

**Zelluläre dynamische Massenumverteilung zur Erfassung der
Signalwegsaktivierung 7-transmembranärer Rezeptoren
unter besonderer Berücksichtigung des M₄-Acetylcholinrezeptors**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Nicole Janßen

aus

Krefeld

Bonn 2011

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Klaus Mohr

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Eberhard Schlicker

Tag der Promotion: 10.02.2012

Erscheinungsjahr: 2012

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2008 bis einschließlich September 2011 in der Abteilung Pharmakologie & Toxikologie des Pharmazeutischen Institutes der Universität Bonn unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Klaus Mohr angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Muskarinische Acetylcholinrezeptoren	1
1.1.1.	Lokalisation	3
1.1.2.	Signaltransduktion	4
1.2.	Allosterische Bindungsstelle	9
1.2.1.	Therapeutisch genutzte allosterische Modulatoren	11
1.3.	Dualsterische Hybridagonisten muskarinischer Acetylcholinrezeptoren	12
1.4.	Messung zellulärer dynamischer Massenumverteilung mittels Epic [®] -Biosensor	13
1.4.1.	Inhibition der Signaltransduktion mit Hilfe bakterieller Toxine	14
1.5.	Fragestellung	17
2.	Material und Methoden	19
2.1.	Material	19
2.1.1.	Computerprogramme	19
2.1.2.	Datenbanken	20
2.1.3.	Geräte	21
2.1.4.	„Kits“ (Analysesets)	23
2.1.5.	Lösungen	24
2.1.6.	Plasmide	30
2.1.7.	Primer	31
2.1.8.	Reagenzien	32
2.1.9.	Verbrauchsmaterialien	36

Inhaltsverzeichnis

2.2.	Firmen	38
2.3.	Strukturformeln & Kurzbeschreibungen der Testsubstanzen	42
2.3.1.	Aktivatoren	42
2.3.2.	Antagonisten	45
2.3.3.	Hybridverbindungen	47
2.3.4.	Radioliganden	48
2.3.5.	Bakterielle Toxine	49
2.4.	Herstellung stabil transfizierter CHO-Zelllinien	50
2.4.1.	Vermehrung von Plasmid-DNA in Escherichia coli-Bakterien	50
2.4.2.	Extraktion von Plasmid-DNA aus Escherichia coli-Bakterien	51
2.4.3.	DNA-Gehaltsbestimmung	52
2.4.4.	Restriktion von Plasmid-DNA	52
2.4.5.	Gelelektrophoretische Auftrennung und Aufreinigung der DNA-Fragmente	53
2.4.6.	Ligation der Rezeptor-DNA mit dem Zielplasmid	54
2.4.7.	Sequenzierung	54
2.5.	Gezielte Mutagenese	55
2.6.	Zellbiologisches Arbeiten	56
2.6.1.	Verwendete Zelllinien	56
2.6.2.	Zellkultur	57
2.6.3.	Membranpräparation von CHO-Zellen	58
2.6.4.	Bestimmung des Proteingehaltes einer Membransuspension	59
2.7.	Stabile Transfektion	60

2.7.1.	Einzelzellklonierung.....	62
2.8.	Methoden	64
2.8.1.	Messung der dynamischen Massenumverteilung (DMR)	64
2.8.2.	Radioligandbindungsuntersuchungen	68
2.8.2.1.	„Homologe Konkurrenzexperimente“.....	69
2.8.2.2.	Messung der [³⁵ S]GTPγS-Bindung	73
2.8.3.	Messung intrazellulärer sekundärer Botenstoffe (cAMP, IP1) mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET).....	79
2.9.	Statistik.....	83
3.	Ergebnisse	86
3.1.	Messung der Agonist-induzierten dynamischen Massenumverteilung an Flp-InTMhM₂-CHO-Zellen.....	87
3.1.1.	Messung ohne Vorinkubation der Zellen.....	87
3.1.1.1.	Vergleich unterschiedlicher Auswertungsmethoden zur Erhebung von Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurven	87
3.1.1.2.	Iperoxo-induzierte dynamische Massenumverteilung	91
3.1.1.3.	Vergleich unterschiedlicher Auswertungsmethoden zur Erhebung von Phth-6-Iper-Konzentrations-Effekt-Kurven	92
3.1.1.4.	Naph-6-Iper-induzierte dynamische Massenumverteilung	94
3.1.1.5.	Maximal induzierbare dynamische Massenumverteilung muskarinischer Liganden an hM ₂ -CHO-Zellen.....	95
3.1.2.	Einfluss erhöhter intrazellulärer cAMP-Spiegel (Forskolin) auf die Ligand- induzierte dynamische Massenumverteilung	98
3.1.2.1.	Maximal induzierbare dynamische Massenumverteilung muskarinischer Liganden unter erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegeln (Forskolin)	98

3.1.3.	Folgen einer $G\alpha_{i/o}$ -Protein-Inhibition (Pertussistoxin) auf die Ligand-induzierte dynamische Massenumverteilung an hM_2 -CHO-Zellen	101
3.1.3.1.	Acetylcholin-induzierte dynamische Massenumverteilung	101
3.1.3.2.	Iperoxo-induzierte dynamische Massenumverteilung	103
3.1.3.3.	Maximal induzierbare dynamische Massenumverteilung muskarinischer Liganden nach $G\alpha_{i/o}$ -Protein-Inhibition (Pertussistoxin)	104
3.1.4.	Phth-6-Iper-induzierte dynamische Massenumverteilung nach Inhibition oder Maskierung verschiedener Signaltransduktionswege.....	106
3.2.	Messung der Agonist-induzierten dynamischen Massenumverteilung an $h\beta_2$-CHO-Zellen	108
3.2.1.	Messung ohne Vorinkubation der Zellen	109
3.2.1.1.	Vergleich unterschiedlicher Auswertungsmethoden zur Erhebung von Orciprenalin-Konzentrations-Effekt-Kurven.....	109
3.2.1.2.	Maximal induzierbare dynamische Massenumverteilung adrenerger Liganden an $h\beta_2$ -CHO-Zellen.....	112
3.2.2.	Orciprenalin-induzierte dynamische Massenumverteilung nach Inhibition oder Maskierung verschiedener Signaltransduktionswege.....	114
3.3.	Messung der Agonist-induzierten dynamischen Massenumverteilung an Flp-InTMhM_3-CHO-Zellen	116
3.3.1.	Messung ohne Vorinkubation der Zellen	116
3.3.1.1.	Vergleich unterschiedlicher Auswertungsmethoden zur Erhebung von Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurven an hM_3 -CHO-Zellen	116
3.3.1.2.	Acetylcholin-induzierte Inositolmonophosphat-Bildung (IP1) an hM_3 -CHO-Zellen	119
3.3.1.3.	Iperoxo-induzierte dynamische Massenumverteilung	120
3.3.1.4.	Phth-6-Iper-induzierte dynamische Massenumverteilung.....	122
3.3.1.5.	Naph-6-Iper-induzierte dynamische Massenumverteilung	123

3.3.1.6.	Maximal induzierbare dynamische Massenumverteilung muskarinischer Liganden an hM ₃ -CHO-Zellen	124
3.3.2.	YM 254890-Validierung an hM ₃ -CHO-Zellen.....	127
3.3.3.	Acetylcholin-induzierte dynamische Massenumverteilung nach Inhibition oder Maskierung verschiedener Signaltransduktionswege an hM ₃ -CHO-Zellen ...	129
3.3.3.1.	Folgen einer Gα _{i/o} -Protein-Inhibition (Pertussistoxin) auf die Acetylcholin-induzierte dynamische Massenumverteilung an hM ₃ -CHO-Zellen.....	129
3.3.3.2.	Einfluss erhöhter intrazellulärer cAMP-Spiegel (Forskolin) auf die Acetylcholin-induzierte dynamische Massenumverteilung	130
3.3.3.3.	Einfluss erhöhter intrazellulärer cAMP-Spiegel (Choleratoxin) auf die Acetylcholin-induzierte dynamische Massenumverteilung	131
3.3.3.4.	Einfluss einer kombinierten Gα _{i/o} -Protein-Inhibition (Pertussistoxin) und Erhöhung intrazellulärer cAMP-Spiegel (Forskolin) auf die Acetylcholin-induzierte dynamische Massenumverteilung	132
3.3.3.5.	Einfluss einer kombinierten Gα _{i/o} -Protein-Inhibition (Pertussistoxin) und Erhöhung intrazellulärer cAMP-Spiegel (Choleratoxin) auf die Acetylcholin-induzierte dynamische Massenumverteilung	133
3.4.	Systematische Analyse einzelner Komponenten des Gα_s-Signaltransduktionsweges mittels Epic[®]-Biosensor	135
3.4.1.	Internalisierung	136
3.4.2.	Adenylylcyclase-vermittelte dynamische Massenumverteilung	138
3.4.3.	Dynamische Massenumverteilung durch Hemmung des cAMP-Abbaus	139
3.4.4.	Proteinkinase A-vermittelte dynamische Massenumverteilung.....	142
3.4.5.	Inhibition der Proteinkinase A	143
3.4.6.	Epac-vermittelte dynamische Massenumverteilung.....	147

3.5.	[³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimente an Membransuspensionen aus Flp-InTMhM₄-CHO-Zellen	149
3.5.1.	Acetylcholin-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung.....	150
3.5.2.	Oxotremorin M-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	151
3.5.3.	Iperoxo-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung.....	152
3.5.4.	Pilocarpin-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	153
3.5.5.	McN-A-343-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung.....	154
3.5.6.	Überprüfung der Bindungseigenschaften der Testsubstanz Iperoxo an hM ₄ -CHO-Zell-Homogenaten	156
3.5.7.	Phth-6-Iper-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung.....	159
3.5.8.	Naph-6-Iper-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung.....	160
3.5.9.	Überprüfung der Bindungseigenschaften der Testsubstanz Phth-6-Iper an hM ₄ -CHO-Zell-Homogenaten	161
3.5.10.	Überprüfung der Bindungseigenschaften der Testsubstanz Naph-6-Iper an hM ₄ -CHO-Zell-Homogenaten	165
3.6.	[³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimente an Membransuspensionen aus Flp-InTMhM₄⁴³⁵Trp→Ala-CHO-Zellen	168
3.6.1.	Acetylcholin-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung.....	170
3.6.2.	Oxotremorin M-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	171
3.6.3.	Iperoxo-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung.....	172
3.6.4.	Pilocarpin-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	174
3.6.5.	McN-A-343-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung.....	175
3.6.6.	Phth-6-Iper-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung.....	176
3.6.7.	Naph-6-Iper-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung.....	177

3.7.	Messung der Agonist-induzierten dynamischen Massenumverteilung an Flp-InTMhM₄-CHO-Zellen.....	179
3.7.1.	Messung ohne Vorinkubation der Zellen	179
3.7.1.1.	Acetylcholin-induzierte dynamische Massenumverteilung	180
3.7.1.2.	Iperoxo-induzierte dynamische Massenumverteilung	181
3.7.1.3.	Phth-6-Iper-induzierte dynamische Massenumverteilung.....	183
3.7.1.4.	Naph-6-Iper-induzierte dynamische Massenumverteilung	184
3.7.1.5.	Maximal induzierbare dynamische Massenumverteilung muskarinischer Liganden an hM ₄ -CHO-Zellen	185
3.7.2.	Einfluss erhöhter intrazellulärer cAMP-Spiegel (Forskolin) auf die Ligand-induzierte dynamische Massenumverteilung.....	188
3.7.2.1.	Acetylcholin-induzierte dynamische Massenumverteilung	188
3.7.2.2.	Maximal induzierbare dynamische Massenumverteilung muskarinischer Liganden unter erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegeln (Forskolin) ..	189
3.7.3.	Folgen einer Gα _{i/o} -Protein-Inhibition (Pertussistoxin) auf die Ligand-induzierte dynamische Massenumverteilung an hM ₄ -CHO-Zellen	192
3.7.3.1.	Acetylcholin-induzierte dynamische Massenumverteilung	192
3.7.3.2.	Iperoxo-induzierte dynamische Massenumverteilung	194
3.7.3.3.	Phth-6-Iper-induzierte dynamische Massenumverteilung.....	195
3.7.3.4.	Naph-6-Iper-induzierte dynamische Massenumverteilung	197
3.7.3.5.	Maximal induzierbare dynamische Massenumverteilung muskarinischer Liganden nach Gα _{i/o} -Protein-Inhibition (Pertussistoxin) an hM ₄ -CHO-Zellen	198
3.7.4.	Vergleich der Acetylcholin-induzierten cAMP-Bildung zwischen hM ₄ - und hM ₂ -CHO-Zellen	201

3.8.	Messung der Agonist-induzierten dynamischen Massenumverteilung an Flp-InTMM₄⁴³⁵Trp→Ala-CHO-Zellen	203
3.8.1.	Messung ohne Vorinkubation der Zellen.....	203
3.8.1.1.	Acetylcholin-induzierte dynamische Massenumverteilung	203
3.8.1.2.	Iperoxo-induzierte dynamische Massenumverteilung	205
3.8.1.3.	Phth-6-Iper-induzierte dynamische Massenumverteilung.....	206
3.8.1.4.	Naph-6-Iper-induzierte dynamische Massenumverteilung	207
3.8.1.5.	Maximal induzierbare dynamische Massenumverteilung muskarinischer Liganden an hM ₄ ⁴³⁵ Trp→Ala-CHO-Zellen	209
3.8.2.	Einfluss erhöhter intrazellulärer cAMP-Spiegel (Forskolin) auf die Ligand-induzierte dynamische Massenumverteilung.....	211
3.8.3.	Folgen einer Gα _{i/o} -Protein-Inhibition (Pertussistoxin) auf die Ligand-induzierte dynamische Massenumverteilung.....	213
3.8.3.1.	Acetylcholin-induzierte dynamische Massenumverteilung	213
3.8.3.2.	Iperoxo-induzierte dynamische Massenumverteilung	215
3.8.3.3.	Maximal induzierbare dynamische Massenumverteilung muskarinischer Liganden nach Gα _{i/o} -Protein-Inhibition (Pertussistoxin) an hM ₄ ⁴³⁵ Trp→Ala-CHO-Zellen.....	216
4.	Diskussion	219
4.1.	Zelluläre dynamische Massenumverteilung (DMR) zur Sonden-freien Signalwegsidentifizierung	220
4.1.1.	Identifikation der Hauptsignaltransduktionswege durch Messung zellulärer dynamischer Massenumverteilung in CHO-Zellen.....	220
4.1.2.	Erhebung von Agonist-Konzentrations-Effekt-Kurven auf Basis dynamischer Massenumverteilung (DMR)	223
4.1.3.	Vergleich von Agonist-Wirksamkeiten zwischen DMR-Messungen und klassischen Messmethoden.....	224

4.2.	Einfluss erhöhter intrazellulärer cAMP-Spiegel auf die G-Protein-Kopplung des muskarinischen M ₃ -Acetylcholinrezeptors	225
4.3.	Analyse einzelner Signalwegskomponenten des Gα _s -Signaltransduktionsweges	228
4.4.	Funktionelle Untersuchungen des humanen muskarinischen M ₄ -Acetylcholinrezeptors.....	230
4.4.1.	Bindungstopographie allo/orthosterischer Hybridagonisten am M ₄ -Acetylcholinrezeptor	230
4.4.2.	M ₄ -Rezeptor-vermittelte G-Protein-Aktivierung muskarinischer Agonisten.....	233
4.4.3.	Vergleich der Agonist-induzierten Signalwegsaktivierung zwischen hM ₄ - und hM ₂ -CHO-Zellen	235
4.5.	Einfluss des Epitops M ₄ ⁴³⁵ Trp auf die Wirksamkeit und intrinsische Aktivität strukturverschiedener muskarinischer Liganden	239
5.	Zusammenfassung	243
6.	Abkürzungsverzeichnis.....	245
7.	Literaturverzeichnis.....	248
8.	Appendix	268
8.1.	„Homologe Kompetitionsexperimente“	268
8.2.	Überprüfung der Signalspezifität eingesetzter Agonisten.....	271
8.2.1.	Überprüfung der Signalspezifität eingesetzter Liganden an untransfizierten Flp-In TM -CHO-Zellen	271
8.2.2.	Überprüfung der Signalspezifität adrenerger Liganden an untransfizierten CHO K1-Zellen	272
8.3.	Überprüfung des Agonist-induzierten, negativ-gerichteten Epic [®] -Signales in hM ₂ -CHO-Zellen	273

8.4.	Validierung des Einsatzes von Pasteurella multocida-Toxin (PMT) an hM ₃ -CHO-Zellen	274
8.5.	Einfluss der Fibronectinbeschichtung auf die β_2 -Adrenozeptor- vermittelte dynamische Massenumverteilung.....	276
8.6.	Messung endogen exprimierter Muskarinrezeptoren in HEK293-Zellen.....	277
9.	Publikationen und Kongressbeiträge.....	278
9.1.	Publikationen.....	278
9.2.	Abstrakta/ Kongressbeiträge.....	278
10.	Lebenslauf.....	280

1. Einleitung

Präambel:

Zu Beginn dieser Arbeit stellte sich die Frage, warum der menschliche Körper zwei unterschiedliche, präferenziell $G\alpha_{i/o}$ -gekoppelte muskarinische Acetylcholinrezeptor-Subtypen exprimiert (M_4 - und M_2 -Acetylcholinrezeptoren). Um mögliche funktionelle Unterschiede zwischen den Rezeptorsubtypen aufzudecken, sollte die Signalwegsaktivierung dualsterischer Hybridliganden, für die zuvor eine M_2 -Rezeptor-vermittelte $G\alpha_{i/o}$ -Signalwegsselektivität publiziert worden war (Antony et al., 2009), mit dem neuen optischen Biosensor Epic[®] untersucht werden. Dieser erlaubt es erstmals ohne Verwendung von Sonden („*label-free*“) nicht invasive Messungen in Echtzeit an ganzen Zellen durchzuführen.

Im Folgenden soll ein Überblick über die muskarinischen Acetylcholinrezeptoren sowie die eingesetzten orthosterischen, allosterischen und dualsterischen Liganden gegeben werden. Außerdem wird eine neue optische Messmethode zur Identifizierung G-Protein-induzierter Signalwege vorgestellt.

1.1. Muskarinische Acetylcholinrezeptoren

Seit langem sind fünf Subtypen muskarinischer Acetylcholinrezeptoren bekannt (Bonner, 1989; Mei et al., 1989). Alle fünf Subtypen M_1 - M_5 stellen 7-transmembranäre (transmembranhelikale) Rezeptoren dar, da sich ihre Peptidfäden siebenfach durch die Phospholipidmembran winden. Ihr N-Terminus ist extrazellulär lokalisiert, während der C-Terminus im Cytosol angesiedelt ist. Aufgrund ihrer Kopplung an Guanylnukleotid-bindende Proteine (G-Proteine) werden sie zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren („*G protein-coupled receptors*“, *GPCR*) gezählt. Phylogenetisch lassen sich Rezeptoren, welche ein externes Signal über die Kopplung an G-Proteine weiterleiten, in fünf Klassen einteilen (Fredriksson et al., 2003: GRAFS-Nomenklatur: Glutamat-, Rhodopsin-, Adhäsions-, „*Frizzled*“, Sekretin-Rezeptorklasse), wobei der Rhodopsin-Familie beim Menschen mit circa 700 Vertretern die weitaus meisten Rezeptoren angehören (Fredriksson et al., 2003).

Klasse	Charakteristika	Prominente Vertreter
Rhodopsin-Typ	Ligand-Bindung meist im Bereich der TMD	Rhodopsin, Adrenozeptoren, muskarinische Acetylcholinrezeptoren
Sekretin-Typ	Bindung großer Peptide	SCTR, CALCR, CRHR
Glutamat-Typ	„Venus-Fliegenfalle“: langer N-Terminus bildet Ligandbindungsdomäne	GRM, GABA _B
„Frizzled-class“	Zell-Proliferation, Wnt-Signaltransduktionsweg	FZD1-10, TAS2Rx
Adhäsions-Familie	Langer N-Terminus mit Adhäsions-Molekülen zur Zell-Zell-Interaktion	TAS1Rx

Tab. 1: GRAFS-Klassifikation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren: TMD: Transmembranäre Domäne, SCTR: Sekretin-Rezeptor, CRHR: „Corticotropin-releasing-hormone-receptor“, CALCR: Calcitonin-Rezeptor, GRM: metabotrope Glutamat-Rezeptoren, GABA_B: metabotroper Rezeptor der γ -Aminobuttersäure (GABA); FZD1-10: „Frizzled-receptors 1-10“, TAS2x: „Taste2-receptor family“, TAS1Rx: „Taste1-receptor family“, modifiziert nach Fredriksson et al., 2003); Hervorgehoben ist die in dieser Arbeit untersuchte Rezeptor-Klasse. Erläuterungen siehe Text.

Bis heute konnte kein Muskarinrezeptorsubtyp kristallisiert werden. Hinweise über die räumliche Orientierung des Rezeptorproteins lassen sich jedoch aus der Kristallisation anderer Vertreter der Rhodopsin-Rezeptorklasse, wie dem kürzlich kristallisierten aktiven adrenergen β_2 -Rezeptor (Rasmussen et al., 2011), erhalten. Charakteristisch für den Rhodopsin-Typ der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ist ihre Ligandbindungstasche im Bereich der transmembranären Domänen (Fredriksson et al., 2003). In diesem Areal bindet auch der endogene Transmitter muskarinischer Rezeptoren Acetylcholin, welches aus Cholin und Acetyl-Coenzym A mit Hilfe des Enzyms Cholin-Acetyl-Transferase (CHAT) gebildet wird. Interessant ist, dass die Edukte in nahezu allen Zellen vorkommen (Wessler & Kirkpatrick 2008). Acetylcholin ist zudem in der Lage nikotinische Acetylcholinrezeptoren zu aktivieren, die zur Klasse der Ligand-gesteuerten Ionenkanäle gehören. Während Acetylcholin früher lediglich als Neurotransmitter bezeichnet wurde, ist seit längerem bekannt, dass es auch nicht-neuronal vorkommt. So dient es nicht-neuronal unter anderem der terminalen Differenzierung und Apoptose von Epithelzellen (Grando et al., 2006). Außerdem fördert es die Proliferation von Fibroblasten (Haag et al., 2008) und steigert über Endothelzellen die NO-Freisetzung (Evora et al., 2007).

1.1.1. Lokalisation muskarinischer Acetylcholinrezeptoren

Über muskarinische Acetylcholinrezeptoren werden unter anderem nachstehende Prozesse reguliert.

Acetylcholinrezeptor-Subtyp	Beispielhafte Lokalisationen	Ausgewählte physiologische Funktionen
M ₁	Cortex, Hippocampus	Kognitive Funktion
M ₂	Herz, Glatte Muskelzellen, ZNS (Hippocampus)	Chronotropie↓, Muskelkontraktion, Gedächtnis, Antinozizeption
M ₃	Glatte Muskelzellen, Drüsen, ZNS, Pankreatische β-Zellen	Muskelkontraktion, Salivation, Appetit, Insulinfreisetzung↑
M ₄	ZNS (Striatum, Vorderhirn)	Motorik, Antinozizeption, Verhalten
M ₅	Zerebrale Gefäße, Substantia nigra	Vasodilatation, Motorik

Tab. 2: Ausgewählte Beispiele der Lokalisation und physiologischen Effekte nach Aktivierung unterschiedlicher muskarinischer Acetylcholinrezeptoren. Hervorgehoben sind die in dieser Arbeit eingesetzten Subtypen. Modifiziert nach Caulfield & Birdsall (1998), Wess et al. (2004), Langmead et al. (2008) sowie Ruiz de Azua et al. (2011).

Muskarinische Rezeptoren befinden sich sowohl auf präsynaptischen als auch auf postsynaptischen Neuronen (Kilbinger et al., 1993; Wess, 2004). So ist eine präsynaptische Lokalisation der muskarinischen M₂- und M₄-Rezeptorsubtypen auf cholinergen Neuronen als Autorezeptoren, sowie auf sympathischen Nervenendigungen als Heterorezeptoren bekannt (Laduron, 1985; Trendelenburg et al., 2002; Zhang et al., 2002; Zhou et al., 2002). Während der M₂-Rezeptor dominanter Subtyp präsynaptischer Neuronen des Hippocampus ist, befindet sich der M₄-Rezeptorsubtyp bevorzugt im Striatum (Zhang et al., 2002). Die teils unterschiedliche Lokalisation der präferenziell G_{α_{i/o}}-gekoppelten muskarinischen M₂- und M₄-Rezeptorsubtypen wirft die Frage auf, warum an einer Stelle der eine und an der anderen Stelle der andere Rezeptorsubtyp exprimiert wird.

Die weite Verbreitung cholinergischer Rezeptoren, neuronal oder nicht-neuronal, lässt den Schluss zu, dass eine Dysfunktion des cholinergen Systems zahlreiche pathophysiologische Aspekte haben kann (Wessler & Kirkpatrick, 2008). Erhöhte Acetylcholin-Konzentrationen werden mit Pruritus (Wessler et al., 2003b), eine reduzierte

CHAT- und erhöhte M₂-Expression mit Colitis ulcerosa in Verbindung gebracht (Jönsson et al., 2007). Daneben ist eine Beteiligung an inflammatorischen Krankheitsprozessen wahrscheinlich, da Acetylcholin anti-inflammatorisch wirkt (Pavlov & Tracey, 2005; de Jonge & Ulloa, 2007). Aus diesen Aspekten und den in Tab. 2 bekannten Lokalisationen der muskarinischen Subtypen lassen sich auch therapeutische Ansätze ableiten. So werden beispielsweise Muskarinrezeptorantagonisten wie Tiotropium (Spiriva[®]) und Ipratropium (z.B. Atrovent[®]) inhalativ bei COPD („*chronic obstructive pulmonary disease*“) angewandt, um eine Kontraktion glatter Atemwegsmuskelzellen zu verhindern. N-Butylscopolaminiumbromid (z.B. Buscopan[®]) verhindert durch Antagonismus muskarinischer Rezeptoren Spasmen glatter Muskulatur. Scopolamin (Scopoderm[®]) stellt ebenfalls einen Antagonisten muskarinischer Acetylcholinrezeptoren dar, der als effektives Arzneimittel gegen Kinetosen Anwendung findet. Darifenacin (Emselex[®]) und Tolterodin (Detrusitol[®]) werden zur Behandlung der Dranginkontinenz eingesetzt, um vorzeitigen Harnabgang zu reduzieren. Bei allen hier aufgeführten Arzneistoffen, besonders den systemisch applizierten, muss jedoch mit parasympholytischen Nebenwirkungen gerechnet werden, da bis heute keine wirklich subtypselektive Substanz zur Therapie zugelassen ist.

1.1.2. Signaltransduktion muskarinischer Acetylcholinrezeptoren

Wie bereits erwähnt weisen die muskarinischen M₂- und M₄-Rezeptorsubtypen gleiche Kopplungspräferenzen an inhibitorischen G α -Proteinen auf. Darüberhinaus gibt es auch solche muskarinischen Acetylcholinrezeptoren, die präferenziell G $\alpha_{q/11}$ -Proteine aktivieren (M_{1/3/5}-Rezeptorsubtypen).

Gruppe	Präferenzielle G-Protein-Kopplung	Ausgewählte, alternative G-Protein-Kopplung
M ₂ , M ₄	G $\alpha_{i/o}$ (M ₂ : Watanabe et al., 1976; M ₄ : Olanas et al., 1983)	G α_s (M ₂ : Vogel et al., 1995; M ₄ : Dittman et al., 1994)
M ₁ , M ₃ , M ₅	G $\alpha_{q/11}$ (M ₃ : Hulme et al., 1990; Caulfield & Birdsall, 1998)	G α_i (M ₃ : Dai et al., 1991) G α_s (M ₃ : Nahorski et al., 1997)

Tab. 3: Präferenzielle G-Protein-Kopplungseigenschaften sowie beispielhafte, alternative Kopplungen muskarinischer Acetylcholinrezeptoren. Erläuterungen siehe Text.

Neben der präferenziellen Kopplung werden von allen Muskarinrezeptoren auch alternative Kopplungen an andere G-Proteine eingegangen, die jedoch erst bei höheren Ligandkonzentrationen auftreten. Das Ansprechen verschiedener G-Proteinklassen durch

einen Rezeptorsubtyp wird als Signalwegs-Promiskuität bezeichnet (Milligan, 1997; Tuček et al., 2002; Schröder et al., 2010). Außerdem sind auch G-Protein-unabhängige Signaltransduktionswege muskarinischer Acetylcholinrezeptoren bekannt (Linial et al., 1997; Ilouz et al., 1999; Kong et al., 2010). Die G-Protein-vermittelte Signaltransduktion soll im Folgenden verdeutlicht werden.

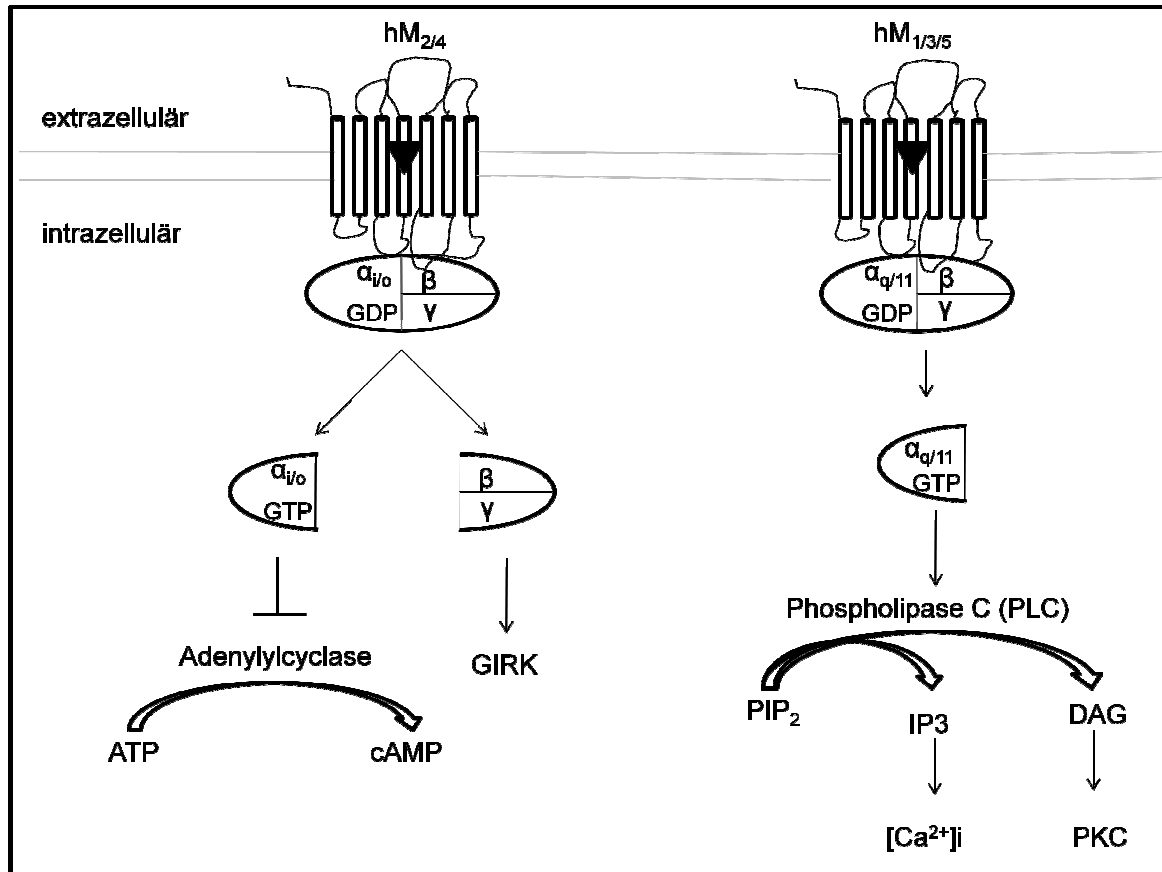


Abb. 1: Schematische Darstellung der präferenziellen Signalwegsaktivierung muskarinischer Acetylcholinrezeptoren. Schwarzes Dreieck: muskarinischer Agonist, ATP: Adenosintriphosphat, cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat, GIRK: (*“G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channel”*) G-Protein-abhängiger Kalium-Kanal. PIP₂: Phosphatidylinositolbisphosphat, IP₃: Inositoltrisphosphat, DAG: Diacylglycerol, PKC: Proteinkinase C. Pfeil: Aktivierung; Balken: Hemmung; Erläuterungen siehe Text.

Muskarinische Acetylcholinrezeptoren können, müssen aber nicht wie in Abbildung 1 aufgeführt als Monomere vorliegen. Es gibt zahlreiche Anhaltspunkte, dass eine Oligomerisierung als Homomer, mit dem gleichen Rezeptorsubtyp, oder als Heteromer, mit einem anderen Rezeptor möglich ist (Zeng & Wess, 1999; Hern et al., 2010). Nach Rezeptoraktivierung kommt es zu einem Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) gegen Guanosintriphosphat (GTP) an der α -Untereinheit des trimeren G-Proteins. In Folge dessen dissoziiert die α -Untereinheit von der $\beta\gamma$ -Untereinheit ab. Die $\beta\gamma$ -

Untereinheit des muskarinischen M_2 - und M_4 -Rezeptorsubtypes ist in der Lage, G-Protein-abhängige Kalium-Ionenkanäle zu aktivieren (GIRK: „*G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channel*“), die über einen Ausstrom von Kalium-Ionen das Membranpotenzial verändern. Darüberhinaus kann die $\beta\gamma$ -Untereinheit auch weitere Signalkaskaden anstoßen oder inhibieren, worauf im Rahmen dieser Einleitung nicht weiter eingegangen werden soll. Die inhibitorische $\alpha_{i/o}$ -Untereinheit hemmt die Adenylylcyclase, welche in der Lage ist Adenosintriphosphat (ATP) in cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) umzuwandeln. Sowohl der muskarinische M_4 - als auch der M_2 -Rezeptorsubtyp können mit circa 100-fach geringerer Wahrscheinlichkeit an stimulatorische G-Proteine koppeln (Dittman et al., 1994, Vogel et al. 1995), was in einer Aktivierung der Adenylylcyclase und somit in einer Steigerung intrazellulärer cAMP-Spiegel resultiert.

Die muskarinischen $M_{1/3/5}$ -Rezeptorsubtypen induzieren nach Rezeptoraktivierung eine Aktivierung der Phospholipase C, welche Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP₂) in die beiden sekundären Botenstoffe („*second messenger*“) Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) spaltet. Beide Botenstoffe sind daraufhin in der Lage weitere Signalwegskaskaden anzustoßen. Neben der präferenziellen Kopplung an $G\alpha_{q/11}$ -Proteine können alternative Kopplungen auch von dieser Muskarinrezeptorgruppe eingegangen werden, die beispielhaft in Tab. 3 aufgeführt sind. Der G-Proteinzyklus wird terminiert durch die GTPase-Aktivität der α -Untereinheit, wodurch GTP in GDP gespalten wird. Die Spaltung wird durch RGS-Proteine („*regulators of G protein signalling*“) katalysiert (Koelle, 1997; Zhong & Neubig, 2001; Hepler, 2003; Milligan & Kostenis, 2006). Durch die Abspaltung des Phosphatrestes ist eine erneute Anlagerung der $\beta\gamma$ -Untereinheit an die α -Untereinheit möglich, so dass ein inaktiver, trimerer G-Proteinkomplex resultiert.

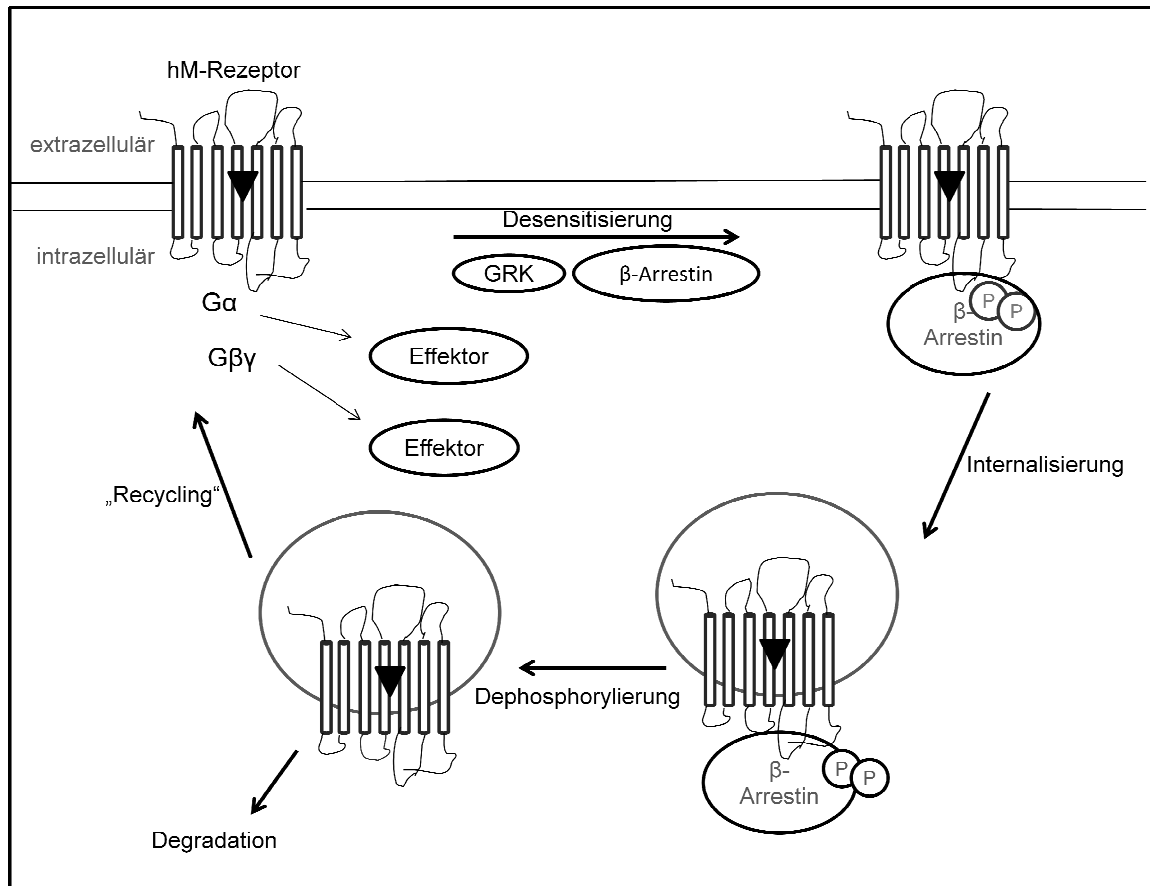


Abb. 2: Schematische Darstellung der Signaltransduktion und Rezeptordesensibilisierung/ Internalisierung nach Aktivierung muskarinischer Acetylcholinrezeptoren. hM: humaner, muskarinischer Acetylcholinrezeptor; G α : α -Untereinheit eines G-Proteins. G $\beta\gamma$: $\beta\gamma$ -Untereinheit eines G-Proteins, GRK: G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Kinase. Schwarzes Dreieck: muskarinischer Agonist. Modifiziert nach Calebiro et al. (2010). Erläuterungen siehe Text.

Über homologe und heterologe Phosphorylierungen kann es nach Rezeptoraktivierung zur Desensibilisierung des Rezeptors kommen. Die homologe Rezeptorphosphorylierung verläuft mit Hilfe G-Protein-gekoppelter Rezeptorkinasen (GRKs), während die heterologe Rezeptorphosphorylierung durch Enzyme induziert wird, die auch andere Proteine phosphorylieren. Je nach Lokalisation der Rezeptor-Phosphorylierung können unterschiedliche Signalwege beeinflusst werden (Tobin et al., 2008). Die Phosphorylierung kann eine β -Arrestin-Rekrutierung nach sich ziehen, die die Anlagerung weiterer Proteine wie dem Adapter-Protein-2 (AP-2) und Clathrin ermöglicht (Moore, 2007). Schließlich kann eine Internalisierung des Rezeptorproteins stattfinden. Die Internalisierung ist nicht gleichbedeutend mit der Terminierung der Signalwegsaktivierung, da neuere Erkenntnisse am β_2 -Adrenozeptor sowie weiteren G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren verdeutlichen, dass auch internalisierte Rezeptoren in der Lage sein können, weiterhin Signalwege zu aktivieren (Miaczynska et al., 2004; Polo & Di Fiore, 2006; von Zastrow & Sorkin, 2007). Diese können sich sowohl qualitativ als

auch quantitativ von der Signalwegsaktivierung nicht-internalisierter Rezeptoren unterscheiden (Calebiro et al., 2010). Nach Rezeptor-Dephosphorylierung kann eine Degradation des Rezeptorproteins oder eine erneute Expression („Recycling“) an der Oberfläche der Zellmembran erfolgen. Ob die oben genannte Signalkaskade abläuft oder nicht, hängt von zahlreichen Faktoren ab, die nur unvollständig bekannt sind.

Das durch einen Liganden unterschiedliche Ansprechen von Signalwegen wird als „*agonist-directed trafficking*“, „*functional selectivity*“ oder „*biased signaling*“ bezeichnet (Urban et al., 2007; Violin & Lefkowitz, 2007; Zheng et al., 2010; Kenakin, 2011). Solch ein „*biased signaling*“ bietet zahlreiche neue Möglichkeiten, gezielt bestimmte Signalwege zu modulieren und somit in pathophysiologische Prozesse einzugreifen (Violin & Lefkowitz, 2007; Kenakin, 2011).

Muskarinische Acetylcholinrezeptoren besitzen neben der orthosterischen Bindungsstelle (griechisch von „*orthos*“ und „*steréos*“ = richtiger Ort) für den körpereigenen Botenstoff Acetylcholin im Eingang der Ligand-Bindungstasche ein allosterisches Haftareal (griechisch von „*allos*“ und „*steréos*“ = anderer Ort) (Lüllmann et al., 1969; Lee & El-Fakahany, 1991; Lazareno & Birdsall, 1995), das neuartige Ansätze zur pharmakologischen Modulation der Rezeptorfunktion bietet (Ehlert et al., 1994; Tucek & Proska, 1995; Christopoulos et al., 1998). Im Folgenden soll die allosterische Bindungsstelle muskarinischer Rezeptoren und im Besonderen des M₄-Rezeptorsubtyps näher erläutert werden.

1.2. Allosterische Bindungsstelle muskarinischer Acetylcholinrezeptoren

Während die orthosterische Acetylcholin-Bindungsstelle im Bereich der transmembranären Domänen angesiedelt ist, ist das allosterische Haftareal mehr extrazellulär lokalisiert (Tuček & Proška, 1995; Ellis, 1997). Im Gegensatz zu den hochkonservierten Epitopen der orthosterischen Bindungsstelle (Hulme et al., 1990), unterscheiden sich die allosterischen Bindungsstellen in ihrer Aminosäuresequenz deutlicher voneinander (Tuček & Proška, 1995; De Amici et al., 2010). Im Folgenden sollen einige allosterisch-lokalisierte Epitope des M₄-Rezeptorproteins gezeigt werden.

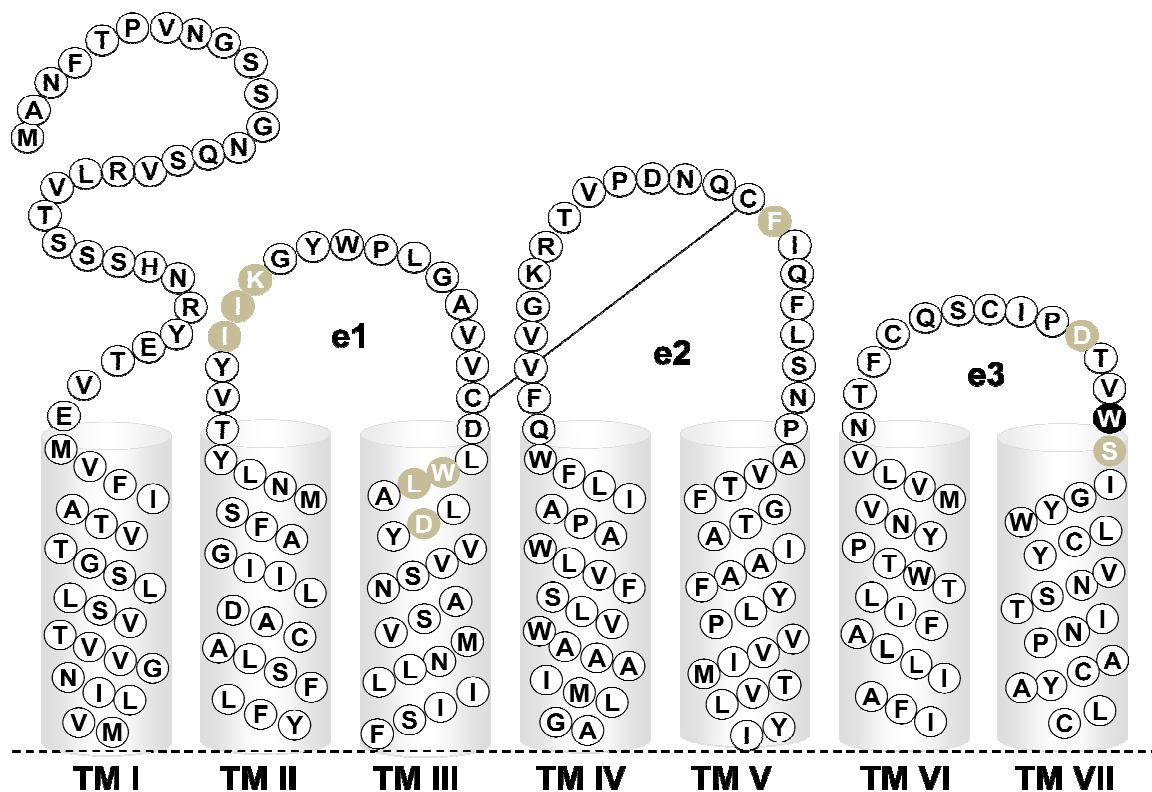


Abb. 3: Aminosäuresequenz des muskarinischen M₄-Rezeptorproteins (Einbuchstabencode). Modifiziert nach Prilla et al. (2006). Aminosäuresequenz und Lokalisation nach SWISS-Prot (D6; P08173). Die intrazellulären, nicht membranären Domänen sind abgeschnitten. In grau unterlegt sind die transmembranären Domänen TM I bis TM VII. e1, e2, e3: extrazelluläre Schleifen des Rezeptorproteins. Schwarz hinterlegt ist die mit dem Einbuchstabencode W abgekürzte Aminosäure M₄⁴³⁵-Tryptophan (Trp 7.35). Grau hinterlegt sind solche Aminosäuren, die bereits als allosterische Epitope des M₄-Rezeptors von anderen Untersuchern identifiziert worden sind (Buller et al., 2002; Nawaratne et al., 2010; Leach et al. 2011). Die Linie zwischen e1 und e2 stellt eine Disulfidbrücke dar. Erläuterungen siehe Text.

Für einen Vergleich mit dem muskarinischen M₂-Rezeptorsubtyp, sollte in dieser Arbeit der Einfluss des konservierten Epitopes M₄⁴³⁵Trp (Trp 7.35: Nomenklatur nach Ballesteros & Weinstein, 1995) auf die Wirksamkeit und intrinsische Aktivität von

Liganden untersucht werden. Die Bezeichnung Trp 7.35 geht dabei auf die nach Ballesteros & Weinstein (1995) eingeführte Nomenklatur zurück, bei der die höchst konservierte Aminosäure einer transmembranären Domäne mit der Position 50 versehen wird. Benachbarte Aminosäuren erhalten C-terminal aufsteigende und N-terminal absteigende Ziffern. Die Nomenklatur nach Ballesteros und Weinstein (1995) wird bisher nicht für die Aminosäuren der extrazellulären Schleifen angewandt. Durch Verwendung dieser Nomenklatur ist ein direkter Vergleich des Epitopes zwischen den Rezeptoren möglich, während das Epitop bei fortlaufender Zählweise der Aminosäuren aufgrund unterschiedlicher Länge des Rezeptorproteins je nach Rezeptor eine andere Zahl aufweist. Aus Mutagenesestudien am M₁- (Matsui et al., 1995) und M₂-Rezeptorprotein (Prilla et al., 2006; Jäger et al., 2007) geht hervor, dass das konservierte Epitop Trp 7.35, zu Beginn der transmembranären Domäne TM VII, welches unter allen Muskarinrezeptoren identisch ist, entscheidend zur Bindung allosterischer und auch orthosterischer, muskarinischer Liganden beiträgt. Prilla et al. (2006) konnten am inaktiven M₂-Rezeptor einen Einfluss dieser Aminosäure auf die Basisaffinität strukturverschiedener Allosterie nachweisen. Im aktiven Rezeptor konnte darüberhinaus ein Beitrag zur Bindung diverser Orthostere detektiert werden (Jäger et al., 2007; Dissertationsschrift Kebig, 2010). Außerdem zeigte sich eine Beteiligung dieses Epitopes an der intrinsischen Aktivität, nicht jedoch an der Wirksamkeit des Partialagonisten Pilocarpin (Jäger et al., 2007).

Über dieses Epitop hinaus konnten bisher zahlreiche weitere muskarinische Epitope einer allosterischen Bindungsstelle des M₄-Rezeptors zugeordnet werden. Buller et al. (2002) konnten zeigen, dass die dem Epitop Trp 7.35 benachbarte Aminosäure M₄⁴³⁶Ser (Ser 7.36) sowie die entsprechende Aminosäure M₂⁴²³Thr (Thr 7.36), welche am Beginn der transmembranären Domäne TM VII lokalisiert sind, einen Einfluss auf die Bindung sowie die M₄/M₅- (und M₂/M₅-) Selektivität strukturverschiedener Allosterie ausüben. Kürzlich konnten durch systematische Mutagenesestudien der transmembranären Domäne III mehrere Aminosäuren identifiziert werden, die an der Kooperativität der Bindung von Acetylcholin und dem allosterischen Modulator LY2033298 beteiligt sind. Zu diesen gehören M₄¹⁰⁸Trp (Trp 3.28), M₄¹⁰⁹Leu (Leu 3.29) und M₄¹¹²Asp (Asp 3.32) (Leach et al., 2011). Weitere in einer allosterischen Bindung involvierten Aminosäuren konnten von Nawaratne et al. (2010) aufgezeigt werden. So wiesen die Aminosäuren M₄⁹³Ile und M₄⁹⁵Lys am Beginn der ersten extrazellulären Schleife e1 sowie M₄⁴³²Asp der dritten extrazellulären Schleife e3 eine Beteiligung an der Kooperativität zwischen dem Alloster LY2033298 und dem endogenen Liganden Acetylcholin auf. Das Epitop M₄¹⁸⁶Phe der zweiten extrazellulären Schleife e2 wurde als Schlüsselepitop für die allosterische Bindung gefunden (Nawaratne et al., 2010). Diese Aminosäure entspricht dem Epitop

M₂¹⁷⁷Tyr, welches ebenfalls eine aromatische Aminosäure der extrazellulären Schleife e2 darstellt, die an der M₂/M₅-Selektivität von Allosteren des Alkan-bisammonium-Typs beteiligt ist (Voigtländer et al., 2003). Außerdem wurde eine Interaktion der Aminosäure M₂¹⁷⁷Tyr mit der Aminosäure M₂⁴²²Trp (Trp 7.35) postuliert (Prilla et al., 2006), die dem in dieser Arbeit untersuchten konservierten Epitop M₄⁴³⁵Trp (Trp 7.35) entspricht.

1.2.1. Therapeutisch genutzte allosterische Modulatoren G-Protein gekoppelter Rezeptoren

Obwohl es aktuell vielversprechende Allosteren zur Modulation der Acetylcholin-Bindung an muskarinischen Rezeptoren gibt (siehe z.B. Chan et al., 2008; Shirey et al., 2008; Conn et al., 2009), erlangte bisher kein Alloster muskarinischer Acetylcholinrezeptoren die Zulassung. In den vergangenen Jahren konnten jedoch einige Alloster anderer G-Protein-gekoppelter Rezeptoren auf den deutschen Arzneimittelmarkt gebracht werden, die im Folgenden kurz vorgestellt werden sollen.

Mit dem Arzneistoff Maraviroc (Celsentri[®]) wurde im Jahre 2007 der erste allosterische Modulator eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors der Rhodopsin-Familie zugelassen (Chemokin-Rezeptor-Subtyp CCR5). Durch Bindung an die allosterische Bindungsstelle des CCR5-Rezeptors, verhindert Maraviroc die Anlagerung und somit das Eindringen CCR5-troper HI-Viren in die Zielzelle („*European public assessment report*“, Homepage der Europäischen Arzneimittelbehörde EMA). Bereits 2004 wurde mit Cinacalcet (Mimpara[®]) ein allosterischer Modulator des Ca²⁺-sensitiven Rezeptors zur Behandlung des sekundären Hyperparathyroidismus bei terminaler Niereninsuffizienz zugelassen. An diesem Rezeptor erhöht Cinacalcet die Empfindlichkeit des Rezeptors gegenüber Ca²⁺, was zur Folge hat, dass weniger Parathormon (PTH) sezerniert und weniger Calcium aus den Knochen freigesetzt wird (Nagano & Nemeth, 2005).

1.3. Dualsterische Hybridagonisten muskarinischer Acetylcholinrezeptoren

Als dualsterisch werden solche Liganden bezeichnet, die gleichzeitig sowohl allosterische als auch orthosterische Haftareale des Rezeptorproteins nutzen (Antony et al., 2009; Mohr et al., 2010). Synonym werden die Begriffe „bivalent orthosterisch/allosterisch“ (Tahtaoui et al., 2004; Valant et al., 2008) bzw. „multivalent orthosterisch/allosterisch“ (Steinfeld et al., 2007) verwendet. Der strukturelle Aufbau der in dieser Arbeit eingesetzten dualsterischen Hybridverbindungen sowie deren Muttersubstanz soll in nachfolgender Tabelle verdeutlicht werden.

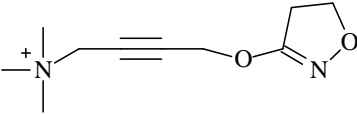
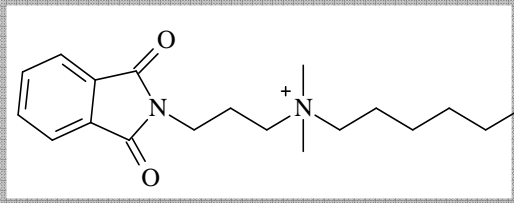
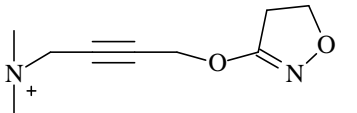
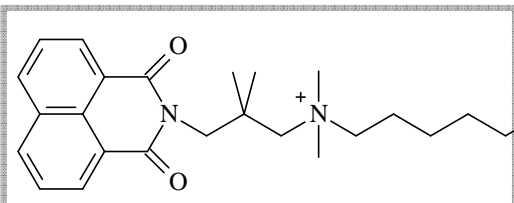
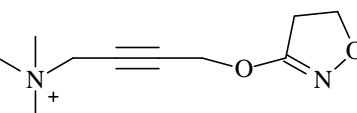
Allosterischer Anker	Quartäres Ammonium	Ligand-bezeichnung
		Iperoxo (Iodid)
		Phth-6-Iper (Dibromid)
		Naph-6-Iper (Dibromid)

Abb. 4: Entwicklung dualsterischer Hybridverbindungen. Grau umrandet ist jeweils der allosterische Anker. Erläuterungen siehe Text.

Die Hybridverbindungen Phth-6-Iper sowie Naph-6-Iper setzen sich aus dem orthosterischen muskarinischen Agonisten Iperoxo und einem Phthalimidrest (Phth-6-Iper) bzw. einem Naphthalimidrest (Naph-6-Iper) zusammen, welche mit Iperoxo über eine C₆-Zwischenkette verknüpft sind. Während der orthosterische Strukturbaustein Iperoxo durch Bindung an die orthosterische Bindungsstelle die Rezeptoraktivierung ermöglichen soll, dient der allosterische Anker durch Bindung an die weniger konservierte allosterische Bindungsstelle dazu, Subtypselektivität zu erreichen.

Am muskarinischen M_2 -Rezeptorprotein zeigten beide Hybridverbindungen eine dualsterische Rezeptorbindung (Antony et al., 2009) und eine Signalwegsselektivität für den $G_{\alpha_{i/o}}$ -Signaltransduktionsweg (Antony et al., 2009). Iperoxo konnte am muskarinischen M_2 -Rezeptorsubtyp als vollagonistischer Ligand mit einer gegenüber Acetylcholin stark erhöhten Wirksamkeit und einer rein orthosterischen Orientierung im Rezeptorprotein identifiziert werden (Antony et al., 2009; Dissertationsschrift Kebig, 2010). Außerdem zeigten diese Liganden eine Abhängigkeit von dem konservierten Epitop Trp 7.35 des M_2 -Rezeptorsproteins (Dissertationsschrift Kebig, 2010).

Somit sollten diese Substanzen als Sonden eingesetzt werden, um sowohl Unterschiede in der allosterischen als auch der orthosterischen Bindungsstelle zwischen dem M_2 - und dem M_4 -Rezeptorsubtyp ermitteln zu können.

Um die Signalwegsaktivierung der Testsubstanzen zwischen den Subtypen vergleichen zu können, wurde eine neue Biosensor-Methodik angewandt, die es erlaubt, an intakten Zellen G-Protein-vermittelte Signalwegsaktivierung zu identifizieren und in Echtzeit zu verfolgen.

1.4. Messung zellulärer dynamischer Massenumverteilung mittels Epic[®]-Biosensor

Bei Aktivierung membranständiger Rezeptoren kann es Ligand-abhängig zur Umverteilung zellulärer Massen kommen. Der optische Biosensor Epic[®] ist in der Lage diese Veränderungen zu erfassen.

Dazu wird Breitbandlicht auf eine Biosensorplatte, auf welcher ein einschichtiger Zellverband adhäriert ist, eingestrahlt. Abhängig von der optischen Dichte unmittelbar oberhalb des Biosensors (ca. 150 nm) wird Licht bestimmter Wellenlänge entlang einer Gitternetzstruktur („*RWG: resonant waveguide grating*“) weitergeleitet und reflektiert (Fang, 2007). Kommt es, Ligand-induziert, zu einer Umverteilung zellulärer Massen, kann es zur Reflektion von Licht anderer Wellenlänge kommen. Die Differenz der reflektierten Wellenlängen vor und nach Substanzzugabe wird schließlich als Messresultat in Picometern angegeben. Sie dient somit als Maß der zellulären dynamischen Massenumverteilung („*DMR: dynamic mass redistribution*“) (für technische Details und die genaue Verfahrensweise einer solchen Messung siehe 2.8.1.).

Im Gegensatz zu anderen pharmakologischen Methoden, wie der Messung der G-Proteinaktivierung oder der Quantifizierung sekundärer Botenstoffe, erlaubt die Messung

von dynamischer Massenumverteilung („DMR: *dynamic mass redistribution*“) die Signalwegsanalyse an lebenden Zellen ohne Verwendung von Sonden („*label-free*“) in Echtzeit. Dies ist aus verschiedenen Gründen vorteilhaft. Zum Einen ist keine Verknüpfung des Rezeptorproteins mit Fluorophoren oder anderen Sonden notwendig, die die Rezeptorfunktion beeinflussen könnten. Die Detektion in Echtzeit ermöglicht es zudem, die Messung über einen variablen Messzeitraum mitzuverfolgen. Die Untersuchung intakter Zellen ist auch deshalb von Vorteil, da bekannt ist, dass eine einzelne zelluläre Komponente kaum den Effekt der ganzen Zelle widerspiegelt (Kenakin, 2010). Außerdem ist seit langem bekannt, dass sich Zellen im Zellverband mitunter anders verhalten können als solche Zellen, die einzeln vermessen werden (Chausovsky et al., 2000; Kimura et al., 2010).

Um selektiv bestimmte Signalwege untersuchen zu können, sollten verschiedene Signalwegsinhibitoren und -aktivatoren eingesetzt werden, die im nächsten Kapitel kurz vorgestellt werden sollen.

1.4.1. Inhibition der Signaltransduktion mit Hilfe bakterieller Toxine

Durch verschiedene bakterielle Toxine lässt sich gezielt die Rolle eines bestimmten Signalwegs prüfen. In vorliegender Arbeit wird mit dem von dem gramnegativen Bakterium *Bordetella pertussi* produzierten (Pittmann et al. 1984) Pertussistoxin (PTX) gearbeitet. Es besteht aus einem Komplex aus sechs Untereinheiten, bei dem die Untereinheit S4 doppelt vertreten ist (Kaslow und Burns, 1992). Die Untereinheiten S2 und S3 binden an membranständige Glykolipide (Kaslow et al., 1987; Saukkonen et al. 1992; Hausmann und Burns, 1993), was die Penetration der S1-Untereinheit in die Zelle enorm steigert (Kaslow und Burns, 1992). Für das Eindringen in die Zelle sind unterschiedliche Mechanismen postuliert. So gehen Kaslow und Burns (1992) von einer direkten Penetration der S1-Untereinheit aus, während Rogel und Hanski (1992) eine Porenbildung als die wahrscheinlichste Penetrationsform ansehen. Intrazellulär erfolgt die Teilung der S1-Untereinheit in die Untereinheiten A und B. Die A1-Untereinheit katalysiert daraufhin die ADP-Ribosylierung des C-Terminus der α -Untereinheit des trimeren $G_{\alpha_{i/o}}$ -Protein-Komplexes (Bokoch & Gilman 1984; Moss et al., 1985). Dadurch wird die Interaktion des trimeren G-Proteins mit dem Rezeptor verhindert und die $G_{\alpha_{i/o}}$ -vermittelte Signaltransduktion innerhalb der Zelle unterbunden.

Neben dem Pertussistoxin wird das von *Vibrio cholerae* produzierte Cholera toxin (CTX) eingesetzt, welches aus einer zweiteiligen A-Komponente (Lai et al., 1976) sowie einer aus fünf Untereinheiten zusammengesetzten B-Komponente (Lönroth et al., 1973; Lai et al., 1977) besteht. Während die B-Komponente für die Bindung an die Zelle sorgt, dringt die A-Komponente in die Zelle ein (van Heyningen, 1976). Für Cholera toxin sind, wie für Pertussistoxin, verschiedene Penetrationswege beschrieben. So gibt es Hinweise dafür, dass die A1-Untereinheit ohne Ausbildung einer Pore in die Zelle gelangt (Wisniewski & Bramhall, 1981; Ribi et al., 1988) oder durch endozytotische Aufnahme in das Cytosol überführt wird (Joseph et al., 1978; 1979; Janicot et al., 1988). Die Ausbildung einer Membranpore, durch welche die A1-Untereinheit in die Zelle gelangen kann, wurde ebenfalls beschrieben (Gill, 1976). Intrazellulär kommt es schließlich zur ADP-Ribosylierung (Xia et al., 1984) eines Argininrestes der α_s -Untereinheit des aktivierten G-Proteins. Dadurch verliert die α -Untereinheit die Fähigkeit in seinen inaktiven Zustand überzugehen, was eine permanente Aktivierung des G_s -Signaltransduktionsweges nach sich zieht (Bharati & Ganguly, 2011).

Bei dem von Chromobakterien sp QS3366-produzierten YM 254890 handelt sich um ein cyclisches Depsipeptid, welches über atypische Aminosäuren verfügt (Takasaki et al., 2004). YM 254890 verhindert selektiv den Austausch von GDP gegen GTP an der $G_{\alpha_{q/11}}$ -Untereinheit und unterbindet somit die $G_{\alpha_{q/11}}$ -vermittelte Signaltransduktion (Takasaki et al., 2004; Orth et al. 2005; Canals et al. 2006). Wie dieses Toxin in das Cytosol gelangt und den Austausch des Guanosinnukleotids an der α -Untereinheit verhindert, ist bisher nicht näher erforscht.

Mit Hilfe dieser Toxine können somit die G-Protein-vermittelten Signaltransduktionswege ($G_{i/o}$, G_s sowie $G_{q/11}$) der zuvor beschriebenen muskarinischen Acetylcholinrezeptoren beeinflusst werden. Während Pertussistoxin und YM 254890 direkt in der Lage sind, den $G_{i/o}$ - bzw. $G_{q/11}$ -Signaltransduktionsweg zu inhibieren, kann mit einer maximal wirksamen Cholera toxin-Konzentration der G_s -Signaltransduktionsweg „maskiert“ werden, indem kein darüberhinaus gehender G_s -vermittelter Effekt mehr induziert werden kann.

1.5. Fragestellung

Nachfolgend soll die Zielsetzung dieser Dissertation erläutert werden.

1. Zu Beginn dieser Arbeit sollte erstmals systematisch die zelluläre dynamische Massenumverteilung zur Erfassung der Signalwegsaktivierung unterschiedlich gekoppelter 7-transmembranärer Rezeptoren mit dem Epic[®]-Biosensor untersucht werden. Stellvertretend für andere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wurde der muskarinische M₂-Rezeptorsubtyp, als Vertreter eines präferenziell G_{α_{i/o}}-gekoppelten Rezeptors, sowie der adrenerge β₂-Rezeptor, als Vertreter eines präferenziell G_{α_s}-gekoppelten Rezeptors gewählt. Als Vertreter von präferenziell G_{α_{q/11}}-gekoppelten Rezeptoren sollte der muskarinische M₃-Rezeptorsubtyp eingesetzt werden.

Mit den in CHO-Zellen stabil transfizierten Rezeptoren wurde die Beantwortung folgender Fragen angestrebt:

- a) Ist die Messung von zellulärer dynamischer Massenumverteilung geeignet, in CHO-Zellen alle drei Hauptsignaltransduktionswege (G_{α_{i/o}}, G_{α_s}, G_{α_{q/11}}) zu identifizieren?
- b) Resultiert die Auswertung verschiedener Messzeitpunkte, aufgrund eines sich über die Messdauer hinweg verändernden Messsignales, in unterschiedlichen Wirksamkeiten der Testsubstanzen?
- c) Gibt es Hinweise auf eine Abhängigkeit der Signalwegsaktivierung vom zellulären Kontext, speziell von erhöhten, intrazellulären cAMP-Spiegeln, wie sie durch eine Cholera-toxin- oder Forskolin-Vorstimulation erzeugt werden?

Darüberhinaus sollte durch den gezielten Einsatz von Aktivatoren und Inhibitoren intrazellulärer Signalwegskomponenten geprüft werden, auf welcher Stufe der Signalwegskaskade die Massenumverteilung stattfindet, welche vom Epic[®]-Biosensor erfasst wird.

Diese Untersuchungen sollten die Möglichkeiten und Grenzen der Messung von dynamischer Massenumverteilung sondieren, um so eine Basis für die mechanistische Interpretation von Messergebnissen zu schaffen.

2. Um der Frage nachzugehen, warum es zwei präferenziell $G_{\alpha_{i/o}}$ -gekoppelte muskarinische Acetylcholinrezeptoren gibt (M_2 - und M_4 -Rezeptorsubtyp), sollte die Signalwegsaktivierung durch strukturverschiedene Liganden am M_2 - und M_4 -Rezeptorsubtyp miteinander verglichen werden. Dazu wurden besonders auch Hybridverbindungen eingesetzt, für die zuvor eine Signalwegsselektivität am M_2 -Rezeptorsubtyp festgestellt worden war (Antony et al., 2009). Zu diesem Zwecke musste überprüft werden, ob die Hybridverbindungen im Gegensatz zu ihrem orthosterischen Strukturbaustein Iperoxo am M_4 -Rezeptor, wie am M_2 -Rezeptor, eine dualsterische Bindungstopographie aufweisen.
3. Weiterhin sollte geprüft werden, ob das am M_2 -Rezeptor funktionell allosterisch/orthosterische (Prilla et al., 2004; Jäger et al., 2007), konservierte Epitop Trp 7.35 am M_4 -Rezeptorprotein eine gleichartige Funktion hat. Dazu wurde die aromatische Aminosäure Tryptophan 7.35 durch gezielte Mutagenese gegen die kleine, aliphatische Aminosäure Alanin ausgetauscht. Mit der stabil transfizierten M_4 -Rezeptormutante sollte sowohl die G-Proteinaktivierung, durch Messung der [35 S]GTP γ S-Bindung, als auch die Signalwegsaktivierung, durch Messung von zellulärer dynamischer Massenumverteilung strukturverschiedener Liganden, untersucht werden.

2. Material und Methoden

Im folgenden Kapitel werden zunächst die in der vorliegenden Dissertation verwendeten Materialien aufgeführt (2.1.), gefolgt von den involvierten Firmen (2.2.) sowie den Strukturformeln (2.3.) eingesetzter Substanzen. Die Herstellung stabil transfizierter CHO-Zelllinien wird unter 2.4. erläutert. Unter 2.8. werden die verwendeten Methoden vorgestellt. Auf die statistischen Auswertungen bezieht sich 2.9. Es liegt in der Natur der Sache, dass im Material- und Methodenteil ähnliche oder gleiche Formulierungen wie in vorangegangenen Dissertationen dieses Arbeitskreises vorkommen können, wenn dieselben Verfahren angewendet wurden.

