

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. M.J. Lohse

**Identifizierung und pharmakologische Charakterisierung von Adenosinrezeptoren
in humanen Melanomzelllinien**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Karsten Rübeling

aus

Homberg / Efze

Würzburg, Dezember 2014

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

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. H. Schulze

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 11.06.2015

Der Promovend ist Zahnarzt.

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

<u>I. EINLEITUNG</u>	<u>1</u>
1. Adenosin	1
2. Adenosinrezeptoren	2
2.1. G-Protein gekoppelte Rezeptorsubtypen	2
2.2. Effektoren der Adenosinrezeptoren	4
2.3. Physiologische und pathophysiologische Aspekte der Adenosinrezeptoren	5
2.3.1. Funktionen des A ₁ -Adenosinrezeptors	6
2.3.2. Funktionen des A _{2A} -Adenosinrezeptors	7
2.3.3. Funktionen des A _{2B} -Adenosinrezeptors	8
2.3.4. Funktionen des A ₃ -Adenosinrezeptors	9
3. Adenosin und Krebs	12
3.1. Humanes Melanom	13
3.2. Adenosinrezeptoren in humanen Tumorzellen	15
4. Fragestellung und Zielsetzung	17
<u>II. MATERIAL UND METHODEN</u>	<u>18</u>
1. Materialien	18
1.1. Chemikalien	18
1.2. Verbrauchsmaterialien	19
1.3. Geräte	19
1.4. Puffer und Medien	20
1.5. Zelllinien	21
2. Methoden	22
2.1. Zellkultur	22
2.2. Membranpräparation	22
2.3. Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford	23
2.4. Radioligandenbindung	24
2.5. Versuche zur Adenylylcyclase-Aktivität	27

<u>III. ERGEBNISSE</u>	<u>32</u>
1. Eigenschaften der verwendeten Zelllinien	32
2. Radioligandenbindung	33
2.1. Identifizierung von A ₁ -AR mit [³ H]CCPA	33
2.2. Identifizierung von A ₃ -AR mit [³ H]HEMADO	33
2.3. Identifizierung von A _{2A} -AR mit [³ H]NECA	34
2.4. Identifizierung von A _{2A} - und A _{2B} -AR mit [³ H]ZM 241385	34
3. Messung der Rezeptor-vermittelten Stimulation der Adenylylcyase	37
3.1. Rezeptor-vermittelte Stimulation der Adenylylcyase	37
3.2. Stimulation der Adenylylcyase mit den Agonisten NECA und CGS 21680	38
3.3. Hemmung der Agonist-stimulierten Adenylylcyase Aktivität mit Antagonisten	40
<u>IV. DISKUSSION</u>	<u>45</u>
1. Adenosinrezeptoren und Hautkrebs	45
2. Nachweis von Adenosinrezeptoren in Melanomzellen	46
2.1. Versuche zum Nachweis von A ₁ - und A ₃ -Adenosinrezeptoren	46
2.2. Nachweis von A _{2A} - und A _{2B} -Adenosinrezeptoren	47
2.2.1. Radioligand [³ H]ZM 241385	48
2.2.2. NECA und CGS 21680 an A _{2B} -AR	48
2.2.3. Bindungsexperimente zum Nachweis von A _{2A} - und A _{2B} -Adenosinrezeptoren	49
2.2.4. Stimulation einer rezeptorgekoppelten Adenylylcyase-Aktivität	50
2.2.5. Wirkung von selektiven Antagonisten auf die NECA-stimulierte Adenylylcyase-Aktivität	52
3. Adenosinrezeptoren und deren Einfluss in Tumoren	53
3.1. A ₁ - und A ₃ -Adenosinrezeptoren in Tumorgeweben	53
3.2. A _{2A} -Adenosinrezeptoren in Tumorgeweben	54
3.3. A _{2B} -Adenosinrezeptoren in Tumorgeweben	55
4. Adenosinrezeptoren als Ansatzpunkt in der Therapie von Hauttumoren	57

V. ZUSAMMENFASSUNG	59
VI. LITERATURVERZEICHNIS	61
VII. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	67
VIII. TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS	69
1. Tabellen	69
2. Abbildungen	69
Danksagung	70
Lebenslauf	71

I. EINLEITUNG

1. Adenosin

Das aus der Base Adenin und dem Zucker D-Ribose aufgebaute Purinnukleosid ist im menschlichen Körper nicht nur als Baustein einer Vielzahl von biochemischen Strukturen ubiquitär vorhanden, sondern erfüllt auch zahlreiche regulatorische Aufgaben in den grundlegenden physiologischen Vorgängen einer Körperzelle. Einerseits ist es am Aufbau und der Umsetzung des menschlichen Genoms als Baustein der Nukleinsäuren (RNA) beteiligt, andererseits stellt es als Teil der energiereichen Verbindung ATP den für biologische Prozesse nötigen „Kraftstoff“ bereit. Des Weiteren ist Adenosin bei der Ausführung zahlreicher biochemischer Reaktionen in Form von Co-Enzymen, wie dem NADH, mitbeteiligt.

Bereits in Untersuchungen der 1970er Jahre stellte sich heraus, dass Purinnukleoside nicht nur in Form von „second-messenger“-Verbindungen wie dem cAMP an der intrazellulären Übertragung von Signalen beteiligt sind, sondern dass Adenosin selbst eine große Rolle als extrazelluläres Signalmolekül spielt.

Ersten Erkenntnissen über die bradykarde Wirkung am Herz im Jahr 1929 (Drury und Szent-Gyorgyi, 1929) folgten zahlreiche weitere Untersuchungen zu der Physio- und Pathophysiologie des Adenosins. So ist die Wirkung von Adenosin auf zellregulatorische Prozesse in fast allen Geweben und Organen des Körpers nachgewiesen worden. Es wirkt beispielsweise hemmend auf den allgemeinen Entzündungsprozess (Linden, 2001), modulierend auf das Immunsystem (Spsychala, 2000) und fördernd auf die Wundheilung (Merighi et al., 2003).

Unter physiologischen Bedingungen befindet sich das intra- sowie extrazellulär vorkommende Adenosin über Nukleosid-Transporter in der Zellmembran durch erleichterte Diffusion in einem ständigen Fließgleichgewicht (Fredholm et al., 2001a). Die Konzentration im Extrazellulärraum liegt hierbei in einem Bereich von 30 - 300 nM (Ballarin et al., 1991). Der Abbau von Adenosin zu Inosin erfolgt durch intra- sowie extrazellulär vorkommende Adenosin-Desaminasen. Weiterhin kann es mit Hilfe von Adenosinkinasen zu AMP phosphoryliert oder zu S-Adenosylhomocystein konvertiert werden (Fredholm et al., 2001a).

Fällt bei einer erhöhten Stoffwechselaktivität vermehrt Adenosin an, kommt es zu einem entsprechenden Anstieg der extrazellulären Adenosinkonzentration. Außerdem ist extrazelluläres ATP, das durch bestimmte Hydrolasen („ekto-ATPase, ekto-ATP-diphosphohydrolasen“) zu Adenosin abgebaut wird, als eine der Hauptquellen für einen Anstieg des extrazellulären Adenosins (Fredholm et al., 2001a) bekannt.

Stark erhöhte extrazelluläre Adenosinkonzentrationen kommen in erster Linie unter physiologischen oder pathophysiologischen Bedingungen vor, die mit einem erhöhten Energieverbrauch, einer verminderten Sauerstoffversorgung oder einem vermehrten Zelluntergang einhergehen (Spychala, 2000; Schulte und Fredholm, 2003).

2. *Adenosinrezeptoren*

2.1. G-Protein gekoppelte Rezeptorsubtypen

Als Purinnukleosid wirkt Adenosin als spezifischer Ligand an einer Untergruppe der Familie der Purin-Rezeptoren (siehe Abbildung [1]). Von den Adenosinrezeptoren (AR) sind bisher vier Subtypen bekannt, die in A_{1-} , A_{2A-} , A_{2B-} und A_{3-} AR (Fredholm et al., 2001a) unterteilt werden.

Diese Rezeptoren bestehen aus sieben, die Zellmembran durchspannende Proteindomänen, die durch drei extra- und drei intrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind. Der N-Terminus dieser Proteinstruktur liegt extrazellulär, wohingegen sich der C-Terminus an der Innenseite der Zellmembran befindet, an welcher die AR mit einem heterotrimer aufgebauten G-Protein interagieren. Eine Ligandenbindung des Rezeptors aktiviert das G-Protein, was die beiden funktionellen Untereinheiten G_{α} und $G_{\beta\gamma}$ freisetzt, mit denen Enzyme, wie beispielsweise die Adenylylcyclase (AC) aktiviert oder inhibiert werden können.

Ursprünglich wurden die AR auf der Basis ihrer Wirkung auf das membranständige Enzym Adenylylcyclase (AC) in einen stimulatorischen und einen inhibitorischen Typ unterteilt (van Calcar et al., 1979; Londos et al., 1980). Die stimulatorischen AR des Subtyps A_{2A} und A_{2B} vermitteln über das stimulatorische G-Protein G_s die Aktivierung der AC und einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration. Die inhibitorischen Subtypen A_1 und A_3 hemmen dagegen die AC über das inhibitorische G-Protein G_i und

erniedrigen somit den intrazellulären cAMP-Spiegel. Die Lebensdauer von cAMP ist auf Grund des intrazellulären Abbaus durch Phosphodiesterasen (PDE) auf kurze Zeiträume beschränkt.

Trotz neuerer Erkenntnisse, dass AR neben der AC auch in der Lage sind andere Signalwege anschalten zu können (Fredholm et al., 2001a), gibt diese Unterteilung in zwei Grundtypen (siehe Abbildung [1]) das noch heute anerkannte generelle Wirkungsprinzip der G-Protein-gekoppelten AR wieder (Schulte und Fredholm, 2003).

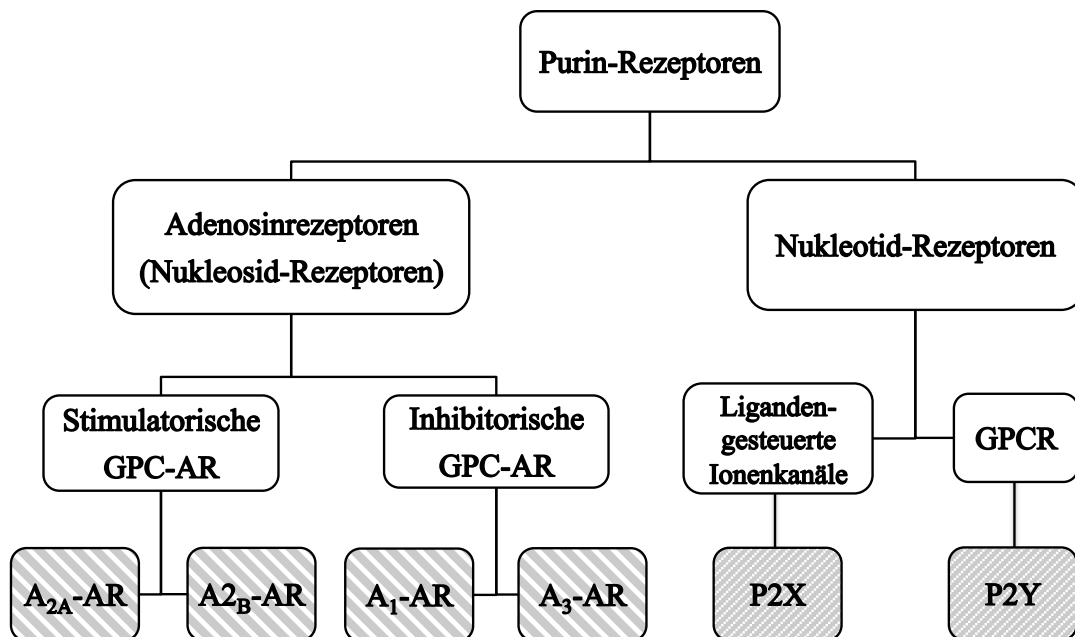


Abbildung [1]: Die Familie der Purin-Rezeptoren

Die Adenosinrezeptoren (AR) bilden die Gruppe der Nukleosid-Rezeptoren, die neben den Nukleotid-Rezeptoren eine Untergruppe der Purin-Rezeptoren darstellen. Die G-Protein-gekoppelten Adenosinrezeptoren (GPC-AR) können weiter in einen stimulatorischen und einen inhibitorischen Typ eingeteilt werden.

Die vielseitigen Effekte von Adenosin hängen zum einen von der Expressionsdichte der einzelnen AR Subtypen in verschiedenen Geweben ab, andererseits werden sie von der extrazellulären Adenosinkonzentration bestimmt. So reagieren die A₁-, A₃- sowie A_{2A}-AR auf Adenosinkonzentrationen schon im nanomolaren Bereich, wohingegen der A_{2B}-AR weitaus höhere Konzentrationen für eine Stimulation benötigt (Feoktistov und Biaggioni, 1997).

2.2. Effektoren der Adenosinrezeptoren

Die Aktivierung des A_1 -AR führt über die Wirkung des Pertussistoxin-sensitiven G_i zu einer verminderten AC-Aktivität und somit zu einer abfallenden cAMP-Konzentration in der Zelle. Die Folge ist eine Reduzierung der Proteinkinase A (PKA) Aktivität und die Abnahme von nachgeschalteten phosphorylierten Substraten. Eine Stimulation des A_1 -AR kann ebenfalls zu einer Aktivierung der Phospholipase C (PLC) führen. So sind A_1 -AR im Weiteren mit der Aktivierung von K^+ -Kanälen und der Hemmung von Ca^{2+} -Kanälen verknüpft, die den Erregungszustand der Zelle beeinflussen.

Ähnliche Effektoren weist der A_3 -AR auf, der wie A_1 zu den inhibitorischen AR zählt. Beide Subtypen leiten durch die Stimulation der PLC die Spaltung von Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP_2) ein, dessen Spaltprodukte Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diazylglyzerin (DAG) unter anderem einen Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} bzw. eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) zur Folge haben können (Fredholm et al., 2001a; Jacobson und Gao, 2006).

Im Gegensatz dazu stehen die beiden stimulatorischen AR des Subtyps A_2 . Der A_{2A} -AR vermittelt über stimulatorisches $G_{s/olf}$ eine Konzentrationserhöhung des intrazellulären cAMP (Fredholm et al., 2001a), was im Folgenden zu einer Aktivierung der PKA führt. Über die Wirkung auf Proteinkinasen können zahlreiche weitere Signalkaskaden initialisiert werden. Die cAMP-abhängige PKA beeinflusst beispielsweise über den Transkriptionsfaktor CREB (cAMP response element-binding protein) die Genexpression im Zellkern (Jacobson und Gao, 2006).

Der A_{2B} -AR stimuliert durch seine Kopplung an G_s wie A_{2A} -AR die cAMP-abhängigen Signalwege. Daneben besitzt der A_{2B} -AR durch eine G_q -vermittelte Stimulation der PLC auch Einfluss auf den IP_3 -Signalweg und die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration (Fredholm et al., 2001a; Jacobson und Gao, 2006).

Abhängig von dem untersuchten Zelltyp können alle vier AR-Subtypen an die Signalwege der Mitogen-aktivierten-Proteinkinasen (MAPK) gekoppelt sein, die eine große Rolle in der Regulation der Proliferation, der Differenzierung und des Zelltods spielen (Fredholm et al., 2001a; Raman et al., 2007).

Die MAP-Kinasen, bestehend aus der ERK-1/2, der JNK- und der p38-MAPK, bilden ein komplexes Netzwerk der Signalübertragung, welches über viele zwischengeschaltete Enzyme und Phosphorylierungsschritte zur Aktivierung von

Transkriptionsfaktoren wie CREB oder NF- κ B (Nuklear Faktor kappa B) führt. Letztlich wird so die Genexpression reguliert und es werden auf diesem Weg die Apoptose und andere zelluläre Funktionen beeinflusst (Schulte und Fredholm, 2003). Die AR erreichen die MAPK über die PKC oder über den Weg der Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) und der Aktivierung der PKB (Jacobson und Gao, 2006).

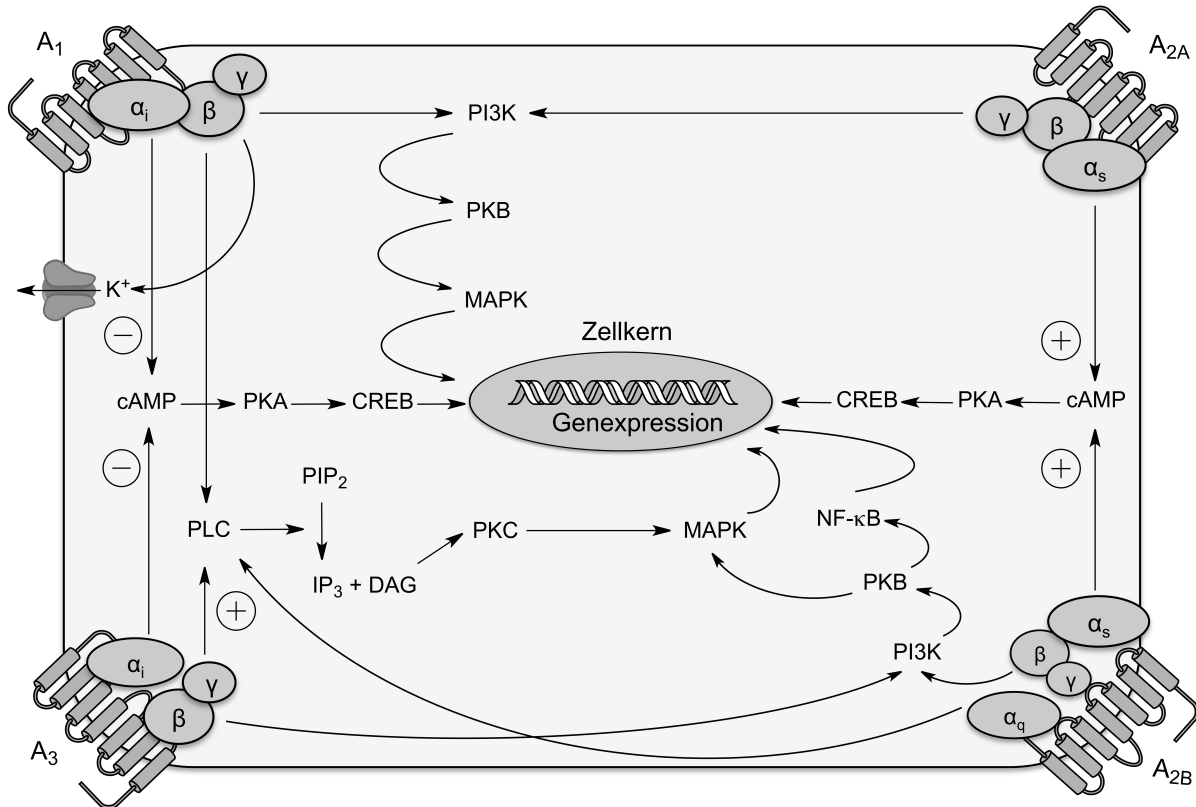


Abbildung [2]: Signalwege der vier Adenosinrezeptoren

Erläuterungen zur Abbildung: PKA, Proteinkinase A; CREB, cAMP response element-binding protein; PI3K, Phosphoinositid-3-Kinase; PKB, Proteinkinase B; MAPK, Mitogen-aktivierte-Proteinkinase; NF- κ B, Nuklear Faktor kappa B; PLC, Phospholipase C; PIP₂, Phosphatidylinositolbisphosphat; IP₃, Inositoltrisphosphat; DAG, Diacylglycerin, PKC, Proteinkinase C; [Abbildung modifiziert nach Jacobson und Gao (2006)]

2.3. Physiologische und pathophysiologische Aspekte der Adenosinrezeptoren

Die physiologische Antwort auf ein „Adenosinsignal“ ist sehr komplex und hängt neben der Expression verschiedener AR-Subtypen in unterschiedlichen Geweben bzw. Organen auch von der jeweiligen Stoffwechselsituation ab. Im Vordergrund steht als

eine der wichtigsten physiologischen Aufgaben des Adenosins, der Schutz von Zellen und Geweben vor Schäden durch Sauerstoffmangel, Traumen, Hypertension oder Anfallsleiden (Poulsen und Quinn, 1998). Im Folgenden sind einige Beispiele zu der Verteilung und der Funktion der vier AR beschrieben. Tabelle [1] gibt einen zusammenfassenden Überblick.

2.3.1. Funktionen des A₁-Adenosinrezeptors

Der A₁-AR ist am stärksten im Bereich des Zentralnervensystem (ZNS) exprimiert, wo er im Groß- und Kleinhirn über den Hippocampus bis in das Rückenmark verteilt ist (Fredholm et al., 2001a). Der „Adenosin-vermittelte Zellschutz“ durch A₁-AR reduziert die Ausschüttung von exzitatorischen Neurotransmittern wie Glutamat und reguliert die neuronale Aktivität auf prä- sowie postsynaptischer Ebene (Spsychala, 2000; Gessi et al., 2011b). Eine überschießende Ausschüttung an Neurotransmittern aufgrund von übermäßigem Stress, Traumen oder Krampfanfällen führt zur Degeneration von Neuronen und im weiteren zu Gehirnschäden bis hin zum Gehirntod (Poulsen und Quinn, 1998). Die Aktivierung des A₁-AR ist an sedativen, anxiolytischen und antikonvulsiven Effekten auf den Körper beteiligt (Gessi et al., 2011b) und bewirkt durch seinen Einfluss auf das nozizeptive System eine Minderung der Schmerzwahrnehmung (Antinozizeption) (Giffin et al., 2003).

Mit Hilfe einer „ischämischen Präkonditionierung“, einem Effekt, der über eine PKC-vermittelte Aktivitätssteigerung der ATP-abhängigen K⁺-Kanäle der Mitochondrien umgesetzt wird, werden das Herz und andere Organe vor kurzzeitigen Zuständen der Ischämie und Hypoxie geschützt (Sato et al., 2000; Fredholm et al., 2001a). Darüber hinaus wirkt Adenosin über A₁-AR negativ-inotrop, -dromotrop und -chronotrop auf die Herzaktivität und inhibiert durch Hemmung der Ausschüttung von Katecholaminen die beta-adrenerge Stimulation (Shryock und Belardinelli, 1997).

