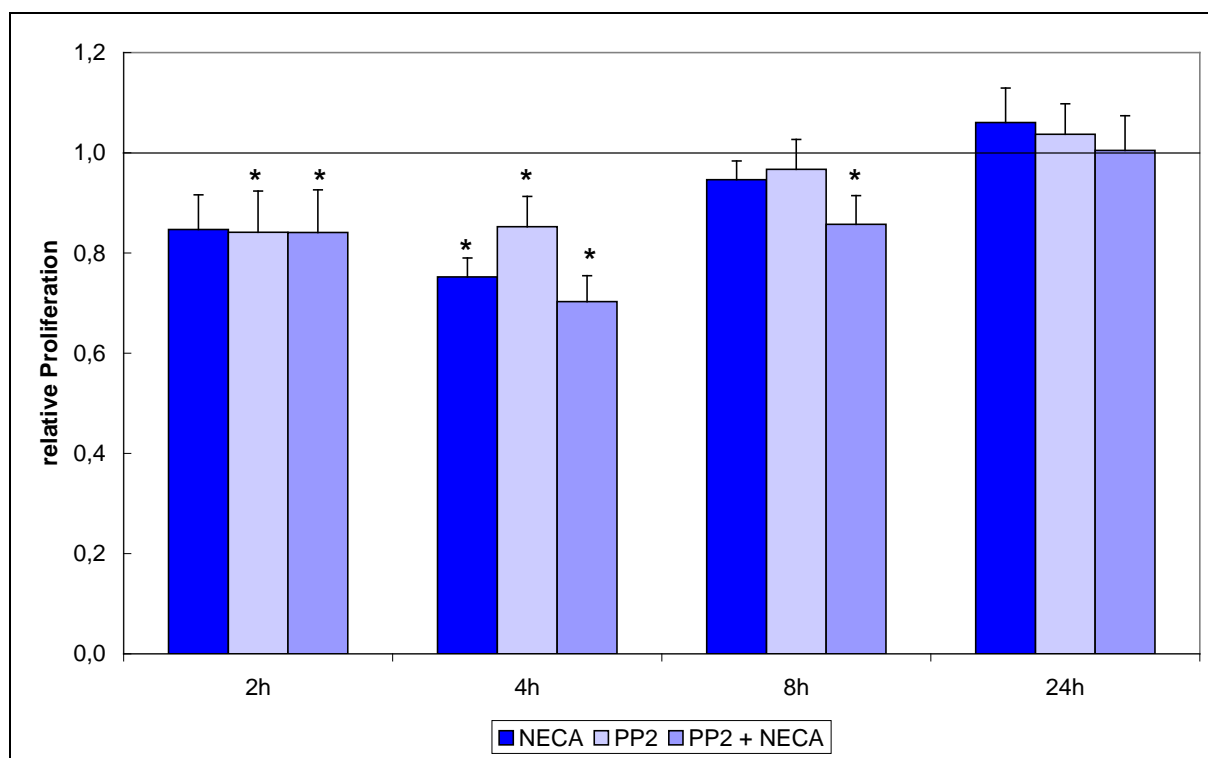


Abbildung 25C: Relative Proliferation der MDA-MB-231-Zellen nach der Behandlung mit NECA, PP2 sowie einer Kombination aus PP2 & NECA. Die Daten sind Mittelwerte aus n=5 Experimenten \pm SEM. Die Inhibition der Proliferation ist signifikant (*) bei $p \leq 0,05$ (ermittelt mit gepaartem, zweiseitigen *t*-Test).

4.5 Beobachtung der MAPK-Aktivität nach NECA-Stimulation über 24 Stunden

Angesichts der Tatsache, dass die Behandlung der Brustkrebszellen mit dem AR-Agonisten NECA 4 Stunden nach der Inkubation zu einer signifikanten Proliferationshemmung führt, die im weiteren Verlauf wieder verschwindet, obwohl die Zellen 4 und 8 Stunden nach der ‚Erst-Inkubation‘ nochmals mit 10 μ M NECA stimuliert worden sind, stellt sich die Frage nach der Ursache dieses Phänomens. Daher wird mittels Western Blot der Zeitverlauf der NECA-vermittelten Hemmung der MAPK-Aktivität genauer untersucht.

Dieses Experiment zeigt, dass ausgehend von einer hohen basalen MAPK-Aktivität in der Östrogenrezeptor-negativen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 die Stimulation

der Zellen mit dem AR-Agonisten NECA zu einer zeitabhängigen Inhibition der ERK-1/2-Phosphorylierung führt, welche allerdings nach 6-stündiger Inkubation mit dem Agonisten wieder verschwindet. Zusätzlich werden Zellen, die bereits 23,5 Stunden mit NECA inkubiert worden sind, vor dem Abstoppen der Reaktion nochmals 30 Minuten mit 10 μM NECA stimuliert, um zu sehen, ob dadurch erneut eine Hemmung des MAPK-Signals möglich ist. Dieses Vorgehen hat jedoch keinen Einfluss mehr auf das p-ERK-1/2-Signal der MDA-MB-231-Zelllinie (Abbildung 26).

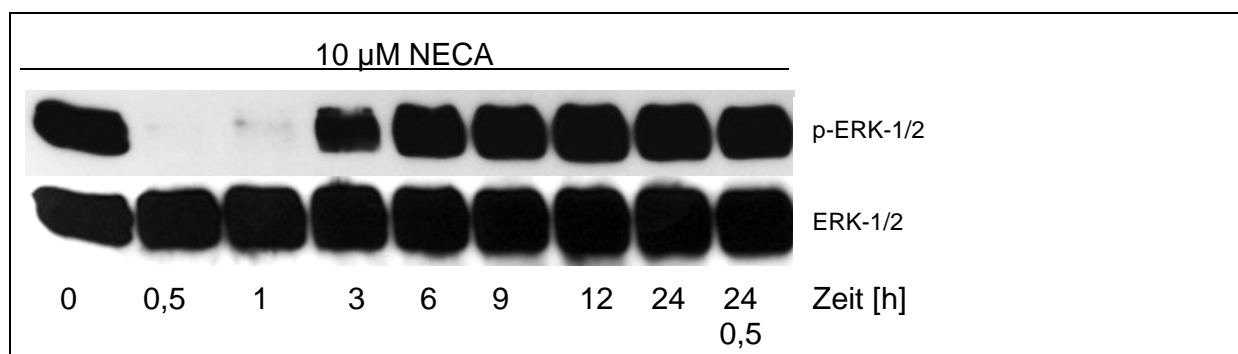


Abbildung 26: Zeitverlauf der NECA-vermittelten MAPK-Hemmung über 24 Stunden

4.6 Bestimmung der A_{2B} AR-Zahl mittels Radioligandenbindung

Aufgrund der Ergebnisse der Proliferationstests sowie des 24-Stunden-Verlaufs der MAPK-Aktivität stellt sich nun die Frage, ob eine längere Exposition der Zellen mit dem AR-Agonisten NECA möglicherweise eine Internalisierung bzw. Desensibilisierung der A_{2B} AR induziert. Um dieser Fragestellung auf den Grund zu gehen, wird ein Bindungsassay mit dem A_{2B} -Antagonisten [^3H]ZM 241385 durchgeführt, dessen spezifische Bindung (SB) als relatives Maß für die Rezeptorexpression herangezogen werden kann (Abbildung 27).

Für dieses Experiment werden Membranen von unbehandelten Brustkrebszellen zum Zeitpunkt 0 und 24 Stunden, sowie von Zellen, die 24 Stunden mit 10 μM NECA vorbehandelt worden sind, präpariert. Die Rezeptorzahl von unbehandelten Zellen zu den Zeitpunkten 0 und 24 Stunden werden bestimmt, um auszuschließen, dass die längere Wachstumsphase die Anzahl der Adenosinrezeptoren beeinflusst.

Die totale Bindung (TB) zeigt die gesamte Anzahl an Bindungen, die der A_{2A}/A_{2B} AR-Antagonist [^3H]ZM 241385 eingeht, während die spezifische Bindung (SB) die Anzahl der vom ‚kalten‘ Liganden NECA besetzten A_{2B} AR darstellt. Die spezifische Bindung kann nur indirekt, aus der Differenz von totaler Bindung (TB) und

unspezifischer Bindung (UB), die in Gegenwart eines Überschusses an nicht radioaktiven Rezeptorliganden bestimmt wird, ermittelt werden (s. Kap. 3.2.3).

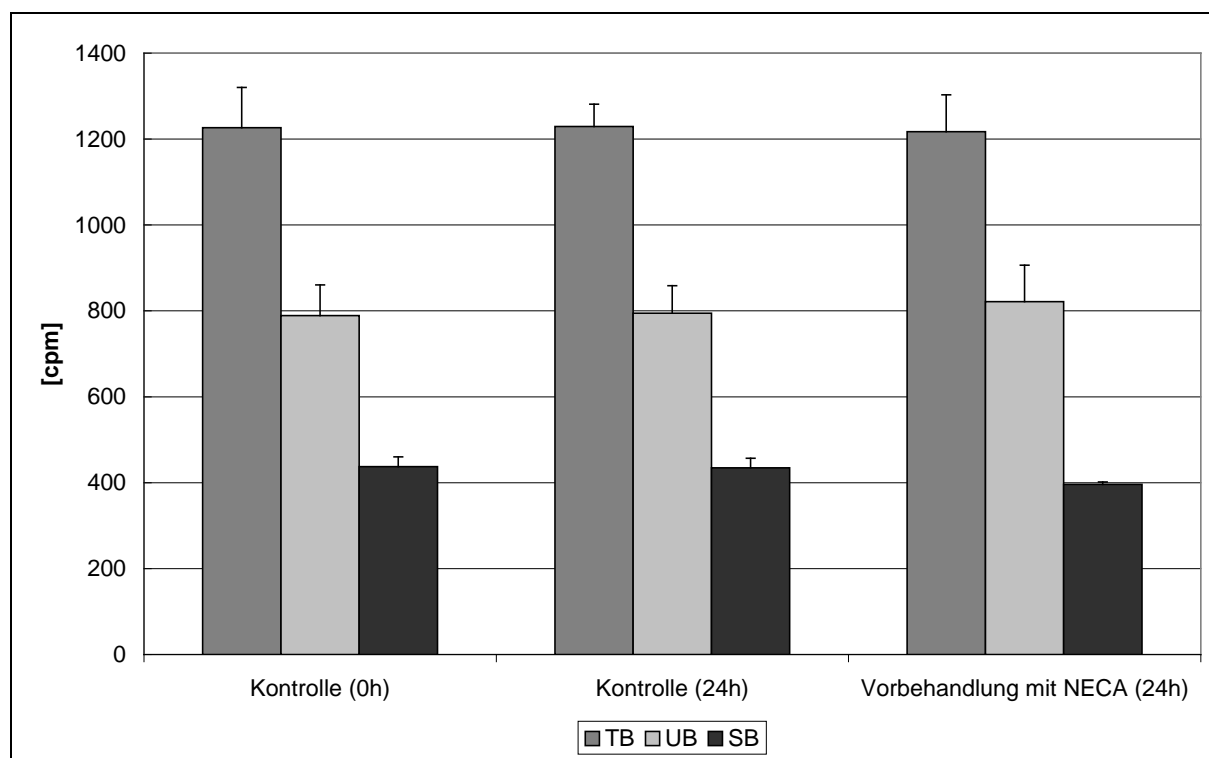


Abbildung 27: Radioligandenbindung der $A_{2B}AR$ in MDA-MB-231 ohne bzw. mit 24-stündiger Vorbehandlung mit NECA. Die Daten sind Mittelwerte aus $n=3$ Experimenten \pm SEM. (TB = totale Bindung, UB = unspezifische Bindung, SB = spezifische Bindung)