2.1. Material

In diesem Kapitel werden alphabetisch alle Materialien aufgeführt, die in vorliegender Arbeit zum Einsatz kamen. Zuerst werden die zu Grunde liegenden Computerprogramme (2.1.1.) sowie die verwendeten Datenbanken aufgelistet (2.1.2.). Es folgt die alphabetische Katalogisierung der Geräte (2.1.3.) und der eingesetzten Analysesets („Kits“) (2.1.4.). Anschließend werden tabellarisch die eingesetzten Lösungen aufgeführt und deren Herstellung beschrieben (2.1.5.). Es folgt eine Liste der Plasmide (2.1.6.) und die Zusammensetzung der für diese Arbeit entwickelten Primer (2.1.7.). Unter 2.1.8. erfolgt eine Auflistung der verwendeten Reagenzien. Für diese Arbeit eingesetzte Verbrauchsmaterialien werden unter 2.1.9. aufgeführt.

2.1.1. Computerprogramme

Alle zur Erstellung dieser Arbeit benötigten Computerprogramme sowie deren Mutterkonzerne werden im Folgenden alphabetisch aufgelistet.

AlphaDigiDoc™ AD 1000 (AlphaInnotech, San Leandro, Kalifornien, USA)

ChemWindow 6.0 (Bio-Rad Laboratories, Philadelphia, Pennsylvania, USA)

ChromasPro 2.31 Testversion (Technelysium, Tewantin, QLD, Australien)

Citavi Pro 3 (Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, Schweiz)

GraphPad Prism 4.03 (GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA)

GraphPad InStat 3.05 (GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA)

Microsoft Word 2007 (Microsoft Corporation, Redmont, Washington, USA)

Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmont, Washington, USA)

Microsoft Excel Makro "Microplate Analyzer v2.0" (Corning, New York, USA)

Microsoft PowerPoint 2007 (Microsoft Corporation, Redmont, Washington, USA)

2.1.2. Datenbanken

Die in vorliegender Arbeit verwendeten Datenbanken werden alphabetisch in nachstehender Tabelle aufgelistet.

Kürzel	Bezeichnung	Herausgeber
D1	cDNA-UMR	Department of Biological Sciences of Missouri University of Science and Technology
D2	GPCR-Datenbank	Nucleic Acids Res. 2011, Jan; 39, D309-19. Epub 2010 Nov 2
D3	IUPHAR-Datenbank (M-Acetylcholinrezeptoren)	N.J.M. Birdsall, D.A.Brown, N.J.Buckley, A.Christopoulos, R.M.Eglen, F.Ehlert, R.Hammer, H. J. Kilbinger, G. Lambrecht, F. Mitchelson, E. Mutschler, N. M.Nathanson, R. D.Schwarz, A. B. Tobin, J. Wess.
D4	Micromedex	Thomson Scientific
D5	Pubmed	U.S. National Library of Medicine
D6	UniProtKB/SwissProt	Schweizer Institut für Bioinformatik; Department of Bioinformatics and Structural Biology, Univ. of Geneva; European Informatics Institute; Georgetown Univ. Medical Centers Protein Inform. Resource

Material

2.1.3. Geräte

In der nachfolgenden Liste sind alle Geräte und ihre Firmen alphabetisch katalogisiert.

Kürzel	Material	Firma
G1	Φ 390 pH/Temp/mV/ISE Meter 511213	Beckman
G2	1450 Microbeta [®] Trilux Liquid Scintillation & Luminescence Counter	Perkin
G3	Absaugvorrichtung, 8 fach	Feinm. W.
G4	AccuJet [®]	Brand
G5	Analysenwaage AG204	Mettler
G6	AlphaDigiDoc [™] Gel Dokumentation & Image Analysis System	Alpha
G7	Avanti [®] J-20 XP Zentrifuge, Rotortypen: JA 25.50, JLA 10.500, JS 4.3, JS 5.3	Beckman
G8	Axiovert 25 Mikroskop	Zeiss
G9	Beckman Counter LS-6000 SC	Beckman
G10	Biorad Power Pac 300 (Spannungsgeber für Elektrophoresekammer)	Biorad
G11	Brutschrank B6060	Heraeus
G12	Digitalkamera DC 290 Zoom	Kodak
G13	Dri-Block [®] DB-2A	Techne
G14	Duran [®] Erlenmeyerkolben weithalsig (50 ml)	Duran
G15	Eismaschine AF-100, AS-E 230/50/1	Scotsman
G16	EH3 basic (temperiertes Rührwasserbad)	IKA
G17	Elix [®] Wasseraufbereiter	Millipore
G18	Epic [®] Biosensor	Corning

Material

G19	Eppendorf Pipette (0,1-1 µl)	Eppendorf
G20	Eppendorf Thermomixer compact	Eppendorf
G21	Eppendorf Tischzentrifuge 5417C	Eppendorf
G22	Finnpipette Stepper	TF
G23	Finnpipette 4500 (1-5 ml, 200-1000 µl, 20- 200 µl, 1-10 µl, 0,2-2 µl)	TF
G24	Finnpipette 4501 (1000 µl)	TF
G25	Finnpipette L58158 (5-50 µl, 6-Kanal)	TF
G26	Gene Amp PCR System 2400	Perkin
G27	Harvester 96 [®] (Mach III M, Tomtec, Produktnr. 963-589)	Perkin
G28	Harvester 96 [®] (Mach III M, Tomtec, Produktnr. 990607010)	Perkin
G29	Herasafe Werkbank HS 15, Klasse II	Heraeus
G30	Mikrowelle HMT 81213	Bosch
G31	Mikrowelle NN-E-205WB EPG	Panasonic
G32	Milli-Q [®] Reinstwasseraufbereitung	Millipore
G33	Mithras LB 960	Berthold
G34	MS 1 Minishaker (Kleinschüttler)	IKA
G35	„Mr. Frosty“ 5100 Cryo 1 °C Freezing Container	Nalgene
G36	Neubauer Zählkammer	VWR
G37	Optima [®] LE-80K Ultrazentrifuge (Rotortyp:35)	Beckman
G38	Orbital Shaker 420	TF
G39	PowerPac Basic Power Supply	Biorad
G40	Polytron-Homogenisator PT 10-35	Kinematica

Material

G41	Präzisionsküvetten 100-QS	Hellma
G42	Präzisionswaage PB403-S	Mettler
G43	Schüttelwasserbad GFL 1083	GFL
G44	Stickstofftank LS 750	Taylor
G45	Sub-Cell GT System (Elektrophoresekammer)	Biorad
G46	Thermo Forma Series II Water Jacketed CO ₂ Inkubator	TF
G47	Ultrospec 3300 pro (UV-VIS-Spektrometer)	Biochrom
G48	Varioklav Dampfsterilisator Typ 135 S	H+P
G49	Variomag Elektronikrührer (Magnetrührer)	H+P
G50	Wasserbad Julabo TW12, temperierbar	Julabo

2.1.4. „Kits“ (Analysesets)

Im Folgenden sind alle in dieser Arbeit verwendeten, käuflich erworbenen Analysesets („Kits“) aufgeführt.

Kits	Artikelnummer	Firma
K1 HTRF [®] -cAMP-dynamic 2	62AM4PEC	Cisbio
K2 HTRF [®] -IP1	62P1APEC	Cisbio
K3 Plasmid Maxi Kit	12162	Qiagene
K4 QIAquick Gel Extraction Kit	78704	Qiagene
K5 QickChange [™] ; Site-directed mutagenesis kit	200519	Stratagene

2.1.5. Lösungen

In der nachfolgenden Liste werden alle verwendeten Lösungen, Puffer und Nährmedien alphabetisch aufgelistet sowie deren Herstellung beschrieben. Wenn nicht explizit aufgeführt, erfolgte die Lagerung bei Raumtemperatur.

L1 50x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Stammlösung)

Feststoff: 242 g Tris Base (R65)

Lösungsmittel in Reihenfolge: 1) 57,1 ml Eisessig (R18) 2) 100 ml 0,5 M EDTA-Lösung (L5) 3) Aqua destillata (R7) ad 1000 ml

Lagerung: 2-8 °C

L2 Ampicillin-Lösung (50 mg/ml)

Feststoff: 750 mg Ampicillin-Natrium (R5)

Lösungsmittel: 15 ml Aqua destillata (R7)

Die Lösung wurde steril filtriert (V32) und zu 550 µl in zuvor autoklavierte Polypropylen-Reaktionsgefäße (V27) pipettiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

L3 cAMP-Puffer (HBSS + 20 mM HEPES + 1 mM IBMX)

Einer Flasche Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, R27) wurde 10 ml entnommen und mit 10 ml HEPES-Lösung (1 M, R29) aufgefüllt.

Isobutylmethylxanthin (IBMX) wurde zur Herstellung einer 1 mM Lösung an jedem Versuchstag frisch hinzugeben.

L4 Dulbeccos phosphatgepufferte Kochsalzlösung

Feststoff: 9,6 g des Konzentrats (R16)

Lösungsmittel: 1 l Aqua destillata (R7)

Endkonzentrationen: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,4 mM

KH₂PO₄. Die Lösung wurde unter einer Sterilwerkbank (G29) mit Hilfe eines Bottle-Top-Filters (V34) in ein zuvor autoklaviertes Glasgefäß steril filtriert und bei 2-8 °C kühl gelagert.

L5 EDTA-Lösung (0,5 mM, pH 8,0)

Feststoff: 186,1 mg EDTA

Lösungsmittel: 100 ml Aqua destillata (R7)

Die Lösung wurde mit 0,1 M Natronlauge (R49) auf pH 8,0 eingestellt und bei 2-8 °C gelagert.

- L6 Epic[®]-Puffer (HBSS + 20 mM HEPES)
Einer Flasche Hanks' balanced salt solution (500 ml, R27) wurde unter einer Sterilwerkbank (G29) 10 ml entnommen und durch das gleiche Volumen einer 1 M HEPES-Lösung (R29) ersetzt. Die Lösung wurde zu je 50 ml aliquotiert und bei 2-8 °C gelagert.
- L7 Folin Ciocalteu's Phenolreagenz-Verdünnung
Ein Teil des Folin-Ciocalteu's Phenolreagenz (R21) wurde mit drei Teilen Aqua destillata (R7) vermischt.
- L8 Forskolin-Stammlösung, variables Ansatzvolumen
Feststoff: Forskolin (R22)
Lösungsmittel: DMSO (R13)
Es wurde eine 40 mM Lösung hergestellt und zu 11 µl aliquotiert.
Die Aliquota wurden bei -20 °C gelagert.
- L9 GDP-Stammlösung 10 mM
Feststoff: 4,65 mg Guanosindiphosphat Natriumsalz (R26)
Lösungsmittel: 1 ml Aqua destillata (R7)
Die Lösung wurde zu je 50 µl aliquotiert und bei -20 °C gelagert.
- L10 Glucose-Lösung 20 %
Feststoff: 4 g Glucose (R24)
Lösungsmittel: 20 ml Aqua destillata (R7)
Die Lösung wurde steril filtriert (V32) und bei -20 °C eingefroren.
- L11 Glycerol-Stammlösung 60 %
30,3 ml Glycerol 99 % (R25) wurden mit 19,7 ml Aqua destillata (R7) versetzt, steril filtriert (V34) und zu je 10 ml aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.
- L12 HEPES-Stammlösung 200 mM
Feststoffe: 17,35 g HEPES-Natriumsalz (R30), 31,77 g HEPES-Säure (R28)
Lösungsmittel: 1 l Aqua destillata (R7).
Die Lösung wurde mit 1 M Natronlauge (R49) auf pH 7,4 eingestellt und bei 2-8 °C gelagert.
- L13 Homogenisationspuffer (20 mM HEPES, 10 mM Na₂EDTA)
50 ml HEPES-Stammlösung (L12) und 50 ml Na₂EDTA-Lösung (R17) wurden mit 400 ml Aqua destillata (R7) versetzt und bei 2-8 °C gelagert.
- L14 Humanes Serumalbumin, Kalibrierlösung (2 mg/ml), variables Ansatzvolumen
Feststoff: Humanes Serumalbumin (R32)
Lösungsmittel: Inkubationspuffers (L15)

- L15 Inkubationspuffer für GTP γ S-Versuchsansatz,
Feststoffe: 1,085 g HEPES-Natrium-Salz (R30), 1,986 g HEPES-Säure (R28),
2,541 g MgCl₂ · 6 H₂O (R42), 7,305 g NaCl (R47)
Lösungsmittel: ad 1000 ml Aqua destillata (R7)
Die Lösung wurde mit 1 M Natronlauge (R49) auf pH 7,4 eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei 2-8 °C.
Konzentrationen: 12,5 mM HEPES, 12,5 mM MgCl₂ und 125 mM NaCl.
- L16 IP1-Puffer (HEPES 10 mM, CaCl₂ 1mM, MgCl 0,5 mM, KCL 4,2 mM, NaCl 146 mM, Glucose 5,5 mM, LiCl 50 mM, pH 7,4)
Ein Teil des im HTRF[®]IP1-Analysesets (K2) mitgelieferten Stimulationspuffers wurde mit 4 Teilen Aqua destillata (R7) verdünnt. Die Verdünnung erfolgte am jeweiligen Versuchstag.
- L17 Kaliumnatriumtartrat-Lösung 2 % (m/m)
Feststoff: 2 g Kaliumnatriumtartrat (R36)
Lösungsmittel: 100 ml Aqua destillata (R7)
- L18 Kupfer(II)sulfat-Lösung 1 % (m/m)
Feststoff: 1 g Kupfersulfat (R37)
Lösungsmittel: 100 ml Aqua destillata (R7)
- L19 Lagerungspuffer für [³⁵S]GTP γ S (10 mM Tricine, 10 mM DTT)
Feststoffe: Tricine (R64), DTT (R14)
Lösungsmittel: Aqua pro analysi (R8).
Der pH-Wert betrug 7,6. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.
- L20 Luria-Bertani Agarplatten, Ampicillin-haltig
Feststoff: 18,5 g Luria-Bertani Agar (R40)
Lösungsmittel: 500 ml Aqua destillata (R7)
Der Ansatz wurde in der Mikrowelle (G30) so lange erhitzt, bis eine klare Lösung entstand. Die Lösung wurde autoklaviert und bei einer Temperatur von 55 °C mit 200 μ l Ampicillin-Lösung (L2) versetzt. Anschließend wurden je 25 ml mit einer sterilen Einmalpipette (V4) in eine sterile Petrischale (V23) gegossen und bei 2-8 °C gelagert.
- L21 Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)
Feststoff: 12,5 g Luria-Bertani Medium (R41)
Lösungsmittel: 500 ml Aqua destillata (R7).
Die Lösung wurde autoklaviert und nach dem Erkalten mit 500 μ l Ampicillin-Lösung (L2) versetzt.

L22 Nährmedien

Alle Nährmedien wurden unter einer Sterilwerkbank (G29) hergestellt und weiterverwendet. Die Aufbewahrung erfolgte bei 2-8 °C. Kurz vor Gebrauch wurde das Nährmedium in einem Wasserbad (G50) auf 37 °C erwärmt.

L22.1. Nährmedium für CHO Flp-InTM-Zellen

Komponente	Volumen (ml)	Endkonzentration
Nutrient Mixture F12 Ham (R53)	500	
Fetales Kälberserum (R20)	50	ca. 10 %
Penicillin-Streptomycin-Lösung (R55)	5	ca. 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin
L-Glutamin-Lösung 200 mM (R38)	6	ca. 2 mM

Tab. 4: Nährmedium zur Kultivierung von CHO Flp-InTM-Zellen

L22.2. Nährmedium zur Selektion stabil transfizierter CHO-Flp-InTM-Zellen

Ergänzend zu L22.1 wurden 6,67 ml Hygromycin B-Lösung (R33) hinzugegeben. Es resultierte eine Endkonzentration von 600 µg/ml Hygromycin B.

L22.3. Nährmedium für CHO K1-Zellen

Komponente	Volumen (ml)	Endkonzentration
Nutrient Mixture F12 Ham (R53)	500	
Fetales Kälberserum (R20)	50	ca. 10 %
Penicillin-Streptomycin-Lösung (R55)	5	ca. 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin
L-Glutamin-Lösung (R38)	3	ca. 1 mM

Tab. 5: Nährmedium zur Kultivierung von CHO K1-Zellen

L22.4. Nährmedium für stabil transfizierte CHO β₂-Zellen

Ergänzend zu L22.3 wurde 1 ml G418 (R23) hinzugefügt. Es resultierte eine Endkonzentration von 0,2 mg/ml G418.

L22.5. Nährmedium für HEK 293-Zellen

Komponente	Volumen (ml)	Endkonzentration
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (R15)	500	
Fetales Kälberserum (R20)	50	ca. 10 %
Penicillin-Streptomycin-Lösung (R55)	5	ca. 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin

Tab. 6: Nährmedium zur Kultivierung von HEK 293-Zellen

L22.6. Nährmedium für Escherichia coli-Bakterien

Komponente	Volumen (ml)	Endkonzentration
Luria-Bertani-Medium (L21)	500	
Ampicillin-Lösung (L2)	0,5	1 mg/ml

Tab. 7: Nährmedium zur Kultivierung von Escherichia coli-Bakterien

L23 Natriumbutyrat-Stammlösung 100 mM

Feststoff: 1,101 g Natriumbutyrat (R45)

Lösungsmittel: 100 ml Aqua destillata (R7)

Die Lagerung erfolgte bei 2-8 °C. Vor der Verwendung erfolgte eine Sterilfiltration (V32).

L24 Natriumcarbonat-Lösung 2 % (m/m)

Feststoff: 2 g Natriumcarbonat (R46)

Lösungsmittel: 100 ml 0,1 M Natronlauge (R48)

L25 NZY-Lösung pH 7,5

Feststoff: 4,2 g NZY-Medium (R54)

Lösungsmittel: 200 ml Aqua destillata (R7)

Die Lösung wurde mit 1 M Natronlauge (R49) auf pH 7,5 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung autoklaviert und bei 2-8 °C gelagert.

L26 NZY⁺-Lösung

10 ml NZY-Lösung (L25) wurden mit 200 µl 20-prozentiger Glucoselösung (L10) versetzt und bei 2-8 °C gelagert.

- L27 Polyethylenimin (PEI)-Lösung 0,1 %
1,0 g PEI-Lösung 50 % (R56) wurden mit Aqua destillata (R7) ad 500 ml aufgefüllt und bei 2-8 °C aufbewahrt.
- L28 Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA)
40 ml der 50x-Stammlösung (L1) wurden ad 2000 ml mit Aqua destillata (R7) verdünnt und bei 2-8 °C gelagert.
- L29 Tris-EDTA-Puffer (TE) 10 mM
Feststoff: 29,22 mg Natrium-EDTA (R17), 121,14 mg Tris
Lösungsmittel: 100 ml Aqua destillata (R7), 1 M Natronlauge (R49), 1 M Salzsäure (35)
Natrium-EDTA wurde in Aqua destillata gegeben und mit Natronlauge versetzt bis eine klare Lösung entstand. Anschließend erfolgte der Zusatz von Tris sowie die Einstellung auf pH 8 mit Salzsäure. Die Lösung wurde mit einem Mikrofilter (V32) steril filtriert, zu je 5 ml aliquotiert und bei 2-8 °C gelagert.
- L30 Zentrifugationspuffer (20 mM HEPES, 0,1 mM Na₂-EDTA)
50 ml HEPES-Stammlösung (L12) wurden mit 0,5 ml Na₂-EDTA-Lösung (R17) versetzt und mit Aqua destillata (R7) auf 500 ml aufgefüllt. Es erfolgte eine Lagerung bei 2-8 °C.

2.1.6. Plasmide

Im Folgenden werden alle eingesetzten Plasmide aufgeführt, die im Laufe der Arbeit Verwendung fanden.

Kürzel	Bezeichnung	Firma/ Herkunft
P1	pcDNA3.1hm1	S&T
P2	pcDNA3.1hm3	S&T
P3	pcDNA3.1hm4	S&T
P4	pOG 44	Invitrogen
P5	pcDNA5FRT/TO	Invitrogen
P6	pcDNA3.1h β 2	Prof. Dr. F. Blaes, Universitätsklinikum Gießen, Neurologie

2.1.7. Primer

In der nachfolgenden Liste sind alle Oligonukleotidprimer aufgeführt, die im Laufe dieser Arbeit entworfen wurden. Die Abkürzung „Fw“ steht für *forward* und beschreibt die 5'→3'-Richtung, die Abkürzung „Rv“ steht für *reverse* und beschreibt die 3'→5' Richtung. Die Abkürzung „Sequenz.“ bedeutet, dass der Primer zur Überprüfung einer bestimmten Mutation und somit zur Sequenzierung entworfen wurde.

Kürzel	Nukleotidsequenz	Funktion
O1	CTGAGTGCCATCCTCCTG	M ₁ ⁴⁰⁰ Trp (Fw; Sequenz.)
O2	CAAAGCAGCAGCAGGCG	M ₁ ⁴⁰⁰ Trp (Rv; Sequenz.)
O3	GCGGCCAGACCCTCAGTGCG	M ₃ ⁵²⁶ (Fw; Sequenz.)
O4	CTGGCACAGCAGCAGCATCTT	M ₃ ⁵²⁶ (Rv; Sequenz.)
O5	GACACGAACGATCTTTGC	M ₄ ⁴³⁵ Trp (Fw; Sequenz.)
O6	CCGATACTGGCACAGCAGC	M ₄ ⁴³⁵ Trp (Rv; Sequenz.)
O7	GCAGCATCTTAAAGGTCTTC	M ₅ ⁴⁷⁷ Trp (Rv; Sequenz.)
O8	GAGACCCTGGCGGAGCTGGGCTAC	M ₁ ⁴⁰⁰ Trp (Fw)
O9	GTAGCCCAGCTCCGCCAGGGTCTC	M ₁ ⁴⁰⁰ Trp (Rv)
O10	CAAAACCTTTGCGAATCTGGG	M ₃ ⁵²⁶ Trp (Fw)
O11	CCAGATTCGCAAAGGTTTTGGG	M ₃ ⁵²⁶ Trp (Rv)
O12	CTGACACGGTGGCGTCCATTGGC	M ₄ ⁴³⁵ Trp (Fw)
O13	GCCAATGGACGCCACCGTGTCAG	M ₄ ⁴³⁵ Trp (Fw)
O14	AGTCACCCTGGCGCACTTGGGCTATTGG	M ₅ ⁴⁷⁷ Trp (Fw)
O15	CCAATAGCCCAAGTGCGCCAGGGTGACT	M ₅ ⁴⁷⁷ Trp (Fw)

Material

2.1.8. Reagenzien

In nachfolgender Liste werden alle verwendeten Reagenzien aufgeführt.

Kürzel	Reagenz	Artikelnummer	Firma
R1	1kb DNA Ladder	15615016	Invitrogen
R2	2-Propanol 99,5 % (HPLC)	34863	Quiagene
R3	10x BlueJuice® (Gelladepuffer)	10816015	Invitrogen
R4	Agarose	A9539	Sigma
R5	Ampicillin-Natrium (M = 371,4 g/ml)	A9518	Sigma
R6	Apal (Restriktionsenzym)	R0114S	NEB
R7	Aqua destillata (hergestellt mittels einer Elix®-Wasseraufbereitungsanlage)		Millipore
R8	Aqua pro analysi (hergestellt mittels eines Milli Q®-Reinstwassersystems)		Millipore
R9	BamHI (Restriktionsenzym)	R0136S	NEB
R10	Bovines Serumalbumin (BSA)	B9001S	NEB
R11	D(+)-Glucose-Monohydrat	8346	Merck
R12	Dimethylformamid	40248	Fluka
R13	Dimethylsulfoxid (DMSO; M = 78,1 g/mol)	D5879	Sigma
R14	DL-Dithiothreitol (DTT; M = 154,3 g/mol) ((R*,R*)-(±)-1,4-Dimercaptobutan-2,3-diol)	D0632	Sigma
R15	Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)	D5796	Sigma
R16	Dulbeccos phosphatgepufferte Kochsalzlösung (D-PBS)	D5652	Sigma
R17	EDTA (Maßlösung 100 mM) (Ethylendiamintetraessigsäure, Na ₂ EDTA)	20271	Grüssing

Material

R18	Essigsäure (100%)	K36101663	Merck
R19	Ethidiumbromid, wässrige Lösung (10 mg/ml)	15585	Invitrogen
R20	Fetales Kälberserum	F7524	Sigma
R21	Folin-Ciocalteu's Phenolreagenz	109001	Merck
R22	Forskolin (M = 410,5 g/mol)	A2154	AppChem
R23	G418-Disulfat (M = 692,8 g/mol)	ant-gn	Invivogen
R24	D(+)-Glucose-Monohydrat (M = 198,17 g/mol)	K40105774	Merck
R25	Glycerol 99 % (M = 92,1 g/mol)	G5516	Sigma
R26	Guanosin-5'-diphosphat-Natriumsalz (M = 443,2 g/mol; GDP)	G7127	Sigma
R27	Hank's balanced salt solution (HBSS)	14025050	Invitrogen
R28	HEPES (M = 238,3 g/mol) (4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ylethansulfonsäure))	A10690	AppChem
R29	HEPES wässrige Pufferlösung 1 M	15630056	Invitrogen
R30	HEPES-Natriumsalz (M = 260,3 g/mol)	H7006	Sigma
R31	Hind III (Restriktionsenzym)	15207012	Invitrogen
R32	Humanes Serumalbumin (HSA; Fraktion V; 96-99 % Albumin)	A1653	Sigma
R33	Hygromycin B (M = 527,5 g/mol)	10687010	Invitrogen
R34	Isopropanol 100 %	67-63-0	VWR
R35	Kaliumdihydrogenorthophosphat (KH_2PO_4 ; M = 136,09 g/mol)	P5379	Sigma
R36	Kaliumnatriumtartrat-Tetrahydrat ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$; M = 282,22 g/mol)	379833	Sigma

Material

R37	Kupfer(II)sulfat-Pentahydrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$; M = 249,7 g/mol)	102790	Merck
R38	L-Glutamin-Lösung 200 mM ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$; M = 146,15 g/mol)	G7513	Sigma
R39	Lipofectamine TM 2000 (Transfektionsreagenz)	11668027	Invitrogen
R40	Luria-Bertani-Agar	L3072	Sigma
R41	Luria-Bertani-Medium	L3522	Sigma
R42	Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$; M = 302,3)	M2760	Sigma
R43	Magnesiumhydrogenphosphat-Trihydrat ($\text{MgHPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$; M = 174,33 g/mol)	63080	Fluka
R44	Meltilex TM A (Szintillationswachs)	1420441	Perkin
R45	Natriumbutyrat ($\text{C}_4\text{H}_7\text{NaO}_2$; M = 110,1 g/mol)	A11079	Alfa
R46	Natriumcarbonat (Na_2CO_3 ; M = 106,0 g/mol)	106392	Merck
R47	Natriumchlorid (NaCl ; M = 58,4 g/mol)	0278	Baker
R48	Natronlauge 0,1 M (NaOH 0,1 M)	35263	Riedel
R49	Natronlauge 1 M (NaOH 1 M)	35256	Riedel
R50	NE-Puffer 2 (10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 1mM DTT, pH 7,9)	B7002S	NEB
R51	NE-Puffer 3 (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 1mM DTT, pH 7,9)	B7003S	NEB
R52	NE-Puffer 4 (20 mM Tris-acetat, 50 mM $\text{C}_3\text{H}_3\text{KO}_2$, 10 mM $\text{C}_4\text{H}_6\text{MgO}_4$, 1 mM DTT, pH 7,9)	B7004S	NEB
R53	Nutrient-Mixture F-12 Ham	N4888	Sigma

Material

R54	NZY-Broth	13635024	Gibco
R55	Penicillin-Streptomycin-Lösung (Penicillin 10.000 -12.000 U/ml; Streptomycin 10-12 mg/ml)	P0781	Sigma
R56	Polyethylenimin-Lösung 50 % in Wasser (m/v) (PEI)	P3143	Sigma
R57	Polyfect [®] (Transfektionsreagenz)	301107	Qiagene
R58	REact [®] 2 (Reaktionspuffer zum Restriktionsverdau)	16302010	Invitrogen
R59	Ready Protein+ [™] (Szintillationscocktail)	586604	Beckmann
R60	Saccharose (M = 342,3 g/mol)	107687	Merck
R61	Salzsäure 0,1 M (HCl 0,1 M)	35335	Riedel
R62	Salzsäure 1 M (HCl 1 M)	35328	Riedel
R63	T4 DNA Ligase (mit Reaktionspuffer)	15224017	Invitrogen
R64	Tricine ((N-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin))) (M = 179,2 g/mol)	T0377	Sigma
R65	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS; M = 121,14 g/mol)	108382	Merck
R66	Trypsin-EDTA-Lösung (0,5 g/l Trypsin vom Schwein und 0,2 g/l Natrium-EDTA)	T3924	Sigma
R67	Xho I (Restriktionsenzym)	15231012	Invitrogen
R68	XL1-Blue " <i>supercompetent cells</i> "	200236	Stratagene

Material

2.1.9. Verbrauchsmaterialien

In der nachfolgenden Liste sind alle verwendeten Verbrauchsmaterialien aufgeführt.

Kürzel	Material	Artikelnummer	Firma
V1	1,2 ml Standardplatte PP, 96 Kavitäten, unsteril	AB-0564	Abgene
V2	95 µl Standardplatte PP, 384 Kavitäten, unsteril	3657	Corning
V3	Cellstar® Einmalpipette 10 ml, steril	607160	Greiner
V4	Cellstar® Einmalpipette 25 ml, steril	760160	Greiner
V5	Cellstar® Filter Top Zellkulturflasche 25 cm ²	690175	Greiner
V6	Cellstar® Filter Top Zellkulturflasche 75 cm ²	658175	Greiner
V7	Cellstar® Standard Zellkulturflasche 175 cm ²	660160	Greiner
V8	Cellstar® Zellkulturschale mit Nocken 145 x 200 mm, steril	639160	Greiner
V9	Cellstar® Zellkulturschale mit Nocken 100 x 20 mm, steril	664160	Greiner
V10	Cellstar® Zellkulturschale 6-Kavitäten	657160	Greiner
V11	Cellstar® Zellkulturschale 24-Kavitäten	662160	Greiner
V12	Cryogenic Vials, 1 ml	500001012	Nalgene
V13	CyBi® TipTray 384/25 µl	QL380025	CyBio
V14	Epic® 384 Well Cell Assay, Mikrotiterplatte	5040	Corning
V15	Epic® 384 Well Cell Assay, Mikrotiterplatte, mit Fibronectin beschichtet	5042	Corning
V16	MultiLex™ (Szintillationswachs)	1450-441	Perkin
V17	Mikrotiterplatte 384 Kavitäten	784080	Greiner
V18	MicroAmp® Reaktionsgefäße 0,2 ml	N8010540	App Bio

Material

V19	Neolus 20G 0,9 mm (Kanüle)	NN-2070S	Terumo
V20	Norm-Ject® Einmalspritze 10 ml	4100.000V0	Henke
V21	Parafilm® M laboratory film	PM-996	Pechiney
V22	Pasteurpipetten, Glas, ca. 150 mm	747715	Brand
V23	Petrischale, unsteril	633161	Greiner
V24	Pipettenspitzen 0,5-5 ml	6125701	Brand
V25	Pipettenspitzen Tip-One® 1-200 µl, 10-1000 µl	S1111-0006 S1111-2021	Starlab
V26	Plate Cassette	1450-105	Perkin
V27	Polypropylen-Reaktionsgefäße 1,5 ml, mit angehängtem Deckel	616201	Greiner
V28	Polypropylenröhrchen 14 ml mit Rundboden	352057	Becton
V29	Polypropylenröhrchen 15 ml, mit konischem Boden	188271	Greiner
V30	Polypropylenröhrchen 50 ml, mit konischem Boden	227261	Greiner
V31	Printed Filtermat (Glasfaserfiltermatte)	1450-421	Perkin
V32	Qualilab® Spitzenvorwaschfilter, 0,22 µm, CM-Membran, steril	5122110	Merck Lab
V33	Sample Bag	1450-432	Perkin
V34	SFCA Bottle-Top-Filter 150 ml, steril	290-4520	Nalgene
V35	Skalpellgriff, Rotilabo®	19.1	Roth
V36	Skalpellklinge, steril	0483	Schreiber
V37	Szintillationsflasche, HD-Polyethylen, 17,0/60,0 mm	619301	Greiner

Material

V38	Zellkulturschale 96-Kavitäten	83.1835	Sarstedt
V39	Zellschaber, 25 cm	83.1830	Sarstedt
V40	Zentrifugenbehältnis, PP, 500 ml	361691	Beckmann
V41	Zentrifugenröhrchen, Polycarbonat, 50 ml	3138-0050	Nalgene

2.2. Firmen

Jegliche mit Geräten, Verbrauchsmaterialien, Reagenzien, Analysebausätze, Primern, Plasmiden oder Computerprogrammen in dieser Arbeit vertretene Firmen, sind im Folgenden mit Sitz aufgeführt. Die für die jeweilige Firma verwendeten Kürzel sind in Klammern ergänzt.

Abgene, Hamburg, Deutschland (Abgene)

Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland (Alfa)

Alpha Innotech Corporation, San Leandro, Kalifornien, USA (Alpha)

AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland (AppChem)

Applied Biosystems, Applera GmbH, Darmstadt (App Bio)

Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland (Beckman)

Beckman Instruments, Paolo Alto, USA (Beckman)

Becton-Dickinson Labware, New Jersey, USA (Becton)

Biochrom, Ltd., Cambridge, UK (Biochrom)

BIO-RAD Laboratories, Hercules, USA (Biorad)

Biozol Diagnostica Vertireb GmbH, Eching, Deutschland (Biozol)

Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland (Brand)

Carl-Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland (Zeiss)

Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland (Roth)

Cisbio Bioassays, Codolet, Frankreich (Cisbio)

Corning Incorporated, New York, USA (Corning)

CyBio AG, Jena, Deutschland (CyBio)

Duran Produktions GmbH & Co KG, Mainz, Deutschland (Duran)

Elektrolux GmbH, Nürnberg, Deutschland (Elektrolux)

Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland (Eppendorf)

Feinmechanische Werkstatt der Universität Bonn, Deutschland (Feinm. W.)

Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz (Fluka)

Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland (GFL)

Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland (Gibco)

Greiner Bio-One GmbH, Solingen, Deutschland (Greiner)

Grüssing GmbH, Filsum, Deutschland (Grüssing)

Hellma GmbH & Co. KG, Mühlheim, Deutschland (Hellma)

Henke Sass Wolf, Tuttlingen, Deutschland (Henke)

Heraeus, Hilden, Deutschland (Heraeus)

H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland (H+P)

IKA[®] Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland (IKA)

Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA (Invitrogen)

InvivoGen, San Diego, USA (Invivogen)

Janke und Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland (Janke)

Julabo Labortechnik, Seelbach, Deutschland (Julabo)

Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland (Kendro)

Kinematica AG, Littau, Schweiz (Kinematica)

Kodak GmbH, Stuttgart Deutschland (Kodak)

Mallinckrodt Baker, Griesheim, Deutschland (Baker)

Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland (Memmert)

Merck Labor und Chemie Vertrieb GmbH, Bruchsal, Deutschland (Merck Lab)

Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland (Merck)

Mettler-Toledo AG, Gießen, Deutschland (Mettler)

Missouri S&T cDNA Resource Center, Rolla, USA (S&T)

Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland (Millipore)

Nalgene® Nunc International, Rochester, USA (Nalgene)

New England BioLabs® Ipswich, USA (NEB)

Panasonic Manufacturing Ltd., Cardiff, U.K. (Panasonic)

Pechiney Plastic Packaging, Menasha, USA (Pechiney)

Perkin Elmer Life Sciences GmbH, Rodgau-Jügesheim, Deutschland (Perkin)

Qiagene GmbH, Hilden, Deutschland (Qiagene)

Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland (Riedel)

Robert Bosch GmbH, Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland (Bosch)

Sarstedt AG Co., Nümbrecht, Deutschland (Sarstedt)

Schreiber GmbH, Fridingen, Deutschland (Schreiber)

Scotsman Ice Systems, Bettolino di Pogliano, Mailand, Italien (Scotsman)

Sharp Electronics GmbH, Hamburg, Deutschland (Sharp)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland (Sigma)

Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland (Starlab)

Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande (Stratagene)

Techne AG, Jahnsdorf, Deutschland (Techne)

Terumo Corporation, Tokyo, Japan (Terumo)

Thermo Labsystems Oy, Helsinki, Finnland (Thermo)

Thermo Forma Scientific, Marietta, USA (TF)

VWR International, Langenfeld, Deutschland (VWR)

Whatman GmbH, Dassel, Deutschland (Whatman)

2.3. Strukturformeln und Kurzbeschreibungen der Testsubstanzen

Im Folgenden werden alle zur Erstellung dieser Arbeit eingesetzten Substanzen aufgeführt. Die molare Masse (M) bezieht sich jeweils auf die angegebene Strukturformel. Nähere Erläuterungen zu den einzelnen Testsubstanzen befinden sich in den jeweiligen Kapiteln.

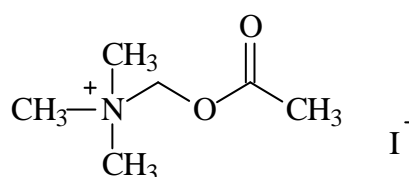
2.3.1. Aktivatoren

Acetylcholin

M = 273,1 g/mol

Lieferant: Sigma

Artikelnummer: A 7000



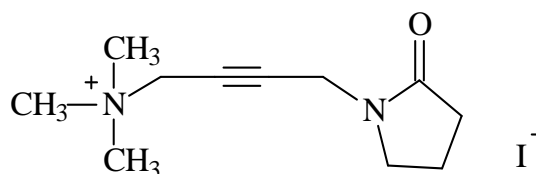
Vorkommen: Acetylcholin dient als Transmitter des Parasympathikus (prä- und postganglionär) sowie des Sympathikus (präganglionär und postganglionär an den Schweißdrüsen). Des Weiteren ist es ein Neurotransmitter im ZNS und Überträgerstoff an der motorischen Endplatte. Nicht-neuronal kommt Acetylcholin unter anderem in Zellen des Immunsystems vor.

Oxotremorin M

M = 322,2 g/mol

Lieferant: Sigma

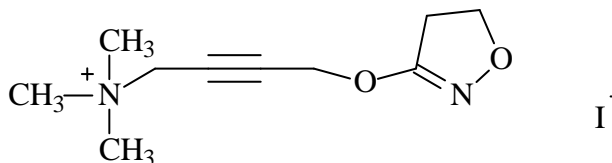
Artikelnummer: 0100



Oxotremorin M stellt ein Derivat des endogenen muskarinischen Liganden Acetylcholin dar. Es wird nicht therapeutisch eingesetzt, sondern dient in der Pharmakologie als experimentelle Testsubstanz.

Iperoxo

M = 324,2 g/mol



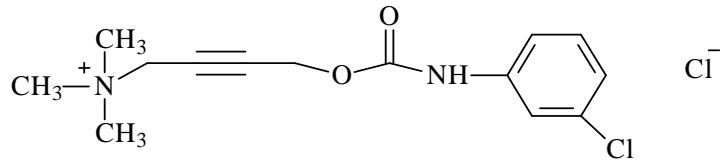
Erstbeschreibung: Arbeitskreis Prof. Dr. Marco De Amici (Istituto di Chimica Farmaceutica e Tossicologica, Università degli Studi di Milano, Italien). Iperoxo stellt ein Derivat von Acetylcholin dar, wird momentan aber therapeutisch nicht genutzt.

McN-A-343

M = 317,2 g/mol

Lieferant: Sigma

Artikelnummer: C 7041



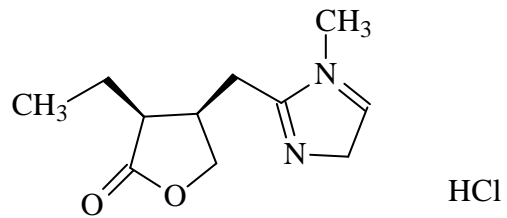
Die Testsubstanz McN-A-343 enthält den quartären Stickstoff des endogenen muskarinischen Liganden Acetylcholin, weist aber Modifikationen des Acetylesters auf.

Pilocarpin

M = 244,7 g/mol

Lieferant: Fluka

Artikelnummer: 80475



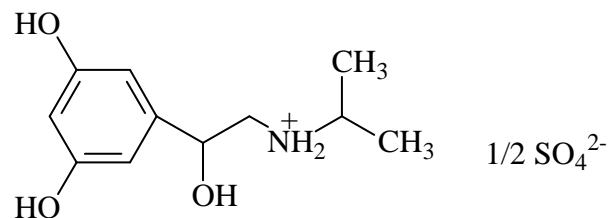
Vorkommen: Die freie Base kommt als Hauptalkaloid in Pilocarpus-Arten aus der Familie der Rutaceae vor. Die Substanz wird heute noch als Arzneimittel zur Glaukomtherapie eingesetzt (z.B. in Salagen®).

Orciprenalin

M = 260,3 g/mol

Lieferant: Sigma

Artikelnummer: M 2398



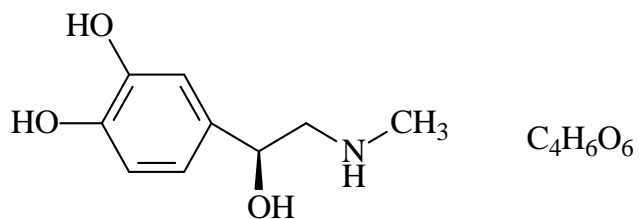
Orciprenalin wird synonym auch als Metaproterenol bezeichnet und stellt ein Derivat des endogenen adrenergen Agonisten Adrenalin dar. Es wirkt somit β -sympathomimetisch.

Adrenalin

M = 333,29 g/mol

Lieferant: Sigma

Artikelnummer: E4375



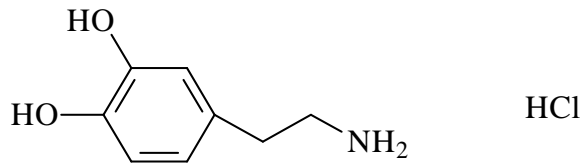
Adrenalin übt als Hormon systemische Wirkungen auf adrenerge Rezeptoren aus. Eingesetzt wird es zur Wiederbelebung bei einem Herz-Kreislaufstillstand (z.B. Suprarenin®).

Dopamin

M = 189,64 g/mol

Lieferant: Sigma

Artikelnummer: H 8502



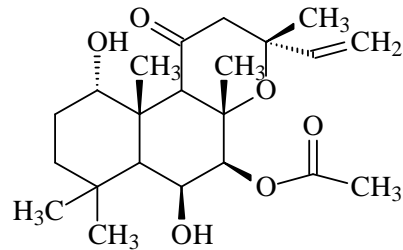
Dopamin dient dem menschlichen Organismus einerseits als Edukt der Noradrenalinsynthese, andererseits stellt es selbst einen Transmitter dar. Es wird heute zur Behandlung eines Kreislaufschockes mit eingeschränkter Nierendurchblutung eingesetzt.

Forskolin

M = 410,5 g/mol

Lieferant: Tocris

Artikelnummer: A 2165



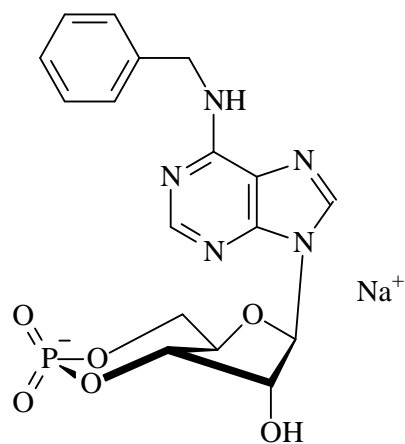
Bei der Substanz Forskolin handelt es sich um ein Diterpen, welches ursprünglich aus der Pflanze *Coleus forskohlii* gewonnen wurde. Es wird experimentell zur Aktivierung der Adenylylcyclase eingesetzt. Momentan findet es keine therapeutische Anwendung.

N⁶-Benzyl-cAMP

M = 441,3 g/mol

Lieferant: BioLog

Artikelnummer: B08



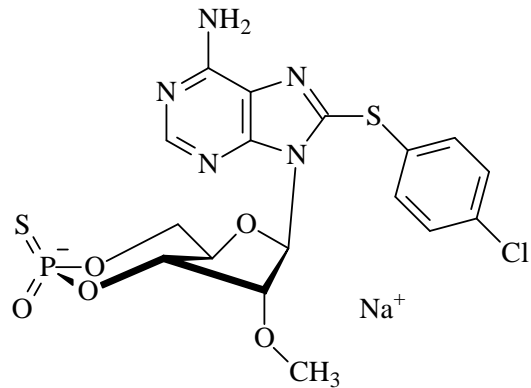
N⁶-Benzyl-cAMP ist ein cAMP-Analogon, das selektiv die Proteinkinase A, nicht aber das Enzym Epac („*exchange protein directly activated by cAMP*“) aktiviert. Es dient momentan lediglich als Experimentalsubstanz.

8-(4-Chlorophenylthio)-2'-O-methyl-cAMPS, Sp-Isomer

M = 523,9 g/mol

Lieferant: BioLog

Artikelnummer: C 052



Bei dieser rein experimentell eingesetzten Substanz handelt es sich um ein cAMP-Analogon, welches so modifiziert ist, dass es eine höhere Affinität zum Enzym Epac besitzt als zur Proteinkinase A.

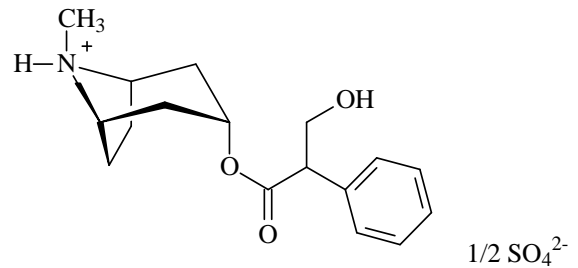
2.3.2. Antagonisten

Atropin

M = 338,44 g/mol

Lieferant: Sigma

Artikelnummer: A 0257



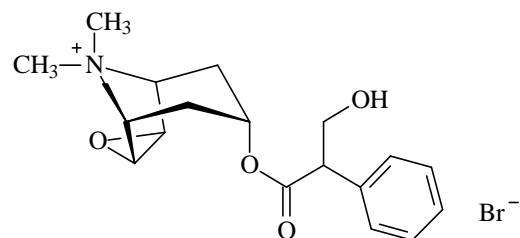
Vorkommen: Atropin ist das Hauptalkaloid von *Atropa belladonna*. Es wird heutzutage unter anderem zur Behebung von Koliken (z.B. Dysurgal®) sowie als Mydriatikum eingesetzt.

N-Methylscopolamin

M = 398,3 g/mol

Lieferant: Sigma

Artikelnummer: S 8502



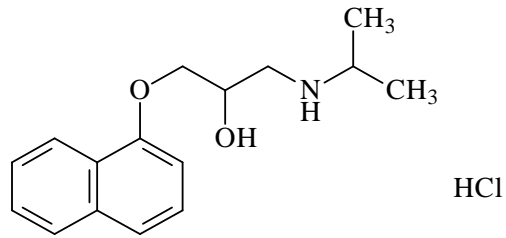
Bei dieser Substanz handelt es sich um ein Scopolaminderivat, welches durch Einführung einer Methylgruppe eine permanente positive Ladung aufweist. Während dessen quartäres Derivat N-Butylscopolaminiumbromid (z.B. Buscopan®) bei Spasmen glatter Muskulatur Anwendung findet, wird die Muttersubstanz Scopolamin zur Prophylaxe von Kinetosen eingesetzt (z.B. Scopoderm®).

Propranolol

M = 295,8 g/mol

Lieferant: Sigma

Artikelnummer: P0884



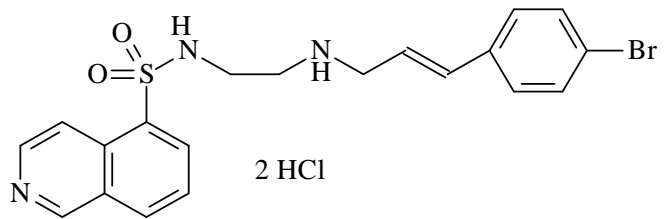
Propranolol stellt einen unselektiven β_1 - und β_2 -Adrenozeptorantagonisten dar. Der Arzneistoff besitzt ein breites Indikationsgebiet und wird unter anderem zur Behandlung von tachykarden Herzrhythmusstörungen sowie zur Migräneprophylaxe eingesetzt (z.B. Dociton[®]).

H89

M = 443, g/mol

Lieferant: Tocris

Artikelnummer: 2910



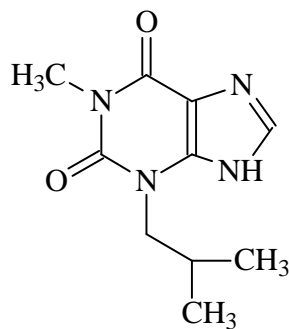
H89 ist die handelsübliche Bezeichnung für N-[2-Bromocinnamylamino)Ethyl]-5-Isochinolinsulfonamid. Es ist ein Vertreter einer Gruppe von Isochinolinsulfonamiden (H-Serie), die die Proteinkinase A-Aktivität inhibieren.

1-Methyl-3-isobutylxanthin (IBMX)

M = 222,3 g/mol

Lieferant: Sigma

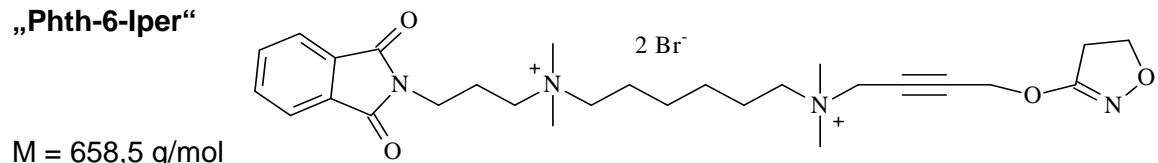
Artikelnummer: I 5879



IBMX wird als experimentelle Substanz eingesetzt, um intrazellulär Phosphodiesterasen zu inhibieren.

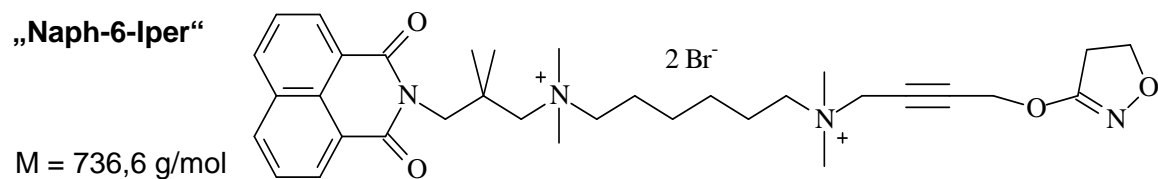
2.3.3. Hybridverbindungen

„Phth-6-Iper“



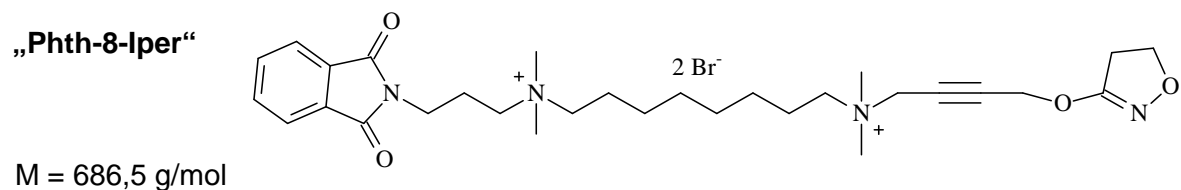
Synonyme: „Hybrid 1“; „DDT5“,

„Naph-6-Iper“



Synonyme: „Hybrid 2“; „MMH5-6“ , „

„Phth-8-Iper“



Synonym: „CZA8“

Synthese: Arbeitskreise Prof. Dr. M. De Amici (Istituto di Chimica Farmaceutica e Tossicologica, Università degli Studi di Milano, Italien) und Prof. Dr. U. Holzgrave (Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Universität Würzburg).

Trotz der Publikationen von Phth-6-Iper unter dem bisher verwendeten Synonym „Hybrid 1“, wird im Folgenden die neue, präzisere Bezeichnung der Substanz Phth-6-Iper verwendet.

2.3.4. Radioliganden

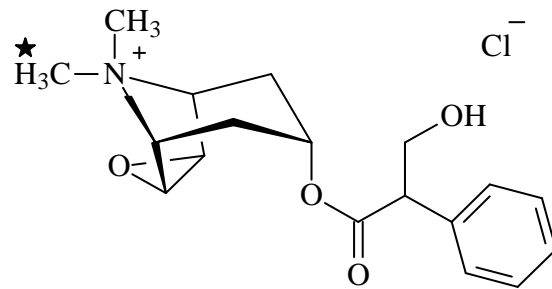
[³H]N-Methylscopolamin

M = 353,8 g/mol

Lieferant: Perkin-Elmer

Artikelnummer: NET 636001

Spezifische Aktivität: 70-82 Ci/mmol
(chargenabhängig)



Bei diesem Radioliganden handelt es sich um das einfach tritiierte N-Methylscopolamin, welches ein Ligand muskarinischer Acetylcholinrezeptoren ist.

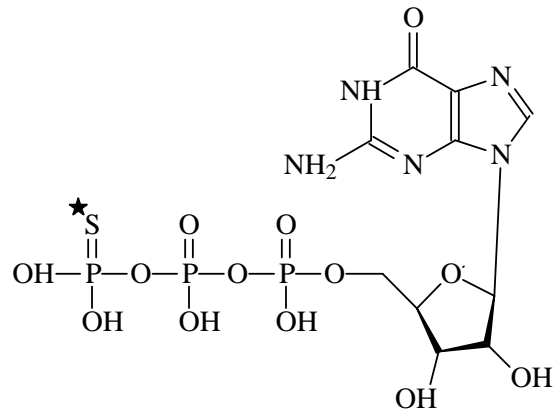
[³⁵S]GTPγS

M = 539,2 g/mol

Lieferant: Perkin Elmer

Artikelnummer: NEG030H250UC

Spezifische Aktivität: 1250 Ci/mmol



Dieses Derivat von Guanosintriphosphat (GTP) enthält ein radioaktives Schwefelatom im Austausch gegen ein Sauerstoffatom am dritten Phosphatrest. Es wird rein experimentell zur Quantifizierung der G-Proteinbindung eingesetzt.

Material

2.3.5. Bakterielle Toxine

Kürzel	Material	Artikelnummer	Lieferant
T1	Choleratoxin (CTX; Vibrio Cholerae)	P7208	Sigma
T2	Pertussistoxin (PTX; Bordetella Pertussi)	C8052	Sigma
T3	Pasteurella multocida Toxin (PMT)	RK-01-507	Biozol
T4	YM 254890 (YM; Chromobacterium sp. QS3366)	freundliche Bereitstellung durch Herrn Prof. Dr. G. Milligan, (Universität Glasgow, UK)	

2.4. Herstellung stabil transfizierter CHO-Zelllinien

Nachfolgend werden alle Arbeiten erläutert, die für die Herstellung stabil mit Rezeptor-Plasmid-DNA-transfizierter CHO-Zelllinien notwendig waren.

2.4.1. Vermehrung von Plasmid-DNA in Escherichia coli-Bakterien

Um eine ausreichend große Konzentration Plasmid-DNA zur Verfügung zu haben, wurden die käuflich erworbenen Plasmide (P1, P2, P3) in Escherichia coli (E. coli)-Bakterien eingebracht und von diesen Prokaryoten vervielfältigt. Allgemein wird das Einbringen von DNA in Prokaryoten als Transformation bezeichnet.

Hierzu wurden Ampicillin-haltige Agarplatten hergestellt. 18,5 g LB Agar (R40) wurden abgewogen und in 500 ml Aqua destillata (R7) in einer Mikrowelle (G30) bis zur klaren Lösung erhitzt. Die Lösung wurde autoklaviert und nach dem Abkühlen auf 55 °C mit 200 µl Ampicillin-Lösung (50 mg/ml, L2) versetzt, um einen Fremdbewuchs zu vermeiden. Anschließend wurden je 25 ml flüssiger Agar pro Petrischale (V23) ausgegossen. Die Platten wurden mit Parafilm® (V21) versehen und bei 2-8 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

Zur Transformation wurde die Hitzeschockmethode angewandt. Diese ermöglicht das erleichterte Einbringen von DNA durch unterschiedliche Temperatureinflüsse. 100 µl XL-1 Blue superkompetente E. coli-Bakterien (R68) wurden vorgelegt und 2 µl DNA hinzupipettiert. Die Mischung wurde 30 min auf Eis stehen gelassen und anschließend in einem 14 ml Rundboden-Reaktionsgefäß (V28) für genau 45 s in 42 °C warmem Wasser erwärmt und danach unverzüglich für 2 min auf Eis gestellt. Je 500 µl der NZY⁺-Lösung (L26) wurden hinzugegeben und der Versuchsansatz 1 h bei 37 °C und 230 rpm im Schüttelinkubator (G38) inkubiert. Zur Ausplattierung der transformierten Bakterien, wurden je 150 µl mittels einer Impföse auf einer Agarplatte ausgestrichen und für ca. 17 h bei 37 °C inkubiert (G11).

Um die transformierte Bakterienkolonie und damit auch die DNA zu vervielfältigen, wurden von jeder beimpften Agarplatte zwei einzelne Bakterienkolonien mittels Finnpipette (G23, 200-1000 µl) gepickt. Anschließend erfolgte zuerst eine Inkubation in 12 ml autoklaviertem LB-Medium (L21) im Schüttelinkubator (G38) bei 37 °C, 200 rpm für 8-9 h, bevor die Lösung in 500 ml autoklaviertes, Ampicillin-haltiges LB-Medium überführt und über Nacht unter obigen Bedingungen im Schüttelinkubator inkubiert wurde. Bei erfolgreicher Vermehrung entstand eine trübe Lösung.

Herstellung von Glycerol-Stocks

Jeder Bakterien-Übernachtskultur wurden 900 µl entnommen und mit 300 µl 60 %-iger Glycerol-Lösung (L11) in einem Einfrierröhrchen (V12) vermischt. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.4.2. Extraktion von Plasmid-DNA aus Escherichia coli-Bakterien

Die Plasmid-DNA-Gewinnung erfolgte mittels Qiagen® Plasmid Maxi Kit (K3). Jede 500 ml Übernachtskultur wurde für 15 min bei 4 °C und 7000 rpm in einem Zentrifugenbehälter (V40) abzentrifugiert (Zentrifuge G7, Rotor: JLA 10.500). Der Überstand wurde abdekantiert und die Pellets mit 10 ml RNase-enthaltendem Puffer resuspendiert, um bakterielle RNA zu zersetzen. Die entstandene Suspension wurde in kleine Zentrifugenröhrchen (V41) überführt und mit 10 ml NaOH-Natriumdodecylsulfat-haltigem Puffer sorgfältig vermischt, so dass es zur Zelllyse und Denaturierung freigelegter DNA kam. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 10 ml gekühlter Kaliumacetat-Puffer zur Beendigung der Denaturierung hinzugegeben. Zur Abtrennung der zirkulären Plasmid-DNA wurden denaturierte Proteine und chromosomale DNA als Einschlussverbindungen mit Kaliumdodecylsulfat für 20 min auf Eis präzipitiert, bevor für 30 min bei 4 °C und 16000 rpm (Zentrifuge G7, Rotor JA 25.5) zentrifugiert wurde. Der entstandene Überstand wurde abdekantiert und erneut bei 4 °C und 16000 rpm für 15 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand auf voräquilibrierte Anionenaustauschersäulen gegeben und die negativ-geladene Plasmid-DNA so an die Säule gebunden. Ebenfalls gebundene Verunreinigungen wurden durch dreimaliges Waschen mit 20 ml Waschpuffer entfernt, bevor die Plasmid-DNA mit 15 ml Elutionspuffer von der Säule in ein PP-Röhrchen (V30) eluiert wurde. Es folgte eine Plasmid-DNA Fällung mit 10,5 ml Isopropanol (R2) und anschließender Zentrifugation für 80 min bei 4 °C und 4300 rpm (Zentrifuge G7, Rotor JS 4.3). Der Überstand wurde erneut abgegossen und das Pellet für 5-10 min luftgetrocknet, bevor es in 600 µl sterilem Tris-EDTA-Puffer (L29) aufgenommen wurde. Nach vorsichtigem Resuspendieren des Pellets erfolgte eine Lagerung bei -20 °C.

2.4.3. DNA-Gehaltsbestimmung

Der Plasmid-DNA-Gehalt wurde photometrisch mittels Absorptionsmessung bestimmt. Dazu wurde die Plasmid-DNA-Lösung im Verhältnis 1:50 mit Aqua pro analysi (R8) gemischt und die Absorption bei 260 sowie 280 nm vermessen (G47). Durch die simultane Messung beider Wellenlängen konnte zusätzlich die Reinheit der DNA-Präparation festgestellt werden. Ein Quotient von 1,8 bis 2,0 zeigte eine reine DNA-Lösung an.

2.4.4. Restriktion von Plasmid-DNA

Zur Gewinnung stabiler Flp-InTMM₁-, Flp-InTMM₃- und Flp-InTMM₄-CHO-Zelllinien mussten die jeweiligen Rezeptor-kodierenden-Sequenzen aus dem pcDNA3.1-Plasmid herausgeschnitten (P1, P2, P3) und in einen pcDNA5 FRT/TO Expressionsvektor (P5) kloniert werden. 10 µg hM₁- oder hM₄-Plasmid-DNA wurden mit 10 Units Restriktionsenzym 1, sowie 10 Units Restriktionsenzym 2 versetzt. Anschließend wurden 5 µl Reaktionspuffer hinzugegeben und ad 40 µl mit Aqua pro analysi versetzt. Für die hM₃-Plasmid-DNA wurde die Restriktion nacheinander in zwei verschiedenen NE-Puffern (R51, R52) durchgeführt, um die jeweils optimalen Pufferbedingungen einzustellen. Beide Ansätze enthielten 10 µg Plasmid-DNA aber nur ein Restriktionsenzym. Nach gelelektrophoretischer Trennung (siehe 2.4.5.) und Aufreinigung sowie DNA-Gehaltsbestimmung (siehe 2.4.3.) wurde eine zweite Restriktion mit dem jeweils anderen Restriktionsenzym durchgeführt. Die Lösungen wurden durchmischt und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung der Enzyme wurden die Lösungen für 20 min auf 60 °C erhitzt (G20).

Substanzen/ Rezeptorsubtyp	Restriktions- enzym I	Restriktions- enzym II	Reaktionspuffer
hM ₁	Hind III (R31)	Xho I (R67)	NE-Puffer 2 (R50)
hM ₃	BamH I (R9)	-	NE-Puffer 3 (R51)
hM ₃	-	Apa I (R6)	NE-Puffer 4 (R52)
hM ₄	Hind III (R31)	Xho I (R67)	NE-Puffer 2 (R50)

Tab. 8: Verwendete Restriktionsenzyme sowie Pufferbedingungen für den Restriktionsverdau des jeweiligen Rezeptorplasmids.

2.4.5. Gelelektrophoretische Auftrennung und Aufreinigung der DNA-Fragmente

Da sich nach erfolgter Restriktion sowohl die erwünschte Rezeptor-DNA als auch die Vektor-DNA noch im Versuchsansatz befanden, musste eine Trennung der Bestandteile sowie eine Aufreinigung der Rezeptor-DNA erfolgen.

Gelelektrophorese

Zur Überprüfung des Restriktionsverdaus und zur Aufreinigung der Fragmente wurde eine agarosegelelektrophoretische Bestimmung vorgenommen. Dazu wurden 0,9 g Agarose (R4) in 150 ml TAE-Puffer (L28) gegeben und in einer Mikrowelle (G30) so lange vorsichtig erhitzt, bis eine klare Lösung entstand. Verdampftes Wasser wurde ergänzt und die Lösung auf 60 °C abgekühlt. Anschließend erfolgte eine Zugabe von 5 µl Ethidiumbromidlösung (R19), so dass eine Endkonzentration von 0,33 µg/ml resultierte. Das Gel wurde blasenfrei in eine Gelladestation mit eingesetztem Kamm gegossen (G39). Die Kammwahl richtete sich nach der gewünschten Taschengröße. Da das gesamte Restriktionsprodukt mittels Gelelektrophorese aufgetrennt werden sollte, wurden Taschen für maximal 40 µl Probe gebildet. Die Probenvorbereitung erfolgte nach unterem Schema.

Substanzen/ Ansatz	Probe	DNA-Ladder (R1)	zehnfach Gelladepuffer (R3)	TAE-Puffer (L28)
DNA- Standard	-	6 µl	8 µl	26 µl
Rezeptor- DNA	16 µl	-	4 µl	-

Tab. 9: Versuchsansätze für die Gelelektrophorese.

Das ausgehärtete Gel wurde in eine Gelkammer (G45) überführt und mit so viel TAE-Puffer (L28) begossen, bis das Gel leicht mit Puffer bedeckt war. Alle Ansätze wurden in Polypropylen-Reaktionsgefäße (V27) pipettiert und durchmischt. Der Zusatz des Gelladepuffers diente zum Einen der Dichteerhöhung der Probe, des Weiteren zur Beobachtung des Probenlaufes, da es aufgrund des Bromphenolblauzusatzes auf der Höhe einer Bande von 500 Basenpaaren mitläuft. Der DNA-Standard wurde in eine mittig liegende Tasche pipettiert, während die Restriktionsproben jeweils in Zweifachbestimmung daneben positioniert wurden. Die Gelelektrophoresekammer wurde verschlossen und eine Spannung von 80 V angelegt, bis $\frac{3}{4}$ des Laufweges erreicht waren.

Gelextraktion

Das Gel wurde mittels UV-Licht auf einem Glasscanner mit Hilfe der zugehörigen Software AlphaDigiDoc™ AD 1000 (G6, G12) untersucht und die identifizierten Banden mittels Skalpell (V35; V36) aus dem Gel geschnitten. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der Rezeptor-DNA mit dem QIAquick Gel Extraction Kit® (K4) unter Befolgung des Handbuchs. Durch Auflösen des Gels und Bindung der DNA an Silicagel-Membranen wurde die DNA von dem Gel getrennt und in Aqua pro analysi (R8) aufgenommen. Es folgte eine photometrische Gehaltsbestimmung (siehe 2.4.4).

2.4.6. Ligation der Rezeptor-DNA mit dem Zielplasmid

Zur Verknüpfung der Rezeptor-DNA mit dem Zielplasmid pcDNA5FRT/TO (P5) wurden die Bestandteile nach unterem Schema in ein Polypropylen-Röhrchen (V27) pipettiert und vermischt. Der Zusatz der T4 DNA-Ligase erfolgte zuletzt, um unerwünschte Ligationen zu reduzieren.

	5 fach Reaktionspuffer	Vektor- DNA	Rezeptor- DNA	Aqua destillata, steril	T4 DNA- Ligase
Volumen bzw. Molarität	4 µl	30 fmol	90 fmol	Ad 19 µl	1 µl

Tab. 10: Versuchsansatz für die Ligation der Rezeptor-DNA mit dem Zielplasmid.

Anschließend wurde für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, da diese dem Temperaturoptimum der Ligase entspricht. Diese wurde im Anschluss durch zehnminütiges Erhitzen auf 65 °C inaktiviert (G20).

2.4.7. Sequenzierung

Zur Überprüfung der Ligation wurde die Plasmid-DNA mittels der Sequenziermethode nach Sanger analysiert. Die Sequenzierung übernahm die Firma Sequence Laboratories Göttingen GmbH. Die Resultate wurden mit der Software ChromasPro ausgewertet.

2.5. Gezielte Mutagenese

Zur Einbringung gezielter Punktmutationen in die Rezeptor-DNA wurden Oligonukleotidprimer (2.1.7.) entwickelt, die an die zugrunde liegende DNA binden, selbst aber die gewünschte veränderte Basenabfolge enthalten. Es wurde das Quick-Change® Site-Directed Mutagenesis Kit (K5) verwendet unter Zuhilfenahme des mitgelieferten Handbuchs. Der Reaktionsansatz setzte sich aus unten aufgeführten Komponenten zusammen.

Substanz	10fach Reaktionspuffer	Plasmid-DNA (5 ng/ml)	Primer A (62,5 ng/ml)	Primer B (62,5 ng/ml)	NTP-Mix (10 mM)	Aqua p.a.	Pfu Turbo® DNA-Polym. (2,5 U/µl)
Volumen	5 µl	2 µl	2 µl	2 µl	1 µl	38 µl	1 µl

Tab. 11: Versuchsansatz zur Durchführung einer Polymerase-Kettenreaktion mit dem Ziel der gezielten Mutagenese. NTP: Nukleotidtriphosphat. Aqua p.a.: Aqua pro analysi (R8), Polym.: Polymerase.

Die Proben wurden vermischt und in einen Thermocycler (G26) platziert. Für die anschließende Polymerase-Kettenreaktion wurde die Probe für 30 s auf 95 °C erhitzt, um die Doppelstränge der Nukleinsäuren aufzubrechen. Danach wurde für 1 min auf 55 °C herunter gekühlt, um die Bindung der Oligonukleotidprimer an die Einzelstränge zu ermöglichen. Bei der darauf folgenden zwölfminütigen Temperaturerhöhung auf 68 °C, welche das Temperaturoptimum der PfuTurbo® DNA Polymerase darstellt, werden die Primer entlang der DNA verlängert. Dieser erste Zyklus wurde zur ausreichenden Verdopplung der DNA zwölfmal durchgeführt und endete mit einem Abkühlen auf 4 °C. Zur Verdauung der unmutierten Matriz-DNA machte man sich die Methylierung bereits in Bakterien transformierter DNA zu Nutze. Dazu wurde zum Reaktionsansatz 1 µl dpn I (10 U/µl) gegeben und nach dem Vermischen und dem Herunterzentrifugieren (3000 rpm, 1 min, Zentrifuge G21) eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C. Zur Überprüfung einer erfolgreichen Mutagenese wurde die DNA mit Hilfe von zuvor synthetisierten Sequenzierungsprimern sequenziert (siehe 2.4.7.) und mit der Software ChromasPro ausgewertet. Alle unter 2.1.7. aufgeführten Primer resultierten in der erwünschten Mutation der entsprechenden Aminosäure.