In der Niere ist der A₁-Rezeptorsubtyp, im Gegensatz zu der sonstigen A_{2A}-vermittelten dilatorischen Wirkung des Adenosins auf die Blutgefäße, für eine Vasokonstriktion der afferenten Arteriolen der Nierenglomeruli verantwortlich. Seine Aktivierung verringert die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) und den renalen Blutfluss (RBF), was sich im weiteren Verlauf auf den Salz- und Flüssigkeitshaushalt des Körpers auswirkt. Mit der Entwicklung von A₁-AR-Antagonisten werden neue Ansätze für die medikamentöse

Therapie von Hypertension und Ödemen erhofft (Vallon et al., 2006; Gessi et al., 2011b).

A₁-AR wurden auch in großer Dichte auf Fettzellen gefunden, deren Aktivierung die Lipolyse und die freien Fettsäuren im Kreislauf reduzieren und somit als potentiell Ziel für die Behandlung von Diabetes und Hyperlipidämie dienen könnten (Dhalla et al., 2009).

2.3.2. Funktionen des A_{2A}-Adenosinrezeptors

A_{2A}-AR sind am dichtesten in Zellen des ZNS, vorallem in den Basalganglien unterhalb der Großhirnrinde und des Immunsystems zu finden (Fredholm et al., 2001a). Im Gehirn steigert Adenosin über den A_{2A}-AR die Freisetzung von diversen Neurotransmittern wie Acetylcholin, Noradrenalin, Aspartat und Glutamat (Sebastiao und Ribeiro, 1996). Im Gegensatz dazu hemmt die Aktivierung des A_{2A}-AR innerhalb der Basalganglien die Freisetzung des Neurotransmitters Dopamin. Durch eine antagonistische Wirkung zwischen A_{2A}-AR und dopaminerge D₂-Rezeptoren hemmt Adenosin über die Ausschüttung des Neurotransmitters GABA die Freisetzung des Dopamins (Khisti et al., 2000). Dies führte zu dem Versuch, A_{2A}-Antagonisten für die Behandlung des Morbus Parkinson zu entwickeln (Armentero et al., 2011).

Im Zusammenhang mit dem A_{2A}-AR ist auch die anregende Wirkung der Genussmittel Koffein und Theophyllin zu sehen, die auf die Inhibition der A_{2A}-AR-vermittelten Hemmung von dopaminergen Neuronen zurückzuführen ist (Fredholm, 1995). Bei der Wirkung auf das nozizeptive System agieren A_{2A}- und auch A₃-AR bei ihrer Aktivierung als Gegenspieler zum A₁-Rezeptorsubtyp pro-nozizeptiv (Giffin et al., 2003).

Als eines der wichtigsten Kennzeichen zum Schutz des ZNS, des Herzens und anderen Gewebe vermittelt der A_{2A}-Rezeptorsubtyp eine Adenosin-abhängige Vasodilatation und vermindert die Aggregation der Thrombozyten (Gessi et al., 2000; Spychala, 2000). Spezifische A_{2A}-Agonisten finden bereits Anwendung bei der Untersuchung von Herzkranzgefäßen oder sind noch in der klinischen Erprobung für die Therapie von Erkrankungen im kardiovaskulären System (Gessi et al., 2011b). Im Fall eines ischämischen Insult oder der Traumatisierung von Geweben verringert der ansteigende Adenosinspiegel über die Aktivierung von A_{2A}-AR die Entzündungsreaktion nach

erfolgter Wiederdurchblutung. Weiter wird die Wundheilung angeregt sowie die Ausbildung von neuen Blutgefäßen gefördert (Fredholm et al., 2001a; Merighi et al., 2003).

Die überwiegend immunsuppressive und anti-inflammatorische Wirkung entfaltet Adenosin maßgeblich über den A_{2A}-Rezeptorsubtyp. Es vermindert über A_{2A}-AR die Ausschüttung von entzündungsfördernden Zytokinen wie dem Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), dem Interleukin-2 (IL-2) und mehreren Makrophagen-Entzündungsproteinen (MIP). Die Aktivierung und Reifung von T-Zellen werden unterdrückt und die Freisetzung von anti-inflammatorischen Zytokinen (IL-10) gefördert. Weiterhin wird die Funktion und Interaktion von Makrophagen, Lymphozyten und NK-Zellen gemindert (Spychala, 2000; Gessi et al., 2011b). Im Bereich chronischer Entzündungsleiden konnten Untersuchungen an Arthritis-Patienten eine Beeinflussung des Krankheitsverlaufs durch A_{2A}-AR-Aktivierung entdeckt werden, was therapeutische Ansätze für die Behandlung degenerativer Gelenkerkrankungen verspricht (Varani et al., 2010). Neben der Verteilung in ZNS und Immunsystem ist auch seit längerem die Rolle des A_{2A}-AR im Glukosehaushalt bekannt, dessen Aktivierung im Pankreas zu einer erhöhten Ausschüttung von Glukagon führt (Chapal et al., 1985).

2.3.3. Funktionen des A_{2B}-Adenosinrezeptors

Der A_{2B}-AR besitzt eine sehr weitreichende Verteilung im menschlichen Körper und wird in nahezu jedem Organ vermutet, was sich unter anderem mit der Expression des A_{2B}-Subtyps auf den ubiquitär im menschlichen Körper vorkommenden Fibroblasten erklären ließe (Feoktistov und Biaggioni, 1997). In kardialen Fibroblasten kann eine Aktivierung des A_{2B}-AR zu einer Hemmung des Zellwachstums und insbesondere der Kollagensynthese führen (Dubey et al., 1998). Ein pharmakologischer Ansatzpunkt wird darin gesehen, das Herz vor beispielsweise einer Hypertension assoziierten Herzmuskelhypertrophie zu bewahren und so eine Herzinsuffizienz zu verhindern (Merighi et al., 2003).

A_{2B}-AR konnten weiter in Zellen des blutbildenden Systems, des Endothels von Blutgefäßen, des Immunsystems, des Darmepithels und in Muskelzellen der glatten Muskulatur nachgewiesen werden (Feoktistov und Biaggioni, 1997).

In Bezug auf die Ausbildung neuer Gefäße konnte neben dem A_{2A} - auch dem A_{2B} -AR ein Einfluss auf die Angiogenese nachgewiesen werden. Durch die Aktivierung der auf Endothelzellen des mikrovaskulären Gefäßnetzes zahlreich vorkommenden A_{2B} -AR kommt es zur Proliferation der Endothelzellen und zu einer gesteigerten Expression von angiogenetischen Faktoren, wie dem „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) und IL-8 sowie fibroblastischen Wachstumsfaktoren (Feoktistov et al., 2002; Gessi et al., 2011a).

Weiterhin spielt der A_{2B} -AR in spezifischen Gefäßen, wie den Mesenterial-, Lungen- oder Koronararterien, eine wichtige Rolle bei der durch Adenosin vermittelten Vasodilatation, die sonst im allgemeinen Gefäßnetz überwiegend durch A_{2A} -AR gesteuert wird (Gessi et al., 2011b).

Auf Zellen der Immunabwehr, wie Endothelzellen, Mastzellen und dendritischen Zellen, fördert die Stimulation von A_{2B} -AR die Produktion und Degranulation von inflammatorischen Zytokinen und die Ausbildung von entzündlichem Granulationsgewebe (Hasko et al., 2009). Bei chronischen Entzündungen der Atemwege, deren Ätiologie eng mit dem Zusammenspiel von glatter Muskulatur, Fibroblasten und Mastzellen verbunden ist, wird in A_{2B} -AR ein vielversprechendes pharmakologisches Ziel in der Therapie von Asthma bronchiale und chronisch-obstruktiver Lungenerkrankungen (COPD) gesehen (Hasko et al., 2009).

Weiter beeinflusst Adenosin die Aktivität des „cystic fibrosis conductance regulators“ (CFTR), einem Cl^- -Kanal und ist so an der Steuerung der Sekretion von Cl^- -Ionen im Darm- und Bronchialepithel beteiligt (Clancy et al., 1999; Rosales et al., 2004).

2.3.4. Funktionen des A_3 -Adenosinrezeptors

Der A_3 -AR ist ebenfalls in einer Vielzahl von Geweben des Körpers vorhanden. Dazu zählen u.a. Lunge, Niere, Herz, Gehirn, Leber, Milz, Blase und Abschnitte des Darms (Jacobson und Gao, 2006).

Im Gehirn spielt der A_3 -AR eine große Rolle bei neuroprotektiven Prozessen. Durch eine „ischämische Präkonditionierung“ werden neuronale Zellen und Zellverbände vor Schäden durch kurze Phasen der Unterversorgung bewahrt. Bei kurzzeitigen unterschwelligen ischämischen Phasen stabilisiert die A_3 -AR-Aktivierung das Zytoskelett, die Einleitung der Apoptose wird verhindert und eine Regeneration der

Zelle wird ermöglicht. Bei länger dauernder Ischämie steigt hingegen die Rezeptoraktivierung an, was zu einer geförderten Induzierung des Zelltods führt. Dieser AR-vermittelte Zelltod ermöglicht die Isolierung irreversibel geschädigter Gewebssareale von noch regenerationsfähigen Bereichen des Gehirns (Abbraccio und Cattabeni, 1999).

Die präkonditionierende Wirkung gegenüber Phasen der Ischämie durch A_3 -AR ist gemeinsam mit dem A_1 -AR auch für das Herz und andere Gewebe bekannt (Fredholm et al., 2001a).

Ähnlich wie der A_{2A} -AR spielt auch der A_3 -AR eine Rolle bei Entzündungs- und Immunreaktionen. So kann die dämpfende Wirkung auf das Entzündungsgeschehen nach ischämischen Ereignissen auch durch A_3 -AR vermittelt werden. Zum Beispiel sind A_3 -AR an der verminderten Ausschüttung von TNF- α aus neutrophilen Granulozyten beteiligt, ebenso an einer gehemmten Chemotaxis eosinophiler Granulozyten (Feoktistov et al., 1999; Gessi et al., 2002).

Die Beispiele zur Verteilung und Wirkung der vier AR im menschlichen Organismus sind in Tabelle [1] zusammengefasst.

Tabelle [1]: Übersicht zum Vorkommen der AR-Subtypen und deren Funktion

AR-Subtyp	Gewebe / Organ	Wirkung
A_1 AR	ZNS	Ischämische Präkonditionierung (Jacobson und Gao, 2006); Hemmung der Schmerzwahrnehmung (Giffin et al., 2003); Sedative und anxiolytische Wirkung (Gessi et al., 2011b); Hemmung der Neurotransmitterfreisetzung (Lohse et al., 1987)
	Herz	Ischämische Präkonditionierung (Sato et al., 2000; Fredholm et al., 2001a); Reduktion der Herzaktivität, -kontraktilität und Erregungsleitung (Shryock und Belardinelli, 1997)
	Niere	Minderung der glomerulären Filtrationsrate und des renalen Blutflusses (Vallon et al., 2006)
	Fettgewebe	Hemmung der Lipolyse (Dhalla et al., 2009)

A _{2A} AR	ZNS	Freisetzung von diversen Neurotransmittern (Sebastiao und Ribeiro, 1996); Hemmung der Dopamin-Ausschüttung (Khisti et al., 2000); Förderung der Schmerz Wahrnehmung (Giffin et al., 2003)
	Blut	Hemmung der Thrombozytenaggregation (Gessi et al., 2000)
	Blutgefäße	Vasodilatation (Shryock und Belardinelli, 1997); Förderung der Angiogenese und der Wundheilung (Merighi et al., 2003)
	Immunsystem	Immunsuppression; Hemmung von pro-inflammatorischer und Ausschüttung anti-inflammatorischer Zytokine (Spychala, 2000)
	Pankreas	Sekretionsförderung von Glukagon (Chapal et al., 1985)
A _{2B} AR	Herz	Hemmung des Fibroblastenwachstums und der Kollagensynthese (Dubey et al., 1998)
	Immunsystem	Steigerung der Mastzelldegranulation und Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine (Hasko et al., 2009)
	Blutgefäße	Vasodilatation spezifischer Blutgefäße (Gessi et al., 2011b), Modulation der Expression von angiogenetischen Wachstumsfaktoren (Feoktistov et al., 2002)
	Darm- und Bronchialepithel	Steuerung der Sekretion von Cl ⁻ -Ionen (Clancy et al., 1999; Rosales et al., 2004)
A ₃ AR	ZNS	Neuroprotektive Prozesse, ischämische Präkonditionierung (Abbraccio und Cattabeni, 1999); Förderung der Schmerz Wahrnehmung (Giffin et al., 2003)
	Herz	Ischämische Präkonditionierung (Fredholm et al., 2001a)
	Immunsystem	Verminderte TNF- α -Ausschüttung aus neutrophiler Granulozyten (Gessi et al., 2002); Hemmung der Chemotaxis eosinophiler Granulozyten (Feoktistov et al., 1999);

3. Adenosin und Krebs

Die Entartung einer Körperzelle bis hin zu einer manifesten tumorösen Läsion ist ein komplexer Prozess, der sich auf unzähligen Ebenen der Zellphysiologie abspielt. Dementsprechend sind die körpereigenen Sicherungsmechanismen gegen eine Mutation oder Transformation im menschlichen Körper ebenfalls enorm vielschichtig, was die Anfälligkeit des Menschen im Verhältnis zu seiner Lebenszeit relativ gering hält. Die Entartung einer Zelle basiert auf der Ausbildung von „neuen“ Fähigkeiten, die sie im Laufe der Pathogenese die körpereigene Abwehr und Reparaturmechanismen überwinden lässt. Selbststeuerung der Wachstumssignale, Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen, Resistenz gegenüber der Apoptose, unbegrenztes Replikationspotential, Neoangiogenese, Invasierung benachbarter Strukturen und Metastasierung kennzeichnen die maligne-mutierten Körperzellen (Hanahan und Weinberg, 2000).

Die Mutation führt dazu, dass ein Tumor und seine entarteten Zellen unter völlig anderen Bedingungen als physiologische Zellen wachsen. Entartete Zellen entziehen sich der Koordinierung ihrer Differenzierung, Proliferation und Ernährung mit anderen Zellen und Strukturen. Das radikale und ignorante Wachstum entarteter Zellen macht den Aufbau einer organisierten Gewebestruktur unmöglich. Es kommt zum Aufbau eines ineffizienten Gefäßsystems, was zu einer Unterversorgung mit Blut und Sauerstoff der Tumorzellen führt (Merighi et al., 2003).

Adenosin spielt eine zentrale Rolle im Energiehaushalt jeder Körperzelle. Nach Spaltung von ATP entsteht Adenosin als Antwort auf energieverbrauchende Prozesse und korreliert mit dem Energiebedarf der Zelle. Unter „angespannten“ Bedingungen, wie beispielsweise bei einem Sauerstoffmangel aufgrund eines gesteigerten Metabolismus, kann es zur Entstehung enormer Mengen an Adenosin kommen (Schulte und Fredholm, 2003).

Als Zeichen einer inadäquaten Stoffwechselsituation im Inneren der Zelle versucht Adenosin der Unterversorgung an Energie und Nährstoffen entgegenzuwirken (Spychala, 2000). Es reguliert über seine Rezeptoren die Neubildung von Gefäßen unter hypoxischen und ischämischen Bedingungen sowie die Steuerung von anti-inflammatorischen Prozessen (Linden, 2001).

Adenosin interagiert über seine Rezeptoren an zahlreichen Stellen mit den Signalwegen des Zellwachstums und des programmierten Zelltods, der Apoptose (Jacobson et al., 1999). Ein unausgewogener oder entgleister Wachstumszyklus der Körperzellen, in dem sich Proliferation und Apoptose nicht mehr im Gleichgewicht befinden, führt zu hypertrophen Strukturen und letztlich zu Krebs (Merighi et al., 2003).

Unter unkontrolliertem Wachstum kommt es zur Ausbildung von tumorösen Veränderungen, deren insuffizientes Gefäßnetz zu Hypoxie führt und es folglich zur Ansammlung von Adenosin kommt. Diese pathologischen Bedingungen kennzeichnen die Verhältnisse in soliden Tumoren, in deren Extrazellulärflüssigkeit 10- bis 20fach höhere Adenosinkonzentrationen (0,2 - 2,4 μM) als in benachbarten physiologischen Strukturen gefunden wurden (Blay et al., 1997). Derart hohe Adenosinkonzentrationen sind in der Lage, innerhalb der Tumorstruktur eine selbst induzierte immunsuppressive Wirkung zu entfalten, indem Adenosin die Funktion von Zellen und die Produktion von Proteinen der Immunantwort beeinflusst (Merighi et al., 2003). Eine intakte Funktionsfähigkeit des körpereigenen Immunsystems ist für eine erfolgreiche Abwehr entarteter Zellen und tumoröser Strukturen unverzichtbar. Mit einer der ersten Verknüpfungen zwischen Adenosin und der Entstehung von Tumoren wurden bei Untersuchungen von Immunabwehrzellen gefunden (Gessi et al., 2011a).

Die zentralen Einflüsse auf die Stimulation des Wachstums, auf die Sicherstellung der Ernährung und auf die Regulation der körpereigenen Immunantwort des Adenosins im Rahmen einer zell- und organschützenden Funktion sind überall im Körper vorhanden und beeinflussen das Verhalten von sowohl gesunden als auch von entarteten Zellen.

In vielen Typen von Tumorzellen wurden mittlerweile die Expression und die Funktion von Adenosinrezeptoren nachgewiesen, was zu einer Verknüpfung von Adenosin und der Entstehung von Krebserkrankungen geführt hat (Spsychala, 2000; Merighi et al., 2003).

3.1. Humanes Melanom

Das humane Melanom ist ein bösartiger Tumor, der von den pigmentproduzierenden Zellen der Haut, den Melanozyten oder Nävuszellen, ausgeht. Aufgrund seiner

häufigen, dunklen „Melanin-farbenen“ Erscheinung, wird bei dieser Krebserkrankung im Volksmund auch von dem „schwarzen Hautkrebs“ gesprochen.

Es stellt eine maligne Neoplasie dar, die alle Eigenschaften der Malignität einschließlich destruierendem Wachstum und Absiedelung in andere Körperorgane zur Erscheinung bringen kann. Es stellt eine der häufigsten dermalen Krebserkrankungen mit letalem Ausgang dar. Neben der Krebserkrankung der Lunge bei Frauen besitzt keine tumoröse Neubildung eine vergleichbar steigende Inzidenz wie das Melanom. Etwa die Hälfte der Patienten sind zum Zeitpunkt der Diagnosestellung zwischen dem 35. und 65. Lebensjahr (Markovic et al., 2007a). Melanome entstehen „de novo“ oder auf dem Boden eines melanozytären Nävus (Pigmentnävus), von dem jeder Mensch im Durchschnitt ca. 20 in seiner Haut trägt. Der Nävus, umgangssprachlich als „Leberfleck“ oder „Muttermal“ bezeichnet, umfasst sämtliche, zunächst gutartigen, Fehlbildungen der Haut. Bei etwa einem Viertel der Melanompatienten ist ein Nävus mit der Entstehung des Hautkrebses in Verbindung zu bringen (Markovic et al., 2007a). Ausgehend von einem Pigmentnävus (melanozytärer Nävus) oder einem Nävuszellnävus (Zellnest aus Nävuszellen) verändern sich die Hautzellen zu einem dysplastischen Nävus durch Vermehrung von atypischen Zellen. Im Weiteren kann sich das dysplastische Mal zu einem primären Melanom und als Spätstadium zu einem metastasierenden Melanom entwickeln.

Neben einer genetischen Prädisposition für eine Entartung der Melanozyten bzw. Nävuszellen ist die Hauptursache eine verstärkte Exposition durch Sonnenlicht, speziell durch UV-B-Strahlung (Lee, 1982). Schäden an der DNA und den DNA-Reparaturmechanismen sind die Folge. Weiter ist bekannt, dass Menschen eines helleren Hauttyps deutlich empfindlicher gegenüber Sonneneinstrahlung und deren schädlichere Auswirkungen in Form von Sonnenbränden reagieren als Menschen dunkleren Hauttyps. Eine intensive Sonnenlichtexposition in der frühen Entwicklung erhöht die Anfälligkeit für ein Melanom in späteren Lebensdekaden (Balch, 1997). Menschen mit einer erhöhten Expression an fehlgebildeten Hautarealen oder starker Neigung zu Pigmentierung, wie Sommersprossen (Epheliden) oder Leberflecken (Lentigo simplex) unterliegen ebenfalls einem erhöhten Risiko für die Entstehung eines Melanoms (MacKie, 1998).

Es werden vier Haupttypen des Melanoms im klinischen und histologischen Erscheinungsbild unterschieden:

1. Superfiziell-spreitendes Melanom (SSM)
2. Noduläres Melanom (NM)
3. Lentigo maligna Melanom (LMM)
4. Akro-lentiginöses Melanom (ALM)

Zu diesen Haupttypen treten weitere Varianten des Melanoms auf, wie beispielsweise das amelanotische Melanom und Sonderformen an den Schleim-, Ader- oder Hirnhäuten, die in weniger als 5% der Fälle in Erscheinung treten (Garbe et al., 2012).

Wie allen tumorösen Veränderungen im menschlichen Körper liegt auch dem Melanom eine gewebstypische Kombination von zahlreichen Gendefekten zu Grunde, unter deren irritativem Einfluss die Steuerung von zentralen Funktionen einer Zelle zum Erliegen kommt. Die Signalwege für Proliferation, Differenzierung und Apoptose der Zelle laufen hier unkoordiniert ab.

Unter anderem wurde bei Melanomen eine Mutation des Tumorsuppressorgens p16 identifiziert (Reginster et al., 2012), welche die physiologische Funktionsweise der zelleigenen Tumorsuppression unterbindet. So können geschädigte Zellen nicht mehr der Apoptose zugeführt werden und das fehlerhafte Genom wird repliziert und an weitere Zellgenerationen weitergegeben. Diese Apoptoseresistenz gehört neben der Ausbildung einer eigenen Angiogenese und der autonomen Steuerung der Wachstumssignale zu den gemeinsamen Kriterien eines malignen Tumors (Hanahan und Weinberg, 2000).