Wie aus Abbildung 27 hervorgeht, zeigen die Ergebnisse der Radioligandenbindung keinen Unterschied zwischen den Kontrollen zu den Zeitpunkten 0 Stunden bzw. 24 Stunden und den Zellen, welche 24 Stunden mit NECA vorbehandelt worden sind, so dass es, insgesamt betrachtet, durch die längere Stimulation der Zellen mit NECA zu keinem Verlust von membranständigen Rezeptoren kommt. Hierbei muss allerdings berücksichtigt werden, dass mit dieser Methode keine Differenzierung zwischen plasmamembranständigen oder internalisierten Rezeptoren erfolgen kann. Somit wäre es durchaus denkbar, dass über den zeitlichen Verlauf A_{2B} -Adenosinrezeptoren der Plasmamembran internalisiert werden, die folglich zur Stimulation nicht mehr zur Verfügung stehen, aber trotzdem als intrazelluläre Rezeptoren mit dem Bindungsassay erfasst werden.

4.7 Bestimmung der Adenylylcyclase-Aktivität in MDA-MB-231

Um der Ursache für den erneuten Anstieg der MAPK-Aktivität nach einer mehrstündigen Behandlung der Zellen mit NECA bei gleich bleibender Anzahl von $A_{2B}AR$ auf den Grund zu gehen, wird die Aktivierbarkeit der Adenylylcyclase (AC) untersucht.

Für dieses Experiment werden die Zellen 2, 3, 6 und 24 Stunden mit $10 \mu M$ NECA vorbehandelt. Diese Zellen werden entweder ohne Agonist inkubiert, um die basale Aktivität der AC zu bestimmen, oder mit $100 \mu M$ NECA stimuliert. Als Kontrolle dienen Zellen, die 24 Stunden ohne NECA gewachsen sind.

Eine Stimulation der Kontrollzellen mit $100 \mu M$ NECA führt zu einem etwa vierfachen Anstieg des cAMP im Vergleich zum Basalwert. Bereits eine 2-stündige Vorbehandlung der Zellen mit $10 \mu M$ NECA hat eine deutlich geringere Stimulation der AC-Aktivität zur Folge, während nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit $10 \mu M$ NECA die Stimulierbarkeit der Adenylylcyclase nur noch das etwa 1,7-fache des Basalwertes beträgt (Abbildung 28).

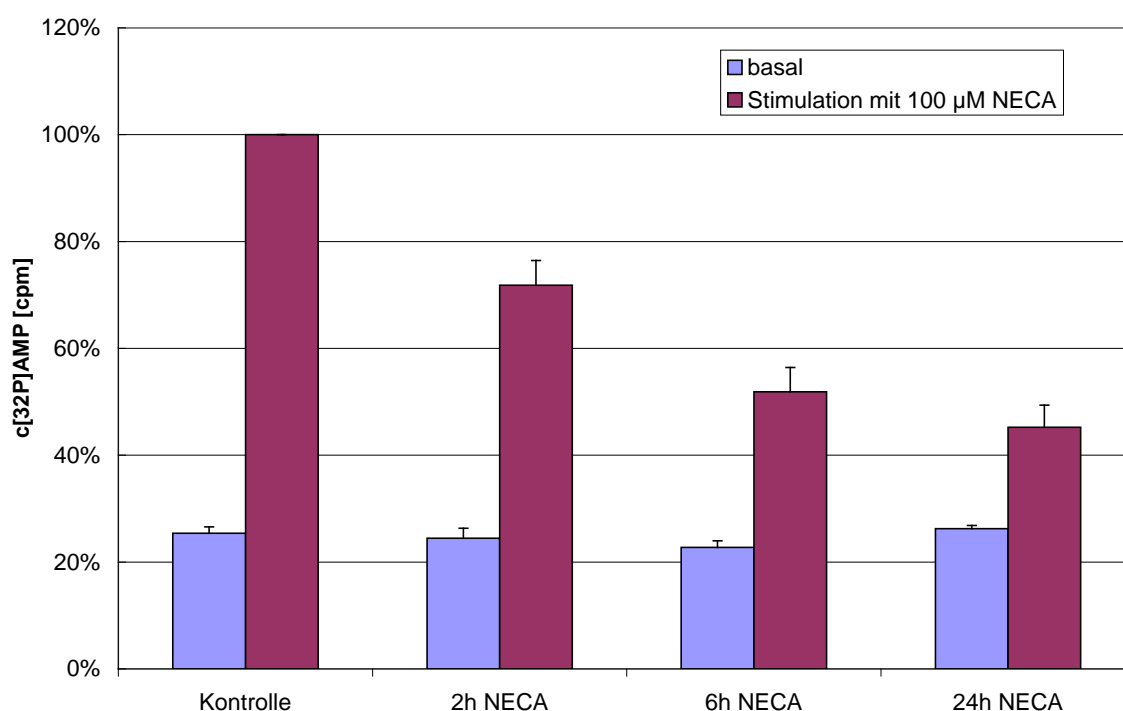


Abbildung 28: Aktivität der Adenylylcyclase in MDA-MB-231. Die Daten sind Mittelwerte aus $n=3$ Experimenten \pm SEM.

5 Diskussion

5.1 Einfluss von MAPK und Adenosin auf die Tumorigenese

Der Entstehung von Tumoren liegen diverse zelluläre Veränderungen zugrunde, in Folge derer eine „normale“ Zelle durch den Erwerb von Fähigkeiten wie der Umgehung der Apoptose, der Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen, der unbegrenzten Replikationsfähigkeit, dem invasiven Wachstum und der Metastasierung sowie der Induktion und Aufrechterhaltung von Angiogenese neoplastisch transformiert und somit zu einer Tumorzelle wird (Dhillon *et al.*, 2007). MAPK beeinflussen einen Großteil dieser Prozesse, wenn nicht sogar alle, weshalb sie eine wichtige Rolle im Rahmen der Entstehung maligner Tumoren spielen (Dhillon *et al.*, 2007). MAP-Kinasen, vor allem ERKs, sind in der Lage, insbesondere nach der Stimulation von Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) durch Wachstumsfaktoren unterschiedliche zelluläre Prozesse wie die Zellproliferation und -differenzierung, die Zellmigration, die Apoptose oder die Angiogenese zu regulieren (Dhillon *et al.*, 2007; Lowes *et al.*, 2002; Lev *et al.*, 2004). Kommt es nun durch unkontrolliertes Wachstum und Proliferation solider Tumore zu einer Hypoxie, resultiert daraus ein dramatischer Anstieg der extrazellulären Adenosinkonzentration. Diese Akkumulation von Adenosin ist in der Lage, Tumorstadium und Angiogenese zu stimulieren und die Funktion von T-Zellen, Makrophagen und NK-Zellen zu inhibieren (Merighi *et al.* 2003; Spychala, 2000).

Adenosin entfaltet seine Wirkung vorrangig über vier Adenosinrezeptor-Subtypen, die alle G-Protein-gekoppelt sind und die MAPK-Kaskade aktivieren (Fredholm *et al.*, 2001). Von diesen Adenosinrezeptoren ist der A_{2B}AR der einzige, der in der Lage ist, alle drei Subtypen der MAPK-Familie (ERK-, JNK-, p38-MAPK) zu aktivieren. Außerdem wird dieser Rezeptorsubtyp erst bei höheren Adenosinkonzentrationen, wie sie beispielsweise in der Umgebung solider Tumore vorkommen, aktiviert (Schulte und Fredholm, 2003b).

So fördert Adenosin durch die Aktivierung des A_{2B}AR einmal die Sekretion angiogenetischer Faktoren wie IL-8, VEGF und bFGF aus mikrovaskulären Endothelzellen und zum anderen führt die Stimulation des A_{2B}AR von Mastzellen, welche sich in entzündetem und neoplastischem Gewebe ansammeln, zur Freisetzung von IL-8 und VEGF, welche zur Angiogenese im Tumorgewebe führen und somit das Tumorstadium begünstigen (Feoktistov *et al.*, 2003; Merighi *et al.*, 2007).

5.2 Hohe basale Aktivität von MDA-MB-231-Brustkrebszellen

Die Östrogenrezeptor-negativen Brustkrebszellen MDA-MB-231 zeigen eine hohe basale ERK-1/2-Phosphorylierung, die selbst durch die Stimulation mit FCS oder EGF nicht weiter gesteigert werden kann, so dass von einer maximalen basalen Aktivität dieser MAPK ausgegangen werden muss.

Angesichts der Tatsache, dass es sich um maligne Zellen handelt, liegt die Vermutung nahe, dass die hohe basale ERK-1/2-Phosphorylierung auf eine Überexpression bzw. konstitutive Aktivität von RTKs, vor allem aus der Familie der EGF-Rezeptoren, zurückzuführen ist. Diese konstitutive Aktivität und das daraus resultierende hohe basale p-ERK-1/2-Signal kann beispielsweise durch aktivierende Mutationen der RTKs oder auch durch Mutationen der ‚downstream targets‘ von Wachstumsfaktorrezeptoren, wie zum Beispiel ras-/raf-Mutationen, verursacht werden (Dhillon *et al.*, 2007). So ist der Raf-MEK-ERK-Signalweg eine Zielkaskade der kleinen GTPase ras, einem der am häufigsten mutierten Onkogene bei einer Vielzahl maligner Neoplasien des Menschen (Roberts und Der, 2007). Deshalb wurde der Einfluss von Tyrosinkinase-Inhibitoren unterschiedlicher Selektivität auf das basale MAPK-Signal untersucht.