2.6. Zellbiologisches Arbeiten

In diesem Kapitel wird auf die stabile Transfektion der Rezeptor-Plasmid-DNA in CHO-Zellen sowie die Kultivierung dieser näher eingegangen.

2.6.1. Verwendete Zelllinien

In dieser Arbeit wurde vornehmlich mit Ovarialzellen des chinesischen Seidenhamsters (*Cricetulus griseus*) gearbeitet. Diese Säugetierzelllinie eignet sich besonders zur Untersuchung von Muskarinrezeptoren, da sie weder endogene Muskarinrezeptoren (Eckstein, 2004) noch endogene Cholinesterasen exprimiert (Lazareno und Birdsall 1993). Insofern war mittels stabiler Transfektion eine gezielte Untersuchung eines Muskarinrezeptorsubtyps möglich. Unten aufgeführte Tabelle gibt eine Übersicht über die verwendeten Wirtszelllinien. Einige wenige Experimente wurden mit HEK293-Zellen durchgeführt, bei der es sich um eine humane embryonale Nierenzelllinie („*Human embryonic kidney cell*“) handelt. Diese war insofern interessant, als dass sie endogen Muskarinrezeptoren exprimiert (Sinnecker & Schäfer, 2004).

CHO Flp-InTM	CHO K1 Zellen, stabil mit FRT-Schnittstelle transfiziert
CHO Flp-InTM-hM	Flp-In TM -CHO Zellen, stabil mit humaner Muskarinrezeptor-cDNA bzw. einer cDNA-Rezeptormutante transfiziert
CHO K1	Subklon einer CHO-Zelllinie
CHO-hM	CHO K1-Zellen stabil mit humaner Muskarinrezeptor-cDNA transfiziert
HEK293	Subklon einer HEK293-Zelllinie

Tab. 12: Auflistung der verwendeten Zelllinien.

Die CHO Flp-InTM- sowie HEK293-Zellen wurden uns freundlicherweise von Frau Prof. Dr. E. Kostenis (Pharmazeutische Biologie, Universität Bonn) zur Verfügung gestellt. Die CHO K1-Zellen waren eine freundliche Bereitstellung durch Herrn Dr. M. Eckhardt (Institut für Physiologische Chemie, Universität Bonn). Die CHO-h β_2 -Zelllinie wurde uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. F. Blaes (Universitätsklinikum Gießen, Neurologie) zur Verfügung gestellt.

2.6.2. Zellkultur

Jegliche zellbiologischen Arbeiten wurden unter einer Sterilwerkbank (G29) unter aseptischen Bedingungen durchgeführt. Die Inkubation erfolgte immer in einem Brutschrank (G46) bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂, wenn es nicht explizit erwähnt ist.

Auftauen der Zellen

Benötigte Zelllinien wurden einem Stickstofftank (G44) entnommen und zügig aufgetaut. Entsprechendes Nährmedium wurde in einem Wasserbad (G50) auf 37 °C erwärmt und 15 ml in einer Zellkulturschale (V8) vorgelegt. Die aufgetaute Zelllinie wurde hinzugegeben und für 3 h in einem Inkubator (G46) stehen gelassen. Anschließend wurde mikroskopisch (G8) überprüft, ob die Zellen an der Zellkulturschale angeheftet waren, das Nährmedium zur Entfernung des DMSO vorsichtig abgesaugt und durch 15 ml neues Nährmedium ersetzt. Die Zellen wurden mindestens 48 h inkubiert, bevor sie weiterverwendet wurden.

Kultivierung der Zellen

Da der Zellzyklus der CHO-Zellen lediglich ca. 14 h dauert, mussten die Zellen auf ihre Konfluenz hin mikroskopisch überprüft und bei einer Konfluenz von 80-100 % ausgedünnt werden. Dazu wurde das Nährmedium vorsichtig abgesaugt und jede Zellkulturschale (V8) mit 10 ml PBS-Puffer (L4) gewaschen, um nichthaftende Zellen zu entfernen. Der Puffer wurde ebenfalls abgesaugt, woraufhin eine Zugabe von 3 ml Trypsin-EDTA-Lösung (R66) zur Ablösung der Zellen erfolgte. Nach einer dreiminütigen Inkubation im Brutschrank wurde vorsichtig an den Rand der Zellkulturschale geklopft, um noch haftende Zellen abzulösen. Je nach erwünschtem Ausdünnungsgrad wurden 3 bis 7 ml Nährmedium hinzugegeben und das Volumen auf die benötigte Anzahl Zellkulturschalen, in welche zuvor 15 bis 20 ml Nährmedium vorgelegt worden war, verteilt.

Kryokonservierung der Zellen

Wie zuvor beschrieben, wurde das Nährmedium einer dicht bewachsenen Zellkulturschale (V8) abgesaugt und die Zellen in analoger Weise abgelöst. Die in Nährmedium aufgenommenen Zellen wurden in ein PP-Röhrchen (V29) überführt und abzentrifugiert (Zentrifuge G7, Rotor: JS 4.3, 4 min., 4 °C, 185 g). Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet einer Zellkulturschale in einer Mischung aus 100 µl DMSO (R13) und 900 µl Nährmedium resuspendiert. Die Suspension wurde daraufhin in ein

Einfrierröhrchen (V12) überführt und sofort in einem mit 100 %-igem Isopropanol (R34) gefüllten Einfrierbehältnis (G35) gestellt. Dieser wurde für ca. 24 h bei -80 °C gelagert, um ein langsames Herunterkühlen der Zellsuspension zu gewährleisten. Das Einfrierröhrchen wurde anschließend in einen Stickstofftank (G44) überführt.

2.6.3. Membranpräparation von CHO-Zellen

Zur Durchführung bestimmter Experimente wie dem [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperiment, bei dem der Radioligand nicht membrangängig ist, ist es notwendig, Membransuspensionen herzustellen. Dazu wurde das Nährmedium von 40 dicht bewachsenen Zellkulturschalen (V8) abgesaugt und durch ein 5 mM Natriumbutyrat-haltiges Nährmedium ersetzt. Der Zusatz von Natriumbutyrat (L23) unterbindet zwar die Teilung der Zellen, bewirkt aber eine verstärkte Rezeptorexpression (Kruh, 1982). Nach 18-24 stündiger Inkubation wurde das Natriumbutyrat-haltige Nährmedium nacheinander von je fünf Zellkulturschalen entfernt und jede Zellkulturschale unmittelbar danach mit 2,4 ml eiskaltem Homogenisationspuffer (L13) benetzt. Anschließend erfolgte ein Abschaben der Zellen mittels Zellschaber (V39). Die so erhaltenen Zellsuspensionen wurden in einem Zentrifugenröhrchen (V41) vereint. Die Zellkulturschalen wurden durch Überführen von 6 ml Homogenisationspuffer (L13) gespült, um die Ausbeute an Zellen zu erhöhen. Nach diesem Schema wurde mit allen 40 Platten verfahren und die Membransuspensionen anschließend mittels Homogenisator (G40) zerkleinert. Dazu wurde der Inhalt jedes Zentrifugenröhrchens zuerst bei Stufe 6 für genau 25 s und nach zwischenzeitlicher Lagerung auf Eis für 20 s bei gleicher Stufe behandelt. Es folgte eine Abzentrifugation der Zellbestandteile (Zentrifuge G7, Rotor JA 25.5, 10 min., 2 °C, 40000 g). Danach wurden die Überstände abdekantiert und die Pellets in je 15 ml kaltem Zentrifugationspuffer (L30) resuspendiert. Der Zentrifugations- sowie der Resuspensionsschritt wurde in gleicher Weise wiederholt und im Anschluss ein Pellet in 18 ml Inkubationspuffer (L15) aufgenommen. Das Pellet wurde resuspendiert und die Suspension auf das nächste Pellet überführt, bis alle Pellets homogen in diesen 18 ml des Inkubationspuffers aufgenommen waren. Die gesamte Suspension wurde auf PP-Reaktionsgefäße (V27) zu je 1 ml bzw. 0,5 ml verteilt und bei -80 °C gelagert.

2.6.4. Bestimmung des Proteingehaltes einer Membransuspension

Die Proteinkonzentrationen der in dieser Arbeit untersuchten Membransuspensionen wurden nach der Methode von Lowry et al. (1951) bestimmt. Die Quantifizierung basiert auf zwei aufeinanderfolgenden Reaktionen. Zuerst kommt es in einer Biuretreaktion zur Bildung blau-violetter Komplexe zwischen den Peptidbindungen und den Kupfer(II)-Ionen in alkalischer Lösung. Anschließend werden Cu^{2+} -Ionen zu Cu^+ -Ionen reduziert. Das einwertige Kupfer reduziert wiederum das Folin-Ciocalteus-Reagenz (bestehend aus Molybdän(VI)-Ionen und Wolfram(VI)-Ionen) zu Molybdänblau. Es entsteht eine Blaufärbung der Lösung, die proportional zum Proteingehalt ist.

Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurde eine Kalibriergerade aufgenommen. Dazu wurde am Versuchstag humanes Serumalbumin (R32) eingewogen und zu einer Konzentration von 2 mg/ml in Inkubationspuffer (L15) gelöst. Es wurde eine Kalibrierreihe in Doppelbestimmung hergestellt, die den Bereich von 0 mg/ml bis 2 mg/ml Proteingehalt abdeckte. Die zu untersuchenden Membranhomogenate wurden ausgefroren und in Zweifachbestimmung 1:8, 1:4, 1:2 mit Inkubationspuffer (L15) verdünnt. Zusätzlich wurde unverdünntes Membranhomogenat eingesetzt. Nach der Herstellung der unten aufgeführten Stammlösungen wurde aus diesen in der angegebenen Reihenfolge eine Arbeitslösung angesetzt.

	Stammlösungen	Konzentration	Lösungsmittel	Arbeitslösung
1.	Na_2CO_3 (R46)	20 g/l	0,1 N NaOH (R48)	100 Teile
2.	$\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ (R36)	20 g/l	Aqua dest. (R7)	1 Teil
3.	CuSO_4 (R37)	10 g/l	Aqua dest. (R7)	1 Teil

Tab. 13: Protokoll zur Herstellung der Stammlösungen sowie der daraus anzusetzenden Arbeitslösung für die Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951).

Je 200 μl aufbereitete Probe wurden in ein Reagenzglas überführt und 2,0 ml der Arbeitslösung hinzugegeben. Es folgte eine zehnmünütige Inkubation, bevor unter Schütteln 200 μl einer Folin-Ciocalteus-Verdünnung (L7) hinzugegeben wurden. Der Ansatz wurde unter Lichtausschluss für 30 min inkubiert und die Absorption anschließend bei 500 nm vermessen (G47). Mit Hilfe der Software Microsoft Excel[®] konnte eine Kalibriergerade erstellt werden, anhand derer der Proteingehalt errechnet wurde.

2.7. Stabile Transfektion

Unter einer Transfektion versteht man das Einbringen von DNA in Eukaryoten. In dieser Arbeit wurde zirkuläre Plasmid-DNA in CHO-Zellen transfiziert, um eine Expression des Rezeptorproteins an der Zelloberfläche zu erreichen. Man unterscheidet zwischen transienter und stabiler Transfektion.

Während bei einer transienten Transfektion die Plasmid-DNA nicht in das Genom eingebaut wird, kommt es bei einer stabilen Transfektion zu einem Einbau in das Genom der Wirtszelle. Dadurch wird zumeist eine lebenslange Expression des eingebrachten Rezeptors durch die transfizierten Zellen erreicht. Somit stellt die stabile Transfektion eine optimale Methode dar, um Rezeptoren an der Oberfläche von Membranen auch in lebenden Zellen dauerhaft zu untersuchen. In dieser Arbeit wurde das Flp-InTM-Transfektionssystem verwendet, um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass die DNA in das Genom der Wirtszelle eingebaut wird.

Hintergrund des Flp-InTM-Transfektionssystems:

Das Flp-InTM-Transfektionssystem besteht aus drei verschiedenen Vektoren. Einem pFRT/lacZeocin-Vektor, der zur Generierung der Wirtszelllinie diente, die uns freundlicherweise von Frau Prof. Dr. E. Kostenis (Pharmazeutische Biologie, Universität Bonn) zur Verfügung gestellt wurde. Dieser verfügt über eine FRT-Schnittstelle (FRT = Flp Recombination Target, ursprünglich aus *Saccharomyces cerevisiae* isoliert) an die die Rekombinase binden kann. Außerdem enthält der Vektor ein lacZ-ZeocinTM Gen, welches über einen SV40 Promotor gesteuert wird (Simian-Virus 40) und der Selektionierung der Wirtszelllinie dient. Der Einbau dieses Vektors in das Genom geschieht zufällig. Mit dem zweiten Vektor (pOG44-Plasmid) wird unter der Kontrolle eines CMV-Promotors (Cytomegalie-Virus) konstitutiv für die Rekombinase kodiert. Außerdem enthält das Flp-InTM-Transfektionssystem das Expressionsplasmid pcDNA5/FRT, an dessen FRT-Bereich die Rekombinase ebenfalls binden kann. Dieser Vektor besitzt neben seinem CMV-Promotor ein Hygromycin-Resistenzgen, über welches nach erfolgreicher Transfektion die Selektionierung erfolgen kann.

Prinzip der stabilen Transfektion mittels Flp-InTM-System: Bei einer Cotransfektion der Vektoren in die Wirtszelllinie führt die konstitutive Aktivität des pOG44-Plasmids zur Expression der Flp-Rekombinase. Diese führt durch Bindung an die FRT-Schnittstellen zu einer homologen Rekombination, wodurch das interessierende pcDNA5/FRT-Konstrukt in das Wirtszellgenom eingebaut wird. Durch die Rekombination wird der SV40-Promoter und das ATG-Startcodon in räumliche Nähe des für Hygromycin B

angelegten Gens gebracht. Gleichzeitig kommt es zur Inaktivierung des lacZ-Zeocin-Gens und somit zum Verlust der Zeocin-Resistenz. Die Selektionierung der auf diese Art stabil transfizierten Zellen erfolgte über die Hygromycin B-Resistenz. Dabei handelt es sich um ein Aminoglykosid-Antibiotikum, welches während der Proteinbiosynthese zur Anlagerung falscher tRNA-Aminosäurekomplexe und somit zur Bildung falscher Proteine führt. Hygromycin B wirkt vor allem auf sich teilende Zellen, da diese eine erhöhte Proteinbiosynthese aufweisen, weshalb die Zellkonfluenz unter 25 % liegen sollte.

Der praktische Verlauf der stabilen Transfektion erfolgte nach dem Handbuch des Flp-In™-Systems (Version C). Die cDNA des hM₄-Rezeptors konnte mit dem Transfektionsreagenz PolyFect® (R57) erfolgreich transfiziert werden. Das hM₃-Rezeptor-Plasmid konnte erst mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine™2000 (R39) erfolgreich transfiziert werden. Beide Vorgehensweisen werden untenstehend erläutert.

Transfektion mit dem Transfektionsreagenz Polyfect® (R57):

Dazu wurden am Vortag $1,6 \cdot 10^6$ Zellen auf eine Zellkulturschale (V9) in 7 ml Nährmedium (L22.1) ausplattiert, so dass am nächsten Tag eine Zellkonfluenz von 40-80 % resultierte. Nach 24 h erfolgte die Cotransfektion des pOG44-Plasmids (P4) und des pcDNA5/FRT-Plasmids im Verhältnis 9:1 in die Flp-In™-Wirtszelllinie. Dabei wurde die DNA-Menge so eingestellt, dass der Gesamt-DNA-Gehalt 6 µg betrug. Die DNA wurde mit dem entsprechenden Volumen Nährmedium, ohne fetales Kälberserum (FKS) und Antibiotika, vermischt und kurz herunterzentrifugiert (G37). Anschließend wurden 30 µl Polyfect®-Transfektionsreagenz (R57) hinzugegeben und für 10 s vermischt. Die Probe wurde 5-10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Unterdessen wurde von den zu transfizierenden Zellen das Medium abgesaugt, mit 10 ml PBS-Puffer (L4) gewaschen und 7 ml neues Nährmedium (mit FKS und Antibiotikum) hinzugegeben. Der inkubierte Ansatz wurde mit 1 ml Nährmedium (L22.1) vermischt und auf die Zellkulturschale gegeben. Nach 24 h wurde das Nährmedium gewechselt und nach unten aufgeführtem Schema weiter vorgegangen.

Transfektion mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine™ 2000 (R39):

Es wurde nach Lipofectamine™ 2000-Handbuch (Stand: 11. Juli 2006) vorgegangen. Dazu wurden die Zellen wie unter 2.6.2 beschrieben abgelöst, gezählt und zur Austestung der optimalen Zellkonzentration 500 µl Zellsuspension in den Konzentrationen 1×10^5 , 2×10^5 , 4×10^5 Zellen pro ml in Nährmedium ohne Antibiotikum in Zellkulturschalen (V10) ausgesät und die beste Konfluenz (90-95 % Konfluenz) am nächsten Tag ausgewählt. 4 µg Gesamt-DNA wurden mit Nährmedium ohne FKS und

Antibiotikum vermischt (L22.1). Parallel wurden ebenfalls 240 µl Medium (L22.1 ohne Zusatz von Antibiotika und FKS) mit 10 µl Lipofectamine™ 2000 für 5 min inkubiert. Danach wurden beide Inkubationsansätze vereint und erneut für 20 min bei Raumtemperatur belassen, bevor der Inkubationsansatz zu den Zellen gegeben wurde. Nach 5-6-stündiger Inkubation fand wiederum ein Mediumwechsel (L22.1) statt.

Unabhängig davon, welches Transfektionsreagenz verwendet wurde, erfolgte 48 h nach der Transfektion ein Ausdünnen der Zellen im Verhältnis 1:10 oder höher, so dass eine Konfluenz von unter 25 % erreicht wurde. Nach Anhaftung der Zellen an der Oberfläche der Zellkulturschale wurde das Nährmedium erneut entfernt und durch 600 µg/ml Hygromycin B-haltiges Nährmedium (L22.2) ersetzt. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage unter dem Mikroskop (G8) betrachtet und ggf. ausgedünnt. Bei der stabilen Transfektion entstanden polyklonale Zelllinien, die aus mehreren transfizierten Zellklonen bestanden. Mit Hilfe dieser Methode konnte die stabil exprimierende Flp-In™-M₄-CHO-Zelllinie sowie dessen Rezeptormutante Flp-In™M₄⁴³⁵Trp→Ala hergestellt werden. Außerdem wurde der Flp-In™M₃-Wildtyp sowie die Rezeptormutante M₃⁵²⁶Trp→Ala stabil transfiziert. Letztgenannte Zelllinie wird in der Dissertation von Frau Lena Vogel (Abteilung Pharmakologie & Toxikologie, Universität Bonn) näher charakterisiert.

2.7.1. Einzelzellklonierung

Obwohl die stabile Transfektion des hM₃-Rezeptor-Plasmids mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine™2000 erfolgreich verlaufen war, nahm die Expression des Rezeptorproteins mit steigender Passage ab, bis nach ca. 14 Passagen keine Rezeptorexpression mehr messbar war. Eine solche Abnahme der M₃-Rezeptorexpression durch Passagierung wurde bereits von anderen Arbeitskreisen beobachtet (Widdop et al., 1993; Gosens et al. 2003). Da es sich bei den mittels Flp-In™-System transfizierten Zellen um polyklonale Zelllinien handelt, bestand die Möglichkeit, einen Zellklon auszumachen, der den muskarinischen M₃-Rezeptor permanent exprimiert. Aufgrund dessen erfolgte eine Einzelzellklonierung.

Dazu wurden die Zellen, wie unter 2.6.2 beschrieben, abgelöst und gezählt (G36). Die Zellsuspension wurde so verdünnt, dass theoretisch je eine Zelle auf 200 µl Hygromycin B-haltiges Nährmedium kam. In eine 96-Kavitäten-enthaltene Zellkulturschale (V38) wurden 100 µl Zellsuspension ausplattiert und ad 200 µl mit Nährmedium aufgefüllt. Nach 2-3 Stunden wurde mikroskopisch (G8) jede Kavität markiert, die nur eine Zelle enthielt. Diese wurde im Folgenden alle 2-3 Tage mit frischem

Nährmedium versorgt und immer wieder ausgedünnt. Durch dieses Verfahren wurden drei Einzelzellklone generiert, die den Rezeptor messbar exprimierten. Durch wiederholtes Vermessen konnte ein Zellklon ermittelt werden, der den hM₃-Rezeptor dauerhaft exprimierte.

2.8. Methoden

In diesem Kapitel sind alle zur Erhebung der Ergebnisse eingesetzten Methoden aufgeführt. Zu jeder Methode wird der theoretische Hintergrund und die Versuchsdurchführung beschrieben sowie die Auswertung erläutert.

2.8.1. Messung der dynamischen Massenumverteilung (DMR)

Die dynamische Massenumverteilung (DMR: „*dynamic mass redistribution*“) wurde in vorliegender Arbeit mittels Epic[®]-Biosensor (G18) vermessen. Die für diese Arbeit genutzte beta-Version des Biosensors besteht aus einer vorgelagerten Temperiereinheit sowie der Messstation, in welcher die Messplatten 2 h vor dem Versuch bei 28°C gelagert wurden. Außerdem ist ein automatischer Pipettierroboter eingebaut, der vor jedem Versuch mit neuen Spitzen (V13) bestückt wurde und der Substanzzugabe diente. Für jegliche Messungen der DMR wurde der Epic[®]-Biosensor im Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. E. Kostenis in der Pharmazeutischen Biologie der Universität Bonn genutzt.

Theoretische Grundlagen

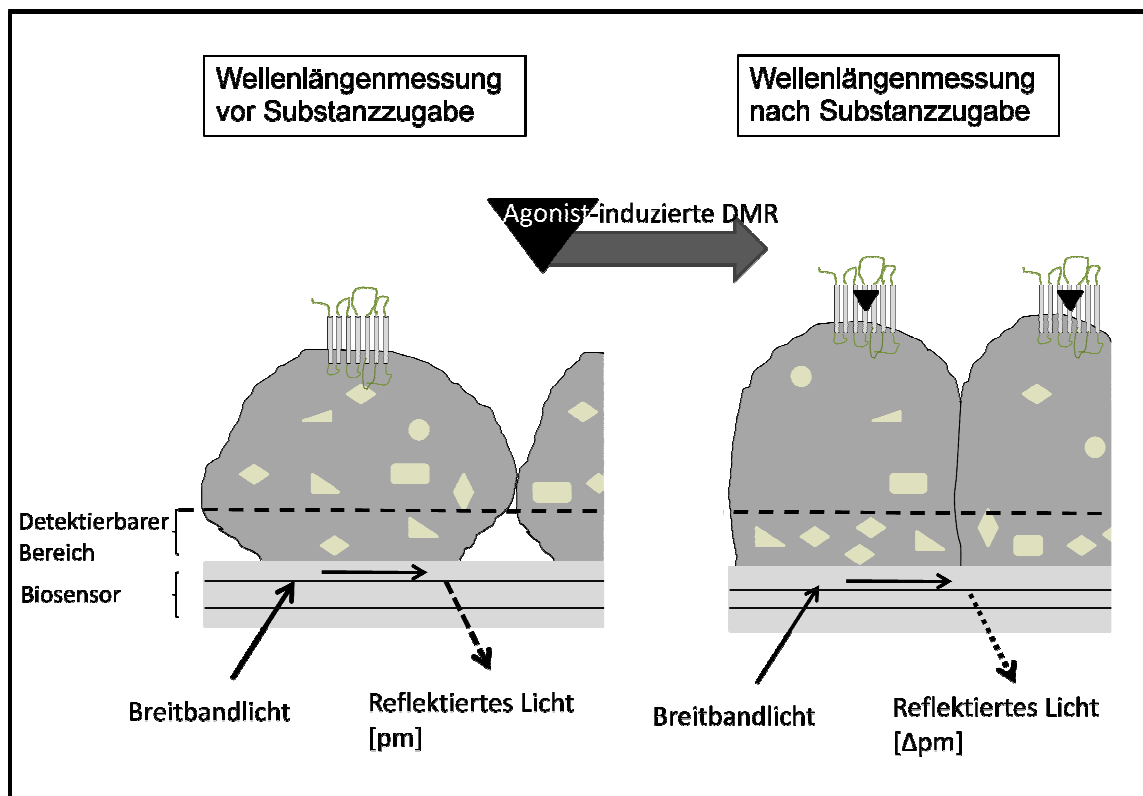


Abb. 5: Schematische Darstellung der Messung der dynamischen Massenumverteilung mittels Epic[®]-Biosensor. Links: Messbedingungen während der Messung der Ausgangswellenlänge (vor Substanzzugabe). Rechts: Mögliche Messbedingungen nach Testsubstanzzugabe (schwarzes Dreieck). Modifiziert nach Kebig et al. (2009).

Die Messung beruht auf der Anregung eines unter jeder Messplatte integrierten Biosensors. Dieser besteht aus einer Glasplatte mit integrierter Gitternetzstruktur (RWG: „*Resonant waveguide grating*“) und Nb₂O₅-Beschichtung. 16 parallelgeschaltete Lichtkanäle strahlen Breitbandlicht auf je einen 100 µm Durchmesser großen Bereich pro Kavität. Licht bestimmter Wellenlänge wird ausgewählt und entlang des Biosensors weitergeleitet (Fang, 2007). Je nach optischer Dichte unmittelbar oberhalb des Biosensors (ca. 150 nm) kommt es zur Reflektion von Licht einer bestimmten Wellenlänge. Da sich in vorliegender Arbeit oberhalb des Biosensors Zellen befinden, ist die reflektierte Wellenlänge ein Maß für die sich in diesem Bereich befindenden Zellbestandteile. Vor Substanzzugabe erfolgt eine Messung der Ausgangswellenlänge. Die bei dieser Messung reflektierte Wellenlänge (in pm) wird vom Epic[®]-Messgerät auf 0 pm festgesetzt. Nach Substanzzugabe erfolgt ungefähr alle 30 s eine Messung, deren Messwert in Bezug auf die Ausgangswellenlänge als Δpm angegeben wird. Eine Erhöhung der optischen Dichte im Messbereich führt zu einem positiv gerichteten Signal, während eine Verringerung der optischen Dichte im Messbereich zu einem negativ gerichteten Signal führt (Lee et al., 2008). Generell sind sowohl Endpunktmessungen als auch kinetische Untersuchungen möglich, da die Testplatte alle 30 s über einen individuell festgelegten Zeitraum vermessen wird. Auf diese Weise können potentielle Liganden an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Schröder et al. 2010) sowie Ligand-gesteuerten Ionenkanälen (Randle und Goa, 2010; Homepage Corning Inc., NY) untersucht werden. Des Weiteren sind biochemische Testungen unter Verwendung einer modifizierten Biosensorplatte, die in jeder Kavität einen Referenzbereich besitzt, um schon kleine Signale mit hoher Genauigkeit messen zu können, möglich. Neben zahlreichen weiteren Anwendungsmöglichkeiten soll noch die Anwendbarkeit zur Messung von Substanzaggregation (Wang et al., 2010; Homepage Corning Inc., NY) Erwähnung finden.

Versuchsdurchführung

Am Vortag der Messung wurden die Zellen wie unter 2.6.2. beschrieben abgelöst, in einem PP-Röhrchen (V29) aufgenommen und abzentrifugiert (Zentrifuge G7, Rotor JS 4.3, 4 min, 4 °C, 185 g). Der Überstand wurde abgeseugt und mit Nährmedium aufgefüllt. Anschließend wurde die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer (G36) bestimmt. Die Zellen wurden danach so verdünnt, dass sich 12500 Zellen in einer Kavität (V14) befanden bzw. in 40 µl vorlagen. Bei Verwendung von Pertussistoxin (PTX) oder Cholera toxin (CTX) wurden gleiche Zellzahlen pro Kavität in 30 µl ausgesät und 10 µl PTX- oder CTX-Verdünnung hinzugegeben. Da mit Hilfe dieser Verfahrensweise teilweise keine 100 %ige Konfluenz resultierte, wurde das Protokoll dahingehend

verändert, dass erst 6 h nach Ausplattierung der Zellen 10 µl PTX- oder CTX-Verdünnung bzw. Nährmedium hinzugegeben wurden. Um sicherzustellen, dass sich keine Luftblasen in den Kavitäten befanden, wurde die Epic[®]-Platte zentrifugiert (G7; Rotor JA 25.50, 500 rpm, 1 min, RT). Die Testplatte wurde daraufhin über Nacht (G46) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach mikroskopischer Überprüfung der Zelldichte und Morphologie (G8) wurde das Nährmedium in den ersten Experimenten durch vorsichtiges Ausschlagen der Epic[®]-Platte entfernt. Von der Feinmechanischen Werkstatt der Universität Bonn konnte für weitere Experimente eine 16-fach Absaugvorrichtung (G3) angefertigt werden. Diese ermöglichte das gleichzeitige Entfernen von Volumen aus 16 Kavitäten, bei der ein Restvolumen von 10 µl zurückblieb. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig mit 50 µl auf 37 °C vorgewärmten Epic[®]-Messpuffer (L6) gewaschen. Diese Prozedur wurde wiederholt und der Puffer ebenfalls abgesaugt. Mit einer Pipette (G23, 1-10 µl) wurde überprüft, wie viel Puffer sich noch in drei Kavitäten befand und alle Kavitäten wurden daraufhin auf 30 µl mit Puffer aufgefüllt (G25). Alle zu untersuchenden Substanzen wurden zu 20 µl in eine 384-Kavitätenplatte (V2) pipettiert. Test- und Substanzplatte wurden anschließend für 2 h bei 28 °C in der Detektereinheit der Epic[®]-Messapparatur (G18) auf die erwünschte Temperatur gebracht. Dieses Verfahren schließt Temperaturschwankungen und somit veränderte Zellaktivitäten aus und minimiert zudem mechanische Einflüsse auf die Platten. Vor der Substanzzugabe erfolgte eine ca. 300 s andauernde Messung der Ausgangswellenlänge. Nach Substanzzugabe wurde die Testplatte für mindestens 60 min vermessen. Alle Messungen am Epic[®]-Biosensor konnten dankenswerterweise in der Pharmazeutischen Biologie der Universität Bonn in den Räumlichkeiten und an den Geräten der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. E. Kostenis durchgeführt werden. Vor dem Einsatz von Liganden am Rezeptor wurde diejenige Ligandkonzentration ermittelt, bei der unspezifische, nicht Rezeptor-vermittelte dynamische Massenumverteilung auftrat. Dazu wurden untransfizierte Flp-In[™]CHO-Zellen verwendet und durch Austestung unterschiedlicher Ligand-Konzentrationen die maximal mögliche, noch spezifisch wirkende Konzentration ermittelt (siehe 8.2.1.). Alle in dieser Arbeit eingesetzten muskarinischen Liganden konnten in Konzentrationen von 100 µM problemlos eingesetzt werden (siehe dazu 8.2.1.). An jedem Versuchstag wurde der direkte Adenylylcyclase-Aktivator Forskolin [10 µM] sowie der inverse Agonist Atropin [10 µM] in supramaximaler Konzentration mitgeführt. Während Forskolin als Rezeptor-unabhängige Kontrolle mitgeführt wurde, diente Atropin der Detektion der konstitutiven Rezeptor-Aktivität.

Auswertung

Die Daten konnten mit dem Microsoft Excel[®] Makro „Microplate Analyzer v2.0“ der Firma Corning geöffnet werden. Anschließend wurden sie in das Programm GraphPad Prism[®] kopiert und dort analysiert. In dieser Arbeit werden Basislinien-korrigierte Originalsignaturen eines Messverlaufes als repräsentatives Ergebnis gezeigt, da eine Zusammenfassung von Originalsignaturen aufgrund der schwankenden Signalhöhe nicht sinnvoll erschien. Zur Erhebung von Konzentrations-Effekt-Kurven wurden unterschiedliche Messzeitpunkte untersucht, die jeweils im Ergebnisteil aufgeführt sind. Anschließend wurden die Daten mittels „Vier-Parameter-logistischer Gleichung“ (Gl. 6) ausgewertet. Es erfolgte eine Normierung auf das obere und untere Plateau der jeweiligen Konzentrations-Effekt-Kurve sowie die Zusammenfassung der Mittelwerte. Anschließend wurden die Mittelwerte erneut mittels „Vier-Parameter-logistischer Gleichung“ (Gl. 6) analysiert. Für jede Kurve erfolgte eine Testung, ob sich der Hill-Koeffizient und somit die Steilheit der Konzentrations-Effekt-Kurve signifikant von $n_H = 1$ unterschied. Maximale intrinsische Aktivitäten wurden separat bestimmt. Dazu wurde die durch Acetylcholin [100 μ M]-induzierte maximale Wellenlängenverschiebung eines Versuchstages auf 100 % festgesetzt.

2.8.2. Radioligandbindungsuntersuchungen

Bei den angewandten Radioligandbindungsuntersuchungen kommt es zur Interaktion von Ligand [L] und Rezeptor [R]. Diese Bindung aneinander ist reversibel und unterliegt dem Massenwirkungsgesetz.



[RL]: Radioligandkomplex

k_{+1} : Assoziationsgeschwindigkeitskonstante

k_{-1} : Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante

Somit gelten für die Assoziationsgeschwindigkeit v_{Ass} sowie für die Dissoziationsgeschwindigkeit v_{Diss} folgende Aussagen:

$$v_{\text{Ass}} = [R] \cdot [L] \cdot k_{+1} \quad (\text{Gleichung 2})$$

$$v_{\text{Diss}} = [RL] \cdot k_{-1} \quad (\text{Gleichung 3})$$

Bei Vorliegen eines Gleichgewichtes, gilt $v_{\text{Ass}} = v_{\text{Diss}}$ und folglich:

$$[R] \cdot [L] \cdot k_{+1} = [RL] \cdot k_{-1} \quad (\text{Gleichung 4})$$

Durch Zusammenfassen der Geschwindigkeitskonstanten k_{+1} und k_{-1} ergibt sich die Gleichgewichts-Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante K_D sowie die Gleichgewichts-Assoziationsgeschwindigkeitskonstante K_A .

$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{[R] \cdot [L]}{[RL]} = \frac{1}{K_A} \quad \left[\frac{\text{mol}}{\text{l}} \right] \quad (\text{Gleichung 5})$$

K_D stellt die Ligand-Konzentration dar, bei der die Hälfte der Rezeptoren mit Ligand besetzt sind, und dient somit als Parameter der Affinität eines Liganden an eine Rezeptorpopulation. Die Angabe erfolgt zumeist als negativer dekadischer Logarithmus ($\text{p}K_D$), wobei gilt: Je größer der $\text{p}K_D$ -Wert, desto größer die Affinität des Liganden zu der Rezeptorpopulation.

2.8.2.1. Homologe Konkurrenzexperimente

Vor der Weiterverwendung eines Zellhomogenates wurde ein homologes Konkurrenzexperiment durchgeführt. Ziel dieses Experimentes war die Charakterisierung des Homogenates hinsichtlich der Affinität (K_D) des Radioantagonisten [^3H]N-Methylscopolamin ([^3H]NMS) zu der Rezeptorpopulation sowie die Bestimmung der Konzentration der Ligandbindungsstellen (B_{max}).

Theoretische Grundlagen

Bei einem homologen Konkurrenzexperiment sind Radioligand und Kompetitor strukturidentisch. In vorliegender Arbeit wurde dazu tritiiertes und unmarkiertes N-Methylscopolamin eingesetzt. Während der Radioantagonist in gleich bleibender Konzentration zugesetzt wird, führen steigende Konzentrationen des unmarkierten Liganden zur verstärkten Besetzung der Rezeptorbindungsstelle. Die Auswertung erfolgte mittels „Vier-Parameter-logistischer Gleichung“ nach Barlow und Blake (1989). Hierfür wird die gemessene Radioaktivität (B_{ges}), als Maß der Radioligand-Rezeptorinteraktion, gegen die logarithmische Konzentration des Kompetitors aufgetragen. Es ergibt sich eine sigmoidale Kurve.

$$B_{\text{ges}} = \text{Bottom} + \frac{\text{Top} - \text{Bottom}}{1 + 10^{(\log \text{IC}_{50} - \log [x]) \cdot n_H}} \quad (\text{Gleichung 6})$$

B_{ges} : gebundene Radioaktivität

Bottom: unteres Kurvenplateau

Top: oberes Kurvenplateau

IC_{50} : Konzentration des Kompetitors, bei der 50 % des Radioliganden „verdrängt“ wurden

[x]: Konzentration des Kompetitors

n_H : Kurvensteilheit, Hill-Koeffizient

Das obere Kurvenplateau („Top“) entspricht der Radioligandbindung in Abwesenheit des Kompetitors, während das untere Kurvenplateau („Bottom“) den Anteil an unspezifisch gebundener Radioaktivität angibt und in dieser Arbeit mit Hilfe des muskarinischen Antagonisten Atropin in einer Konzentration von 30 μM bestimmt wurde. Der nach Hill benannte Koeffizient n_H gibt die Steilheit der Konzentrations-Effekt-Kurve wieder. Ein Hill-Koeffizient von 1 bzw. -1 zeigt eine Rezeptor-Ligand-Interaktion im Verhältnis 1:1 auf.

Um die Beziehung zwischen dem IC_{50} -Wert und der Affinität des Kompetitors (K_i) zur Rezeptorpopulation wiederzugeben, entwickelten Cheng & Prusoff (1973) eine Gleichung, die die beiden Werte zueinander ins Verhältnis setzt.

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L]}{K_D}} \quad (\text{Gleichung 7})$$

$[L]$ = Konzentration des Radioliganden

K_D = Gleichgewichts-Dissoziationskonstante der Radioligandbindung

Da bei der homologen Kompetition Radioligand und Kompetitor strukturidentisch sind, besitzen sie folglich auch die gleiche Affinität zum Rezeptor. Dadurch vereinfacht sich die Gleichung nach Cheng & Prusoff zu folgender Gleichung.

$$K_D = K_i = IC_{50} - [L] \quad (\text{Gleichung 8})$$

Nach De Blasi et al. (1989) kann aus der Kompetitorkonzentration im Wendepunkt (IC_{50}) und der Radioligandkonzentration $[L]$ sowie der spezifischen Bindung des Radioliganden (B_0) zusätzlich die Anzahl an Bindungsstellen (maximale spezifische Bindung, B_{max}) berechnet werden.

$$B_{max} = \frac{B_0 \cdot IC_{50}}{[L]} \quad (\text{Gleichung 9})$$

Diese wird als Konzentration in der Einheit $[fmol/ml]$ oder bezogen auf die Proteinkonzentration des Homogenates in $[fmol/mg]$ angegeben.

Versuchsdurchführung

Am Versuchstag wurden die Substanzen nach unten aufgeführtem Pipettierschema in eine 96-Kavitätenplatte (V1) einpipettiert.

Komponente	Gesamt- bindung	Unspez. Bindung	Homologe Kompetition	Eingesetzte Konz.	Endkonz.
Aqua dest.	50	-	-		
Atropin (in Aqua dest.)	-	50	-	30 µM	3 µM
NMS- Verdünnung (in Aqua dest.)	-	-	50	$1 \cdot 10^{-x}$ M $3 \cdot 10^{-x}$ M	$1 \cdot 10^{-x+1}$ M $3 \cdot 10^{-x+1}$ M
Membran- suspension (in Puffer L15)	50	50	50	ca. 125 µg/ml (Membran- protein)	ca. 25 µg/ml (Membran- protein)
GDP (in Puffer L15)	50	50	50	100 µM	10 µM
HEPES-Puffer (L15)	300	300	300	12,5 mM	10 mM
[³ H]NMS (in Puffer L15)	50	50	50	2 nM	0,2 nM
Gesamt- volumen	500	500	500		

Tab. 14: Pipettierschema zur Durchführung eines „[³H]NMS/NMS-Homologen Kompetitionsexperimentes“ sowie die resultierenden Endkonzentrationen im Versuchsansatz. Alle Angaben sind in Mikrolitern zu verstehen, wenn nicht explizit aufgeführt. Unspez.: Unspezifische Bindung. Konz.: Konzentration.

Die in Aqua destillata gelösten Substanzen wurden als Erstes einpipettiert. Anschließend folgte die Zugabe der Membransuspension in einer Endkonzentration der Rezeptoren, die nicht mehr als 10 % des im Ansatz befindlichen Radioliganden wegbindet, da sonst die Konzentration des freien Liganden nicht mit der Konzentration der eingesetzten Gesamtkonzentration gleich gesetzt werden darf. Der Zusatz von Guanosindiphosphat (GDP) sowie die Wahl der Pufferbedingungen orientierten sich an den [³⁵S]GTPγS-Experimenten (siehe 2.8.2.2.), um eine bessere Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten. Als letztes folgte die Radioligandzugabe, mit der der Versuch startete. Zur Gleichgewichtseinstellung wurde der Versuchsansatz 2 h in einem Schüttelwasserbad bei 30 °C inkubiert (Dissertation Straßmann, 2007). Der Versuchsansatz wurde in Glasfasermatten (V31), welche 5 min mit 0,1 %iger Polyethyleniminlösung (L27) gesättigt wurden, abgesaugt. Das Polyethylenimin ist durch Bindung an die Oberfläche der Glasfasermatte in der Lage, die unspezifische Bindung zu senken und somit das Messfenster zu erweitern. Der weitere Versuchsablauf ist unter 2.8.2.2. beschrieben.

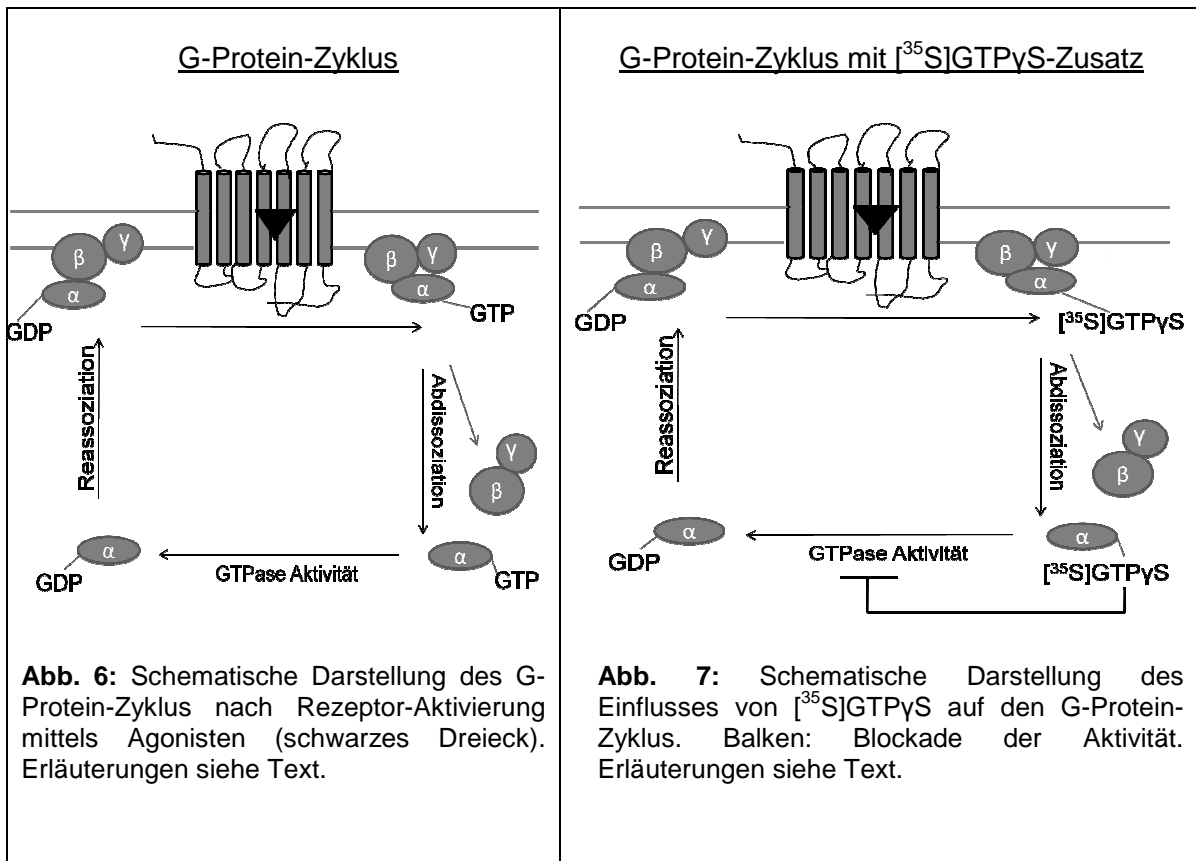
Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software GraphPad Prism®. Zur Berechnung der spezifischen Bindung des Radioliganden wurde an jedem Versuchstag die in Gegenwart eines Überschusses von Atropin gemessene unspezifische Bindung subtrahiert. Anschließend wurde mittels „Vier-Parameter-logistischer Gleichung“ (Gleichung 6) eine sigmoidale Kurve angepasst und auf das obere und untere Plateau der Konzentrations-Bindungs-Kurve des jeweiligen Versuchstages normiert. Jede Kurvensteilheit wurde mittels F-Test auf eine von $n_H = -1$ abweichenden Hill-Koeffizienten getestet. Nach der Zusammenführung der Mittelwerte der Einzelversuche erfolgte eine erneute Analyse mittels „Vier-Parameter-logistischer Gleichung“ (Gl. 6) und eine erneute Überprüfung der Kurvensteilheit.

2.8.2.2. Messung der [³⁵S]GTPγS-Bindung

Bei der Messung der [³⁵S]GTPγS-Bindung handelt es sich um eine funktionelle Messmethode, bei welcher der erste Schritt nach der Rezeptoraktivierung untersucht wird.

Theoretische Grundlagen



Bei Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors kommt es zum Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) gegen Guanosintriphosphat (GTP) an der α-Untereinheit des G-Proteins. Dadurch ändert sich die Konformation des G-Proteins und die α-Untereinheit dissoziiert von der βγ-Untereinheit ab. Beide G-Proteinfragmente können nun Signaltransduktionswege aktivieren. Durch die intrinsische GTPase-Aktivität der α-Untereinheit ist diese in der Lage GTP in GDP zu spalten. In Folge dessen reassoziert sie mit einem βγ-Fragment, was eine Terminierung des G-Proteinzyklus bedeutet, aber eine erneute Aktivierung ermöglicht (Abb. 6). Bei [³⁵S]GTPγS handelt es sich um ein Derivat des Guanosintriphosphates, bei dem am γ-ständigen Phosphatrest ein Sauerstoffatom gegen ein Schwefelatom ausgetauscht ist. Dieses Schwefelatom stellt einen radioaktiven β-Strahler dar, dessen Radioaktivität bei der Vermessung aktivierter G-Proteine genutzt werden kann. Darüberhinaus ist dieses GTP-Derivat aufgrund des Austausches des γ-ständigen Sauerstoffatoms gegen ein Schwefelatom gegenüber der

intrinsischen GTPase-Aktivität der α -Untereinheit hydrolysestabil. [^{35}S]GTP γ S ist nicht membrangängig, weshalb Untersuchungen mit Membransuspensionen erfolgen müssen. Wird nun in hohen Konzentrationen [^{35}S]GTP γ S zu einem Homogenat gegeben, kommt es bei Aktivierung des G-Protein-gekoppelten Rezeptors auch zu einem Austausch von GDP gegen [^{35}S]GTP γ S an der α -Untereinheit des G-Proteins. Die α -Untereinheit verbleibt in Folge dessen in ihrer aktivierten Form und akkumuliert in der Membran, wo sie aufgrund der radioaktiven Markierung vermessen werden kann (Abb.7). Die Messung der [^{35}S]GTP γ S-Bindung misst somit den ersten Schritt in der Signalkaskade nach der Rezeptoraktivierung. Mit dieser Methode lassen sich einerseits intrinsische Aktivitäten von Testsubstanzen und andererseits auch deren Wirksamkeiten bestimmen. Theoretisch sind mit dieser Methode jegliche G-Protein-gekoppelten Rezeptoren messbar. Aufgrund eines großen Messfensters und einer niedrigen basalen Bindung ist die Methode jedoch besonders zur Untersuchung präferenziell $\text{G}\alpha_i$ -gekoppelter Rezeptoren geeignet (Milligan, 2003), was auf die in dieser Arbeit untersuchten muskarinischen M_2 - und M_4 -Rezeptorsubtypen zutrifft.

Versuchsdurchführung:

Alle [^{35}S]GTP γ S-Bindungsexperimente wurden nach folgendem Pipettierschema angesetzt.

	Basale Bindung	Inverser Agonist	Orthoster/ Alloster	Eingesetzte Konzentration	Endkonzentration
Aqua pro analysi	100	50	50		
Atropin (in Aqua p.a.)	-	50	-	30 μM	3 μM
Testsubstanz (in Aqua p.a.)	-	-	50	$1 \cdot 10^{-x}$ $3 \cdot 10^{-x}$	$1 \cdot 10^{-x+1}$ $3 \cdot 10^{-x+1}$
Membran (in Puffer L15)	50	50	50	400 $\mu\text{g/ml}$ (Membranprotein)	40 $\mu\text{g/ml}$ (Membranprotein)
GDP (in Puffer L15)	50	50	50	100 μM	10 μM
HEPES-Puffer (L15)	250	250	250	12,5 mM	10 mM
[^{35}S]GTP γ S (in Puffer L15)	50	50	50	0,7 nM	0,07 nM
Gesamt-volumen	500	500	500		

Tab. 15 : Pipettierschema zur Durchführung eines [^{35}S]GTP γ S-Bindungsexperimentes sowie die resultierenden Endkonzentrationen im Versuchsansatz; Alle Angaben sind in Mikrolitern zu verstehen, wenn nicht explizit aufgeführt, Aqua p.a.: Aqua pro analysi.

Zuerst wurden alle in Aqua pro analysi (R7) gelösten Substanzen in einer 96-Kavitätenplatte (V1) vorgelegt. Anschließend folgte die verdünnte Membransuspension, für die sich eine Endkonzentration von 40 µg/ml zur Erreichung eines großen Messfensters als sinnvoll erwiesen hatte (Dissertationsschrift Kebig 2010). Es folgte der Zusatz von GDP, das durch Auffüllung leerer Nukleotidstellen die basale Bindung des [³⁵S]GTPγS senkt und somit das Messfenster vergrößert (Hilf et al., 1989, Lazareno et al., 1993). Da die Konkurrenz von GDP und [³⁵S]GTPγS vor allem um nicht aktivierte G-Proteine stattfindet, ist die Senkung der basalen Bindung größer als die Senkung der Agonist-vermittelten Aktivierung (Harrison und Traynor, 2003). Die Konzentration des eingesetzten Guanosindiphosphats ist dabei abhängig von der G-Proteinausstattung des Messsystems sowie den G-Protein-Kopplungseigenschaften des Rezeptors und somit für jedes Messsystem unterschiedlich. Für einen besseren Vergleich mit vorhergehenden Arbeiten wurde eine Endkonzentration von 10 µM GDP verwendet. Durch den eingesetzten HEPES-Puffer (L15) wurde ein physiologischer pH-Wert von 7,4 eingestellt sowie folgende Endkonzentrationen erreicht: 10 mM HEPES, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl. Magnesium-Ionen führen in Konzentrationen von 5-10 mM zu einer größeren Absenkung der basalen als der Agonist-vermittelten Bindung (Szekeres und Traynor, 1997). Für Natrium-Ionen ist ebenfalls eine stärkere Senkung der basalen als der Agonist-vermittelten [³⁵S]GTPγS-Bindung publiziert (Selley et al., 2000).

Durch Zugabe des Radioliganden startete die Inkubationszeit von 60 min bei 30 °C in einem Schüttelwasserbad (G43). Zuvor wurde die Messplatte mit Parafilm[®] abgedeckt und durchmischt, um eine homogene Verteilung der Bestandteile in jeder Kavität zu gewährleisten. Die in dieser Arbeit gewählte Inkubationszeit und Temperatur hatte sich in vorangegangenen Arbeiten zur Einstellung eines optimalen Messfensters für die untersuchten Rezeptoren empfohlen (z.B. Dissertation Klemm 2005). Der Glasfaserfilter (V31) wurde für 2 min in Aqua destillata eingelegt und der Messansatz anschließend durch Vakuumfiltration in diesem aufgenommen. Jede Kavität wurde zweimal mit 500 µl Aqua destillata gespült und das Spülwasser erneut durch Vakuumfiltration abgesaugt. Anschließend erfolgte eine 3-minütige Trocknung des Filters in einer Mikrowelle bei 300 W. Zur Messung des Signales wurde ein Szintillationswachs (V16) auf einem Heizblock (G13) mit der Filtermatte verschmolzen. Nach Erhärten des Wachses wurde der Filter in eine Schutzfolie überführt (V33) und in dieser in eine Halterung des Trilux-Messgerätes (G2) eingepasst.

Auswertung

Effekt eines Partialagonisten oder eines Vollagonisten auf die [³⁵S]GTPyS-Bindung

Mit Hilfe dieser Messmethode wurde die intrinsische Aktivität eines Agonisten sowie dessen Wirksamkeit charakterisiert und mit einem bekannten Vollagonisten verglichen. Als Vollagonisten dienten der endogene Transmitter muskarinischer Rezeptoren Acetylcholin, sowie dessen Derivate Oxotremorin M, je nach Fragestellung. Die Auswertung erfolgte mit der Software GraphPad Prism[®] durch Analyse der Datenpunkte mittels „Vier-Parameter-logistischer Gleichung“ (Gl. 6). Für jede Konzentrations-Effekt-Kurve wurde auf eine von $n_H=1$ abweichende Kurvensteilheit getestet (F-Test, siehe 2.9.). Die Einzelkurven wurden auf das obere (= 100 %) und untere Plateau (= 0 %) der Vollagonist-Konzentrations-Effekt-Kurve des Versuchstages normiert. Anschließend wurden die Mittelwerte der Einzelversuchstage zusammengefasst und erneut eine nicht-lineare Regressionsanalyse mittels „Vier-Parameter-logistischer Gleichung“ (Gl. 6) sowie eine Überprüfung der Kurvensteilheit durchgeführt.

Einfluss eines Antagonisten auf die durch orthosterische Vollagonisten oder von ihnen abgeleitete Hybridverbindungen-induzierte [³⁵S]GTPyS-Bindung

Mit diesem Versuchsansatz wurde die Art der Ligandbindung an Rezeptoren näher charakterisiert. Nutzen beide Liganden dieselbe Bindungstasche, kommt es zu einer Konkurrenz beider Liganden um diese und somit zu einer Rechtsverschiebung der Agonist-Konzentrations-Effekt-Kurve bei steigenden Antagonist-Konzentrationen. Binden die Liganden hingegen an unterschiedliche Epitope und bilden sich ternäre Komplexe aus dem Rezeptor und den beiden Liganden, so kann die Rechtsverschiebung einem Maximum zustreben und es kann zur Abnahme der intrinsischen Aktivität des Agonisten mit steigender Antagonist-Konzentration kommen.

Zur Quantifizierung der Rechtsverschiebung wurden zuerst Verschiebefaktoren (dose ratios, DR) gebildet. Diese ergeben sich aus den Wirksamkeiten des Agonisten mit und ohne Antagonist-Zugabe.

$$DR = \frac{EC_{50 \text{ Antagonist}}}{EC_{50 \text{ Kontrolle}}} \quad (\text{Gleichung 10})$$

Zur graphischen Darstellung wurde der dekadische Logarithmus aus „DR - 1“ gegen den dekadischen Logarithmus der Antagonist-Konzentration aufgetragen und geprüft, ob die Lage der Datenpunkte mittels der Gleichung nach Arunlakshana und Schild (1959) durch eine Gerade mit der Steigung $s = 1$ beschreibbar waren (kompetitive Interaktion) oder,

bei Vorliegen einer allosterischen Interaktion, eine Kurve gemäß Lanzafame et al. (1996) zu einer besseren Anpassung führte.

Auswertung einer kompetitiven Interaktion

Bei Vorliegen eines kompetitiven Antagonismus kommt es zu einer parallelen Rechtsverschiebung der Agonist-Konzentrations-Effekt-Kurve mit steigenden Antagonist-Konzentrationen. Voraussetzung für eine parallele Rechtsverschiebung ist ein gleicher Hill-Koeffizient sowie gleich bleibende maximale intrinsische Aktivitäten. Nach Arunlakshana und Schild (1959) kann eine Gerade angepasst werden.

$$\log (DR - 1) = pK_B + s \cdot \log [B] \quad (\text{Gleichung 11})$$

DR: dose ratio, Verschiebungsfaktoren aus Gleichung 10

pK_B : negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten der Bindung des Antagonisten

[B]: Antagonist-Konzentration

s: Steigung der Regressionsgeraden

Der Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse kennzeichnet den pA_2 -Wert eines Antagonisten und damit den negativen dekadischen Logarithmus der Antagonist-Konzentration, die zu einer Verschiebung des Wendepunktes um den Faktor zwei führt. Da bei einem kompetitiven Antagonismus eine Gerade mit der Steilheit $s = 1$ vorliegt, vereinfacht sich Gleichung 11 und es gilt:

$$pA_2 = pK_B \quad (\text{Gleichung 12})$$

Der pK_B -Wert gibt die Affinität der antagonistischen Testsubstanz zum Rezeptor wieder. Es handelt sich dabei um den negativen dekadischen Logarithmus der Antagonist-Konzentration, bei der 50 % der Rezeptoren besetzt sind.

Auswertung einer allosterischen Interaktion

Bei einer inhibitorischen, negativ-kooperativen allosterischen Interaktion mündet die Rechtsverschiebung in ein Maximum und ist somit sättigbar. Die Datenpunkte folgen bei niedrigen Antagonist-Konzentrationen zunächst einer Geraden mit der Steigung $s = 1$, münden jedoch bei höheren Antagonist-Konzentrationen in ein Plateau. Lanzafame et al. entwickelten 1996 eine Gleichung, die auf dem von Ehlert (1988) beschriebenen, ternären Modell einer allosterischen Interaktion beruht. Diese Gleichung bezieht den Kooperativitätsfaktor α sowie die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des Allosters (K_A) mit ein.

$$\text{Log (DR - 1)} = \log \left(\frac{\alpha - 1}{\frac{\alpha K_A}{[A]} + 1} \right) \quad (\text{Gleichung 13})$$

DR: dose ratio, Verschiebungsfaktoren aus Gleichung 11

α : Kooperativitätsfaktor der Interaktion zweier Liganden an einer Rezeptorpopulation

K_A : negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichts-Dissoziationskonstante der Bindung des Allosters

[A]: Konzentration des Allosters

Die Kooperativität α beschreibt die gegenseitige Beeinflussung von Ligand und allosterischem Modulator an der untersuchten Rezeptorpopulation. Ein Kooperativitätsfaktor von $\alpha > 1$ geht mit einer verringerten Affinität des Liganden durch das Alloster einher. Ein Kooperativitätsfaktor mit $0 < \alpha < 1$ steht für eine gesteigerte Affinität des Liganden zu der Rezeptorpopulation, während ein Kooperativitätsfaktor von $\alpha = 1$ eine neutrale Kooperativität und damit eine unveränderte Affinität des Liganden zu den Bindungsstellen widerspiegelt.

2.8.3. Messung intrazellulärer sekundärer Botenstoffe (cAMP, IP1) mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)

Theoretische Grundlagen

Zur FRET-basierten Messung intrazellulärer sekundärer Botenstoffe wurden die HTRF[®]-cAMP- und HTRF[®]-IP1-Analysesets (K1, K2) („*Homogenous Time-Resolved Fluorescence*“) der Firma Cisbio verwendet. Jegliche Messungen erfolgten 60 min nach der letzten Zugabe (siehe Pipettierschema), um im Gleichgewicht zu messen. Dankenswerterweise konnten diese Erhebungen in den Räumlichkeiten des Arbeitskreises von Frau Prof. Dr. E. Kostenis (Pharmazeutische Biologie, Universität Bonn) am Mithras-LB 940 (G33) durchgeführt werden.

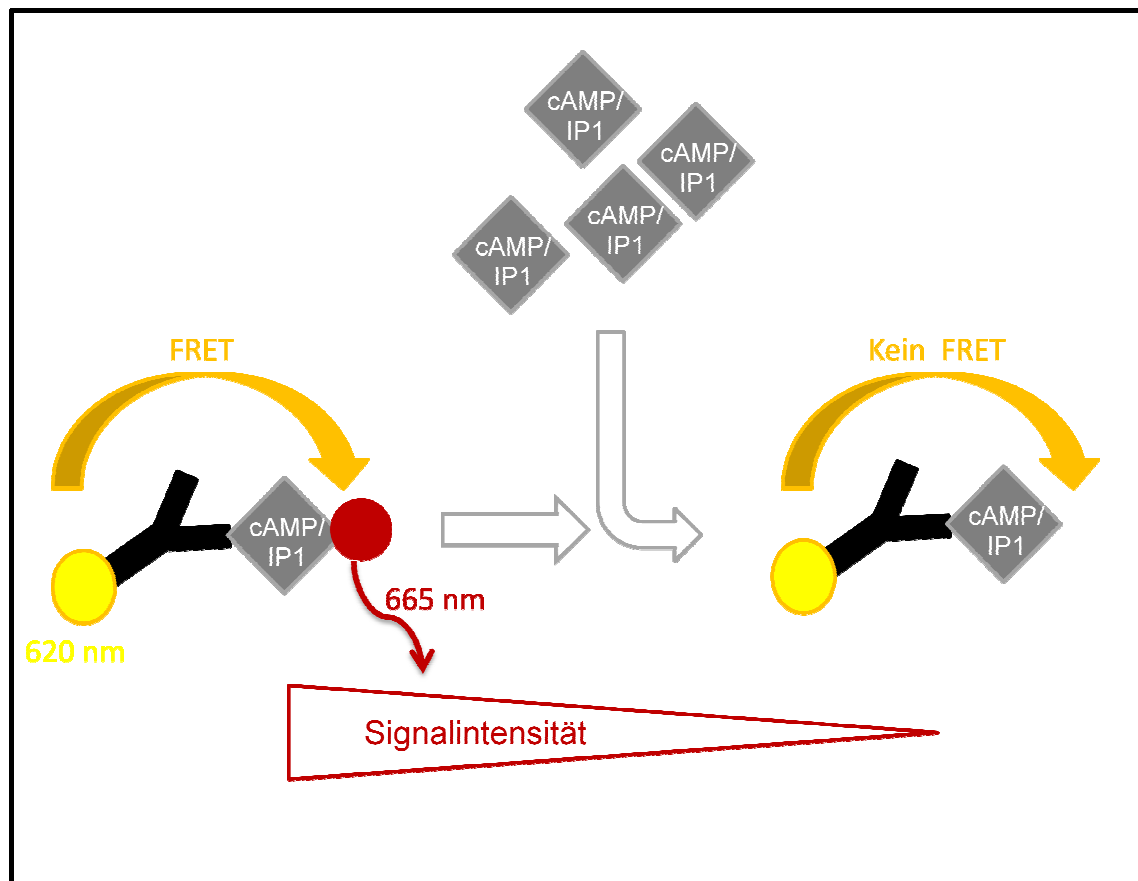


Abb. 8: Schematische Darstellung des Messprinzips eines HTRF[®]-cAMP- bzw. HTRF[®]-IP1-Experimentes. Modifiziert nach Abbildung 1 des Handbuches (K1; K2). cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat, IP1: Inositolmonophosphat, schwarze Struktur: monoklonaler Antikörper gelber Kreis: Europiumkryptat, roter Kreis: Fluorophor des Akzeptors; Erläuterung siehe Text.

Die FRET-Messung beruht auf der Übertragung von Energie eines Donors auf einen Akzeptor, die in enger räumlicher Nähe (nm) zueinander stehen. Als Donor dient ein mit Europiumkryptat-markierter Anti-cAMP- bzw. Anti-IP1-Antikörper. Diese sind in der Lage, sowohl unmarkiertes als auch mit einem Fluorophor konjugiertes cAMP bzw. IP1 zu

binden. Wird der Antikörper mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angestrahlt (337 nm), kann es zu einer Energieübertragung auf einen gebundenen, mit einem Fluorophor-markierten Akzeptor kommen. Der angeregte Fluorophor des Akzeptors emittiert Licht mit einer Wellenlänge von 665 nm. Unabhängig davon emittiert der Fluorophor des Donors Licht mit einer Wellenlänge von 620 nm, welches ebenfalls detektiert wird. Diese Wellenlängen werden miteinander ins Verhältnis gesetzt und als „ratio = $665 \text{ nm} / 620 \text{ nm} \times 10^4$ “ angegeben. Durch Agonist-induzierte Bildung der intrazellulären Botenstoffe, beispielweise durch Aktivierung des G_s- oder G_q-Signaltransduktionsweges, kommt es zur Konkurrenz von markiertem und unmarkiertem Ligand um die Bindungsstelle des Antikörpers. Das resultierende Signal ist in Folge dessen umgekehrt proportional zur Konzentration des in der Zelle gebildeten, unmarkierten Botenstoffes.

Versuchsdurchführung

Messung intrazellulärer Konzentrationen cyclischen Adenosinmonophosphates (cAMP)

Die Versuche wurden analog dem mitgelieferten Handbuch (Version rev04, Februar 2009) des Analysesets (K1) durchgeführt. Zur separaten Messung des G_s-Signalweges des M₄- und des M₂-Rezeptorsubtyps wurden die Zellen am Vortag mit Pertussistoxin [50 ng/ml, 20 h] vorinkubiert.

Hintergrund	Zellsuspension (in cAMP-Puffer)	cAMP-Puffer	Lysepuffer	Anti-cAMP-Antikörper (in Lysepuffer)
cAMP-Puffer-Kontrolle	Zellsuspension (in cAMP-Puffer)	cAMP-Puffer	Markiertes cAMP (in Lysepuffer)	Anti-cAMP-Antikörper (in Lysepuffer)
Testsubstanz	Zellsuspension (in cAMP-Puffer)	Testsubstanz (in cAMP-Puffer)	Markiertes cAMP (in Lysepuffer)	Anti-cAMP-Antikörper (in Lysepuffer)

Tab. 16: Pipettierschema zur Durchführung eines HTRF[®]-cAMP-Experimentes. Von jeder Substanz werden 5 µl einpipettiert. Hintergrund: Unspezifisches Signal ohne Testsubstanz; cAMP-Puffer-Kontrolle: Durch den cAMP-Puffer (L3) induziertes Signal; Testsubstanz: Einfluss einer Testsubstanz, Als cAMP-Puffer wurde immer L3 verwendet, während der Lysepuffer immer dem Analysebausatz K1 entnommen wurde.

Die Testsubstanzen wurden zuerst in cAMP-Puffer (L3) gelöst. Die Zellen wurden von der Zellkulturschale (V8) gelöst (siehe 2.6.2.), in einem Polypropylenröhrchen (V30) aufgenommen und herunter zentrifugiert (G7, Rotor JS 4.3, 900 rpm, 4 min, 4°C). Das überschüssige Trypsin-haltige Medium wurde abgesaugt und durch cAMP-Puffer ohne IBMX-Zusatz ersetzt. Anschließend wurden die Zellen mittels Neubauer-Zählkammer (G36) gezählt und das Volumen abgenommen, welches die erwünschte Zellzahl enthielt.

Es erfolgte eine erneute Pelletierung der Zellen und eine Aufnahme des Pellets in dem zur Einstellung der Zellkonzentration (10^7 Zellen/ml) notwendigen Volumen cAMP-Puffer (L3). Es wurden 50.000 Zellen je Kavität eingesetzt und nach oben aufgeführtem Schema in eine Mikrotiterplatte (V17) pipettiert. Nach dem Ausplattieren der Zellsuspension wurde die Mikrotiterplatte bei 500 rpm (G7, Rotor JA 25.50 1 min, Raumtemperatur) zentrifugiert. Die Mikrotiterplatte (V17) wurde 30 min inkubiert (G46) bevor die in cAMP-Puffer gelöste Testsubstanz oder der cAMP-Puffer (L3) hinzugegeben wurde. Der cAMP-Puffer enthielt den Phosphodiesterase-Inhibitor IBMX (Isobutylmethylxanthin) in einer Konzentration von 1 mM. Dies verhinderte die Degradation von intrazellulärem cAMP. Es wurde erneut für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend das markierte cAMP sowie der Anti-cAMP-Antikörper hinzugegeben. Das markierte cAMP sowie der Anti-cAMP-Antikörper waren in Lysepuffer gelöst, welcher im Analysebausatz (K1) mitgeliefert wurde. Dieser setzte sich wie folgt zusammen: Phosphatpuffer 50 mM, pH 7,0; 0,8 M Kaliumfluorid, 1,25 % Triton X100. Nach 60 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur war die Zellyse durch das im Lysepuffer-enthaltene Detergenz Triton X100 abgeschlossen, woraufhin die Messung am Mithras-LB 940 (G33) erfolgte.