3.2. Adenosinrezeptoren in humanen Tumorzellen

Auf vielen bisher untersuchten humanen Tumorzellen konnte eine erhöhte Expression der vier AR-Subtypen festgestellt werden, deren Aktivierung und Funktion das Tumorwachstum vielfältig beeinflusst (Fishman et al., 2009). Dabei lässt sich keinem AR-Typ eine eindeutige Rolle in seiner Wirkung auf Tumorzellen zuweisen. Vielmehr wurden bisher grundsätzliche Wirkmechanismen für jeden der vier AR erforscht, die einerseits zu einem tumorfördernden und andererseits zu einem tumorhemmenden Effekt gezählt werden können (siehe (Gessi et al., 2011a)). Die unzähligen Prozesse der

Zellphysiologie sowie der -pathophysiologie laufen oftmals zeitgleich und durchaus gegensinnig ab, so dass bspw. eine gesteigerte Proliferation nicht zwangsläufig zu entartetem Wachstum und in der Folge zu einem Tumor führen muss. Mögliche Wirkmechanismen, die durch AR vermittelt werden können, sind in Abbildung [3] schematisch zusammengefasst.

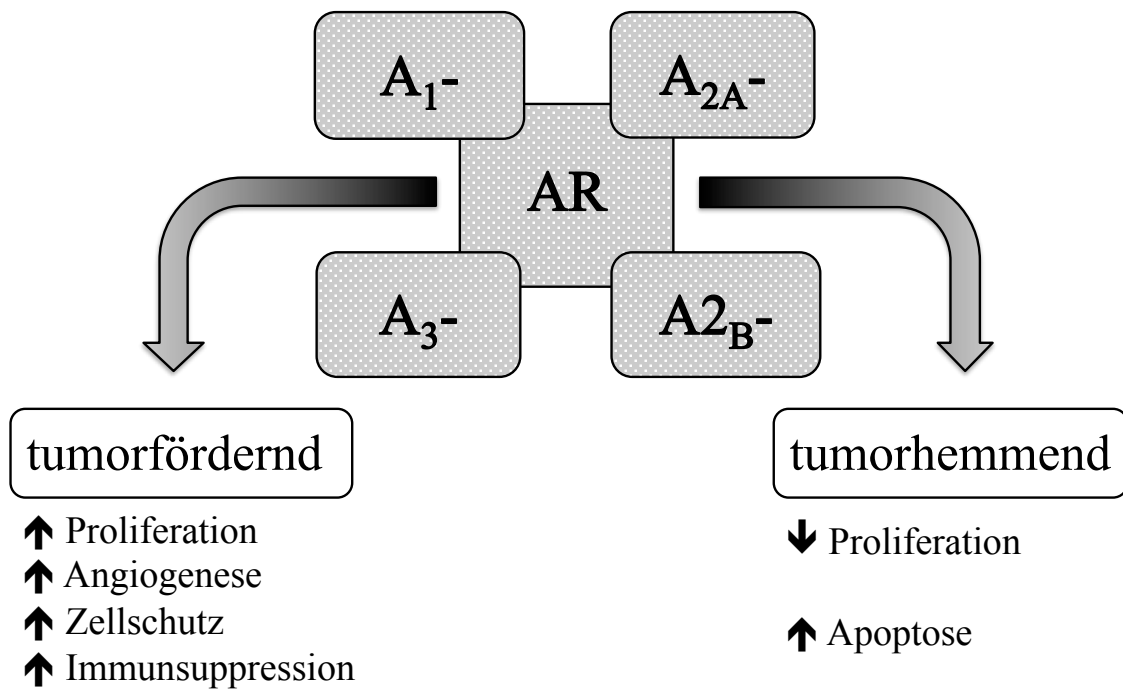


Abbildung [3]: Mögliche Wirkungsmechanismen der AR auf Tumorzellen

Abbildung modifiziert nach (Gessi et al., 2011a)

4. Fragestellung und Zielsetzung

In vorangegangenen Untersuchungen an einer humanen Estrogenrezeptor negativen Brustkrebszelllinie des Typs MDA-MB-231 konnte eine hohe Expression von ausschließlich A_{2B}-AR nachgewiesen werden (Panjehpour et al., 2005). Diese Beobachtung führte zu der Frage, ob dieses ungewöhnliche Expressionsmuster charakteristisch auch für bestimmte Typen humaner Krebszellen anderer Organe sein könnte.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten fünf Melanom-Zelllinien aus humanem Hautgewebe dahingehend untersucht werden, ob sie Subtypen von AR exprimieren.

Es sollte versucht werden, vorhandene AR pharmakologisch mit Hilfe von Radioligandenbindung- und Adenylylcyclase-Experimenten zu charakterisieren und gegebenenfalls deren Dichte in den Zellen zu bestimmen.

Weiter sollten im Zusammenhang mit den untersuchten Hautkrebszellen mögliche Perspektiven für den Einsatz von AR als therapeutische Angriffspunkte für die Behandlung von Melanomen dargestellt und erörtert werden.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Materialien

1.1. Chemikalien

[³ H]CCPA	GE Healthcare
[³ H]HEMADO	Tocris Bioscience
[³ H]NECA	GE Healthcare
[³ H]ZM 241385	Tocris Bioscience
[α - ³² P]ATP	Hartmann Analytic
Adenosin-Desaminase (ADA)	Roche Diagnostics
ATP	Sigma
cAMP	Sigma
CGS21680	Sigma
Di-Natriumhydrogenphosphat	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
DPCPX	Sigma
GTP	Sigma
Kaliumchlorid	Sigma
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Kreatinkinase	Roche Diagnostics
Magnesiumchlorid	AppliChem
MRE 3008 F20	Prof. P. A. Baraldi, Ferrara, Italien
Natriumcarbonat	Merck
NECA	Sigma
Phosphocreatin	Roche Diagnostics
Protein-Assay Reagenz	Bio-Rad Labs
R-PIA	Sigma
Rinderserumalbumin (BSA)	AppliChem
RO 20-1724 (PDEI)	Tocris Bioscience

Salzsäure	AppliChem
SCH 58261	Sigma
Theophyllin	Sigma
Tris	AppliChem
Zinkacetat	Merck

1.2. Verbrauchsmaterialien

Nährmedium DMEM 4,5 g/l Glucose, ohne Glutamin	PAN Biotech
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma
L-Glutamin	PAN Biotech
Penicillin / Streptomycin	PAN Biotech
DPBS Puffer ohne Calcium und Magnesium	PAN Biotech
Trypsin/EDTA	PAN Biotech
Einwegspritzen und -kanülen	B.Braun
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml Safe-Lock)	Eppendorf
Photometerküvetten (10x4x45 mm)	Sarstedt
Mikrotiterplatte Multi-Screen (96-well)	Millipore
mit Filterboden (GFC-Filter; 1.2µm)	
Glasfaserfilter (GF/B, Ø 25 mm)	Millipore
Alumina-Säulen	Sigma
Kunstharz-Ionenaustauscher DOWEX-1, Cl-form (1 x 2-200)	Sigma
Szintillations-Röhrchen (6 ml)	Hartenstein
Szintillator Lumasafe	LumacLsc B.V.

1.3. Geräte

Brutschrank BBD 6220	Heraeus
Lichtmikroskop	Leitz
Photometer UV-1601	Shimadzu
Sterilbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik

Thermomixer 5436		Eppendorf
Trockenschrank TH 25		Edmund Bühler
UltraTurrax T25		Janke & Kunkel
Vakuumpumpe		KNF Neuberger
Vortex - Genie 2		Scientific Industries
β-Counter	Modell 1450-MicroBeta Trilux	Wallac
	Modell LS 1801	Beckmann Coulter Inc.
Zentrifugen	Modell 5417	Eppendorf
	Modell R 16 Universalzentrifuge	Hettich
	Modell Avanti J25	Beckmann Coulter Inc.
	Modell LE-70 Ultrazentrifuge	Beckmann Coulter Inc.
Rotoren	Typ JA 17	Beckmann Coulter Inc.
	Typ 70 Ti	Beckmann Coulter Inc.

1.4. Puffer und Medien

CMF-PBS Puffer	8,0 g/l Natriumchlorid (NaCl)
	0,2 g/l Kaliumchlorid (KCl)
	1,44 g/l Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)
	0,24 g/l Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)
	pH 7,4 mit HCl eingestellt
5/2 Puffer	5 mM Tris + 2mM EDTA
	pH 7,4 mit HCl eingestellt
Tris 5 mM Puffer	pH 7,4 mit HCl eingestellt
Tris 100 mM Puffer	pH 7,4 mit HCl eingestellt
TM 10 Puffer	50 mM Tris + 10 mM MgCl
	pH 7,4 mit HCl eingestellt
TM 10 + 0,1 % BSA Puffer	50 mM Tris + 10 mM MgCl + 0,1% BSA
	pH 7,4 mit HCl eingestellt
TME Puffer	50 mM Tris + 10 mM MgCl ₂ + 1 mM EDTA
	pH 7,4 mit HCl eingestellt

REA-Mix (5x)	H ₂ O	42,5	ml
	250 mM Tris pH 7,4	25	ml
	0,5 mM cAMP	5	ml
	1% BSA	10	ml
	50 µM GTP	5	ml
	0,5 mM ATP	5	ml
	5 mM MgCl ₂ *6H ₂ O	5	ml
	2,5 mM RO 20-1724	2,5	ml

1.5. Zelllinien

M1	A375	Zur Verfügung gestellt wurden die fünf humanen Melanomzelllinien von der ehemaligen Arbeitsgruppe des Rudolf-Virchow-Zentrums Würzburg unter Prof. Dr. Schön (Universitätsmedizin Göttingen der Georg-August-Universität, Abteilung für Dermatologie, Venerologie und Allergologie)
M2	Brown	
M3	MV3	
M4	SK-MEL23	
M5	MEL2A	

2. *Methoden*

2.1. Zellkultur

Die zu untersuchenden Melanom Zelllinien wurden auf Gewebekulturschalen adhärent gezüchtet. Als Nährmedium wurde DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) mit 4,5 g/l Glucose verwendet. Zu diesem Standardnährmedium wurden 10% fetales Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin hinzugegeben. Die Zellen wurden bei 37°C in einer Atmosphäre von 95% Luftfeuchtigkeit und 7% CO₂ im Brutschrank kultiviert.

Das Anmischen der Nährlösung und das Passagieren der Zellkulturen wurden unter einer Sterilbank vorgenommen. Die Nährlösungen und Puffer wurden bei 4°C gelagert und vor ihrer Verwendung in einem Wasserbad vorgewärmt.

Vor dem Ernten der Zellen wurde zuerst die Zelldichte unter einem Lichtmikroskop kontrolliert und dann das Nährmedium von den Kulturschalen abgesaugt. Nach zweimaligem Waschen mit 5 ml DPBS-Puffer wurde zum Ablösen der Zellen vom Schalenboden für ca. 2 Minuten 4 ml Trypsin/EDTA-Lösung (0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA) aufgetragen. Mit frischem Medium wurden die Zellen von ihrem Träger abgespült, zentrifugiert (24°C, 1.500 rpm, 3 min.) und entsprechend auf neue Kulturschalen verteilt.

Mögliche Kontaminationsrisiken der Flüssigkeiten wurden mit adäquaten Vorsichtsmaßnahmen wie Händedesinfektion, dem Tragen von Handschuhen und Verwendung von sterilen Glaspipetten minimiert.

Abhängig von Versuchsplanung und Zelllinie konnten die Zellen wöchentlich zwei- bzw. dreimal in Verhältnissen von 1:5, 1:8 oder 1:10 geteilt werden.

2.2. Membranpräparation

Nach Entnahme aus dem Brutschrank und Kontrolle der Zelldichte wurden die Zellen zunächst mit eiskaltem CMF-PBS (pH 7,4) zweimal gewaschen und auf Eis aufbewahrt. Die Zellen wurden mit eiskaltem 5/2-Puffer (5 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA) versetzt,

mit einem Silikonschaber vom Plattenboden abgelöst und in Suspension überführt. Zur Präparation der Zellmembranen wurden die Zellen mittels einer Ultra-Turrax-Behandlung (2 x 10 sek. bei v_{\max}) aufgebrochen. In einem ersten Zentrifugationsschritt (3.200 rpm, 10 min., 4°C) wurden dann Zelltrümmer und Zellkerne von den Membranen getrennt. Alle Arbeitsschritte erfolgten dabei unter Kühlung auf Eis. Eine zweite Zentrifugation (37.000 rpm, 25 min., 4°C) des Überstandes ergab das Membranpellet. Dieses wurde in 4 ml 50 mM Tris-Puffer resuspendiert und die Membranen wurden in einem Glaspotter homogenisiert. Abhängig von dem im Protein-Assay ermittelten Proteingehalt wurde die Membransuspension anschließend in 1,5 ml Reaktionsgefäßen in Volumina von 250 - 300 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Für den Assay zur Bestimmung der Aktivität der Adenylylcyclase (AC) mussten die Membranen am Versuchstag frisch präpariert werden. Hierfür wurde eine vereinfachte Präparationsmethode mit nur einem Zentrifugationsschritt (37.000 rpm, 25 min., 4°C) angewendet.

Das Membranpellet wurde dann in 50 mM Tris-Puffer (pH 7,4) aufgenommen, auf Eis gelagert und vor weiterer Verarbeitung mit einer Spritze durch eine Einwegkanüle homogenisiert.

2.3. Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford

Der Proteingehalt der verschiedenen Membranpräparationen wurde mit Hilfe eines kommerziellen Protein-Assays nach der Bradford-Methode bestimmt. Dieser Assay beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Triphenylmethan-Farbstoffs Coomassie-Brilliant-Blau G-250 durch Komplexbildung mit in Lösung befindlichen Proteinen von 470 nm nach 595 nm. Die Extinktion des Farbstoff-Protein-Gemischs wurde gegen eine Standardproteinlösung aus BSA (1 µg/µl) photometrisch gemessen. Hierfür wurden vier Standardwerte (2 µg, 4 µg, 8 µg und 10 µg) der BSA-Lösung angesetzt und eine Eichkurve am Photometer erstellt. Jede Membransuspension wurde in zwei Verdünnungen (1:4 und 1:6) in 50 mM Tris hergestellt, um daraus 5 µl, 10 µl und 20 µl als Doppelwert zu messen. Das Protein-Assay Reagenz wurde 5:1 mit

Wasser verdünnt und 1 ml zu jeder Photometerküvette hinzugegeben. Nach manuellem Durchmischen erfolgte die Messung der Extinktion am Photometer und anhand des Verdünnungsfaktors wurde für jede Membransuspension der Proteingehalt ermittelt. Die präparierten Membranen wurden in 250 µl oder 300 µl Volumina aliquotiert.

Eine Übersicht zu den Proteinbestimmungen gibt folgende Tabelle:

Tabelle [2]: Proteinbestimmung für Bindungsversuche

Nr.	Zelllinie	Proteingehalt (µg/µl)	Aliquot á (µl)
M1	A375	3,65	250
M2	Brown	2,68	300
M3	MV3	3,28	250
M4	SK-MEL23	2,83	300
M5	MEL2A	2,46	300

Bei den Versuchen zur Bestimmung der Aktivität der Adenylylcyclase unter Verwendung von frisch präparierten Membranen wurde die Menge des eingesetzten Membranproteins im Anschluss an den Versuch gemessen.

2.4. Radioligandenbindung

In einem Bindungs-Assay kann die Anzahl von spezifischen Rezeptoren einer Zelle nachgewiesen werden, indem man die spezifische Bindung eines Radioliganden misst. Da diese nur indirekt bestimmt werden kann, erfolgt im Versuch zunächst die Messung der totalen Bindung und der unspezifischen Bindung.

Im Versuch wird in Triplets die Bindung des reinen Radioliganden gemessen, diese gibt die gesamte Bindung an spezifische und unspezifische Bindungsstellen wieder (totale Bindung = TB), an die der Radioligand in den Zellmembranen binden kann. In einem weiteren Triplet konkurriert ein Überschuss an nicht-markiertem Ligand mit dem Radioligand um die vorhandenen Bindungsstellen. Hierbei wird der nicht-markierte Ligand in einer Konzentration weit über der des Radioliganden eingesetzt, was die spezifischen Bindungsplätze für den Radioliganden blockiert. So belegt der Radioligand nur die unspezifischen Bindungsstellen (unspezifische Bindung = UB). Die spezifische Bindung (spezifische Bindung = SB) ist dann als Differenz der totalen Bindung und der

unspezifischen Bindung zu ermitteln und ermöglicht quantitative Aussagen über die Dichte an Rezeptoren in der untersuchten Zelle.

Bindungs-Assay auf Mikrotiterplatten

Die Bindungsversuche zu den AR-Subtypen A₁, A_{2A} und A₃ wurden auf Mikrotiterplatten mit GFC-Filterboden durchgeführt.

Die Reaktionsvolumina von 200 µl setzten sich nach folgendem Schema zusammen:

- 50 µl Assaypuffer (siehe Tabelle [3])
- 50 µl Assaypuffer für TB (totale Bindung)
Assaypuffer mit nicht markiertem Liganden für UB (unspezifisch Bindung)
- 50 µl Radioligand in Assaypuffer
- 50 µl Membransuspension

Die eingesetzte Proteinmenge betrug zwischen 25 und 50 µg. Um die Bindung nicht durch endogenes Adenosin zu verfälschen, wurde den Membranen 5 µl 10%iger ADA (10 mg/ml; ≈ 200 U/mg) pro ml Membransuspension zugegeben.

Vor Auftragen der Proben auf die Filterplatten wurden die Filter mit 10 µl Assaypuffer gesättigt. Nach Zugabe der Membransuspension wurden die Proben für 20 Sekunden gerüttelt und bei Raumtemperatur für drei Stunden inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Proben mit einer Absaugvorrichtung von den Multi-Screen Platten abgesaugt und die zurückgehaltenen Membranen dreimal mit 200 µl kaltem Puffer aufgewaschen. Anschließend wurden die Platten bei 40°C für ca. 30 Minuten getrocknet. Für den folgenden Zählvorgang in einem β-Counter (Wallac, 1450 MicroBeta Trilex) wurde zu jeder Probe 20 µl Szintillator pipettiert. Der Zählvorgang mit 5 Minuten pro Probe wurde nach einer Equilibrierung von 300 Minuten gestartet.

Bindungs-Assay in Einzelfiltermethode

Da bisher kein hochaffiner A_{2B}-selektiver Ligand zur Verfügung steht, mussten die Bindungsversuche für A_{2B}-AR in einem für niedrigaffine Bindung abgewandelten Versuchsaufbau durchgeführt werden.

Der Nachweis von A_{2B}-AR erfolgt hierbei in einer Art Ausschlussverfahren. Neben der Messung der totalen Bindung (=TB1), die die gesamte Bindung des A_{2A}-/A_{2B}-AR-Antagonisten [³H]ZM 241385 an den Zellen darstellt, erfolgen zwei weitere Messungen. In der Messung mit dem nicht-markierten NECA (=UB) werden alle spezifischen Bindungsstellen für AR-Liganden blockiert, so dass nur die unspezifische Bindung gemessen wird. In einer weiteren Messung wird CGS 21680 verwendet, das kaum Affinität zum A_{2B}-AR, jedoch eine mit NECA vergleichbar hohe Affinität an den anderen AR-Subtypen besitzt. Es werden so alle Rezeptoren außer dem A_{2B}-Subtyp für den Radioligand blockiert. Die als totale Bindung 2 bezeichnete Messung (=TB2) zeigt somit die unspezifische Bindung der zuvor beschriebenen Messung gemeinsam mit der spezifischen Bindung für den A_{2B}-AR.

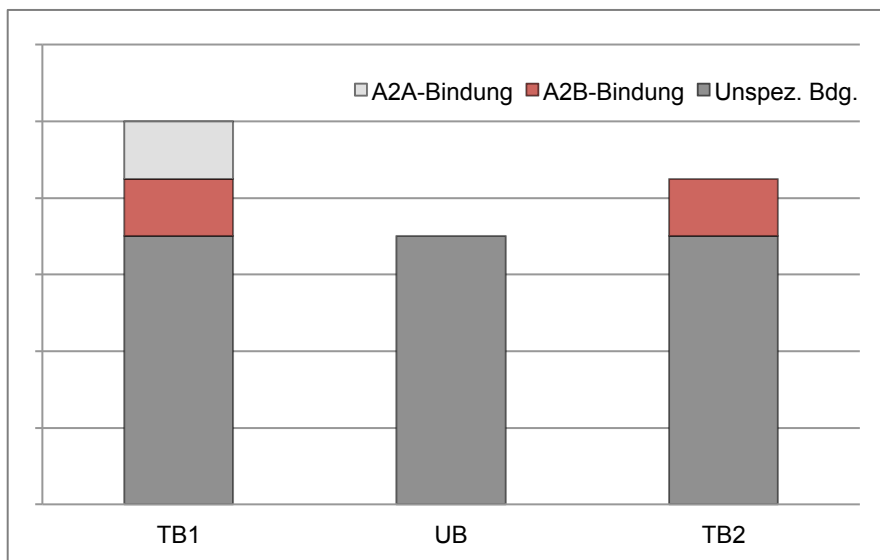


Abbildung [4]: Schematische Darstellung eines Bindungs-Assay

Totale Bindung 1 (TB1): [³H]ZM241385 40 nM; Unspezifische Bindung (UB): [³H]ZM241385 40 nM + NECA 300 µM; Totale Bindung 2 (TB2): [³H]ZM241385 40 nM + CGS 21680 10 µM

Beim Vergleich der drei Messungen kann so die spezifische Bindung an den A_{2A}- bzw. A_{2B}-AR errechnet werden. Die Abbildung [4] stellt mit Angabe der hier verwendeten Ligandenkonzentrationen die Auswertung des Verfahrens schematisch dar.

Das verwendete Material unterschied sich zu der auf Mikrotiterplatten mit Filterboden im Wesentlichen nur in der Größe der Reaktionsgefäße und -filter.

Die Reaktionsvolumina von 200 μl wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen pipettiert und setzten sich analog dem obigen Schema zusammen. Die eingesetzte Proteinmenge betrug hier 80 μg . Die Inkubationszeit bei Raumtemperatur betrug ebenfalls drei Stunden. Währenddessen wurden die zur Trennung verwendeten Glasfaserfilter (GF/B, \O 25 mm) in kaltem Assaypuffer eingeweicht und nach Ablauf der Inkubationszeit auf einer Absaugvorrichtung positioniert. Dann wurden 180 μl des Reaktionsvolumens auf die Filter pipettiert und durch Vakuum abgesaugt. Anschließend wurden die Filter zweimal mit 3 ml eiskaltem Assaypuffer gewaschen. Jeder Filter wurde in ein Szintillations-Röhrchen überführt und mit 4 ml Szintillator versetzt. Alle Proben wurden analog zu den Versuchen auf Mikrotiterplatten nach fünfstündiger Equilibrierung in einem β -Counter (Beckmann, LS 1801) gezählt.