Das Isoflavonoid Genistein, das eine strukturelle Ähnlichkeit zu Estradiol aufweist, ist in der Lage, sowohl den Östrogen-Signalweg als auch den RTK-Signalweg zu modulieren. So inhibiert Genistein, allerdings nur mit geringer Selektivität, die Aktivierung von zytosolischen Tyrosinkinasen (Levitzki und Mishani, 2006; Yang *et al.*, 2007; Davis *et al.*, 2008). Es stellt sich jedoch heraus, dass der nicht-selektive Rezeptortyrosinkinaseinhibitor Genistein zwar keinen Einfluss auf die basale ERK-Aktivität in MDA-MB-231 Östrogenrezeptor-negativen Brustkrebszellen hat (siehe 4.1.2), jedoch konnten Yang *et al.* (2007) und Davis *et al.* (2008) eine Wachstumshemmung und Apoptose-Induktion in MDA-MB-231-Brustkrebszellen unter Genistein zeigen. Xu und Loo (2001) hingegen beobachteten eine Genistein-induzierte Apoptose in MCF-7 Östrogenrezeptor-positiven Brustkrebszellen, jedoch nicht in MDA-MB-231-Zellen, was sie auf die unterschiedliche Ausstattung der Zellen mit Östrogenrezeptoren und eine denkbare Wirkung des Genisteins über Östrogenrezeptoren zurückführen. Ein möglicher Erklärungsansatz für diese Diskrepanz wären zum einen unterschiedliche Kulturbedingungen oder Phänotypen der untersuchten Brustkrebszelllinien (Xu und Loo, 2001). Andererseits wäre es auch denkbar, dass die wachstums- und apoptosehemmende Wirkung von Genistein

eventuell ERK-unabhängig beispielsweise über andere MAPK oder durch Regulation von Apoptose-Genen vermittelt wird.

Der EGFR und Her2, die als RTKs in der Lage sind, MAPK zu aktivieren, sind in 20-50% aller Brustkrebsfälle vermehrt exprimiert, was mit einer schlechten Prognose verbunden ist (Lev *et al.*, 2004). Dies ist darauf zurückzuführen, dass aktivierte MAPK beispielsweise die Entstehung von Lymphknotenmetastasen begünstigen (Adeyinka *et al.*, 2002). Aufgrund der Tatsache, dass Her2 die MAPK-Kaskade aktiviert, untersuchten Lev *et al.* (2004) einen möglichen Zusammenhang zwischen einer vermehrten Expression des Her2-Rezeptors und einer erhöhten basalen MAPK-Aktivität. So zeigen beispielsweise MDA-MB-231-Zellen, die eine starke basale ERK-Aktivierung aufweisen, zwar eine relativ hohe EGFR-Expression, aber keine Überexpression des Her2-Rezeptors, wohingegen MCF-7- und SUM-149-Brustkrebszellen bei schwacher basaler ERK-Phosphorylierung eine relativ starke Expression des Her2-Rezeptors zeigen, so dass ein Zusammenhang zwischen basaler MAPK-Aktivität und Her2-Überexpression ausgeschlossen werden kann (Lev *et al.*, 2004). Jedoch weisen MDA-MB-231 Brustkrebszellen bei basaler Her2-Expression eine verstärkte Expression von Her1 und src-Kinase auf (Belsches-Jablonski *et al.*, 2001; Biscardi *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1995). Weiterhin konnte eine Korrelation zwischen Östrogenrezeptor-Negativität und EGF-abhängiger c-src/Her1-Heterokomplex-bildung nachgewiesen werden, welche alleine, aber auch über aktiviertes ras zu einer erhöhten MAPK-Phosphorylierung führt und als Indikator für einen aggressiven Phänotyp gilt, da derartige funktionelle Synergismen die Progression von Brustkrebs fördern (Biscardi *et al.*, 1998; Biscardi *et al.*, 2000).

Darüber hinaus steigert auch eine Überexpression der nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase c-src, welche einerseits zur Aktivierung der Her-Rezeptoren beitragen, andererseits aber auch als second messenger des Her2 fungieren kann, die basale MAPK-Aktivität (Moasser, 2007; Ishizawa *et al.*, 2007). Neben Wachstumsfaktor-Rezeptoren interagiert die src-Kinase beispielsweise auch mit Zell-Zell-Adhäsionsrezeptoren und Integrinen, weshalb ihre Aktivierung nicht nur die Proliferation und das Überleben der Zellen durch die Aktivierung mitogener Signalwege, sondern auch die Migration und die Invasion durch die Beeinflussung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen begünstigt (Hiscox *et al.*, 2006; Biscardi *et al.*, 2000). Deshalb geht eine erhöhte Expression bzw. Aktivität der src-Kinase auch mit einer erhöhten Metastasierung *in vivo* einher (Hiscox *et al.*, 2006).

Die Behandlung der MDA-MB-231-Zellen mit dem Her2-Inhibitor Emodin sowie mit dem src-Kinase-Inhibitor PP2 erzeugt eine nahezu vollständige Inhibition der basalen ERK-Aktivität (Abbildungen 9 und 10). Im Falle der src-Kinase, die in MDA-MB-231-Brustkrebszellen überexprimiert wird, ist dieser Effekt leicht zu erklären, wohingegen der Einfluss des Her2-Inhibitors auf unterschiedliche Ursachen zurückgeführt werden kann:

So wäre beispielsweise denkbar, dass der Her2-Rezeptor, der in MDA-MB-231-Brustkrebszellen zwar eine basale Expression aufweist, eine konstitutive Aktivität zeigt, welche durch Emodin inhibiert wird. Diese konstitutive Aktivität könnte neben einer aktivierenden Mutation des Her2-Rezeptors auch durch überexprimierte bzw. konstitutiv aktivierte ‚downstream targets‘ des Her2-Rezeptors zustande kommen (Dhillon *et al.*, 2007). Darüber hinaus könnte man in Betracht ziehen, dass Emodin eventuell auch an den überexprimierten Her1 Rezeptor binden und dessen Aktivität blockieren kann, so dass in Folge der Her1-Inhibition auch die c-src/Her1-Heterokomplexbildung unterbunden wird. Schließlich besteht auch noch die Möglichkeit, dass Emodin eine gewisse inhibierende Wirkung auf die src-Kinase ausübt.

5.3 Inhibition der MAPK-Aktivität durch die Stimulation des A_{2B}-Adenosinrezeptors in MDA-MB-231-Zellen

Wie bereits erwähnt, spielen Adenosinrezeptoren eine wichtige Rolle für das Tumorstadium und die Tumorpromotion (Merighi *et al.*, 2003). Gerade der A_{2B}AR wird durch die im Tumorgewebe vorkommenden hohen Adenosinkonzentrationen aktiviert und kann einerseits die Angiogenese stimulieren, aber auch die MAPK, wie zum Beispiel die ERK-1/2-Aktivität, beeinflussen. Deshalb wurden zwei menschliche Brustkrebszelllinien auf die Expression von A_{2B}ARs untersucht. Hierbei handelt es sich um die Östrogenrezeptor-positive Brustkrebszelllinie MCF-7, die keine A_{2B}AR exprimiert sowie die Östrogenrezeptor-negative Brustkrebszelllinie MDA-MB-231, für die mit funktionellen und Radioligandenbindungsexperimenten nachgewiesen werden konnte, dass sie den A_{2B}AR als einzigen Adenosinrezeptor-Subtyp in einer sehr hohen Dichte exprimiert (Panjehpour *et al.*, 2005).

Im Gegensatz zu anderen Experimenten, in denen die Stimulation des A_{2B}AR mit dem unselektiven Agonisten NECA zu einer Aktivierung der MAPK-Kaskade führt, induziert die Stimulation des A_{2B}AR in der Östrogenrezeptor-negativen Brustkrebs-

zelllinie MDA-MB-231 eine zeitabhängige Inhibition des p-ERK-1/2-Signals. So führt eine Stimulation des A_{2B}AR in HEK-293-Zellen zu einer zeit- und konzentrationsabhängigen ERK-Aktivierung (Gao *et al.*, 1999). Ebenfalls beobachteten Schulte und Fredholm (2003b) eine Induzierung der ERK-Phosphorylierung in A_{2B}AR-transfizierten CHO-Zellen nach der Behandlung mit NECA. Eine Inhibition der MAPK-Kaskade, wie sie im Rahmen der Untersuchungen für diese Arbeit bei MDA-MB-231-Zellen nach der NECA-Stimulation beobachtet wurde, ist z.B. auch für Mesangiumzellen beschrieben, bei denen die Endothelin-1 induzierte MAPK-Aktivierung via cAMP gehemmt wird (Haneda *et al.*, 1996).

Weiterhin wurde auch der zeitliche Verlauf der MAPK-Aktivität nach NECA-Stimulation in A_{2B}-transfizierten CHO-Zellen sowie in HaCaT untersucht. In beiden Zelllinien konnte ein transienter Signalverlauf der ERK-1/2-Phosphorylierung mit einem Signalmaximum nach einer 5-minütigen Stimulation nachgewiesen werden. Dies ist im Einklang mit den Ergebnissen von Schulte und Fredholm (2000), die für A_{2B}-transfizierte CHO-Zellen ebenfalls einen transienten Signalverlauf beobachten konnten

Somit nehmen die MDA-MB-231-Brustkrebszellen, die ausgehend von einer hohen basalen MAPK-Aktivität durch die Stimulation mit NECA eine zeitabhängige Inhibition des p-ERK-1/2-Signals erfahren, eine besondere Stellung unter den A_{2B}AR-exprimierenden Zellen ein.

In einigen Experimenten an CHO-A_{2B} und HaCaT wurde versucht, durch eine 10-minütige Vorstimulation der Zellen mit 10% FCS und eine nachfolgende Stimulation der Zellen mit NECA einen ähnlichen Mechanismus nachzuweisen, wie er in MDA-MB-231-Brustkrebszellen vorhanden ist. Die in diesen Experimenten teilweise beobachtete zeitabhängige Inhibition der ERK-Phosphorylierung ist allerdings möglicherweise auf einen Wirkungsverlust des FCS über die Zeitspanne von 30 Minuten und nicht auf die Stimulation des A_{2B}AR zurückzuführen.