Messung intrazellulärer Inositolmonophosphat-Konzentrationen (IP1)

Die Versuche wurden analog dem mitgelieferten Handbuch (Version rev04, Februar 2009) des Analysesets (K2) durchgeführt.

Hintergrund	7 μ l Zellsuspension (in IP1-Puffer)	7 μ l IP1-Puffer	3 μ l Lysepuffer	3 μ l Anti-IP1- Antikörper (in Lysepuffer)
IP1-Puffer- Kontrolle (L16)	7 μ l Zellsuspension (in IP1-Puffer)	7 μ l IP1-Puffer	3 μ l markiertes IP1 (in Lysepuffer)	3 μ l Anti-IP1- Antikörper (in Lysepuffer)
Test- substanz	7 μ l Zellsuspension (in IP1-Puffer)	7 μ l Testsubstanz (in IP1-Puffer)	3 μ l markiertes IP1 (in Lysepuffer)	3 μ l Anti-IP1- Antikörper (in Lysepuffer)

Tab. 17: Pipettierschema zur Durchführung eines HTRF[®]-IP1-Experimentes. Hintergrund: Unspezifisches Signal; Puffer-Kontrolle: Durch den IP1-Puffer (L16) induziertes Signal; Testsubstanz: Einfluss einer Testsubstanz, Der IP1-Puffer stellte immer L16 dar, während der Lysepuffer dem Analysebausatz K2 entnommen wurde.

Die Zellablösung von der Zellkulturschale sowie die Zellzahlbestimmung erfolgten analog der Versuchsdurchführung der cAMP-Messung. Abweichend davon wurden 100.000 Zellen je Kavität nach oben aufgeführtem Schema in eine Mikrotiterplatte (V17) pipettiert. Nach dem Ausplattieren der Zellsuspension wurde die Mikrotiterplatte bei 500 rpm (G7, Rotor JA 25.50 1 min, Raumtemperatur) herunter zentrifugiert. Die Mikrotiterplatte wurde

20 min inkubiert (G11) bevor die in IP1-Puffer gelösten Testsubstanzen oder der IP1-Puffer (L16) hinzugegeben wurde. Der IP1-Puffer enthielt LiCl (50 mM), welches die Degradation des IP1 verhinderte (Trinquet et al., 2006). Anschließend wurde erneut für 30 min inkubiert (G46) bevor das markierte IP1 sowie der Anti-IP1-Antikörper hinzugegeben wurden. Sowohl das markierte IP1 als auch der Anti-IP1-Antikörper waren in Lysepuffer gelöst, dessen Zusammensetzung dem Lysepuffer der cAMP-Messung entspricht.

Auswertung

Die Auswertung der mit dem Mithras LB 960-Messgerät detektierten Signale erfolgte mit dem Programm GraphPad-Prism[®]. Dazu wurden die für jede Kavität ermittelten „ratios“ mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen Gleichung“ (Gl. 6) analysiert. An jedem Versuchstag wurde auf das obere und untere Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve der Testsubstanz normiert, und auf einen von $n_H=1$ abweichenden Hill-Koeffizienten mittels F-Test getestet. Anschließend wurden die Mittelwerte der Einzelversuchstage zusammengeführt und einer erneuten Analyse mittels „Vier-Parameter-logistischer Gleichung“ (Gl. 6) unterzogen. Ebenso wurde diese Konzentrations-Effekt-Kurve auf einen von $n_H=1$ abweichende Kurvensteilheit getestet.

2.9. Statistik

Im Folgenden werden alle statistischen Analyseverfahren aufgeführt, die zur Erstellung dieser Arbeit notwendig waren. Wenn nicht explizit erwähnt, erfolgte die Berechnung mit Hilfe der Software GraphPad Prism®.

Deskriptive Methoden:

Berechnung des arithmetischen Mittelwertes \bar{x} : Der arithmetische Mittelwert \bar{x} stellt ein Lagemaß dar, bei dem die Lage des mittleren Bereichs einer Messreihe bestimmt wird. Voraussetzung für dessen Berechnung ist eine Normalverteilung der Werte aus den Einzelversuchen.

$$\bar{X} = \frac{x_1 + x_2 + x_n}{n} \quad (\text{Gleichung 14})$$

x_1 = Messwert des ersten Versuches

x_2 = Messwert des zweiten Versuches

x_n = Messwert des n-ten Versuches

n = Anzahl der Einzelversuche

Berechnung der Varianz s^2 : Die Varianz s^2 , die Standardabweichung SD sowie der Standardfehler des Mittelwertes SEM stellen Streuungsmaße dar. Sie dienen als Maß für die Präzision einer Methode.

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2 \quad (\text{Gleichung 15})$$

n : Anzahl der Einzelversuche

x_i : Messwert des i-ten Versuches

\bar{x} : arithmetischer Mittelwert der Einzelversuche

Berechnung der Standardabweichung SD: Die Standardabweichung SD (engl. *standard deviation*) gibt die Streuung der Einzelwerte an. Sie stellt die Wurzel der Varianz dar.

$$SD = \sqrt{s^2} = \sqrt{\frac{1}{(n-1)} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (\text{Gleichung 16})$$

s^2 : Varianz

n: Anzahl der Einzelversuche

x_i : Messwert des i-ten Versuches

\bar{x} : arithmetischer Mittelwert der Einzelversuche

Berechnung des Standardfehlers des Mittelwertes SEM: Der Standardfehler SEM (engl. *standard error of the mean*) gibt die Variabilität der Mittelwerte an.

$$SEM = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (\text{Gleichung 17})$$

SD: Standardabweichung

n: Anzahl der Einzelversuche

Statistische Vergleiche einer Kurvenanpassung:

Die Kurvenanpassung erfolgte mittels nicht-linearer Regressionsanalyse, wobei die Summe der Fehlerquadrate der vertikalen Abstände der Datenpunkte von der Kurvenanpassung (SS, *sum of squares*) berechnet und die Parameterwerte so lange variiert werden, bis die Summe der Fehlerquadrate ein Minimum erreichte.

$$SS = \sum (y_{\text{gemessen}} - y_{\text{berechnet}})^2 \quad (\text{Gleichung 18})$$

y_{gemessen} : gemessener y-Wert

$y_{\text{berechnet}}$: von GraphPad Prism[®] berechneter y-Wert

Um zwei Modelle der Kurvenanpassung miteinander vergleichen zu können, wurde ein F - Test angewandt. Dazu wird die Differenz der Fehlerquadrate (SS) durch die Differenz der Freiheitsgrade (DF) dividiert.

$$F = \frac{\frac{(SS_1 - SS_2)}{SS_2}}{\frac{(DF_1 - DF_2)}{DF_2}} \quad (\text{Gleichung 19})$$

SS_1 : Summe der Fehlerquadrate der Kurvenanpassung auf der Basis des einfacheren Modells

SS_2 : Summe der Fehlerquadrate der Kurvenanpassung auf der Basis des komplexeren Modells

DF_1 : Anzahl der Freiheitsgrade des einfacheren Anpassungsmodells

DF_2 : Anzahl der Freiheitsgrade des komplexeren Anpassungsmodells

Aus dem F-Wert wurde ein p-Wert ermittelt. Ein p-Wert < 0,05 zeigte eine signifikante Überlegenheit des komplexen Modells mit den zusätzlichen Freiheitsgraden an (Motulsky, 2003).

Statistische Vergleiche von Kenngrößen: Um die mittels nicht linearer Regressionsanalyse erhaltenen Kenngrößen miteinander vergleichen zu können, wurde mit der Software GraphPad InStat® ein ungepaarter, zweiseitiger (Student's) t-Test durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen parametrischen Test, dessen Voraussetzung eine Normalverteilung der Werte ist. Dazu wird als erstes der t-Wert ermittelt. Dieser ergibt sich als Quotient aus der Differenz der arithmetischen Mittelwerte und dem Standardfehler SE (engl. standard error).

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{SE} \quad (\text{Gleichung 20})$$

x_1 : arithmetischer Mittelwert des ersten Versuchsansatzes

x_2 : arithmetischer Mittelwert des zweiten Versuchsansatzes

SE: Standardfehler

Aus dem t-Wert lässt sich ein p-Wert zur Beschreibung der Irrtumswahrscheinlichkeiten ermitteln, der wiedergibt, ob die betrachteten Versuchsreihen der gleichen Grundgesamtheit entstammen. Je kleiner der p-Wert, desto größer ist somit die Wahrscheinlichkeit, dass die beiden betrachteten Gruppen signifikant verschieden voneinander sind. Bei einem $p < 0,05$ wird in dieser Arbeit von einem signifikanten Unterschied gesprochen. Bei einem p-Wert < 0,01 ist der Unterschied sehr signifikant und ein p-Wert < 0,001 steht für einen hochsignifikanten Unterschied zweier Versuchsreihen.

3. Ergebnisse

Der vorliegende Ergebnisteil ist wie folgt gegliedert: Zuerst erfolgt die Analyse der Signalwegsaktivierung unterschiedlich gekoppelter 7-transmembranärer Rezeptoren mit dem Epic[®]-Biosensor, um zu prüfen, welche Signaltransduktionswege durch Messung von dynamischer Massenumverteilung (DMR, „*dynamic mass redistribution*“) identifiziert werden können. Anschließend werden einzelne Komponenten des G_s-Signaltransduktionsweges näher betrachtet, um einen Einblick zu erhalten, welche zellulären Komponenten der Epic[®]-Biosensor zu detektieren vermag. Es folgen funktionelle Untersuchungen des M₄-Rezeptorsubtyps und der Rezeptormutante M₄⁴³⁵Trp→Ala, die die G-Protein-Aktivierung und die Signalwegsaktivierung unterschiedlicher muskarinischer Liganden an diesem Rezeptor bzw. ihrer Rezeptormutante verdeutlichen sollen.

Als Beispiel eines bevorzugt G_{α_{i/o}}-gekoppelten Rezeptors wurde der muskarinische M₂-Rezeptorsubtyp gewählt. Für einen präferenziell G_s-gekoppelten Rezeptor konnte auf die uns freundlicherweise von Herrn Professor Dr. Blaes (Universitätsklinikum Gießen) zur Verfügung gestellten stabil mit der Plasmid-DNA des humanen β₂-Adrenozeptors transfizierten CHO-Zellen zurückgegriffen werden. Als Stellvertreter eines präferenziell G_{α_{q/11}}-gekoppelten Rezeptors wurde der muskarinische M₃-Rezeptorsubtyp eingesetzt, dessen Plasmid-DNA zuvor stabil in CHO-Zellen eingebracht wurde. Zur gezielten Analyse der Signale wurden unterschiedliche Versuchsbedingungen gewählt, die es dem jeweiligen Rezeptor erlaubten, bestimmte Signaltransduktionswege innerhalb der Zelle zu aktivieren. Die Auswertung der Daten erfolgte analog der im Material und Methodenteil ausführlich beschriebenen Vorgehensweise (siehe 2.8.).

3.1. Messung der Agonist-induzierten dynamischen Massenumverteilung an Flp-InTMhM₂-CHO-Zellen

3.1.1. Messung ohne Vorinkubation der Zellen

Zu Beginn der Untersuchungen wurde die durch eine M₂-Rezeptor-Aktivierung hervorgerufene dynamische Massenumverteilung von CHO-Zellen mit dem Epic[®]-Biosensor untersucht. Die Untersuchung M₂-Rezeptor-vermittelter Effekte mit dem Epic[®]-Biosensor erfolgte zum Teil bereits in der vorangegangenen Arbeit von A. Kebig (Dissertationsschrift 2010). In vorliegender Arbeit wurden bestimmte Messungen erneut durchgeführt zur Überprüfung der eigenen Vorgehensweise sowie zur Verwendung für eigene Vergleiche mit neu untersuchten Rezeptoren. Zu Beginn sollte erstmals geprüft werden, welcher Messzeitpunkt zur Auswertung von Konzentrations-Effekt-Kurven herangezogen werden konnte bzw. welches Signalcharakteristikum für eine Auswertung zur Erhebung dieser geeignet war. Anschließend wurden die Wirksamkeiten strukturverschiedener muskarinischer Liganden durch Erhebung von Konzentrations-Effekt-Kurven untersucht. Maximale intrinsische Aktivitäten wurden separat erhoben und am Ende jedes Unterkapitels vorgestellt.

3.1.1.1. Vergleich unterschiedlicher Auswertungsmethoden zur Erhebung von Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurven an hM₂-CHO-Zellen

Zuerst wurde Acetylcholin für einen Vergleich der Auswertungsmethoden von Konzentrations-Effekt-Kurven herangezogen, da er sowohl einen endogenen Agonisten muskarinischer Acetylcholinrezeptoren als auch *per definitionem* einen Vollagonisten darstellt.

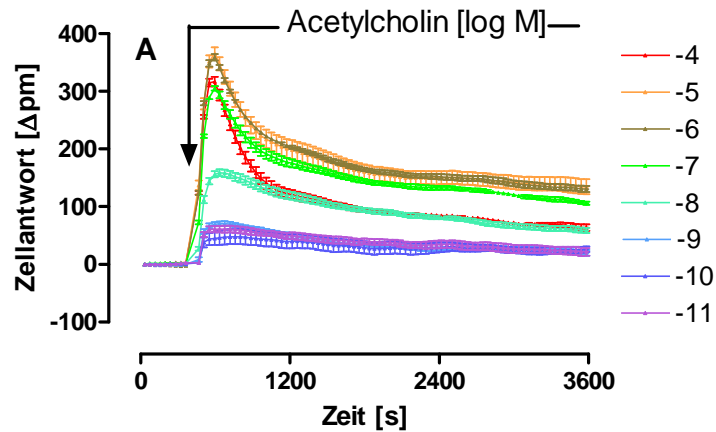


Abb. 9: Acetylcholin-induzierte dynamische Massenumverteilung an Flp-InTMhM₂-CHO-Zellen. *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Aufgetragen sind die logarithmierten, molaren Konzentrationen von Acetylcholin sowie die durch die jeweilige Konzentration induzierte Zellantwort. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Substanzzugabe wider. Mittelwerte ± Standardfehler eines repräsentativen Experimentes, welches in Dreifachbestimmung erhoben und zweifach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert.

Acetylcholin zeigte eine positiv-gerichtete Wellenlängenverschiebung in CHO-Zellen. Diese resultierte in einer Spitze, die innerhalb der ersten 1700 s nach Substanzzugabe auftrat und anschließend wieder abfiel. Ein solcher Signalverlauf konnte am M₂-Rezeptorsubtyp bereits für Acetylcholin sowie weitere muskarinische Agonisten publiziert werden (Antony et al., 2009; Kebig et al., 2009; Scott & Peters, 2010).

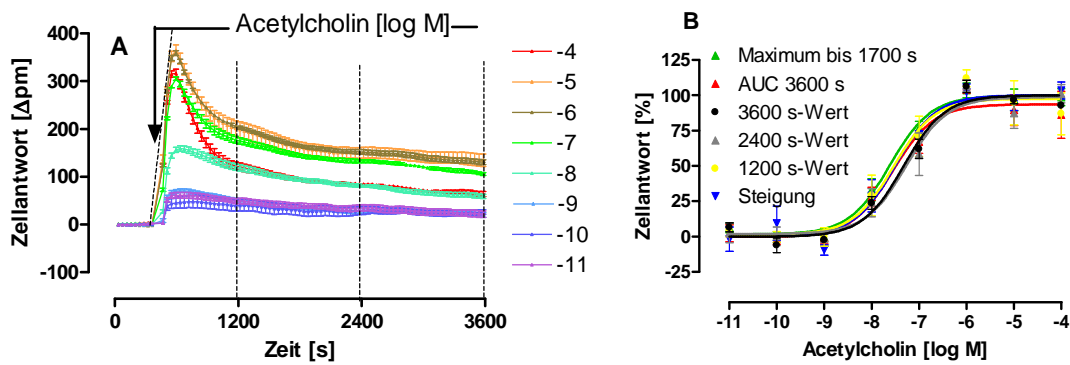


Abb. 10: **A:** Ablesezeitpunkte (gestrichelte Linien) der Acetylcholin-induzierten dynamischen Massenumverteilung an Flp-InTMhM₂-CHO-Zellen. *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Aufgetragen sind die logarithmierten, molaren Konzentrationen von Acetylcholin sowie die durch die jeweilige Konzentration induzierte Zellantwort. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Substanzzugabe wider. Mittelwerte ± Standardfehler eines repräsentativen Experimentes, welches in Dreifachbestimmung erhoben und zweifach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messwerte einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert.

B: Durch die gewählten Ablesezeitpunkte resultierende, gemittelte Konzentrations-Effekt-Kurven der Acetylcholin-induzierten dynamischen Massenumverteilung. *Ordinate:* Prozentuale, Basislinien-korrigierte Zellantwort. 0 % entspricht dem unteren Plateau, 100 % dem oberen Plateau der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration. *Datenpunkte:* Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die je als Drei- bzw. Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6). Konstanter Hill-Koeffizient von $n_H=1$.

Aufgrund eines sich über die Messdauer hinweg verändernden Signales, kamen zur Berechnung von Konzentrations-Effekt-Kurven unterschiedliche Messzeitpunkte sowie verschiedene Analyseverfahren in Frage. Als Ablesezeitpunkte wurde der Messwert nach 1200 s, nach 2400 s und nach 3600 s gewählt. Darüberhinaus wurde die Fläche zwischen Basallinie und Kurve („area under the curve“, AUC), die Steigung einer Steigungstangente, die vor Substanzzugabe bis zum ersten Messpunkt nach Substanzzugabe auftrat sowie die maximale Zellantwort bis 1700 s für die Berechnung von Konzentrations-Effekt-Kurven verglichen. Die Ablesezeitpunkte sowie die analysierten Signalcharakteristika wurden beispielhaft gewählt, um einen möglichst großen Bereich der Messung abzudecken sowie eine möglichst hohe Variabilität an Analysemethoden zu untersuchen.

Analysierte Datenpunkte	pEC ₅₀ \pm SEM	E _{min} [%]	E _{max} [%]	n _H (frei) \pm SEM
Wert nach 1200 s	7,54 \pm 0,23	1,3 \pm 6,8	97,6 \pm 6,4	1,01 \pm 0,43 n.s.
Wert nach 2400 s	7,30 \pm 0,19	1,8 \pm 5,3	98,7 \pm 5,9	0,92 \pm 0,34 n.s.
Wert nach 3600 s	7,33 \pm 0,11	-0,1 \pm 3,1	99,9 \pm 3,6	0,94 \pm 0,20 n.s.
AUC 3600 s	7,55 \pm 0,19	0,2 \pm 5,5	93,6 \pm 5,1	0,97 \pm 0,34 n.s.
Steigungstangente	7,50 \pm 0,16	0,7 \pm 4,8	100 \pm 4,9	0,95 \pm 0,28 n.s.
Maximum bis 1700 s	7,61 \pm 0,11	1,6 \pm 3,5	99,7 \pm 3,2	0,96 \pm 0,21 n.s.

Tab. 18: Kenngrößen \pm Standardfehler von drei gemittelten Konzentrations-Effekt-Kurven von Acetylcholin. Die Kenngrößen basieren auf den Mittelwertskurven aus Abb. 10. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration, die zu einer halbmaximalen Zellantwort führt. E_{min}: Minimale Zellantwort (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven), E_{max}: Maximale Zellantwort (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven). n_H(frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. n.s.: nicht signifikant verschieden von n_H=1 (F-Test, p>0,05).

Die Wirksamkeiten der Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurven, die durch Anwendung unterschiedlicher Auswertungsmethoden erhoben wurden, unterschieden sich nicht signifikant voneinander (t-Test, p>0,05). Die Kurvensteilheit unterschied sich bei keiner

Auswertungsmethode von $n_H=1$ (F-Test, $p<0,05$). Die Beobachtung, dass kein Unterschied bei der Auswertung unterschiedlicher Messzeitpunkte auftrat, zeigte, dass die Analyse der Signale der dynamischen Massenumverteilung über die Messdauer hinweg möglich ist. Es können somit für die Testsubstanz Acetylcholin unterschiedliche Aspekte zur Berechnung von Konzentrations-Effekt-Kurven herangezogen werden. Dennoch darf dies nicht für jeden Liganden und insbesondere nicht für jeden $G\alpha_{i/o}$ -gekoppelten Rezeptor pauschalisiert werden, da nicht auszuschließen ist, dass der Einsatz anderer Liganden zu unterschiedlichen Resultaten führt (Schröder et al., zur Publikation angenommen). Aufgrund der nicht signifikant verschiedenen Wirksamkeiten und Kurvensteilheiten von Acetylcholin bei Verwendung obiger Analyseverfahren und für einen Vergleich mit den Daten des M_4 -Rezeptorsubtypes wurde für $G\alpha_{i/o}$ -gekoppelte Rezeptoren die maximale Zellantwort innerhalb der ersten 1700 s zur Erhebung von Konzentrations-Effekt-Kurven verwendet.

Der in dieser Arbeit ermittelte pEC_{50} -Wert für die Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve des Maximums bis 1700 s von $7,61 \pm 0,11$ unterscheidet sich nicht signifikant von dem von A. Kebig (Dissertationsschrift 2010) ermittelten Wert der dynamischen Massenumverteilung von hM_2 -CHO-Zellen (pEC_{50} -Wert: $7,53 \pm 0,09$) und er unterscheidet sich nicht signifikant von dem von Scott und Peters (2010) an M_2 -CHO-Zellen gefundenen Wert von $7,3 \pm 0,2$ (t-Test, $p>0,05$). Des Weiteren unterscheidet sich die Wirksamkeit nicht von dem in [^{35}S]GTP γ S-Bindungsversuchen von C. Schmalenbach (Dissertationsschrift 2005) gemessenen Wert an CHO- M_2 -Homogenaten (pEC_{50} -Wert: $7,69 \pm 0,03$, t-Test, $p>0,05$) sowie dem von Lazareno und Birdsall (1995) ermittelten pEC_{50} -Wert von $7,6 \pm 0,1$. Damit liegen mittels verschiedener funktioneller Untersuchungen erhobene Wirksamkeiten auf einem Niveau mit solchen, die für Acetylcholin mittels dynamischer Massenumverteilung am hM_2 -Rezeptor erhoben werden.

3.1.1.2. Iperoxo-induzierte dynamische Massenumverteilung an hM₂-CHO-Zellen

Obwohl die Testsubstanz Iperoxo im Epic[®]-Biosensor bereits in einer vorangegangenen Arbeit untersucht wurde (Dissertationsschrift Kebig, 2010), sollte im Folgenden eine eigene Erhebung erfolgen, um einen direkten Vergleich mit den in späteren Kapiteln erstmals an PTX-vorinkubierten hM₂-CHO-Zellen vornehmen zu können. Die intrinsische Aktivität wurde ebenfalls bestimmt und wird separat betrachtet (siehe 3.1.1.5).

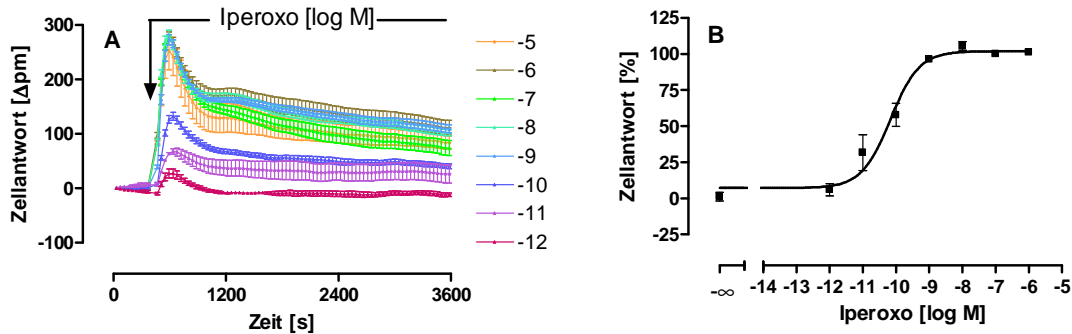


Abb. 11: Iperoxo-induzierte dynamische Massenumverteilung an Flp-InTMhM₂-CHO-Zellen. **A:** *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Aufgetragen sind die logarithmierten molaren Konzentrationen von Iperoxo sowie die durch die jeweilige Konzentration induzierte Zellantwort. Der Pfeil stellt den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Mittelwerte ± Standardfehler eines repräsentativen Experimentes in Vierfachbestimmung, welches zweifach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration wurden durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert. **B:** *Ordinate:* Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht dem unteren Plateau, 100 % dem oberen Plateau der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven. *Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die je als Drei- bzw. Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), Konstanter Hill-Koeffizient von n_H=1.

M ₂ wt	pEC ₅₀	E _{min} [%]	E _{max} [%]	n _H (frei)	n
Iperoxo	10,17 ± 0,12	7,2 ± 4,0	101,9 ± 3,2	0,67 ± 0,13 n.s.	3

Tab. 19: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Konzentrations-Effekt-Kurven von Iperoxo an Flp-InTMhM₂-CHO-Zellen. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration, die zu einer halbmaximalen Zellantwort führt. E_{min}: Minimale Zellantwort (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve), E_{max}: Maximale Zellantwort (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). Die Kenngrößen basieren auf der Mittelwertskurve aus Abb. 11. n_H(frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. n.s. nicht signifikant verschieden von n_H=1 (F-Test, p>0,05). n: Anzahl unabhängiger Experimente.

Der Vollagonist Iperoxo zeigte am M₂-Rezeptor einen für Gα_{i/o}-gekoppelte Rezeptoren typischen Signalverlauf. Dieser Verlauf unterschied sich nicht von dem von Kebig et al. (2009) gezeigten Signalverlauf dieser Testsubstanz. A. Kebig (Dissertationsschrift 2010) fand für Iperoxo eine Wirksamkeit am Epic[®]-Biosensor von 10,16 ± 0,16, die sich nicht signifikant von dem in dieser Arbeit ermittelten pEC₅₀-Wert unterschied (t-Test, p>0,05). Iperoxo zeigte in vorliegender Arbeit einen im Vergleich zum endogenen Agonisten

Acetylcholin nach links verschobenen Wendepunkt. In Organbadversuchen am isolierten Meerschweinchen-Vorhof konnte ebenfalls eine im Vergleich zu Acetylcholin erhöhte Wirksamkeit gezeigt werden (Antony et al. 2009).

3.1.1.3. Vergleich unterschiedlicher Auswertungsmethoden zur Erhebung von Phth-6-Iper-Konzentrations-Effekt-Kurven an hM₂-CHO-Zellen

In dieser Arbeit wurden erstmalig unterschiedliche Auswertungsmethoden der dualsterischen Testsubstanz Phth-6-Iper zur Erhebung von Konzentrations-Effekt-Kurven miteinander verglichen. Die intrinsische Aktivität wurde separat bestimmt und wird später besprochen (siehe 3.1.1.5.).

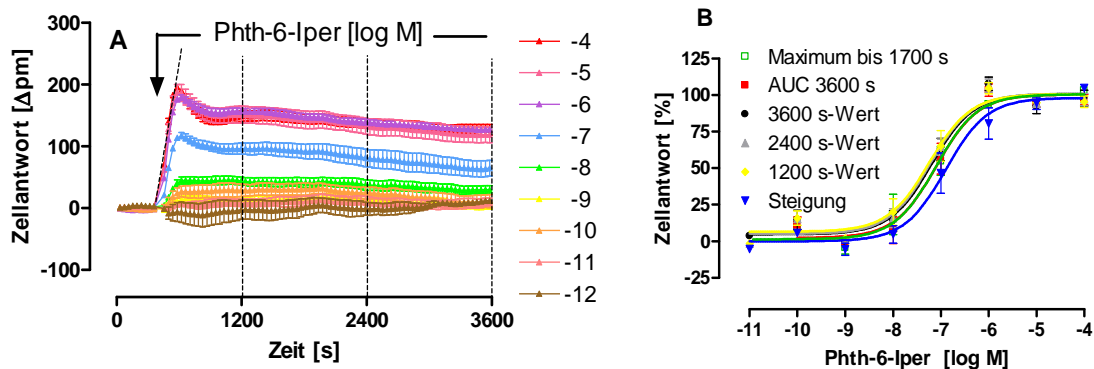


Abb. 12: Ableszeitpunkte (gestrichelte Linien) der Phth-6-Iper-induzierten dynamischen Massenumverteilung an Flp-InTMhM₂-CHO-Zellen. *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Aufgetragen sind die logarithmierten, molaren Konzentrationen von Phth-6-Iper sowie die durch die jeweilige Konzentration induzierte Zellantwort. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Substanzzugabe wider. Mittelwerte ± Standardfehler eines repräsentativen Experimentes, welches in Vierfachbestimmung erhoben und zweifach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messwerte zu einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert. **B:** Durch die gewählten Ableszeitpunkte resultierende, gemittelte Konzentrations-Effekt-Kurven der Phth-6-Iper-induzierten dynamischen Massenumverteilung. *Ordinate:* Prozentuale, Basislinien-korrigierte Zellantwort. 0 % entspricht dem unteren Plateau, 100 % dem oberen Plateau der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration. *Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die je als Drei- bzw. Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6). Konstanter Hill-Koeffizient von n_H=1.

Durch Aktivierung des M₂-Rezeptorsubtypes führte Phth-6-Iper zu einem konzentrationsabhängigen, positiv-gerichteten Epic[®]-Signal, dessen Verlauf in den ersten 900 s nach Substanzzugabe eine Signalspitze aufwies. Das Signal fiel anschließend wieder ab. Ein solcher Phth-6-Iper-induzierter Signalverlauf konnte auch von Antony et al. (2009) an hM₂-CHO-Zellen detektiert werden.

Ergebnisse

Analysierte Datenpunkte	pEC ₅₀ ± SEM	E _{min} [%]	E _{max} [%]	n _H (frei) ± SEM
Wert nach 1200 s	7,25 ± 0,14	6,6 ± 4,0	100,6 ± 4,0	1,25 ± 0,44 n.s.
Wert nach 2400 s	7,22 ± 0,11	5,2 ± 3,5	100,9 ± 3,4	1,53 ± 0,62 n.s.
Wert nach 3600 s	7,19 ± 0,14	4,8 ± 4,1	100,8 ± 4,1	1,92 ± 1,89 n.s.
AUC 3600 s	7,10 ± 0,13	1,8 ± 4,0	100,4 ± 4,1	3,91 ± 132,7 n.s.
Steigungstangente	6,90 ± 0,14	0 ± 4,2	98,1 ± 4,6	0,84 ± 0,25 n.s.
Maximum bis 1700 s	7,12 ± 0,12	1,4 ± 3,6	100,4 ± 4,0	0,84 ± 0,22 n.s.

Tab. 20: Kenngrößen ± Standardfehler von drei gemittelten Konzentrations-Effekt-Kurven von Phth-6-Iper. Die Kenngrößen basieren auf den Mittelwertskurven aus Abb. 12. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration, die zu einer halbmaximalen Zellantwort führt. E_{min}: Minimale Zellantwort (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven), E_{max}: Maximale Zellantwort (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven). n_H(frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. n.s.: nicht signifikant verschieden von n_H=1 (F-Test, p>0,05).

Die Wirksamkeiten der Phth-6-Iper-Konzentrations-Effekt-Kurven, die durch Anwendung unterschiedlicher Auswertungsmethoden erhoben wurden, unterschieden sich nicht signifikant voneinander (t-Test, p>0,05). Die Kurvensteilheit unterschied sich bei keiner Auswertungsmethode von n_H=1 (F-Test, p<0,05). Somit konnte erstmals sowohl für die orthosterische Substanz Acetylcholin als auch für die dualsterische Substanz Phth-6-Iper gezeigt werden, dass die Wirksamkeit der mittels Epic[®]-Biosensor erhobenen Konzentrations-Effekt-Kurven unabhängig von den hier angewandten Analysemethoden ist. In Folge dessen wird auch für dualsterische Testsubstanzen eine Auswertung des Maximaleffektes bis 1700 s Messdauer zur Erhebung von Konzentrations-Effekt-Kurven vorgenommen. Der für Phth-6-Iper erhobene Wendepunkt an hM₂-CHO-Zellen wich nicht signifikant von der von A. Kebig (Dissertationsschrift 2010) erhobenen Wirksamkeit dieser Testsubstanz, die ebenfalls mittels Epic[®]-Biosensor ermittelt wurde, ab (pEC₅₀= 7,33 ± 0,12; t-Test, p>0,05).

3.1.1.4. Naph-6-Iper-induzierte dynamische Massenumverteilung an hM₂-CHO-Zellen

In nachstehendem Kapitel sollte für einen Vergleich mit dem später besprochenen M₄-Rezeptorsubtyp die dualsterische Substanz Naph-6-Iper hinsichtlich ihrer Signalwegsaktivierung an hM₂-CHO-Zellen untersucht werden. Die Auswertung erfolgte dabei, wie zuvor für die dualsterische Testsubstanz Phth-6-Iper analysiert, durch Bestimmung der maximalen Wellenlängenverschiebung jeder Agonist-Konzentration in den ersten 1700 s Messdauer. Neben der hier betrachteten Wirksamkeit, wurde die intrinsische Aktivität untersucht, die in einem späteren Kapitel besprochen wird (siehe 3.1.1.5.).

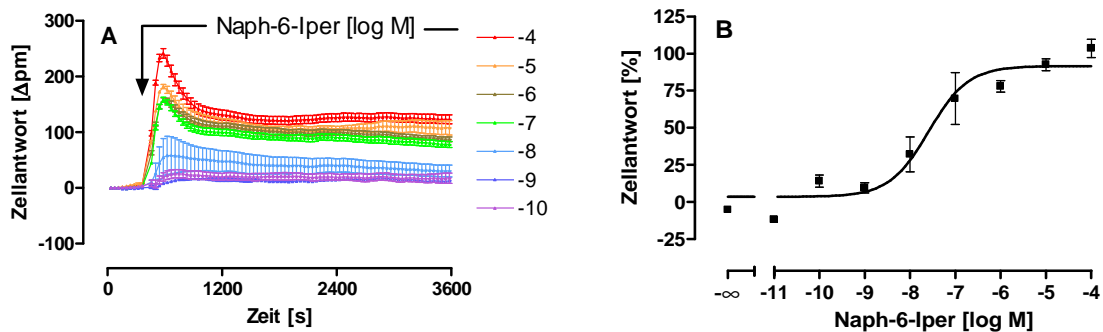


Abb. 13: Naph-6-Iper-induzierte dynamische Massenumverteilung an Flp-InTMhM₂-CHO-Zellen. **A:** *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Aufgetragen sind die logarithmierten, molaren Konzentrationen von Naph-6-Iper sowie die durch die jeweilige Konzentration induzierte Zellantwort. Der Pfeil stellt den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Mittelwerte ± Standardfehler eines repräsentativen Experimentes in Dreifachbestimmung, welches zweifach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration wurden durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert. **B:** *Ordinate:* Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht dem unteren Plateau, 100 % dem oberen Plateau der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration. *Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die je als Drei- bzw. Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6). Konstanter Hill-Koeffizient von n_H = 1.

M ₂ wt	pEC ₅₀	E _{min} [%]	E _{max} [%]	n _H (frei)	n
Naph-6-Iper	7,59 ± 0,19	3,6 ± 4,8	91,7 ± 4,9	0,45 ± 0,13 n.s.	4

Tab. 21: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Konzentrations-Effekt-Kurve von Naph-6-Iper an Flp-InTMhM₂-CHO-Zellen. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration, die zu einer halbmaximalen Zellantwort führt. E_{min}: Minimale Zellantwort (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve), E_{max}: Maximale Zellantwort (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). Die Kenngrößen beruhen auf der Mittelwertkurve aus Abb. 13. n_H(frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. n.s. nicht signifikant verschieden von n_H=1 (F-Test, p>0,05). n: Anzahl unabhängiger Experimente.

Die Testsubstanz Naph-6-Iper führte wie die zuvor untersuchten Agonisten an hM₂-CHO-Zellen zu einer positiv-gerichteten Wellenlängenverschiebung. Diese gipfelte in einer

Signalspitze und fiel anschließend wieder ab. Die Wirksamkeit von Naph-6-Iper lag mit einem pEC_{50} -Wert von $7,59 \pm 0,19$ signifikant niedriger (t-Test, $p < 0,05$) als die des reinen orthosterischen Bestandteiles Iperoxo (pEC_{50} : $10,17 \pm 0,12$). Eine Wirksamkeit von $7,68 \pm 0,12$ für Naph-6-Iper fand A. Kebig (Dissertationsschrift 2010) durch Messung der dynamischen Massenumverteilung. Diese stimmt gut mit der in dieser Arbeit ermittelten Wirksamkeit überein. Durch Messung der [35 S]GTP γ S-Bindung konnte K. Kellershohn (Dissertationsschrift 2007) einen Wendepunkt von $8,29 \pm 0,05$ ermitteln. Dieser unterscheidet sich zwar signifikant von dem in dieser Arbeit gefundenen Wert (t-Test, $p > 0,05$), liegt aber in der gleichen Größenordnung.

3.1.1.5. Maximal induzierbare dynamische Massenumverteilung muskarinischer Liganden an hM_2 -CHO-Zellen

Die Untersuchung maximal wirksamer Konzentrationen muskarinischer Liganden am M_2 -Rezeptorsubtyp diente dem Vergleich der intrinsischen Aktivitäten strukturell verschiedener Liganden. Des Weiteren wurden diese Ergebnisse mit Daten verglichen, die nach Vorstimulation der Zellen erhoben wurden (siehe dazu 3.1.2. sowie 3.1.3.). Außerdem dienten diese zum Teil ebenfalls von A. Kebig (Dissertationsschrift 2010) erhobenen Daten des M_2 -Rezeptorsubtyps einem Vergleich mit solchen des M_4 -Rezeptorsubtyps, was ebenfalls in späteren Kapiteln besprochen wird (siehe 3.7.1.).

Zuerst soll ein repräsentatives Beispiel einer Messung der Agonist-induzierten DMR an hM_2 -CHO-Zellen solcher Agonisten gezeigt werden, die zuvor nicht durch Konzentrations-Effekt-Kurven charakterisiert wurden, um einen Eindruck des Signalverlaufs zu erhalten. Acetylcholin wurde an den Versuchstagen als Kontrolle mitgeführt. Es wurden jeweils maximal mögliche Konzentrationen eingesetzt, die nicht in einem Rezeptor-unabhängigen Signal resultierten (vergleiche 8.2.1.).

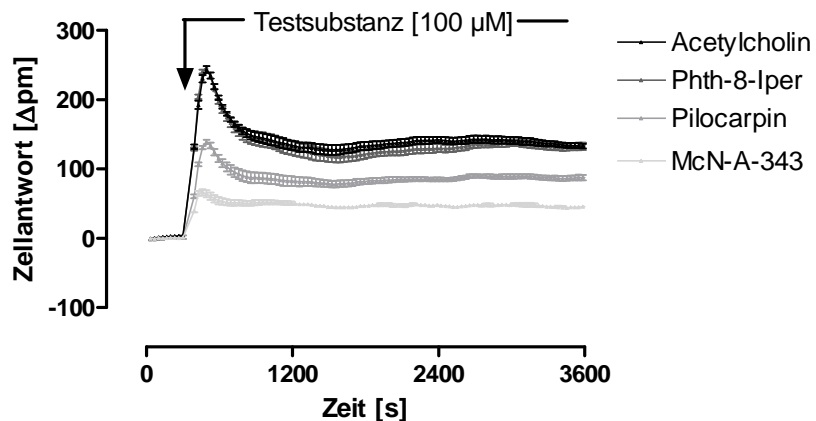


Abb. 14: Durch verschiedene muskarinische Liganden induzierte dynamische Massenumverteilung an Flp-InTMhM₂-CHO-Zellen. *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δ pm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Der Pfeil stellt den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Mittelwerte \pm Standardfehler eines repräsentativen Experimentes in Dreifachbestimmung, welches drei- bis vierfach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration wurden durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert.

Es wird deutlich, dass die untersuchten Testsubstanzen ein positiv-gerichtetes Signal zeigten, das in einer Signalspitze resultierte und anschließend wieder abfiel. Darüberhinaus ist gut zu erkennen, dass weder die Substanz Pilocarpin noch die Substanz McN-A-343 in der Lage waren dieselbe Signalhöhe wie Acetylcholin zu erreichen. Der Effekt aller bereits besprochenen Agonisten soll gegenüber dem Acetylcholin-Effekt im Folgenden quantifiziert werden.

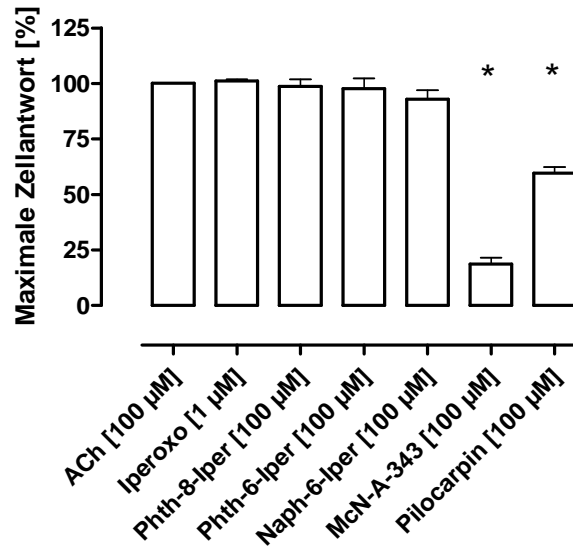


Abb. 15: Maximal-induzierbare, Basislinien-korrigierte dynamische Massenumverteilung muskarinischer Liganden an Flp-InTMhM₂-CHO-Zellen. *Ordinate:* Prozentuale, maximale Zellantwort normiert auf die durch Acetylcholin [100 µM]-induzierte Massenumverteilung. 0 % entspricht keiner Zellantwort, 100 % der durch Acetylcholin-[100 µM] ausgelösten Zellantwort. *Abszisse:* Untersuchte Liganden mit eingesetzter Konzentration, Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3-17 voneinander unabhängigen Experimenten, jeweils in Drei- oder Vierfachbestimmung erhoben. *: signifikant verschieden von Acetylcholin [100 µM], (t-Test, $p > 0,05$).

Ergebnisse

M_2 wt	$E_{max} \pm SEM$ [%]	n
Acetylcholin [100 μ M]	100,0	17
Iperoxo [1 μ M]	101,2 \pm 0,7	3
Phth-8-Iper [100 μ M]	98,8 \pm 4,9	5
Phth-6-Iper [100 μ M]	93,8 \pm 7,4	5
Naph-6-Iper [100 μ M]	93,8 \pm 5,1	4
McN-A-343 [100 μ M]	17,8 \pm 5,5*	4
Pilocarpin [100 μ M]	59,0 \pm 3,9*	4

Tab. 22: Maximal induzierbare, Basislinien-korrigierte dynamische Massenumverteilung durch muskarinische Liganden an Flp-InTMhM₂-CHO-Zellen normiert auf die durch Acetylcholin [100 μ M]-induzierte dynamische Massenumverteilung des jeweiligen Versuchstages. E_{max} : Maximale Zellantwort, Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) aus 3-17 Einzelversuchen, die je in Drei- oder Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. n: Anzahl unabhängiger Experimente je Testsubstanz. *: signifikant verschieden von Acetylcholin [100 μ M], (t-Test, $p < 0,05$).

Für die Agonisten, die in einem vorangegangenen Kapitel mittels Konzentrations-Effekt-Kurven charakterisiert wurden, wurde für einen Vergleich der Maxima eine Konzentration aus dem oberen Plateau der jeweiligen Konzentrations-Effekt-Kurve eingesetzt. Sowohl Iperoxo als auch die dualsterischen Verbindungen Phth-8-Iper, Phth-6-Iper sowie Naph-6-Iper wiesen keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich ihrer intrinsischen Aktivitäten gegenüber Acetylcholin auf (t-Test, $p < 0,05$). Die Testsubstanz McN-A-343, welche als Partialagonist an muskarinischen M₂-Rezeptoren publiziert ist (Lambrecht et al., 1993), zeigte auch hinsichtlich der dynamischen Massenumverteilung am M₂-Rezeptor nur einen schwachen intrinsischen Effekt (E_{max} : 17,82 \pm 5,48 %). A. Kebig (Dissertationsschrift 2010) konnte intrinsische Aktivitäten von 22 \pm 5 % für McN-A-343 und 44 \pm 5 % für Pilocarpin mit dem Epic[®]-Biosensor messen. Diese unterscheiden sich nicht signifikant von den hier ermittelten maximalen intrinsischen Aktivitäten (t-Test, $p > 0,05$). Alle anderen Testsubstanzen wiesen auch bei ihr einen Vollagonismus auf.

3.1.2. Einfluss erhöhter intrazellulärer cAMP-Spiegel (Forskolin) auf die Ligand-induzierte dynamische Massenumverteilung an hM₂-CHO-Zellen

Forskolin ist in der Lage die Adenylylcyclasen I-VIII (Tesmer und Sprang, 1998), nicht aber die Guanylylcyclasen (Hurley, 1998) direkt zu aktivieren. Dabei bindet es an eine spezifische Forskolin-Bindungsstelle der Adenylylcyclase und führt zu einer verstärkten Umsetzung von Adenosintriphosphat (ATP) in cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP). Da Forskolin auf diese Weise den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöht, imitiert es einen G_{α_s}-vermittelten, zellulären cAMP-Anstieg. Eine Vorstimulation mit einer sättigenden Forskolin-Konzentration von 10 µM (Dissertationsschrift Kebig, 2010) führt somit zu einer Maskierung der Aktivierung des G_s-Signaltransduktionsweges, da diese die Aktivität der Adenylylcyclase nicht weiter zu steigern vermag (Schröder et al., 2010).

3.1.2.1. Maximal induzierbare dynamische Massenumverteilung muskarinischer Liganden unter erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegeln (Forskolin)

Im Folgenden wurde die durch unterschiedliche Testsubstanzen induzierbare dynamische Massenumverteilung an hM₂-CHO-Zellen unter erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegeln untersucht. Zur Untersuchung der intrinsischen Aktivitäten wurde für jeden Liganden die maximale, noch in einem Rezeptor-vermittelten Signal resultierende Konzentration von 100 µM eingesetzt. Ziel dieser Untersuchungen war es zu prüfen, ob die intrinsische Aktivität der Testsubstanzen von erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegeln beeinflussbar war.

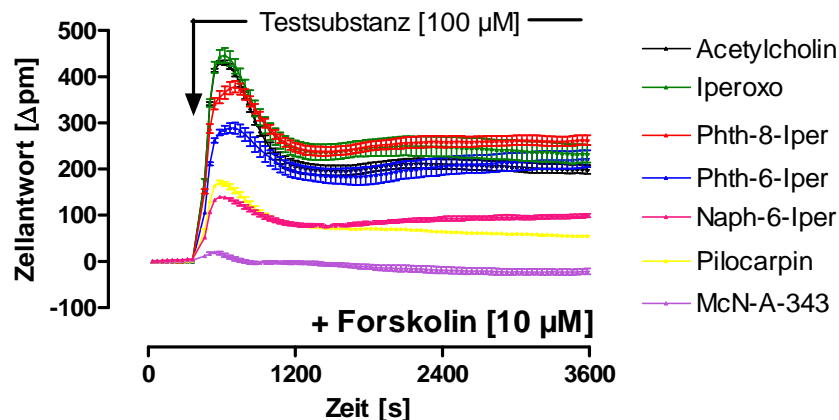


Abb. 16: Durch verschiedene muskarinische Liganden induzierte dynamische Massenumverteilung an Flp-InTMhM₂-CHO-Zellen nach Forskolin Vorstimulation [10 µM]. *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Der Pfeil stellt den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Mittelwerte ± Standardfehler eines repräsentativen Experimentes in Dreifachbestimmung, welches zwei- bis vierfach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration wurden durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert.

Alle hier untersuchten Agonisten zeigten auch nach einer Forskolin-Vorstimulation der Zellen eine positiv-gerichtete Wellenlängenverschiebung, die eine Signalspitze aufwies und anschließend wieder abfiel. Die Wellenlängenverschiebung war jeweils größer als solche, die ohne Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels erhoben wurden (siehe Abb. 15). Nachstehend soll die Quantifizierung der Wellenlängenverschiebung aller Testsubstanzen erfolgen.

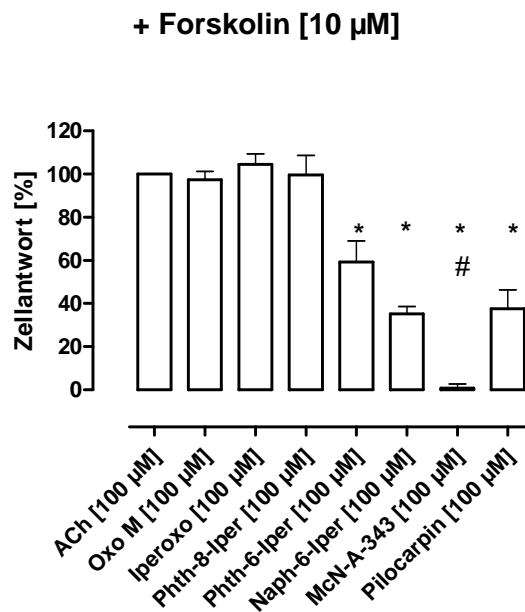


Abb. 17: Maximal induzierbare, Basislinien-korrigierte dynamische Massenumverteilung durch muskarinische Liganden an Flp-InTMhM₂-CHO-Zellen nach Forskolin-Vorstimulation, normiert auf die durch Acetylcholin [100 µM]-induzierte dynamische Massenumverteilung des jeweiligen Versuchstages. E_{max}: Maximale Zellantwort, Mittelwert ± Standardfehler (SEM) aus 3-5 Einzelversuchen, die je in Drei- oder Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. n: Anzahl unabhängiger Experimente je Testsubstanz. *: Signifikant verschieden von Acetylcholin [100 µM], (t-Test, p<0,05). #: nicht signifikant verschieden von 0 (t-Test, p>0,05).

Ergebnisse

M_2 wt	$E_{max} \pm SEM$ [%]	n
Acetylcholin [100 μ M]	100,0	5
Oxotremorin M [100 μ M]	97,5 \pm 3,7	4
Iperoxo [100 μ M]	104,5 \pm 4,8	4
Phth-8-Iper [100 μ M]	99,6 \pm 9,0	4
Phth-6-Iper [100 μ M]	59,3 \pm 9,7*	4
Naph-6-Iper [100 μ M]	35,3 \pm 3,2*	3
McN-A-343 [100 μ M]	0,9 \pm 1,7 *	4
Pilocarpin [100 μ M]	37,5 \pm 8,8*	4

Tab. 23: Maximal-induzierbare, Basislinien-korrigierte dynamische Massenumverteilung durch muskarinische Liganden an Flp-InTMhM₂-CHO-Zellen nach Forskolin-Vorstimulation, normiert auf die durch Acetylcholin [100 μ M]-induzierte dynamische Massenumverteilung des jeweiligen Versuchstages. E_{max} : Maximale Zellantwort, Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) aus 3-5 Einzelversuchen, die je in Drei- oder Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. n: Anzahl unabhängiger Experimente je Testsubstanz. *: Signifikant verschieden von Acetylcholin [100 μ M], (t-Test, $p < 0,05$).

Nach Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels durch eine Forskolin-Vorstimulation von 10 μ M über 2,5 h zeigte McN-A-343 keine M₂-vermittelte dynamische Massenumverteilung mehr, obwohl es ohne Forskolin-Vorstimulation als Partialagonist eingestuft werden konnte ($E_{max} = 17,82 \pm 5,48$ %). Die intrinsische Aktivität von Pilocarpin war im Vergleich zu der Messung unter Normalbedingungen ebenfalls erniedrigt ($E_{max} = 59,0 \pm 3,9$ % gegenüber $37,5 \pm 8,8$ %). Die dualsterischen Testsubstanzen Phth-6-Iper sowie Naph-6-Iper wiesen unter erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegeln nur noch einen Partialagonismus auf. Dies war insofern interessant, als dass sie ohne Vorbehandlung Vollagonisten darstellten (siehe 3.1.1.5). Die Forskolin-Vorstimulation der Zellen resultierte auch in den Voruntersuchungen von A. Kebig (Dissertationsschrift 2010) in einem Partialagonismus von Phth-6-Iper und Naph-6-Iper. Die Testsubstanz Phth-8-Iper stellte auch unter hier untersuchten erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegeln einen Vollagonisten dar, so dass der Verlust der Aktivitäten nicht in der dualsterischen Hybridstruktur begründet sein konnte.

3.1.3. Folgen einer $G\alpha_{i/o}$ -Inhibition (Pertussistoxin) auf die Ligand-induzierte dynamische Massenumverteilung an hM_2 -CHO-Zellen

Wie in der Einleitung beschrieben wurde ist seit langem bekannt, dass eine Aktivierung des muskarinischen M_2 -Rezeptors zu einer Kopplung an stimulatorische G-Proteine führen kann (Dittmann, 1994; Mistry et al., 2005). Für die systematische Analyse des Epic[®]-Signales war es unablässlich zu testen, inwiefern die alternativen Kopplungen des M_2 -Rezeptorsubtypes mit dem Ganzzellmessgerät detektiert werden können. Während die intrinsische Aktivität einzelner Substanzen bereits von A. Kebig (Dissertationsschrift 2010) nach einer Pertussistoxin-Vorbehandlung von hM_2 -CHO-Zellen vermessen wurde, konnten in dieser Arbeit erstmals Konzentrations-Effekt-Kurven von Agonisten unter PTX erhoben werden.

3.1.3.1. Acetylcholin-induzierte dynamische Massenumverteilung an hM_2 -CHO-Zellen

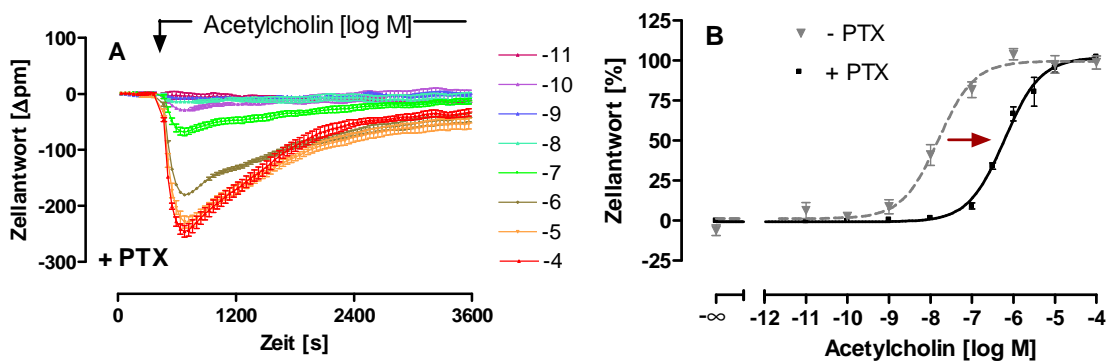


Abb. 18: Einfluss einer PTX-Vorinkubation auf die durch Acetylcholin-induzierte dynamische Massenumverteilung an hM_2 Flp-InTM-CHO-Zellen. **A:** *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Aufgetragen sind die logarithmierten molaren Konzentrationen von Acetylcholin sowie die durch die jeweilige Konzentration induzierte Zellantwort. Der Pfeil stellt den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Mittelwerte \pm Standardfehler eines repräsentativen Experimentes, welches in Dreifachbestimmung erhoben und dreifach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert. **B:** *Ordinate:* Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht dem unteren Plateau, 100 % dem oberen Plateau der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration. *Datenpunkte:* Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei bis vier voneinander unabhängigen Experimenten, die je als Drei- bzw. Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6). Konstanter Hill-Koeffizient von $n_H=1$.

M₂wt	pEC₅₀	E_{min} [%]	E_{max} [%]	n_H (frei)	n
Acetylcholin + PTX	6,21 ± 0,04*	-0,8 ± 1,1	101,9 ± 1,8	1,12 ± 0,10 n.s.	4
Acetylcholin -PTX	7,61 ± 0,11	1,6 ± 3,5	99,7 ± 3,2	0,96 ± 0,21 n.s.	3

Tab. 24: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Konzentrations-Effekt-Kurven von Acetylcholin an Flp-InTMhM₂-CHO-Zellen. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration, die zu einer halbmaximalen Zellantwort führt. E_{min}: Minimale Zellantwort (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven), E_{max}: Maximale Zellantwort (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven). Die Kenngrößen beruhen auf den Mittewertskurven aus Abb. 18; n_H(frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. n.s. nicht signifikant verschieden von n_H=1 (F-Test, p>0,05). n: Anzahl unabhängiger Experimente. *: signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße ohne PTX-Vorinkubation (t-Test, p<0,05).

Der endogene Transmitter Acetylcholin zeigte nach einer PTX-Vorbehandlung und somit einer Ausschaltung der Gα_{i/o}-Proteine eine negativ-gerichtete Wellenlängenverschiebung. Das an hM₂-CHO-Zellen ermittelte Signal resultierte zunächst in einer negativen Signalspitze, während es anschließend wieder in Richtung Basislinie anstieg (vergleiche 3.7.3.1.). Das unter PTX-Vorinkubation gemessene, negativ-gerichtete Signal konnte eindeutig auf eine Aktivierung muskarinischer Acetylcholinrezeptoren zurückgeführt werden, da es durch eine Vorinkubation mit Atropin [10 μM] komplett unterbunden werden konnte (siehe 8.3.).

Die Wirksamkeit von Acetylcholin lag unter PTX-Vorbehandlung signifikant unter der ohne PTX-Vorbehandlung (ΔpEC₅₀= 1,4 Dekaden; t-Test, p<0,05). R. Schrage (mündliche Mitteilung, Abteilung Pharmakologie & Toxikologie, Universität Bonn) konnte an den gleichen Zellen eine Differenz der Acetylcholin-Wirksamkeit von ΔpEC₅₀= 1,76 Dekaden messen. Mistry et al. (2005) fanden durch Messung intrazellulärer cAMP-Spiegel für Methacholin einen pEC₅₀-Wert von 5,37 ± 0,08 nach einer PTX-Vorinkubation gegenüber einem pEC₅₀-Wert von 6,64 ± 0,10 ohne PTX-Vorbehandlung. Die Differenz der pEC₅₀-Werte von 1,27 Dekaden liegt in der Größenordnung der für Acetylcholin in dieser Arbeit gemessenen Differenz von 1,4 Dekaden.

3.1.3.2. Iperoxo-induzierte dynamische Massenumverteilung an hM₂-CHO-Zellen

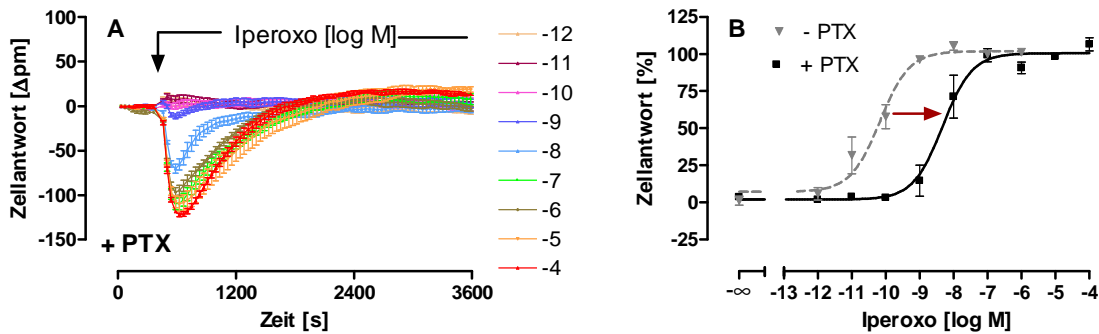


Abb. 19: Einfluss einer PTX-Vorinkubation auf die durch Iperoxo-induzierte dynamische Massenumverteilung an hM₂ Flp-InTM-CHO-Zellen. **A:** *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Aufgetragen sind die logarithmierten, molaren Konzentrationen von Iperoxo sowie die durch die jeweilige Konzentration induzierte Zellantwort. Der Pfeil stellt den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Mittelwerte ± Standardfehler eines repräsentativen Experimentes, welches in Dreifachbestimmung erhoben und dreifach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert. **B:** *Ordinate:* Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht dem unteren Plateau, 100 % dem oberen Plateau der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration. *Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler aus vier voneinander unabhängigen Experimenten, die je als Drei- bzw. Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6). Konstanter Hill-Koeffizient von n_H=1.

M ₂ wt	pEC ₅₀	E _{min} [%]	E _{max} [%]	n _H (frei)	n
Iperoxo + PTX	8,32 ± 0,12*	1,9 ± 2,9	100,6 ± 3,6	1,27 ± 0,31 n.s.	3
Iperoxo - PTX	10,17 ± 0,12	7,2 ± 4,0	101,9 ± 3,2	0,67 ± 0,13 n.s.	3

Tab. 25: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Konzentrations-Effekt-Kurven von Iperoxo an Flp-InTMhM₂-CHO-Zellen. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration, die zu einer halbmaximalen Zellantwort führt. E_{min}: Minimale Zellantwort (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve), E_{max}: Maximale Zellantwort (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). Die Kenngrößen beruhen auf den Mittelwertskurven aus Abb. 19. n_H(frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. n.s.: nicht signifikant verschieden von n_H=1 (F-Test, p>0,05); n: Anzahl unabhängiger Experimente. *: signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße ohne PTX-Vorinkubation (t-Test, p<0,05).

Wie Acetylcholin führte auch eine Zugabe des orthosterischen Agonisten Iperoxo nach PTX-Vorbehandlung der Zellen am M₂-Rezeptorsubtyp zu einer negativ-gerichteten Wellenlängenverschiebung. Für eine maximale Iperoxo-Konzentration von 1 μM unter PTX konnte ein solcher Signalverlauf bereits bei Antony et al. (2009) gezeigt werden. Die Wirksamkeit von Iperoxo unter PTX wurde erstmals in vorliegender Arbeit bestimmt. Sie war gegenüber der Wirksamkeit ohne PTX-Vorbehandlung signifikant erniedrigt (t-Test, p<0,05). Die Rechtsverschiebung des Wendepunktes war mit 1,85 Dekaden sogar größer als die des endogenen Liganden Acetylcholin (1,4 Dekaden). R. Schrage

(mündliche Mitteilung, Abteilung Pharmakologie & Toxikologie, Universität Bonn) konnte an PTX-vorbehandelten hM₂-CHO-Zellen eine Iperoxo-Wirksamkeit von pEC₅₀ = 8,44 ± 0,20 messen, die mit der in dieser Arbeit erhaltenen Wirksamkeit sehr gut übereinstimmt.

3.1.3.3. Maximal induzierbare dynamische Massenumverteilung muskarinischer Liganden nach Gα_{i/o}-Inhibition (Pertussistoxin) an hM₂-CHO-Zellen

Zuerst soll ein repräsentatives Experiment der Wellenlängenverschiebung der bisher nicht in dieser Arbeit unter PTX an hM₂-CHO-Zellen charakterisierten Liganden gezeigt werden. Da keine Wirksamkeiten hinsichtlich der dynamischen Massenumverteilung bekannt waren, wurde jeweils eine Konzentration von 100 µM eingesetzt.

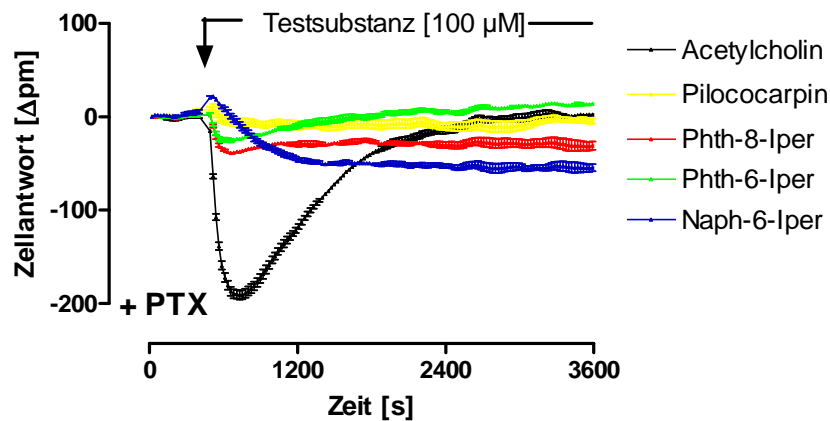


Abb. 20: Einfluss einer PTX-Vorinkubation auf die durch verschiedene Liganden induzierte dynamische Massenumverteilung an hM₂ Flp-InTM-CHO-Zellen. *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Der Pfeil stellt den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Mittelwerte ± Standardfehler eines repräsentativen Experimentes, welches in Dreifachbestimmung erhoben und zwei- bis achtfach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert.

Obige Abbildung spiegelt die durch verschiedene Agonisten an hM₂-CHO-Zellen induzierbare dynamische Massenumverteilung nach Inhibition der Gα_i-Proteine wider. Es wird deutlich, dass Acetylcholin zu einem negativ-gerichteten Signal führte, während alle weiteren Testsubstanzen keine DMR mehr induzierten. Iperoxo wurde bereits im vorangegangenen Abschnitt besprochen und zeigte wie Acetylcholin eine konzentrationsabhängige DMR. Im Folgenden sollte die Quantifizierung der Maxima erfolgen.

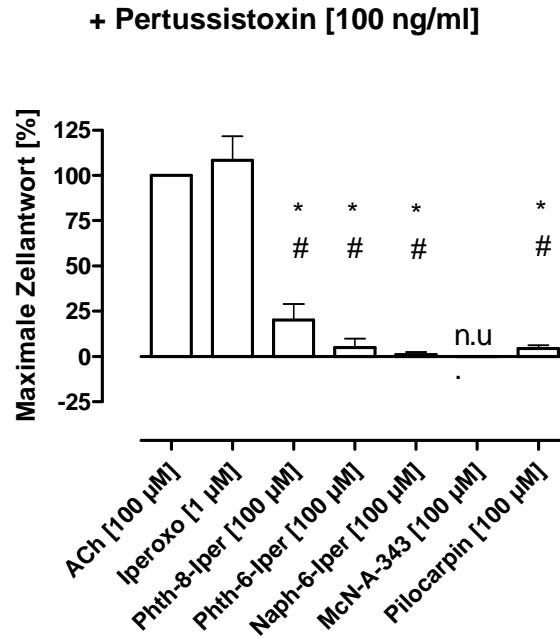


Abb. 21: Maximal induzierbare, Basislinien-korrigierte dynamische Massenumverteilung an hM₂Flp-InTM-CHO-Zellen durch muskarinische Liganden nach PTX-Vorinkubation. *Ordinate:* Prozentuale maximale Zellantwort normiert auf die durch Acetylcholin [100 µM]-induzierte Massenumverteilung. 0 % entspricht keiner Zellantwort, 100 % der durch Acetylcholin [100 µM]-ausgelösten Zellantwort. *Abszisse:* Untersuchte Liganden mit eingesetzter Konzentration, Mittelwerte ± Standardfehler aus 3-9 voneinander unabhängigen Experimenten, jeweils in Drei- oder Vierfachbestimmung erhoben. n.u.: nicht untersucht. Zu dieser Testsubstanz liegen keine Daten unter PTX-Vorbehandlung vor. *: signifikant verschieden von ACh [100 µM], (t-Test, p<0,05). #: Nicht signifikant verschieden von 0 (t-Test, p>0,05).

M ₂ wt +PTX	E _{max} ± SEM [%]	n
Acetylcholin [100 µM]	100,0	9
Iperoxo [1 µM]	108,4 ± 13,9	3
Phth-8-Iper [100 µM]	20,2 ± 8,8*#	3
Phth-6-Iper [100 µM]	4,9 ± 5,1*#	4
Naph-6-Iper [100 µM]	1,0 ± 1,5*#	4
McN-A-343 [100 µM]	-	-
Pilocarpin [100 µM]	4,4 ± 1,9*#	3

Tab. 26: Maximal-induzierbare, Basislinien-korrigierte dynamische Massenumverteilung durch muskarinische Liganden nach PTX-Vorinkubation an Flp-InTMhM₂-CHO-Zellen normiert auf die durch Acetylcholin [100 µM]-induzierte dynamische Massenumverteilung des jeweiligen Versuchstages. E_{max}: Maximale Zellantwort, Mittelwert ± Standardfehler (SEM) aus 3-9 Einzelversuchen, die je in Drei- oder Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. n: Anzahl unabhängiger Experimente je Testsubstanz. *: signifikant verschieden von ACh [100 µM], (t-Test, p<0,05). #: Nicht signifikant verschieden von 0 (t-Test, p>0,05).