Folgende Puffer und Liganden wurden bei den Bindungsversuchen mit dem jeweiligen Rezeptorsubtyp verwendet:

Tabelle [3]: Puffer und Liganden der Bindungsversuche

AR-Subtyp	A ₁	A _{2A}	A _{2B}	A ₃
Assaypuffer	Tris 50 mM	TM 10	TM 10 + 0,1 % BSA	TME
UB	Theophyllin	R-PIA	NECA	R-PIA
Ec.:	1 mM	100 μM	300 μM	100 μM
TB2	-	-	CGS 21680	-
Ec.:	-	-	10 μM	-
Radioligand	[³ H]CCPA	[³ H]NECA	[³ H]ZM241385	[³ H]HEMADO
Ec.:	1 nM	10 nM	40 nM	1 nM

2.5. Versuche zur Adenylylcyclase-Aktivität

In diesem Versuch wird durch Messung des zyklischem [³²P]Adenosinmonophosphat (c[³²P]AMP), was unter Versuchsbedingungen aus [α -³²P]ATP entsteht, die Aktivität des Enzyms Adenylylcyclase (AC) bestimmt. Die stimulierte Funktion der AC zeigt einerseits eine rezeptor-gekoppelte Enzymaktivierung mit vorangeschalteten AR und andererseits gibt sie Aufschluss über Aktivierbarkeit und maximale Stimulierbarkeit des

Enzyms selbst. Das produzierte $c[^{32}\text{P}]\text{AMP}$ lässt sich durch Detektion der emittierten β -Strahlung messen.

Die angewendete Methode zur Stimulation der AC entspricht dem von Klotz et al. (1985) beschriebenen Vorgehen und wurde wie im Folgenden beschrieben durchgeführt. Bei der Verwendung von Antagonisten wurde das Schema leicht variiert (siehe unten).

Die Reaktionsvolumina von 100 μl wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen inkubiert und beinhalteten neben homogenisierter Membransuspension und einem Reaktionsgemisch (REA-Mix) einen Agonisten und gegebenenfalls zusätzlich einen Antagonisten. Die verwendeten Zellmembranen wurden am Versuchstag frisch präpariert (siehe unter II.2.2) und pro ml Membransuspension mit 4 μl 10%iger ADA (10 mg/ml; ≈ 200 U/mg) versetzt. Die Liganden wurden in Stammlösungen mit DMSO angesetzt und für die Versuche in den entsprechenden Endkonzentrationen in H_2O verdünnt.

Folgende Pipettierschemata wurden für die Versuche verwendet:

Bestimmung der Agonist stimulierten Adenylylcyclase-Aktivität

10 μl	NECA	Ec.: 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 μM , 3 μM , 10 μM , 30 μM , 100 μM
	CGS 21680	Ec.: 100 μM
	H_2O	für Basalaktivität
40 μl	Membransuspension (ca. 150 μg Protein in 50 mM Tris-Puffer suspendiert)	
50 μl	REA-Mix (2x)	400 $\mu\text{l}/\text{ml}$ REA-Mix (5x) 5,9 mg/ml Phosphocreatin 0,8 mg/ml Kreatinkinase [α - ^{32}P]ATP (ca. 4 Mio cpm/ml)
	mit H_2O ad 1 ml	

Hemmung der NECA-stimulierten Adenylylcyclase-Aktivität durch Antagonisten

10 µl	NECA	Ec.: 5 µM
	H ₂ O	für Basalaktivität
10 µl	Antagonist:	Ec.: 100 nM, 1 µM, 10 µM, 100 µM
	H ₂ O	für Basalaktivität
30 µl	Membransuspension (ca. 100 µg Protein in 50 mM Tris-Puffer suspendiert)	
50 µl	REA-Mix (2x)	
	400 µl/ml REA-Mix (5x)	
	5,9 mg/ml Phosphocreatin	
	0,8 mg/ml Kreatinkinase	
	[α- ³² P]ATP (ca. 4 Mio cpm/ml)	
	mit H ₂ O ad 1 ml	

Als Antagonisten wurden in den Ansätzen in jeweils vier Konzentrationen (100 nM, 1 µM, 10 µM, 100 µM) eingesetzt:

SCH 58261

DPCPX

MRE 3008 F20

Nach Starten der Reaktion durch Zugabe der Membransuspension wurden die Ansätze gründlich gemischt und für 20 Minuten bei 37°C im Thermomixer inkubiert.

Zur Abtrennung von nicht umgesetztem [α-³²P]ATP am Inkubationsende wurden 400 µl 125 mM ZnAc und 500 µl 144 mM Na₂CO₃ zum Reaktionsgemisch hinzugegeben und die Reaktionsgefäße auf Eis gestellt. Nach Durchmischen auf dem Vortex erfolgte eine weitere Inkubation von 10 Minuten. Die entstandene Zn₂CO₃-Ausfällung wurde in einem folgenden Zentrifugationsschritt (14.000 rpm, 5 min.) von dem Reaktionsgemisch getrennt. Von dem Überstand wurden dann 800 µl auf Alumina-Säulen aufgetragen. Die Chromatographie-Säulen wurden vor der Verwendung zweimalig mit 5 ml Tris 100 mM aus einem Dispenser gewaschen. Das nicht Alumina bindende [³²P]cAMP wurde in Szintillationsröhrchen aufgefangen. Zum vollständigen Eluieren des [³²P]cAMP wurde noch zweimal mit jeweils 2 ml 100 mM Tris gewaschen und der Waschpuffer ebenfalls in den jeweiligen Szintillationsröhrchen aufgefangen.

Die Szintillationsröhrchen wurden verschlossen und für jeweils fünf Minuten ohne Szintillator (Cerenkov-Strahlung) in einem β -Counter (Beckmann, LS 1801) gezählt.

Reinigung von $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$

Das im Adenylylcyclase-Assay eingesetzte radioaktive $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ wurde vor Verwendung aufgereinigt und in handliche Volumina fraktioniert.

Die Aufreinigung erfolgte durch Ionenaustauschchromatographie über DOWEX-1 in der Cl^- form (1 x 2-200 Säulenmaterial). Die mit 800 μl DOWEX-1 befüllten Säulen wurden zunächst mit 5 ml Wasser gewaschen und folgend die $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ -Lösung aufgetragen. Dann erfolgte zweimal eine Spülung mit 5 ml einer 0,0316 N HCl-Lösung (pH 1,5) und die Elution mit 3 x 1 ml 0,25 N HCl in drei Aliquots. Jedem Volumen wurde anschließend 1 μl kaltes 10 mM ATP hinzupipettiert. Abschließend erfolgte die Einstellung des pH-Werts auf $\text{pH} \leq 7$ mit Hilfe von Triethanolamin (TEA), um eine saure Hydrolyse des ATP zu verhindern. Die Aktivität der verwendeten Fraktionen lag nach Aufreinigung durchschnittlich bei etwa 180.000 cpm/25 μl ($7,3 \times 10^6$ cpm/ml). Die Lagerung der Aliquots erfolgte bei -20°C .

Auswertung der AC-Messdaten

Bei den gemessenen Daten werden grundsätzlich drei Werte voneinander unterschieden:

1. Der BLANK-Wert

Die blank-Probe enthält nur H_2O und REA-Mix, aber keine Membranen. Sie dient der Überprüfung des Versuchsaufbaus und gibt die versuchsbedingte Verunreinigung der Messproben wieder, die u.a. durch nicht abgetrenntes radioaktives $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ des REA-Mix entsteht. Zur Auswertung wird der blank-Wert von allen anderen Werten subtrahiert.

2. Der BASAL-Wert

Dem basal-Wert wird H_2O , REA-Mix und Membranen, aber kein stimulierender Ligand zugegeben. Er gibt so die unstimulierte Aktivität des AC-Enzyms wieder und wird daher als Basalaktivität bezeichnet. Um eine Rezeptor-vermittelte Stimulation der AC

unter den fünf Melanomzellen vergleichen zu können, dient die Basalaktivität als Referenz.

3. Die zellspezifischen Messwerte

Die Daten der verschiedenen Membranen zeigen die im Versuch maximal umgewandelte und messbare Menge an $c[^{32}\text{P}]\text{AMP}$. Sie ermöglichen gemeinsam mit den Basalaktivitäten nach Abzug des blank-Wertes, eine Rezeptor-vermittelte Stimulation der AC vergleichen und bewerten zu können.

III. *ERGEBNISSE*

1. *Eigenschaften der verwendeten Zelllinien*

Im Laufe der Arbeit in der Zellkultur konnte beobachtet werden, dass die fünf Melanomzelllinien ganz unterschiedlich auf die Verarbeitungsschritte reagierten. Die dabei gemachten Beobachtungen sind in Tabelle [4] zusammen gefasst.

Tabelle [4]: Beobachtungen in der Zellkultur

	A375	Brown	MV3	SK-MEL23	MEL2A
Wachstum	+++	++	++	+	+
Adhärenz	+++	++	+	--	-
Ablösen	-	+	++	+++	+++
Aggregation	+++	++	+	o	o
Resuspendieren	--	-	o	+	+

Zeichenerklärung: +++ = sehr schnell / überaus hoch, ++ = schnell / hoch, + = beschleunigt / gut, o = durchschnittlich, - = langsam / wenig, -- = sehr langsam / sehr wenig

Die Zellen unterschieden sich deutlich in ihrer Wachstumsgeschwindigkeit, was sich besonders auf die Versuchsplanung auswirkte. So wurden in der Regel die schnell wachsenden Zellen (A375, Brown und MV3) gruppiert untersucht und in einer anderen Gruppe die langsam wachsenden Zellen (SK-MEL23 und MEL2A).

Die Stärke, mit der die Zellen an den Kulturschalen hafteten (Adhärenz), variierte unter den Zellen enorm. Beim Waschen der Zellen SK-MEL23 und MEL2A musste daher besonders vorsichtig vorgegangen werden, um die Ausbeute der Passage nicht zu verringern.

Das Ablösen der Zellen von den Kulturschalen mit Trypsin/EDTA konnte von Zelle zu Zelle schneller oder langsamer umgesetzt werden. Trypsin/EDTA ist bei längerer Einwirkdauer zelltoxisch, weshalb das Ablösen nicht länger als 2 Minuten dauern sollte. Weiter bildeten die Zellen beim Ablösen mehr oder weniger prominente Zellansammlungen (Aggregation) in der Trypsin/EDTA-Nährmedium-Suspension.

Das abzentrifugierte Zellpellet war unterschiedlich schnell wieder in frischem Medium zu resuspendieren. Die Zellen mit hoher Adhärenz am Kulturschalenboden setzten beispielsweise hier auch einen hohen Widerstand entgegen.

Die Zellen A375, Brown und MV3 waren demnach im Vergleich zu SK-MEL23 und MEL2A einfacher für die Versuche vorzubereiten, da die Versuchsplanung und Membranpräparation sehr stark von der Handhabbarkeit der Zellen in der Zellkultur abhängig war.

2. Radioligandenbindung

In einer ersten Versuchsreihe sollte die Bindung von ausgewählten AR-Liganden an den fünf Zelllinien überprüft werden. Diese Experimente dienten als Screening für die Expression von AR-Subtypen.

Im Gegensatz zu den A_{2B}-AR stehen für A₁-, A_{2A}- und A₃AR geeignete Radioliganden zur Verfügung, die einen direkten Nachweis der Rezeptoren ermöglichen.

2.1. Identifizierung von A₁-AR mit [³H]CCPA

Für den Nachweis von Rezeptoren des A₁ Subtyps wurde der hochaffine A₁-selektive Agonist [³H]CCPA verwendet. Dieser Radioligand bindet mit einem K_i-Wert von 1 nM an den A₁-AR der Ratte (Klotz et al., 1989) und Mensch (Klotz et al., 1998) und ist somit in der Lage, schon sehr geringe Mengen an vorhandenen Rezeptoren zu identifizieren.

In keiner der fünf Melanomzellen konnte eine spezifische Bindung mit [³H]CCPA gemessen werden. Daher wurde angenommen, dass die untersuchten Zellen keine relevanten Mengen an A₁-AR exprimieren. Dieses Ergebnis schloss den A₁AR als Gegenstand für weitere Untersuchung an den fünf Zelllinien aus.

2.2. Identifizierung von A₃-AR mit [³H]HEMADO

Bei der Identifizierung von Rezeptoren des A₃ Subtyps wurde als Radioligand [³H]HEMADO eingesetzt. Dieser A₃-selektive Agonist bindet, ebenfalls hochaffin, mit einem K_i-Wert von 1 nM am humanen A₃-AR (Klotz et al., 2007).

Es konnte keine spezifische Bindung des [³H]HEMADO an den fünf Zelllinien gemessen werden. Daher wurde, vergleichbar mit den Ergebnissen zum A₁-AR, eine relevante Anzahl an exprimierten A₃-AR in den Zellen ausgeschlossen und weitere Untersuchungen bezüglich dieses Rezeptorsubtyps zurückgestellt.

2.3. Identifizierung von A_{2A}-AR mit [³H]NECA

Um Rezeptoren des A_{2A} Subtyps zu ermitteln, wurde als Radioligand der unselektive Agonist [³H]NECA eingesetzt. Es besitzt zwar entgegen der anfänglichen Annahme, ein A₂-selektiver Agonist zu sein, auch hohe Affinitäten zu anderen Subtypen, bietet aber mit einem K_i-Wert von 20 nM für den humanen A_{2A}-AR (Klotz et al., 1998) eine brauchbare Möglichkeit diesen Rezeptor nachzuweisen.

Unter Verwendung von [³H]NECA konnte eine spezifische Bindung für den AR-Subtyp A_{2A} nicht eindeutig gemessen werden. Im Vergleich zu den Bindungsergebnissen des A₁- und A₃-AR konnte eine Expression des A_{2A}-AR in den Zellen jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Daher wurde versucht, mit Hilfe eines radioaktiv markierten Antagonisten ([³H]ZM 241385) einen genaueren Nachweis von A_{2A}-AR zu erbringen und diese von eventuell interferierenden A_{2B}-AR zu differenzieren.

2.4. Identifizierung von A_{2A}- und A_{2B}-AR mit [³H]ZM 241385

Zum Nachweis beider Rezeptor Subtypen wurde der als A_{2A}-selektiv bezeichnete Antagonist [³H]ZM 241385 eingesetzt. Dieser besitzt neben einem K_i-Wert von 1,6 nM für den A_{2A}-AR (Jacobson und Gao, 2006) ebenfalls eine gute Affinität zu dem A_{2B}-Subtyp. Mit einem K_i-Wert von etwa 50 nM (Ji und Jacobson, 1999; Klotz, 2000; Jacobson und Gao, 2006) für den A_{2B}-AR liegt seine Affinität zwar um das 30-fache unter der für den A_{2A}-AR, doch mit dem Einsatz von 40 nM [³H]ZM 241385 kann bei genügend hoher Rezeptordichte auch der A_{2B}-Subtyp markiert werden.

Um zwischen A_{2A}- und A_{2B}-AR nach oben beschriebener Methode (siehe unter II.2.4) differenzieren zu können, wurde 300 µM des unselektiven NECA (=UB, siehe Abbildung [5]) bzw. 10 µM CGS 21680 (=TB2, siehe Abbildung [5]) verwendet.

NECA bindet mit einer vergleichsweise niedrigen Affinität am A_{2B} -AR (K_i -Wert \approx 140 - 2400 nM), wohingegen aber CGS 21680 so gut wie keine Affinität zum A_{2B} -AR besitzt. In ihrer Affinität zum A_{2A} -AR unterscheiden sich die beiden Agonisten unwesentlich (Klotz, 2000; Fredholm et al., 2011)

In den Bindungsexperimenten mit dem Radioliganden [3 H]ZM 241385 konnte an den Zelllinien Brown, MV3, SK-MEL23 und MEL2A eine gerade noch detektierbare Menge an A_{2B} -Rezeptoren nachgewiesen werden. In diesen schwach positiven A_{2B} -Ergebnissen zeigten die Zellen Brown und MV3 die meisten Bindungsstellen, gefolgt von den Zelllinien SK-MEL23 und MEL2A (siehe Tabelle [5]). An den MV3-Zellen konnte darüberhinaus eine geringfügige A_{2A} -Bindung nicht ausgeschlossen werden. Die Zellen A375 zeigten hingegen in keiner der Messungen Hinweise auf eine AR-Expression.

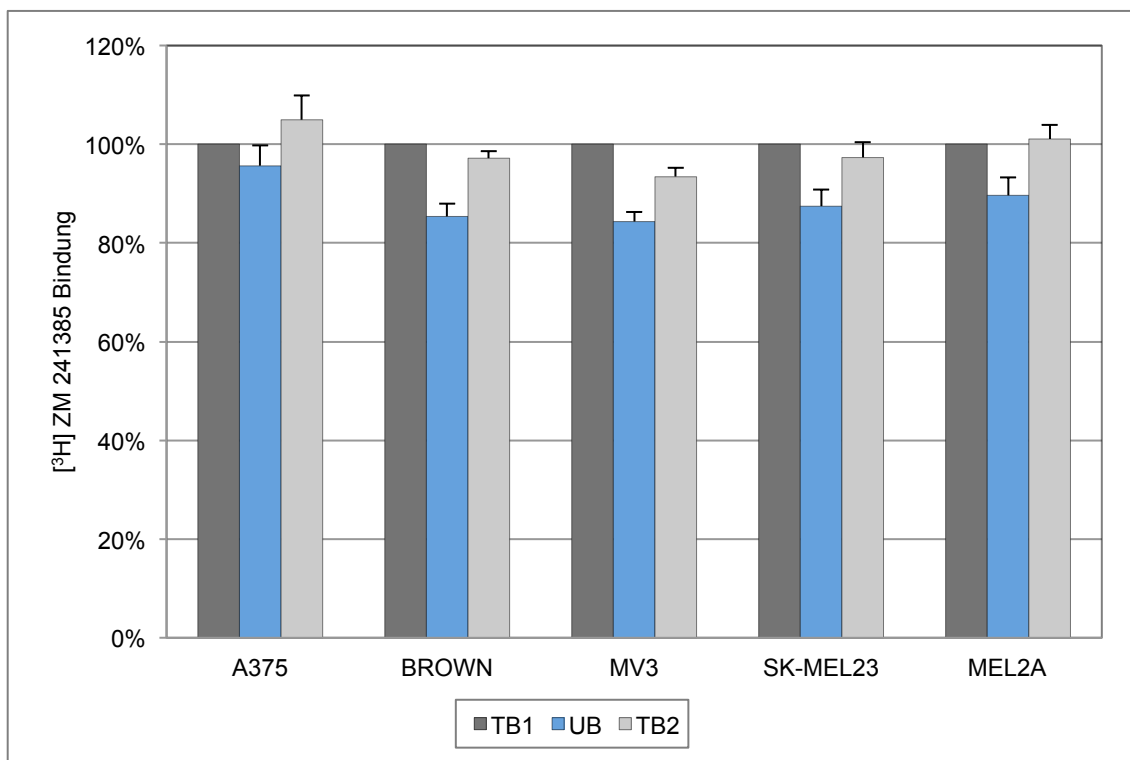


Abbildung [5]: Bindung des Antagonisten [3 H]ZM 241385

Dargestellt ist die totale Bindung (TB1) des Radioliganden [3 H]ZM241385 (Ec.: 40 nM), die unspezifische Bindung (UB) in Gegenwart von 300 μ M NECA und die zur Elimination von A_{2A} -Bindung in Gegenwart von 10 μ M CGS 21680 gemessene Bindung (TB 2). Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus jeweils drei Experimenten ($n=3 \pm$ SEM).

Abbildung [5] soll die ermittelten Bindungen graphisch veranschaulichen. An den Zellen Brown, MV3, SK-MEL23 und MEL2A wurde in Gegenwart eines Überschusses an unmarkiertem NECA ein Teil der Bindung des Radioliganden [^3H]ZM241385 (=TB1) verdrängt. Dieser kleine Bereich stellt die Menge an vorhandenen A_{2B} - bzw. A_{2A} -Bindungsstellen dar.

Bei der Messung in Gegenwart von CGS 21680 (=TB2), die der unspezifischen Bindung (=UB) inklusive einer eventuell vorhandenen A_{2B} Bindung entspricht, konnte nur an MV3-Zellen eine Verdrängung von [^3H]ZM241385 beobachtet werden. Dieser geringe Prozentsatz an verdrängtem [^3H]ZM241385 weist auf eine A_{2A} -Bindung in MV3-Zellen hin. An den Zellen Brown, SK-MEL23 und MEL2A hingegen zeigte CGS 21680 keine Wirkung. Somit waren A_{2A} -Bindungsstellen in relevanter Menge an diesen Zellen auszuschließen. Die Messungen an A375 legten den Schluss nahe, dass diese Zellen keine AR exprimieren.

Aus den Messergebnissen der Radioligandenbindung ist anhand der spezifischen Aktivität des eingesetzten Radioliganden und der eingesetzten Proteinmenge eine Abschätzung der Rezeptordichte in den jeweiligen Zelllinien möglich. Die entsprechenden Schätzwerte sind in Tabelle [5] zusammengefasst.

Tabelle [5]: Spezifische A_{2B} -Bindungsstellen

	A375	Brown	MV3	SK-MEL23	MEL2A
A_{2B}	0	339	270	220	209
SEM	0	32	28	46	41

Die geschätzten Werte der Rezeptordichte für die Zellen bei denen eine Bindung detektiert wurde sind in fmol/mg angegeben. Es sind Mittelwerte aus je drei Experimenten ($n=3 \pm \text{SEM}$).

3. *Messung der Rezeptor-vermittelten Stimulation der Adenylylcyclase*

Nachdem in Bindungsexperimenten keine nachweisbaren Mengen von A₁- und A₃-AR gefunden wurden (siehe unter III.2.1 und III.2.2), wurde durch Stimulation der AC lediglich die Expression von A_{2A}- und A_{2B}-AR genauer untersucht.

Es wurde angenommen, dass ohne spezifische Bindungsstellen für A₁- und A₃-selektive Liganden die Zellen auch kein funktionelles Signal auf entsprechende Rezeptoragonisten zeigen würden.