5.4 Beteiligung von cAMP an der Signaltransduktion des A_{2B}-Adenosinrezeptors in MDA-MB-231-Brustkrebszellen

Was die Signaltransduktion anbelangt, so ist in der Literatur für den A_{2B}AR durchweg eine Beteiligung von G_s beschrieben, welche beispielsweise über eine cAMP-abhängige Aktivierung der PKA zu einer Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie z.B. CREB führt (Schulte und Fredholm, 2003b). Andererseits haben Panjehpour *et al.* (2005) auch festgestellt, dass G_q in die Signaltransduktion des A_{2B}AR involviert ist. Abbildung 29 gibt einen Überblick über mögliche Signaltransduktionsmechanismen von G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren und RTKs, welche in die MAPK-Kaskade einmünden.

Wie in 4.1.3 beschrieben, führt eine Stimulation der Zellen mit Forskolin sowie eine Behandlung mit membranpermeablen cAMP-Analoga zur gleichen zeitabhängigen Inhibition des p-ERK-1/2-Signals wie die Stimulation des A_{2B}AR mittels NECA, was für eine Beteiligung von cAMP an der Signaltransduktion dieses AR-Subtyps in der Östrogenrezeptor-negativen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 spricht.

In der weitaus überwiegenden Anzahl der Fälle vermittelt cAMP seine Wirkung durch die Aktivierung der PKA, die je nach Zelltyp über die Aktivierung von Rap1 eine Hemmung der Raf-1-MEK-1/2-ERK-1/2-Kaskade verursacht oder über B-Raf zu einer ERK-Aktivierung führt (Stork und Schmitt, 2002; Vossler *et al.*, 1997; Goldsmith und Dhanasekaran, 2007). Mit dem Einsatz des PKA-Aktivators Sp-cAMPS kam es zu einer Inhibition des p-ERK-1/2-Signals in MDA-MB-231-Brustkrebszellen (s. 4.1.3). Jedoch konnte durch den Einsatz von PKA-Inhibitoren wie H-89, KT-5720 und RpcAMPS die NECA-induzierte Hemmung der MAPK-Aktivität nicht aufgehoben werden. Somit ergibt sich die paradoxe Situation, dass die Aktivierung der PKA zwar die ERK-1/2-Phosphorylierung inhibiert, diese andererseits aber auch in der Anwesenheit von PKA-Inhibitoren persistiert.

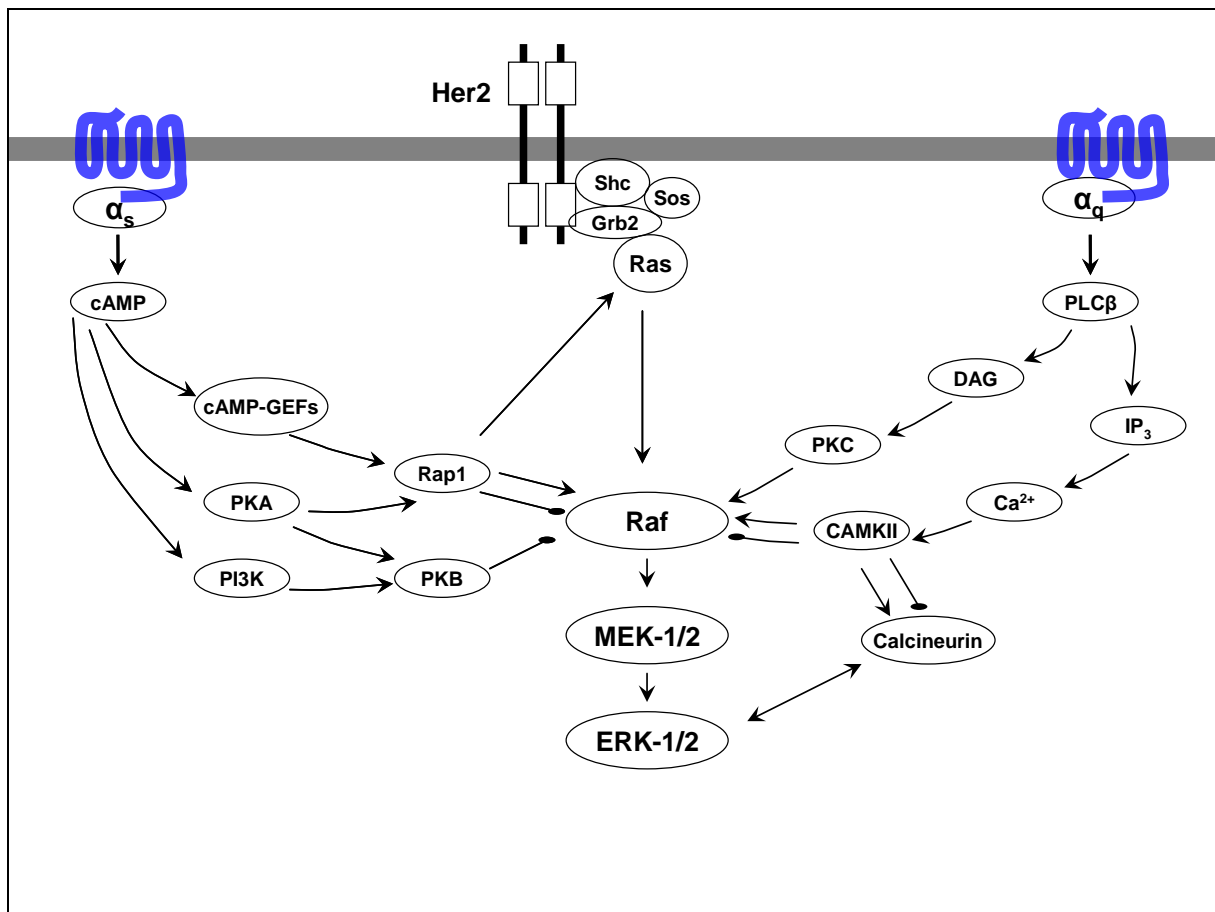


Abbildung 29: Mögliche GPCR- und RTK-vermittelte Mechanismen der ERK-Aktivierung bzw. -Inhibition [Die Abbildung ist eine selbst erstellte Übersicht. Quellen: Berridge *et al.*, 2000; Cass *et al.*, 1999; Gao *et al.*, 1999; Goldsmith und Dhanasekaran, 2007; Kang *et al.*, 2007; Lowes *et al.*, 2002; Marinissen und Gutkind, 2001; Mirabet *et al.*, 1997; Moasser, 2007; Molkentin *et al.*, 2004; Montiel *et al.*, 2007; Panjehour *et al.*, 2005; Roberts und Der, 2007; Schulte und Fredholm, 2003b; Stark und Schmitt, 2002; Vosseler *et al.*, 1997]

CHO-A_{2B}-Zellen zeigen eine cAMP-abhängige, aber PKA-unabhängige Aktivierung der MAPK-Kaskade, jedoch wurde hier eine Beteiligung der PI3K für die Signaltransduktion des A_{2B}AR festgestellt. Die PI3K kann entweder direkt oder indirekt durch cAMP, aber auch durch RTKs aktiviert werden (Schulte und Fredholm, 2003b; Lowes *et al.*, 2002; Cass *et al.*, 1999). Für die Signaltransduktion des A_{2B}AR in MDA-MB-231-Zellen spielt die PI3K keine Rolle, da die Inhibition der PI3K und der nachgeschalteten PKB keinen Einfluss auf die NECA-vermittelte Hemmung des MAPK-Signals nimmt (siehe 4.1.3).

Eine weitere Möglichkeit der cAMP-abhängigen, aber PKA-unabhängigen Signaltransduktion wäre der Rap-1-spezifische guanine nucleotide exchange factor (GEF) EPAC, welcher über B-Raf zu einer Aktivierung von ERK-1/2 führen kann (Goldsmith und Dhanasekaran, 2007). Jedoch spielt auch EPAC für die Signalweiterleitung des A_{2B}AR der MDA-MB-231 Brustkrebszelllinie keine Rolle, da der EPAC-Aktivator 8-CPT-2'-O-Me-cAMP keinen Effekt zeigte (Yadav und Klotz,

unveröffentlicht). So stellt sich die Frage, ob möglicherweise andere GEFs wie z.B. CNrasGEF, für die Signaltransduktion dieser Zelllinie von Bedeutung sein könnten (Pham *et al.*, 2000).

Als weitere Möglichkeit der cAMP-abhängigen Signaltransduktion des A_{2B}AR in der menschlichen MDA-MB-231-Brustkrebszelllinie muss diskutiert werden, ob beispielsweise cAMP-abhängige dualspezifische MAP Kinase Phosphatasen (MKPs) eine Rolle spielen (Stork und Schmitt, 2002).

Darüber hinaus stellen SGKs (serum- and glucocorticoid-inducible kinases) eine relativ neue Familie von Proteinkinasen dar, die mit der PKB verwandt sind. Ihre Expression steigt unter dem Einfluss von Steroidhormonen, Zytokinen oder osmotischem Stress. Sie können sowohl durch eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration als auch durch die PKA aktiviert werden und sind in der Lage die Raf-Kinase und somit das ERK-Signal zu inhibieren (Stork und Schmitt, 2002; Zhang *et al.*, 2001). Somit bietet sich mit den SGKs eine weitere Option für eine cAMP-abhängige Signaltransduktion, welche möglicherweise eine Rolle für MDA-MB-231-Brustkrebszellen spielen.

5.5 Ca²⁺-abhängige Signaltransduktion

In der Literatur wird mehrfach auf eine durch Stimulation des A_{2B}AR ausgelöste Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration hingewiesen, die je nach Zelllinie auf ganz unterschiedlichen Mechanismen beruht.

So beschreiben beispielsweise Feoktistov und Biaggioni (1997) eine PLCβ-abhängige Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺ in HMC-1 (human mast cells) sowie einen durch G_s-Kopplung vermittelten Ca²⁺-Influx in HEL-Zellen (human erythroleukemia cells) nach der Stimulation des A_{2B}-Adenosinrezeptors. Ein Inositolphosphat-unabhängiger Anstieg der zytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration nach der Stimulation des A_{2B}AR kann in Jurkat-T-Zellen nachgewiesen werden (Mirabet *et al.*, 1997). In HEK-293-Zellen führt die Stimulation des A_{2B}AR vermutlich zu einem G_q-abhängigen Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration (Gao *et al.*, 1999).