Die Testsubstanz Iperoxo wurde in einer zu Acetylcholin [100 μM] äquieffektiven Konzentration von 1 μM eingesetzt, die der Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurve entnommen werden konnte (siehe 3.1.3.2.). Unter PTX-Vorbehandlung zeigte nur die rein orthosterisch bindende Substanz Iperoxo gegenüber Acetylcholin [100 μM] einen vollagonistischen Effekt. Die dualsterisch bindenden Hybridverbindungen Phth-8-Iper, Phth-6-Iper und Naph-6-Iper waren auch in supramaximalen Konzentrationen nicht mehr in der Lage den muskarinischen M_2 -Rezeptor zu aktivieren (t-Test, $p > 0,05$). Dies konnte bereits für Phth-6-Iper sowie Naph-6-Iper in der Publikation von Antony et al. (2009) und für Phth-8-Iper in der Dissertationsschrift von A. Kebig (2010) gezeigt werden. Der muskarinische Partialagonist Pilocarpin (Freedman et al., 1988; McKinney et al., 1991) zeigte keine messbare dynamische Massenumverteilung nach PTX-Vorinkubation. Mit einer Konzentration von 100 μM wurde die maximal mögliche, nicht in unspezifischen Effekten resultierende Pilocarpin-Konzentration gewählt (siehe 8.2.1.). Messungen des intrazellulären cAMP-Spiegels von Mistry et al. (2005) an PTX-vorbehandelten CHO-Zellen zeigten allerdings, dass sich die eingesetzte Pilocarpin-Konzentration nicht im oberen Plateau der Konzentration-Effekt-Kurve befand und Pilocarpin bei höheren Konzentrationen durchaus in der Lage war, den Rezeptor zu aktivieren. Aufgrund einer nur sehr schwachen $G\alpha_i$ -Aktivierung der Testsubstanz McN-A-343 am muskarinischen M_2 -Rezeptor (E_{max} : $17,82 \pm 5,48$ %) wurde sie nicht unter PTX getestet.

3.1.4. Phth-6-Iper-induzierte dynamische Massenumverteilung nach Inhibition oder Maskierung verschiedener Signaltransduktionswege an hM_2 -CHO-Zellen

Mit dem von Chromobakterien sp. QS3366-produzierten cyclischen Depsipeptid YM 254890 (YM) sollte erstmals ein selektiver $G\alpha_q$ -Inhibitor (Takasaki et al., 2004) im Epic[®]-Messgerät eingesetzt werden. Dieser verhindert den Austausch von GDP gegen GTP an der $G\alpha_q$ -Untereinheit und unterbindet somit die G_q -vermittelte Signaltransduktion (Orth et al., 2005; Canals et al., 2006). Die zur Inhibition des G_q -Signaltransduktionsweges notwendige YM-Konzentration wurde zuvor an hM_3 -CHO-Zellen ermittelt (siehe 3.3.2.) und müsste aufgrund der nicht präferenziellen Kopplung des M_2 -Rezeptorsubtypes an $G_{q/11}$ -Proteine auch für den M_2 -Rezeptorsubtyp ausreichen. Durch die Vorinkubation der hM_2 -CHO-Zellen mit YM 254890 sollte überprüft werden, ob dem durch Phth-6-Iper-induziertem DMR-Signal eine $G\alpha_{q/11}$ -Protein-Aktivierung zu Grunde lag. Darüberhinaus wurde eine Vorstimulation der hM_2 -CHO-Zellen mit Cholera toxin vorgenommen. Cholera toxin (CTX) gehört wie Pertussis toxin zur Gruppe der ADP-ribosylierenden Toxine, aktiviert aber selektiv die $G\alpha_s$ -Untereinheit des G-

Proteins im aktiven Zustand. Die in dieser Arbeit eingesetzte Konzentration von (100ng/ml; 20 h) führte zu einem maximalen Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels, da in Folge dessen der direkte Adenylylcyclase-Aktivator Forskolin keine weitere DMR mehr hervorrufen konnte (vergleiche 3.4.2.).

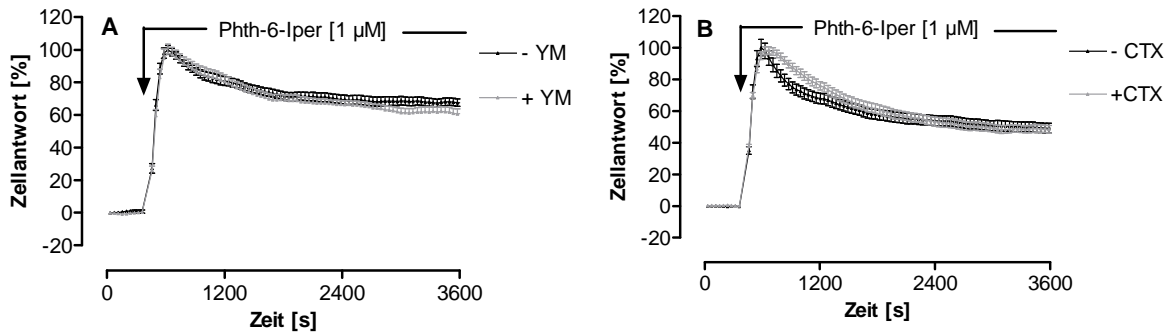


Abb. 22: Einfluss einer YM 254890 Vorinkubationen (**A**) bzw. einer CTX-Vorstimulation (**B**) auf die durch Phth-6-Iper-induzierte dynamische Massenumverteilung an Flp-InTMhM₂-CHO-Zellen. **A, B:** *Ordinate:* Prozentuale, Basislinien-korrigierte Zellantwort [%], normiert auf die jeweilige Kontrolle ohne Vorinkubation. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Substanzzugabe an. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Mittelwerte \pm Standardfehler eines repräsentativen Experimentes, welches in Dreifachbestimmung erhoben und zweifach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Vorinkubation sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert.

Phth-6-Iper zeigte nach Vorinkubation der hM₂-CHO-Zellen mit YM 254890 oder CTX ein nicht signifikant verschiedenes Signal gegenüber der Kontrolle. Da durch Cholera toxin der G_s-Signaltransduktionsweg maskiert und durch YM 254890 der G_{αq/11}-Signalweg unterbunden werden kann (siehe dazu 3.2.2. sowie 3.3.2.), konnte erstmals gezeigt werden, dass dem Phth-6-Iper-vermittelten Signal über den M₂-Rezeptorsubtyp lediglich eine G_{i/o}-Aktivierung zu Grunde lag.

3.2. Messung der Agonist-induzierten dynamischen Massenumverteilung an h β_2 -CHO-Zellen

Der adrenerge β_2 -Rezeptor ist ein präferenziell $G\alpha_s$ -gekoppelter Rezeptor (Moffett et al. 1993, Daaka et al. 1997), der bei Aktivierung zu einem Austausch von GDP gegen GTP an der α -Untereinheit des G-Proteins führt und somit die weitere Signaltransduktion initiiert. Er diente aufgrund seiner bevorzugten $G\alpha_s$ -Aktivierung als Untersuchungsoption für eine G_s -vermittelte dynamische Massenumverteilung. Zusätzlich zu einer G_s -Kopplung gibt es Hinweise auf die Aktivierung weiterer G-Proteine: $G\alpha_{i/o}$ (Asano et al., 1984; Daaka et al., 1997), $G\alpha_{q/11}$ (Zhu et al., 1994), $G\alpha_{16}$ (Wu et al., 1995). Ziel dieser Versuchsreihe war es erstmals ein Rezeptor-vermitteltes G_s -Signal systematisch mit dem Epic[®]-Biosensor zu analysieren, um einen besseren Einblick in das neue Ganzzellmesssystem zu erhalten. Vor dem Einsatz der Liganden erfolgte eine Überprüfung der Signalspezifität. Dazu wurden untransfizierte CHO K1-Zellen verwendet und getestet, ob eine Ligand-Konzentration von 100 μ M eine nicht Rezeptor-vermittelte Zellantwort hervorruft. Es konnte gezeigt werden, dass alle in dieser Arbeit eingesetzten adrenergen Liganden in einer Konzentration von 100 μ M kein unspezifisches Signal hervorriefen (siehe dazu 8.2.2.). Die Versuchsdurchführung erfolgte analog des im Material- & Methodenteil ausführlich dargelegten Protokolls. An allen Versuchstagen wurde Propranolol in einer supramaximalen Konzentration [10 μ M] zur Überprüfung der konstitutiven Rezeptoraktivität mitgeführt.

3.2.1. Messung ohne Vorinkubation der Zellen

Zur Untersuchung der Rezeptor-vermittelten dynamischen Massenumverteilung wurden unterschiedliche Liganden des adrenergen β_2 -Rezeptors eingesetzt und die Wirksamkeit und intrinsische Aktivität mit Literaturdaten anderer Messmethoden verglichen.

3.2.1.1. Vergleich unterschiedlicher Auswertungsmethoden zur Erhebung von Orciprenalin-Konzentrations-Effekt-Kurven an $h\beta_2$ -CHO-Zellen

Zuerst wurde das durch verschiedene Orciprenalin-Konzentrationen induzierte Signal in $h\beta_2$ -CHO-Zellen betrachtet.

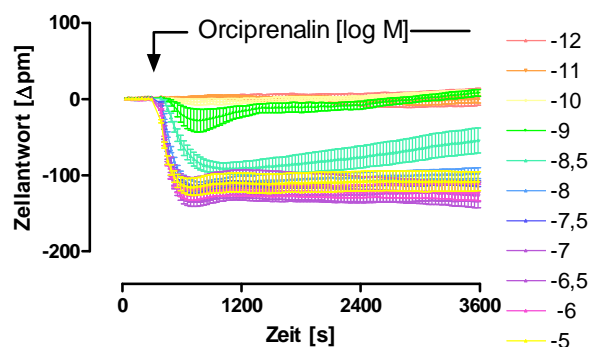


Abb. 23: Orciprenalin-induzierte dynamische Massenumverteilung an β_2 -CHO-Zellen. *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δ pm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Aufgetragen sind die logarithmierten, molaren Konzentrationen von Orciprenalin sowie die durch die jeweilige Konzentration induzierte Zellantwort. Der Pfeil stellt den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Mittelwerte \pm Standardfehler eines repräsentativen Experimentes, welches in Dreifachbestimmung erhoben und dreifach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert.

Bei der Zugabe von Orciprenalin zu stabil mit der β_2 -Rezeptor-cDNA transfizierten CHO-Zellen erfolgte in den ersten 1200 s eine starke negative Wellenlängenverschiebung, anschließend verblieb das Signal meist parallel zur Basallinie. Vor der Erhebung von Konzentrations-Effekt-Kurven adrenerger Liganden mittels Epic[®]-Biosensor war es obligatorisch zu testen, welche Analyseverfahren geeignet war, um die resultierenden Signalverläufe zu charakterisieren. Dazu wurden möglichst verschiedene Aspekte miteinander verglichen.

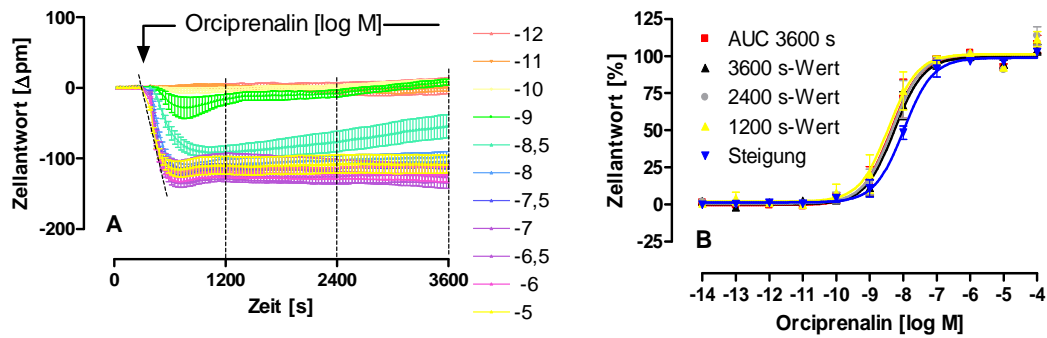


Abb. 24: Orciprenalin-induzierte dynamische Massenumverteilung an β_2 -CHO-Zellen. **A:** *Ordinate:* Basislinien-korrigierte Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Aufgetragen sind die logarithmierten, molaren Konzentrationen von Orciprenalin sowie die durch die jeweilige Konzentration induzierte Zellantwort. Der Pfeil stellt den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Mittelwerte \pm Standardfehler eines repräsentativen Experimentes, welches in Vierfachbestimmung erhoben und dreifach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden. Eingefügte gestrichelte Linien zeigen die für die Erhebung von Konzentrations-Effekt-Kurven untersuchten Ableszeitpunkte. **B:** *Ordinate:* Basislinien-korrigierte, prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht dem unteren Plateau, 100 % dem oberen Plateau der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration. *Datenpunkte:* Mittelwerte \pm Standardfehler aus vier voneinander unabhängigen Experimenten, die je als Drei- bzw. Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), Konstanter Hill-Koeffizient von $n_H=1$.

Obige Abbildung zeigt unterschiedliche Ableszeitpunkte, die für die Berechnung von Konzentrations-Effekt-Kurven eines G_s -gekoppelten Rezeptors verglichen wurden. Abgesehen von der Analyse der Signalspitze, die bei Orciprenalin nicht auftrat, wurden die gleichen Ableszeitpunkte gewählt, wie im vorangegangenen Kapitel für das über hM_2 -CHO-Zellen-vermittelte Signal.

Analysierte Datenpunkte	pEC ₅₀ ± SEM	E _{min} [%]	E _{max} [%]	n _H (frei) ± SEM
Wert nach 1200 s	8,43 ± 0,12	2,0 ± 3,2	101,4 ± 3,3	1,09 ± 0,24 n.s.
Wert nach 2400 s	8,33 ± 0,11	0,8 ± 2,7	100,3 ± 3,0	1,12 ± 0,23 n.s.
Wert nach 3600 s	8,27 ± 0,07	0,3 ± 1,9	99,5 ± 2,2	1,24 ± 0,21 n.s.
AUC 3600 s	8,34 ± 0,11	0 ± 2,7	100,2 ± 3,0	1,12 ± 0,22 n.s.
Steigungstangente	7,99 ± 0,06	1,4 ± 1,4	98,0 ± 1,7	1,01 ± 0,14 n.s.

Tab. 27: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Konzentrations-Effekt-Kurven von Orciprenalin an β_2 -CHO-Zellen. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration, die zu einer halbmaximalen Zellantwort führt. E_{min}: Minimale Zellantwort (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve), E_{max}: Maximale Zellantwort (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). Die Kenngrößen beruhen auf den Mittelwertskurven aus Abb. 24; n_H(frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. n.s.: nicht signifikant verschieden von n_H=1 (F-Test, p>0,05).

Zwischen den Wirksamkeiten des Agonisten der unterschiedlichen Auswertungsmethoden ergab sich kein signifikanter Unterschied (t-Test, p>0,05). Somit scheint auch das über den G_s-gekoppelten adrenergen β_2 -Rezeptor erhobene Signal über die Gesamtmessdauer von 3600 s stabil zu verlaufen. Ein derartiger Befund konnte ebenso für den präferenziell G_{i/o}-gekoppelten muskarinischen M₂-Rezeptor gezeigt werden (siehe 3.1.1.1.). Dennoch dürfen diese Resultate nicht pauschalisiert werden und es empfiehlt sich einen Vergleich verschiedener Auswertungsmethoden für andere Rezeptoren oder Liganden vorzunehmen.

Orciprenalin zeigte hinsichtlich der dynamischen Massenumverteilung eine hohe Wirksamkeit mit einem pEC₅₀-Wert von 8,34 ± 0,06. Der mittels FRET-basierter cAMP-Messung an den gleichen Zellen erhobene Wendepunkt lag bei pEC₅₀: 7,34 ± 0,03 (Schröder et al., 2010), was eine signifikant niedrigere Wirksamkeit darstellt (t-Test, p<0,05). Untersuchungen von O'Donnell (1970) an der Meerschweinchen-Trachea ergaben für Orciprenalin einen pEC₅₀-Wert von 6,90 ± 0,31, der sich ebenfalls signifikant von der in dieser Arbeit erhobenen Wirksamkeit unterscheidet (t-Test, p<0,05). Die intrinsische Aktivität wurde im Folgenden separat bestimmt.

3.2.1.2. Maximal induzierbare dynamische Massenumverteilung adrenerger Liganden an $h\beta_2$ -CHO-Zellen

Im folgenden Abschnitt sollte der Signalverlauf unterschiedlicher adrenerger Agonisten an β_2 -CHO-Zellen untersucht und die intrinsische Aktivität miteinander verglichen werden. Adrenalin ist endogener Ligand adrenerger Rezeptoren und per definitionem ein Vollagonist. Aufgrund dessen wurden die intrinsischen Aktivitäten der anderen Testsubstanzen auf die durch Adrenalin 100 μ M induzierte Zellantwort normiert. Dopamin ist endogener Transmitter dopaminerger Rezeptoren und als biogenes Amin Edukt von Noradrenalin und Adrenalin, den endogenen Botenstoffen adrenerger Rezeptoren. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit ist Dopamin ebenfalls in der Lage an den adrenergen β_2 -Rezeptor zu binden und diesen zu aktivieren (Gupta et al., 1970; Goldberg, 1972). Da für diese Substanzen keine Konzentrations-Effekt-Kurve erhoben wurden, wurde eine Konzentration von 100 μ M eingesetzt. Diese erwies sich für alle Liganden als spezifisch über den Adrenozeptor wirkend, da an untransfizierten Kontrollzellen kein Signal auftrat (siehe 8.2.2.).

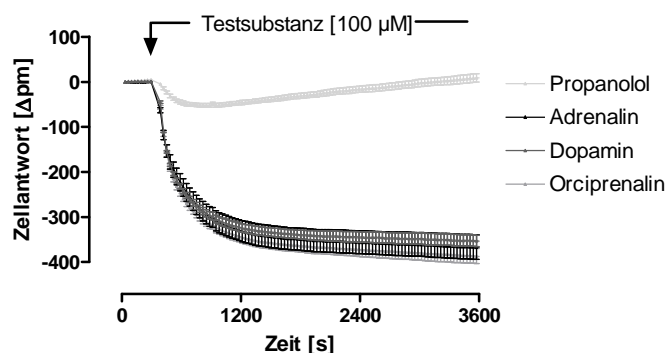


Abb. 25: Durch verschiedene adrenerge Liganden-induzierte dynamische Massenumverteilung an β_2 -CHO-Zellen. *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δ pm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Der Pfeil stellt den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Mittelwerte \pm Standardfehler eines repräsentativen Experimentes, welches in Dreifachbestimmung erhoben und zwei- bis vierfach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert.

Die adrenergen Testsubstanzen Adrenalin, Dopamin und Orciprenalin zeigten einen gleichartigen Signalverlauf. Darüberhinaus unterschieden sich die Signalverläufe hinsichtlich ihrer maximalen Auslenkung nicht. Propranolol war nicht in der Lage ein Rezeptor-vermitteltes Signal zu induzieren.

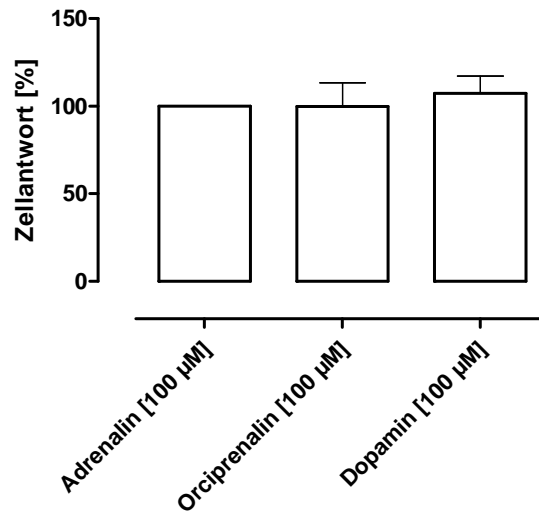


Abb. 26: Maximal-induzierbare, Basislinien-korrigierte dynamische Massenumverteilung adrenerger Liganden. *Ordinate:* Prozentuale, maximale Zellantwort normiert auf die durch Adrenalin [100 µM]-induzierte Massenumverteilung. 0 % entspricht keiner Zellantwort, 100 % der durch Adrenalin [100 µM]-ausgelösten Zellantwort. *Abszisse:* Untersuchte Liganden mit eingesetzter Konzentration, Mittelwerte ± Standardfehler aus drei bis fünf voneinander unabhängigen Experimenten, jeweils in Zwei- bis Vierfachbestimmung erhoben.

β_2 wt	$E_{max} \pm SEM$ [%]	n
Adrenalin [100 µM]	100,0	5
Orciprenalin [100 µM]	99,7 ± 13,6	5
Dopamin [100 µM]	107,4 ± 9,8	3

Tab. 28: Maximal-induzierbare, Basislinien-korrigierte dynamische Massenumverteilungen adrenerger Liganden an β_2 -CHO-Zellen normiert auf die durch Adrenalin [100 µM]-induzierte dynamische Massenumverteilung des jeweiligen Versuchstages. E_{max} : Maximale Zellantwort, Mittelwert ± Standardfehler (SEM) aus drei bis fünf Einzelversuchen, die je in Zwei- bis Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. n: Anzahl unabhängiger Experimente je Testsubstanz.

Orciprenalin und Dopamin waren in der Lage eine maximale dynamische Massenumverteilung am adrenergen β_2 -Rezeptor zu induzieren. Orciprenalin zeigte bei Malta & Raper (1976) eine im Vergleich zu Isoprenalin gleich starke intrinsische Aktivität durch Messung der Herztätigkeit von Katzen. Weitzl und Seifert (2002) fanden für Dopamin in stabil mit dem β_2 -G_s α_L -Fusionsprotein-transfizierten Sf9-Zellen im GTPase Messansatz eine intrinsische Aktivität von 82 % (77-88 %: 95 % Konfidenzintervall, normiert auf Isoprenalin) und somit einen starken Partialagonismus.

3.2.2. Orciprenalin-induzierte dynamische Massenumverteilung nach Inhibition oder Maskierung verschiedener Signaltransduktionswege an $h\beta_2$ -CHO-Zellen

Ziel der nachfolgenden Untersuchungen war es, herauszufinden, welcher Signalweg bzw. welche Signalwege dem durch Orciprenalin an $h\beta_2$ -CHO-Zellen induzierten Epic[®]-Signal zu Grunde lagen. Dazu wurde eine Orciprenalin-Konzentration von 30 nM gewählt, die sich nicht im oberen Plateau der Orciprenalin-Konzentrations-Effekt-Kurve befand, um einen Einfluss einer Signalwegsinhibition erkennen zu können. Als Inhibitor des G_{α_i} -Signaltransduktionsweges wurde Pertussis toxin [100 ng/ml] und zur Maskierung des G_{α_s} -Signalweges Choleratoxin [100 ng/ml] eingesetzt. Eine G_{α_q} -Aktivierung wurde mit dem Toxin YM 254890 [300 nM] verhindert.

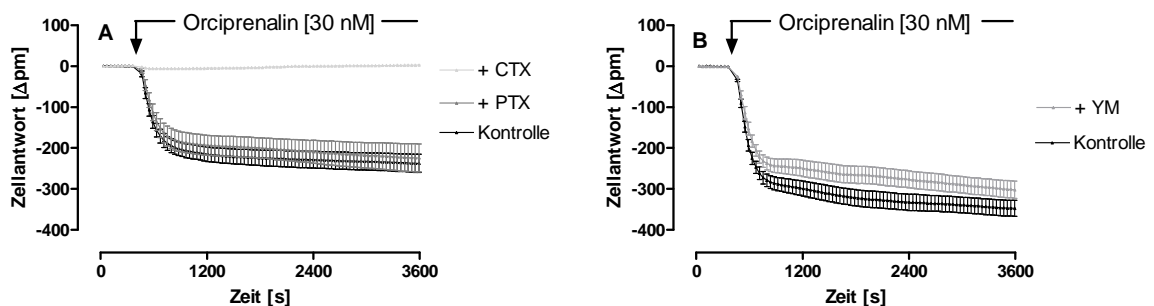


Abb. 27: Einfluss verschiedener Vorinkubationen auf die durch Orciprenalin-induzierte dynamische Massenumverteilung an β_2 -CHO-Zellen. **A, B:** Ordinate: Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δ pm]. Abszisse: Messdauer in Sekunden [s]. Mittelwerte \pm Standardfehler zweier repräsentativer Experimente, welche in Vierfachbestimmung erhoben und zweifach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurden. Alle Messpunkte einer Vorinkubation sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert. PTX: Pertussis toxin, CTX: Choleratoxin, YM: YM 254890

Orciprenalin führte ohne Vorinkubation zu einer bereits beschriebenen, starken Wellenlängenverschiebung in den negativen Bereich (siehe 3.2.1.1.) und wurde bei jedem dieser Versuche als Kontrolle mitgeführt. Eine Vorinkubation mit Pertussis toxin [100 ng/ml] über Nacht führte zu keinem verringerten Signal von Orciprenalin. Da Pertussis toxin in der Lage ist die $G_{\alpha_{i/o}}$ -Untereinheit an seiner Aktivierung zu hindern, würde eine β_2 -Rezeptor-vermittelte $G_{i/o}$ -Aktivierung in einem veränderten Signal resultieren. Da kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle messbar war, konnte davon auszugehen werden, dass der hier untersuchte β_2 -Rezeptor unter diesen Messbedingungen nicht an $G_{i/o}$ -Proteine koppelt. In der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben bezüglich der β_2 -vermittelten $G_{\alpha_{i/o}}$ -Aktivierung. So behaupten Friedman et al. (2002), dass ein Wechsel der β_2 -induzierten G_s -Kopplung hin zu einer $G_{\alpha_{i/o}}$ -Kopplung nicht existiere, während Lefkowitz et al. (2002) von einer Zellklon-abhängigen β_2 - $G_{i/o}$ -Kopplung sprechen, die somit nicht bei jedem Zellklon auftritt. Mit

Choleratoxin [100 ng/ml, ca. 20 h] war eine Maskierung des Orciprenalin-induzierten Signals möglich, da der Agonist keine weitere Zellantwort hervorrief. Nach einer Vorinkubation mit YM 254890 über 2,5 h war kein Unterschied zur Kontrolle sichtbar. Somit zeigte der adrenerge β_2 -Rezeptor unter den gewählten Versuchsbedingungen lediglich eine G_s -Kopplung, wie es seiner präferenziellen Kopplung entspricht.

3.3. Messung der Agonist-induzierten dynamischen Massenumverteilung an Flp-InTMhM₃-CHO-Zellen

Der muskarinische M₃-Rezeptorsubtyp ist ein präferenziell G $\alpha_{q/11}$ -gekoppelter Rezeptor (Caulfield & Birdsall, 1998) und diente als solcher erstmals der systematischen Analyse G $\alpha_{q/11}$ -vermittelter dynamischer Massenumverteilung. Es gibt zudem Literaturhinweise, dass der M₃-Rezeptorsubtyp zusätzlich in der Lage ist weitere G-Proteine zu aktivieren (Dai et al., 1991, Jones et al., 1991, Offermanns et al., 1994). Ob eine solche Kopplung mittels des Epic[®]-Biosensors nachgewiesen werden kann, sollte im Folgenden ebenso überprüft werden. Zur Überprüfung der Signalspezifität der eingesetzten Liganden wurden untransfizierte Flp-InTMCHO-Zellen verwendet und durch Austestung unterschiedlicher Ligand-Konzentrationen die maximal mögliche, noch spezifisch wirkende Konzentration ermittelt. Alle am M₃-Rezeptor verwendeten muskarinischen Liganden konnten in Konzentrationen von 100 μ M problemlos eingesetzt werden (siehe dazu 8.2.1.). Die intrinsische Aktivität der untersuchten Liganden wurde jeweils separat bestimmt und wird am Ende jedes Kapitels besprochen.

3.3.1. Messung ohne Vorinkubation der Zellen

Zur Analyse des M₃-Rezeptorsubtyps wurde zunächst der unveränderte Zellkontext untersucht.

3.3.1.1. Vergleich unterschiedlicher Auswertungsmethoden zur Erhebung von Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurven an hM₃-CHO-Zellen

Da nicht bekannt war, welcher Messzeitpunkt bzw. welche Analysemethode sich zur Erhebung von Konzentrations-Effekt-Kurven aus den Signalen der Messung der G $\alpha_{q/11}$ -vermittelten dynamischen Massenumverteilung eignete, wurden unterschiedliche Aspekte miteinander verglichen. Dazu wurde die Zellantwort des endogenen muskarinischen Liganden Acetylcholin herangezogen.

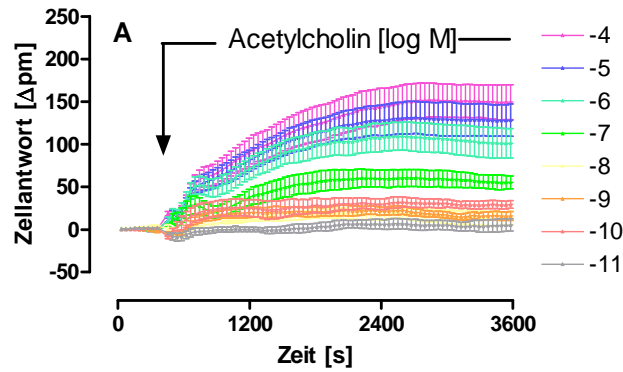


Abb. 28: Acetylcholin-induzierte dynamische Massenumverteilung an Flp-InTMhM₃-CHO-Zellen. **A:** *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Aufgetragen sind die logarithmierten, molaren Konzentrationen von Acetylcholin sowie die durch die jeweilige Konzentration induzierte Zellantwort. Der Pfeil stellt den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Mittelwerte ± Standardfehler eines repräsentativen Experimentes, welches in Vierfachbestimmung erhoben und dreifach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert.

Acetylcholin zeigte am muskarinischen M₃-Rezeptorsubtyp eine positiv gerichtete dynamische Massenumverteilung. Diese resultierte in der Ausbildung eines Plateaus nach ungefähr einer Stunde Messdauer. Dadurch unterschied sich das M₃-vermittelte Epic[®]-Signal in Form und Ausrichtung von den bisher untersuchten Gα_{i/o}- und Gα_s-induzierten Signalen (vergleiche 3.1.1. und 3.2.1.). Im Folgenden sollten nun unterschiedliche Analyseverfahren zur Erhebung von Agonist-vermittelten Konzentrations-Effekt-Kurven an hM₃-CHO-Zellen miteinander verglichen werden, um zu überprüfen, ob der gewählte Zeitpunkt einen Einfluss auf die Wirksamkeit ausübt.

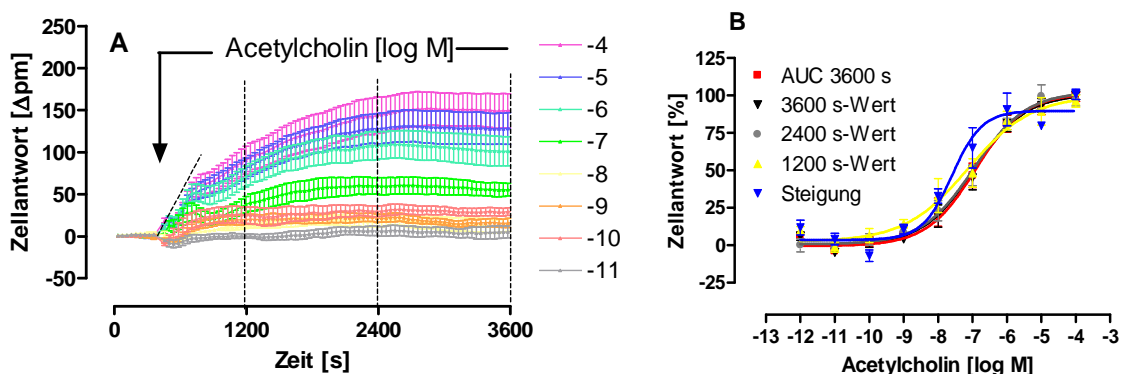


Abb. 29: Acetylcholin-induzierte dynamische Massenumverteilung an Flp-InTMhM₃-CHO-Zellen. **A:** *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Aufgetragen sind die logarithmierten, molaren Konzentrationen von Acetylcholin sowie die durch die jeweilige Konzentration induzierte Zellantwort. Der Pfeil stellt den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Mittelwerte ± Standardfehler eines repräsentativen Experimentes, welches in Vierfachbestimmung erhoben und dreifach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration sind durch eine

Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert. Eingefügte gestrichelte Linien zeigen die gewählten Ablesezeitpunkte an. **B**: *Ordinate*: Basislinien-korrigierte, prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht dem unteren Plateau, 100 % dem oberen Plateau der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven. *Abszisse*: Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration. *Datenpunkte*: Mittelwerte \pm Standardfehler aus vier voneinander unabhängigen Experimenten, die je als Drei- bzw. Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. *Kurvenanpassung*: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient $n_H = 1$ für die durch Analyse der Steigungstangente ermittelte Kurvensteilheit, variabler Hill-Koeffizient für alle weiteren Konzentrations-Effekt-Kurven aus obiger Abbildung.

Analysierte Datenpunkte	pEC ₅₀ \pm SEM	E _{min} [%]	E _{max} [%]	n _H (frei) \pm SEM
Wert nach 1200 s	7,13 \pm 0,28	2,3 \pm 5,6	99,9 \pm 8,5	0,47 \pm 0,14*
Wert nach 2400 s	6,95 \pm 0,15	0,6 \pm 3,3	102,6 \pm 5,2	0,57 \pm 0,11*
Wert nach 3600 s	6,91 \pm 0,14	-0,6 \pm 3,1	101,5 \pm 4,9	0,62 \pm 0,11*
AUC 3600 s	6,96 \pm 0,17	0,9 \pm 3,5	100,8 \pm 5,6	0,58 \pm 0,12*
Steigungstangente	7,59 \pm 0,17	3,5 \pm 4,0	89,7 \pm 4,2	0,71 \pm 0,21 n.s.

Tab. 29: Kenngrößen \pm Standardfehler der gemittelten Konzentrations-Effekt-Kurven von Acetylcholin an Flp-InTMhM₃-CHO-Zellen. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration, die zu einer halbmaximalen Zellantwort führt. E_{min}: Minimale Zellantwort (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve), E_{max}: Maximale Zellantwort (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve), Die Kenngrößen beruhen auf den Mittelwertskurven aus Abb. 29. n_H(frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit.*: Signifikant verschieden von n_H=1 (F-Test, p<0,05). n.s.: nicht signifikant verschieden von n_H=1 (F-Test, p>0,05).

Um eine möglichst große Variabilität der untersuchten Messzeitpunkte zu erhalten, wurde die Zellantwort zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Es wurden die gleichen Messzeitpunkte und Signalcharakteristika gewählt wie zuvor für den adrenergen β_2 -Rezeptor gezeigt. Alle pEC₅₀-Werte von Acetylcholin lagen in der gleichen Größenordnung und wichen nicht signifikant voneinander ab (t-Test, p>0,05). Die erhobenen Konzentrations-Effekt-Kurven konnten alle, bis auf die durch Analyse der Steigungstangente ermittelte, mit einem freien Hill-Koeffizienten angepasst werden (F-Test, p<0,05). Einen Hill-Koeffizienten von n_H<1 zeigten auch die zu Grunde liegenden Einzelkurven. Lediglich für eine durch Analyse der Steigungstangente ermittelte Konzentrations-Effekt-Kurve konnte eine Kurvensteilheiten von n_H =1,08 berechnet werden. Abschließend konnte am M₃-Rezeptor, wie bereits für den M₂-Rezeptorsubtyp sowie den adrenergen β_2 -Rezeptor gezeigt, kein signifikanter Unterschied zwischen den mittels unterschiedlicher Analysemethoden erhaltenen Wirksamkeiten festgestellt

werden, so dass im weiteren Verlauf der Zeitpunkt nach 3600 s zur Erhebung von Konzentration-Effekt-Kurven gewählt wurde. Der endogene, muskarinische Ligand Acetylcholin zeigte in der zu Grunde liegenden Messmethode einen Wendepunkt von $6,91 \pm 0,14$ und sollte im Folgenden anhand einer klassischen Messmethode überprüft werden.

3.3.1.2. Acetylcholin-induzierte Inositolmonophosphat-Bildung (IP1) an hM₃-CHO-Zellen

Mittels FRET-basierter Inositolmonophosphat-Messung sollte für den M₃-Rezeptor eine klassische, funktionelle Methode zur Erhebung von Konzentrations-Effekt-Kurven des endogenen Muskarinrezeptor-Agonisten Acetylcholin angewandt werden. Dies diente dem Vergleich der Wirksamkeiten mit im vorherigen Kapitel erhobenen Befunden der dynamischen Massenumverteilung.

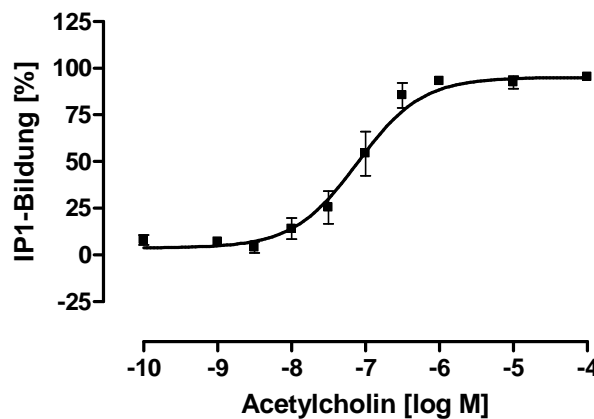


Abb. 30: Acetylcholin-induzierte IP1-Bildung an Flp-InTMM₃-CHO-Zellen. *Ordinate:* Prozentuale IP1-Bildung. 0 % entspricht dem unteren Plateau, 100 % dem oberen Plateau der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Acetylcholin-Konzentration. *Datenpunkte:* Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die je als Zwei- oder Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient $n_H = 1$.

M ₃ wt	pEC ₅₀	E _{min} [%]	E _{max} [%]	n _H (frei)	n
Acetylcholin	7,02 \pm 0,07	3,8 \pm 3,8	95,1 \pm 3,0	1,47 \pm 0,33 n.s.	3

Tab. 30: Kenngrößen \pm Standardfehler der gemittelten Konzentrations-Effekt-Kurven. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus der Acetylcholin-Konzentration, die zu einer halbmaximalen IP1-Bildung führt. E_{min}: Minimale IP1-Bildung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve), E_{max}: Maximale IP1-Bildung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). Die Kenngrößen beruhen auf der Mittelwertskurve aus Abb. 30. n.s.: nicht signifikant verschieden von n_H=1 (F-Test, p>0,05). n: Anzahl unabhängiger Einzelversuche.

Acetylcholin führte am M_3 -Rezeptor zu einer konzentrationsabhängigen IP1-Bildung, die mittels FRET-basierter Technologie gemessen werden konnte. Die Konzentrations-Effekt-Kurven konnten an jedem der drei Versuchstage mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H=1$ angepasst werden, während die Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurven der Messung der DMR mit einer flacheren Kurvensteilheit von $n_H<1$ angepasst werden musste. Der Wendepunkt von Acetylcholin unterschied sich nicht signifikant von dem mittels dynamischer Massenumverteilung an den gleichen Zellen gemessenen pEC_{50} -Wert: $6,91 \pm 0,14$ (t-Test, $p>0,05$). Somit konnte gezeigt werden, dass sich die Wirksamkeit von Acetylcholin am M_3 -Rezeptor durch Verwendung unterschiedlicher funktioneller Messmethoden nicht unterschied.

3.3.1.3. Iperoxo-induzierte dynamische Massenumverteilung an hM_3 -CHO-Zellen

Nachfolgend wurde erstmals Iperoxo an hM_3 -CHO-Zellen im Epic[®]-Messsystem eingesetzt, um einen Eindruck der Testsubstanz hinsichtlich dessen Wirksamkeit im Ganzzellmesssystem zu erhalten. Zur Erhebung der Konzentrations-Effekt-Kurven wurde der zuvor analysierte Messzeitpunkt nach 3600 s gewählt. Die intrinsische Aktivität wurde ebenfalls bestimmt und wird in einem späteren Kapitel separat betrachtet (siehe 3.3.1.6.).

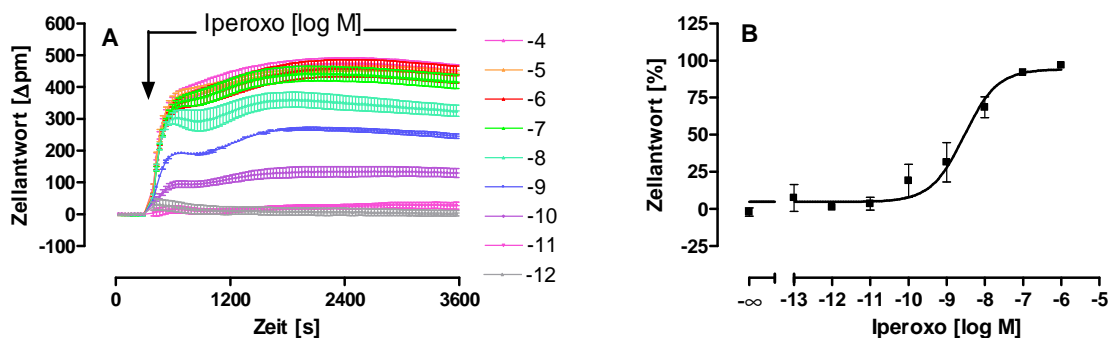


Abb. 31: Iperoxo-induzierte dynamische Massenumverteilung an Flp-InTM hM_3 -CHO-Zellen. **A:** *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Aufgetragen sind die logarithmierten molaren Konzentrationen von Iperoxo sowie die durch die jeweilige Konzentration induzierte Zellantwort. Der Pfeil stellt den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Mittelwerte \pm Standardfehler eines repräsentativen Experimentes in Vierfachbestimmung, welches dreifach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert. **B:** *Ordinate:* Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht dem unteren Plateau, 100 % dem oberen Plateau der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration. *Datenpunkte:* Mittelwerte \pm Standardfehler aus vier voneinander unabhängigen Experimenten, die je als Drei- bzw. Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient $n_H=1$.

Ergebnisse

M₃wt	pEC₅₀	E_{min} [%]	E_{max} [%]	n_H (frei)	n
Iperoxo	8,54 ± 0,15	4,8 ± 3,4	94,2 ± 4,7	0,60 ± 0,16 n.s.	3

Tab. 31: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Konzentrations-Effekt-Kurven von Iperoxo . an Flp-InTMhM₃-CHO-Zellen pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration, die zu einer halbmaximalen Zellantwort führte. E_{min}: Minimale Zellantwort (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve), E_{max}: Maximale Zellantwort (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). Die Kenngrößen beruhen auf der Mittelwertskurve aus Abb. 31. n_H(frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. n.s.: nicht signifikant verschieden von n_H=1 (F-Test, p>0,05); n: Anzahl unabhängiger Einzelversuche.

Iperoxo führte am muskarinischen M₃-Rezeptor zu einem gleichartigen Signalverlauf wie Acetylcholin. Nach einem steilen Anstieg resultierte ein Plateau, welches über die Messdauer hinweg stabil blieb. Die Wirksamkeit von Iperoxo war signifikant größer als die Wirksamkeit des endogenen muskarinischen Liganden Acetylcholin (pEC₅₀: 6,91 ± 0,14, t-Test, p<0,05). Sie lag jedoch signifikant unter der Wirksamkeit, die am muskarinischen M₂-Rezeptorsubtyp mit Iperoxo gemessen werden konnte (pEC₅₀: 10,17 ± 0,12, t-Test, p<0,05). Am isolierten Meerschweinchen-Ileum (M₃-Rezeptormodell) zeigte Iperoxo eine leicht reduzierte Wirksamkeit gegenüber dem nativen M₂-Rezeptormodell (isolierter Meerschweinchen-Vorhof), die jedoch nicht signifikant war (Antony et al., 2009).

3.3.1.4. Phth-6-Iper-induzierte dynamische Massenumverteilung an hM₃-CHO-Zellen

In nachfolgendem Abschnitt sollte erstmals die durch die Hybrids substanz Phth-6-Iper-induzierte DMR an hM₃-CHO-Zellen untersucht werden. In diesem Kapitel wird nur die Wirksamkeit betrachtet, während die intrinsische Aktivität in einem späteren Kapitel aufgeführt wird.

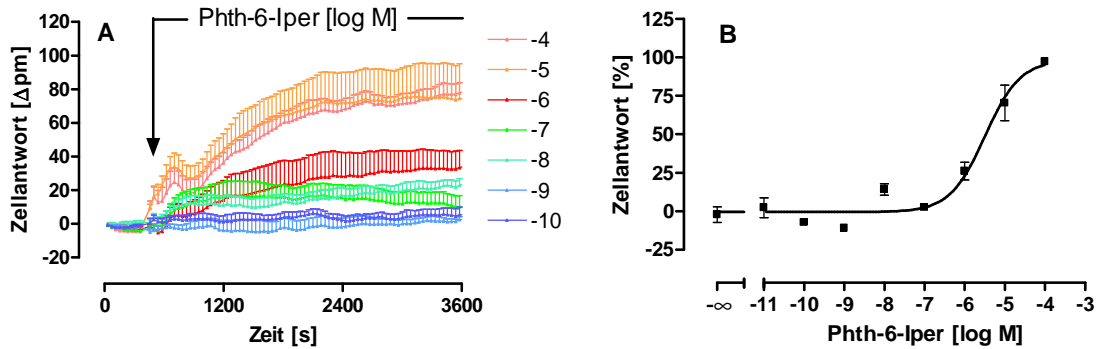


Abb. 32: Phth-6-Iper-induzierte dynamische Massenumverteilung an Flp-InTMhM₃-CHO-Zellen. **A:** *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Aufgetragen sind die logarithmierten, molaren Konzentrationen von Phth-6-Iper sowie die durch die jeweilige Konzentration induzierte Zellantwort. Der Pfeil stellt den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Mittelwerte ± Standardfehler eines repräsentativen Experimentes in Vierfachbestimmung, welches zweifach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert. **B:** *Ordinate:* Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht dem unteren Plateau, 100 % dem oberen Plateau der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration. *Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die je als Drei- bzw. Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient $n_H = 1$.

M ₃ wt	pEC ₅₀	E _{min} [%]	E _{max} [%]	n _H (frei)	n
Phth-6-Iper	5,49 ± 0,14	-0,5 ± 2,6	98,7 ± 6,5	0,72 ± 0,20 n.s.	3

Tab. 32: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Konzentrations-Effekt-Kurven von Phth-6-Iper an Flp-InTMhM₃-CHO-Zellen. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration, die zu einer halbmaximalen Zellantwort führt. E_{min}: Minimale Zellantwort (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve), E_{max}: Maximale Zellantwort (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). Die Kenngrößen beruhen auf der Mittelwertskurve aus Abb. 32. n_H(frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. n.s. nicht signifikant verschieden von n_H=1 (F-Test, p>0,05). n: Anzahl unabhängiger Einzelversuche.

Der durch Phth-6-Iper-induzierte Signalverlauf am muskarinischen M₃-Rezeptor zeigte ebenfalls ein Plateau, wie es die zuvor untersuchten Liganden Acetylcholin und Iperoxo aufwiesen. Die für den M₃-Acetylcholinrezeptor ermittelte Wirksamkeit von 5,49 ± 0,14 zeigte eine verglichen mit Organbadversuchen am isolierten Meerschweinchen-Ileum (natives M₃-Rezeptormodell) nicht signifikant verschiedene Wirksamkeit (pEC₅₀: 5,81 ± 0,08, Disingrini et al., 2006, t-Test, p>0,05). Die Tatsache, dass Phth-6-Iper am M₃-

Rezeptorsubtyp eine um ca. 1,5 Dekaden geringere Wirksamkeit aufwies als am M₂-Acetylcholinrezeptor konnte auch von Antony et al. (2009) durch Messung an isolierten Organen (Meerschweinchen-Ileum: M₃-Rezeptormodell; linker Meerschweinchen-Vorhof: M₂-Rezeptormodell) gezeigt werden.

3.3.1.5. Naph-6-Iper-induzierte dynamische Massenumverteilung an hM₃-CHO-Zellen

Neben der Hybridverbindung Phth-6-Iper sollte ebenfalls die Wirksamkeit der Hybridverbindung Naph-6-Iper hinsichtlich der DMR an hM₃-CHO-Zellen untersucht und mit der Wirksamkeit an hM₂-CHO-Zellen verglichen werden. Die intrinsische Aktivität von Naph-6-Iper wurde separat bestimmt und wird im nächsten Abschnitt erläutert.

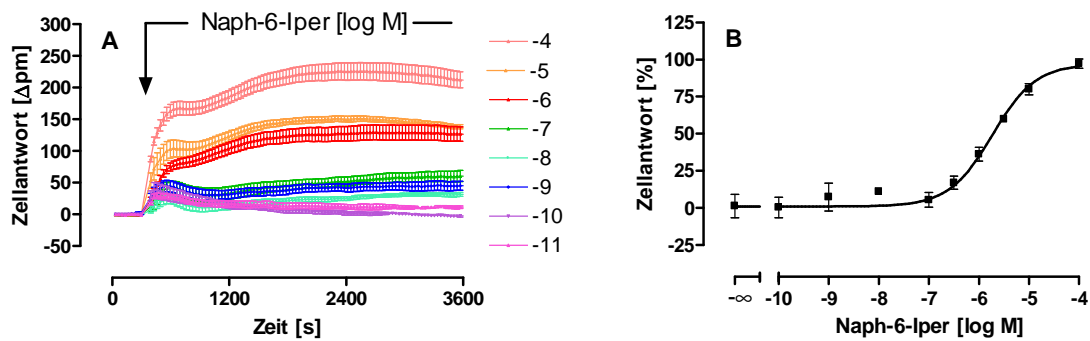


Abb. 33: Naph-6-Iper-induzierte dynamische Massenumverteilung an Flp-InTMhM₃-CHO-Zellen. **A:** *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Aufgetragen sind die logarithmierten, molaren Konzentrationen von Naph-6-Iper sowie die durch die jeweilige Konzentration induzierte Zellantwort. Der Pfeil stellt den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Mittelwerte ± Standardfehler eines repräsentativen Experimentes in Vierfachbestimmung, welches zweifach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert. **B:** *Ordinate:* Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht dem unteren Plateau, 100 % dem oberen Plateau der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration. *Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die je als Drei- bzw. Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient n_H = 1.

M ₃ wt	pEC ₅₀	E _{min} [%]	E _{max} [%]	n _H (frei)	n
Naph-6-Iper	5,73 ± 0,10	0,9 ± 2,2	97,1 ± 5,1	0,83 ± 0,17 n.s.	3

Tab. 33: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Konzentrations-Effekt-Kurven von Naph-6-Iper. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration, die zu einer halbmaximalen Zellantwort führt. E_{min}: Minimale Zellantwort (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve), E_{max}: Maximale Zellantwort (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). Die Kenngrößen beruhen auf der Mittelwertskurve aus Abb. 33. n_H(frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. n.s.: nicht signifikant verschieden von n_H=1 (F-Test, p>0,05). n: Anzahl unabhängiger Einzelversuche.

Der Naph-6-Iper-induzierte Signalverlauf unterschied sich nicht von den Signalverläufen der zuvor gezeigten orthosterischen Agonisten am M_3 -Rezeptorsubtyp. Nach einem starken Anstieg resultierte ein Plateau, welches über die Messdauer aufrecht erhalten wurde. Die dualsterische Testsubstanz Naph-6-Iper wies eine um 1,2 Dekaden signifikant geringere Wirksamkeit auf als der endogene muskarinische Ligand Acetylcholin (pEC_{50} : $5,73 \pm 0,10$ vs. $6,91 \pm 0,14$, t-Test, $p < 0,05$). Die Wirksamkeit lag am M_3 -Rezeptorsubtyp zudem signifikant unter der am M_2 -Rezeptor ermittelten (pEC_{50} : $5,73 \pm 0,10$ vs. $7,59 \pm 0,19$, t-Test $p < 0,05$). Damit zeigte die Hybridverbindung eine durch Messung der dynamischen Massenumverteilung deutliche Subtypselektivität mit einer Präferenz für den M_2 -Rezeptor.

3.3.1.6. Maximal-induzierbare dynamische Massenumverteilung muskarinischer Liganden an hM_3 -CHO-Zellen

In nachfolgender Versuchsreihe sollten die intrinsischen Aktivitäten strukturverschiedener muskarinischer Liganden an hM_3 -CHO-Zellen durch Messung der dynamischen Massenumverteilung ermittelt werden. Als Referenzsubstanz wurde der endogene muskarinische Ligand Acetylcholin verwendet. Es wurden die gleichen Konzentrationen eingesetzt, die bereits am M_2 -Rezeptor vermessen wurden. Zuerst soll ein repräsentatives Experiment solcher Testsubstanzen gezeigt werden, deren Epic[®]-Signal an hM_3 -CHO-Zellen noch nicht aufgeführt wurde.

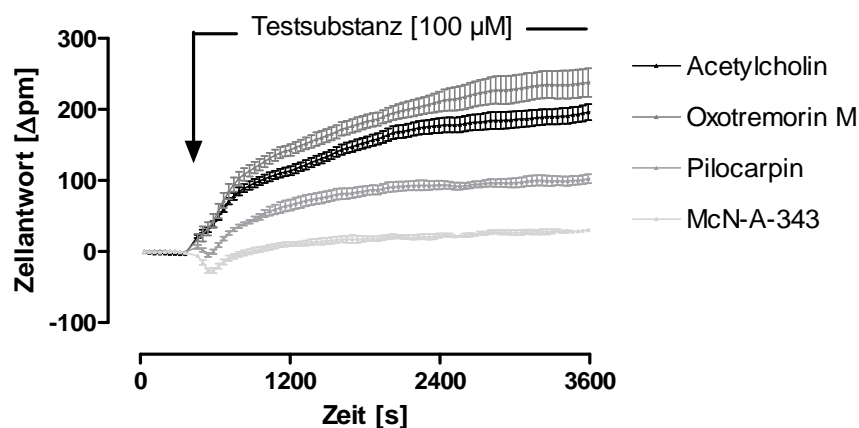


Abb. 34: Agonist-induzierte dynamische Massenumverteilung an Flp-InTM hM_3 -CHO-Zellen. *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Der Pfeil stellt den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Mittelwerte \pm Standardfehler eines repräsentativen Experimentes in Vierfachbestimmung, welches zwei- bis zwölfmal mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert.

Obige Abbildung verdeutlicht, dass alle Substanzen an hM₃-CHO-Zellen zu einem positiv-gerichteten Signalverlauf führten, der in einem Plateau mündete. Die Testsubstanzen Pilocarpin und McN-A-343 wiesen eine gegenüber Acetylcholin schwächere Wellenlängenverschiebung auf. Als nächstes sollten die intrinsischen Aktivitäten aller in dieser Arbeit an hM₃-CHO-Zellen eingesetzten Liganden quantifiziert werden.

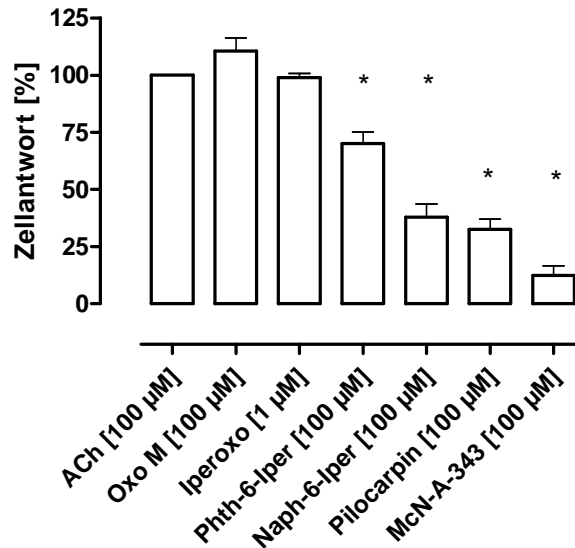


Abb. 35: Maximal-induzierbare, Basislinien-korrigierte dynamische Massenumverteilung muskarinischer Liganden. *Ordinate:* Prozentuale, maximale Zellantwort normiert auf die durch Acetylcholin [100 µM]-induzierte Massenumverteilung. 0 % entspricht keiner Zellantwort, 100 % der durch Acetylcholin-[100 µM] ausgelösten Zellantwort. *Abszisse:* Untersuchte Liganden mit eingesetzter Konzentration, Mittelwerte ± Standardfehler aus 3-13 voneinander unabhängigen Experimenten, jeweils in Drei- oder Vierfachbestimmung erhoben.*: Signifikant verschieden von Acetylcholin [100 µM], (t-Test, p<0,05).

Ergebnisse

M₃wt	E_{max} ± SEM [%]	n
Acetylcholin [100 µM]	100,0	13
Oxotremorin M [100 µM]	110,5 ± 5,7	4
Iperoxo [1 µM]	98,9 ± 1,7	3
Phth-6-Iper [100 µM]	70,1 ± 4,9*	5
Naph-6-Iper [100 µM]	37,8 ± 5,8*	3
McN-A-343 [100 µM]	12,3 ± 4,2*	3
Pilocarpin [100 µM]	32,4 ± 2,6*	4

Tab. 34: Maximal-induzierbare, Basislinien-korrigierte dynamische Massenumverteilung muskarinischer Liganden an Flp-InTMhM₃-CHO-Zellen normiert auf die durch Acetylcholin [100 µM]-induzierte dynamische Massenumverteilung des jeweiligen Versuchstages. E_{max}: Maximale Zellantwort, Mittelwert ± Standardfehler (SEM) aus 3-13 Einzelversuchen, die je in Drei- oder Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. n: Anzahl unabhängiger Experimente je Testsubstanz. *: Signifikant verschieden von Acetylcholin [100 µM], (t-Test, p<0,05).

Die orthosterischen Agonisten Oxotremorin M sowie Iperoxo zeigten keine von Acetylcholin verschiedene intrinsische Aktivität (t-Test, p>0,05). Phth-6-Iper konnte am muskarinischen M₃-Rezeptor im Vergleich zu Acetylcholin keine maximale Wellenlängenverschiebung auslösen, obwohl es ebenfalls in Rezeptor-sättigenden Konzentrationen appliziert wurde (vergleiche 3.3.1.4.). Am isolierten Meerschweinchen-Ileum zeigte Phth-6-Iper eine vollagonistische Aktivität (mündliche Mitteilung E. Barocelli an K. Kellershohn, Dissertationsschrift 2007). Naph-6-Iper zeigte wie Phth-6-Iper nur einen partialagonistischen Effekt im Epic[®]-Biosensor. Eine intrinsische Aktivität von 20 ± 1 % fand K. Kellershohn (Dissertationsschrift 2007) durch Messung der [³⁵S]GTPγS-Bindung. Beide Aktivitäten lagen unter der von Antony et al. (2009) publizierten, in der Naph-6-Iper am isolierten Meerschweinchen-Ileum einen starken partialagonistischen Effekt aufwies, der jedoch nicht beziffert wurde. Die Testsubstanzen McN-A-343 sowie Pilocarpin wiesen ebenfalls nur einen schwachen Partialagonismus am M₃-Rezeptorsubtyp auf. Richards und van Giersbergen (1995) fanden für McN-A-343 am M₃-Rezeptor eine maximale Inositolmonophosphatbildung (IP1) von 9 ± 3 % in CHO-Zellen sowie für Pilocarpin ein Maximum von 43 ± 9 % gegenüber Oxotremorin M. Beide Befunde unterscheiden sich nicht signifikant von den in dieser Arbeit mittels Messung der intrazellulären Massenumverteilung gefundenen Maxima (t-Test, p>0,05).

3.3.2. YM 254890-Validierung an hM₃-CHO-Zellen

Um den G_{αq}-Inhibitor YM 254890 einsetzen zu können, musste zuvor eine geeignete Konzentration festgelegt werden. Es wurde bewusst der muskarinische M₃-Rezeptor zur Bestimmung der notwendigen YM-Konzentration gewählt, da dieser die stärkste G_{αq/11}-Aktivierung zeigt und folglich die höchste Konzentration an YM 254890 benötigt, um den G_q-Signalweg vollständig zu inhibieren. Die gewählte Konzentration sollte schließlich zur Unterbindung des G_q-Signalweges anderer, nicht präferenziell G_q-gekoppelter Rezeptoren Anwendung finden. Zur Austestung einer ersten Konzentrationsspanne konnten Stoddart et al. (2007), Canals et al. (2006) sowie Orth et al. (2005) herangezogen werden. Dort führte eine YM-Konzentration von 100 nM zu einer Reduktion der G_{αq}-vermittelten Signaltransduktion und eine Konzentration von 300 nM (Orth et al., 2005) zu einem maximalem YM 254890-Effekt. Es wurde eine Acetylcholin-Konzentration nahe des EC₈₀-Wertes eingesetzt, die der zuvor erhobenen Konzentrations-Effekt-Kurve entnommen werden konnte (siehe 3.3.1.1.), um schon bei niedrigen YM-Konzentrationen einen deutlichen Effekt detektieren zu können.

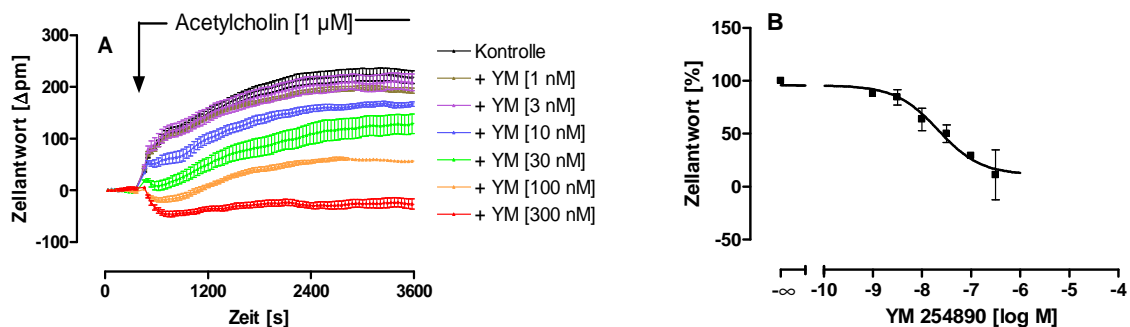


Abb. 36: Einfluss unterschiedlicher YM 254890-Konzentrationen auf die durch Acetylcholin [1 μM]-induzierte dynamische Massenumverteilung an Flp-InTMhM₃-CHO-Zellen. **A:** Ordinate: Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. Abszisse: Messdauer in Sekunden [s]. Der Pfeil stellt den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Mittelwerte ± Standardfehler eines repräsentativen Experimentes in Vierfachbestimmung, welches zweifach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert. **B:** Ordinate: Prozentuale Zellantwort. 100 % stellt die durch Acetylcholin [1 μM]-induzierte Wellenlängenverschiebung dar. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der YM-Konzentration. Datenpunkte: Mittelwerte ± Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die je als Drei- bzw. Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. Kurvenanpassung: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient $n_H = -1$.

Acetylcholin [1 μ M]	pEC ₅₀	E _{min} [%]	E _{max} [%]	n _H (frei)	n
+ YM 254890	7,67 \pm 0,19	11,3 \pm 9,1 n.s.	95,7 \pm 4,9	-0,58 \pm 0,69 n.s.	3

Tab. 35: Kenngrößen \pm Standardfehler der gemittelten Konzentrations-Effekt-Kurve. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus der YM-Konzentration, die zu einer halbmaximalen Zellantwort führt. E_{min}: Minimale Zellantwort (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve), E_{max}: Maximale Zellantwort (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). Die Kenngrößen beruhen auf der Mittelwertskurve aus Abb. 36; n_H(frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. n.s. nicht signifikant verschieden von E_{min} = 0 % bzw. n_H = -1 (F-Test, p>0,05).

Zur Testung der für eine vollkommene Auslöschung der G α_q -vermittelten Zellantwort optimalen YM-Konzentration wurden verschiedene Konzentrationen YM 254890 eingesetzt. Abbildung A zeigt ein durch steigende YM-Konzentrationen reduziertes Acetylcholin-Signal. Es wird deutlich, dass eine YM-Konzentration von 300 nM notwendig war, um das Acetylcholin-induzierte Signal in hM₃-CHO-Zellen zu unterbinden. Nach Stimulation mit einer Acetylcholin-Konzentration von 1 μ M ergab sich ein Wendepunkt von pEC₅₀: 7,67 \pm 0,19. Bei Orth et al (2005) zeigte sich in HEK 293-Zellen ein halbmaximaler Effekt von YM 254890 nach einer 1 mM Carbachol-Stimulation von 30 nM (ohne Angabe einer Streuung). Damit liegen die Wirksamkeiten in der gleichen Größenordnung. Darüberhinaus zeigten die Daten erstmals, dass dem Acetylcholin-induzierten Signal an hM₃-CHO-Zellen eine reine G α_q -Kopplung zu Grunde lag und keine weiteren Signalwege parallel angeschaltet wurden, da das Acetylcholin-induzierte Signal durch die YM-Behandlung vollkommen ausgelöscht werden konnte.

3.3.3. Acetylcholin-induzierte dynamische Massenumverteilung nach Inhibition oder Maskierung verschiedener Signaltransduktionswege an hM₃-CHO-Zellen

Vorherige Versuchsreihe vermittelte den Eindruck, dass der muskarinische M₃-Rezeptor im Epic[®]-Biosensor nach Ausschaltung des G $\alpha_{q/11}$ -Signalweges bei Aktivierung keine alternative Kopplung an andere G-Proteine eingeht. Dies sollte durch den Einsatz weiterer Signalwegsinhibitoren und Aktivatoren überprüft werden.

3.3.3.1. Folgen einer G $\alpha_{i/o}$ -Inhibition (Pertussistoxin) auf die Acetylcholin-induzierte dynamische Massenumverteilung an hM₃-CHO-Zellen

Da eine G α_i -Aktivierung in der Literatur beschrieben ist (Dai et al., 1991; Offermann et al., 1994), sollte dies im Folgenden durch eine Vorinkubation der hM₃-CHO-Zellen mit Pertussistoxin überprüft werden. Es wurde eine supramaximale Acetylcholin-Konzentration von 100 μ M eingesetzt, die der zuvor erhobenen Konzentrations-Effekt-Kurve entnommen werden konnte (siehe 3.3.1.1.).

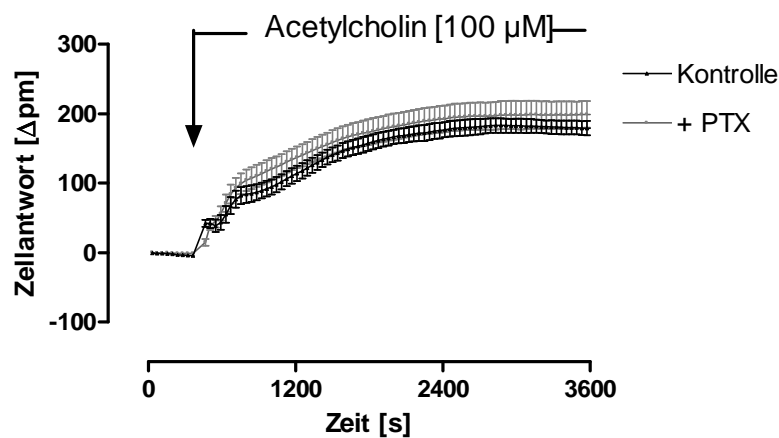


Abb. 37: Einfluss einer Pertussistoxin-Vorinkubation (100 ng/ml, über Nacht) auf die durch Acetylcholin [100 μ M]-induzierte dynamische Massenumverteilung an Flp-InTMhM₃-CHO-Zellen. *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δ pm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Der Pfeil stellt den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Mittelwerte \pm Standardfehler eines repräsentativen Experimentes in Vierfachbestimmung, welches zweifach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Versuchsreihe sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert. PTX: mit Pertussistoxin vorinkubierte Zellen.

Eine Vorinkubation mit Pertussistoxin führte zu keinem vom Kontrollsignal verschiedenen Signal, so dass der untersuchte muskarinische M₃-Rezeptor unter den verwendeten Messbedingungen nicht an G $\alpha_{i/o}$ Proteine koppelte. Obwohl es Literaturhinweise zu einer G $\alpha_{i/o}$ -Kopplung des M₃-Rezeptors gibt (Offermann et al., 1994; Dai et al., 1991), ist dieser

Befund nicht überraschend, da eine zusätzliche Rezeptorkopplung nicht zwingend bei jedem Zellklon und in jedem Messsystem detektierbar sein muss. Somit bestätigt dieser Befund die zuvor erhobene Hypothese, dass der M_3 -Rezeptor keine weitere Signalwegsaktivierung im Epic[®]-Biosensor eingeht. Eine Überprüfung der Kopplung an stimulatorische G-Proteine soll nachfolgend erläutert werden.

3.3.3.2. Einfluss erhöhter intrazellulärer cAMP-Spiegel (Forskolin) auf die Acetylcholin-induzierte dynamische Massenumverteilung an hM_3 -CHO-Zellen

Um die Auswirkungen eines erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegels auf die Agonist-induzierte Massenumverteilung am M_3 -Rezeptorsubtyp zu untersuchen, wurde der Adenylylcyclase-Aktivator Forskolin eingesetzt. Ziel dieser Untersuchungen war zu überprüfen, ob der M_3 -Rezeptor in diesem Messsystem an G_s -Proteine koppelt und, ob ein verändertes intrazelluläres Milieu Einfluss auf das Acetylcholin-induzierte Signal ausübt. Dazu wurde eine supramaximale Konzentration des endogenen Liganden Acetylcholin eingesetzt, die der zuvor erhobenen Konzentrations-Effekt-Kurve entnommen werden konnte (siehe 3.3.1.1.).