3.1. Rezeptor-vermittelte Stimulation der Adenylylcyclase

Mit Hilfe von 100 µM NECA wurde nun überprüft, ob die vorhandenen AR in der Lage sind, eine Rezeptor-vermittelte Stimulation der AC in den Zellen auszulösen.

Zunächst sollte die Enzymaktivität im Ruhezustand der Zellen, also ihre Basalaktivität, bestimmt werden, um dann die Wirkung einer Rezeptor-vermittelten Stimulation der verschiedenen Zellen messen zu können.

In drei der fünf Zelllinien konnte so eine deutliche Rezeptor-vermittelte Stimulation der AC nachgewiesen werden. Die Zellen A375 zeigten in den Versuchen die höchste stimulierte AC-Aktivität, Brown und MV3 reagierten mit etwas geringeren Werten ebenfalls positiv auf das angebotene NECA. In Brown-Zellen, die über die niedrigste Basalaktivität verfügen, konnte diese mit NECA um das 8-fache gesteigert werden. In A375- und MV3-Zellen, deren Basalwerte annähernd gleich niedrig waren, konnte die Basalaktivität mit NECA um das 2,5- bzw. 2-fache gesteigert werden.

In SK-MEL23-Zellen wurde in den aus drei Versuchen gemittelten Messdaten ähnlich der MV3-Zellen das c[³²P]AMP um ca. 200 cpm erhöht. Allerdings war die relative Erhöhung im Vergleich zu ihrer Basalaktivität bei den SK-MEL23-Zellen sehr gering.

MEL2A zeigte keine relevante Steigerung der AC-Aktivität über die basalen Werte hinaus.

Die folgende Abbildung [6] stellt die Messungen graphisch dar.

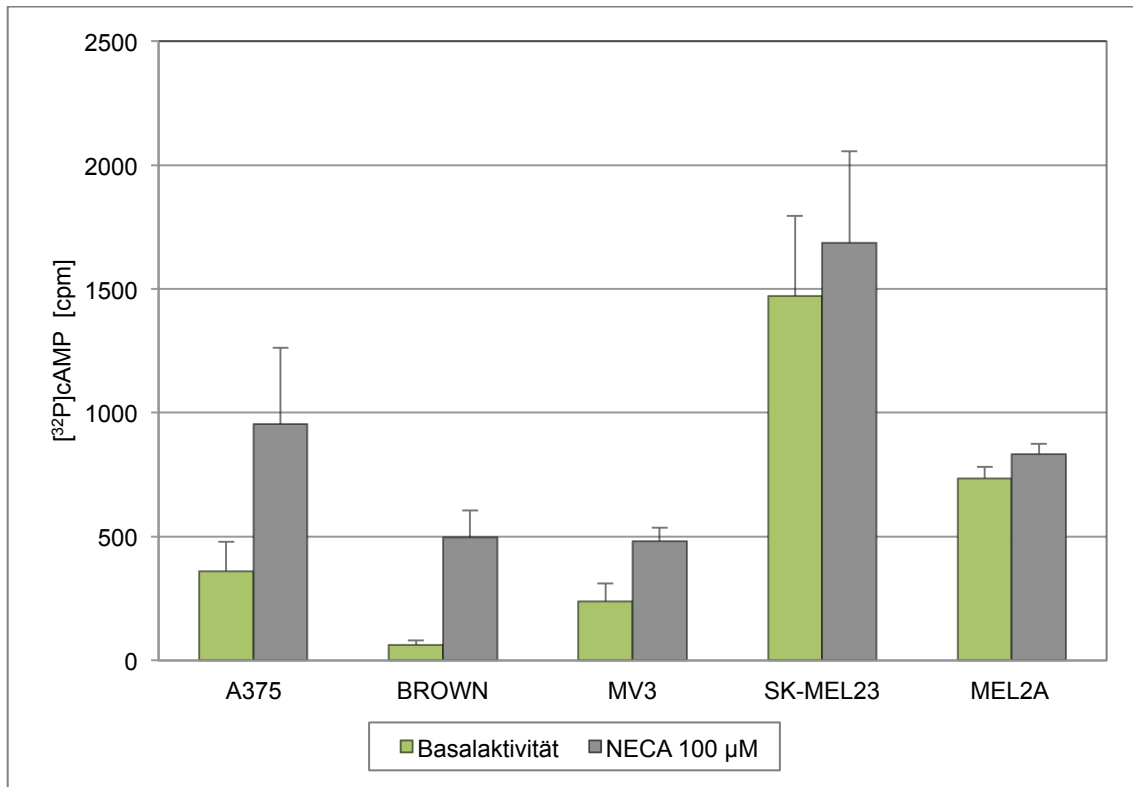


Abbildung [6]: Aktivität der Adenylylase

Dargestellt ist die Basalaktivität im Vergleich mit der maximal erreichten Stimulation durch NECA (Ec.: 100 µM). Die Daten sind Mittelwerte aus jeweils drei Versuchen ($n=3 \pm \text{SEM}$).

3.2. Stimulation der Adenylylase mit den Agonisten NECA und CGS 21680

Um die bewirkte Stimulation einem der beiden A_2 -AR zuordnen zu können, wurde ähnlich wie bei den Bindungsversuchen vorgegangen. Zum Nachweis einer A_{2A} -gekoppelten Stimulation wurde der Agonist CGS 21680 eingesetzt, der mit einem K_i -Wert von 27 nM am humanen A_{2A} -AR bindet (Klotz et al., 1998). Neben CGS 21680 wurde wieder das unselektive NECA verwendet. Trotz einer vergleichsweise niedrigen Affinität von 2,4 µM am A_{2B} -AR (Klotz et al., 1998) gehört es noch zu einem der potentesten Liganden für diesen AR-Subtyp.

Durch den Einsatz dieser Kombination an Liganden kann zwischen einer A_{2A} - und einer A_{2B} -vermittelten Stimulation unterschieden werden.

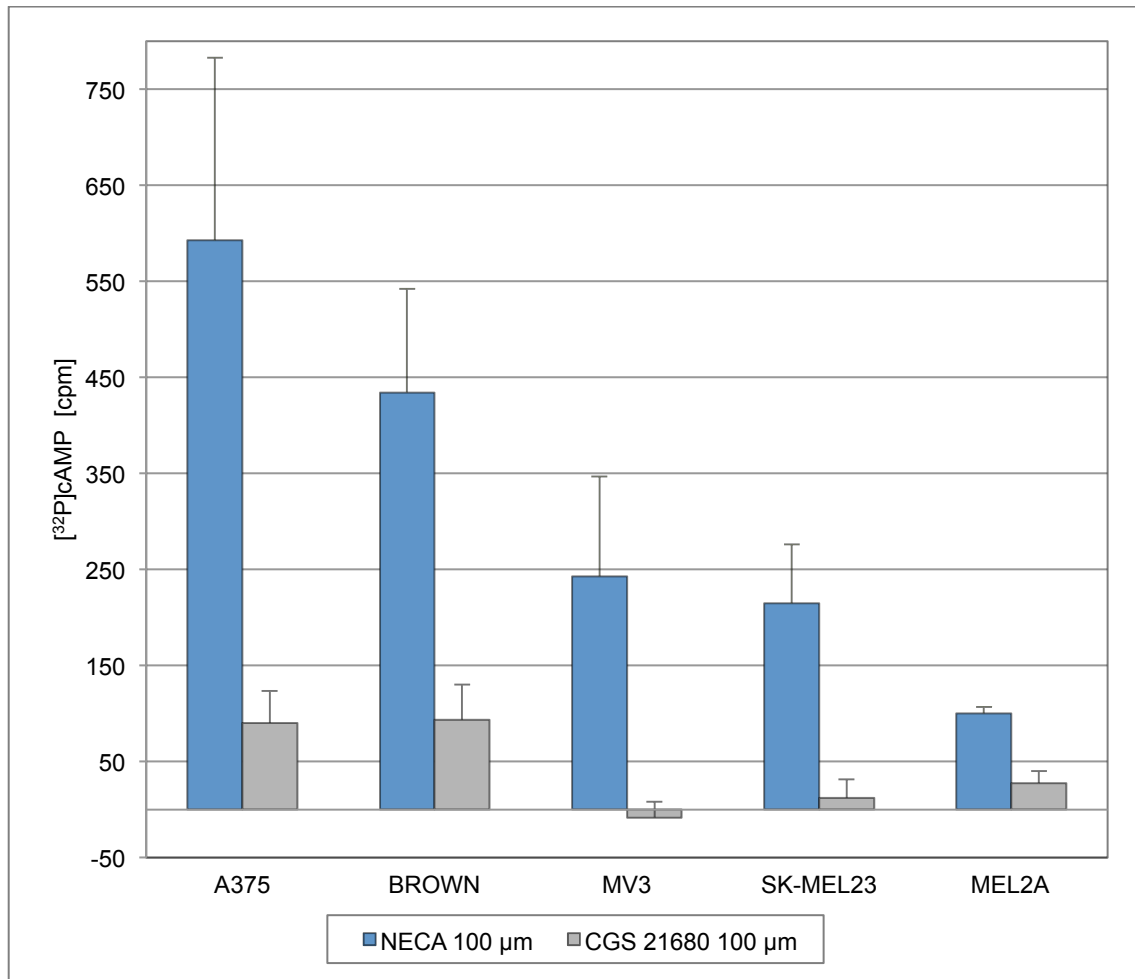


Abbildung [7]: Stimulation der Adenylyl cyclase

Dargestellt sind die über der Basalaktivität der Zellen liegenden Messwerte, die durch die Stimulation mit 100 µM NECA bzw. 100 µM CGS 21680 erreicht werden konnten. Die Daten sind Mittelwerte aus je drei Experimenten ($n=3 \pm \text{SEM}$).

Mit NECA konnte, wie bereits zuvor beschrieben, an den Zellen A375, Brown, MV3 sowie SK-MEL23 eine NECA-vermittelte AC-Stimulation nachgewiesen werden.

In Abbildung [7] sind die Messdaten abzüglich ihrer Basalaktivität graphisch dargestellt, um lediglich den Agonist-induzierten Effekt zu illustrieren.

Die an den SK-MEL23-Zellen bewirkte Stimulation lässt sich hier deutlich besser erkennen als auf der vorangegangenen Abbildung (siehe Abbildung [6]). Durch die Darstellung abzüglich der Basalaktivität, kann so auch bei SK-MEL23-Zellen von einer relevanten Stimulation der AC ausgegangen werden.

An MEL2A-Zellen konnte NECA keine zuverlässig nachweisbare Wirkung erzielen.

Im Gegensatz zu NECA konnte CGS 21680 an keiner der Zellen eine wesentliche Steigerung der AC-Aktivität bewirken. Der beobachtete $c[^{32}\text{P}]\text{AMP}$ -Anstieg in den Zellen A375, Brown, MV3 und SK-MEL23 erfolgte demnach durch eine A_{2B} -rezeptorvermittelte Stimulation. Lediglich in den A375- und Brown-Zellen konnte ein geringfügiger Anteil an A_{2A} -AR nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Den in der Bindung an MV3-Zellen gefundenen Spuren von A_{2A} -AR konnten im Rahmen dieser Versuche keine funktionelle Wirkung nachgewiesen werden. Dies könnte daran liegen, dass zu wenige Rezeptoren zur Stimulation eines messbaren Signals vorliegen oder keine funktionelle Kopplung an die AC zustande kommt.

Für das unselektive NECA konnten für die Zellen A375, Brown und MV3 folgende EC_{50} -Werte für die A_{2B} -vermittelte Aktivierung der AC ermittelt werden:

Tabelle [6]: EC_{50} -Werte der NECA-stimulierten AC-Aktivität

	A375	Brown	MV3
NECA	3.300	2.900	5.580
	(1.770 – 6.120)	(2.070 – 4.100)	(1.780 – 17.580)

Angegeben sind die EC_{50} -Werte (in nM mit 95% Konfidenzintervall) für die AC-Stimulation mit NECA in den genannten Zellen. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus je drei Versuchen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Hill-Gleichung.

Zum Vergleich mit den hier gewonnenen Daten ist in der Literatur für NECA ein ähnlicher EC_{50} -Wert von 2.400 nM für den A_{2B} -AR angegeben (siehe Klotz (2000)), was das Vorliegen dieses Rezeptorsubtyps bestätigt.

3.3. Hemmung der Agonist-stimulierten Adenylylcyclase Aktivität mit Antagonisten

Zum weiteren Nachweis, dass die AC-Aktivierung mit NECA durch A_{2B} -AR vermittelt wird, wurde die Wirkung von Antagonisten auf die NECA-stimulierte AC-Aktivität untersucht. Hierfür wurden die Zellen A375, Brown und MV3 mit 5 μM NECA stimuliert und der cAMP-Spiegel in Gegenwart von steigenden Konzentrationen von drei verschiedenen AR-Antagonisten gemessen.

Dazu wurden ausgewählt: DPCPX als A₁-selektiver Antagonist, der in höheren Konzentrationen auch an den A_{2B}-AR bindet. SCH58261 als A_{2A}-selektiver Ligand und MRE-3008-F20 als A₃-selektiver Antagonist.

Diese Versuche beschränkten sich auf die Zellen A375, Brown und MV3, da nur in diesen funktionell nachweisbare Mengen an A_{2B}-AR gefunden wurden.

Die Ergebnisse der Messungen sind in den Abbildungen [8-10] graphisch dargestellt.

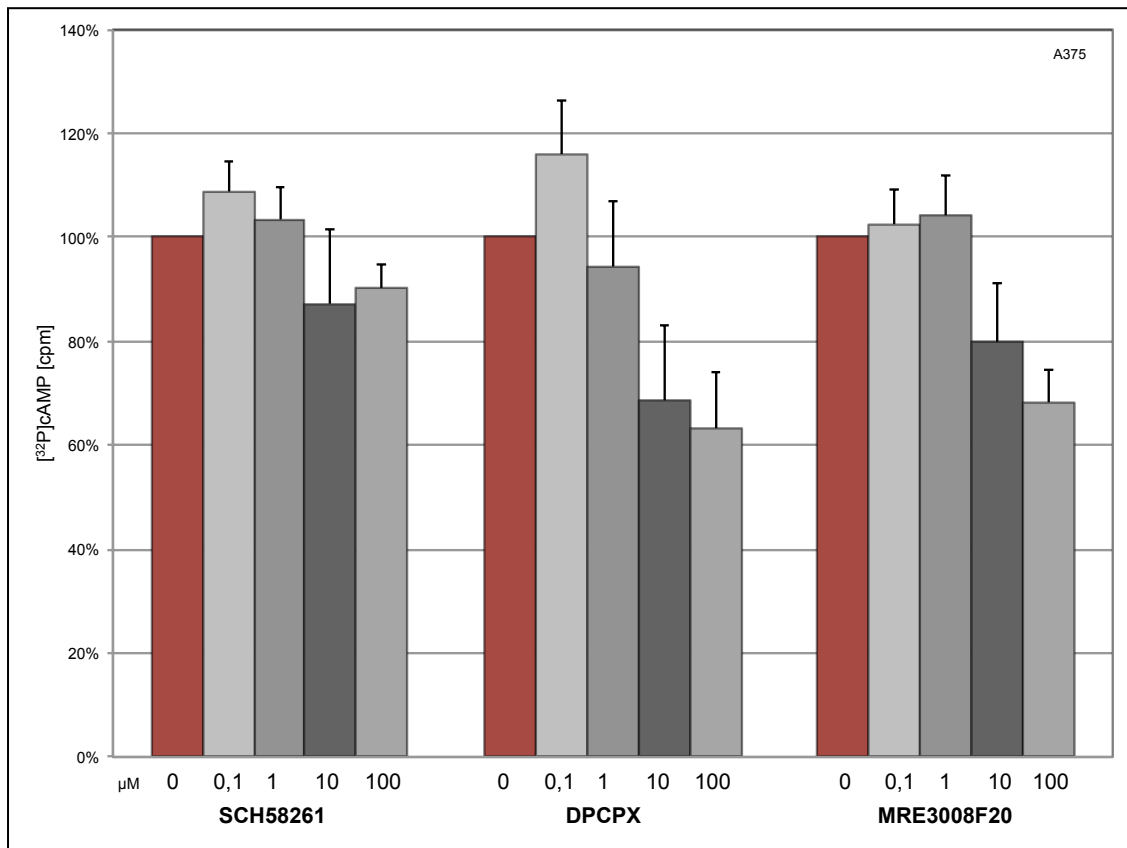


Abbildung [8]: Wirkung von Antagonisten auf die NECA-stimulierten AC-Aktivität in A375-Zellen

Dargestellt ist die Stimulation von A375-Zellen mit 5 μM NECA in Gegenwart von Antagonisten (Konzentration 0,1, 1, 10 und 100 μM). Die Daten sind Mittelwerte aus je drei Versuchen ($n=3 \pm \text{SEM}$).

Es konnte gezeigt werden, dass trotz einer selektiven Blockade von A₁-, A_{2A} und A₃-AR mit jeweils 0,1 μM des Antagonisten, es durch NECA zu einer AC-Stimulation an den drei Zellen kam. Mit höheren Konzentrationen ließ sich mit jedem der drei Antagonisten eine Hemmung der AC-Aktivität erzielen.

Die Hemmung der AC-Aktivität unter Zugabe des Antagonisten in steigenden Konzentrationen verlief mit geringfügigen Abweichungen an allen drei Zelllinien

ähnlich: Das A_{2A}-selektive SCH 58261 zeigte bei allen Zellen ab einer Konzentration von 10 µM eine geringfügige Hemmung der AC-Aktivität. Ein selektiver A_{2A}-Antagonismus wäre aber schon bei einer Konzentration von 1 - 10 µM zu erwarten gewesen.

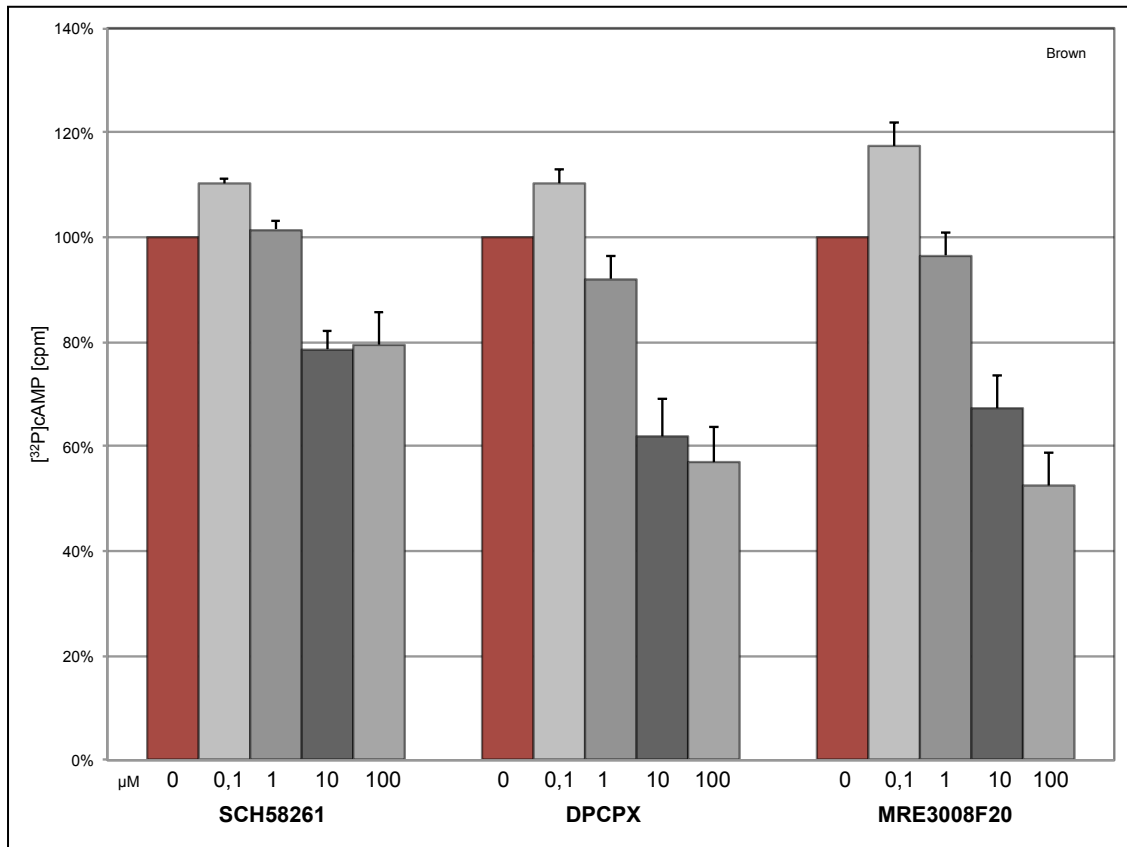


Abbildung [9]: Wirkung von Antagonisten auf die NECA-stimulierten AC-Aktivität in Brown-Zellen

Dargestellt ist die Stimulation von Brown-Zellen mit 5 µM NECA in Gegenwart von Antagonisten (Konzentration 0,1, 1, 10 und 100 µM). Die Daten sind Mittelwerte aus je drei Versuchen ($n=3 \pm \text{SEM}$).

Auch die Hemmung der AC-Aktivität mit den A₁- und A₃-selektiven Antagonisten DPCPX bzw. MRE 3008-F20 trat erst bei sehr hohen Konzentrationen ($\geq 10 \mu\text{M}$) ein. Besonders gut konnte dies an den MV3-Zellen beobachtet werden (siehe Abbildung [10]).