Für die MDA-MB-231 Östrogenrezeptor-negative Brustkrebszelllinie weisen Panjehpour *et al.* (2005) in Folge der A_{2B}AR-Stimulation ein sowohl cAMP- als auch G_i-unabhängiges Ca²⁺-Signal nach, welches durch die Inhibition der PLC mit dem spezifischen Inhibitor U-73122 verschwindet. Dieses durch A_{2B}AR-Stimulation

ausgelöste PLC-abhängige Ca^{2+} -Signal ist wahrscheinlich auf eine Aktivierung von G_q zurückzuführen. Außerdem führt die Stimulation des $A_{2B}AR$ sowohl zur Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern als auch zu einem Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} (Panjehpour *et al.*, 2005).

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass sowohl die PLC als auch Ca^{2+} für die $A_{2B}AR$ -vermittelte Hemmung der ERK-1/2-Phosphorylierung von Bedeutung sind, da eine Inhibition von PLC und Ca^{2+} die NECA-induzierte Hemmung der ERK-1/2-Phosphorylierung aufhebt. Dies ist ein indirekter Hinweis darauf, dass es sich um ein $A_{2B}AR$ -vermitteltes Ca^{2+} -Signal handelt. Um den Signalweg, über den die $A_{2B}AR$ -vermittelte Hemmung der ERK-1/2-Phosphorylierung zustande kommt, weiter zu charakterisieren, wurden verschiedene Ca^{2+} -abhängige Signalwege untersucht.

So kann freies intrazelluläres Ca^{2+} die Ras-Raf-1-ERK-Kaskade durch die Stimulation diverser Ca^{2+} -abhängiger Kinasen wie z.B. PKC-Isoenzyme, Pyk2 oder auch über die CamKII aktivieren (Marinissen und Gutkind, 2001; Montiel *et al.*, 2007; Goldsmith und Dhanasekaran, 2007). Darüber hinaus nimmt Ca^{2+} durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren Einfluss auf wichtige zelluläre Prozesse. Dies geschieht beispielsweise durch eine CamKII-abhängige Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB oder durch eine Dephosphorylierung von NF-AT durch die Stimulation des Calcineurin (Berridge *et al.*, 2000).

Calcineurin, auch als Proteinphosphatase 2B bekannt, kann je nach Zelllinie die MAPK-Kaskade aktivieren oder inhibieren. Außerdem beeinflussen sich Calcineurin und ERK gegenseitig in ihrer Aktivierung (Kang *et al.*, 2007; Molkentin, 2004).

Jedoch zeigen die Inhibition der PKC und die Hemmung der CamKII keinen Einfluss auf die NECA-vermittelte ERK-Inhibition in MDA-MB-231-Zellen. Wie unter 4.1.5 beschrieben, kann die $A_{2B}AR$ -vermittelte Inhibition der ERK-Phosphorylierung durch keinen der beiden eingesetzten Calcineurin-Inhibitoren (Cyclosporin A, FK 506) beeinflusst werden. Die Hemmung der basalen ERK-Phosphorylierung, die unter Cyclosporin A, jedoch nicht unter dem Einfluss von FK 506 beobachtet worden ist, ist vermutlich nicht auf eine Inhibition der Calcineurin-induzierten MAPK-Aktivierung, sondern eher auf einen anderen Wirkmechanismus des Cyclosporin A zurückzuführen, da diese Hemmung im Falle einer Abhängigkeit von Calcineurin auch unter FK 506 zustande kommen müsste.

Ein weiterer Mechanismus, der untersucht wurde, ist die Blockade von TRPC-Kanälen mittels KB-R7943. TRPC 3, 6 und 7 sind nicht-selektive Ca^{2+} -permeable

Kanäle, die durch Abbauprodukte des PIP_2 aktiviert werden, wobei der Kanal TRPC 6 in Brustkrebszellen stark exprimiert wird (Lemonnier *et al.*, 2007; Prevarskaya *et al.*, 2007). Jedoch zeigt auch die Hemmung dieser Kanäle keinen Einfluss auf die NECA-induzierte Hemmung der ERK-1/2-Phosphorylierung in MDA-MB-231-Zellen (siehe 4.1.5).

Somit konnte nicht geklärt werden, über welchen Ca^{2+} -abhängigen Mechanismus die NECA-vermittelte Hemmung der ERK-Aktivität zustande kommt, da eine Beteiligung sowohl der PKC und der CamKII als auch des Calcineurin und der TRPC-Kanäle weitgehend ausgeschlossen werden kann.

Es stellt sich nun die Frage nach dem Zusammenhang zwischen der cAMP- und Ca^{2+} -abhängigen Signaltransduktion des $\text{A}_{2\text{B}}$ AR in MDA-MB-231-Brustkrebszellen:

Eine denkbare Verbindung wären beispielsweise CNG-Kanäle (cyclic nucleotide gated channels), die aufgrund ihrer Modulierbarkeit durch zyklische Nukleotide wie cAMP eine molekulare Verbindung zwischen GPCR-Kaskaden und Ca^{2+} -Signalen herstellen. Meist handelt es sich dabei um Ca^{2+} -Kanäle, deren Aktivität durch die intra- und extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration reguliert wird (Zufall *et al.*, 1997).

5.6 Hemmung der Proliferation der MDA-MB-231-Brustkrebszellen durch $\text{A}_{2\text{B}}$ -Adenosinrezeptor-Stimulation und Tyrosinkinase-Inhibition

Wie bereits erwähnt, ist die aktivierte ERK in der Lage durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren das Wachstum und die Proliferation von Zellen zu beeinflussen (Schaeffer und Weber, 1999). Deshalb wurden mögliche wachstumshemmende Wirkungen jener Substanzen überprüft, für die im Rahmen dieser Arbeit eine Hemmung der MAPK-Aktivität nachgewiesen werden konnte. Dies trifft zum einen auf den Her2-Inhibitor Emodin und den src-Kinase-Inhibitor PP2 zu, andererseits auch auf den AR-Agonisten NECA, der durch die Stimulation des $\text{A}_{2\text{B}}$ -Adenosinrezeptors eine zeitabhängige Inhibition der ERK-Phosphorylierung induziert.

Unter 4.4 wird beschrieben, dass MDA-MB-231-Brustkrebszellen nach der Inkubation mit dem Agonisten NECA eine signifikante Proliferationshemmung erfahren. Jedoch zeigt der eigentlich potentere AR-Agonist PHPNECA eine weniger ausgeprägte Wirkung auf das Zellwachstum als NECA. Dieses Phänomen ist möglicherweise auf rezeptorunabhängige Angriffspunkte des AR-Agonisten NECA zurückzuführen. So wird beispielsweise beschrieben, dass AR-Agonisten via A_3AR eine zum Teil

rezeptorunabhängige, hemmende Wirkung in bestimmten Brustkrebszelllinien entfalten können. Diese Adenosinrezeptor-unabhängige Wirkung kann zum einen durch die Bindung an unidentifizierte Membranrezeptoren oder aber nach der Aufnahme in die Zelle via Nukleotidtransporter durch eine direkte Interaktion mit Adenosin-bindenden Proteinen zustande kommen (Lu *et al.*, 2003; Chung *et al.*, 2006).

Daneben führt auch die Behandlung der Brustkrebszellen mit Emodin und PP2 zu einer signifikanten Wachstumshemmung, wobei der src-Kinase-Inhibitor PP2 eine stärkere Wachstumshemmung zeigt als Emodin.

Zhang *et al.* (1995) belegen, dass Emodin das Wachstum jener Brustkrebszellen supprimiert, welche den Her2-Rezeptor überexprimieren. So konnte für MDA-MB-453-Brustkrebszellen, welche Her2 sehr stark exprimieren, durch die Behandlung mit Emodin eine Wachstumshemmung durch die Repression der Proliferation nachgewiesen werden, ohne dass es dabei zur Induktion von Apoptose kommt. Darüber hinaus beobachtete diese Arbeitsgruppe in MDA-MB-231-Brustkrebszellen nur eine geringe Wachstumshemmung durch Emodin, was durch die fehlende Überexpression des Her2 begründet wird.

Unter diesen Aspekten ist das Phänomen einer stärkeren und länger andauernden Wachstumshemmung der MDA-MB-231-Brustkrebszellen unter dem Einfluss des src-Kinase-Inhibitors PP2 im Vergleich zu Emodin zu erklären, konnte doch gezeigt werden, dass MDA-MB-231 Zellen bei normaler Her2-Expression eine höhere Expression von c-src aufweisen (Belsches-Jablonsik *et al.*, 2001).

Mögliche Erklärungen für das Verschwinden der wachstumshemmenden Wirkung über die Zeitspanne von 8 – 24 Stunden wäre zum Beispiel der Abbau der Inhibitoren Emodin und PP2 bzw. des Agonisten NECA, deren Konzentration dadurch unter die notwendigen Wirkungsspiegel sinken würde, oder eine Desensibilisierung der Membranrezeptoren. Im Falle von Emodin und PP2 wurde dieser Aspekt in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Für A_{2B}AR konnte jedoch gezeigt werden, dass eine 24-stündige Inkubation der MDA-MB-231-Brustkrebszellen mit NECA zwar zu keiner Reduktion der Rezeptorzahl im Sinne einer Rezeptor Down-Regulation durch Degradation oder reduzierte Synthese, jedoch zu einem Funktionsverlust der A_{2B}AR führt. Dies begründet den lediglich transienten Effekt des Agonisten NECA sowohl auf die Hemmung der ERK-Phosphorylierung als auch auf die Proliferationshemmung. Eine derartige Agonisten-induzierte Desensibilisierung von

A_{2B}AR wurde bereits für COS-7-Zellen beschrieben (Peters *et al.*, 1998). Außerdem haben Untersuchungen gezeigt, dass ein Threoninrest (Thr²⁹⁸) am C-Terminus des A_{2A}AR, der sich in der Nähe der siebten transmembranen Domäne befindet, für die schnelle Agonisten-vermittelte Desensibilisierung des A_{2A}AR verantwortlich ist. Da sich eine ähnliche Situation auch beim A_{2B}AR (Thr³⁰⁰) findet, wäre es durchaus denkbar, dass dieser Mechanismus auch für die beobachtete Desensibilisierung des A_{2B}AR nach Stimulation mit dem Agonisten NECA eine Rolle spielt (Feoktistov und Biaggioni, 1997).