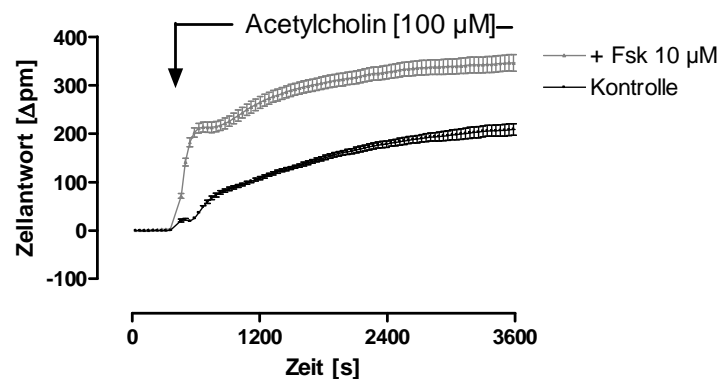


Abb. 38: Einfluss einer Forskolin-Vorstimulation auf die durch Acetylcholin [100 μ M]-induzierte dynamische Massenumverteilung an Flp-InTM hM_3 -CHO-Zellen. *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δ pm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Der Pfeil stellt den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Mittelwerte \pm Standardfehler eines repräsentativen Experimentes in Vierfachbestimmung, welches zweifach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Versuchsreihe sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert. Fsk: Mit Forskolin vorinkubierte Zellen.

Da es sich bei Forskolin um eine Rezeptor-unabhängige, direkte Stimulation der Adenylylcyclase handelt, konnte die gleiche Konzentration gewählt werden, die auch zur Erlangung eines maximalen intrazellulären cAMP-Spiegels an hM_2 -Flp-InTMCHO-Zellen bestimmt wurde. Es wurde analog der Publikation von Kebig et al. (2009) in einer maximal wirksamen Konzentration von 10 μ M für zwei Stunden vorstimuliert. Die

Vorstimulation führte zu einer stärkeren, Acetylcholin-induzierten, positiv-gerichteten Wellenlängenverschiebung als die am Versuchstag mitgeführte Kontrolle ohne Vorstimulation. McGraw et al. (2003) konnten eine im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen erhöhte Carbachol-induzierte IP1-Produktion in solchen Mäusen messen, die den adrenergen β_2 -Rezeptor überexprimierten. Übertragen auf die in dieser Arbeit erhobenen Befunde könnte ein erhöhter intrazellulärer cAMP-Spiegel zu einem verstärkten $G_{\alpha_{q/11}}$ -Signal des M_3 -Rezeptors führen. Dafür spräche, dass das resultierende Signal einen ähnlichen Signalverlauf wie das $G_{q/11}$ -vermittelte Kontrollsignal zeigt. Dies sollte durch weitere Experimente überprüft werden.

3.3.3.3. Einfluss erhöhter intrazellulärer cAMP-Spiegel (Choleratoxin) auf die Acetylcholin-induzierte dynamische Massenumverteilung an hM_3 -CHO-Zellen

Durch eine Vorstimulation mit Choleratoxin sollten die mit Forskolin erhobenen Daten überprüft und mit einem direkten Angriff am G-Protein verglichen werden.

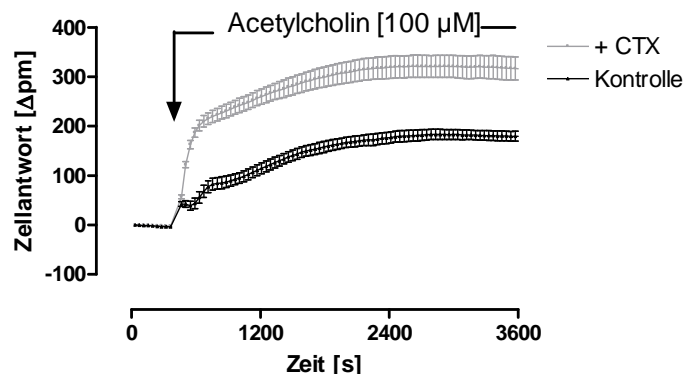


Abb. 39: Einfluss einer Choleratoxin-Vorstimulation [100 ng/ml, über Nacht] auf die durch Acetylcholin [100 μ M]-induzierte dynamische Massenumverteilung an Flp-InTM hM_3 -CHO-Zellen. *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δ pm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Der Pfeil stellt den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Mittelwerte \pm Standardfehler eines repräsentativen Experimentes in Vierfachbestimmung, welches zweifach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Versuchsreihe sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert. CTX: mit Choleratoxin vorinkubierte Zellen.

Acetylcholin führte nach Vorstimulation der M_3 -CHO-Zellen mit Choleratoxin ebenfalls zu einem erhöhten positiv-gerichteten Epic[®]-Signal gegenüber der Kontrolle ohne CTX-Vorstimulation. Somit kommt es auch nach G-Protein-vermitteltem cAMP-Anstieg zu einem verstärkten Acetylcholineffekt. Ob dieses erhöhte Signal über den $G_{\alpha_{q/11}}$ -Signaltransduktionsweg oder über andere Signalwege vermittelt ist, wurde im Folgenden

durch die kombinierte Vorinkubation eines cAMP-erhöhenden Agens mit Pertussistoxin näher untersucht.

3.3.3.4. Einfluss einer kombinierten Inhibition von $G\alpha_{i/o}$ -Proteinen (Pertussistoxin) und Erhöhung intrazellulärer cAMP-Spiegel (Forskolin) auf die Acetylcholin-induzierte dynamische Massenumverteilung an hM_3 -CHO-Zellen

Durch die Vorinkubation der hM_3 -CHO-Zellen mit Forskolin und Pertussistoxin sollte überprüft werden, ob eine $G\alpha_i$ -Kopplung unter erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegeln auftritt. An jedem Versuchstag wurden zusätzlich hM_3 -CHO-Zellen ohne Vorinkubation (Kontrolle) sowie mit Pertussistoxin oder Forskolin-vorinkubierte Zellen mitgeführt um einen direkten Vergleich der Acetylcholin-induzierten Signale zu erhalten.

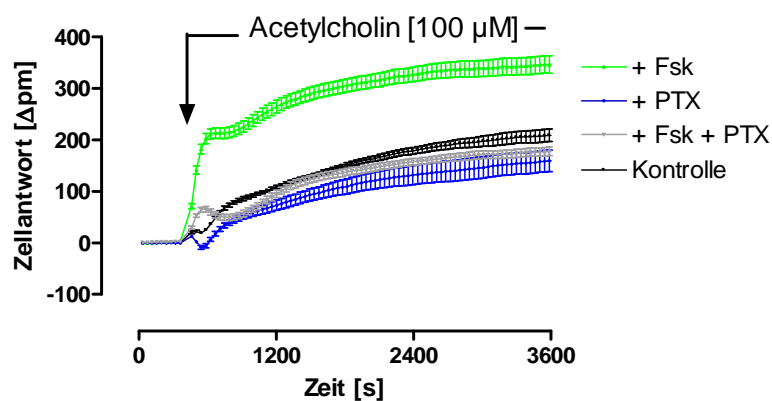


Abb. 40: Einfluss unterschiedlicher Vorinkubationen auf die durch Acetylcholin [100 μ M]-induzierte dynamische Massenumverteilung an Flp-InTM hM_3 -CHO-Zellen. *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δ pm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Der Pfeil stellt den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Mittelwerte \pm Standardfehler eines repräsentativen Experimentes in Vierfachbestimmung, welches zweifach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Vorinkubation sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert. Fsk: Mit Forskolin vorinkubierte Zellen; PTX: mit Pertussistoxin vorinkubierte Zellen.

Während eine Pertussistoxin-Vorinkubation nicht zu einem veränderten Signal führte (wie es bereits unter 3.3.3. gezeigt wurde), resultierte eine Forskolin-Vorstimulation in einem stark erhöhten Signal wie unter 3.3.2. bereits beschrieben. Eine kombinierte Vorinkubation mit beiden Toxinen resultierte in einem Signal, das auf Kontrollniveau ohne Vorinkubation lag. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass der M_3 -Rezeptor erst unter erhöhten cAMP-Spiegeln an $G\alpha_{i/o}$ -Proteine koppelt, da das durch Forskolin-Vorstimulation erhöhte Acetylcholin-induzierte Signal durch eine zusätzliche PTX-Vorinkubation inhibiert werden konnte. Dieser Befund sollte im Folgenden durch Einsatz eines weiteren cAMP-erhöhenden Agens überprüft werden.

3.3.3.5. Einfluss einer kombinierten Inhibition von $G\alpha_{i/o}$ -Proteinen (Pertussistoxin) und Erhöhung intrazellulärer cAMP-Spiegel (Choleratoxin) auf die Acetylcholin-induzierte dynamische Massenumverteilung an hM_3 -CHO-Zellen

Neben Forskolin führt auch eine Vorinkubation mit Choleratoxin zu einer Adenylylcyclase-Stimulation und somit zu einer Forskolin-ähnlichen Zellmanipulation. Es mussten sich folglich die gleichen Befunde einstellen wie unter 3.3.3.4. beschrieben.

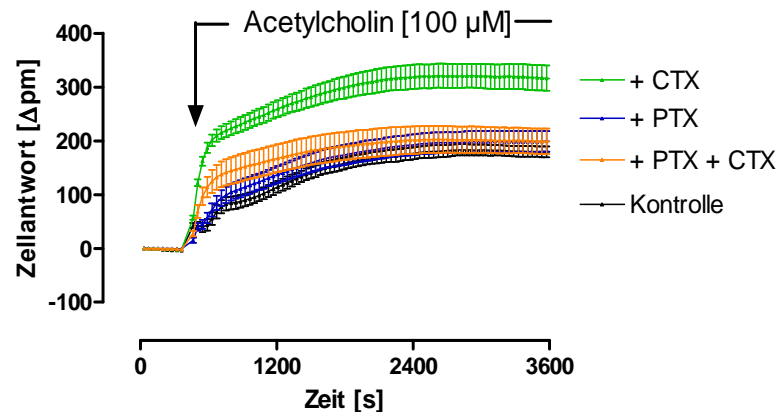


Abb. 41: Einfluss unterschiedlicher Vorinkubationen auf die durch Acetylcholin [100 μ M]-induzierte dynamische Massenumverteilung an Flp-InTM hM_3 -CHO-Zellen. *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δ pm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Der Pfeil stellt den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Mittelwerte \pm Standardfehler eines repräsentativen Experimentes in Vierfachbestimmung, welches zweifach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Vorinkubation sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Puffer-korrigiert. PTX: mit PTX-vorinkubierte Zellen, CTX: mit CTX-vorinkubierte Zellen.

Während eine Vorinkubation mit Pertussistoxin erneut nicht zu einer gegenüber dem Kontrollsignal veränderten Zellantwort führte, resultierte eine Choleratoxin-Vorstimulation der Zellen in einem erhöhten Acetylcholin-induzierten Signal am M_3 -Rezeptor. Die kombinierte Vorinkubation beider Toxine resultierte in keinem vom Kontrollsignal verschiedenen Signal. Somit konnte auch das durch eine CTX-Vorstimulation erhöhte Acetylcholin-induzierte Signal durch eine zusätzliche Pertussistoxin-Vorinkubation inhibiert werden. Dies weist auf eine durch erhöhte intrazelluläre cAMP-Spiegel ausgelöste $G\alpha_i$ -Kopplung des M_3 -Rezeptors hin. Somit konnte die im vorangegangenen Abschnitt durch eine Forskolin-Vorstimulation hervorgerufene $G\alpha_i$ -Aktivierung des M_3 -Rezeptors auch durch die Choleratoxin-Vorstimulation gezeigt werden.

Zur Untermauerung dieser mittels Epic[®]-Biosensor erhobenen Befunde wurden [³⁵S]GTP γ S-Bindungsexperimente mit anschließender Immunopräzipitation von N.J. Smith (Molecular Pharmacology Group, University of Glasgow, UK; jetzt Victor Chang Cardiac Research Institute, Sydney, Australien) durchgeführt. Nach Vorinkubation der

Flp-InTMhM₃-CHO-Zellhomogenate mit Cholera toxin [100 ng/ml, 20h] konnte von N.J. Smith ein signifikant erhöhtes Acetylcholin-Signal durch Messung der [³⁵S]GTPγS-Bindung gegenüber den nicht vorstimulierten Zellen detektiert werden. Durch Immunopräzipitation konnte das erhöhte Acetylcholin-Signal auf eine M₃-Rezeptor-vermittelte Gα_i-Aktivierung zurückgeführt werden (Schröder et al., 2010). Somit konnte auch mittels alternativer Messmethode ein verändertes Ansprechen von G-Proteinen der stabil mit dem M₃-Rezeptor-Plasmid transfizierten CHO-Zellen erhalten werden. Alle Resultate wiesen auf eine Gα_{i/o}-Kopplung des M₃-Acetylcholinrezeptors hin, die, im Gegensatz zu bereits publizierten Befunden (Dai et al., 1991; Offermanns et al., 1994), erst dann auftrat, wenn der intrazelluläre cAMP-Spiegel erhöht war.

3.4. Systematische Analyse einzelner Komponenten des $G\alpha_s$ -Signaltransduktionsweges mittels Epic[®]-Biosensor

In nachfolgendem Kapitel sollte untersucht werden, auf welcher Ebene der Signaltransduktion der größte Anteil der mit dem Epic[®]-Biosensor detektierbaren dynamischen Massenumverteilung entsteht, um dem Ursprung des Signales näher zu kommen. Dazu wurden gezielt Aktivatoren eingesetzt und mittels Antagonisten oder Toxinen die Spezifität des Aktivators überprüft. Die Analyse diente dem größeren Verständnis der messbaren dynamischen Massenumverteilung und der Interpretation der Daten. Der größte Teil dieses Kapitels wurde an untransfizierten Flp-InTMCHO-Zellen durchgeführt, um unerwünschte Rezeptor-vermittelte Signale auszuschließen, es sei denn es wird explizit auf ein anderes Zellsystem hingewiesen.

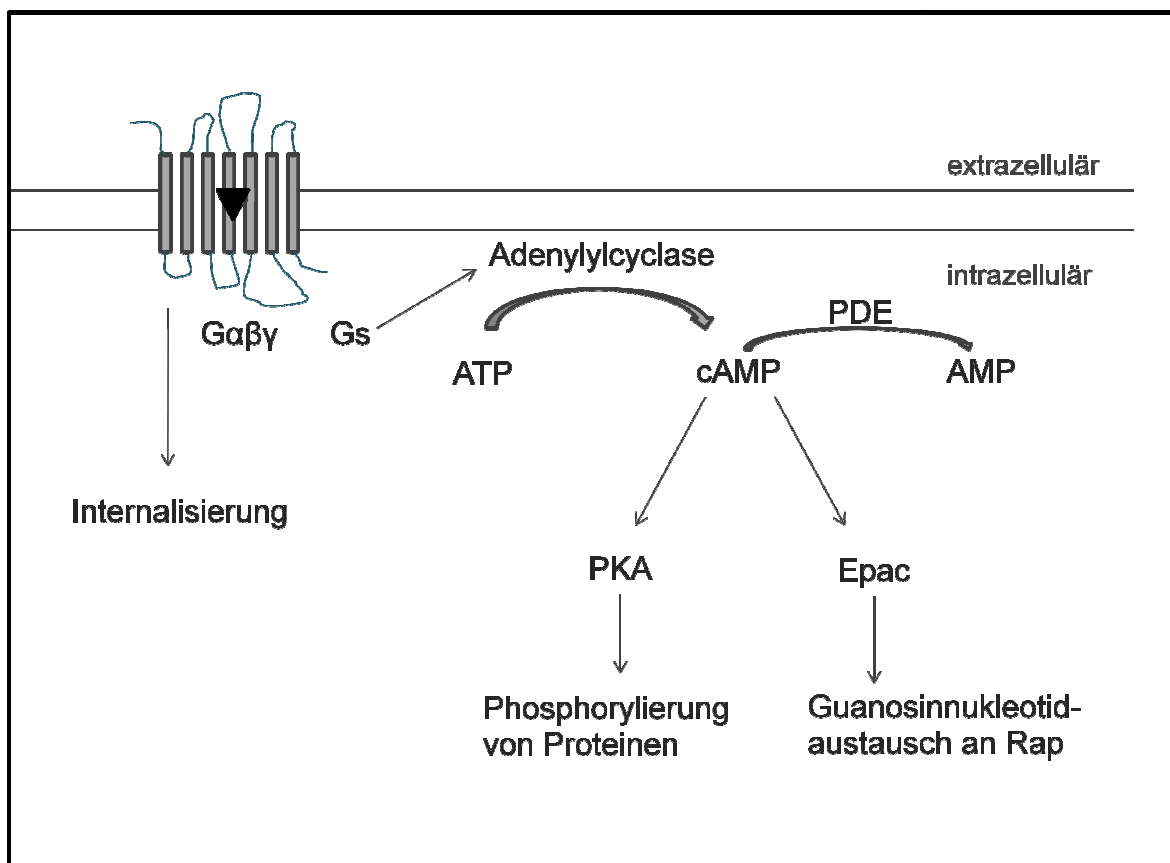


Abb. 42: Schematische Darstellung der Signaltransduktion G_s -Protein-gekoppelter Rezeptoren. Aufgeführt sind nur die im Folgenden untersuchten Komponenten der Signaltransduktionskaskade. Nach Rezeptoraktivierung dissoziiert die α -Untereinheit von der $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins ab. Die α_s -Untereinheit ist in der Lage die Adenylylcyclase zu aktivieren, die Adenosintriphosphat (ATP) in cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) umwandelt. Phosphodiesterasen (PDE) sind demgegenüber in der Lage gebildetes cAMP wieder abzubauen. cAMP kann die Proteinkinase A (PKA) aktivieren oder zu einer Aktivierung des Guaninnukleotidaustauschproteins Epac führen, welches einen Austausch von GDP gegen GTP an der kleinen GTPase Rap bewirkt. Darüberhinaus kann eine Rezeptor-Internalisierung erfolgen.

3.4.1. Internalisierung

Um der Frage nachzugehen, ob eine Internalisierung mittels Epic[®]-Biosensor messbar ist bzw., ob sich hinter dem messbaren Epic[®]-Signal eine Internalisierung verbirgt, wurden unterschiedliche Versuchsansätze geprüft, die zu einer intrazellulären Massenumverteilung führen müssten. Zum einen wurde die Internalisierung von Substanzen wie dem Cholera toxin untersucht, zum anderen die Internalisierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, die meist innerhalb von Minuten nach Rezeptoraktivierung stattfindet (z.B. Ferguson, 2001).

Rezeptorinternalisierung: Für Adrenalin ist bekannt, dass es nach Aktivierung des β_2 -Adrenozeptors zur Internalisierung dessen führt, während Dopamin zwar den adrenergen β_2 -Rezeptor zu aktivieren, jedoch nicht zu internalisieren vermag (Swaminath et al., 2004). Aufgrund dessen sollten unterschiedliche Messzeitpunkte des Adrenalin- und Dopamin-induzierten Signales an β_2 -CHO-Zellen miteinander verglichen werden. Durch vorangegangene Untersuchungen dieser Arbeit war sichergestellt, dass in der gewählten Konzentration von 100 μM auch Dopamin eine maximale, Rezeptor-vermittelte DMR erzielt (siehe 3.2.1.2.).

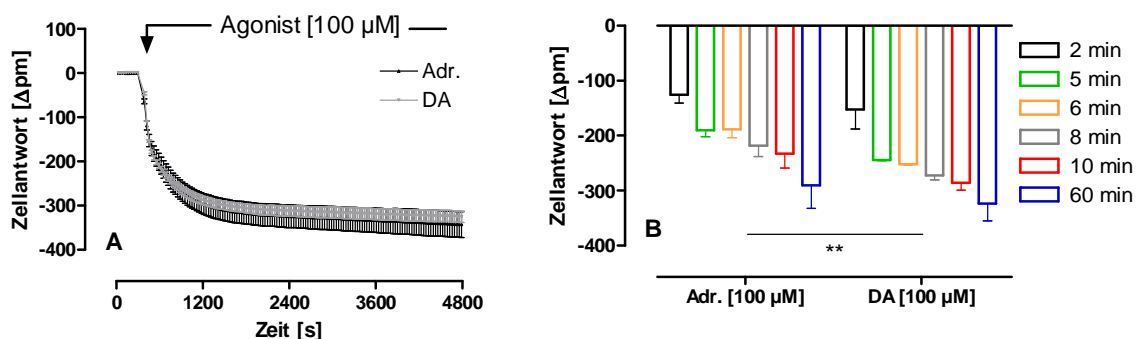


Abb. 43: Vergleich der durch Adrenalin- und Dopamin-induzierten dynamischen Massenumverteilungen an β_2 -CHO-Zellen zu unterschiedlichen Messzeitpunkten. *Ordinate A* und *B*: Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. *Abszisse A*: Messdauer in Sekunden [s]. Der Pfeil stellt den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Mittelwerte \pm Standardfehler eines Basislinien-korrigierten repräsentativen Experimentes, welches in Dreifachbestimmung erhoben und zweifach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden. *B*: *Abszisse*: Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, je in Drei- bzw. Vierfachbestimmung erhoben. Angegeben ist jeweils der gemessene, Basislinien-korrigierte Messzeitpunkt nach Substanzzugabe in min; Adr.: Adrenalin, DA: Dopamin, **: Die Messpunkte 8 min nach Substanzzugabe unterscheiden sich sehr signifikant voneinander (t-Test, $p < 0,01$).

Hinsichtlich der induzierten dynamischen Massenumverteilung zeigten die Agonisten Adrenalin und Dopamin über die gesamte Messdauer von 4800 s einen gleichartigen Signalverlauf. Es wurden vor allem frühe Zeitpunkte gewählt, da eine

Rezeptorinternalisierung innerhalb weniger Minuten nach Substanzzugabe erfolgt. Nur für einen Messwert 8 min nach Substanzzugabe ergab sich ein signifikanter Unterschied der maximalen Zellantworten von Dopamin und Adrenalin (t-Test, $p < 0,01$). Alle anderen Messzeitpunkte zeigten keinen signifikanten Unterschied (t-Test, $p > 0,05$). Da eine Dopamin-vermittelte Rezeptorinternalisierung evtl. langsamer abläuft, wurde zusätzlich der Wert 60 min nach Substanzzugabe getestet. Auch hier ließ sich kein Unterschied zu Adrenalin feststellen. Die Daten wiesen folglich nicht auf eine mittels dynamischer Massenumverteilung messbare Rezeptorinternalisierung hin.

Toxininternalisierung: Es stehen mehrere Hypothesen im Raum, wie die A1-Untereinheit des Choleratoxins die Zellmembran zu überwinden vermag. Neben der von Gill (1976) postulierten Ausbildung einer Membranpore, durch welche die A1-Untereinheit in das Zellinnere gelangen kann, gibt es Publikationen über die endozytotische Aufnahme des Toxins in das Cytosol (Joseph et al., 1978, 1979; Janicot et al., 1988). Für Pertussistoxin gibt es ebenfalls mehrere Hypothesen einer Zellmembranpenetration. Vorausgesetzt es liegt eine Internalisierung zu Grunde, wäre ein Toxin-Signal ein Indiz dafür, dass eine Internalisierung mit dem Epic[®]-Biosensor messbar ist. Außerdem sollte überprüft werden, ob die Toxine selbst zu einer Massenumverteilung führen, was bei einer Vorinkubation der Zellen mit diesen Toxinen berücksichtigt werden müsste. Aus diesem Grund wurde zusätzlich YM 254890 in der zuvor eingesetzten, maximalen Konzentration von 300 nM eingesetzt. Über welchen Mechanismus YM 254890 in das Cytosol gelangt ist derzeit nicht bekannt.

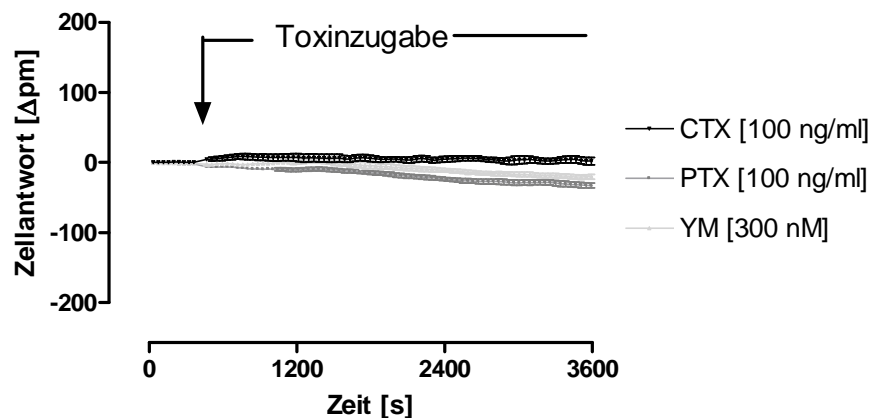


Abb. 44: Toxin-induzierte, Basislinien-korrigierte dynamische Massenumverteilung an Flp-InTM-CHO-Zellen. *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Der Pfeil stellt den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Mittelwerte ± Standardfehler eines repräsentativen Experimentes in Dreifachbestimmung, welches zweifach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Vorinkubation sind durch eine Linie miteinander verbunden. CTX: Choleratoxin; PTX: Pertussistoxin; YM: YM 254890.

Keines der eingesetzten Toxine zeigte eine dynamische Massenumverteilung mittels Epic[®]-Biosensor. Da insbesondere für Cholera toxin eine Internalisierung publiziert ist, ist dieses Resultat ein weiterer Hinweis, dass dieser Vorgang mit dem Epic[®]-Biosensor unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht messbar ist. Dies unterstützt die in vorigem Abschnitt erhobenen Befunde, bei denen mittels Epic[®]-Biosensor keine Adrenalin-induzierte Rezeptorinternalisierung des β_2 -Adrenozeptors gemessen werden konnte. Die Daten zum direkten Einfluss der Toxine auf die Zellen waren auch insofern wichtig, als dass ein dauerhaft negativ- oder positiv-gerichtetes Signal ein Agonist-induziertes Signal maskieren könnte. Da die Toxine keine dynamische Massenumverteilung induzieren, ist dies somit ausgeschlossen.

3.4.2. Adenylylcyase-vermittelte dynamische Massenumverteilung

Durch Aktivierung $G\alpha_{i/o}$ - bzw. $G\alpha_s$ -gekoppelter Rezeptoren kommt es zur Inhibition bzw. Aktivierung der Adenylylcyase, welche Adenosin triphosphat in cyclisches Adenosin monophosphat umwandelt. Im Folgenden sollte überprüft werden, ob die Forskolin-induzierte DMR durch Vorinkubation der Zelle mittels Cholera toxin inhibiert werden kann.

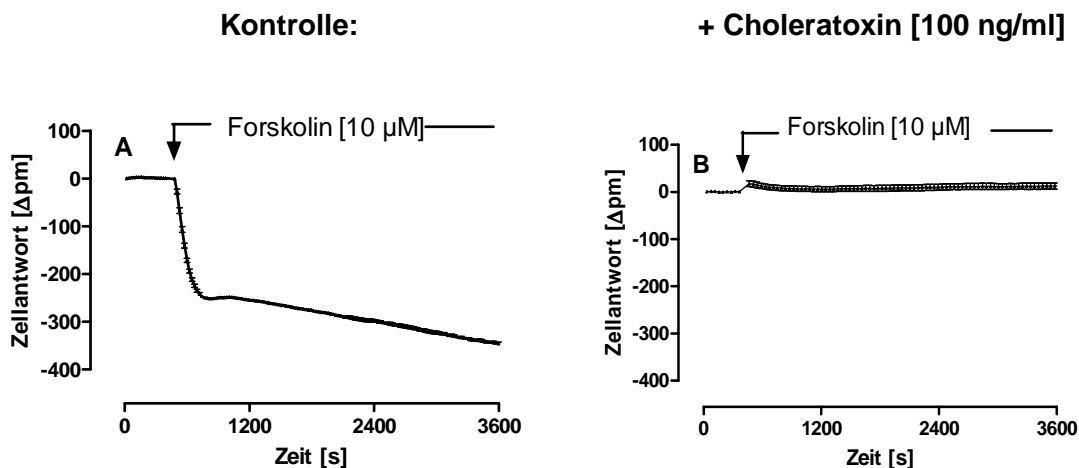


Abb. 45: Forskolin-induzierte dynamische Massenumverteilung ohne Vorstimulation (**A**) bzw. nach Cholera toxin (CTX)-Vorstimulation (**B**) von Flp-InTMCHO-Zellen: (**A**, **B**): *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Der Pfeil stellt jeweils den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Mittelwerte ± Standardfehler eines repräsentativen Experimentes in Dreifachbestimmung, welches drei- bis zwanzigfach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Vorinkubation sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert.

Forskolin zeigte in Flp-InTMCHO Zellen ein negativ gerichtetes Epic[®]-Signal, wie es auch von Kebig et al. (2009) publiziert wurde. Mittels Choleratoxin wurde ein Versuchsansatz zur Maskierung des G_s-Signalweges gewählt. Aus der Beobachtung, dass das Forskolin-Signal durch eine Vorstimulation der Zellen mit Choleratoxin gänzlich aufgehoben werden konnte, lässt sich folgern, dass Forskolin über den gleichen Signaltransduktionsweg agiert ohne direkt das stimulatorische G-Protein zu aktivieren. Forskolin greift somit spezifisch in die G_s-Signalkaskade ein. Des Weiteren lässt sich aus obigen Daten schlussfolgern, dass das Epic[®]-Signal entweder durch Aktivierung der Adenylylcyclase oder durch Aktivierung nachgeschalteter Signalwegskomponenten entstehen muss. Ob die Adenylylcyclase-Aktivierung hauptverantwortlich für die messbare DMR ist oder die Aktivierung nachstehender Enzyme, sollte im Folgenden näher untersucht werden.

3.4.3. Dynamische Massenumverteilung durch Hemmung des cAMP-Abbaus

Isobutylmethylxanthin (IBMX) ist ein unselektiver Inhibitor von Phosphodiesterasen (PDE), welche den Abbau von cAMP sowie cGMP katalysieren. Es wird standardmäßig bei der Messung von intrazellulären cAMP-Spiegeln in einer Konzentration von 1 mM eingesetzt, um die Degradation des Nukleotids zu unterbinden. Im Folgenden wurde die Auswirkung einer PDE-Inhibition am Epic[®]-Biosensor untersucht.

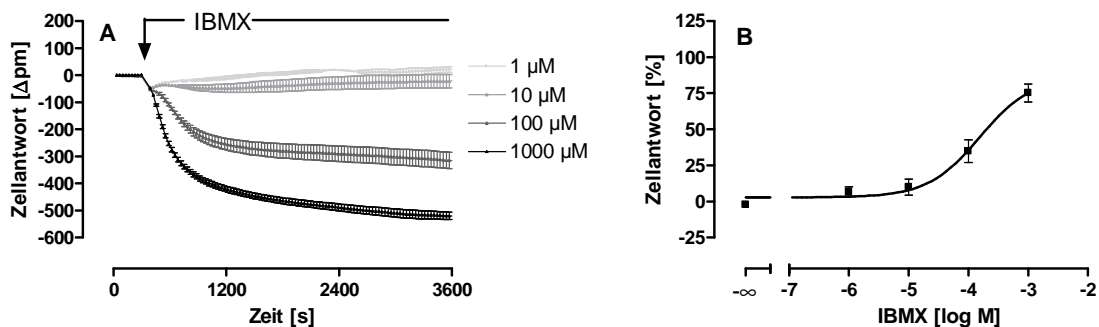


Abb. 46: IBMX-induzierte dynamische Massenumverteilung an h β_2 -CHO-Zellen. **A:** *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δ pm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Substanzzugabe wider. Mittelwerte \pm Standardfehler eines repräsentativen Experimentes in Vierfachbestimmung, welches dreifach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert. **B:** *Ordinate:* Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht dem unteren Plateau, 100 % dem oberen Plateau der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration. *Datenpunkte:* Mittelwerte \pm Standardfehler aus vier voneinander unabhängigen Experimenten, die je als Drei- bzw. Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient $n_H = 1$.

β_2 wt	pEC ₅₀	E _{min} [%]	E _{max} [%]	n _H (frei)	n
IBMX	3,81 ± 0,17	2,9 ± 3,4	86,3 ± 8,8	0,46 ± 0,31 n.s.	4

Abb. 47: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Einzel-Konzentrations-Effekt-Kurve von IBMX an h β_2 -CHO-Zellen. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration, die zu einer halbmaximalen Zellantwort führt. E_{min}: Minimale Zellantwort (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve), E_{max}: Maximale Zellantwort (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). Die Kenngrößen beruhen auf der Mittelwertskurve aus Abb. 46. n.s.: nicht signifikant verschieden von n_H=1 (F-Test, p>0,05). n: Anzahl unabhängiger Einzelversuche.

Der Phosphodiesterase-Inhibitor IBMX führte selbst zu einer intrazellulären Massenumverteilung, die konzentrationsabhängig war. Eine Konzentration von 1 mM IBMX lag im oberen Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve, wie es auch von Bryson und Rodger (1987) beschrieben wurde. Im Folgenden wurde das IBMX-induzierte Epic[®]-Signal auf dessen Spezifität überprüft. Es wurden h β_2 -CHO-Zellen eingesetzt, um eine Rezeptor-vermittelte Stimulation des G_s-Signaltransduktionsweges mittels Orciprenalin durchzuführen. Zusätzlich wurde der G_s-Signaltransduktionsweg durch eine Vorstimulation der Adenylylcyclase mit Forskolin maskiert.

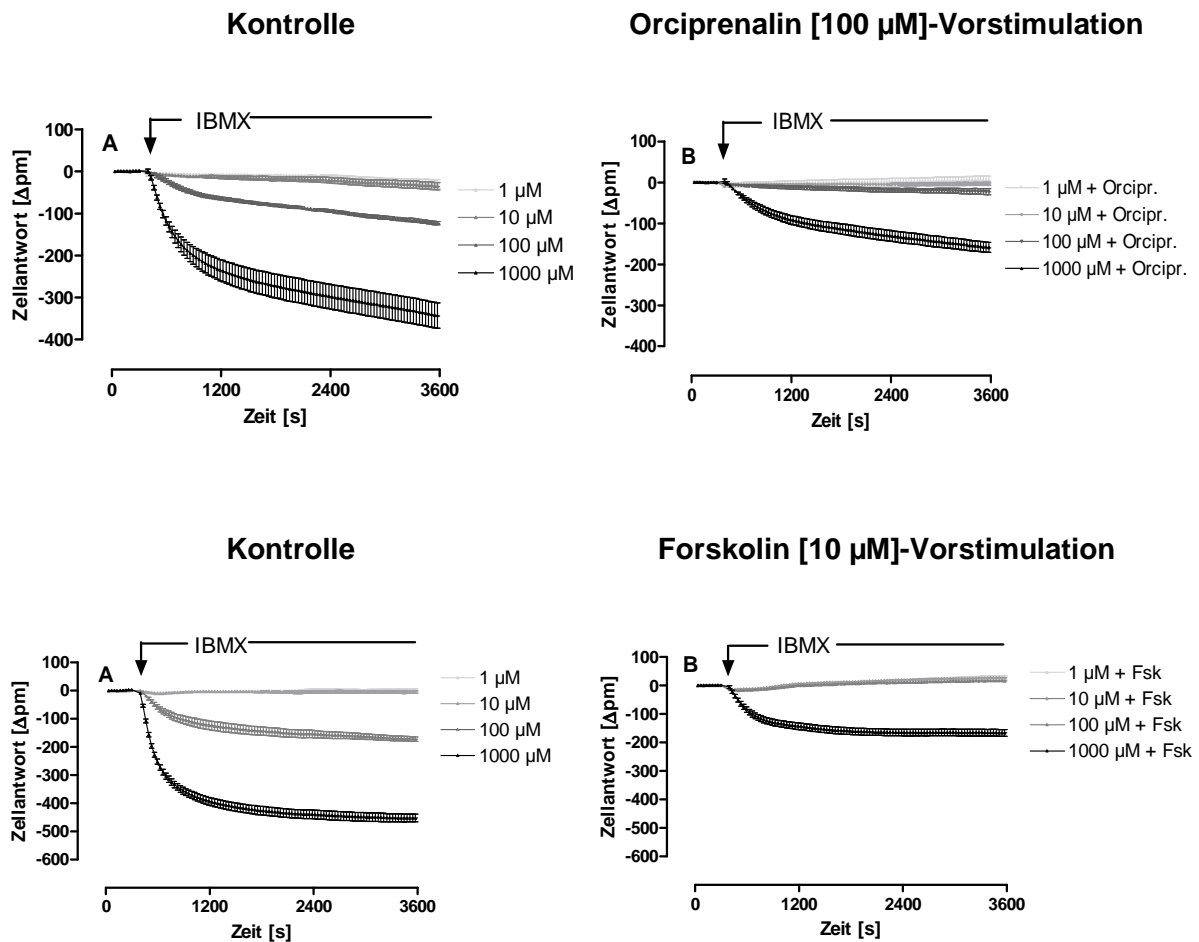


Abb. 48: Oben: Vergleich der IBMX-induzierten dynamischen Massenumverteilung ohne (A) und mit einer Orciprenalin-Vorinkubation [100 μ M] (B) an $h\beta_2$ -CHO-Zellen. **Unten:** Vergleich der IBMX-induzierten dynamischen Massenumverteilung ohne (A) und mit einer Forskolin-Vorstimulation (B) an $h\beta_2$ -CHO-Zellen. *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δ pm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Der Pfeil stellt den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Mittelwerte \pm Standardfehler eines repräsentativen Experimentes in Vierfachbestimmung, welches dreifach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert. Orcipr.: Orciprenalin [100 μ M]; Fsk: Forskolin [10 μ M].

Der Phosphodiesterase-Inhibitor IBMX zeigte nach einer Orciprenalin-Vorstimulation der Zellen über 2,5 h in allen Konzentrationen eine geringere dynamische Massenumverteilung gegenüber der Kontrolle ohne Vorstimulation. Das Kontrollexperiment mit einer Forskolin-Vorstimulation für 2,5 h resultierte ebenfalls in einer verringerten IBMX-induzierten Wellenlängenverschiebung.

Einen ähnlichen experimentellen Ansatz wählten Ng et al. (1999). IBMX wurde an den humanen Sekretin-Rezeptor exprimierenden CHO-Zellen getestet. Der Effekt wurde von Ng et al. (1999) mit dem Cytosensor Microphysiometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) gemessen, welches den pH-Wert des Mediums unmittelbar vor und nach IBMX-Zugabe misst. IBMX führte in Konzentrationen von mehr als 100 μ M zu einer erhöhten extrazellulären Azidifizierungsrate (als Parameter für die erhöhte Konzentration saurer Metabolite). Eine Vorstimulation des G_s -gekoppelten humanen Sekretinrezeptors mit maximalen Sekretin-Konzentrationen konnte keine weitere IBMX-induzierte Azidifizierung induzieren. Zu Grunde liegt wahrscheinlich eine bereits maximale Stimulation der cAMP-vermittelten Wirkung (Ng et al., 1999).

In einer Konzentration von 1 mM führte IBMX auch nach Vorstimulation der Zellen mittels Orciprenalin oder Forskolin zu einer negativen Wellenlängenverschiebung. Dies kann auf eine IBMX-Wirkung außerhalb des G_s -Signalweges deuten oder darauf, dass das Signal ohne Hemmung des cAMP-Abbaus nicht so hoch ansteigen kann wie durch Hemmung des cAMP-Abbaus mittels IBMX. Da IBMX unspezifisch auf Phosphodiesterasen wirkt und damit auch den Abbau von cGMP unterbindet, während Orciprenalin über den β_2 -Adrenozeptor bzw. Forskolin über die Adenylylcyclase nur den cAMP Spiegel steigert, könnte das Restsignal cGMP vermittelt sein.

Der Befund, dass die Hemmung des cAMP-Abbaus zu einer mit dem Epic[®]-Biosensor messbaren DMR führte, ließ vermuten, dass cAMP selbst oder die Aktivierung eines signalabwärts aktivierten Enzyms an der Entstehung des DMR-Signals beteiligt ist. Aus diesem Grund wurden Effektoren des cAMP wie der Proteinkinase A und dem Epac-Protein („exchange protein directly activated by cAMP“) näher untersucht.

3.4.4. Proteinkinase A-vermittelte dynamische Massenumverteilung

Bei der Substanz N^6 -Benzyl-cAMP handelt es sich um ein cAMP-Derivat, welches selektiv die Proteinkinase A (PKA) zu aktivieren vermag (Cho-Chung et al., 1991; Gjertsen et al., 1995). Da N^6 -Benzyl-cAMP selektiv die Proteinkinase A, nicht aber das Protein Epac aktiviert, konnte somit nachgeschaltet von cAMP die messbare dynamische Massenumverteilung betrachtet werden.

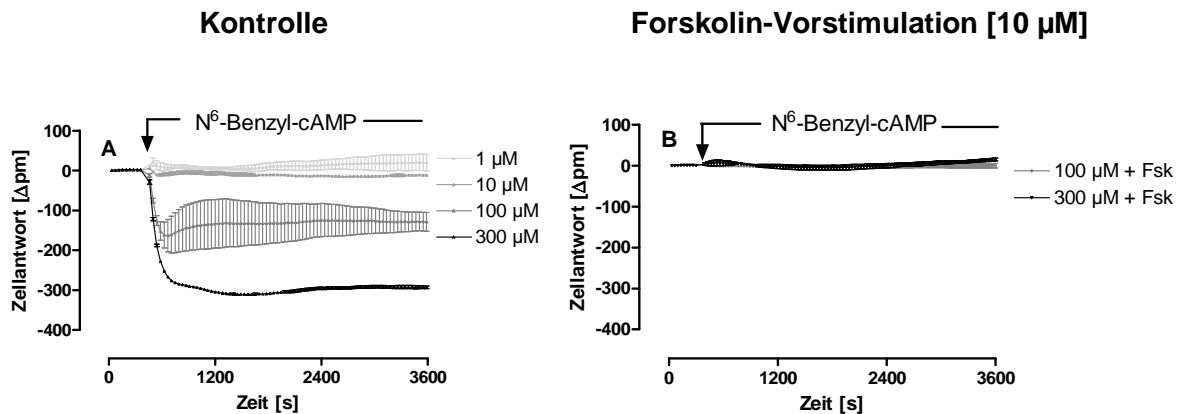


Abb. 49: N^6 -Benzyl-cAMP-induzierte dynamische Massenumverteilung an Flp-InTMCHO-Zellen ohne (A) und mit Forskolin-Vorstimulation für 2,5 h (B) Ordinate: Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. Abszisse: Messdauer in Sekunden [s]. Der Pfeil stellt jeweils den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Mittelwerte ± Standardfehler eines repräsentativen Experimentes in Vierfachbestimmung, welches zweifach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert.

Der PKA-selektive Aktivator N^6 -Benzyl-cAMP führte zu einer starken, intrazellulären Massenumverteilung, die konzentrationsabhängig auftrat. Um zu überprüfen, ob dieses Signal über den G_s -Signaltransduktionsweg vermittelt war, erfolgte parallel eine Vorinkubation der Zellen mit dem Adenylylcyclase-Aktivator Forskolin. N^6 -Benzyl-cAMP war in Folge dessen nicht mehr in der Lage, eine messbare Massenumverteilung hervorzurufen. Daraus konnte geschlussfolgert werden, dass das Epic[®]-Signal des G_{α_s} -Signalweges durch Aktivierung der Proteinkinase A oder nachgeschaltet zu dieser auftritt.

3.4.5. Inhibition der Proteinkinase A

Um selektiv die Proteinkinase A zu inhibieren und somit das PKA-vermittelte Epic[®]-Signal gezielt zu unterbinden, wurde die Substanz H89 gewählt. Bei dieser handelt es sich um ein Isochinolinderivat, welches aus einem unselektiven Inhibitor der Proteinkinase G und der PKA entwickelt wurde (Murray, 2008). H89 wurde bereits von Tran und Fang (2009) am Epic[®]-Biosensor in einer Konzentration von 10 μM eingesetzt, wodurch eine Reduktion des Forskolin-induzierten Signals gemessen werden konnte. Allerdings wurde in der Publikation von Tran & Fang (2009) nicht gezeigt, ob H89 selbst eine messbare DMR-hervorrufft. Dies sollte in vorliegender Arbeit überprüft werden. Es wurden sowohl Experimente an β_2 -CHO-Zellen durchgeführt, um eine Rezeptor-vermittelte Vorstimulation durchzuführen, als auch an untransfizierten Flp-InTM-CHO-Zellen, um auszuschließen, dass H89 über den β_2 -Adrenozeptor agiert.

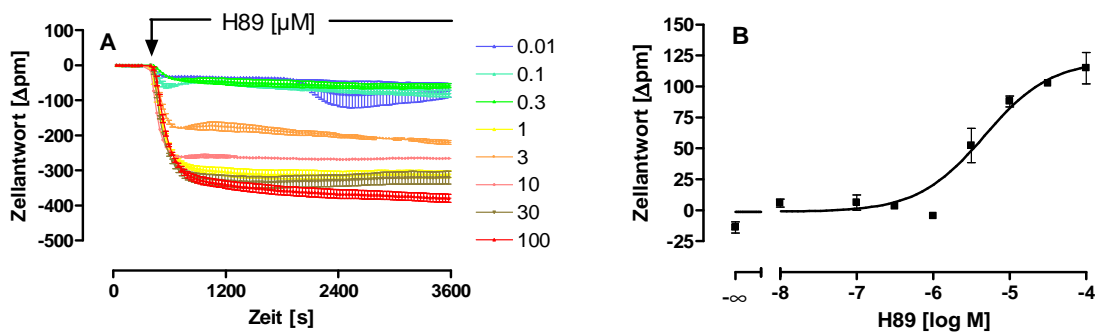


Abb. 50: H89-induzierte dynamische Massenumverteilung an β_2 -CHO-Zellen. **A:** *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Aufgetragen sind die logarithmierten, molaren Konzentrationen von H89 sowie die durch die jeweilige Konzentration induzierte Zellantwort. Der Pfeil stellt den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Mittelwerte \pm Standardfehler eines repräsentativen Experimentes in Zwei- bis Dreifachbestimmung, welches einmal mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert. **B:** *Ordinate:* Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht dem unteren Plateau, 100 % dem oberen Plateau der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration. *Datenpunkte:* Mittelwerte \pm Standardfehler aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten, die je als Zwei- bzw. Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient $n_H = 1$.

β_2 wt	pEC ₅₀	E _{min} [%]	E _{max} [%]	n _H (frei)	n
H89	5,33 \pm 0,14	-1,3 \pm 4,6	121,2 \pm 8,8	1,67 \pm 0,59 n.s.	2

Tab. 36: Kenngrößen \pm Standardfehler der gemittelten Konzentrations-Effekt-Kurve von H89 an β_2 -CHO-Zellen. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration, die zu einer halbmaximalen Zellantwort führt. E_{min}: Minimale Zellantwort (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve), E_{max}: Maximale Zellantwort (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). Die Kenngrößen beruhen auf der Mittelwertskurve aus Abb. 50; n_H(frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. n.s.: nicht signifikant verschieden von n_H=1 (F-Test, p>0,05).

Der Proteinkinase A-Inhibitor H89 zeigte ein negativ gerichtetes Epic[®]-Signal, welches konzentrationsabhängig war. Obwohl H89 einen Inhibitor darstellt, konnte es demnach eine dynamische Massenumverteilung induzieren. Aus zahlreichen jüngeren Publikationen (Lochner und Moolmann, 2006; Palacios et al., 2007; Murray, 2008) geht hervor, dass H89 neben der PKA-Inhibition weitere Effekte innerhalb der Zelle ausübt. So inhibiert es intrazellulär weitere Kinasen mit IC₅₀-Werten im nanomolaren Bereich (Davis et al., 2000). Des Weiteren hemmt es die kleine GTPase Rho, welche zu einer Aktivierung von ROCK („*Rho A coiled-coil kinase*“) und somit zu einer Beeinflussung des Cytoskelettes führt (Leemhuis et al., 2002). Da eine Destabilisierung des Cytoskelettes zu einem großen Signalverlust bei Ganzzellmessungen führt (Scott & Peters, 2010), könnte die Inhibition von Rho an dem H89-Signal beteiligt sein. Im Folgenden musste überprüft werden, ob das H89-induzierte Epic[®]-Signal über den G_s-Signaltransduktionsweg ausgelöst wird oder, ob das Signal über andere Signalwege vermittelt wird.

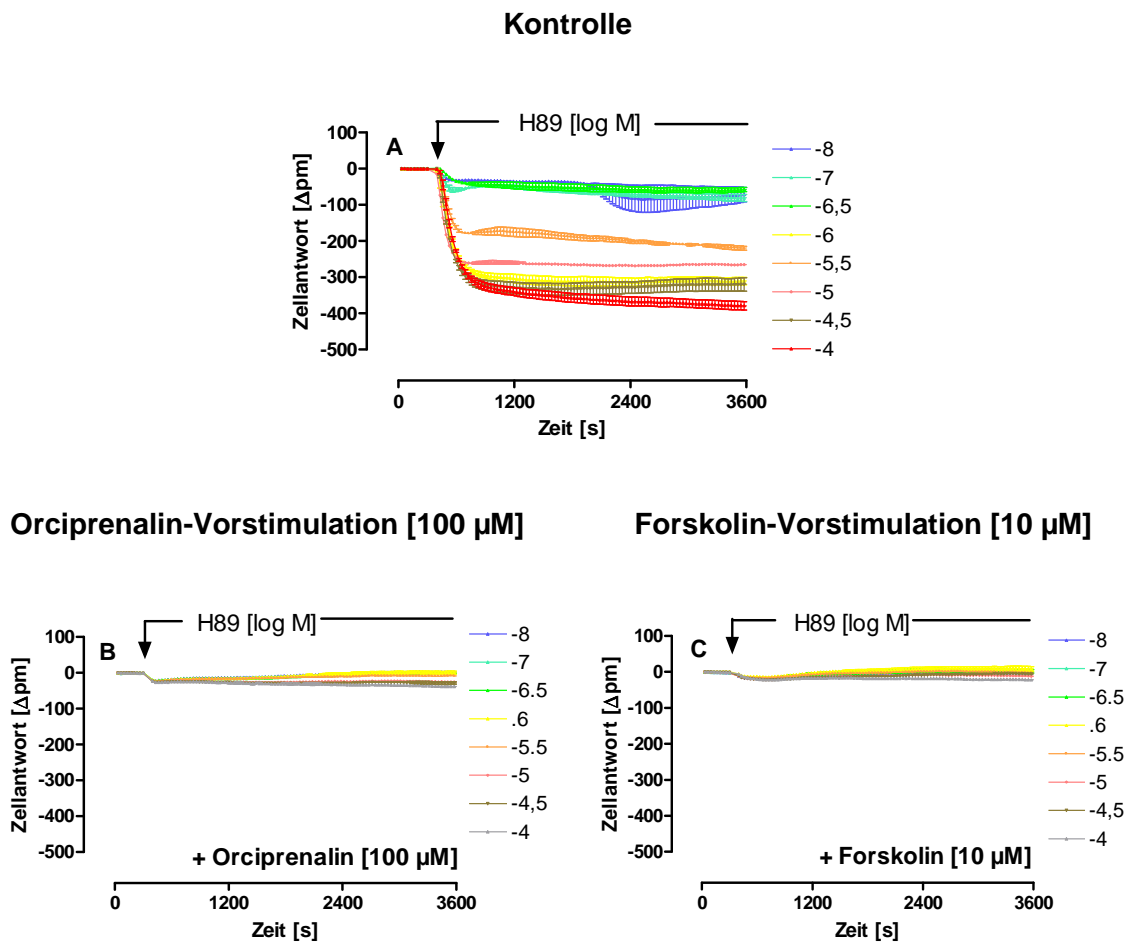


Abb. 51: H89-induzierte dynamische Massenumverteilung ohne Vorstimulation (**A**), nach einer Orciprenalin-Vorstimulation (**B**) oder einer Forskolin-Vorstimulation (**C**) der β_2 -CHO-Zellen.

Ordinate: Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Der Pfeil stellt den jeweiligen Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Mittelwerte \pm Standardfehler eines repräsentativen Experimentes in Zwei- bis Dreifachbestimmung, welches einmal mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert.

Sowohl eine Rezeptor-vermittelte Vorstimulation der Zellen mit einer maximalen Orciprenalin-Konzentration als auch eine nicht Rezeptor-vermittelte Forskolin Vorstimulation führten zu einer Maskierung des im gleichen Experiment erhobenen H89-Signales. Da es Hinweise darauf gibt, dass H89 mit dem adrenergen β_2 -Rezeptor interagiert (Penn et al., 1999), wurden die gleichen Experimente auch an untransfizierten Flp-InTMCHO-Zellen durchgeführt.

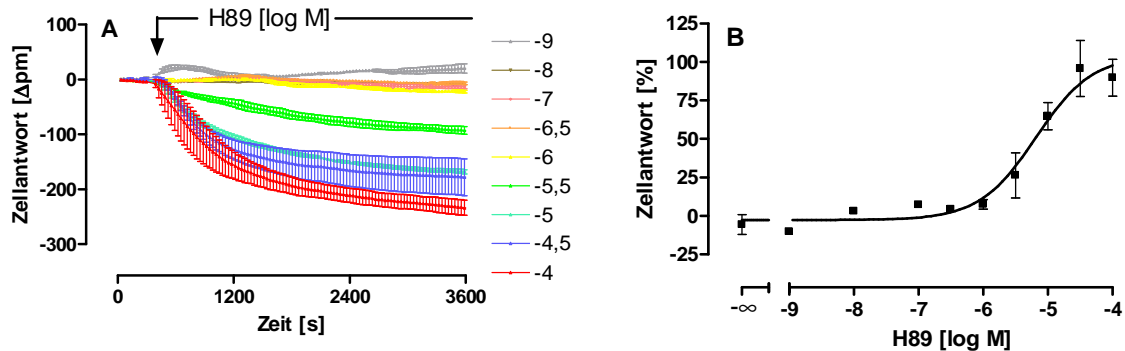


Abb. 52: H89-induzierte dynamische Massenumverteilung an Flp-InTM-CHO-Zellen. **A:** *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Aufgetragen sind die logarithmierten, molaren Konzentrationen von H89 sowie die durch die jeweilige Konzentration induzierte Zellantwort. Der Pfeil stellt den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Mittelwerte \pm Standardfehler eines repräsentativen Experimentes in Zwei- bis Dreifachbestimmung, welches einmal mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert. **B:** *Ordinate:* Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht dem unteren Plateau, 100 % dem oberen Plateau der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration. *Datenpunkte:* Mittelwerte \pm Standardfehler aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten, die je als Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient $n_H = 1$.

	pEC_{50}	E_{min} [%]	E_{max} [%]	n_H (frei)	n
H89	$5,19 \pm 0,15$	$-2,7 \pm 3,8$	$104,2 \pm 8,9$	$1,59 \pm 0,11$ n.s.	2

Tab. 37: Kenngrößen \pm Standardfehler der gemittelten Konzentrations-Effekt-Kurve von H89 an Flp-InTM-CHO-Zellen. pEC_{50} : Negativer dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration, die zu einer halbmaximalen Zellantwort führt. E_{min} : Minimale Zellantwort (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve), E_{max} : Maximale Zellantwort (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). Die Kenngrößen beruhen auf der Mittelwertskurve aus Abb. 52; n_H (frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. n.s.: nicht signifikant verschieden von $n_H=1$ (F-Test, $p>0,05$).

Auch an untransfizierten CHO-Zellen führte IBMX zu einer konzentrations-abhängigen dynamischen Massenumverteilung. Es konnte ein Wendepunkt berechnet werden, der sich nicht signifikant von dem IBMX-Wendepunkt an β_2 -CHO-Zellen des vorangegangenen Abschnitts unterschied (t-Test, $p > 0,05$). Als nächstes sollte auch an diesen Zellen untersucht werden, ob das IBMX-induzierte Signal über den G_s -Signalweg vermittelt ist.

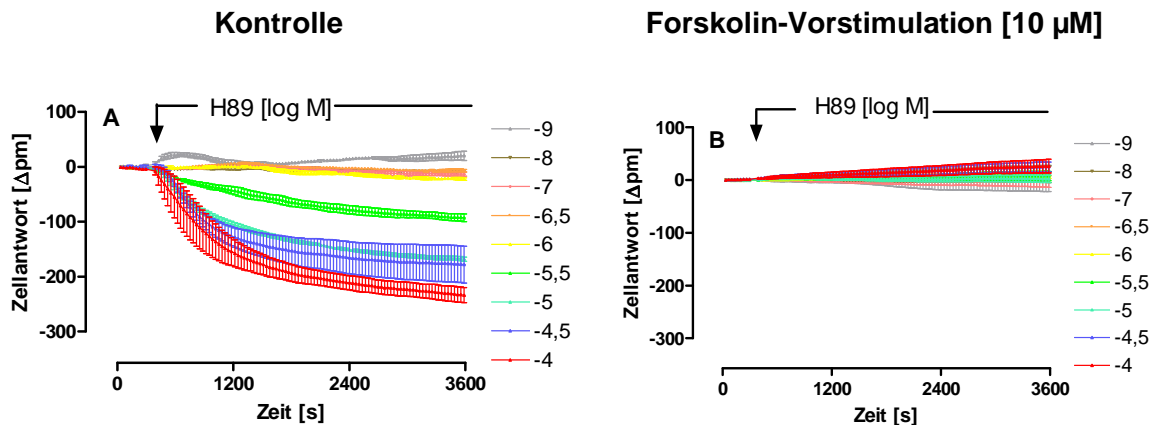


Abb. 53: H89-induzierte dynamische Massenumverteilung ohne Vorstimulation (**A**), nach einer Forskolin-Vorstimulation (**B**) der Flp-InTM-CHO-Zellen. *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Der Pfeil stellt jeweils den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Mittelwerte ± Standardfehler eines repräsentativen Experimentes in Zwei- bis Dreifachbestimmung, welches einmal mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert.

Eine Forskolin-Vorstimulation führte wie im vorangegangenen Abschnitt an $h\beta_2$ -CHO-Zellen gezeigt, zur Maskierung des H89-Signales, so dass nicht die Interaktion mit dem β_2 -Adrenozeptor für das H89-induzierte Epic[®]-Signal verantwortlich war. Aufgrund der hier erhobenen Daten konnte H89 nicht zur PKA-Inhibition einer Ganzzellmessung verwendet werden. Die in diesem Abschnitt gezeigten Experimente verdeutlichen, dass das H89-induzierte Signal über den G_s -Signaltransduktionsweg vermittelt sein kann oder durch Forskolin bereits eine maximale negative DMR induziert wird, die die Messung einer weiteren negativen Massenumverteilung verhindert.

3.4.6. Epac-vermittelte dynamische Massenumverteilung

Bei dem Guaninaustauschfaktor Epac („exchange protein directly activated by cAMP“) handelt es sich um ein Effektorprotein von cAMP (de Rooij et al., 1998, Kawasaki et al. 1998). Von diesem sind aktuell zwei Isoformen bekannt, Epac 1 und Epac 2. Während Epac 1 ubiquitär im gesamten Körper vorkommt, befindet sich Epac 2 vor allem in Gehirn und endokrinen Geweben (Kawasaki et al., 1998). Bei Aktivierung kommt es zum Austausch von GDP gegen GTP an der kleinen GTPase Rap1. Diese agiert als Gegenspieler von Ras, einer an der Plasmamembran lokalisierten GTPase (Kitayama et al., 1989).

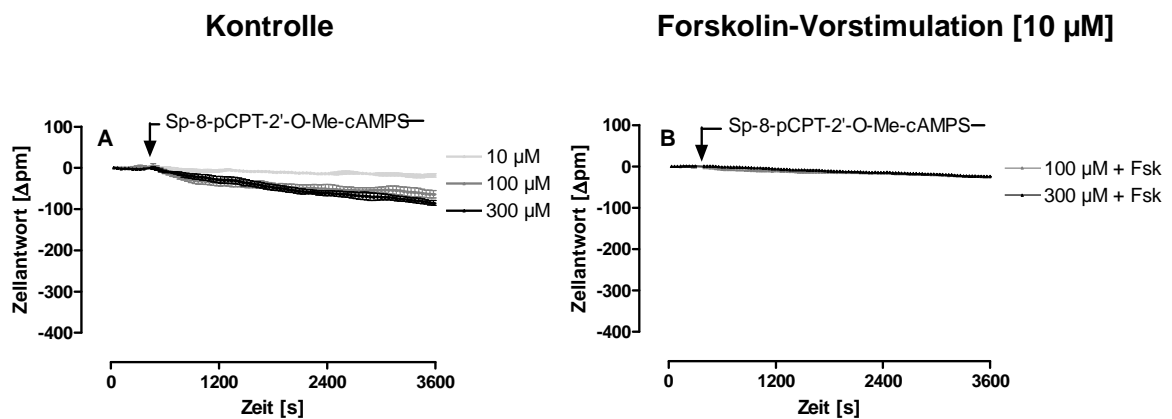


Abb. 54: Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS-induzierte dynamische Massenumverteilung an Flp-InTMCHO-Zellen ohne (A) und mit Forskolin-Vorstimulation für 2,5 h (B) Ordinate: Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. Abszisse: Messdauer in Sekunden [s]. Der Pfeil stellt jeweils den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Mittelwerte ± Standardfehler eines repräsentativen Experimentes in Vierfachbestimmung, welches zweifach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert.

Der Epac-Aktivator Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS zeigte ein geringes, aber signifikantes, negativ-gerichtetes Epic[®]-Signal. Dieses konnte durch Vorstimulation der Zellen mit Forskolin für 2,5 h maskiert werden, so dass kein weiteres negativ-gerichtetes Signal mehr messbar war. Dies wies darauf hin, dass auch das durch den Epac-Agonisten-induzierte Signal über den G_s-Signaltransduktionsweg ausgelöst wurde oder die Forskolin-Vorstimulation bereits eine maximale negativ-gerichtete Massenumverteilung induzierte, die von Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS nicht mehr gesteigert werden konnte. Da Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS in Konzentrationen größer 100 μM auch die Proteinkinase A aktiviert (Holz et al., 2007), könnte das durch Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS-induzierte Signal auf eine schwache Aktivierung der PKA zurückzuführen sein.

3.5. [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimente an Membransuspensionen aus Flp InTMhM₄-CHO-Zellen

Nach der systematischen Analyse der Messung der dynamischen Massenumverteilung sollte nun der muskarinische M₄-Rezeptorsubtyp durch funktionelle Untersuchungen eingehender untersucht werden. Der erste Schritt intrazellulärer Signalwegsaktivierung ist die Aktivierung des trimeren G-Proteins, welches durch Rezeptoraktivierung initialisiert wird. Im Folgenden sollte die durch unterschiedliche Agonisten an Membransuspensionen, die den humanen, muskarinischen M₄-Rezeptorsubtyp enthalten, induzierte G-Proteinaktivierung untersucht werden. Dabei wurde sowohl deren Wirksamkeit als auch die intrinsische Aktivität der Liganden untersucht. Jede Charge einer Membransuspension wurde zuvor einem „Homologen Konkurrenzexperiment“ mit [³H]N-Methylscopolamin ([³H]NMS) und unmarkierten NMS unterzogen wie es in 2.8.2.1. ausführlich beschrieben ist. Dies diente der Berechnung der Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des Radioliganden (K_D) sowie der Anzahl an Ligandbindungsstellen (B_{max}). Die Charakteristika jeder Charge sind unter 8.1. aufgeführt und näher erläutert.

Für die Testsubstanz Acetylcholin erfolgte die Normierung auf das obere und untere Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve des Versuchstages, die durch Analyse mittels „Vier-Parameter-logistischer-Gleichung“ (Gleichung 6) ermittelt wurde. Alle weiteren Konzentrations-Effekt-Kurven wurden auf das obere und untere Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve eines Vollagonisten, das zuvor auf seine gegenüber Acetylcholin unveränderte intrinsische Aktivität hin überprüft wurde, des gleichen Versuchstages normiert. Für jede sigmoidale Kurve wurde mittels F-Test (Gl. 19) auf eine von $n_H = 1$ abweichende Kurvensteilheit getestet. Die Mittelwerte der Einzelversuche wurden berechnet, zusammengeführt und erneut einer „Vier-Parameter-logistischen Gleichung“ (Gl. 6) unterzogen. An allen Versuchstagen wurde eine supramaximale Konzentration des inversen Agonisten Atropin mitgeführt, um eine mögliche konstitutive Rezeptoraktivität zu detektieren.

3.5.1. Acetylcholin-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung

Zu Beginn der Untersuchungen wurde der endogene Transmitter cholinergere Rezeptoren Acetylcholin untersucht. Acetylcholin diente als Referenzsubstanz zur Detektion von partialagonistischem oder superagonistischem Verhalten einer Testsubstanz, da es per definitionem einen Vollagonisten darstellt.

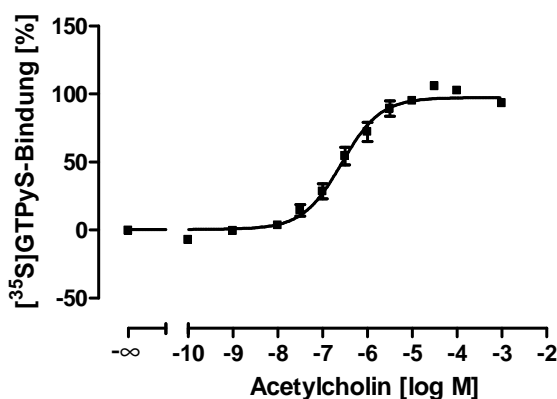


Abb. 55: Acetylcholin-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung an Membransuspensionen aus CHO Flp-InTMM₄-Zellen. *Ordinate:* Prozentuale [³⁵S]GTPγS-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Acetylcholin Konzentration. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameterlogistische Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient n_H = 1. *Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler (SEM) aus acht voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung erhoben wurden.

M ₄ wt	pEC ₅₀	E _{min} [%]	E _{max} [%]	n _H (frei)	n
Acetylcholin	6,58 ± 0,07	0,5 ± 2,3	97,4 ± 2,2	0,84 ± 0,10 n.s.	8

Tab. 38: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve. Die Kenngrößen beruhen auf der Mittelwertskurve aus Abb. 55. pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung hervorruft. E_{min}: Minimale [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve) E_{max}: Maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). n_H(frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit, n.s.: nicht signifikant verschieden von n_H = 1 (F-Test, p>0,05); n: Anzahl unabhängiger Einzelversuche.

Die Wirksamkeit von Acetylcholin ist mit einem pEC₅₀-Wert von 6,58 ± 0,07 nicht signifikant von der von Lazareno und Birdsall (1993) gemessenen Wirksamkeit (pEC₅₀= 6,79 ± 0,09) durch [³⁵S]GTPγS-Messung von M₄-CHO-Zellhomogenaten verschieden (t-Test, p>0,05). Außerdem unterscheidet sie sich nicht signifikant von der von Peters et al. (2007) ermittelten Acetylcholin Wirksamkeit an Membransuspensionen aus hM₄-CHO-Zellen (EC₅₀ = 384 nM; t-Test, p>0,05). Der in vorliegender Arbeit ermittelte Hill-Koeffizient unterscheidet sich ebenfalls nicht signifikant von dem von Lazareno und Birdsall publizierten (n_H= 0,67 ± 0,02; t-Test, p>0,05).

3.5.2. Oxotremorin M-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung

Mit Oxotremorin M sollte eine seit langem bekannte pharmakologische Testsubstanz untersucht werden, da sie strukturell den neu synthetisierten Substanzen Iperoxo und damit auch den Hybridverbindungen zu Grunde liegt. Vergleichend wurde der endogene muskarinische Agonist Acetylcholin mitgeführt.

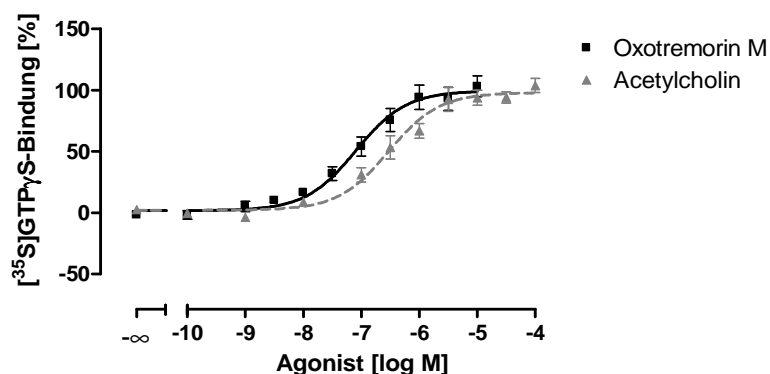


Abb. 56: Vergleich von Oxotremorin M- und Acetylcholin-induzierter [³⁵S]GTPγS-Bindung an Membransuspensionen aus CHO Flp-InTMM₄-Zellen. *Ordinate:* Prozentuale [³⁵S]GTPγS-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve von Acetylcholin. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameter-logistische Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient n_H = 1. *Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler (SEM) aus vier bis fünf voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung erhoben wurden.

M ₄ wt	pEC ₅₀	E _{min} [%]	E _{max} [%]	n _H (frei)	n
Oxotremorin M	7,09 ± 0,11*	2,8 ± 3,4	99,4 ± 4,3	0,70 ± 0,15 n.s.	5
Acetylcholin	6,53 ± 0,09	2,1 ± 3,2	98,0 ± 3,3	0,93 ± 0,15 n.s.	5

Tab. 39: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Oxotremorin M- und Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurven. Die Kenngrößen beruhen auf den Mittelwertskurven aus Abb. 56. pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung hervorruft. E_{min}: Minimale [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven), E_{max}: Maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve), n_H(frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit, n.s.: nicht signifikant verschieden von n_H = 1 (F-Test, p>0,05), n: Anzahl unabhängiger Einzelversuche. *: Signifikant verschieden zu der entsprechenden Kenngröße von Acetylcholin (t-Test, p>0,05).