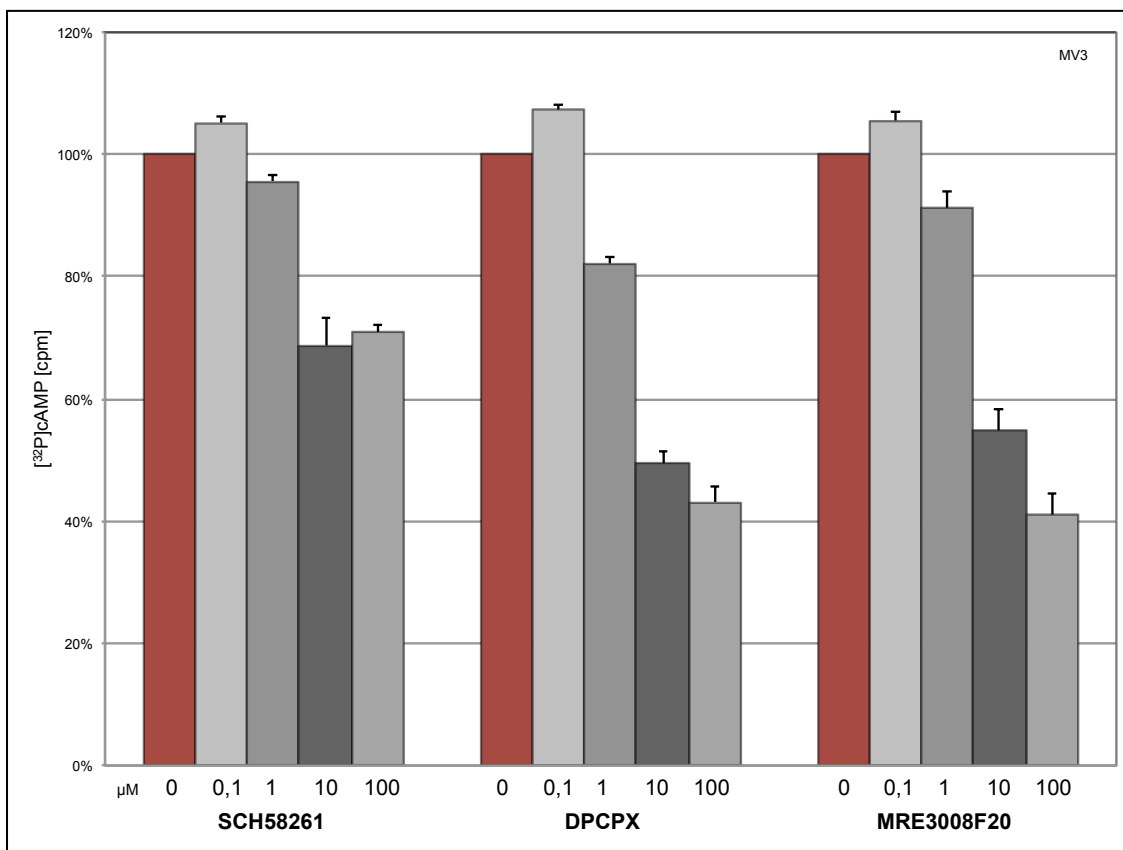


Abbildung [10]: Wirkung von Antagonisten auf die NECA-stimulierte AC-Aktivität in MV3-Zellen

Dargestellt ist die Stimulation von MV3-Zellen mit 5 μM NECA in Gegenwart von Antagonisten (Konzentration 0,1, 1, 10 und 100 μM). Die Daten sind Mittelwerte aus je drei Versuchen ($n=3 \pm \text{SEM}$).

In der graphischen Auswertung ist zu erkennen, dass DPCPX und MRE 3008 F20 in dem Konzentrationsbereich von 1 - 10 μM die deutlichste Wirkung auf die AC-Aktivität zeigen. Dieser Effekt konnte nicht durch eine Blockade von A₁- bzw. A₃-AR bewirkt werden, da hierfür ebenfalls deutlich niedrigere Konzentrationen des Antagonisten ausgereicht hätten. Die Zugabe von mehr als 10 μM führte nur unwesentlich zu einer weiteren Zunahme der Hemmung.

Der so bewirkte Antagonismus kann abschließend als weiterer Beleg dafür gesehen werden, dass die NECA-stimulierte AC-Aktivität A_{2B}-vermittelt sein muss.

Die aus den Versuchsdaten ermittelten IC₅₀-Werte für die Wirkung der Antagonisten auf die NECA-stimulierte AC-Aktivität sind in Tabelle [7] aufgeführt.

Für das A₁-selektive DPCPX wurden IC₅₀-Werte von 1 - 2 μM ermittelt, was gut mit den bekannten Daten an dem humanen A_{2B}-AR übereinstimmt (Klotz et al., 1998). Das

A₃-selektive MRE 3008 F20 wurde bisher mit einem K_i-Wert von 2,1 µM angegeben (Jacobson und Gao, 2006), was ebenfalls mit den hier gefundenen Werten in Brown- und MV3-Zellen im Einklang steht. Die Messungen an A375-Zellen zeigten aus unbekanntem Gründen eine sehr große Streuung. Der geringe mit SCH 58261 beobachtete Hemmeffekt ließ die Bestimmung eines K_i-Wertes nicht zu.

Tabelle [7]: Wirkung von Antagonisten auf NECA-stimulierte AC-Aktivität

	A375	Brown	MV3
DPCPX	1.370 (1.000 - 1.850)	2.210 (1.160 - 4.190)	1.880 (1.730 - 2.040)
MRE 3008 F20	18.550 (4.400 - 78.200)	1.720 (630 - 4.770)	3.390 (2.320 - 4.980)

Angegeben sind die IC₅₀-Werte (in nM mit 95% Konfidenzintervall) für die Hemmung der NECA-stimulierten AC-Aktivität. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus n = 3 Versuchen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Hill-Gleichung.

IV. DISKUSSION

1. Adenosinrezeptoren und Hautkrebs

Die weite Verbreitung von Adenosinrezeptoren im menschlichen Körper und deren „tumorassoziierte Spuren“ lassen sich auch in humanen Hautgeweben sowie in dysplastischen Manifestationen in Form von Tumoren der menschlichen Haut nachweisen. Die Tatsache, dass Adenosin und dessen verwandte Nukleotide in „kritischen Zuständen“, wie Entzündungs- und Wundheilungsprozessen, ubiquitär eine wichtige Rolle spielen, machte auch die Haut zu einem Ziel von AR-Untersuchungen. So konnte nachgewiesen werden, dass Adenosin und Adenosinderivate in der Lage sind, Phasen der Zellteilung von Hautzellen zu unterbinden und so direkten Einfluss auf die Reifung der Haut haben (Brown et al., 2000). Bereits frühe Studien zeigten, dass die topische Anwendung eines A_{2A} -AR-Agonisten die Wundheilung und die Gefäßneubildung im Falle einer Verletzung positiv beeinflussen kann (Montesinos et al., 2002). Viele Untersuchungen von AR in Verbindung mit der menschlichen Haut und deren Tumore betreffen den A_3 -AR. Grund für dieses verstärkte Interesse war der Nachweis einer ungewöhnlich hohen Expression von A_3 -AR in Melanom-Zelllinien. Der in gesunden Geweben und Organen sonst eher schwach exprimierte A_3 -AR erwies sich besonders in Tumorgeweben als sehr stark vertreten (Madi et al., 2003; Gessi et al., 2011a). Die Beobachtung eines besonders hohen Vorkommens nur eines AR-Subtyps in Tumorgewebe wurde für weitere AR-Subtypen, wie beispielsweise dem A_{2B} -AR, gemacht (Li et al., 2005; Panjehpour et al., 2005). Falls diese ungewöhnliche Rezeptorausstattung eine charakteristische Eigenschaft von malignen Veränderungen sein sollte, wäre dies für die Aufklärung der Beziehung und des Einflusses von solch potenten Signalempfängern und -modulatoren wie den AR im Tumorgeschehen von großer Bedeutung.

Dies war auch der Ansatz für die hier dargestellten Untersuchungen an fünf humanen Melanom-Zelllinien. Die Hautkrebszellen sollten zunächst auf die Expression von AR untersucht werden. Falls möglich, sollten anhand der Ergebnisse genauere Aussagen zu Verteilung und Menge der vorhandenen AR-Subtypen getroffen werden. Zum Nachweis der AR diene Radioliganden Bindung mit selektiven Substanzen für AR

sowie funktionelle Versuche zur Untersuchung einer möglichen AR-vermittelten Signaltransduktion.

2. *Nachweis von Adenosinrezeptoren in Melanomzellen*

2.1. Versuche zum Nachweis von A₁- und A₃-Adenosinrezeptoren

Bei den hier durchgeführten Bindungsstudien konnte weder der A₁- noch der A₃-Subtyp in nachweisbaren Mengen gefunden werden. Da mit den hochaffinen und selektiven Agonisten [³H]CCPA für den A₁- und [³H]HEMADO für den A₃-AR (Klotz et al., 1989; Klotz et al., 2007) keine AR nachgewiesen werden konnten, wurden die fünf Melanomzelllinien keinen weiteren spezifischen Nachweismethoden für A₁- und A₃-AR unterzogen.

In einer Studie von Merighi et al. (2001) an der Melanom-Zelllinie A375 wurde bereits eine Expression von A₁-, A₃-, sowie A_{2A}-AR nachgewiesen. Der Nachweis der AR-Subtypen erfolgte dort unter anderem mit Hilfe von Radioliganden (Merighi et al., 2001).

Trotz ähnlich aufgebauter Experimente wie von Merighi et al. (2001) verwendet, konnten die hier beschriebenen Versuche keinerlei Bindung für den A₁- oder A₃-AR bestätigen. Die hier vorliegenden Bindungsexperimente wurden nach der Beschreibung von Klotz et al. (1998) durchgeführt, die sonst für die Überprüfung neuer Substanzen und deren Eigenschaften an AR eingesetzt werden.

Als Radioliganden, die entscheidend für den Nachweis einer Bindung sind, wurden die beiden Agonisten [³H]CCPA und [³H]HEMADO ausgewählt. Mit der Affinität von [³H]CCPA zum A₁- und [³H]HEMADO zum A₃-AR im niedrigen nanomolaren Bereich ($K_i \leq 1$ nM, siehe III.2.1 und III.2.2) und ihrer enorm hohen Selektivität sollten auch gering exprimierte A₁- bzw. A₃-AR gefunden werden.

Im Gegensatz hierzu kamen bei den Versuchen von Merighi et al. (2001) rezeptorspezifische Antagonisten ([³H]DPCPX für A₁; [³H]MRE3008F20 für A₃) als Radioliganden zum Einsatz. Einen Vorteil in der Verwendung von Antagonisten als Radioliganden kann man darin sehen, dass alle potentiellen Rezeptoren nachgewiesen

werden, unabhängig von deren Kopplung an G-Proteine und den vielfältigen Prozessen der nachgeschalteten Signaltransduktion.

Da sich den Bindungsversuchen funktionelle Experimente anschließen sollten und das Hauptinteresse in dem direkten Vergleich von Bindung und nachgeschalteter Funktion bestand, wurde hier der Einsatz von agonistischen Liganden bevorzugt.

Weiter muss nicht zwangsläufig trotz gleicher Zelllinie eine völlige Übereinstimmung zwischen den von Merighi et al. (2001) und den hier untersuchten A375 Zellen bestehen. So haben vergleichende Untersuchungen an A_{2A}-AR in vier Zellklonen von PC12 Zellen zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen geführt. Man fand heraus, dass die vermeintlich gleichen Zellen große Unterschiede in ihrer Ausstattung an A₂-AR, ihres G-Proteins und deren Effektoren aufwiesen (Arslan et al., 1999).

So mögen die A375 der gleichen Zelllinien angehören, können jedoch mittlerweile je nach Quelle eine unterschiedliche Ausstattung von Rezeptoren und anderen Proteinen besitzen.

2.2. Nachweis von A_{2A}- und A_{2B}-Adenosinrezeptoren

Die nach dem gleichen Versuchsaufbau wie vorangehend für den A₁- und A₃-Subtyp durchgeführten Bindungsstudien mit [³H]NECA für den A_{2A}-AR führten nicht zu eindeutigen Ergebnissen. Die Daten reichten weder für eine negative, noch für eine positive Aussage über eine spezifische A₂-Bindung in den fünf Zelllinien aus.

Das eingesetzte radioaktiv-markierte [³H]NECA besitzt ähnliche Affinitäten für den A₁-, A_{2A}-, sowie für den A₃-AR (Klotz, 2000). Nach vorangegangenem Ausschluss von einer A₁- oder A₃-vermittelten Bindung konnte davon ausgegangen werden, dass spezifische Bindung von [³H]NECA dem A_{2A}-Subtyp zuzuordnen ist.

Zum Nachweis von A_{2B}-AR wurde der Antagonist [³H]ZM 241685 gewählt (siehe IV.2.2.1). Radioaktiv markierte Agonisten stehen für diesen Rezeptorsubtyp keine zur Verfügung.

2.2.1. Radioligand [³H]ZM 241385

Die Verwendung des Antagonisten [³H]ZM 241385 als Radioligand sollte eine Aussage über das Vorliegen von A₂-Subtypen mit Hilfe von Bindungsexperimenten ermöglichen.

[³H]ZM 241385 bindet mit einem K_i-Wert von ca. 750 nM an A₁- sowie an A₃-AR (Jacobson und Gao, 2006). Verglichen mit der höheren Affinität für A_{2A} (K_i-Wert ca. 1 nM) und A_{2B} (K_i-Wert ca. 50 nM) war so eine ungewünschte Bindung an A₁- und A₃-AR auszuschließen. Um mit [³H]ZM 241385 A_{2A} ebenso wie A_{2B}-AR identifizieren zu können, wurde eine Konzentration des Radioliganden von 40 nM gewählt (Ji und Jacobson, 1999; Jacobson und Gao, 2006). Um bei der Bindung von [³H]ZM 241385 an A_{2A} und A_{2B} differenzieren zu können, wurde wie im Abschnitt III.2.4 beschrieben vorgegangen.

2.2.2. NECA und CGS 21680 an A_{2B}-AR

Obwohl die Entdeckung des zweiten A₂-Subtyps bereits mehr als 30 Jahre zurück liegt (Bruns, 1980), stellt der direkte pharmakologische Nachweis von A_{2B}-AR nach wie vor ein Problem dar. Im Gegensatz zu dem A_{2A}-Subtypen, für den mehrere selektive Liganden, wie beispielsweise das A_{2A}-selektive SCH 58261, zur Verfügung stehen, sind selektive Liganden für den A_{2B}-AR noch immer sehr selten. Ein Grund hierfür wird darin gesehen, dass Adenosin selbst eine nur sehr niedrige Affinität zu dem A_{2B}-Subtyp aufweist (Fredholm et al., 2001b).

NECA ist ebenso wie der endogene Ligand Adenosin ein unselektiver, aber metabolisch stabiler Agonist. Obwohl es im Vergleich zu den anderen Subtypen mit der geringsten Affinität an A_{2B}-AR bindet, ist es immer noch einer der potentesten Agonisten an A_{2B}-AR. Für die Aktivierung des A₁-, A_{2A}- und A₃-AR reichen deutlich geringere Konzentrationen aus als für den A_{2B}-AR (Klotz, 2000).

CGS 21680 ist ein 2-substituiertes NECA-Derivat mit vergleichbarer Affinität zu den AR-Subtypen mit Ausnahme des A_{2B}-AR, zu dem es nahezu keine Affinität besitzt (Klotz et al., 1998). CGS 21680 wurde, basierend auf Versuchen an Ratten, ursprünglich als A_{2A}-selektiver Agonist eingeführt. An humanen AR-Subtypen hat sich diese Selektivität jedoch nicht bestätigt, da CGS 21680 ebenfalls sehr affin

($K_i = 67 \text{ nM}$) an A_3 bindet (Klotz, 2000). Der große Affinitätsunterschied zwischen menschlichen A_{2A} - und A_{2B} -AR stellt in Kombination mit NECA eine gute Möglichkeit dar, um zwischen diesen beiden Subtypen zu unterscheiden.

2.2.3. Bindungsexperimente zum Nachweis von A_{2A} - und A_{2B} -Adenosinrezeptoren

Mit dem antagonistischen Radioliganden [^3H]ZM 241385 gelang es, an vier der fünf Melanomzellen A_{2B} -AR nachzuweisen. Es konnten zwar nur geringe Mengen einer A_{2B} -vermittelten Bindung festgestellt werden, doch wurde zunächst qualitativ die Expression von A_{2B} -AR bestätigt, nachdem alle anderen Subtypen nicht nachgewiesen werden konnten.

Als mögliche Ausnahme erschienen die Zellen MV3, bei denen geringe Mengen an A_{2A} -AR nicht ausgeschlossen werden konnten. Zu diesem Schluss führte die Tatsache, dass nur an diesen Zellen CGS 21680 eine noch messbare Menge an [^3H]ZM 241385 verdrängen konnte (siehe Abbildung [5]).

Um auch ohne hoch selektiven A_{2B} -Liganden den Nachweis von A_{2B} -AR zu ermöglichen, wurde die Kombination der Liganden NECA und CGS 21680 nach dem Prinzip des Ausschlussverfahrens eingesetzt. Diese Vorgehensweise wurde ursprünglich für funktionelle Studien, wie der Stimulation der AC, angewendet. In den vorliegenden Versuchen wurde in Bindungsexperimenten analog vorgegangen. Bei der Untersuchung der MV3-Zellen ermöglichte es die Differenzierung zwischen einer A_{2A} - und A_{2B} -Bindung.

Die auf den vier Zelllinien ermittelten Mengen an Rezeptorprotein sind sehr gering. Dennoch können sie enorm wichtig für die Zellphysiologie sein. Eine niedrige Expressionsdichte eines Rezeptors lässt keine Aussagen über dessen Bedeutung in der Zelle zu. Die den AR nachgeschaltete Signaltransduktion wie beispielsweise der „second messenger“ cAMP oder die Mitogen-aktivierten-Proteinkinasen (siehe unter I.2.2) sind in der Lage ein extrazelluläres Signal um ein Vielfaches zu verstärken. Am Beispiel der niedrig exprimierten β_1 -adrenergen Rezeptoren des Herzens (Brodde, 1993) lässt sich erkennen, wie wichtig auch nur wenige Rezeptoren für die Funktion eines ganzen Organs und sogar Organismus sind. Die β_1 -Rezeptoren sind, wie die AR

an ein G-Protein gekoppelt. Dessen Aktivierung führt zu einer Zunahme der Kontraktionskraft und der Schlagfrequenz des Herzens. Diese als positiv inotrope und positiv chronotrope bezeichnete Wirkung wird mit Hilfe der sog. Betablocker medikamentös gesteuert, die so helfen das Herz vor Überbelastung und Sauerstoffunterversorgung zu schützen.

Die Vermutung, dass auf diesen humanen Melanomzellen explizit ein AR-Subtyp in besonders starkem Ausmaß exprimiert sein könnte, ähnlich der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 (Panjehpour et al., 2005), konnte durch Bindungsstudien nicht bekräftigt werden.

2.2.4. Stimulation einer rezeptorgekoppelten Adenylylase-Aktivität

Bei der Signaltransduktion ist für A_{2A} - und A_{2B} -AR bekannt, dass sie, unabhängig von anderen Effekten, wie der Mobilisation von intrazellulärem Kalzium, über ihr G_s -Protein in der Lage sind, einen rezeptorvermittelten cAMP-Anstieg zu bewirken (Fredholm et al., 2001a). So konnte mit NECA in vier der fünf Zelllinien eine Stimulation der AC in Form eines cAMP-Anstiegs beobachtet werden (siehe Abbildung [6] und [7]).

Dies bestätigte die Expression von A_{2B} -AR in den Zellen A375, Brown, MV3, sowie SK-MEL23. Bekräftigt wurde diese Annahme von den für A375, Brown und MV3 ermittelten EC_{50} -Werten, die im Bereich der von Klotz (2000) am A_{2B} -AR beschriebenen NECA-Werte von 2.400 nM liegen. Zu berücksichtigen ist hierbei, dass die zum Vergleich herangezogenen Werte Auswertungen von Versuchen an „Modellzellen“ sind. Die dort verwendeten Zellen sind CHO- oder HEK-Zellen, die über große Mengen von stabil transfizierten AR verfügen (Klotz et al., 1998; Ji und Jacobson, 1999). Bei den hier untersuchten Zellen, die aus Tumoren gewonnenen wurden, sind solche optimierten Bedingungen nicht vorhanden.

Dies ist besonders beim Vergleich der Basalaktivität und der maximal zu erreichenden AC-Stimulation (siehe Abbildung [6]) zu erkennen. Die Basalaktivitäten der Zelllinien sind sehr unterschiedlich, so dass deren Ausgangssituation für eine AC-Stimulation entsprechend stark von einander abweichen. Weiter sind natürlich auch unterschiedlich

starke AC-Stimulationen zu messen. Je nach Basalaktivität ist ein günstigeres oder ungünstigeres „Signal-Rausch-Verhältnis“ zu beobachten.

Bei den bereits erwähnten Untersuchungen von A_{2A}-AR an PC12-Zellen zeigte sich, dass der cAMP-Anstieg neben der Anzahl an AR auch sehr von der verfügbaren Menge von G-Protein und der Aktivität der AC abhängig ist (Arslan et al., 1999). Ein niedriger cAMP-Anstieg könnte daher auch mit einer konstitutiv hohen Aktivität der AC einer Zelle zusammenhängen, die bei einsetzender Stimulation nicht oder nur unwesentlich weiter zu steigern ist. Außerdem wäre es möglich, dass Rezeptor und Effektor unterschiedlich effizient miteinander verknüpft sind.

Wie bereits erwähnt, spielt die Signaltransduktion mit den angekoppelten Signalkaskaden eine enorm wichtige Rolle für die zu entstehende Wirkung. Viele Schritte der Signaltransduktion haben die Aufgabe einer Signalverstärkung. Messungen eines Effekts können daher nicht zwangsläufig Hinweise auf die Rezeptordichte liefern.

Nachdem die vorangegangenen Bindungsstudien an den A375-Zellen keine nachweisbaren Mengen an A_{2B}-AR ergaben, konnten die durchgeführten funktionellen Untersuchungen in Übereinstimmung mit bereits erfolgten Studien gebracht werden. So kamen Merighi et al. (2001) bei der funktionellen Überprüfung von A375-Zellen ebenfalls zu dem Schluss, dass diese Zellen AC-gekoppelte A_{2B}-AR exprimieren.

Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse über eine Expression von A_{2A}-AR. Der Versuch, die AC mit CGS 21680 zu beeinflussen, um in erster Linie eine A_{2A}-vermittelte AC-Stimulation zu überprüfen, fiel an allen fünf Zellen negativ aus.

Die insgesamt negativen Ergebnisse mit CGS 21680 bestätigen das Fehlen von funktionell gekoppelter A₁- bzw. A₃-AR auf den fünf Zelllinien (Daten nicht gezeigt). Bei vorhandenen A₁- oder A₃-AR, die inhibierend mit der AC gekoppelt sind, wäre eine Abnahme des cAMP-Signals zu erwarten gewesen.