5.7 Adenosinrezeptoren als potentieller Angriffspunkt zur Brustkrebstherapie?

Wie zu Beginn bereits erwähnt, induziert eine Hypoxie, welche im Rahmen der Proliferation solider Tumoren auftritt, eine Erhöhung der extrazellulären Adenosinkonzentration, die wiederum die Proliferation von Tumoren begünstigt. Angesichts der Tatsache dass unter diesen pathologischen Bedingungen Adenosinspiegel erreicht werden, welche eigentlich zu einer Stimulation der A_{2B}AR führen müssten, stellt sich die Frage, ob es hier auch *in vivo* eventuell nach einer initialen Proliferationshemmung zu einer Desensibilisierung der A_{2B}AR und folglich zum weiteren Wachstum der malignen Zellen kommt. Eine derartige Desensibilisierung unter pathophysiologischen Bedingung wurde bereits von Breschi *et al.* (2007) für die glatte Atemwegsmuskulatur beschrieben. Somit wäre es wichtig, Substanzen zu finden, die in der Lage sind, die Rezeptordesensibilisierung aufzuheben, um möglicherweise eine permanente A_{2B}AR-vermittelte Proliferationshemmung zu erzielen.

Demgegenüber steht jedoch die Tatsache, dass Adenosin durch die Stimulation von Mastzell- und Endothelzell-A_{2B}AR die Angiogenese und somit indirekt das Tumorstadium begünstigt. Daraus ergibt sich das Problem, dass einerseits eine Agonisten-Stimulation der A_{2B}AR der Brustkrebszellen eine potentielle Möglichkeit der Wachstumshemmung bietet, auf der anderen Seite aber die Stimulation der A_{2B}AR beispielsweise von in nächster Nachbarschaft zum Tumor liegenden Mastzellen das Wachstum des Tumors begünstigt.

Deshalb stellt sich die Frage, ob beispielsweise eine Blockade von Mast- bzw. Endothelzell-A_{2B}AR bei einer gleichzeitigen Unterbindung der Rezeptordesensibilisierung in den Brustkrebszellen möglich ist, um das Tumorstadium an zwei

unterschiedlichen Angriffspunkten zu bekämpfen, oder ob es eventuell auch in Mast- und Endothelzellen zur Desensibilisierung der $A_{2B}AR$ kommt. Denkbar ist jedoch auch, dass nach der Blockade der $A_{2B}AR$ sämtlicher Zellen im Tumorgewebe (Mast, Endothel- und Brustkrebszellen) Adenosin die Proliferation der malignen Zellen durch $A_{2B}AR$ -unabhängige Mechanismen beeinflussen kann (Chung *et al.*, 2006).

Andererseits stellt sich die Frage, ob eine Reduktion der Adenosinkonzentration beispielsweise durch die Bindung des ‚freien‘ Adenosins oder den Einsatz von AR-Antagonisten eventuell ein effektiver Ansatzpunkt ist, um die Adenosin-induzierte Beeinträchtigung der Immunantwort aufzuheben und auf diese Art und Weise dem Tumorwachstum entgegenzuwirken. Immunzytokine bieten eine weitere Option, die das Einwandern und die Aktivierung von Immuneffektorzellen in das Tumorgewebe begünstigen und eine Immunantwort gegen den Tumor auslösen (Lode *et al.*, 1998), welche durch Adenosin verhindert wird.

Demgegenüber steht die Beobachtung, dass nur ein Teil der soliden Tumore zu einer Erhöhung der Adenosinkonzentration führt (Spychala, 2000). Somit besteht die Möglichkeit, dass auch bei dieser aggressiven Form von Brustkrebs normale Adenosinkonzentrationen vorliegen, so dass tatsächlich eine therapeutische Gabe von $A_{2B}AR$ -Agonisten eine viel versprechende Therapieoption darstellen, wenn man die Rezeptordesensibilisierung verhindern könnte.

5.8 Perspektiven

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass der AR-Agonist NECA via $A_{2B}AR$ -Stimulation in der Lage ist, das Wachstum der Östrogenrezeptor-negativen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 zu hemmen und auch die proliferationshemmende Wirkung von Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Emodin und PP2 zu verstärken.

Jedoch wirft die transiente Wachstumshemmung des Adenosin-Agonisten NECA, die auf eine Desensibilisierung des $A_{2B}AR$ zurückzuführen ist, neue Fragen auf:

Welcher molekulare Mechanismus steht hinter der Desensibilisierung der $A_{2B}AR$ in MDA-MB-231-Brustkrebszellen? Kann dieser Mechanismus durchbrochen werden und ergibt sich daraus die Möglichkeit einer permanenten Wachstumshemmung der MDA-MB-231-Brustkrebszellen? Wie lange dauert der Zustand der Rezeptordesensibilisierung an? Ist nach der Überführung der Zellen in ein Agonisten-freies Medium wieder eine Stimulation des $A_{2B}AR$ möglich? Könnte man die

Desensibilisierung des $A_{2B}AR$ ausschalten, so würden AR-Agonisten beispielsweise in Kombination mit Tyrosinkinase-Inhibitoren, wie dem bereits heute im klinischen Einsatz befindlichem Her2-Inhibitor Trastuzumab, eine neue Chance in der Therapie des aggressiven Östrogenrezeptor-negativen Brustkrebs darstellen. Weiterhin sind auch ‚downstream targets‘ des Her2-Rezeptors, wie zum Beispiel ras oder raf, als mögliche therapeutische Angriffspunkte in Betracht zu ziehen (Roberts und Der, 2007).

Ein weiteres Problem, neben der Desensibilisierung des $A_{2B}AR$ stellt jedoch die Tatsache dar, dass zum gegenwärtigen Zeitpunkt praktisch keine selektiven $A_{2B}AR$ -Agonisten existieren, woraus sich wiederum über andere AR-Subtypen vermittelte, unerwünschte Wirkungen wie zum Beispiel Bradykardien, Bronchospasmen oder auch eine Hemmung der Thrombozytenaggregation ergeben könnten.

Somit bleibt es das Ziel der zukünftigen Forschung, selektive AR-Agonisten zu entwickeln und die Mechanismen der $A_{2B}AR$ -Desensibilisierung in MDA-MB-231 Östrogenrezeptor-negativen Brustkrebszellen aufzuklären.

6 Zusammenfassung

Sowohl MAPK als auch Adenosin werden mit der Tumorpheriferation und der Angiogenese in Verbindung gebracht. MDA-MB-231 Östrogenrezeptor-negative Brustkrebszellen weisen eine sehr starke Expression des $A_{2B}AR$, des einzigen von dieser Zelllinie exprimierten Adenosinrezeptors, auf.

Es konnte gezeigt werden, dass MDA-MB-231-Brustkrebszellen eine hohe basale MAPK-Aktivität aufweisen, welche durch die Stimulation mit FCS nicht weiter gesteigert werden kann. Dieses hohe basale MAPK-Signal wird durch die src-Kinase und Her2 verursacht, da eine Inhibition dieser beiden Tyrosinkinase eine Hemmung der basalen ERK-Phosphorylierung induziert.

Interessanterweise führt die Stimulation des $A_{2B}AR$ der MDA-MB-231-Brustkrebszellen mit dem unselektiven Agonisten NECA zu einer zeitabhängigen Inhibition der ERK-1/2-Phosphorylierung. Eine Behandlung der Brustkrebszelllinie mit 10 μM CGS 21680 hatte keinen Einfluss auf die ERK-Aktivität, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass die zeitabhängige Inhibition der ERK-1/2-Phosphorylierung durch den $A_{2B}AR$ vermittelt wird.

Eine Beteiligung von cAMP an der MAPK-Signaltransduktion des $A_{2B}AR$ scheint insofern wahrscheinlich, da sowohl eine Behandlung der Zellen mit Forskolin als auch der Kombination aus cAMP-AM und dem PDE4-Inhibitor Rolipram eine zeitabhängige Hemmung der ERK-1/2-Phosphorylierung induziert. Jedoch scheint weder die PKA noch die PI3K an dieser Signaltransduktion des $A_{2B}AR$ beteiligt zu sein, da die $A_{2B}AR$ -vermittelte Inhibition der MAPK in Anwesenheit von PKA- und PI3K-Inhibitoren bestehen bleibt. Ebenso scheinen cAMP-GEFs wie beispielsweise EPAC in diesem Zusammenhang keine Rolle zu spielen.

In Gegenwart des PLC-Inhibitors U-73122 und des Ca^{2+} -Chelators BAPTA verschwindet die NECA-induzierte Hemmung der ERK-1/2-Phosphorylierung, was für eine Beteiligung der PLC und des Ca^{2+} an der $A_{2B}AR$ -vermittelten Hemmung der MAPK-Aktivität spricht. Letztlich konnte jedoch kein Mechanismus eruiert werden, der diese $A_{2B}AR$ -vermittelte, Ca^{2+} -abhängige MAPK-Hemmung mediert, da weder eine Inhibition der PKC, der CamKII oder des Calcineurins Einfluss auf die NECA-induzierte MAPK-Hemmung hatten.

Was das Wachstum und die Proliferation der Östrogenrezeptor-negativen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 anbelangt, so konnte gezeigt werden, dass der unselektive Agonist NECA zu einer geringfügigen, aber signifikanten

Wachstumshemmung dieser Brustkrebszelllinie führt. Allerdings kommt es aufgrund einer Desensibilisierung der $A_{2B}AR$ in MDA-MB-231-Brustkrebszellen lediglich zu einem transienten proliferationshemmenden Effekt nach der Stimulation mit NECA.