Die Wirksamkeit von Oxotremorin M am muskarinischen M₄-Rezeptor lag signifikant über der Wirksamkeit des endogenen, muskarinischen Liganden Acetylcholin (t-Test, p<0,05), während sich die intrinsischen Aktivitäten nicht voneinander unterschieden (t-Test, p>0,05). Die Tatsache, dass Oxotremorin M am M₄-Rezeptorsubtyp vollagonistisch wirkt, konnte auch von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden: So fanden Mistry et al. (2005) durch Messung des intrazellulären cAMP-Spiegels eine intrinsische Aktivität von 99,7 ± 4,2 % im Vergleich zu Methacholin. Eine gegenüber Acetylcholin erhöhte Wirksamkeit

konnte auch am M₂-Acetylcholinrezeptor von K. Kellershojn (Dissertationsschrift 2007) durch Messung der [³⁵S]GTPγS-Bindung gezeigt werden. Dort lag die Differenz der Wendepunkte bei 0,52 Dekaden, eine Differenz, die mit der am M₄-Rezeptor gemessenen Differenz (0,56 Dekaden) übereinstimmt.

3.5.3. Iperoxo-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung

Die Testsubstanz Iperoxo wurde in vorliegender Arbeit erstmals am muskarinischen M₄-Rezeptorsubtyp untersucht. Für den M₂-Rezeptorsubtyp ist für Iperoxo eine gegenüber Acetylcholin erhöhte Wirksamkeit bekannt (Antony et al., 2009).

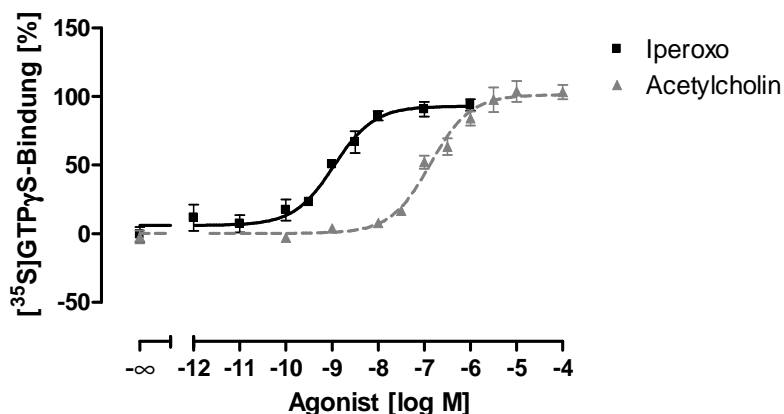


Abb. 57: Vergleich von Iperoxo- und Acetylcholin-induzierter [³⁵S]GTPγS-Bindung an Membransuspensionen aus CHO Flp-InTMM₄-Zellen. *Ordinate:* Prozentuale [³⁵S]GTPγS-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve von Acetylcholin. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameter-logistische Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient $n_H = 1$. *Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler (SEM) aus vier voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung erhoben wurden.

M ₄ wt	pEC ₅₀	E _{min} [%]	E _{max} [%]	n _H (frei)	n
Iperoxo	8,96 ± 0,10*	6,0 ± 3,1	92,9 ± 3,5	0,95 ± 0,18 n.s.	4
Acetylcholin	6,87 ± 0,08	0,2 ± 2,9	101,2 ± 3,1	0,77 ± 0,12 n.s.	4

Tab. 40: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Iperoxo- und Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurven. Die Kenngrößen beruhen auf den Mittelwertskurven aus Abb. 57. pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung hervorruft. E_{min}: Minimale [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven) E_{max}: Maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). n.s.: nicht signifikant verschieden von n_H = 1 (F-Test, p>0,05); n_H(frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit, n: Anzahl unabhängiger Einzelversuche.

Iperoxo führte am muskarinischen M_4 -Rezeptor zu einer signifikant höheren Wirksamkeit als der endogene Muskarinrezeptor-Ligand Acetylcholin. Die Linksverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurve von Iperoxo gegenüber Acetylcholin betrug 2,09 Dekaden. Eine Linksverschiebung von 2,17 Dekaden beobachtete auch A. Kebig (Dissertationsschrift 2010) durch $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Messung am M_2 -Rezeptorsubtyp. Die intrinsischen Aktivitäten von Iperoxo und Acetylcholin unterschieden sich hingegen nicht voneinander (t-Test, $p > 0,05$). Am M_2 -Rezeptor wies Iperoxo ebenfalls einen Vollagonismus auf (Dissertationsschrift Kebig 2010).

3.5.4. Pilocarpin-induzierte $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung

Pilocarpin wurde im Folgenden als ein therapeutisch genutzter Vertreter muskarinischer Partialagonisten untersucht.

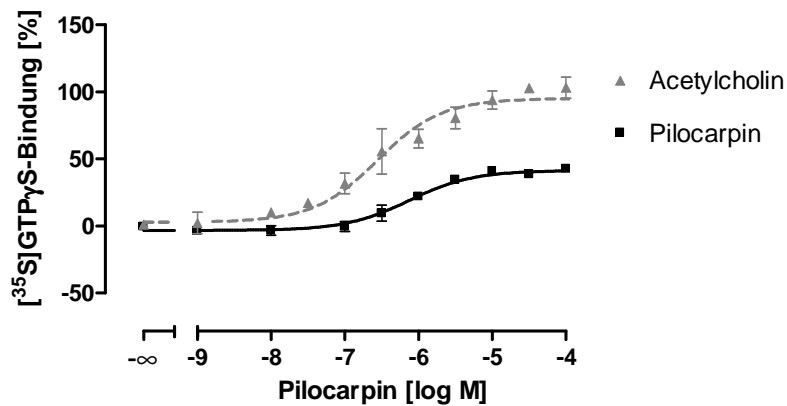


Abb. 58: Vergleich von Pilocarpin- und Acetylcholin-induzierter $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung an Membransuspensionen aus CHO Flp-InTM M_4 -Zellen. *Ordinate:* Prozentuale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve von Acetylcholin. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameter-logistische Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient $n_H = 1$. *Datenpunkte:* Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung erhoben wurden.

M_4 wt	pEC_{50}	E_{min} [%]	E_{max} [%]	n_H (frei)	n
Pilocarpin	6,13 ± 0,11	-3,3 ± 1,9	41,3 ± 1,8	1,30 ± 0,20 n.s.	3
Acetylcholin	6,56 ± 0,12	2,8 ± 4,1	95,0 ± 3,8	0,66 ± 0,15 n.s.	3

Tab. 41: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Pilocarpin- und Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurven. Die Kenngrößen beruhen auf den Mittelwertskurven aus Abb. 58. pEC_{50} : negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [35 S]GTP γ S-Bindung hervorruft. E_{min} : Minimale [35 S]GTP γ S-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven) E_{max} : Maximale [35 S]GTP γ S-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). n_H (frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. n.s.: nicht signifikant verschieden von $n_H = 1$ (F-Test, $p > 0,05$). n: Anzahl unabhängiger Einzelversuche.

Pilocarpin erreichte am muskarinischen M_4 -Rezeptor eine Wirksamkeit von $pEC_{50} = 6,12 \pm 0,12$, die sich nicht signifikant von dem von D. Klemt (Dissertationsschrift 2005) mittels [35 S]GTP γ S-Bindung gemessenen Wendepunkt (pEC_{50} : $6,23 \pm 0,03$; t-Test, $p > 0,05$) unterscheidet. McKinney et al. (1991) konnten an den M_4 -Rezeptor-exprimierenden N1E-115-Zellen eine Pilocarpin-Wirksamkeit von 5,85 durch cAMP-Messung ermitteln, die sich ebenfalls nicht signifikant von dem in dieser Arbeit ermittelten Wendepunkt unterscheidet (t-Test, $p > 0,05$). Neuere Untersuchungen von Nawaratne et al. (2008) konnten durch Messung der ERK1/2-Phosphorylierung an den humanen M_4 -Rezeptorsubtyp exprimierenden CHO-Zellen eine Pilocarpin-Wirksamkeit mit einem pEC_{50} -Wert von $5,7 \pm 0,3$ ermitteln, der sich ebenfalls nicht signifikant von der in vorliegender Arbeit unterscheidet (t-Test, $p > 0,05$). Die Wirksamkeit war zudem nicht signifikant verschieden von der Acetylcholin-Wirksamkeit (t-Test, $p > 0,05$). Die intrinsische Aktivität von Pilocarpin betrug in jenen Experimenten $37,5 \pm 2,5$ %, was im Vergleich zu Acetylcholin einen Partialagonismus darstellt. McKinney et al. (1991) fanden durch Messung des intrazellulären cAMP-Spiegels ebenfalls einen Partialagonismus von 42 ± 4 %, der genau mit dem in dieser Arbeit gemessenen übereinstimmt.

3.5.5. McN-A-343-induzierte [35 S]GTP γ S-Bindung

Mit McN-A-343 wurde eine muskarinische Testsubstanz untersucht, die in früheren Publikationen als M_4 -Rezeptor-prävalenter Agonist identifiziert worden war (McKinney et al., 1991; Wang & El-Fakahany, 1993; Richards & van Giersbergen, 1995). In vorliegender Arbeit sollte nun die intrinsische Aktivität sowie die Wirksamkeit von McN-A-343 an hM_4 -Flp-InTM-CHO-Zellhomogenaten untersucht werden und ein Vergleich zu dem im nachfolgenden Kapitel untersuchten Einfluss der Epitopes Trp 7.35 des M_4 -Rezeptors gezogen werden. Als Referenz wurde die zuvor als muskarinischer Vollagonist identifizierte Testsubstanz Oxotremorin M mitgeführt.

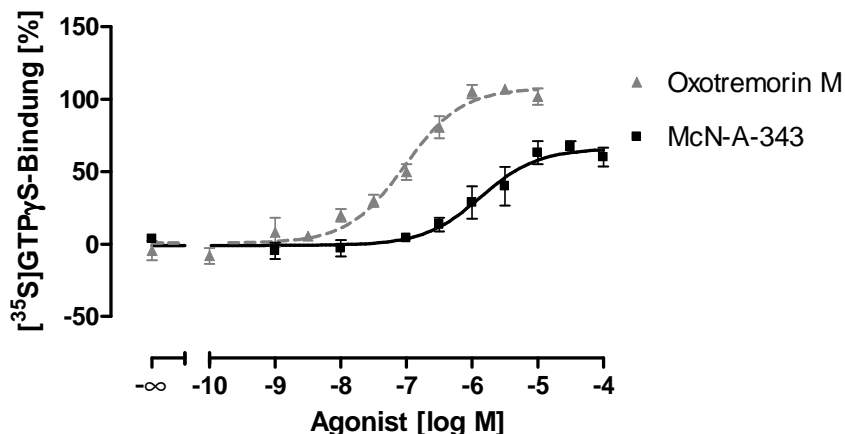


Abb. 59: Vergleich von McN-A-343- und Oxotremorin M-induzierter [³⁵S]GTPγS-Bindung an Membransuspensionen aus CHO Flp-InTMM₄-Zellen. *Ordinate:* Prozentuale [³⁵S]GTPγS-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve von Oxotremorin M. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameter-logistische Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient $n_H = 1$. *Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler (SEM) aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung erhoben wurden.

M ₄ wt	pEC ₅₀	E _{min} [%]	E _{max} [%]	n _H (frei)	n
McN-A-343	5,87 ± 0,16*	-0,9 ± 3,4	65,9 ± 4,6*	1,20 ± 0,52 n.s.	3
Oxotremorin M	7,03 ± 0,09	0,7 ± 3,2	107,7 ± 4,3	0,81 ± 0,16 n.s.	3

Tab. 42: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten McN-A-343- und Oxotremorin M-Konzentrations-Effekt-Kurven. Die Kenngrößen beruhen auf den Mittelwertkurven aus Abb. 59. pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung hervorruft. E_{min}: Minimale [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven) E_{max}: Maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). n_H (frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit, n.s.: nicht signifikant verschieden von n_H = 1. n: Anzahl unabhängiger Einzelversuche. *: signifikant verschieden zu der entsprechenden Kenngröße von Oxotremorin M (t-Test, p<0,05).

Die Testsubstanz McN-A-343 erreichte am M₄-Rezeptor eine Wirksamkeit von 5,87 ± 0,16, die signifikant unter der Wirksamkeit von Oxotremorin M lag (t-Test, p<0,05). McKinney et al. (1991) konnten an den M₄-Rezeptor-enthaltendem Rattenstriatum eine McN-A-343-Wirksamkeit von pEC₅₀ = 5,85 durch Messung des intrazellulären cAMP-Spiegels ermitteln, ebenso wie Figueroa et al. (2008) eine Wirksamkeit von pEC₅₀ = 6,25 ± 0,17 an stabil mit der M₄-Rezeptor-Plasmid-DNA transfizierten CHO-Zellen erhielten. Beide Wendepunkte unterscheiden sich nicht signifikant von dem in dieser Arbeit gefundenen Wendepunkt (t-Test, p>0,05). Wang und El-Fakahany (1993) erzielten mittels Messung der intrazellulären cAMP-Konzentration nach Forskolin-Vorstimulation einen EC₅₀-Wert von 0,4 ± 0,1 μM, der sich ebenfalls nicht signifikant von dem in dieser Arbeit unterscheidet (t-Test, p>0,05). Des Weiteren zeigte McN-A-343 einen Partialagonismus mit einer maximalen intrinsischen Aktivität von 65,9 ± 4,6 [%]

verglichen mit Oxotremorin M. Eine maximale intrinsische Aktivität bezogen auf eine maximale Oxotremorin M-Konzentration von 58 ± 4 % zeigten auch McKinney et al. (1991) durch Messung des intrazellulären cAMP-Spiegels. Beide Maxima unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (t-Test, $p > 0,05$).

3.5.6. Überprüfung der Bindungseigenschaften der Testsubstanz Iperoxo an hM₄-CHO-Zell-Homogenaten

Da Iperoxo in vorliegender Arbeit erstmals am M₄-Rezeptor eingesetzt wurde und ein Vergleich mit den am M₂-Rezeptor erhobenen Iperoxo-Kenngrößen erfolgen sollte, musste überprüft werden, ob die Substanz am M₄-Rezeptorsubtyp, wie am M₂-Rezeptorsubtyp (Dissertationsschrift Kebig, 2010), eine rein orthosterische Rezeptor-Bindung eingeht. Dazu wurden Konzentrations-Effekt-Kurven mit und ohne Zusatz verschiedener Atropin-Konzentrationen erhoben. Es sollte analysiert werden, ob der muskarinische inverse Agonist Atropin, der rein orthosterisch bindet, zu einer kompetitiven Interaktion mit Iperoxo und somit zu einer steten Rechtsverschiebung mit steigenden Atropin-Konzentrationen bei unverändertem Maximum führt. Dies wäre ein Indiz für eine ebenfalls rein orthosterische Bindung von Iperoxo an den M₄-Rezeptor.

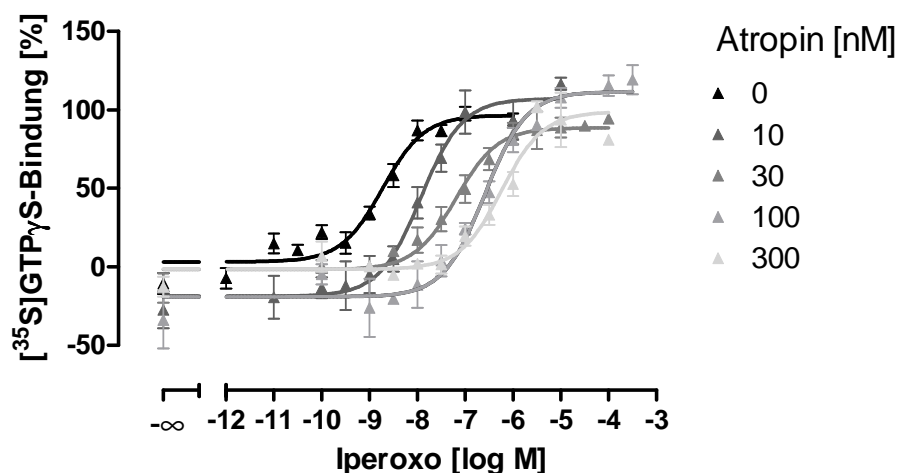


Abb. 60: Einfluss von Atropin auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Iperoxo an Membransuspensionen aus CHO Flp-InTMM₄-Zellen. *Ordinate:* Prozentuale [³⁵S]GTPγS-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurve ohne Atropin-Zusatz. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Iperoxo-Konzentration. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameter-logistische Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient $n_H = 1$. *Datenpunkte:* Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) aus drei bis vier voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung erhoben wurden.

Ergebnisse

	Kontrolle	Atropin 10 nM	Atropin 30 nM	Atropin 100 nM	Atropin 300 nM
pEC₅₀	8,73 ± 0,10	7,92 ± 0,13*	7,19 ± 0,12*	6,59 ± 0,12*	6,24 ± 0,14*
E_{min} [%]	3,1 ± 2,1	-18,7 ± 0,1	-1,7 3,7	-19,2 ± 5,1	-1,6 ± 3,8
E_{max} [%]	96,6 ± 3,8	107,1 ± 6,5	88,6 ± 3,9	111,7 ± 6,3	98,8 ± 7,6
n_H (frei)	0,78 ± 0,15 n.s.	0,92 ± 0,23 n.s.	0,62 ± 0,13 n.s.	0,67 ± 0,15 n.s.	1,05 ± 0,33 n.s.
n	3	3	3	4	3

Tab. 43: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurven ohne (Kontrolle) und mit Atropinzugabe. Die Kenngrößen beruhen auf den Mittelwertkurven aus Abb. 60. pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung hervorruft. E_{min}: Minimale [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve) E_{max}: Maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve); n_H(frei): freier Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit, n.s.: nicht signifikant verschieden von n_H = 1. n: Anzahl unabhängiger Einzelversuche. *: signifikant verschieden zur entsprechenden Kenngröße der Kontrollkurve (t-Test, p<0,05).

Obige Abbildung sowie die dazugehörige Tabelle verdeutlichen, dass die Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurve mit steigenden Atropin-Konzentrationen zu höheren Konzentrationen verschoben wurde. Gleichzeitig blieb das obere Plateau der Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurven unverändert.

Alle Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurven wiesen eine Steigung auf, die sich nicht signifikant von n_H = 1 unterschied (t-Test, p>0,05), so dass eine Parallelverschiebung mit steigenden Atropin-Konzentrationen vorlag.

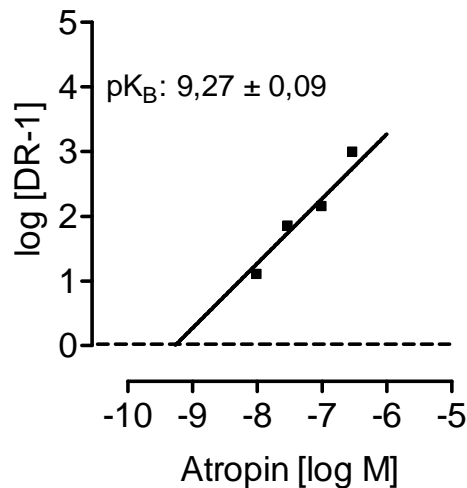


Abb. 61: Schild-Auftragung der Atropin-induzierten Rechtsverschiebung der Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurve an Membransuspensionen aus CHO Flp-InTMM₄-Zellen. *Ordinate:* Dekadischer Logarithmus der Differenz aus Verschiebungsfaktoren (dose ratio, DR) und eins. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Atropin-Konzentration. *Kurvenanpassung:* Gleichung von Arunlakshana und Schild (Gleichung 12). *Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler aus drei bis vier voneinander unabhängigen Experimenten, die je als Vierfachbestimmung erhoben wurden. pK_B: negativer dekadischer Logarithmus der Atropin-Konzentration bei der 50 % der Rezeptoren besetzt sind.

Abb. 61 zeigt die aus den Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurven ohne und mit Atropin berechneten Verschiebungsfaktoren, die gegen die Konzentration des inversen Agonisten Atropin aufgetragen wurden. Es resultierte eine Gerade mit einer Steigung, die nicht signifikant von $s = 1$ verschieden war (F-Test, $p > 0,05$). Dies zeigte, dass es sich bei der Interaktion von Atropin mit Iperoxo um einen kompetitiven Antagonismus um die gleiche Rezeptor-Bindungsstelle handelt und somit Iperoxo rein orthosterisch an den muskarinischen M₄-Rezeptor bindet. Eine rein orthosterische Bindung von Iperoxo konnte auch für den muskarinischen M₂-Rezeptor gezeigt werden (Dissertationsschrift Kebig, 2010). Somit unterschied sich der Antagonismus von Iperoxo mit Atropin nicht zwischen diesen beiden Subtypen.

Mit einem pK_B-Wert von $9,27 \pm 0,09$ für Atropin am freien Rezeptor konnte ein ähnlicher Wert wie bei D. Klemt (Dissertationsschrift 2005, pK_A-Wert: $9,34 \pm 0,1$) erhalten werden. Außerdem stimmt der in dieser Arbeit ermittelte pK_B-Wert mit dem von Dong et al. (1995) durch Messung der [³⁵S]GTPγS-ermittelten pK_A-Wert von $9,23 \pm 0,01$ überein. Zudem liegt die in dieser Arbeit erhobene Affinität für Atropin im Bereich des von der „IUPHAR-Database“ (D3) herausgegebenen Bereiches der Atropin-Affinität am M₄-Rezeptorsubtyp (pK_i: 8,7 - 9,5).

3.5.7. Phth-6-Iper-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung

Bei Phth-6-Iper handelt es sich um eine Verbindung aus dem orthosterischen Agonisten Iperoxo sowie einem Teil des allosterischen Modulators W84. In vorliegender Arbeit sollte erstmals die intrinsische Aktivität und Wirksamkeit der Substanz am M₄-Rezeptorsubtyp untersucht werden. Als Vergleichssubstanz wurde die Referenzsubstanz Oxotremorin M mitgeführt.

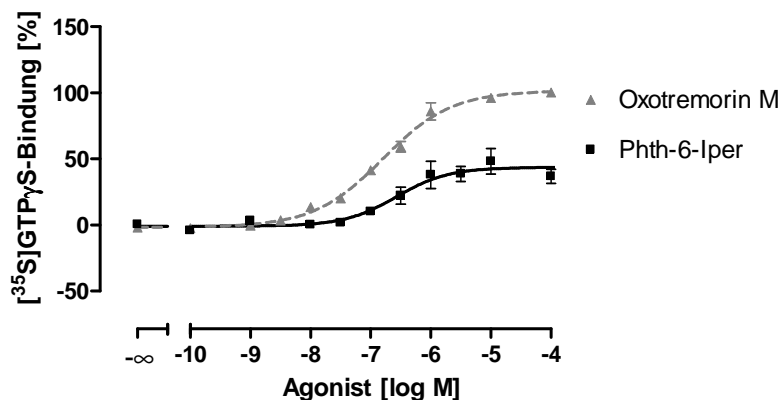


Abb. 62: Vergleich von Phth-6-Iper- und Oxotremorin M-induzierter [³⁵S]GTPγS-Bindung an Membransuspensionen aus CHO Flp-InTMM₄-Zellen. *Ordinate:* Prozentuale [³⁵S]GTPγS-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve von Oxotremorin M. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameter-logistische Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient n_H = 1 für Phth-6-Iper bzw. freier Hill-Koeffizient mit n_H = 0,76 für Oxotremorin M. *Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler (SEM) aus drei bis fünf voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung erhoben wurden.

M ₄ wt	pEC ₅₀	E _{min} [%]	E _{max} [%]	n _H (frei)	n
Phth-6-Iper	6,55 ± 0,19	-0,9 ± 2,6	43,6 ± 3,2 [#]	1,38 ± 0,57 n.s.	5
Oxotremorin M	6,78 ± 0,06	-1,7 ± 1,7	101,5 ± 2,5	0,76 ± 0,07*	3

Tab. 44: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Phth-6-Iper- und Oxotremorin M-Konzentrations-Effekt-Kurven. Die Kenngrößen beruhen auf den Mittelwertskurven aus Abb. 62. pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung hervorruft. E_{min}: Minimale [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven) E_{max}: Maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve), n_H(frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit, n: Anzahl unabhängiger Einzelversuche. n.s.: nicht signifikant verschieden von n_H = 1 (F-Test, p>0,05). *: signifikant verschieden von n_H=1 (F-Test, p<0,05). #: signifikant verschieden von E_{max} [%] von Oxotremorin M (t-Test, p<0,05).

Phth-6-Iper zeigte eine Wirksamkeit, die nicht signifikant von der von Oxotremorin M verschieden war (t-Test, p>0,05). Die intrinsische Aktivität von Phth-6-Iper war gegenüber Oxotremorin M signifikant auf 43,6 ± 3,2 % reduziert (t-Test, p<0,05).

Am M₂-Rezeptor zeigte Phth-6-Iper gegenüber Oxotremorin M eine etwas geringere Wirksamkeit ($\Delta pEC_{50} = 0,51$ Dekaden) und eine um 18 % geringere intrinsische Aktivität (Dissertationsschrift Kebig, 2010).

3.5.8. Naph-6-Iper-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung

In vorliegender Arbeit sollte erstmals die intrinsische Aktivität und Wirksamkeit von Naph-6-Iper am M₄-Rezeptorsubtyp untersucht werden. Als vollagonistische Referenzsubstanz und Ausgangssubstanz der Hybridverbindungen wurde Oxotremorin M mitgeführt.

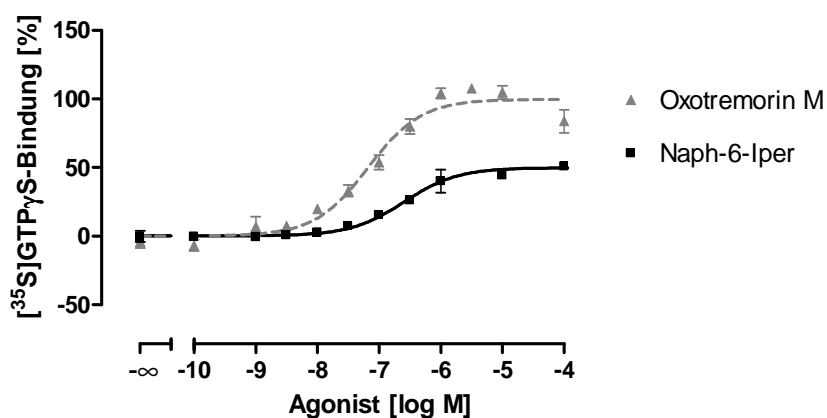


Abb. 63: Vergleich von Naph-6-Iper- und Oxotremorin M-induzierter [³⁵S]GTPγS-Bindung an Membransuspensionen aus CHO Flp-InTMM₄-Zellen. *Ordinate:* Prozentuale [³⁵S]GTPγS-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve von Oxotremorin M. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameter-logistische Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient $n_H = 1$. *Datenpunkte:* Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) aus vier bis fünf voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung erhoben wurden.

M ₄ wt	pEC ₅₀	E _{min} [%]	E _{max} [%]	n _H (frei)	n
Naph-6-Iper	6,59 \pm 0,09*	0,1 \pm 0,4	49,9 \pm 2,0*	0,72 \pm 0,14 n.s.	5
Oxotremorin M	7,18 \pm 0,09	0,0 \pm 3,2	99,7 \pm 3,4	0,92 \pm 0,17 n.s.	4

Tab. 45: Kenngrößen \pm Standardfehler der gemittelten Naph-6-Iper- und Oxotremorin M-Konzentrations-Effekt-Kurven. Die Kenngrößen beruhen auf den Mittelwertkurven aus Abb. 63. pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung hervorruft. E_{min}: Minimale [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven) E_{max}: Maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve), n_H(frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit, n.s.: nicht signifikant verschieden von n_H = 1 (F-Test, p>0,05). n: Anzahl unabhängiger Einzelversuche. *: signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße der Oxotremorin M-Kontrollkurve (t-Test, p<0,05).

Naph-6-Iper zeigte eine gegenüber Oxotremorin M signifikant reduzierte Wirksamkeit (t-Test, $p < 0,05$). Die intrinsische Aktivität von Naph-6-Iper war ebenfalls signifikant auf $E_{\max} = 49,9 \pm 2,0$ reduziert. Am muskarinischen M_2 -Rezeptor wies Naph-6-Iper in [^{35}S]GTP γ S-Bindungsexperimenten ebenfalls einen Partialagonismus mit einer intrinsischen Aktivität von $70 \pm 1\%$ gegenüber Iperoxo auf (Dissertationsschrift Kebig, 2010). Die Wirksamkeit von Naph-6-Iper gegenüber Oxotremorin M war am M_2 -Rezeptorsubtyp nicht signifikant reduziert ($\Delta pEC_{50} = 0,16$ Dekaden, t-Test, $p > 0,05$; Dissertationsschrift Kebig, 2010).

3.5.9. Überprüfung der Bindungseigenschaften der Testsubstanz Phth-6-Iper an hM_4 -CHO-Zell-Homogenaten

Da die Hybridsubstanzen Phth-6-Iper und Naph-6-Iper in vorliegender Arbeit erstmals am M_4 -Acetylcholinrezeptor untersucht wurden, musste überprüft werden, ob die Verbindungen wie bereits für den M_2 -Rezeptor gezeigt (Antony et al., 2009), auch am M_4 -Rezeptorprotein eine dualsterische Bindungstopographie aufweisen. Es wurden Konzentrations-Effekt-Kurven der Hybridverbindung ohne Zusatz aufgenommen, die als Kontrollkurven dienten. Parallel dazu wurden Konzentrations-Effekt-Kurven der Hybridverbindung erhoben, zu denen unterschiedliche Konzentrationen des inversen Agonisten Atropin zugegeben wurden. Dies sollte zeigen, ob die Hybridsubstanz mit dem Orthoster Atropin um die Bindung an die orthosterische Bindungstasche konkurriert.

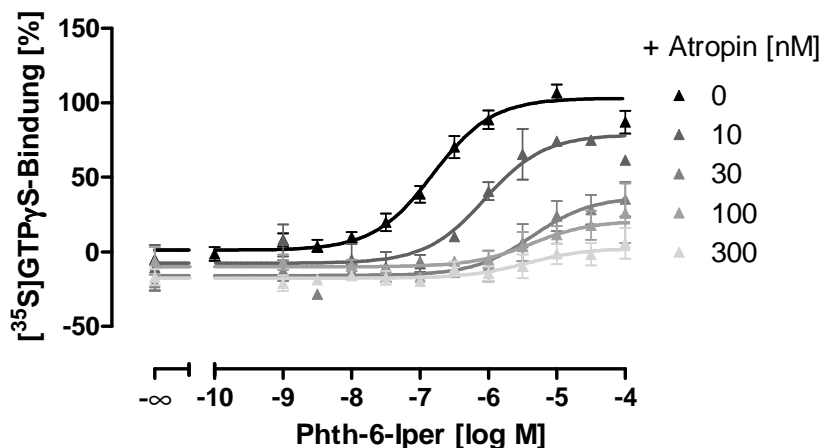


Abb. 64: Einfluss von Atropin auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Phth-6-lper an Membransuspensionen aus CHO Flp-InTMM₄-Zellen. *Ordinate:* Prozentuale [³⁵S]GTPγS-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Phth-6-lper-Konzentrations-Effekt-Kurve ohne Atropinzusatz. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Phth-6-lper-Konzentration. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameter-logistische Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient $n_H = 1$. *Datenpunkte:* Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) aus drei bis neun voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung erhoben wurden.

	Kontrolle	Atropin 10 nM	Atropin 30 nM	Atropin 100 nM	Atropin 300 nM
pEC₅₀	6,81 \pm 0,08	6,05 \pm 0,18*	5,48 \pm 0,28*	5,37 \pm 0,40*	5,44 \pm 0,47*
E_{min} [%]	1,1 \pm 2,4	-7,7 \pm 4,6	-16,2 \pm 3,4	-10,0 \pm 3,1	-17,7 \pm 2,5
E_{max} [%]	103 \pm 4,1	78,6 \pm 7,6*	31,3 \pm 6,5*	20,9 \pm 6,3*	2,5 \pm 4,4*
n_H(frei)	0,95 \pm 0,16 n.s.	1,73 \pm 0,74 n.s.	1,82 \pm 1,32 n.s.	1,31 \pm 1,07 n.s.	0,83 \pm 0,78 n.s.
n	7	3	4	4	9

Tab. 46: Kenngrößen \pm Standardfehler der gemittelten Phth-6-lper-Konzentrations-Effekt-Kurven ohne (Kontrolle) und mit Atropinzugabe. Die Kenngrößen beruhen auf den Mittelwertskurven aus Abb. 64. pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung hervorruft. E_{min}: Minimale [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven), E_{max}: Maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve), n_H(frei): freier Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit, n: Anzahl unabhängiger Einzelversuche. n.s.: nicht signifikant verschieden von n_H = 1 (F-Test, p>0,05). *: signifikant verschieden zur Kontrollkenngröße (t-Test, p<0,05).

Die Wirksamkeit der Phth-6-lper-Kontrollkurve wich mit einem pEC₅₀ von 6,81 \pm 0,08 nicht signifikant von der zuvor für den M₄-Rezeptor gezeigten Wirksamkeit von Phth-6-lper ab (pEC₅₀ = 6,55 \pm 0,19; t-Test, p>0,05). Steigende Konzentrationen des inversen Agonisten Atropin führten zu einer Absenkung des oberen Plateaus sowie zu einer Rechtsverschiebung der Phth-6-lper-Kurve. Somit resultierte sowohl eine negative

Kooperativität der Bindungsaffinität als auch eine negative Kooperativität der Rezeptoraktivierung. Mit steigenden Atropin-Konzentrationen konnten weniger Rezeptoren durch das orthosterische Strukturelement der Hybridverbindung (Iperoxo) aktiviert werden. Dies wies auf eine teilweise orthosterische Bindung der Hybridverbindung Phth-6-Iper hin. Das Ausmaß der Rechtsverschiebung wurde durch Auftragung der Verschiebefaktoren gegen die Konzentration des Kompetitors Atropin genauer analysiert.

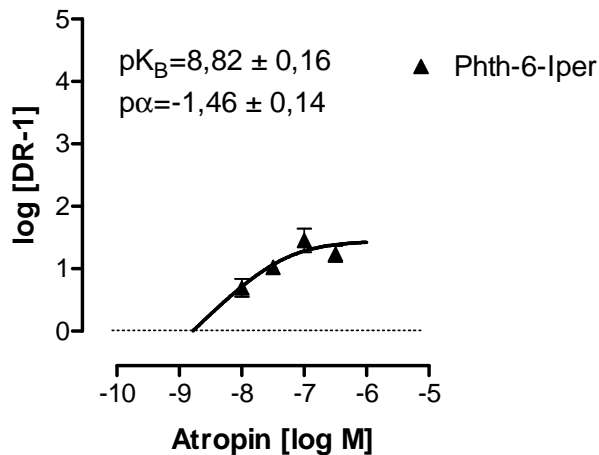


Abb. 65: Auftragung der Atropin-induzierten Rechtsverschiebung der Phth-6-Iper-Konzentrations-Effekt-Kurve an Membransuspensionen aus CHO Flp-InTMM₄-Zellen. *Ordinate:* Dekadischer Logarithmus der Differenz aus Verschiebungsfaktoren (dose ratio, DR) und eins. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Atropin-Konzentration. *Kurvenanpassung:* Gleichung von Lanzafame et al. (1996; Gleichung 13). *Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler aus drei bis neun voneinander unabhängigen Experimenten, die je als Vierfachbestimmung erhoben wurden. pK_B : negativer dekadischer Logarithmus der Atropin-Konzentration bei der 50 % der Rezeptoren besetzt sind. $p\alpha$: Kooperativitätsfaktor.

Da die Verschiebefaktoren von Phth-6-Iper nach Zugabe steigender Atropin-Konzentrationen eine von $s = 1$ signifikant verschiedene Steigung ergaben (F-Test, $p < 0,05$), wurden die Daten nach Lanzafame et al. (1996) analysiert. Für Atropin resultierte ein pK_B -Wert von $8,82 \pm 0,16$, welcher im Bereich des von der „IUPHAR-Database“ (D3) herausgegebenen Bereiches der Atropin-Affinität (pK_i : 8,7-9,5) am M₄-Rezeptor lag. Es konnte eine negative Kooperativität für die Interaktion von Atropin mit Phth-6-Iper gemessen werden, bei der ein Kooperativitätsfaktor von $p\alpha = -1,46 \pm 0,14$ resultierte.

Am M₂-Rezeptorsubtyp konnte für selbige Interaktion ein Kooperativitätsfaktor von $p\alpha = -2,36 \pm 0,24$ gemessen werden (Dissertationsschrift Kellershohn, 2007), der auf eine signifikant stärkere, negative Kooperativität zwischen Atropin und Phth-6-Iper hinweist als am M₄-Rezeptor.

Im Folgenden sollte der Einfluss steigender Atropinkonzentrationen auf einen Maximaleffekt von Phth-6-Iper analysiert werden, um die E_{\max} -Werte aus Tab. 46 zu überprüfen. Es wurde eine Phth-6-Iper-Konzentration von 10 μM gewählt, die im oberen Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve der Hybridverbindung liegt.

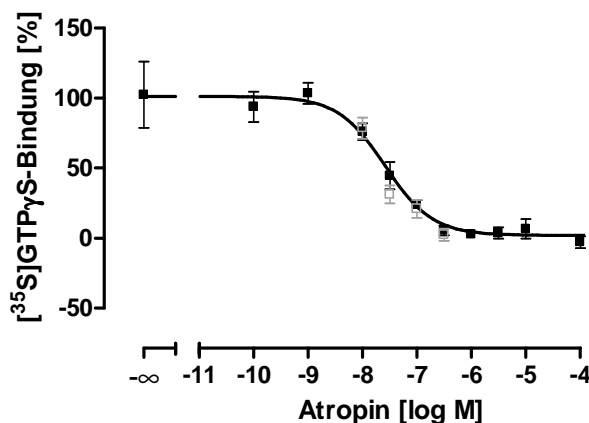


Abb. 66: Einfluss von Atropin auf den Effekt der maximal-wirksamen Phth-6-Iper-Konzentration [10 μM] an Membransuspensionen aus CHO Flp-InTMM₄-Zellen. *Ordinate:* Prozentuale [³⁵S]GTPγS-Bindung. 0 % entspricht der basalen [³⁵S]GTPγS-Bindung und 100 % dem maximal induzierbaren Phth-6-Iper-Effekt. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Atropin-Konzentration. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameter-logistische Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient $n_H = -1$. *Datenpunkte:* schwarze, ausgefüllte Symbole: Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) aus vier voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung erhoben wurden; graue, offene Symbole: E_{\max} -Werte aus Tab. 46.

Obige Abbildung verdeutlicht, dass mit steigenden Atropin-Konzentrationen die durch eine maximale Konzentration von Phth-6-Iper induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung gesenkt werden konnte. Die Atropin-Konzentration, die zu einer halbmaximalen Senkung des Phth-6-Iper-Maximaleffektes führte, lag bei einem pIC_{50} -Wert von $7,55 \pm 0,07$. Die durch Phth-6-Iper-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung konnte vollständig aufgehoben werden (F-Test, $p < 0,05$). Die in Tab. 46 aufgeführten Maximaleffekte (graue, offene Symbole) der Konzentrations-Effekt-Kurve von Phth-6-Iper unter Zusatz verschiedener Atropin-Konzentrationen stimmen gut mit der hier erhobenen Konzentrations-Effekt-Kurve überein. Aus dem pK_B -Wert von Atropin und der berechneten Kooperativität ließ sich der $\text{p}(\alpha \cdot \text{K}_B)$ -Wert = 7,4 ermitteln, der die Affinität von Atropin zum Phth-6-Iper-besetzten Rezeptor (in rein allosterischer Topographie) widerspiegelt. Dieser Wert unterscheidet sich nicht signifikant von dem pIC_{50} -Wert, der durch Untersuchung der Konzentrations-Effekt-Kurve von Atropin und maximaler Phth-6-Iper-Konzentration erhalten wurde (pIC_{50} : $7,55 \pm 0,07$; t-Test, $p > 0,05$).

3.5.10. Überprüfung der Bindungseigenschaften der Testsubstanz Naph-6-lper an hM₄-CHO-Zell-Homogenaten

Naph-6-lper sollte in vorliegender Arbeit erstmals als Hybridverbindung am muskarinischen M₄-Rezeptorsubtyp charakterisiert werden. Aus diesem Grund musste überprüft werden, ob Naph-6-lper sowohl die orthosterische als auch die allosterische Bindungsdomäne nutzt. Es wurde die gleiche Vorgehensweise gewählt, die zuvor zur Bestimmung der Bindungseigenschaften von Phth-6-lper angewandt wurde (siehe 3.5.9.).

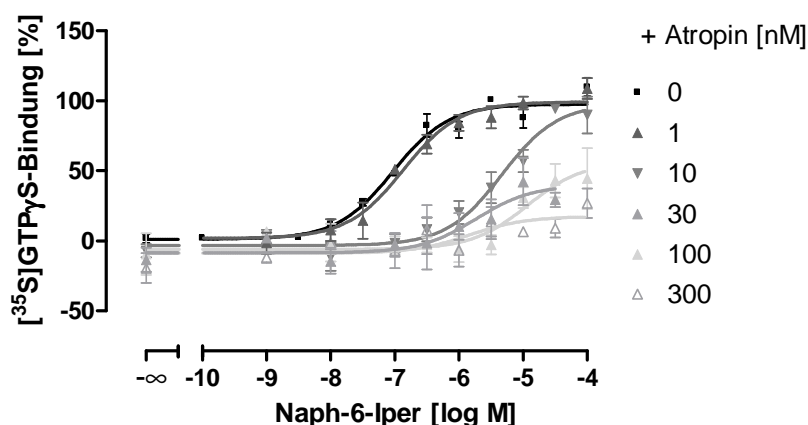


Abb. 67: Einfluss von Atropin auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Naph-6-lper an Membransuspensionen aus CHO Flp-InTMM₄-Zellen. *Ordinate:* Prozentuale [³⁵S]GTPγS-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Naph-6-lper-Konzentrations-Effekt-Kurve. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Naph-6-lper-Konzentration. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameter-logistische Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient n_H = 1. *Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler (SEM) aus drei bis fünf voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung erhoben wurden.

	Kontrolle	Atropin 1 nM	Atropin 10 nM	Atropin 30 nM	Atropin 100 nM	Atropin 300 nM
pEC₅₀	7,03 ± 0,08	6,87 ± 0,12	5,33 ± 0,15*	5,73 ± 0,46*	5,05 ± 0,37*	5,83 ± 0,65*
E_{min} [%]	1,2 ± 2,6	-1,8 ± 4,2	-3,3 ± 3,8	-8,5 ± 6,1	-6,1 ± 4,1	-8,9 ± 5,5
E_{max} [%]	97,2 ± 3,1	99,2 ± 4,1	98,0 ± 10,2	39,8 ± 12,6*	50,2 ± 14,5*	17,4 ± 7,4*
n_H(frei)	0,88 ± 0,14	0,90 ± 0,23	0,70 ± 0,24	1,02 ± 1,07	3,30 ± 3,40	0,13 ± 0,45
n	4	4	3-5	3	4	4

Tab. 47: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Naph-6-lper-Konzentrations-Effekt-Kurven ohne (Kontrolle) und mit Atropinzugabe. Die Kenngrößen beruhen auf den Mittelwertskurven aus Abb. 67. pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung hervorruft. E_{min}: Minimale [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven) E_{max}: Maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau

der Konzentrations-Effekt-Kurve), $n_H(\text{frei})$: freier Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit, n : Anzahl unabhängiger Einzelversuche. *: Signifikant verschieden von der entsprechenden Kontrollkenngröße ($p < 0,05$, t-Test).

Die Konzentrations-Effekt-Kurve von Naph-6-Iper wurde durch steigende Konzentrationen Atropin rechtsverschoben. Ab einer Atropinkonzentration von 30 nM resultierte zusätzlich eine Absenkung des oberen Plateaus.

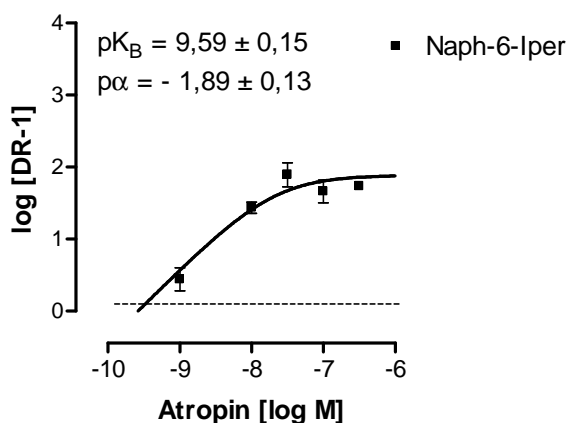


Abb. 68: Auftragung der Atropin-induzierten Rechtsverschiebung der Naph-6-Iper-Konzentrations-Effekt-Kurve an Membransuspensionen aus CHO Flp-InTMM₄-Zellen. *Ordinate:* Dekadischer Logarithmus der Differenz aus Verschiebungsfaktoren (dose ratio, DR) und eins. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Atropin-Konzentration. *Kurvenanpassung:* Gleichung von Lanzafame et al. (1996; Gleichung 13). *Datenpunkte:* Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei bis fünf voneinander unabhängigen Experimenten, die je als Vierfachbestimmung erhoben wurden. pK_B : negativer dekadischer Logarithmus der Atropin-Konzentration bei der 50 % der Rezeptoren besetzt sind. $p\alpha$: Kooperativitätsfaktor.

Durch Auftragung der logarithmierten Atropinkonzentration gegen die Verschiebefaktoren $[DR-1]$, die aus Abb. 67 berechnet wurden, ergab sich eine von $s = 1$ abweichende Steigung (F-Test, $p < 0,05$). Aufgrund dessen wurden die Datenpunkte mit der Gleichung nach Lanzafame et al. (1996) beschrieben. Naph-6-Iper und Atropin wiesen eine negative Kooperativität mit einem Kooperativitätsfaktor $p\alpha = -1,89 \pm 0,13$ auf. Damit zeigten beide untersuchten dualsterischen Verbindungen am muskarinischen M₄-Rezeptor mit Atropin eine negative Kooperativität. Für Atropin resultierte ein pK_B -Wert von $9,59 \pm 0,15$, welcher sich nicht signifikant von dem von der „IUPHAR-Database“ (D3) herausgegebenen Bereich der Atropin-Affinität unterscheidet (pK_i : 8,7-9,5; t-Test, $p < 0,05$).

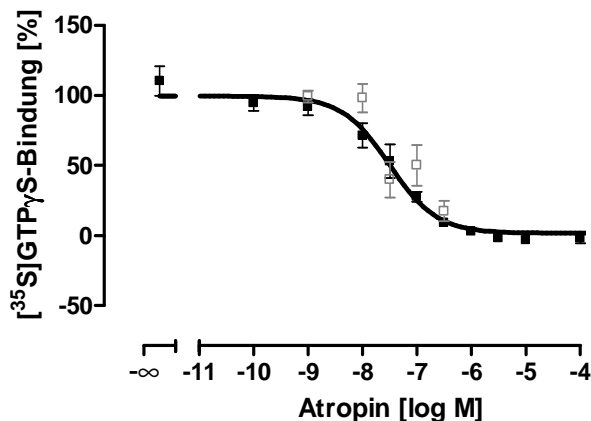


Abb. 69: Einfluss von Atropin auf den Effekt der maximal wirksamen Naph-6-lper-Konzentration [10 µM] an Membransuspensionen aus CHO Flp-In™M₄-Zellen. *Ordinate:* Prozentuale [³⁵S]GTPγS-Bindung. 0 % entspricht der basalen [³⁵S]GTPγS-Bindung und 100 % dem maximal induzierbaren Naph-6-lper-Effekt. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Atropin-Konzentration. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameter-logistische Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient n_H = -1. *Datenpunkte:* schwarze Symbole: Mittelwerte ± Standardfehler (SEM) aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung erhoben wurden; graue, offene Symbole: E_{max}-Werte aus Tab. 47.

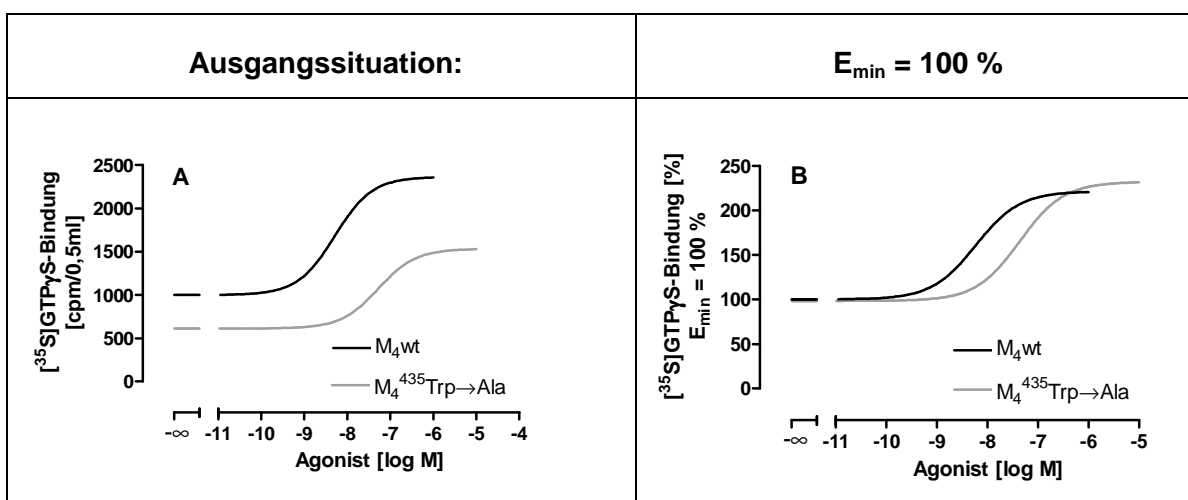
Aus obiger Abbildung geht hervor, dass eine durch die maximale Naph-6-lper-Konzentration von 10 µM-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung mit steigenden Atropin-Konzentrationen bis auf den Basalwert abgesenkt werden kann (F-Test, p<0,05). Durch Analyse der Datenpunkte mittels „Vier-Parameter-logistischer Gleichung“ (Gl. 6) konnte die Atropin-Konzentration ermittelt werden, die zu einer halbmaximalen Absenkung der [³⁵S]GTPγS-Bindung führte: pIC₅₀ = 7,51 ± 0,10. Die in Tab. 47 aufgeführten Maximaleffekte sind als graue, offene Symbole eingefügt und beschreiben die oben aufgeführte Konzentrations-Effekt-Kurve von Atropin einigermaßen (t-Test, p>0,05), bei jedoch großer Streuung der Einzelwerte. Aus dem pK_B-Wert von Atropin und der berechneten Kooperativität ließ sich der p(α·K_B)-Wert ermitteln, der die Atropin-Affinität zum Naph-6-lper besetzten Rezeptor wiedergibt. Es resultierte ein p(α·K_B)-Wert von 7,7. Dieser Wert unterscheidet sich nicht signifikant von dem pIC₅₀-Wert, der durch Untersuchung der Konzentrations-Effekt-Kurve von Atropin und maximaler Naph-6-lper-Zugabe erhalten wurde (pIC₅₀: 7,51 ± 0,10).

3.6. $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsexperimente an Membransuspensionen aus Flp InTMhM₄⁴³⁵Trp→Ala-CHO-Zellen

In folgender Versuchsreihe wurde erstmals der Einfluss des Epitops M₄⁴³⁵Trp durch gezielte Mutagenese der aromatischen Aminosäure Tryptophan gegen die kleine aliphatische Aminosäure Alanin am aktiven, muskarinischen M₄-Rezeptorsubtyp analysiert. Dieses Epitop ist konserviert unter allen Muskarinrezeptoren und wird in der Nomenklatur nach Ballesteros und Weinstein (1995) subtypübergreifend als Epitop Trp 7.35 bezeichnet. In vorangegangenen Arbeiten wurde bereits der Einfluss des Epitops Trp 7.35 des M₂-Rezeptors hinsichtlich der Wirksamkeit und intrinsischen Aktivität strukturverschiedener muskarinischer Liganden näher betrachtet. So konnte für den aktiven M₂-Rezeptor bereits ein Einfluss auf die Wirksamkeit von Vollagonisten und die intrinsische Aktivität von Pilocarpin gefunden werden (Jäger et al., 2007). Für dualsterische Hybridverbindungen wie die Substanz Phth-6-lper konnte ebenfalls ein Wirksamkeitsverlust bei Austausch des Epitops Trp 7.35 gegen Alanin ermittelt werden (Dissertationsschrift Kebig, 2010).

Jede Charge einer Membransuspension wurde zuvor einem „ $[^3\text{H}]\text{NMS}/\text{NMS}$ -Homologen Konkurrenzexperiment“ unterzogen, wie es in 2.8.2.1. ausführlich beschrieben ist. Dies diente der Berechnung der Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des Radioliganden (K_D) sowie der Anzahl an Ligandbindungsstellen (B_{max}). Die Charakteristika jeder Charge sind tabellarisch im Anhang dieser Arbeit unter 8.1. sowie im nachfolgenden Kapitel mitaufgeführt.

Aufgrund unterschiedlicher Rezeptorexpression zwischen Wildtyp und Rezeptormutante bei gleich eingestellter Proteinkonzentration und daraus resultierenden unterschiedlichen Messbereichen (siehe Abb. 70A) wurde bei der Auswertung zuerst das untere Plateau der jeweiligen Konzentrations-Effekt-Kurve auf 100 % gesetzt (siehe Abb. 70B).



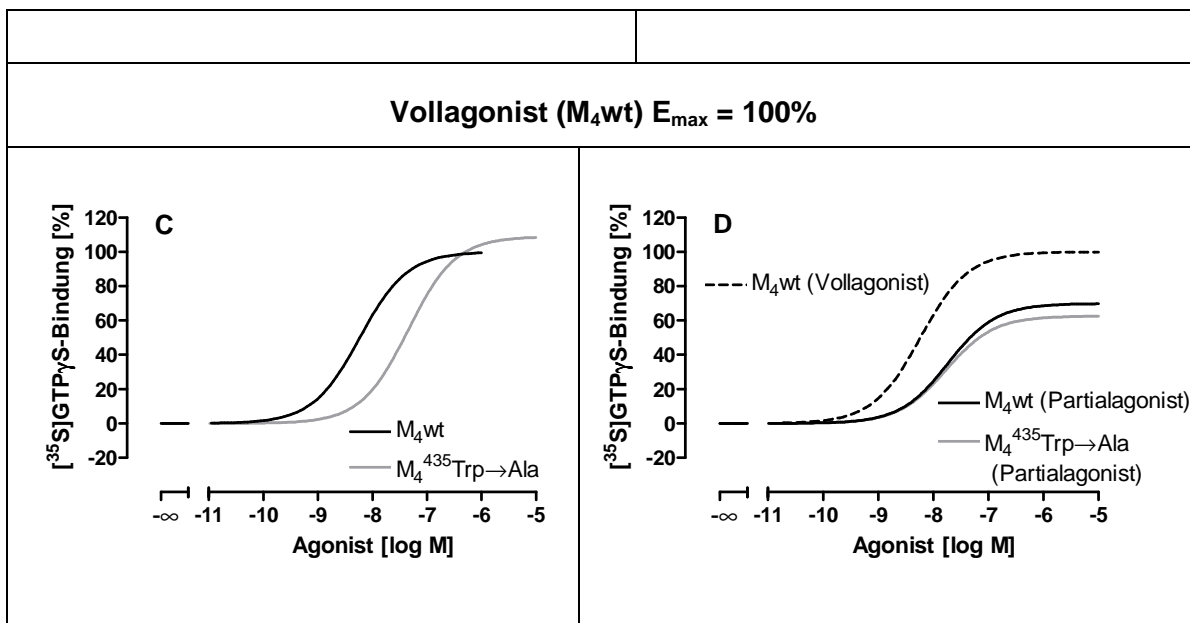


Abb. 70: Schematische Darstellung der Auswertung von Agonist-Konzentrations-Effekt-Kurven an Membransuspensionen aus $hM_4^{435}\text{-Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -CHO-Zellen im Vergleich zum hM_4 -Wildtyp durch Messung der $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung. *Ordinate:* $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung. (A): Zerfälle pro Minute pro Kavität [cpm/0,5ml]; (B-D): Prozentuale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung: 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Vollagonist-Konzentrations-Effekt-Kurve des M_4 -Wildtyps. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration; Erläuterungen siehe Text.

Anschließend wurden die Agonist-Konzentrations-Effekt-Kurven der hM_4 -Rezeptor-Membranhomogenate und der $hM_4^{435}\text{-Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptor-Membranhomogenate auf das obere Plateau der Kontrollkurve des Wildtyps normiert (siehe Abb. 70C). Handelte es sich bei der Testsubstanz um einen Partialagonisten am M_4 -Wildtyp, wurde auf E_{max} einer Vollagonist-Konzentrations-Effekt-Kurve des M_4 -Wildtyps normiert (siehe Abb. 70D: gestrichelte Linie). So konnte einerseits ein Vergleich der Wendepunkte sowie der intrinsischen Aktivitäten der Testsubstanz untereinander andererseits auch ein Vergleich mit einem Vollagonisten des M_4 -Wildtypes erfolgen. An jedem Versuchstag wurde der inverse muskarinische Agonist Atropin in einer supramaximalen Konzentration [30 μM] mitgeführt, um eine konstitutive Rezeptoraktivität zu detektieren. Ein signifikantes, inverses Messfenster konnte an $hM_4^{435}\text{-Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -CHO-Membranhomogenaten an keinem Versuchstag ermittelt werden.

3.6.1. Acetylcholin-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung

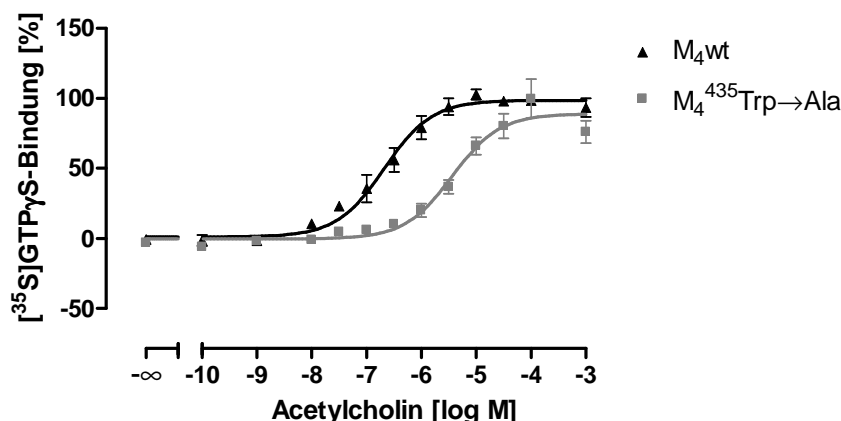


Abb. 71: Vergleich der Acetylcholin-induzierten [³⁵S]GTPγS-Bindung an Membransuspensionen aus CHO Flp-InTMM₄wt und CHO Flp-InTMM₄⁴³⁵Trp→Ala-Zellen. *Ordinate:* Prozentuale [³⁵S]GTPγS-Bindung. 0 % entspricht dem jeweiligen unteren Plateau der Acetylcholin-Kurve und 100 % dem oberen Plateau der Acetylcholin-Kontrollkurve (M₄wt). *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameter-logistische Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient n_H = 1. *Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler (SEM) aus vier bis fünf voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung erhoben wurden.

Acetylcholin	pEC ₅₀	E _{min} [%]	E _{max} [%]	n _H (frei)	n
M ₄ ⁴³⁵ Trp→Ala	5,44 ± 0,10*	-0,4 ± 2,4	89,0 ± 4,1	1,02 ± 0,20 n.s.	5
M ₄ wt	6,68 ± 0,08	1,1 ± 2,9	98,6 ± 2,8	0,85 ± 0,15 n.s.	5

Tab. 48: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurven. Die Kenngrößen beruhen auf den Mittelwertkurven aus Abb. 71. pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung hervorruft. E_{min}: Minimale [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven) E_{max}: Maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve), n_H(frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit, n.s.: nicht signifikant verschieden von n_H=1 (F-Test, p>0,05). n: Anzahl unabhängiger Einzelversuche. *: Signifikant verschieden von der Kenngröße des Wildtyps (t-Test, p<0,05).

An der M₄-Rezeptormutante zeigte Acetylcholin einen pEC₅₀-Wert von 5,44 ± 0,10, der signifikant unter der Wirksamkeit am M₄-Wildtyp lag (t-Test, p<0,05). Somit wird die Fähigkeit der G-Protein-Aktivierung des orthosterischen Liganden Acetylcholin durch Austausch der Aminosäure Tryptophan 7.35 gegen Alanin des M₄-Rezeptorproteins vermindert. Der Wildtyp zeigte eine signifikant höhere Rezeptorexpression (B_{max} [fmol/mg Protein] ± SEM: M₄wt: 2279 ± 106; M₄⁴³⁵Trp→Ala: 1141 ± 139, t-Test, p<0,05). Trotz niedrigerer Rezeptorexpression der Mutante wurde bei gleich eingestellter Proteinkonzentration der gleiche Anstieg der [³⁵S]GTPγS-Bindung erreicht wie am M₄-Wildtyp.

Am M₂-Rezeptorsubtyp blieb die intrinsische Aktivität durch den Austausch des Rezeptorepitops ebenfalls unberührt, wohingegen ein Wirksamkeitsverlust von 1,89 Dekaden beobachtet wurde (Dissertationsschrift Kebig, 2010). Somit zeigten beide präferenziell Gα_{i/o}-gekoppelten Muskarinrezeptoren einen Einfluss dieses Epitops auf die Wirksamkeit, nicht aber auf die intrinsische Aktivität von Acetylcholin.

3.6.2. Oxotremorin M-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung

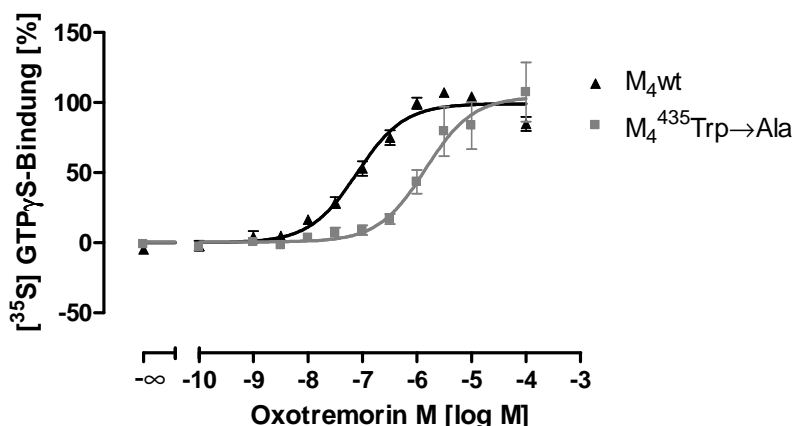


Abb. 72: Vergleich der Oxotremorin M-induzierten [³⁵S]GTPγS-Bindung an Membransuspensionen aus CHO Flp-InTMM₄wt und CHO Flp-InTMM₄⁴³⁵Trp→Ala-Zellen. *Ordinate:* Prozentuale [³⁵S]GTPγS-Bindung. 0 % entspricht dem jeweiligen unteren Plateau der Oxotremorin M-Kurve und 100 % dem oberen Plateau der Oxotremorin M-Kontrollkurve (M₄wt). *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameter-logistische Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient n_H = 1. *Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler (SEM) aus drei bis acht voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung erhoben wurden.

Oxotremorin M	pEC ₅₀	E _{min} [%]	E _{max} [%]	n _H (frei)	n
M ₄ ⁴³⁵ Trp→Ala	5,85 ± 0,14*	0,5 ± 3,5	104,3 ± 7,6	0,80 ± 0,16 n.s.	7
M ₄ wt	7,10 ± 0,07	0,0 ± 2,2	99,2 ± 2,5	1,05 ± 0,22 n.s.	7

Tab. 49: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Oxotremorin M-Konzentrations-Effekt-Kurven. Die Kenngrößen beruhen auf den Mittelwertskurven aus Abb. 72. pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung hervorruft. E_{min}: Minimale [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven) E_{max}: Maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve), n_H(frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit, n: Anzahl unabhängiger Einzelversuche. n.s.: nicht signifikant verschieden von n_H = 1 (F-Test, p>0,05); *: Signifikant verschieden von der Kenngröße des Wildtyps (t-Test, p<0,05).

Die gezielte Mutagenese des Epitops 7.35 des M₄-Rezeptors führte zu einer Abnahme der Wirksamkeit von Oxotremorin M um 1,25 Dekaden. Dies entsprach dem Wirksamkeitsverlust von Acetylcholin durch Veränderung dieses Epitops (1,24 Dekaden).

Verglichen mit dem M_4 -Wildtyp zeigte die Mutante eine signifikant niedrigere Rezeptorexpression (B_{max} [fmol/mg Protein] \pm SEM: M_4 wt: 2478 ± 140 ; $M_4^{435}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$: 1128 ± 85 , t-Test, $p < 0,05$). Oxotremorin M erreicht an der Mutante bei gleich eingestellter Proteinkonzentration trotz niedrigerer Rezeptorexpression den gleichen Anstieg der [^{35}S]GTP γ S-Bindung verglichen mit dem M_4 -Wildtyp.

Am M_2 -Rezeptorsubtyp führte der Austausch der entsprechenden Aminosäure ebenfalls zu einem Verlust der Wirksamkeit von Oxotremorin M. Es resultierte eine Rechtsverschiebung um 1,58 Dekaden (Dissertationsschrift Kebig, 2010), die in der Größenordnung der Verschiebung am M_4 -Rezeptor liegt.

3.6.3. Iperoxo-induzierte [^{35}S]GTP γ S-Bindung

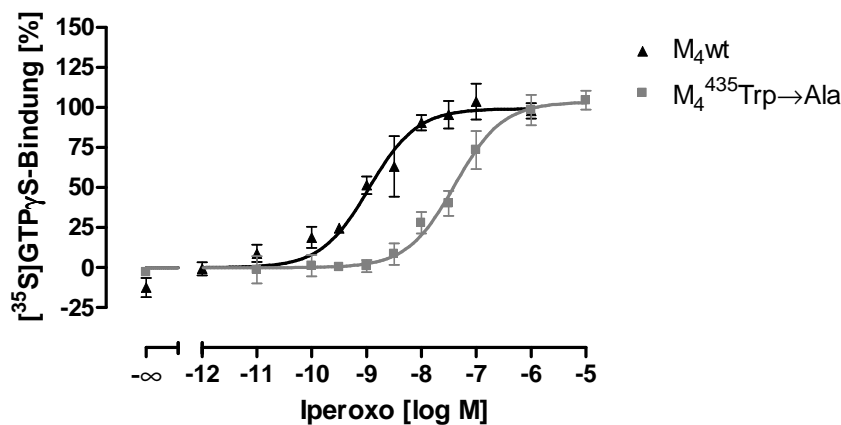


Abb. 73: Vergleich der Iperoxo-induzierten [^{35}S]GTP γ S-Bindung an Membransuspensionen aus CHO Flp-InTM M_4 wt und CHO Flp-InTM $M_4^{435}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Zellen. *Ordinate:* Prozentuale [^{35}S]GTP γ S-Bindung. 0 % entspricht dem jeweiligen unteren Plateau der Iperoxo-Kurven und 100 % dem oberen Plateau der Iperoxo-Kontrollkurve (M_4 wt). *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameter-logistische Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient $n_H = 1$. *Datenpunkte:* Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung erhoben wurden.

Ergebnisse

Iperoxo	pEC ₅₀	E _{min} [%]	E _{max} [%]	n _H (frei)	n
M₄⁴³⁵Trp→Ala	7,39 ± 0,10*	-0,1 ± 2,9	103,3 ± 4,7	0,84 ± 0,17 n.s.	3
M₄wt	8,95 ± 0,14	-0,1 ± 4,6	99,2 ± 4,6	0,67 ± 0,16 n.s.	3

Tab. 50: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurven. Die Kenngrößen beruhen auf den Mittelwertskurven aus Abb. 73. pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung hervorruft. E_{min}: Minimale [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven), E_{max}: Maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve), n_H(frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit, n.s.: nicht signifikant verschieden von n_H=1 (F-Test, p>0,05); n: Anzahl unabhängiger Einzelversuche. *: Signifikant verschieden von der Kenngröße des Wildtyps (t-Test, p<0,05).