Zu ähnlichen Erkenntnissen kamen Merighi et al. (2001) bei der Überprüfung der A375-Zellen mit Hilfe von A₁- und A₃-Agonisten zum Nachweis von A₁- bzw. A₃-AR. Merighi et al. (2001) überprüften A375 unter Verwendung von SCH 58261 zum Blockieren eines störenden A_{2A}-Signals, anstelle des hier verwendeten CGS 21680. Auch dort konnte kein A₁- oder A₃-vermittelter Effekt auf die AC-Stimulation gefunden werden, was zu der Vermutung führte, dass A375-Zellen über nicht ausreichend

effizient an die AC-gekoppelte A₁- bzw. A₃-AR verfügen oder eine Überlagerung der Signaltransduktion durch andere stimulatorische AR stattfindet. So wäre es möglich, dass bei einer Co-Expression von G_s- und G_i-Protein-gekoppelter Rezeptoren innerhalb einer Zelle es zu einer Maskierung der G_i-vermittelten Inhibierung der AC kommt (Merighi et al., 2001). Anlass hierfür gaben Untersuchungen in HEK-293-Zellen an chimären A₁- und A₂-AR, die G_s- sowie G_i-Protein-gekoppelt waren (Tucker et al., 2000).

2.2.5. Wirkung von selektiven Antagonisten auf die NECA-stimulierte Adenylylcyclase-Aktivität

Diese abschließenden Versuche dienten vorrangig dazu, den Nachweis von A_{2B}-AR zu bekräftigen, und zu verdeutlichen, dass die AC-Stimulation durch A_{2B}-AR vermittelt wird. Gleichmaßen bestand die Möglichkeit die Zellen A375, Brown und MV3 nochmals auf Hinweise für eine Expression eines anderen AR-Subtyps zu kontrollieren. Eine durch 5 µM NECA erzeugte AC-Stimulation bestätigte zunächst die zuvor ausgeführten Ergebnisse (siehe unter IV.2.2.4) an diesen drei Zellen durch einen deutlichen cAMP-Anstieg. Durch Zugabe der selektiven Antagonisten DPCPX, SCH 58261 und MRE 3008-F20 in vier ansteigenden Konzentrationen (100 nM, 1 µM, 10 µM, 100 µM) kam es wie beabsichtigt zu einem Abfall des cAMP-Spiegels. Die Hemmung, trat hierbei in dem Konzentrationsbereich der Antagonisten ein, in dem es für A_{2B}-AR zu erwarten ist. Diese Beobachtung bestätigte den Nachweis und die funktionelle Kopplung an die AC der A_{2B}-AR.

Ebenso schloss sie weiter die Expression bzw. die Beteiligung eines anderen AR-Subtypen an der AC-Stimulation in diesen Zellen aus. Im Fall von anderen AR-Subtypen, wäre dies durch eine deutlich Hemmung des NECA-Signals bei einer niedrigeren Konzentration des Antagonisten zu erkennen gewesen. So hätten die ausgewählten Antagonisten DPCPX mit einem K_i-Wert von 3 nM am A₁- , SCH 58261 mit 5 nM am A_{2A}- und MRE 3008-F20 mit 0,8 nM am A₃-AR bei viel niedrigeren Konzentrationen zu einer Hemmung führen müssen (Fredholm et al., 2011).

Wie bereits erwähnt, ist es dennoch möglich, dass andere AR-Subtypen vorhanden sind, sie aber unterhalb einer nachweisbaren Menge liegen oder nicht ausreichend effizient mit der AC in Kontakt stehen und es zu keinem messbaren Signal kommt.

Bei der Verwendung von SCH 58261 kam es im Vergleich zu den beiden anderen eingesetzten Antagonisten zu wesentlich größeren Streuungen der Messwerte. Dies könnte an der schlechten Löslichkeit dieser sehr lipophilen Substanzen liegen.

Bei den Versuchen mit SCH 58261 könnte es mit steigender Konzentration der Substanz zur Ausfällung gekommen sein und so eine verminderte und nicht klar definierte Konzentration vorgelegen haben. Dies würde erklären, warum ab einer Konzentration von 1 μM SCH 58261 keine weitere Hemmung erreicht werden konnte und die Werte stark streuten.

3. *Adenosinrezeptoren und deren Einfluss in Tumoren*

3.1. A_1 - und A_3 -Adenosinrezeptoren in Tumorgeweben

Die Beobachtung, dass der A_3 -AR bei der Regulierung des Zellzyklus beteiligt ist, führte zu großem Interesse an der Erforschung seiner Rolle im Tumorgeschehen. Verantwortlich hierfür war der Umstand, dass Muskelgewebe, obwohl es einen großen Anteil an der gesamten Körpermasse des Menschen ausmacht, relativ selten von Metastasen befallen wird. Man fand heraus, dass Muskelzellen Adenosin ausschütten und über den A_3 -Rezeptor Tumorzellen am Wachstum und der Metastasierung in das Muskelgewebe gehindert werden (Fishman et al., 2002).

Untersuchungen an Melanomzellen von Mäusen zeigten ebenfalls, dass durch eine Aktivierung des A_3 -AR das Wachstum der Tumorzellen direkt gehemmt werden kann (Madi et al., 2003).

Diese und viele weitere Studien haben den A_3 -AR zu einem vielversprechenden Ziel in der Anti-Tumorforschung gemacht. Vielleicht auch aufgrund der Tatsache, dass der A_3 -AR abhängig von der Stärke der jeweiligen Rezeptoraktivierung tumorhemmende sowie tumorfördernde Effekte vermitteln kann, befinden sich eine Vielzahl an Ansatzpunkten des A_3 -AR in der Erforschung (siehe Gessi et al. (2011a)).

Trotz intensiver Forschung ist die Position des A_1 -AR in Bezug auf einen pro- oder antitumoralen Effekt nicht geklärt. Der A_1 -AR wurde beispielsweise in großer Anzahl in Brustkrebsgewebe (Typ MDA-MB-468) gefunden, dessen Hemmung ein

vermindertes Wachstum und eine reduzierte Vermehrung der Krebszellen ergab (Mirza et al., 2005). Im Gegensatz dazu konnten für A_1 -AR auf Gliazellen des Gehirns eine tumorhemmende und präventive Wirkung auf die Entstehung von Glioblastomen nachgewiesen werden (Fishman et al., 2009). Ähnlich antitumorale Wirkung konnte in weiteren Brustkrebsgeweben (Typ T47D, HS578T und MCF-7) und leukämisch veränderten Zellen (Typ MOLT-4) für den A_1 -AR beobachtet werden (Gessi et al., 2011a). Um Klarheit in diese widersprüchlichen Ergebnisse zu bringen, sind besonders für den A_1 -AR weitere Studien notwendig.

3.2. A_{2A} -Adenosinrezeptoren in Tumorgewebe

Aufgrund der weitreichenden Funktionen, wie die Beeinflussung der Immunantwort oder Unterstützung der Angiogenese, ist dem A_{2A} - ähnlich wie dem A_3 -AR ein Einfluss auf die Entstehung und Verbreitung tumoröser Strukturen nicht mehr abzuspüren.

Ein außer Kontrolle geratenes Zellwachstum führt zu einer Unterversorgung mit Sauerstoff und anderen Nährstoffen. Ischämische sowie hypoxische Zustände haben den Untergang von Zellen und die Freisetzung erhöhter Adenosinkonzentrationen zur Folge und werden als Hauptquelle für extrazelluläres Adenosin in Tumorgewebe angesehen (Spychala, 2000). Das in Tumoren vorherrschende hypoxische Milieu ist bekannt dafür, über einen hohen Gehalt an extrazellulärem Adenosin zu verfügen, was eine immunsupprimierende Wirkung verursachen kann (Blay et al., 1997). Zellen vor ischämischen Schäden zu schützen und supprimierend auf die Immunantwort einwirken zu können, ermöglichen einer A_{2A} -Aktivierung, physiologisch gesunde Zellen ebenso wie pathologische Tumorzellen vor einer Unterversorgung oder „Entsorgung“ durch die Immunabwehr zu bewahren.

Tatsächlich wurden in Tumorgewebe nachgewiesen, dass es durch Adenosin zu einer A_{2A} -vermittelten Inhibition der vorhandenen T-Lymphozyten kommt und so die malignen Zellen vor der körpereigenen Immunabwehr schützt (Ohta et al., 2006). Weiter wurde entdeckt, dass der A_{2A} -AR eine inhibierende Wirkung auf die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen und deren Produktion an essentiellen immunologischen Zytokinen verursachen kann (Hoskin et al., 2008). Durch die Behandlung von T-Lymphozyten mit antagonistischen Liganden, wie u.a. Coffein,

konnte das Tumorwachstum gemindert, eine Metastasierung verhindert und die Ausbildung neuer Blutgefäße aufgehalten werden (Ohta et al., 2006).

Mittlerweile ist nachgewiesen, dass unspezifische wie auch spezifische Lymphozyten Ziele der sog. „tumor-immune-escape“-Mechanismen sind. Diese Mechanismen umfassen sämtliche Strategien und neu erworbenen Fähigkeiten der Tumorzelle, um sich gegen die körpereigene Immunabwehr behaupten zu können (siehe Igney und Krammer (2002)).

Auch spezifische, gegen Melanome gerichtete CD8⁺ und CD4⁺ T-Helferzellen wurden durch Adenosin und seinem Analogon 2-Chloradenosin über den A_{2A}-AR in ihrer Aktivität und der Produktion wichtiger Zytokine, wie etwa dem IFN- γ , IL-2 und TNF- α , gehemmt. Mit Hilfe von CGS 21680 und ZM 241385 stellte sich heraus, dass die Suppression über einen cAMP-Anstieg und eine Aktivierung der PKA gesteuert wurde (Raskovalova et al., 2007).

Neben diesen indirekten Mechanismen in Form der Immunmodulation sind auch direkte Einflüsse des A_{2A}-AR auf Tumorzellen und deren Überleben bekannt. So setzen die für Wachstum notwendige Ernährung sowie die für die Malignität erforderliche Metastasierung einen ausreichenden Zugang der Tumorzellen zu Blutgefäßen voraus. Neben der beschriebenen Förderung der Wundheilung ist der A_{2A}-AR ebenso an der Proliferation von Endothelzellen und der Synthese des wichtigen Signalmoleküls VEGF für die Gefäßneubildung beteiligt (Leibovich et al., 2002; Montesinos et al., 2002).

Im Gegensatz dazu scheinen A_{2A}-AR auf Melanomzellen auch zu wachstumshemmenden Signalen in der Lage zu sein. So wird vermutet, dass eine potentielle Signaltransduktion des A_{2A} über eine PKA-unabhängige Signalkaskade, wie über ERK-1/2, zum Zelltod führen könnte (Merighi et al., 2002).

3.3. A_{2B}-Adenosinrezeptoren in Tumorgewebe

Durch die weitreichende Expression von A_{2B}-AR, insbesondere auf Zellen des Binde- und Stützgewebes sowie der Gefäße (siehe unter I.2.3.3), wunderte es nicht, dass ihm nach seiner Entdeckung durch Bruns (1980) auch die Verbreitung in tumorösen Strukturen nachgewiesen wurde. Die Tatsache, dass der A_{2B}-AR erst bei hohen, pathologischen Adenosinkonzentrationen aktiviert wird, bekräftigt den Verdacht, dass

er Tumorzellen in ihrer stoffwechselreichen Umgebung und angespannten Versorgungslage mit Nährstoffen in Form einer „Strukturhilfe“ unterstützen könnte. Weiter liegt nahe, dass der A_{2B}-AR überwiegend eine pathophysiologische Rolle spielt, da er aufgrund seiner niedrigen Adenosinaffinität unter physiologischen Bedingungen kaum in Funktion tritt. Ausschließlich im Zustand der Hypoxie oder Ischämie werden die für eine A_{2B}-AR-Aktivierung notwendigen hohen Adenosinkonzentrationen erreicht (Fredholm et al., 2001b).

In humanen Kolonkarzinomzellen HT29 sowie in den Glioblastomzellen U87MG wurde bei einer A_{2B}-Aktivierung eine vermehrte Ausschüttung des Chemokins IL-8 nachgewiesen (Merighi et al., 2007; Gessi et al., 2011a). Dieses chemotaktische Zytokin ist neben dem VEGF einer der wichtigsten Angiogenesefaktoren und trägt zur Rekrutierung von Leuko- und Granulozyten in entzündliches Gewebe bei. Eine Blockade dieser A_{2B}-vermittelten Effekte könnten zu einer Unterversorgung der Krebszellen führen und dadurch ihr Wachstum limitieren (Gessi et al., 2011a).

Im Zusammenhang mit Tumorzellen erweist sich das bereits erwähnte ERK-1/2-Signal der MAP-Kinase-Signalwege als äußerst interessant. Neben dem A_{2A}- scheint auch der A_{2B}-AR antiproliferativ bzw. proapoptotisch auf Tumorzellen einzuwirken. So konnte, wie einleitend beschrieben, nicht nur eine große Anzahl an A_{2B}-AR auf den Brustkrebszellen MDA-MB-231 gefunden werden, sondern auch eine A_{2B}-abhängige Inhibierung des ERK-1/2-Signalwegs nachgewiesen werden. NECA konnte über den A_{2B}-AR eine vorübergehende Inhibition der ERK-1/2-Phosphorylierung verursachen (Panjehpour et al., 2005; Bieber et al., 2008).

Der für die Proliferation von Zellen wichtige ERK-Signalweg findet in ungefähr einem Drittel aller Tumorzellen in irregulärer Art und Weise statt. Als Ursache für eine tumorassoziierte ERK-Aktivierung werden Mutationen der Ras- und Raf-Proteine im ERK-Signalweg angesehen. Die Mutationen bewirken eine permanente Aktivierung des Signalwegs und führen zu einem ununterbrochenem Wachstumssignal in der Zelle (Dhillon et al., 2007).

Dem A_{2B}-AR konnte bisher keine eindeutige Rolle in der Tumorgenese oder Tumormetastasierung zugeordnet werden. Ähnlich der anderen AR-Subtypen sind ihm

sowohl tumorfördernde als auch tumorhemmende Einflüsse in der Zellphysiologie bzw. -pathophysiologie nachzuweisen (siehe Gessi et al. (2011a).

Weitere Untersuchungen des A_{2B}-AR in Tumorzellen sind notwendig, um der Klärung der durch ihn vermittelten Effekte näher zu kommen. Insbesondere sollten verstärkt die cAMP-unabhängigen Signalwege, wie bspw. MAPK, untersucht werden.

4. *Adenosinrezeptoren als Ansatzpunkt in der Therapie von Hauttumoren*

Bisher fällt bei der Frage nach einer definitiven und erfolgversprechenden Maßnahme in der Therapie von Melanomen und Hauttumoren die Wahl auf die chirurgische Exzision (Markovic et al., 2007b). In Fällen, in denen mittels reiner chirurgischer Entfernung keine kurative Therapie möglich oder das Risiko erneuter Tumore sehr hoch ist, werden adjuvante Therapien hinzugezogen. Patienten mit einem onkologischem Stadium von >II haben dann mit den oftmals sehr starken Nebenwirkungen und der damit verbundenen Abnahme von Lebensqualität zu kämpfen. Die Signalmechanismen der AR, die bei der Therapie von Hauttumoren dienen könnten, wirken einerseits direkt auf die zelluläre Signalübertragung oder regulieren andererseits indirekt mit Hilfe von Immunzellen das Wachstum von Krebszellen. Im Fall von inoperablen Tumoren wäre der direkteste Therapieansatz, die Krebszelle an einer Reproduktion und einer Verschleppung in andere Körperareale zu hindern, und im besten Fall keine gesunden Zellen in Mitleidenschaft zu ziehen.

Bei der Forschung um Adenosin und der Krebsbekämpfung scheint sich der A₃-AR als hoffnungsvollster Ansatzpunkt zu etablieren. In Melanomzellen von Mäusen konnte mit einer A₃-Aktivierung ein direkter antiproliferativer Effekt nachgewiesen werden, indem eine Änderung des Wnt-Signalwegs erzielt und die Vermehrung durch Arretierung des Zellzyklus in der G₀/G₁-Phase gestoppt werden konnte (Fishman et al., 2002). Weiter konnte Adenosin über den A₃-AR eine verstärkte Expression der Proteine HIF-1 α und dem bereits in Verbindung mit dem A_{2A}- und A_{2B}-AR genannten VEGF nachgewiesen werden (Merighi et al., 2006). Das Protein HIF-1 α ist ein Wachstumsfaktor, der unter hypoxischen Bedingungen ausgeschüttet wird, um eine dem Bedarf angepasste Sauerstoffsättigung zu gewährleisten. In Verbindung mit der Induzierung von VEGF

scheint es einen entscheidenden Beitrag zur Angiogenese und folglich zur Tumorausdehnung und Metastasierung beizutragen. Studien, in denen A_3 - sowie A_{2B} -AR in Melanomzellen pharmakologisch blockiert wurden, um eine Ausschüttung von VEGF und IL-8 zu minimieren, zeigten, dass eine Modulation von AR sehr hilfreich bei der Verbesserung von Chemotherapeutika in der Krebstherapie sein könnte (Merighi et al., 2009).

Auch der A_{2A} -AR ist ein vielversprechendes Ziel in der Entwicklung neuer Therapieansätze. Angesichts der beschriebenen Adenosin-vermittelten Resistenz in anti-Melanom spezifischen T-Helferzellen (Raskovalova et al., 2007), wäre eine pharmakologische Blockade des A_{2A} -AR denkbar, die eine regelrechte Immunantwort von T- und NK-Zellen gewährleistet, ausreichend Zytokine bereitstellt und die Verbreitung der Tumorzellen durch eine eingeschränkte Neoangiogenese verhindert.

Für den A_3 - sowie den A_{2A} -AR sind derzeit Adenosinderivate für die Behandlung von hautassoziierten Erkrankungen, wie Ulzera oder der Psoriasis, in klinischen Erprobungsphasen (siehe (Gessi et al., 2011b)). Antagonisten des A_{2A} - und A_{2B} -AR sowie Agonisten für den A_3 -AR müssen weiter als potentielle Werkzeuge für die Behandlung von Hauttumoren erforscht werden, um sie möglicherweise in Zukunft in Kombination mit der Standardbehandlung von Hauttumoren anwenden zu können.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Adenosin steuert seine physiologische Funktionen über die vier G-Protein gekoppelten Adenosinrezeptoren A_1 , A_{2A} , A_{2B} und A_3 und kann enormen Einfluss auf die Zellphysiologie und das Immunsystem haben. Hohe Adenosinkonzentrationen in Tumorgewebe haben das Interesse vieler Forschungsgruppen geweckt und den Nachweis von AR und dessen tumorfördernde sowie -hemmende Wirkung auf diverse Krebszellen nach sich gezogen. Melanome sind für 90% der letal ausgehenden Hautkrebsformen verantwortlich, da bereits kleinste Formen metastasieren können und oftmals eine rein chirurgische Therapie keine Heilung verspricht. Bei ungünstiger Prognose schränken adjuvante und systemische Therapieergänzungen die Lebensqualität erheblich ein. Auf der Suche nach gezielteren und schonenderen Therapieansätzen gilt es, die Rolle des Adenosins im Tumorgeschehen weiter aufzuklären, was den Nachweis und die Charakterisierung von AR und deren rezeptorspezifisch-gekoppelte Effekte voraussetzt. Daher sollten in der hier vorliegenden Arbeit die fünf humanen Melanomzelllinien A375, Brown, MV3, SK-MEL23 und MEL2A auf die Expression von AR untersucht werden.

Zu Beginn wurden die Zellen mit Hilfe von Bindungsexperimenten unter Einsatz radioaktiv markierter Liganden ($[^3\text{H}]$ HEMADO, $[^3\text{H}]$ CCPA, $[^3\text{H}]$ NECA und $[^3\text{H}]$ ZM 241385) auf das Vorliegen der vier AR-Subtypen untersucht. A_1 - und A_3 -AR wurden nach Bindungsstudien mit $[^3\text{H}]$ CCPA bzw. $[^3\text{H}]$ HEMADO ausgeschlossen und nicht weiter untersucht. Durch Bindungsstudien mit $[^3\text{H}]$ ZM 241385 konnten in den Zellen Brown, MV3, SK-MEL23 und MEL2A geringe Mengen von A_{2B} -Rezeptoren detektiert werden.