7 Literaturverzeichnis

Adeyinka A., Nui Y., Cherlet T., Snell L., Watson P.H., Murphy L.C., Activated Mitogen-activated Protein Kinase Expression during Human Breast Tumorigenesis and Breast Cancer Progression, Clin. Cancer Res. 8 (2002) 1747-1753

Belsches-Jablonski A.P., Biscardi J.S., Peavy D.R., Tics D.A., Romney D.A., Parsons S.J., Src family kinases and HER2 interactions in human breast cancer cell growth and survival, Oncogene 20 (2001) 1465-1475

Berridge M.J., Lipp P., Bootman M.D., The Versatility And Universality Of Calcium Signalling, Mol. Cell Biol. 1 (2000) 11-21

Biscardi J.S., Belsches A.P., Parsons S.J., Characterization of Human Epidermal Growth Factor Receptor and c-Src Interactions in Human Breast Tumor Cells, Mol. Carcinogenesis 21 (1998) 261-272

Biscardi J.S., Ishizawa R.C., Silva C.M. Parsons S.J., Tyrosine kinase signalling in breast cancer – Epidermal growth factor receptor and c-Src interactions in breast cancer, Breast Cancer Res. 2 (2000) 203-210

Blay J., White T.D., Hoskin D.W., The Extracellular Fluid of Solid Carcinomas Contains Immunosuppressive Concentrations of Adenosine, Cancer Res. 57 (1997) 2602-2605

Bonni A., Brunet A., West A.E., Datta S.R., Takasu M.A., Greenberg M.E., Cell Survival Promoted by the Ras-MAPK Signaling Pathway by Transcription-Dependent and –Independent Mechanisms, Science 286 (1999) 1358-1362

Breschi, M.C. et al., In vivo adenosine A_{2B} receptor desensitization in guinea-pig airway smooth muscle: Implications for asthma, Eur. J. Pharmacol. (2007), doi:10.1016/j.ejphar.2007.07.051

Cass L.A., Summers S.A., Prendergast G.V., Backer J.M., Birnbaum M.J., Meinkoth J.L., Protein Kinase A-Dependent and –Independent Signaling Pathways Contribute to Cyclic AMP-Stimulated Proliferation, Mol. Cell Biol. 19 (1999) 5882-5891

Chang L., Karin M., Mammalian MAP kinase signalling cascades, Nature 410 (2001) 37-40

Chapal J., Loubatières-Mariani M.M., Petit P., Roye M., Evidence for an A₂-subtype adenosine receptor on pancreatic glucagon secreting cells, Br. J. Pharmacol. 86 (1985) 565-569

Chen Y., Epperson S., Makhsudova L., Ito B., Suarez J., Dillmann W., Villarreal F., Functional effects of enhancing or silencing adenosine A_{2b} receptors in cardiac fibroblasts, Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 287 (2004) H2478-H2486

Chijiwa T., Mishima A., Hagiwara M., Sano M., Hayashi K., Inoue T., Naito K., Toshioka T., Hidaka H., Inhibition of Forskolin-induced Neurite Outgrowth and Protein Phosphorylation by a Newly Synthesized Selective Inhibitor of Cyclic AMP-dependent Protein Kinase, N-[2-(p-Bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D Pheochromocytoma Cells, Biol. Chem. 265 (1990) 5267-5272

Choi S.-E., Shin H.-C., Kim H.-E., Lee S.-J., Jang H.-J., Lee K.-W., Kang Y., Involvement of Ca²⁺, CaMK II and PKA in EGb 761-induced insulin secretion in INS-1 cells, J. Ethnopharmacol. 110 (2007) 49-55

Chung H., Jung J.-Y., Cho S.-D., Hong K.-A., Kim H.-J., Shin D.-H., Kim H., Kim H.O., Shin D.H., Lee H.W., Jeong L.S., Kong G., The antitumor effect of LJ-529, a novel agonist to A₃ adenosine receptor, in both estrogen receptor-positive and estrogen receptor-negative human breast cancers, Mol. Cancer Ther. 5 (2006) 685-692

Cristalli G., Camaioni E., Costanzi S., Vittori S., Volpini R., Klotz K.-N., Characterization of Potent Ligands at Human Recombinant Adenosine Receptors, Drug Dev. Res. 45 (1998) 176-181

Cronstein B.N., Daguma L., Nichols D., Hutchinson A.J., Williams M., The Adenosine/Neutrophil Paradox Resolved: Human Neutrophils Possess Both A₁ and A₂ Receptors that Promote Chemotaxis and Inhibit O₂⁻ Generatio, Respectively, J. Clin. Invest. 85 (1990) 1150-1157

Daré E., Schulte G., Karovic O., Hammarberg C., Fredholm B.B., Modulation of glial cell functions by adenosine receptors, Physiology & Behaviour 92 (2007) 15-20

Davis D.D., Díaz-Cruz E.S., Landini S., Kim Y.-W., Brueggemeier R.W., Evaluation of synthetic isoflavonese on cell proliferation, estrogen receptor binding affinity, and apoptosis in human breast cancer cells, J. Ster. Biochem. Mol. Biol. 108 (2008) 23-31

Dhillon A.S., Hagan S., Rath O., Kolch W., MAP kinase signalling pathways in cancer, Oncogene 26 (2007) 3279-3290

Dobson J.G., Jr., Mechanism of adenosine inhibition of catecholamine-induced responses in heart, Circ. Res. 52 (1983) 151-160

Elia M.G., Muscella A., Romano S., Greco S., Di Jeso, B., Verri T., Storelli C., Marsigliante, Effects of extracellular nucleotides in the thyroid: P2Y₂ receptor-mediated ERK1/2 activation and c-Fos induction in PC C13 cells, Cell. Signal. 17 (2005) 739-749

El Yacoubi M., Ledent C., Ménard J.-F., Parmentier M., Costentin J., Vaugeois J.-M., The stimulant effects of caffeine on locomotor behaviour in mice are mediated through its blockade of Adenosine A_{2A} receptors, Br. J. Pharmacol. 129 (2000) 1465-1473

English J.M., Cobb M.H., Pharmacological inhibitors of MAPK pathways, Trends Pharmacol. Sci. 23 (2002) 40-45

Feoktistov I., Biaggioni I., Adenosine A_{2B} Receptors, Pharmacol. Rev. 49 (1997) 381-402

Feoktistov I., Polosa R., Holgate S.T., Biaggioni I., Adenosine A_{2B} receptors: a novel therapeutic target in asthma?, Trends Pharmacol. Sci. 19 (1998) 148-153

Feoktistov I., Ryzhov S., Goldstein A.E., Biaggioni I., Mast Cell-Mediated Stimulation of Angiogenesis – Cooperative Interaction between A_{2B} and A₃ Adenosine Receptors, Circ. Res. 92 (2003) 485-492

Feoktistov I., Goldstein A.E., Biaggioni I., Role of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase and Extracellular-Regulated Kinase Kinase in Adenosine A_{2B} Receptor-Mediated Interleukin-8 Production in Human Mast Cells, Mol. Pharmacol. 55 (1999) 726-734

Fredholm B.B., S.23. Caffeine as an adenosine receptor antagonist, European Neuropsychopharmacol. 14 (2004) S156-S157

Fredholm B.B., IJzerman A.P., Jacobson K.A., Klotz K.N., Linden J., International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors, Pharmacol. Rev. 53 (2001) 527-552

Gadbois D.M., Crissman H.A., Tobey R.A., Bradbury E.M., Multiple kinase arrest points in the G₁ phase of nontransformed mammalian cells are absent in transformed cells, Cell Biol. 89 (1992) 8626-8630

Gao Z., Chen T., Webers M.J., Linden J., A_{2B} Adenosine and P2Y₂ receptors Stimulate Mitogen-activated Protein Kinase in Human Embryonic Kidney-293 Cells, J. Biol. Chem. 274 (1999) 5972-5980

Goldsmith Z.G., Dhanasekaran D.N., G Protein regulation of MAPK networks, Oncogene 26 (2007) 3122-3142

Giffin N.J., Kowacs F., Libri V., Williams P., Goadsby P.J., Kaube H., Effect of adenosine A₁ receptor agonist GR79236 on trigeminal nociception with blink reflex recordings in healthy human subjects, Cephalgia 23 (2003) 287-292

Haneda M., Araki S.-I., Sugimoto T., Togawa M., Koya D., Kikkawa R., Differential inhibition of mesangial MAP kinase cascade by cyclic nucleotides, Kidney Int. 50 (1996) 384-391

Haskó G., Pacher P., Deitch E.A., Vizi E.S., Shaping of monocyte and macrophage function by adenosine receptors, Pharmacol. Ther. 113 (2007) 264-275

Hillaire-Buys D., Chapal J., Bertrand G., Petit P., Loubatières-Mariani M.M., Purinergic receptors on insulin-secreting cells, Fundam. Clin. Pharmacol. 8 (1994) 117-127

Hiscox S., Morgan L., Green T., Nicholson R.I., Src as a therapeutic target in anti-hormone/anti-growth factor-resistant breast cancer, Endocrine-Related Cancer 13 (2006) 53-59

Ishizawar R.C., Miyake T., Parsons S.J., Src modulates ErbB2 and ErbB3 heterocomplex formation and function, Oncogene 26 (2007) 3503-3510

Iwamoto T., Kita S., Uehara A., Inoue Y., Taniguchi Y., Imanaga I., Shigewaka M., Structural Domains Influencing Sensitivity to Isothiourea Derivate Inhibitor KB-R7943 in Cardiac Na⁺/Ca²⁺ Exchanger, Mol. Pharmacol. 59 (2001) 524-531

Jacobson K.A., Gao Z.G., Adenosine Receptors as therapeutic targets, Nature Rev. 5 (2006) 247-264

Kang, Y.J., Kusler B., Otsuka M., Hughes M., Suzuki N., Suzuki S., Yeh W.-C., Akira S., Han J., Jones P., Calcineurin Negatively Regulates TLR-Mediated Activation Pathways, J. Immunol. 179 (2007) 4598-4607

Khisti R.T., Chopede C.T., Abraham E., GABAergic involvement in motor effects of an adenosine A_{2A} receptor agonist in mice, Neuropharmacology 39 (2003) 1004-1015

Klein J.M., McCarthy T.A., Inhibition of tyrosine kinase activity decreases expression of surfactant protein A in a human lung adenocarcinoma cell line independent of epidermal growth factor receptor, Biochim. Biophys. Acta 1355 (1997) 218-230

Klotz K.-N., Hessling J., Hegler J., Owman C., Kull B., Fredholm B.B., Lohse M.J., Comparative pharmacology of human adenosine receptor subtypes – characterization of stably transfected receptors in CHO cells, Naunyn-Schmiedberg's Arch. Pharmacol. 357 (1998) 1-9

Lemonnier L., Trebak M., Putney jr. J.W., Complex regulation of the TRPC3, 6 and 7 channels subfamily by diacylglycerol and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, Cell Calc. (2007), doi: 10.1016/j.ceca.2007.09.001