Es folgten funktionelle Untersuchungen zur Stimulation der AC mit den Liganden NECA und CGS 21680 unter besonderem Blick auf die Differenzierung zwischen einer A_{2A} - oder A_{2B} -vermittelten Stimulation. Ein NECA-vermittelter Anstieg des $c[^{32}\text{P}]\text{AMP}$ im AC-Versuch bestätigte die Anwesenheit von A_{2B} -Rezeptoren in den Zellen A375, Brown, MV3 und SK-MEL23. Durch CGS 21680 kam es hingegen zu keiner AC-Stimulation, was eine A_{2A} -AR-Beteiligung ausschloss. Zur Bestätigung einer A_{2B} -gekoppelten AC-Aktivität wurde zum Abschluss der Versuche die Wirkung von drei selektiven Antagonisten (DPCPX, SCH 58261 und MRE 3008-F20) auf ein

NECA-induziertes cAMP-Signal überprüft. Mit den drei Antagonisten konnte an den Zelllinien A375, Brown und MV3 die für A_{2B}-AR zu erwartende Wirkung nachgewiesen und damit die Expression von A_{2B}-AR in diesen Zellen bestätigt werden. Die gewonnenen Daten können als Ausgangspunkt weiterführender Untersuchungen genutzt werden, um die Rolle von AR in Krebszellen besser zu verstehen. Sie könnten als Grundlage für die Suche nach potenziellen Angriffspunkten für neue Therapieansätze dienen und so einen Beitrag für Fortschritte in der Behandlung von Tumoren leisten.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- Abbraccio, M. P. und Cattabeni, F.** (1999). Brain adenosine receptors as targets for therapeutic intervention in neurodegenerative diseases, Ann N Y Acad Sci 890: 79-92.
- Armentero, M. T., Pinna, A., Ferre, S., Lanciego, J. L., Muller, C. E. und Franco, R.** (2011). Past, present and future of A(2A) adenosine receptor antagonists in the therapy of Parkinson's disease, Pharmacol Ther 132: 280-299.
- Arslan, G., Kull, B. und Fredholm, B. B.** (1999). Signaling via A2A adenosine receptor in four PC12 cell clones, Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 359: 28-32.
- Balch, C. M. R., D.S.; Kirkwood, J.M.; Houghton, A.; Peters, L. & Ang, K.K.** (1997). Cutaneous Melanoma. Philadelphia. *Cancer: Principles and Practice of Oncology (5th Ed.)*. Lippincott-Raven.
- Ballarin, M., Fredholm, B. B., Ambrosio, S. und Mahy, N.** (1991). Extracellular levels of adenosine and its metabolites in the striatum of awake rats: inhibition of uptake and metabolism, Acta Physiol Scand 142: 97-103.
- Bieber, D., Lorenz, K., Yadav, R. und Klotz, K. N.** (2008). A2B adenosine receptors mediate an inhibition of ERK-1/2 phosphorylation in the breast cancer line MDA-MB-231, Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology 377: 1-98.
- Blay, J., White, T. D. und Hoskin, D. W.** (1997). The extracellular fluid of solid carcinomas contains immunosuppressive concentrations of adenosine, Cancer Res 57: 2602-2605.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal Biochem 72: 248-254.
- Brodde, O. E.** (1993). Beta-adrenoceptors in cardiac disease, Pharmacol Ther 60: 405-430.
- Brown, J. R., Cornell, K. und Cook, P. W.** (2000). Adenosine- and adenine-nucleotide-mediated inhibition of normal and transformed keratinocyte proliferation is dependent upon dipyridamole-sensitive adenosine transport, J Invest Dermatol 115: 849-859.
- Bruns, R. F.** (1980). Adenosine receptor activation in human fibroblasts: nucleoside agonists and antagonists, Can J Physiol Pharmacol 58: 673-691.
- Chapal, J., Loubatieres-Mariani, M. M., Petit, P. und Roye, M.** (1985). Evidence for an A2-subtype adenosine receptor on pancreatic glucagon secreting cells, Br J Pharmacol 86: 565-569.
- Clancy, J. P., Ruiz, F. E. und Sorscher, E. J.** (1999). Adenosine and its nucleotides activate wild-type and R117H CFTR through an A2B receptor-coupled pathway, Am J Physiol 276: C361-369.

- Dhalla, A. K., Chisholm, J. W., Reaven, G. M. und Belardinelli, L.** (2009). A1 adenosine receptor: role in diabetes and obesity, Handb Exp Pharmacol: 271-295.
- Dhillon, A. S., Hagan, S., Rath, O. und Kolch, W.** (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer, Oncogene 26: 3279-3290.
- Drury, A. N. und Szent-Gyorgyi, A.** (1929). The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart, J Physiol 68: 213-237.
- Dubey, R. K., Gillespie, D. G. und Jackson, E. K.** (1998). Adenosine inhibits collagen and protein synthesis in cardiac fibroblasts: role of A2B receptors, Hypertension 31: 943-948.
- Feoktistov, I. und Biaggioni, I.** (1997). Adenosine A2B receptors, Pharmacol Rev 49: 381-402.
- Feoktistov, I., Goldstein, A. E. und Biaggioni, I.** (1999). Role of p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated protein kinase kinase in adenosine A2B receptor-mediated interleukin-8 production in human mast cells, Mol Pharmacol 55: 726-734.
- Feoktistov, I., Goldstein, A. E., Ryzhov, S., Zeng, D., Belardinelli, L., Voyno-Yasenetskaya, T. und Biaggioni, I.** (2002). Differential expression of adenosine receptors in human endothelial cells: role of A2B receptors in angiogenic factor regulation, Circ Res 90: 531-538.
- Fishman, P., Bar-Yehuda, S., Madi, L. und Cohn, I.** (2002). A3 adenosine receptor as a target for cancer therapy, Anticancer Drugs 13: 437-443.
- Fishman, P., Bar-Yehuda, S., Synowitz, M., Powell, J. D., Klotz, K. N., Gessi, S. und Borea, P. A.** (2009). Adenosine receptors and cancer, Handb Exp Pharmacol: 399-441.
- Fredholm, B. B.** (1995). Astra Award Lecture. Adenosine, adenosine receptors and the actions of caffeine, Pharmacol Toxicol 76: 93-101.
- Fredholm, B. B., AP, I. J., Jacobson, K. A., Linden, J. und Muller, C. E.** (2011). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update, Pharmacol Rev 63: 1-34.
- Fredholm, B. B., IJzerman, A. P., Jacobson, K. A., Klotz, K. N. und Linden, J.** (2001a). International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors, Pharmacol Rev 53: 527-552.
- Fredholm, B. B., Irenius, E., Kull, B. und Schulte, G.** (2001b). Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells, Biochem Pharmacol 61: 443-448.
- Garbe, C., Peris, K., Hauschild, A., Saiag, P., Middleton, M., Spatz, A., Grob, J. J., Malvehy, J., Newton-Bishop, J., Stratigos, A., Pehamberger, H. und Eggermont, A. M.** (2012). Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline - Update 2012, Eur J Cancer 48: 2375-2390.

- Gessi, S., Merighi, S., Sacchetto, V., Simioni, C. und Borea, P. A.** (2011a). Adenosine receptors and cancer, Biochim Biophys Acta 1808: 1400-1412.
- Gessi, S., Merighi, S., Varani, K. und Borea, P. A.** (2011b). Adenosine receptors in health and disease, Adv Pharmacol 61: 41-75.
- Gessi, S., Varani, K., Merighi, S., Cattabriga, E., Iannotta, V., Leung, E., Baraldi, P. G. und Borea, P. A.** (2002). A(3) adenosine receptors in human neutrophils and promyelocytic HL60 cells: a pharmacological and biochemical study, Mol Pharmacol 61: 415-424.
- Gessi, S., Varani, K., Merighi, S., Ongini, E. und Borea, P. A.** (2000). A(2A) adenosine receptors in human peripheral blood cells, Br J Pharmacol 129: 2-11.
- Giffin, N. J., Kowacs, F., Libri, V., Williams, P., Goadsby, P. J. und Kaube, H.** (2003). Effect of the adenosine A1 receptor agonist GR79236 on trigeminal nociception with blink reflex recordings in healthy human subjects, Cephalalgia 23: 287-292.
- Hanahan, D. und Weinberg, R. A.** (2000). The hallmarks of cancer, Cell 100: 57-70.
- Hasko, G., Csoka, B., Nemeth, Z. H., Vizi, E. S. und Pacher, P.** (2009). A(2B) adenosine receptors in immunity and inflammation, Trends Immunol 30: 263-270.
- Hoskin, D. W., Mader, J. S., Furlong, S. J., Conrad, D. M. und Blay, J.** (2008). Inhibition of T cell and natural killer cell function by adenosine and its contribution to immune evasion by tumor cells (Review), Int J Oncol 32: 527-535.
- Igney, F. H. und Krammer, P. H.** (2002). Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack, J Leukoc Biol 71: 907-920.
- Jacobson, K. A. und Gao, Z. G.** (2006). Adenosine receptors as therapeutic targets, Nat Rev Drug Discov 5: 247-264.
- Jacobson, K. A., Hoffmann, C., Cattabeni, F. und Abbracchio, M. P.** (1999). Adenosine-induced cell death: evidence for receptor-mediated signalling, Apoptosis 4: 197-211.
- Ji, X. D. und Jacobson, K. A.** (1999). Use of the triazolotriazine [3H]ZM 241385 as a radioligand at recombinant human A2B adenosine receptors, Drug Des Discov 16: 217-226.
- Khisti, R. T., Chopde, C. T. und Abraham, E.** (2000). GABAergic involvement in motor effects of an adenosine A(2A) receptor agonist in mice, Neuropharmacology 39: 1004-1015.
- Klotz, K. N.** (2000). Adenosine receptors and their ligands, Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 362: 382-391.
- Klotz, K. N., Cristalli, G., Grifantini, M., Vittori, S. und Lohse, M. J.** (1985). Photoaffinity labeling of A1-adenosine receptors, J Biol Chem 260: 14659-14664.

- Klotz, K. N., Falgner, N., Kachler, S., Lambertucci, C., Vittori, S., Volpini, R. und Cristalli, G.** (2007). [3H]HEMADO--a novel tritiated agonist selective for the human adenosine A3 receptor, Eur J Pharmacol 556: 14-18.
- Klotz, K. N., Hessling, J., Hegler, J., Owman, C., Kull, B., Fredholm, B. B. und Lohse, M. J.** (1998). Comparative pharmacology of human adenosine receptor subtypes - characterization of stably transfected receptors in CHO cells, Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 357: 1-9.
- Klotz, K. N., Lohse, M. J., Schwabe, U., Cristalli, G., Vittori, S. und Grifantini, M.** (1989). 2-Chloro-N6-[3H]cyclopentyladenosine ([3H]CCPA)--a high affinity agonist radioligand for A1 adenosine receptors, Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 340: 679-683.
- Lee, J. A.** (1982). Melanoma and exposure to sunlight, Epidemiol Rev 4: 110-136.
- Leibovich, S. J., Chen, J. F., Pinhal-Enfield, G., Belem, P. C., Elson, G., Rosania, A., Ramanathan, M., Montesinos, C., Jacobson, M., Schwarzschild, M. A., Fink, J. S. und Cronstein, B.** (2002). Synergistic up-regulation of vascular endothelial growth factor expression in murine macrophages by adenosine A(2A) receptor agonists and endotoxin, Am J Pathol 160: 2231-2244.
- Li, S., Huang, S. und Peng, S. B.** (2005). Overexpression of G protein-coupled receptors in cancer cells: involvement in tumor progression, Int J Oncol 27: 1329-1339.
- Linden, J.** (2001). Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection, Annu Rev Pharmacol Toxicol 41: 775-787.
- Lohse, M. J., Brenner, A. S. und Jackisch, R.** (1987). Pentobarbital antagonizes the A1 adenosine receptor-mediated inhibition of hippocampal neurotransmitter release, J Neurochem 49: 189-194.
- Londos, C., Cooper, D. M. und Wolff, J.** (1980). Subclasses of external adenosine receptors, Proc Natl Acad Sci U S A 77: 2551-2554.
- Mackie, R. M.** (1998). Incidence, risk factors and prevention of melanoma, Eur J Cancer 34 Suppl 3: S3-6.
- Madi, L., Bar-Yehuda, S., Barer, F., Ardon, E., Ochaion, A. und Fishman, P.** (2003). A3 adenosine receptor activation in melanoma cells: association between receptor fate and tumor growth inhibition, J Biol Chem 278: 42121-42130.
- Markovic, S. N., Erickson, L. A., Rao, R. D., Weenig, R. H., Pockaj, B. A., Bardia, A., Vachon, C. M., Schild, S. E., McWilliams, R. R., Hand, J. L., Laman, S. D., Kottschade, L. A., Maples, W. J., Pittelkow, M. R., Pulido, J. S., Cameron, J. D. und Creagan, E. T.** (2007a). Malignant melanoma in the 21st century, part 1: epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis, Mayo Clin Proc 82: 364-380.
- Markovic, S. N., Erickson, L. A., Rao, R. D., Weenig, R. H., Pockaj, B. A., Bardia, A., Vachon, C. M., Schild, S. E., McWilliams, R. R., Hand, J. L., Laman, S. D., Kottschade, L. A., Maples, W. J., Pittelkow, M. R., Pulido, J. S., Cameron, J. D. und Creagan, E. T.** (2007b). Malignant melanoma in the 21st century, part 2: staging, prognosis, and treatment, Mayo Clin Proc 82: 490-513.

- Merighi, S., Benini, A., Mirandola, P., Gessi, S., Varani, K., Leung, E., Maclennan, S. und Borea, P. A.** (2006). Adenosine modulates vascular endothelial growth factor expression via hypoxia-inducible factor-1 in human glioblastoma cells, Biochem Pharmacol 72: 19-31.
- Merighi, S., Benini, A., Mirandola, P., Gessi, S., Varani, K., Simioni, C., Leung, E., Maclennan, S., Baraldi, P. G. und Borea, P. A.** (2007). 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: 395-406.
- Merighi, S., Mirandola, P., Milani, D., Varani, K., Gessi, S., Klotz, K. N., Leung, E., Baraldi, P. G. und Borea, P. A.** (2002). Adenosine receptors as mediators of both cell proliferation and cell death of cultured human melanoma cells, J Invest Dermatol 119: 923-933.
- Merighi, S., Mirandola, P., Varani, K., Gessi, S., Leung, E., Baraldi, P. G., Tabrizi, M. A. und Borea, P. A.** (2003). A glance at adenosine receptors: novel target for antitumor therapy, Pharmacol Ther 100: 31-48.
- Merighi, S., Simioni, C., Gessi, S., Varani, K., Mirandola, P., Tabrizi, M. A., Baraldi, P. G. und Borea, P. A.** (2009). A(2B) and A(3) adenosine receptors modulate vascular endothelial growth factor and interleukin-8 expression in human melanoma cells treated with etoposide and doxorubicin, Neoplasia 11: 1064-1073.
- Merighi, S., Varani, K., Gessi, S., Cattabriga, E., Iannotta, V., Ulouglu, C., Leung, E. und Borea, P. A.** (2001). Pharmacological and biochemical characterization of adenosine receptors in the human malignant melanoma A375 cell line, Br J Pharmacol 134: 1215-1226.
- Mirza, A., Basso, A., Black, S., Malkowski, M., Kwee, L., Pachter, J. A., Lachowicz, J. E., Wang, Y. und Liu, S.** (2005). RNA interference targeting of A1 receptor-overexpressing breast carcinoma cells leads to diminished rates of cell proliferation and induction of apoptosis, Cancer Biol Ther 4: 1355-1360.
- Montesinos, M. C., Desai, A., Chen, J. F., Yee, H., Schwarzschild, M. A., Fink, J. S. und Cronstein, B. N.** (2002). Adenosine promotes wound healing and mediates angiogenesis in response to tissue injury via occupancy of A(2A) receptors, Am J Pathol 160: 2009-2018.
- Ohta, A., Gorelik, E., Prasad, S. J., Ronchese, F., Lukashev, D., Wong, M. K., Huang, X., Caldwell, S., Liu, K., Smith, P., Chen, J. F., Jackson, E. K., Apasov, S., Abrams, S. und Sitkovsky, M.** (2006). A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells, Proc Natl Acad Sci U S A 103: 13132-13137.
- Ongini, E., Dionisotti, S., Gessi, S., Irenius, E. und Fredholm, B. B.** (1999). Comparison of CGS 15943, ZM 241385 and SCH 58261 as antagonists at human adenosine receptors, Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 359: 7-10.
- Panjehpour, M., Castro, M. und Klotz, K. N.** (2005). Human breast cancer cell line MDA-MB-231 expresses endogenous A2B adenosine receptors mediating a Ca²⁺ signal, Br J Pharmacol 145: 211-218.

- Poulsen, S. A. und Quinn, R. J.** (1998). Adenosine receptors: new opportunities for future drugs, Bioorg Med Chem 6: 619-641.
- Raman, M., Chen, W. und Cobb, M. H.** (2007). Differential regulation and properties of MAPKs, Oncogene 26: 3100-3112.
- Raskovalova, T., Lokshin, A., Huang, X., Su, Y., Mandic, M., Zarour, H. M., Jackson, E. K. und Gorelik, E.** (2007). Inhibition of cytokine production and cytotoxic activity of human antimelanoma specific CD8+ and CD4+ T lymphocytes by adenosine-protein kinase A type I signaling, Cancer Res 67: 5949-5956.
- Reginster, M. A., Pierard-Franchimont, C., Pierard, G. E. und Quatresooz, P.** (2012). Molecular dermatopathology in malignant melanoma, Dermatol Res Pract 2012: 684032.
- Rosales, O. R., Eades, B. und Assali, A. R.** (2004). Cardiovascular drugs: adenosine role in coronary syndromes and percutaneous coronary interventions, Catheter Cardiovasc Interv 62: 358-363.
- Sato, T., Sasaki, N., O'Rourke, B. und Marban, E.** (2000). Adenosine primes the opening of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels: a key step in ischemic preconditioning?, Circulation 102: 800-805.
- Schulte, G. und Fredholm, B. B.** (2003). Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases, Cell Signal 15: 813-827.
- Sebastiao, A. M. und Ribeiro, J. A.** (1996). Adenosine A2 receptor-mediated excitatory actions on the nervous system, Prog Neurobiol 48: 167-189.
- Shryock, J. C. und Belardinelli, L.** (1997). Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: biochemistry, physiology, and pharmacology, Am J Cardiol 79: 2-10.
- Spychala, J.** (2000). Tumor-promoting functions of adenosine, Pharmacol Ther 87: 161-173.
- Tucker, A. L., Jia, L. G., Holeton, D., Taylor, A. J. und Linden, J.** (2000). Dominance of G(s) in doubly G(s)/G(i)-coupled chimaeric A(1)/A(2A) adenosine receptors in HEK-293 cells, Biochem J 352 Pt 1: 203-210.
- Vallon, V., Muhlbauer, B. und Osswald, H.** (2006). Adenosine and kidney function, Physiol Rev 86: 901-940.
- van Calker, D., Muller, M. und Hamprecht, B.** (1979). Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells, J Neurochem 33: 999-1005.
- Varani, K., Vincenzi, F., Tosi, A., Targa, M., Masieri, F. F., Ongaro, A., De Mattei, M., Massari, L. und Borea, P. A.** (2010). Expression and functional role of adenosine receptors in regulating inflammatory responses in human synoviocytes, Br J Pharmacol 160: 101-115.

VII. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AC	Adenylylcyclase
ADA	Adenosin-Desaminase
AMP	Adenosinmonophosphat
AR / A _x AR	Adenosinrezeptor(en)
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serum Albumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CCPA	2-Chloro-N ⁶ -cyclopentyladenosin
CGS 21680	2-[p-(2-Caboxyethyl)phenylethylamino]-5'-N-ethylcarboxamido-adenosinhydrochlorid
CHO	Chinesische Hamster Ovarzellen
CMF-PBS	Kalzium- und magnesiumfreie phosphatgepufferte Salzlösung / Calcium + magnesium free phosphate buffered saline
cpm	Zähler pro Minute / Counts per minute
CREB	cAMP bindendes Protein / cAMP response element-binding protein
DAG	Diacylglycerin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DPCPX	1,3-Dipropyl-8-cyclopentylxanthin
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK-1/2	Extrazelluläre Signal-regulierende Kinase-1/2 / Extracellular signal-regulated kinase-1/2
FCS	Fetales Kälberserum
G _i -Protein	Inhibitorisches G-Protein
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G _s -Protein	Stimulatorisches G-Protein
HEK	Humane Nierenzellen
HEMADO	2-(1-hexynyl)-N-methyladenosin
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IL-(x)	Interleukin-(x), bspw. Interleukin-2
IFN- γ	Interferon gamma
IP ₃	Inositoltrisphosphat

$K_{D/i}$	Dissoziationskonstante für die Bindung einer Substanz / Inhibitors an einem Rezeptor oder Enzym
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen / MAP-Kinasen
MDA	Humane Brustkrebszellen / MD Anderson-Zellen
MRE 3008-F20	N ⁵ -4-methoxyphenyl-carbamoyl)amino-8-propyl-2(2furyl)-pyrazolo[4,3e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NECA	5'-N-ethylcarboxamidoadenosin
NF- κ B	Nuklear Faktor kappa B
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung / Phosphate buffered saline
PDEI	Phosphodiesterase-Inhibitor
PIA	N ⁶ -(2-phenyl-isopropyl)adenosin
PIP ₂	Phosphatidylinositolbisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
rpm	Umdrehung pro Minute / Rounds per minute
SCH 58261	7-(2-phenylethyl)-5-amino-2-(2-furyl)-pyrazolo-[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin
SEM	Standardfehler des Mittelwerts / Standard error of the mean
TB	Totale Bindung
TEA	Triethanolamin
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
UB	Unspezifische Bindung
VEGF	Endothelialer Wachstumsfaktor / Vascular endothelial growth factor
v_{max}	Maximale Geschwindigkeit
ZM 241385	4-(2-[7-amino-2-(2-furyl)[1,2,4]triazolo[2,3-a][1,3,5]triazin-5-ylamino]ethyl)phenol
ZNS	Zentrales Nervensystem

VIII. TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS

1. Tabellen

Tabelle [1]: Übersicht zum Vorkommen der AR-Subtypen und deren Funktion	10
Tabelle [2]: Proteinbestimmung für Bindungsversuche	24
Tabelle [3]: Puffer und Liganden der Bindungsversuche	27
Tabelle [4]: Beobachtungen in der Zellkultur	32
Tabelle [5]: Spezifische A _{2A} - und A _{2B} -Bindungsstellen	36
Tabelle [6]: EC ₅₀ -Werte der NECA-stimulierten AC-Aktivität	40

2. Abbildungen

Abbildung [1]: Die Familie der Purin-Rezeptoren	3
Abbildung [2]: Signalwege der vier Adenosinrezeptoren	5
Abbildung [3]: Mögliche Wirkungsmechanismen der AR auf Tumorzellen	16
Abbildung [4]: Schematische Darstellung eines Bindungs-Assay	26
Abbildung [5]: Bindung des Antagonisten [³ H]ZM 241385	35
Abbildung [6]: Aktivität der Adenylylcyclase	38
Abbildung [7]: Stimulation der Adenylylcyclase	39
Abbildung [8]: Wirkung von Antagonisten auf die NECA-stimulierten AC-Aktivität in A375-Zellen	41
Abbildung [9]: Wirkung von Antagonisten auf die NECA-stimulierten AC-Aktivität in Brown-Zellen	42
Abbildung [10]: Wirkung von Antagonisten auf die NECA-stimulierte AC-Aktivität in MV3-Zellen	43

DANKSAGUNG

Bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Klotz für die Überlassung des interessanten Themas und die Betreuung der Arbeit.

Für die Einführung in verschiedene Methoden sowie für die Unterstützung bei den experimentellen Versuchen während meiner Zeit im Labor möchte ich mich bei Sonja Kachler recht herzlich bedanken.

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

Mein Dank gilt ebenso ganz herzlich meinen Eltern. Besonders dafür, dass sie mich fortwährend in meiner Motivation bestärkt haben und ich mich stets auf ihre Hilfe verlassen kann. Außerdem möchte ich mich bei meinen guten Freunden für ihr immer offenes Ohr bedanken.