Lev D.C., Kim L.S., Melnikova V., Ruiz M., Ananthaswamy H.N., Price J.E., Dual blockade of EGFR and ERK1/2 phosphorylation potentiates growth inhibition of breast cancer cells, Br. J. Cancer 91 (2004) 795-802

Levitzki A., Mishani E., Tyrophostins and Other Tyrosine Kinase Inhibitors, Annu. Rev. Biochem. 75 (2006) 93-109

Lode H.N., Xiang R., Becker J.C., Gillies S.D., Reisfeld R.A., Immunocytokines: A Promising Approach to Cancer Immunotherapy, Pharmacol. Ther. 80 (1998) 277-292

Lowes V.L., Ip N.Y., Wong Y.H., Integration of Signals from Receptor Tyrosine Kinases and G Protein-Coupled Receptors, Neurosign. 11 (2002) 5-19

Lu J., Pierron A., Ravid K., An Adenosine Analogue, IB-MECA, Down-Regulates Estrogen Receptor α and Suppresses Human Breast Cancer Cell Proliferation, Cancer Res. 63 (2003) 6413-6423

MacKenzie S.J., Houslay M.D., Action of rolipram on specific PDE4 cAMP phosphodiesterase isoforms and on the phosphorylation of cAMP-response-element-binding protein (CREB) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase in U973 monocytic cells, Biochem. J. 347 (2000) 571-578

Marinissen M.J., Gutkind J.S., G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms, Trends Pharmacol. Sci. 22 (2001) 368-376

Merighi S., Mirandola P., Varani K., Gessi S., Leung E., Baraldi P.G., Tabrizi M.A., Borea P.A., A glance at adenosine receptors: novel target for antitumor therapy, Pharmacol. Ther. 100 (2003) 31-48

Merighi S., Benini A., Mirandola P., Gessi S., Varani K., Simioni C., Leung E., MacLennan S., Baraldi G.P., Borea P.A., Caffeine Inhibits Adenosine-Induced Accumulation of Hypoxia-Inducible Factor-1 α , Vascular Endothelial Growth Factor, and Interleukin-8 Expression in Hypoxic Human Colon Cancer Cells, Mol. Pharmacol. 72 (2007) 395-406

Mirabet M., Mallol J., Lluís C., Franco R., Calcium mobilization in Jurkat cells via A_{2b} adenosine receptors, Br. J. Pharmacol. 122 (1997) 1075-1082

Moasser M.M., The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis, Oncogene 26 (2007) 6469-6487

Modlinger P.S., Welch W.J., Adenosine A1 receptor antagonists and the kidney, Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. 12 (2003) 497-502

Molkentin J.D., Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs, Cardiovasc. Res. 63 (2004) 467-475

Montiel M., Quesada J., Jiménez E., Activation of calcium-dependent kinases and epidermal growth factor receptor regulate muscarinic acetylcholine receptor-mediated MAPK/ERK activation in thyroid epithelial cells, Cell. Signal. 19 (2007) 2138-2146

Panjehpour M., Castro M., Klotz K.N., Human breast cancer cell line MDA-MB-231 expresses endogenous A_{2B} adenosine receptors mediating a Ca²⁺ signal, Br. J. Pharmacol. 145 (2005) 211-218

Peart J.N., Headrick J.P., Adenosinergic cardioprotection: Multiple receptors, multiple pathways, Pharmacol. Ther. 114 (2007) 208-221

Pérez-Vallina J.R., Revuelta M.P., Cantabrana B., Hidalgo A., Effect of Rp Diastereoisomer of Adenosine 3',5' cyclic-monophosphothioate on the cAMP-dependent relaxation of smooth muscle, Life Sciences 61 (1997) 869-880

Peters D.M., Gies E.K., Gelb C.R., Peterfreund R.A., Agonist-Induced Desensitization of A_{2B} Adenosine Receptors, Biochem. Pharmacol. 55 (1998) 873-882

Pham N., Cheglakov I., Koch C.A., de Hoog C.L., Moran M.F., Rotin D., The guanine nucleotide exchange factor CNras GEF activates Ras in response to cAMP and cGMP, Curr. Biol. 10 (2000) 555-558

Prevarskaya N., Zhang L., Barritt G., TRP channels in cancer, Biochim. Biophys. Acta 1772 (2007) 937-946

Roberts P.J., Der C.J., Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer, Oncogene 26 (2007) 3291-3310

Rosales O.R., Eades B., Assali A.R., Cardiovascular Drugs: Adenosine Role in Coronary Syndromes and Percutaneous Coronary Interventions, Cathet. Cardiovasc. Diagn. 62 (2004) 358-363

Sato T., Sasaki N., O'Rourke B., Marbán E., Adenosine Primes the Opening of Mitochondrial ATP-Sensitive Potassium Channels: A key-step in Ischemic Preconditioning?, Circulation 102 (2000) 800-805

Sawynok J., Adenosine receptor activation and nociception, Eur. J. Pharmacol. 317 (1998) 1-11

Schaeffer H.J., Weber M.J., Mitogen-activated Protein Kinases: Specific Messages from Ubiquitous Messengers, Mol. Cell. Biol. 19 (1999) 2435-2444

Schulte G., Fredholm B.B., Human Adenosine A₁, A_{2A}, A_{2B}, and A₃ Receptors Expressed in Chinese Hamster Ovary Cells All Mediate the Phosphorylation of Extracellular-Regulated Kinase ½, Mol. Pharmacol. 58 (2000) 477-482

Schulte G., Fredholm B.B., Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases, Cell. Signal. 15 (2003a) 813-827

Schulte G., Fredholm B.B., The G_s-coupled adenosine A_{2B} receptor recruits divergent pathways to regulate ERK1/2 and p38, Exp. Cell Res. 290 (2003b) 168-176

Sebastião A.M., Ribeiro J.A., Adenosine A₂ receptor-mediated excitatory actions on the nervous system, Prog. Neurobiol. 48 (1996) 167-189

Seger R., Krebs E.G., The MAPK signalling cascade, FASEB J. 9 (1995) 726-735

Shryock J.C., Belardinelli L., Adenosine and Adenosine Receptors in the Cardiovascular System: Biochemistry, Physiology, and Pharmacology, Am J Cardiol 79 (1997) 2-10

Sipka S., Kovács I., Szántó S., Szegedi G., Brugós L., Bruckner G., Szentmiklósi A.J., Adenosine inhibits the release of interleukin-1 β in activated human peripheral mononuclear cells, Cytokine 31 (2005) 258-263

Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C., Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid, Anal. Biochem. 150 (1985) 76-85

Spychala J., Tumor-promoting functions of adenosine, Pharmacol. Ther. 87 (2000) 161-173

Stevens B., Porta S., Haak L.L., Gallo V., Fields R.D., Adenosine: a neuron-glia transmitter promoting myelination in the CNS in response to action potentials, Neuron 36 (2002), 855-868

Stork P.J.S., Schmitt J.M., Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation, Trends Cell Biol. 12 (2002) 258-266

Tang Q., Jin M.-W., Xiang J.-Z., Dong M.-Q., Sun H.-Y., Lau C.-P., Li G.-R., The membrane permeable calcium chelator BAPTA-AM directly blocks human ether a-go-go-related gene potassium channels stably expressed in HEK 293 cells, Biochem. Pharmacol. 74 (2007) 1596-1607

Vallon V., Mühlbauer B., Osswald H., Adenosine and Kidney Function, Physiol. Rev. 86 (2006) 901-940

Vossler M.R., Yao H., York R.D., Pan M.-G., Rim C.S., Stork P.J.S., cAMP Activates MAP Kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-Dependent Pathway, Cell 89 (1997) 73-82

Wiechelmann K.J., Braun R.D., Fitzpatrick J.D., Investigation of the Bicinchoninic Acid Protein Assay: Identification of the groups responsible for color formation, Anal. Biochem. 175 (1988) 231-237

Xu J., Loo G., Different Effects of Genistein on Molecular Markers Related to Apoptosis in Two Phenotypically Dissimilar Breast Cancer Cell Lines, J. Cell. Biochem. 82 (2001) 78-88

Xu K., Bastia E., Schwarzschild M., Therapeutic potential of adenosine A_{2A} receptor antagonists in Parkinson's disease, Pharmacol. Ther. 105 (2005) 267-310

Yang S., Zhou Q, Yang X., Caspase-3 status is a determinant of the differential responses to genistein between MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells, Biochim. Biophys. Acta 1773 (2007) 903-911

Yasuda N., Inoue T., Horizoe T., Nagata K., Minami H., Kawata T., Hoshino Y., Harada H., Yoshikawa S., Asano O., Nagaoka J., Murakami M., Abe S., Kobayashi S., Tanaka I., Functional characterization of the adenosine receptor contributing to glycogenolysis and gluconeogenesis in rat hepatocytes, Eur. J. Pharmacol. 459 (2003) 159-166

Zhang, B.-H., Tang E.D., Zhu T., Greenberg M.E., Vojtek A.B., Guan K.-L., Serum- and Glucocorticoid-inducible Kinase SGK Phosphorylates and Negatively Regulates B-Raf, J. Biol. Chem. 276 (2001) 31620-31626

Zhang L., Chang C., Bacus S.S., Hung M.-C., Suppressed Transformation and Induced Differentiation of HER-2/neu-overexpressing Breast Cancer Cells by Emodin, Cancer Res. 55 (1995) 3890-3896

Zufall F., Shepherd G.M., Barnstable C.J., Cyclic nucleotide gated channels as regulators of CNS development and plasticity, Curr. Opin. Neurobiol. 7 (1997) 404-412

Danksagung

Ein herzliches Dankeschön möchte ich an dieser Stelle an alle richten, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Klotz, danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und für die gute Betreuung der Arbeit. Auch möchte ich mich dafür bedanken, dass er mir die aktive Teilnahme am Pharmakologenkongress ermöglicht hat.

Herrn Prof. Dr. Dietl danke ich für das Interesse an meiner Arbeit und die freundliche Übernahme des Koreferates.

Für die Einführung in verschiedene Methoden sowie für die Unterstützung während meiner Zeit im Labor möchte ich mich bei Sonja Kachler, Kristina Lorenz, Sandra Dorsch, Michaela Hofmann, Christian Dees und der AG Schön bedanken.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich an dieser Stelle auch bei meinen Eltern, die mir das Studium und die Promotion erst ermöglicht und mich stets unterstützt haben. Außerdem möchte ich mich bei meinen Freunden für ihr immer offenes Ohr bedanken.