Iperoxo verlor durch Mutation des Epitops 7.35 des muskarinischen M₄-Rezeptors an Wirksamkeit im Umfang von 1,56 Dekaden, was in der Größenordnung der anderen Vollagonisten lag. Der Wildtyp zeigte eine signifikant höhere Rezeptorexpression (B_{max} [fmol/mg Protein] ± SEM: M₄wt: 2317 ± 151; M₄⁴³⁵Trp→Ala: 915 ± 0, t-Test, p<0,05) als die Mutante. Trotz niedrigerer Rezeptorexpression der Mutante wurde bei gleich eingestellter Proteinkonzentration der gleiche Anstieg der [³⁵S]GTPγS-Bindung erreicht wie am M₄-Wildtyp.

Am M₂-Rezeptor zeigte Iperoxo durch Mutation des Epitops 7.35 ebenfalls eine Rechtsverschiebung um 1,3 Dekaden (Dissertationsschrift Kebig, 2010), was in der Größenordnung der Verschiebung am M₄-Rezeptor lag. Die intrinsische Aktivität wurde nicht beeinflusst (Dissertationsschrift Kebig, 2010).

3.6.4. Pilocarpin-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung

Mit Pilocarpin sollte erstmals ein Partialagonist am mutierten M₄-Rezeptor untersucht werden. Um die intrinsische Aktivität gegenüber einem Vollagonisten zu verdeutlichen, wurden beide Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven auf das obere Plateau von Acetylcholin des M₄-Wildtypes normiert.

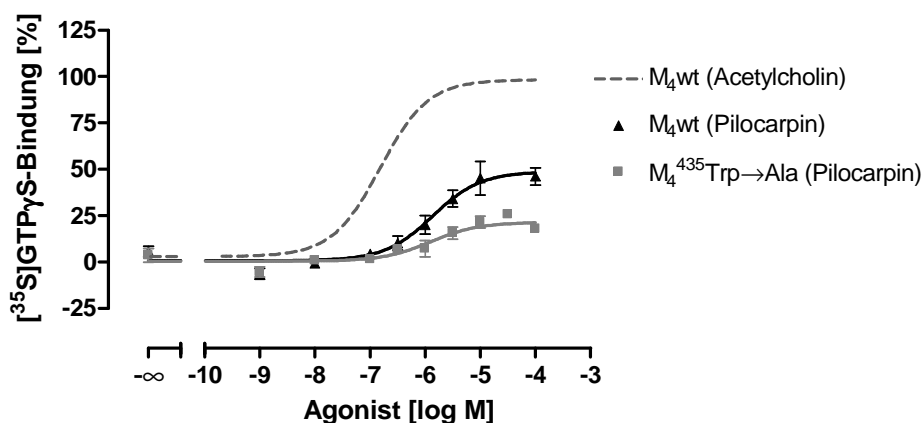


Abb. 74: Vergleich der Agonist-induzierten [³⁵S]GTPγS-Bindung an Membransuspensionen aus CHO Flp-InTMM₄wt und CHO Flp-InTMM₄⁴³⁵Trp→Ala-Zellen. Die gestrichelte Linie dient dem direkten Vergleich mit der Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve des M₄-Wildtypes. *Ordinate:* Prozentuale [³⁵S]GTPγS-Bindung. 0 % entspricht dem jeweiligen unteren Plateau der Pilocarpin-Kurve und 100 % dem oberen Plateau der Acetylcholin-Kontrollkurve (M₄wt). *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameterlogistische Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient n_H = 1. *Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler (SEM) aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung erhoben wurden.

Pilocarpin	pEC ₅₀	E _{min} [%]	E _{max} [%]	n _H (frei)	n
M ₄ ⁴³⁵ Trp→Ala	5,90 ± 0,23	0,4 ± 1,6	21,4 ± 2,3*	1,16 ± 0,58 n.s.	4
M ₄ wt	5,87 ± 0,16	0,7 ± 2,4	48,8 ± 4,1	1,08 ± 0,36 n.s.	3

Tab. 51: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven. Die Kenngrößen beruhen auf den Mittelwertskurven aus Abb. 74. pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung hervorruft. E_{min}: Minimale [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven), E_{max}: Maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve), n_H: Hill-Koeffizient, n: Anzahl unabhängiger Einzelversuche. n.s.: nicht signifikant verschieden von n_H=1 (F-Test, p>0,05), *: Signifikant verschieden von der Kenngröße des Wildtypes (t-Test, p<0,05).

Die Mutation 7.35 des M₄-Rezeptors zu Alanin führte zu keinem Wirksamkeitsverlust des Partialagonisten Pilocarpin. Es kam jedoch zu einem signifikanten Verlust an intrinsischer Aktivität von E_{max} = 48,8 ± 4,1 auf E_{max} = 21,4 ± 2,3 [%] (t-Test, p<0,05). Der Wildtyp zeigte eine signifikant höhere Rezeptorexpression als die Mutante (B_{max} [fmol/mg Protein] ± SEM: M₄wt: 2196 ± 0; M₄⁴³⁵Trp→Ala: 1111 ± 196, t-Test, p<0,05).

Am M₂-Rezeptor resultierte nach Austausch des Epitops 7.35 gegen Alanin ein Abfall an intrinsischer Aktivität von E_{max} = 45 ± 3 auf E_{max} = -30 ± 5 [%]. Die Wirksamkeit von Pilocarpin unterschied sich auch am M₂-Rezeptorsubtyp nicht von der des am Epitop 7.35 mutierten Rezeptorproteins.

3.6.5. McN-A-343-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung

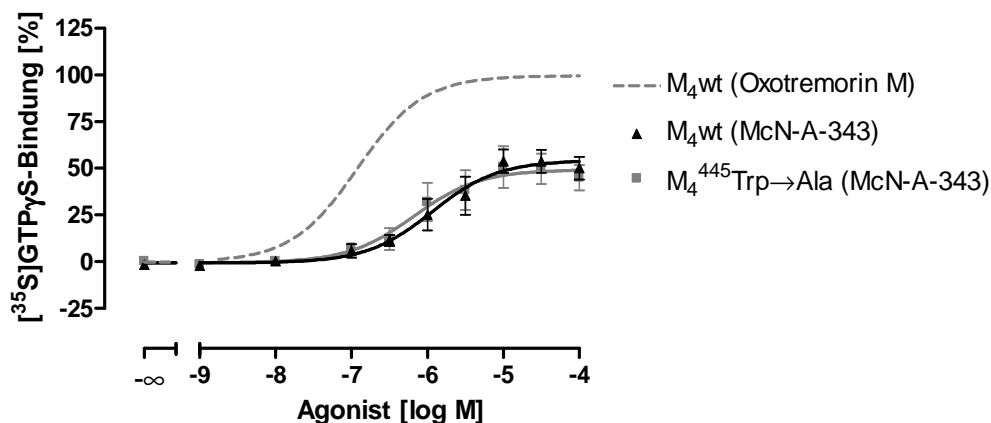


Abb. 75: Vergleich der Agonist-induzierten [³⁵S]GTPγS-Bindung an Membransuspensionen aus CHO Flp-InTMM₄wt und CHO Flp-InTMM₄⁴³⁵Trp→Ala-Zellen. Die gestrichelte Linie gibt die Oxotremorin M-Konzentrations-Effekt-Kurve des Wildtyps an. *Ordinate:* Prozentuale [³⁵S]GTPγS-Bindung. 0 % entspricht dem jeweiligen unteren Plateau der McN-A-343-Kurve und 100 % dem oberen Plateau der Oxotremorin M-Kontrollkurve (M₄wt). *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameter-logistische Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient n_H = 1. *Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler (SEM) aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung erhoben wurden.

McN-A-343	pEC ₅₀	E _{min} [%]	E _{max} [%]	n _H (frei)	n
M ₄ ⁴³⁵ Trp→Ala	6,18 ± 0,20	-0,5 ± 3,4	49,3 ± 3,9	1,13 ± 0,21 n.s.	5
M ₄ wt	5,94 ± 0,15	0,7 ± 2,7	54,2 ± 3,4	0,96 ± 0,30 n.s.	3

Tab. 52: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten McN-A-343-Konzentrations-Effekt-Kurven. Die Kenngrößen beruhen auf den Mittelwertskurven aus Abb. 75. pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung hervorruft. E_{min}: Minimale [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven) E_{max}: Maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve), n_H(frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit, n.s.: nicht signifikant verschieden von n_H=1; n: Anzahl unabhängiger Einzelversuche.

Die Wirksamkeit von McN-A-343 wurde durch Austausch der Aminosäure 7.35 des M₄-Rezeptors zu Alanin nicht beeinträchtigt, wie es auch für den Partialagonisten Pilocarpin gezeigt werden konnte (siehe vorheriges Kapitel). Dieser Befund stimmt mit Messungen der [³⁵S]GTPγS-Bindung an der Mutante hM₂⁴²²Trp→Ala überein (Dissertationsschrift

Kebig, 2010). Die intrinsische Aktivität von McN-A-343 wurde durch Mutation des M₄-Rezeptors ebenfalls nicht beeinflusst. Dennoch muss berücksichtigt werden, dass der Wildtyp eine signifikant höhere Rezeptorexpression zeigte als die Mutante (B_{max} [fmol/mg Protein] ± SEM: M₄wt: 2637 ± 236; M₄⁴³⁵Trp→Ala: 1116 ± 101, t-Test, p<0,05). Am M₂-Rezeptor konnte von A. Kebig (Dissertationsschrift, 2010).ebenfalls kein signifikanter Unterschied der intrinsischen Aktivitäten von McN-A-343 zwischen dem Wildtyp und dem hM₂⁴²²Trp→Ala-Rezeptorprotein gemessen werden

3.6.6. Phth-6-Iper-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung

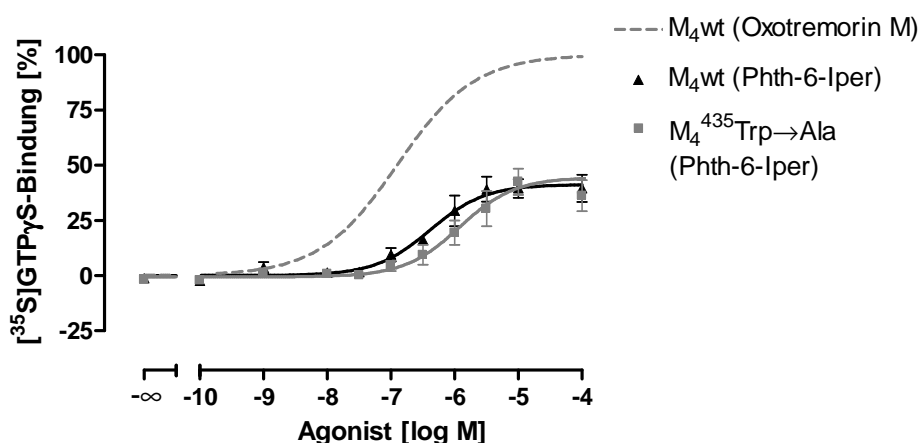


Abb. 76: Vergleich der Phth-6-Iper-induzierten [³⁵S]GTPγS-Bindung an Membransuspensionen aus CHO Flp-InTMM₄wt und CHO Flp-InTMM₄⁴³⁵Trp→Ala-Zellen. Die gestrichelte Linie gibt die Oxotremorin M-Konzentrations-Effekt-Kurve des M₄-Wildtyps an. *Ordinate:* Prozentuale [³⁵S]GTPγS-Bindung. 0 % entspricht dem jeweiligen unteren Plateau der Phth-6-Iper-Kurve und 100 % dem oberen Plateau der Oxotremorin M-Kontrollkurve (M₄wt). *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameter-logistische Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient n_H = 1. *Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler (SEM) aus vier voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung erhoben wurden.

Phth-6-Iper	pEC ₅₀	E _{min} [%]	E _{max} [%]	n _H (frei)	n
M ₄ ⁴³⁵ Trp→Ala	5,92 ± 0,15	-0,6 ± 1,7	44,4 ± 3,2	0,92 ± 0,27 n.s.	4
M ₄ wt	6,38 ± 0,14	0,0 ± 1,7	41,2 ± 1,5	1,21 ± 0,33 n.s.	4

Tab. 53: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Phth-6-Iper-Konzentrations-Effekt-Kurven. Die Kenngrößen beruhen auf den Mittelwertkurven aus Abb. 76. pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung hervorruft. E_{min}: Minimale [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven) E_{max}: Maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve), n_H(frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit, n.s.: nicht signifikant verschieden von n_H=1 (F-Test, p>0,05), n: Anzahl unabhängiger Einzelversuche.

Die Wirksamkeit von Phth-6-Iper wurde schwach, aber nicht signifikant durch Austausch des Epitops 7.35 gegen Alanin des M₄-Rezeptors beeinflusst (ΔpEC_{50} : 0,46 Dekaden; t-Test, $p > 0,05$). Verglichen mit der separat an Membransuspensionen aus hM₄-CHO-Zellen erhobenen Wirksamkeit von Phth-6-Iper ($pEC_{50} = 6,55 \pm 0,19$) zeigte sich jedoch eine signifikante Rechtsverschiebung durch Mutation des Epitopes Trp 7.35 (t-Test, $p < 0,05$).

Eine Rechtsverschiebung der Phth-6-Iper-Konzentrations-Effekt-Kurve von 0,42 Dekaden wurde durch Messung der [³⁵S]GTP γ S-Bindung auch für den mutierten M₂-Rezeptorsubtyp gefunden (Dissertationsschrift Kebig, 2010). Am M₂-Rezeptor zeigte sich zusätzlich eine Erhöhung des oberen Plateaus, die für den M₄-Rezeptor nicht signifikant war (t-Test, $p > 0,05$). Bei Betrachtung der Maxima von Phth-6-Iper muss jedoch berücksichtigt werden, dass die M₄-Rezeptor-Mutante im Verlauf der zu Grunde liegenden Experimente eine signifikant niedrigere Rezeptorexpression aufwies als der M₄-Wildtyp (B_{max} [fmol/mg Protein] \pm SEM: M₄wt: 2948 \pm 352; M₄⁴³⁵Trp→Ala: 1202 \pm 111, t-Test, $p < 0,05$).

3.6.7. Naph-6-Iper-induzierte [³⁵S]GTP γ S-Bindung

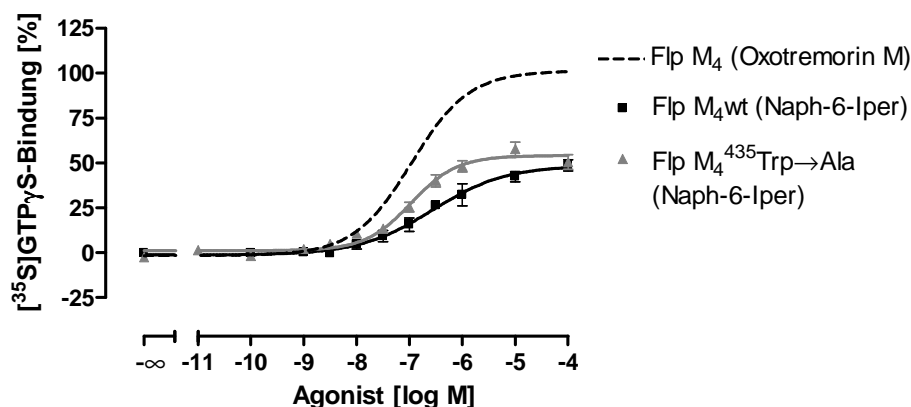


Abb. 77: Vergleich der Naph-6-Iper-induzierten [³⁵S]GTP γ S-Bindung an Membransuspensionen aus CHO Flp-InTMM₄wt und CHO Flp-InTMM₄⁴³⁵Trp→Ala-Zellen. Die gestrichelte Linie gibt die Oxotremorin M-Konzentrations-Effekt-Kurve an. *Ordinate:* Prozentuale [³⁵S]GTP γ S-Bindung. 0 % entspricht dem jeweiligen unteren Plateau der Naph-6-Iper-Kurve und 100 % dem oberen Plateau der Oxotremorin M-Kontrollkurve (M₄wt). *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameter-logistische Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient $n_H = 1$ für M₄⁴³⁵Trp→Ala, freier Hill-Koeffizient $n_H = 0,63$ für M₄wt. *Datenpunkte:* Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) aus vier bis fünf voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung erhoben wurden.

Ergebnisse

Naph-6-Iper	pEC ₅₀	E _{min} [%]	E _{max} [%]	n _H (frei)	n
M₄⁴³⁵Trp→Ala	6,86 ± 0,07	1,3 ± 1,2	57,0 ± 1,6*	0,78 ± 0,10 n.s.	6
M₄wt	6,57 ± 0,14	-1,3 ± 1,7	48,7 ± 2,8	0,63 ± 0,12 [#]	4

Tab. 54: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Naph-6-Iper-Konzentrations-Effekt-Kurven. Die Kenngrößen beruhen auf den Mittelwertskurven aus Abb. 77. pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung hervorruft. E_{min}: Minimale [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven) E_{max}: Maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve), n_H(frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit, n.s. nicht signifikant verschieden von n_H=1 (F-Test, p>0,05), [#]: signifikant verschieden von n_H=1 (F-Test, p<0,05). n: Anzahl unabhängiger Einzelversuche. *: signifikant verschieden zu der entsprechenden Kenngröße des Wildtyps (t-Test, p<0,05).

Am M₄⁴³⁵Trp→Ala-Rezeptor konnte eine schwach erhöhte Wirksamkeit von Naph-6-Iper gegenüber Oxotremorin M ermittelt werden, die jedoch nicht signifikant war (t-Test, p>0,05). Die intrinsische Aktivität von Naph-6-Iper wurde signifikant erhöht (t-Test, p<0,05). Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass die M₄-Mutante an den zu Grunde liegenden Versuchstagen eine signifikant niedrigere Rezeptorexpression aufwies als der M₄-Wildtyp (B_{max} [fmol/mg Protein] ± SEM: M₄wt: 2696 ± 177; M₄⁴³⁵Trp→Ala: 1205 ± 86, t-Test, p<0,05)

Am Trp 7.35 zu Alanin mutierten M₂-Rezeptor zeigte Naph-6-Iper eine schwache, jedoch signifikante Reduktion der Wirksamkeit um 0,31 Dekaden (Dissertationsschrift Kebig, 2010). Die intrinsische Aktivität wurde am M₂-Rezeptor in selbiger Arbeit um 28 % erhöht, während es am M₄-Rezeptor lediglich 8 % waren.

3.7. Messung der Agonist-induzierten dynamischen Massenumverteilung (DMR) an Flp-InTMhM₄-CHO-Zellen

Nach der Charakterisierung des muskarinischen M₄-Rezeptors hinsichtlich der G-Protein-Aktivierung wurde dieser erstmals mit dem Epic[®]-Biosensor bezüglich seiner Signalwegsaktivierung näher untersucht. Dies diente zum Einen dem Vergleich mit dem M₂-Rezeptorsubtyp und zum Anderen dem Vergleich mit dem zu M₄⁴³⁵Trp→Ala mutierten Rezeptor.

3.7.1. Messung ohne Vorinkubation der Zellen

Zuerst wurde die durch unterschiedliche Agonisten induzierte dynamische Massenumverteilung ohne Vorinkubation der hM₄-CHO-Zellen gemessen. Da der muskarinische M₄-Rezeptorsubtyp präferenziell an G $\alpha_{i/o}$ -Proteine koppelt, war ein dem muskarinischen M₂-Rezeptor-ähnliches Signal zu erwarten. Für einen direkten Vergleich mit dem M₂-Rezeptorsubtyp wurde zur Erhebung von Konzentrations-Effekt-Kurven ebenfalls die maximale Zellantwort innerhalb der ersten 1700 s berechnet. An allen Versuchstagen wurde sowohl Forskolin also auch der inverse muskarinische Agonist Atropin in supramaximaler Konzentration mitgeführt. Forskolin diente der Detektion eines Rezeptor-unabhängigen Signales, während Atropin eine konstitutive Rezeptoraktivität aufzeigen konnte. Lediglich an drei von circa 50 Versuchstagen trat ein inverses Messfenster am M₄-Rezeptor auf.

3.7.1.1. Acetylcholin-induzierte dynamische Massenumverteilung an hM₄-CHO-Zellen

Im Folgenden wurde die Wirksamkeit von Acetylcholin an hM₄-CHO-Zellen durch Messung zellulärer dynamischer Massenumverteilung bestimmt. Acetylcholin diente zusätzlich, da es per definitionem einen Vollagonisten darstellt, als Referenzsubstanz zur Bestimmung der maximalen dynamischen Massenumverteilung weiterer Agonisten (siehe 3.7.1.5.).

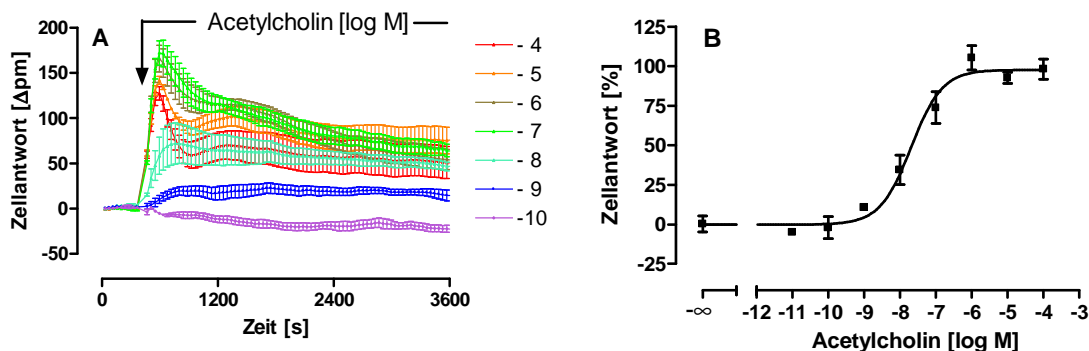


Abb. 78: Acetylcholin-induzierte dynamische Massenumverteilung an Flp-InTMhM₄-CHO-Zellen. **A:** *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Aufgetragen sind die logarithmierten, molaren Konzentrationen von Acetylcholin sowie die durch die jeweilige Konzentration induzierte Zellantwort. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Substanzzugabe an. Mittelwerte ± Standardfehler eines repräsentativen Experimentes in Dreifachbestimmung, welches fünffach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert. **B:** *Ordinate:* Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht dem unteren Plateau, 100 % dem oberen Plateau der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration. *Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler aus sechs voneinander unabhängigen Experimenten, die je als Drei- bzw. Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient $n_H = 1$.

M ₄ wt	pEC ₅₀	E _{min} [%]	E _{max} [%]	n _H (frei)	n
Acetylcholin	7,68 ± 0,13	-0,2 ± 3,4	97,7 ± 3,7	0,78 ± 0,18 n.s.	6

Tab. 55: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Konzentrations-Effekt-Kurve von Acetylcholin an Flp-InTMhM₄-CHO-Zellen. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration, die zu einer halbmaximalen Zellantwort führt. E_{min}: Minimale Zellantwort (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve), E_{max}: Maximale Zellantwort (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). Die Kenngrößen beruhen auf der Mittelwertskurve aus Abb. 78. n_H(frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. n.s.: nicht signifikant verschieden von n_H = 1 (F-Test, p>0,05); n: Anzahl unabhängiger Experimente.

Acetylcholin zeigte am M₄-Rezeptorsubtyp einen Signalverlauf, der dem am M₂-Acetylcholinrezeptor entsprach (vergleiche 3.1.1.1.). Durch Analyse der Daten mittels „Vier-Parameter-logistischer Gleichung“ (Gl. 6) konnte ein pEC₅₀-Wert von 7,68 ± 0,13 berechnet werden, der sich nicht signifikant von dem des M₂-Rezeptors unterschied (pEC₅₀: 7,61 ± 0,11; t-Test, p>0,05). Dies entspricht der Einordnung von Acetylcholin als

nicht subtypselektiven Agonisten muskarinischer Rezeptoren. Peters et al. (2010) fanden für Acetylcholin am M_4 -Rezeptor durch Messung der Impedanz an lebenden Zellen einen pEC_{50} -Wert von 7,82 (ohne Angabe einer Streuung). Dieser liegt in der gleichen Größenordnung wie der mittels Epic[®]-Biosensor erhobene Wirksamkeit (pEC_{50} : $7,68 \pm 0,13$). Die mittels dynamischer Massenumverteilung ermittelte Wirksamkeit lag jedoch signifikant über der mittels [³⁵S]GTPγS-Bindung in dieser Arbeit ermittelten (pEC_{50} : $6,58 \pm 0,07$, t-Test, $p < 0,05$). Eine Diskrepanz der Wirksamkeiten unterschiedlicher Messmethoden konnte für präferenziell $G\alpha_{i/o}$ -gekoppelte Rezeptoren auch bei Schröder et al. (2010) sowie Peters et al. (2010) gefunden werden. Beispielsweise zeigte Acetylcholin am M_4 -Rezeptor eine um 1,4 Dekaden höhere Wirksamkeit in der Ganzzellmessung als im [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperiment (Scott & Peters, 2010), während die Wirksamkeiten beider Ganzzellmessungen, wie oben aufgeführt, gut übereinstimmten.

3.7.1.2. Iperoxo-induzierte dynamische Massenumverteilung an hM₄-CHO-Zellen

Im Folgenden sollte erstmals die durch Iperoxo-induzierte DMR an hM₄-CHO-Zellen untersucht werden. In diesem Kapitel wird lediglich die Wirksamkeit betrachtet, während die intrinsische Aktivität separat bestimmt wurde und in einem späteren Kapitel betrachtet wird (siehe 3.7.1.5.).

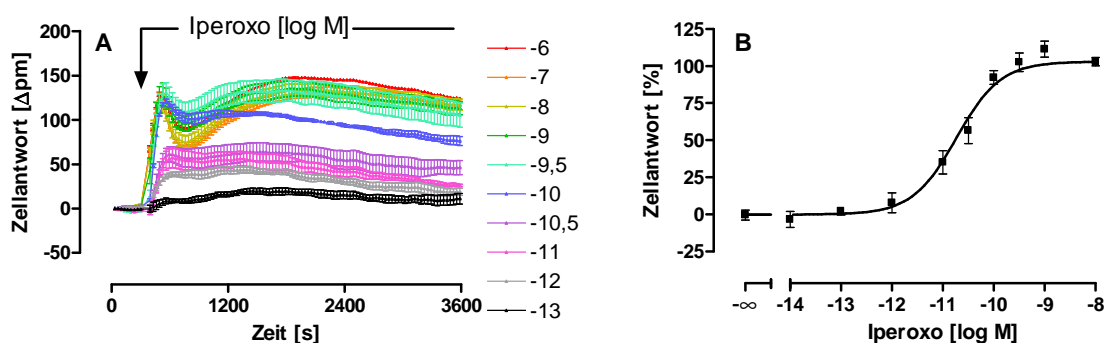


Abb. 79: Iperoxo-induzierte dynamische Massenumverteilung an Flp-InTMhM₄-CHO-Zellen. **A:** Ordinate: Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. Abszisse: Messdauer in Sekunden [s]. Aufgetragen sind die logarithmierten, molaren Konzentrationen von Iperoxo sowie die durch die jeweilige Konzentration induzierte Zellantwort. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Substanzzugabe an. Mittelwerte ± Standardfehler eines repräsentativen Experimentes in Dreifachbestimmung, welches dreifach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert.

B: Ordinate: Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht dem unteren Plateau, 100 % dem oberen Plateau der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus vier voneinander unabhängigen Experimenten, die je als Drei- bzw. Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient $n_H = 1$.

M₄wt	pEC₅₀	E_{min} [%]	E_{max} [%]	n_H (frei)	n
Iperoxo	10,73 \pm 0,09	-0,1 \pm 3,0	103,0 \pm 2,4	1,18 \pm 0,23 n.s.	4

Tab. 56: Kenngrößen \pm Standardfehler der gemittelten Konzentrations-Effekt-Kurve von Iperoxo an Flp-InTMhM₄-CHO-Zellen. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration, die zu einer halbmaximalen Zellantwort führt. E_{min}: Minimale Zellantwort (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve), E_{max}: Maximale Zellantwort (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). Die Kenngrößen beruhen auf der Mittelwertskurve aus Abb. 79. n_H(frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. n.s.: nicht signifikant verschieden von n_H = 1 (F-Test, p>0,05); n: Anzahl unabhängiger Experimente.

Iperoxo zeigte an hM₄-CHO-Zellen einen typischen Signalverlauf für die Aktivierung G $\alpha_{i/o}$ -gekoppelter Rezeptoren. Mit einer Wirksamkeit von pEC₅₀ = 10,73 \pm 0,09 war der Wendepunkt gegenüber Acetylcholin signifikant zu kleineren Konzentrationen hin verschoben (t-Test, p<0,05). Durch Messung der dynamischen Massenumverteilung ergab sich somit eine Differenz von 3,05 Dekaden, die im Bereich der mittels [³⁵S]GTP γ S-Bindung gemessenen Differenz von 2,09 Dekaden lag. Die Wirksamkeit von Iperoxo war, wie die von Acetylcholin, im Epic[®]-Biosensor signifikant höher als bei der [³⁵S]GTP γ S-Bindungsmessung (pEC₅₀: 8,96 \pm 0,10, t-Test, p<0,05). Am muskarinischen M₂-Rezeptor konnte ebenfalls eine höhere Iperoxo-Wirksamkeit durch Messung der dynamischen Massenumverteilung gegenüber der mittels [³⁵S]GTP γ S-Bindung gemessenen Wirksamkeit beobachtet werden (Dissertationsschrift Kebig, 2010 sowie mündliche Mitteilung R. Schrage, Abteilung Pharmakologie & Toxikologie, Universität Bonn).

3.7.1.3. Phth-6-Iper-induzierte dynamische Massenumverteilung an hM₄-CHO-Zellen

Mit Phth-6-Iper sollte erstmals die Signalwegsaktivierung einer von Iperoxo abgeleiteten Hybridverbindung an hM₄-CHO-Zellen mittels Epic[®]-Biosensor untersucht werden. Die intrinsische Aktivität wurde separat bestimmt und wird in einem späteren Kapitel vorgestellt (siehe 3.7.1.5.).

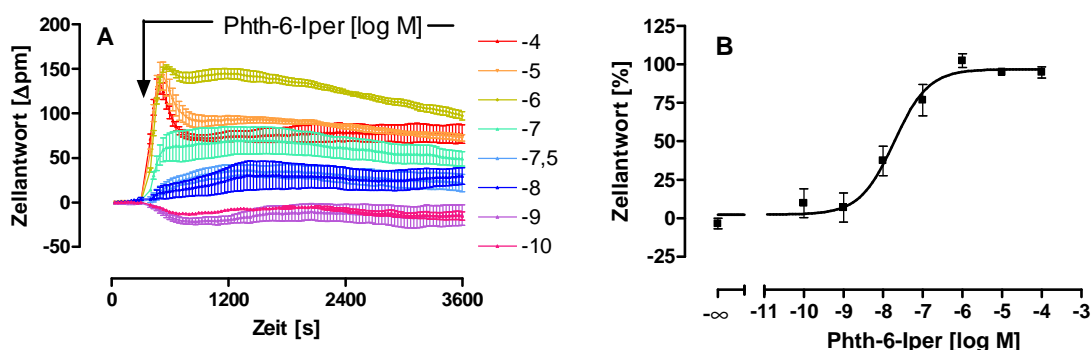


Abb. 80: Phth-6-Iper-induzierte dynamische Massenumverteilung an Flp-InTMhM₄-CHO-Zellen. **A:** *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Aufgetragen sind die logarithmierten, molaren Konzentrationen von Phth-6-Iper sowie die durch die jeweilige Konzentration induzierte Zellantwort. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Substanzzugabe an. Mittelwerte ± Standardfehler eines repräsentativen Experimentes in Dreifachbestimmung, welches dreifach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert. **B:** *Ordinate:* Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht dem unteren Plateau, 100 % dem oberen Plateau der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration. *Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler aus vier voneinander unabhängigen Experimenten, die je als Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient n_H = 1.

M ₄ wt	pEC ₅₀	E _{min} [%]	E _{max} [%]	n _H (frei)	n
Phth-6-Iper	7,72 ± 0,14	2,4 ± 4,4	96,9 ± 3,7	0,86 ± 0,23 n.s.	4

Tab. 57: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Konzentrations-Effekt-Kurve von Phth-6-Iper an Flp-InTMhM₄-CHO-Zellen. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration, die zu einer halbmaximalen Zellantwort führt. E_{min}: Minimale Zellantwort (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve), E_{max}: Maximale Zellantwort (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). Die Kenngrößen beruhen auf der Mittelwertskurve aus Abb. 80; n_H(frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. n.s.: nicht signifikant verschieden von n_H=1 (F-Test, p>0,05); n: Anzahl unabhängiger Experimente.

Phth-6-Iper zeigte am M₄-Rezeptor einen gleichartigen Signalverlauf wie die Vollagonisten Acetylcholin und Iperoxo. Dieser unterschied sich rein optisch ebenfalls nicht von dem Phth-6-Iper-Signalverlauf am M₂-Rezeptorsubtyp (siehe 3.1.1.3.). Somit führte eine Aktivierung Gα_{i/o}-gekoppelter Rezeptoren in CHO-Zellen zu einem gleichartigen Signalverlauf, unabhängig davon, welcher Rezeptor untersucht wurde. Die

Wirksamkeit war mit einem pEC_{50} -Wert von $7,72 \pm 0,14$ nicht signifikant verschieden von der des endogenen Liganden Acetylcholin (pEC_{50} : $7,68 \pm 0,13$, t-Test, $p > 0,05$). Der Wendepunkt unterschied sich jedoch signifikant von dem durch Messung der [35 S]GTP γ S-Bindung erhobenen (pEC_{50} : $6,55 \pm 0,19$, t-Test, $p < 0,05$).

Am M_2 -Rezeptor konnte durch Messung der dynamischen Massenumverteilung ein Wendepunkt von pEC_{50} : $7,12 \pm 0,12$ detektiert werden (siehe 3.1.1.3.), welcher sich signifikant von dem pEC_{50} -Wert am M_4 -Rezeptor unterschied (t-Test, $p < 0,05$). A. Kebig (Dissertationsschrift 2010) konnte an hM_2 -CHO-Zellen eine Phth-6-Iper-Wirksamkeit von $7,33 \pm 0,12$ messen. Diese unterscheidet sich nicht von dem in dieser Arbeit am M_4 -Rezeptor erhobenen pEC_{50} -Wert von Phth-6-Iper (t-Test, $p > 0,05$).

3.7.1.4. Naph-6-Iper-induzierte dynamische Massenumverteilung an hM_4 -CHO-Zellen

Nachfolgend sollte erstmals die aus Iperoxo und einem Teil Naphmethonium bestehende Hybridverbindung Naph-6-Iper hinsichtlich ihrer Signalwegsaktivierung an hM_4 -CHO-Zellen untersucht werden. Die intrinsische Aktivität wurde separat bestimmt und wird in einem eigenen Kapitel aufgeführt (siehe 3.7.1.5.).

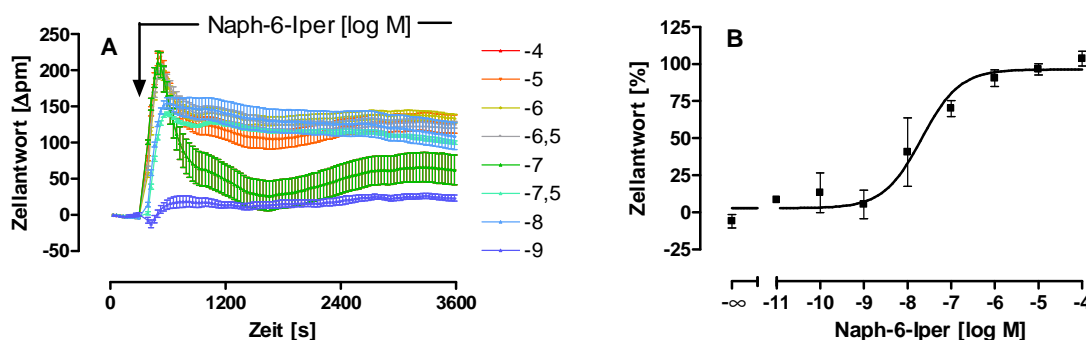


Abb. 81: Naph-6-Iper-induzierte dynamische Massenumverteilung an Flp-InTM hM_4 -CHO-Zellen. **A:** *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Aufgetragen sind die logarithmierten, molaren Konzentrationen von Naph-6-Iper sowie die durch die jeweilige Konzentration induzierte Zellantwort. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Substanzzugabe an. Mittelwerte \pm Standardfehler eines repräsentativen Experimentes in Vierfachbestimmung, welches dreifach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert. **B:** *Ordinate:* Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht dem unteren Plateau, 100 % dem oberen Plateau der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration. *Datenpunkte:* Mittelwerte \pm Standardfehler aus vier voneinander unabhängigen Experimenten, die je als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient $n_H = 1$.

Ergebnisse

M₄wt	pEC₅₀	E_{min} [%]	E_{max} [%]	n_H(frei)	n
Naph-6-lper	7,68 ± 0,20	2,9 ± 4,3	96,4 ± 4,5	0,59 ± 0,17 n.s.	5

Tab. 58: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Konzentrations-Effekt-Kurve von Naph-6-lper an Flp-InTMhM₄-CHO-Zellen. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration, die zu einer halbmaximalen Zellantwort führt. E_{min}: Minimale Zellantwort (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve), E_{max}: Maximale Zellantwort (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). Die Kenngrößen beruhen auf der Mittelwertskurve aus Abb. 81; n_H(frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. n.s.: nicht signifikant verschieden von n_H=1 (F-Test, p>0,05); n: Anzahl unabhängiger Experimente

Der durch Messung der dynamischen Massenumverteilung von Naph-6-lper-induzierte Signalverlauf entsprach anderen an Gα_{i/o}-gekoppelten Rezeptoren erhobenen Signalverläufen. Es ergab sich eine gegenüber Acetylcholin nicht signifikant verschiedene Wirksamkeit mit einem pEC₅₀-Wert von 7,68 ± 0,20 (t-Test, p>0,05). Die Wirksamkeit unterschied sich signifikant von der durch Messung der [³⁵S]GTPγS-Bindung-erhobenen Wirksamkeit von 6,59 ± 0,09 (t-Test, p<0,05).

Am M₂-Rezeptor konnte im gleichen Messsystem ein Wendepunkt von pEC₅₀: 7,59 ± 0,19 gemessen werden. Dieser unterschied sich nicht signifikant von der am M₄-Rezeptor ermittelten Wirksamkeit (t-Test, p>0,05).

3.7.1.5. Maximal induzierbare dynamische Massenumverteilung muskarinischer Liganden an hM₄-CHO-Zellen

Im Folgenden sollte die maximale Wellenlängenverschiebung strukturverschiedener muskarinischer Liganden an hM₄-CHO-Zellen verglichen werden. Dazu wurden alle Liganden in einer Konzentration von 100 μM eingesetzt, da diese Konzentration bei allen Agonisten noch zu einem spezifischen, Rezeptor-vermittelten Signal führte (siehe 8.2.1.). Es wurden parallel Agonist-induzierte Signale erhoben und auf die durch Acetylcholin induzierte maximale Wellenlängenverschiebung normiert. Acetylcholin wurde dazu in supramaximaler Konzentration von 100 μM eingesetzt. Diese Konzentration konnte der Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve entnommen werden (siehe 3.7.1.1.). Zuerst sollen Signalverläufe solcher Agonisten an hM₄-CHO-Zellen gezeigt werden, die zuvor nicht durch Erhebung einer Konzentrations-Effekt-Kurve charakterisiert wurden.

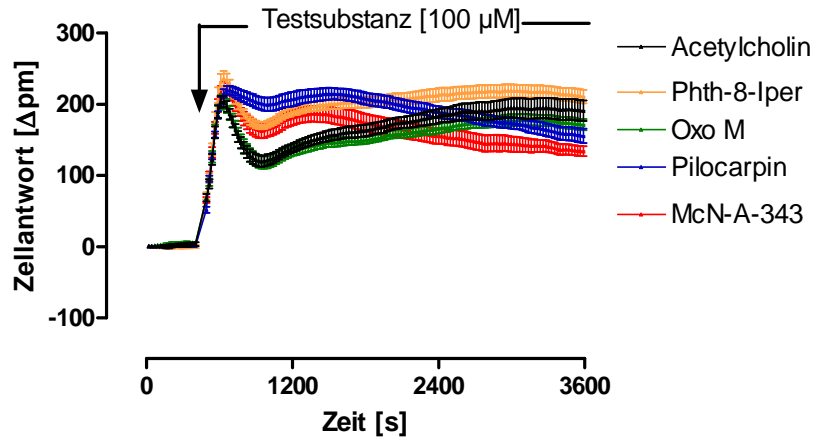


Abb. 82: Agonist-induzierte dynamische Massenumverteilung an Flp-InTMhM₄-CHO-Zellen. *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Substanzzugabe an. Mittelwerte ± Standardfehler eines repräsentativen Experimentes in Vierfachbestimmung, welches zwei- bis elfach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert.

Obige Abbildung verdeutlicht, dass alle an hM₄-CHO-Zellen eingesetzten Agonisten zu einem positiv gerichteten Signal mit einer Signalspitze unmittelbar nach Substanzzugabe führten. Die maximale Auslenkung des Signals sollte im Folgenden quantifiziert werden.

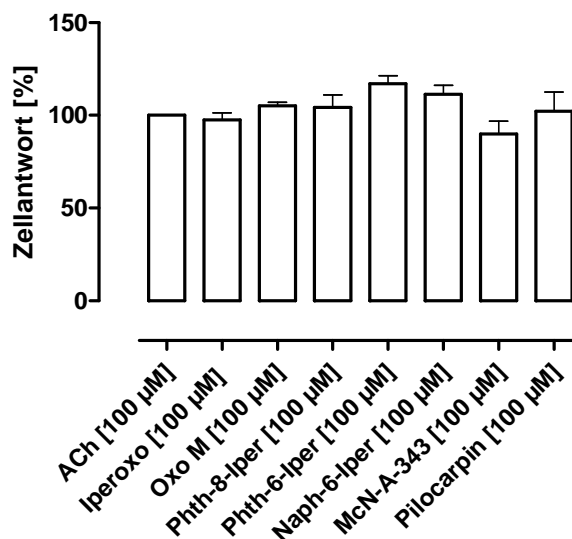


Abb. 83: Maximal-induzierbare, Basislinien-korrigierte dynamische Massenumverteilung muskarinischer Liganden an Flp-InTMhM₄-CHO-Zellen. *Ordinate:* Prozentuale, maximale Zellantwort normiert auf die durch Acetylcholin [100 μM]-induzierte Massenumverteilung. 0 % entspricht keiner Zellantwort, 100 % der durch Acetylcholin-[100 μM] ausgelösten Zellantwort. *Abszisse:* Untersuchte Liganden mit eingesetzter Konzentration, Mittelwerte ± Standardfehler aus 3-12 voneinander unabhängigen Experimenten, jeweils in Drei- oder Vierfachbestimmung erhoben. ACh: Acetylcholin, Oxo M: Oxotremorin M.

Ergebnisse

M_4 wt	$E_{max} \pm SEM$ [%]	n
Acetylcholin [100 μ M]	100,0	12
Iperoxo [1 μ M]	97,6 \pm 3,7	3
Oxotremorin M [100 μ M]	105,0 \pm 2,1	5
Phth-8-Iper [100 μ M]	104,4 \pm 6,6	5
Phth-6-Iper [100 μ M]	117,0 \pm 4,3	7
Naph-6-Iper [100 μ M]	111,4 \pm 4,8	5
McN-A-343 [100 μ M]	90,0 \pm 7,0	7
Pilocarpin [100 μ M]	106,3 \pm 10,2	7

Tab. 59: Maximal-induzierbare, Basislinien-korrigierte dynamische Massenumverteilung muskarinischer Liganden an Flp-InTMhM₄-CHO-Zellen normiert auf die durch Acetylcholin [100 μ M]-induzierte Massenumverteilung des jeweiligen Versuchstages. E_{max} : Maximale Zellantwort, Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) aus drei bis zwölf Einzelversuchen, die je in Drei- oder Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. n: Anzahl unabhängiger Experimente je Testsubstanz.

Alle Agonisten zeigten ein im Vergleich zu einer Rezeptor-sättigenden Acetylcholin-Konzentration nicht signifikant verschiedenes Epic[®]-Signal. Die intrinsische Aktivitäten der Hybridsubstanzen Phth-8-Iper, Phth-6-Iper und Naph-6-Iper wiesen ebenso wie die Liganden McN-A-343 und Pilocarpin eine vollagonistische Massenumverteilung auf.

Bei der Messung der [³⁵S]GTP γ S-Bindung wiesen einige Testsubstanzen lediglich einen Partialagonismus auf (E_{max} [%]: Phth-6-Iper: 43,6 \pm 3,2; Naph-6-Iper: 49,9 \pm 2,0; McN-A-343: 59,5 \pm 5,0; Pilocarpin: 41,3 \pm 1,8; siehe Kapitel 3.5.).

An hM₂-CHO-Zellen zeigten die Hybridverbindungen durch Messung der dynamischen Massenumverteilung ebenfalls vollagonistische Aktivität, während die Testsubstanzen McN-A-343 und Pilocarpin einen Partialagonismus aufwiesen (E_{max} [%]: McN-A-343: 17,8 \pm 5,5; Pilocarpin: 59,0 \pm 3,9; siehe 3.1.1.5.).

3.7.2. Einfluss erhöhter intrazellulärer cAMP-Spiegel (Forskolin) auf die Ligand-induzierte dynamische Massenumverteilung an hM₄-CHO-Zellen

Durch eine Forskolin-Vorstimulation kommt es intrazellulär zu einer Aktivierung der Adenylylcyclase und in Folge dessen zu einem Anstieg des cAMP-Spiegels (zur genauen Wirkweise siehe 3.1.2.). Durch Vorstimulation mit einer maximal wirksamen Forskolin-Konzentration von 10 µM sollte erstmals der Einfluss erhöhter intrazellulärer cAMP-Spiegel auf die Wirksamkeit von Acetylcholin und die intrinsische Aktivität strukturverschiedener muskarinischer Liganden an hM₄-CHO-Zellen mit dem Epic[®]-Biosensor überprüft werden.

3.7.2.1. Acetylcholin-induzierte dynamische Massenumverteilung an hM₄-CHO-Zellen

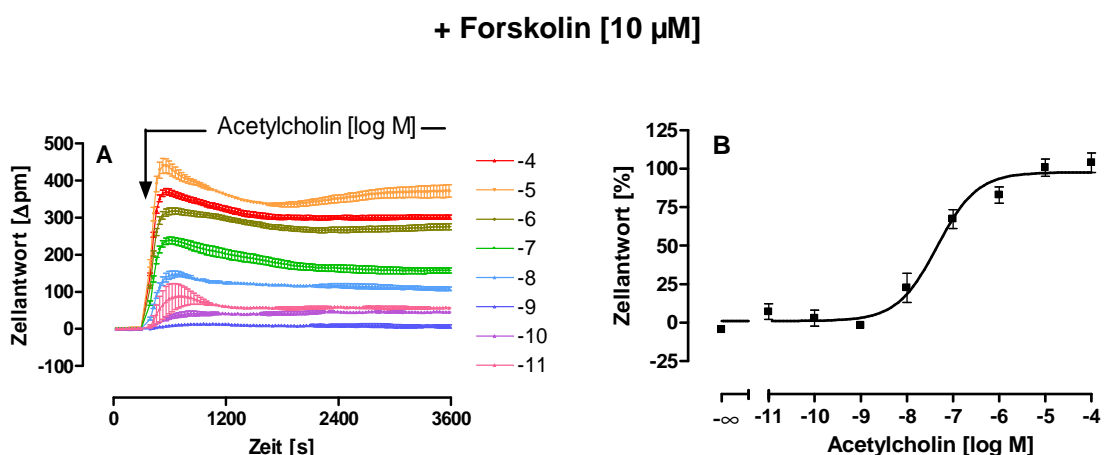


Abb. 84: Acetylcholin-induzierte dynamische Massenumverteilung an Flp-InTMhM₄-CHO-Zellen nach Forskolin [10 µM]-Vorstimulation. **A:** *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Aufgetragen sind die logarithmierten, molaren Konzentrationen von Acetylcholin sowie die durch die jeweilige Konzentration induzierte Zellantwort. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Substanzzugabe an. Mittelwerte ± Standardfehler eines repräsentativen Experimentes in Vierfachbestimmung, welches zweifach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert. **B:** *Ordinate:* Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht dem unteren Plateau, 100 % dem oberen Plateau der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration. *Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die je als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient $n_H = 1$.

M_4 wt	pEC_{50}	E_{min} [%]	E_{max} [%]	n_H (frei)	n
Acetylcholin	$7,35 \pm 0,12$	$1,0 \pm 3,0$	$97,7 \pm 3,6$	$0,74 \pm 0,16$ n.s.	3

Tab. 60: Kenngrößen \pm Standardfehler der gemittelten Konzentrations-Effekt-Kurve von Acetylcholin an Flp-InTMhM₄-CHO-Zellen. pEC_{50} : Negativer dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration, die zu einer halbmaximalen Zellantwort führt. E_{min} : Minimale Zellantwort (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve), E_{max} : Maximale Zellantwort (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). Die Kenngrößen beruhen auf der Mittelwertskurve aus Abb. 84; n_H (frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. n.s.: nicht signifikant verschieden von $n_H=1$ (F-Test, $p>0,05$); n: Anzahl unabhängiger Experimente

Nach einer Acetylcholin-Zugabe zeigte sich gegenüber nicht vorstimulierten Zellen ein deutlich größeres Messfenster (vergleiche 3.7.1.1.). Dies wurde in vorliegender Arbeit ebenso für hM₂-CHO-Zellen beobachtet (siehe 3.1.2.1.). Es konnte ein pEC_{50} -Wert von $7,35 \pm 0,12$ berechnet werden, der sich nicht signifikant von dem ohne Forskolin-Vorstimulation der Zellen unterschied ($7,68 \pm 0,13$, t-Test, $p>0,05$). Damit führte der erhöhte intrazelluläre cAMP-Spiegel nicht zu einer Beeinflussung der Wirksamkeit von Acetylcholin.

3.7.2.2. Maximal induzierbare dynamische Massenumverteilung muskarinischer Liganden unter erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegel (Forskolin) an hM₄-CHO-Zellen

Im Folgenden sollten die intrinsischen Aktivitäten muskarinischer Liganden unter erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegeln an hM₄-CHO-Zellen untersucht werden. Dazu wurde von jeder Testsubstanz eine Konzentration von 100 μ M eingesetzt und mit der intrinsischen Aktivität von Acetylcholin verglichen.

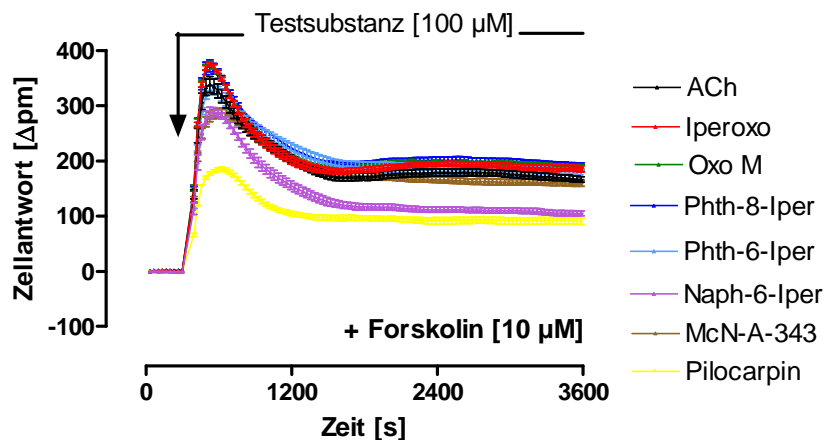


Abb. 85: Agonist-induzierte dynamische Massenumverteilung an Flp-InTMhM₄-CHO-Zellen nach Forskolin-Vorstimulation [10 µM]. *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Substanzzugabe an. Mittelwerte ± Standardfehler eines repräsentativen Experimentes in Vierfachbestimmung, welches zwei- bis elfmal mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert. ACh: Acetylcholin; Oxo M: Oxotremorin M.

Nach einer Forskolin-Vorstimulation wiesen alle Liganden an hM₄-CHO-Zellen den gleichen Signalverlauf auf wie zuvor ohne Forskolin-Vorstimulation gezeigt (siehe 3.7.2.2.). Im Folgenden sollte die maximale Wellenlängenverschiebung jeder Testsubstanz quantifiziert werden.

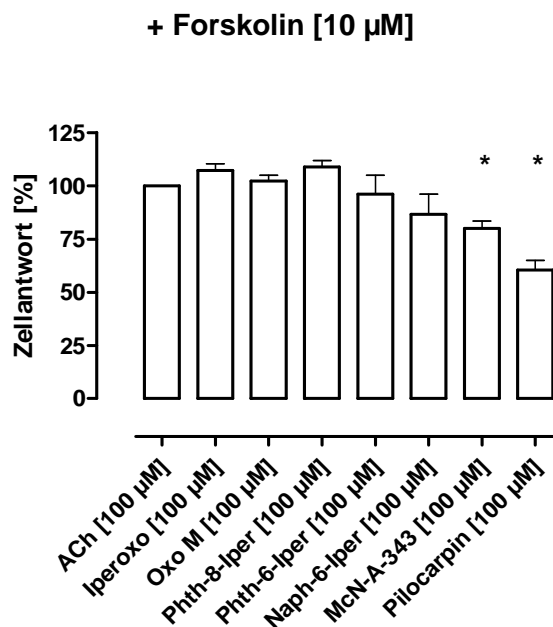


Abb. 86: Maximal-induzierbare, Basislinien-korrigierte dynamische Massenumverteilung muskarinischer Liganden an Flp-InTMhM₄-CHO-Zellen nach Forskolin-Vorstimulation. *Ordinate:* Prozentuale, maximale Zellantwort normiert auf die durch Acetylcholin [100 µM]-induzierte Massenumverteilung. 0 % entspricht keiner Zellantwort, 100 % der durch Acetylcholin-[100 µM] ausgelösten Zellantwort. *Abszisse:* Untersuchte Liganden mit eingesetzter Konzentration, Mittelwerte ± Standardfehler aus drei bis elf voneinander unabhängigen Experimenten, jeweils in Drei- oder Vierfachbestimmung erhoben. ACh: Acetylcholin, Oxo M: Oxotremorin M, *: Signifikant verschieden von Acetylcholin [100 µM] (t-Test, p<0,05).

Ergebnisse

M₄wt	E_{max} ± SEM [%]	n
Acetylcholin [100 µM]	100,0	11
Iperoxo [100 µM]	107,2 ± 3,2	3
Oxotremorin M [100 µM]	102,2 ± 2,8	4
Phth-8-Iper [100 µM]	108,9 ± 3,0	3
Phth-6-Iper [100 µM]	96,1 ± 8,9	6
Naph-6-Iper [100 µM]	86,6 ± 9,5	4
McN-A-343 [100 µM]	80,1 ± 3,3*	4
Pilocarpin [100 µM]	60,4 ± 4,6*	3

Tab. 61: Maximal-induzierbare, Basislinien-korrigierte dynamische Massenumverteilung muskarinischer Liganden an Flp-InTMhM₄-CHO-Zellen nach Forskolin-Vorstimulation. Die Normierung erfolgte auf die durch Acetylcholin [100 µM]-induzierte dynamische Massenumverteilung des jeweiligen Versuchstages. E_{max}: Maximale Zellantwort, Mittelwert ± Standardfehler (SEM) aus drei bis elf Einzelversuchen, die je in Drei- oder Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. n: Anzahl unabhängiger Experimente je Testsubstanz. *: Signifikant verschieden von Acetylcholin [100 µM] (t-Test, p<0,05).

Nach einer Vorstimulation der Zellen mit Forskolin und somit einer Aufspaltung des Messfensters wiesen alle Hybridsubstanzen weiterhin einen Vollagonismus auf. Die Substanzen Pilocarpin und McN-A-343 zeigten in der jeweils eingesetzten Konzentration nach der Forskolin-Vorstimulation nur noch einen Partialagonismus.

3.7.3. Folgen einer $G\alpha_{i/o}$ -Inhibition (Pertussistoxin) auf die Ligand-induzierte dynamische Massenumverteilung an hM_4 -CHO-Zellen

Da bekannt ist, dass der M_4 -Acetylcholinrezeptor neben dem $G\alpha_{i/o}$ -Signaltransduktionsweg auch an $G\alpha_s$ -Proteine koppelt (Dittman et al., 1994; Mistry et al., 2005), wurden im Folgenden Messungen der dynamischen Massenumverteilung nach Pertussistoxin (PTX)-Vorinkubation erhoben. Zur genauen Wirkweise von Pertussistoxin siehe 3.1.3. Die Auswertung erfolgte durch Berechnung der minimalen Zellantwort bis 1700 s Messdauer, um einen Vergleich zu dem am M_2 -Rezeptorsubtyp erhobenen Daten herstellen zu können.

3.7.3.1. Acetylcholin-induzierte dynamische Massenumverteilung an hM_4 -CHO-Zellen

Es wurde erstmalig die Acetylcholin-induzierte DMR an mit PTX vorinkubierten hM_4 -CHO-Zellen mittels Epic[®]-Biosensor analysiert und die Wirksamkeit im Vergleich zu nicht vorinkubierten Zellen betrachtet.

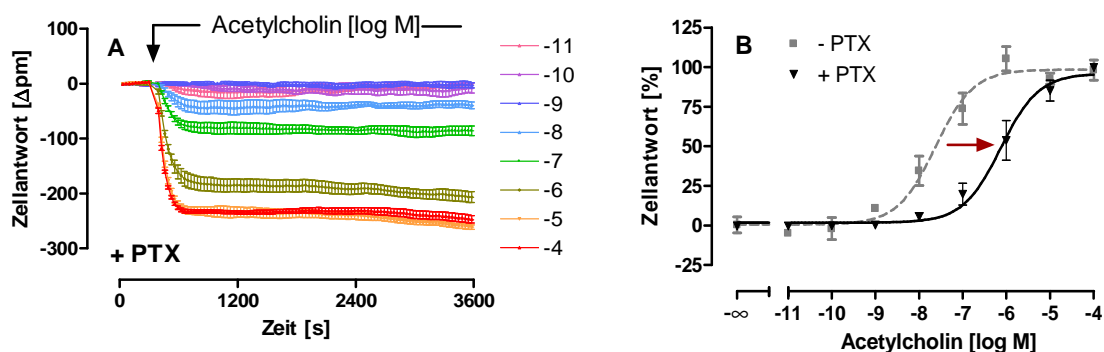


Abb. 87: **A:** Einfluss einer PTX-Vorinkubation auf die Acetylcholin-induzierte dynamische Massenumverteilung an Flp-InTM hM_4 -CHO-Zellen. *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Aufgetragen sind die logarithmierten, molaren Konzentrationen von Acetylcholin sowie die durch die jeweilige Konzentration induzierte Zellantwort. Der Pfeil stellt den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Mittelwerte ± Standardfehler eines repräsentativen Experimentes, welches in Dreifachbestimmung erhoben und fünffach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert. **B:** Vergleich der Acetylcholin-induzierten Konzentrations-Effekt-Kurven mit (+ PTX) und ohne (- PTX) PTX-Vorbehandlung. *Ordinate:* Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht dem unteren Plateau, 100 % dem oberen Plateau der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration. *Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler aus sechs voneinander unabhängigen Experimenten, die je als Drei- bzw. Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient $n_H = 1$.

Ergebnisse

Acetylcholin	pEC ₅₀	E _{min} [%]	E _{max} [%]	n _H (frei)	n
+ PTX	6,13 ± 0,11*	1,7 ± 2,4	97,0 ± 4,3	0,63 ± 0,14 n.s.	6
- PTX	7,68 ± 0,13	-0,2 ± 3,4	97,7 ± 3,7	0,78 ± 0,18 n.s.	6

Tab. 62: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Konzentrations-Effekt-Kurven von Acetylcholin an Flp-InTMhM₄-CHO-Zellen mit (+ PTX) und ohne (- PTX) PTX-Vorinkubation. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration, die zu einer halbmaximalen Zellantwort führt. E_{min}: Minimale Zellantwort (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven), E_{max}: Maximale Zellantwort (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven). Die Kenngrößen beruhen auf den Mittelwertskurven aus Abb. 87; n_H(frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. n.s.: nicht signifikant verschieden von n_H=1 (F-Test, p>0,05); n: Anzahl unabhängiger Experimente. *:Signifikant verschieden von der Kenngröße ohne PTX-Vorinkubation (t-Test, p<0,05).

Acetylcholin führte nach Vorinkubation der Zellen mit Pertussistoxin zu einem negativ gerichteten Signal mittels Epic[®]-Biosensor. Dieses verlief ab ca. 900 s bis zum Ende der Messung parallel zur Basislinie weiter. In CHO-Zellen entsprach dies einem Signal für G_s-gekoppelte Rezeptoraktivierung, wie es über den adrenergen β₂-Rezeptor vermittelt wurde (siehe 3.2.). Am M₂-Rezeptorsubtyp ergab sich hingegen nach PTX-Vorinkubation ein etwas anderer Signalverlauf. Das negativ-verlaufende Signal stieg an hM₂-CHO-Zellen nach ca. 900 s wieder auf das Basalniveau an (vergleiche 3.1.3.1.).

Die Wirksamkeit war nach PTX-Vorinkubation signifikant geringer als ohne Ausschaltung des Gα_{i/o}-Signaltransduktionsweges mit einer Differenz von 1,55 Dekaden. An hM₂-CHO-Zellen ergab sich in vorliegender Arbeit für die Konzentrations-Effekt-Kurven von Acetylcholin ebenfalls eine höhere Wirksamkeit ohne Vorinkubation mit PTX von 1,59 Dekaden.

3.7.3.2. Iperoxo-induzierte dynamische Massenumverteilung an hM₄-CHO-Zellen

Im Folgenden sollte erstmals die Signalwegsaktivierung von Iperoxo an hM₄-CHO-Zellen nach PTX-Vorinkubation untersucht werden. Die intrinsische Aktivität von Iperoxo wurde separat bestimmt und wird in einem späteren Kapitel erläutert.

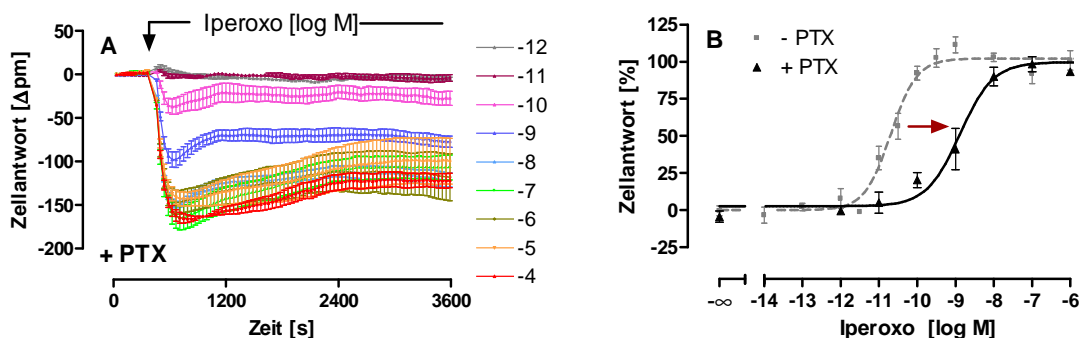


Abb. 88: **A:** Einfluss einer PTX-Vorinkubation auf die durch Iperoxo-induzierte dynamische Massenumverteilung an Flp-InTMhM₄-CHO-Zellen. *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Aufgetragen sind die logarithmierten, molaren Konzentrationen von Iperoxo sowie die durch die jeweilige Konzentration induzierte Zellantwort. Der Pfeil stellt den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Mittelwerte ± Standardfehler eines repräsentativen Experimentes, welches in Dreifachbestimmung erhoben und zweifach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert. **B:** Vergleich der Iperoxo-induzierten Konzentrations-Effekt-Kurven mit (+ PTX) und ohne (- PTX) PTX-Vorbehandlung. *Ordinate:* Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht dem unteren Plateau, 100 % dem oberen Plateau der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration. *Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler aus drei bis vier voneinander unabhängigen Experimenten, die je als Drei- bzw. Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient $n_H = 1$.

Iperoxo	pEC ₅₀	E _{min} [%]	E _{max} [%]	n _H (frei)	n
+ PTX	8,90 ± 0,11*	1,1 ± 3,6	99,8 ± 3,1	0,83 ± 0,19 n.s.	3
- PTX	10,69 ± 0,09	0 ± 3,0	103,4 ± 2,4	1,29 ± 0,24 n.s.	4

Tab. 63: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Konzentrations-Effekt-Kurven von Iperoxo an Flp-InTMhM₄-CHO-Zellen mit (+ PTX) und ohne (- PTX) PTX-Vorinkubation. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration, die zu einer halbmaximalen Zellantwort führt. E_{min}: Minimale Zellantwort (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven), E_{max}: Maximale Zellantwort (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven). Die Kenngrößen beruhen auf den Mittelwertskurven aus Abb. 88; n_H(frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. n.s.: nicht signifikant verschieden von n_H=1 (F-Test, p>0,05); n: Anzahl unabhängiger Experimente. *: Signifikant verschieden von der Kenngröße ohne PTX-Vorinkubation (t-Test, p<0,05).

Iperoxo zeigte wie Acetylcholin nach Vorinkubation der Zellen mit Pertussistoxin eine negativ-gerichtete Zellantwort mit einer signifikant reduzierten Wirksamkeit verglichen mit

den Aufnahmen ohne Vorinkubation. Die Differenz von 1,79 Dekaden lag in der gleichen Größenordnung wie die von Acetylcholin (1,55 Dekaden).

An hM₂-CHO-Zellen lag der Wendepunkt von Iperoxo nach PTX-Vorinkubation um 2,28 Dekaden niedriger verglichen mit der Iperoxo-Wirksamkeit unter Normbedingungen (siehe 3.1.3.2.).

3.7.3.3. Phth-6-Iper-induzierte dynamische Massenumverteilung an hM₄-CHO-Zellen

Phth-6-Iper konnte in vorangegangenen Kapiteln als dualsterisch-bindende Testsubstanz des M₄-Rezeptors charakterisiert werden und sollte hier erstmals auf seine Signalwegsaktivierung nach PTX-Vorinkubation überprüft werden. Dazu wurden Konzentrations-Effekt-Kurven an hM₄-CHO-Zellen aufgenommen und die Wirksamkeit mit und ohne PTX-Vorinkubation verglichen. Die intrinsische Aktivität von Phth-6-Iper unter PTX-Vorinkubation wurde separat bestimmt und wird im weiteren Verlauf erläutert (siehe 3.7.3.5.).

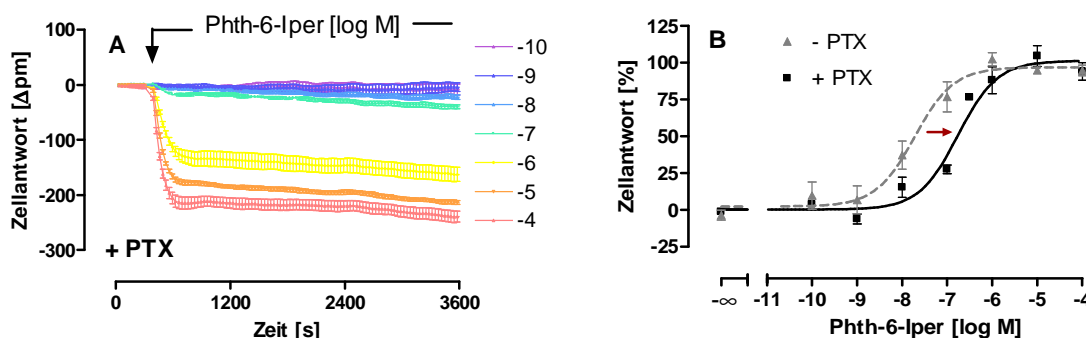


Abb. 89: **A:** Einfluss einer PTX-Vorinkubation auf die durch Phth-6-Iper-induzierte dynamische Massenumverteilung an Flp-InTMhM₄-CHO-Zellen. *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Aufgetragen sind die logarithmierten, molaren Konzentrationen von Phth-6-Iper sowie die durch die jeweilige Konzentration induzierte Zellantwort. Der Pfeil stellt den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Mittelwerte ± Standardfehler eines repräsentativen Experimentes, welches in Dreifachbestimmung erhoben und zweifach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert. **B:** Vergleich der Phth-6-Iper-induzierten Konzentrations-Effekt-Kurven mit (+ PTX) und ohne (- PTX) PTX-Vorbehandlung. *Ordinate:* Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht dem unteren Plateau, 100 % dem oberen Plateau der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration. *Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler aus drei bis vier voneinander unabhängigen Experimenten, die je als Drei- bzw. Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient $n_H = 1$.

Ergebnisse

Phth-6-Iper	pEC ₅₀	E _{min} [%]	E _{max} [%]	n _H (frei)	n
+ PTX	6,76 ± 0,12*	0,3 ± 3,2	101,3 ± 4,2	1,39 ± 0,39 n.s.	3
- PTX	7,72 ± 0,14	2,4 ± 4,4	96,9 ± 3,7	0,86 ± 0,23 n.s.	4

Tab. 64: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Konzentrations-Effekt-Kurven von Phth-6-Iper mit (+ PTX) und ohne (- PTX) PTX-Vorinkubation an Flp-InTMhM₄-CHO-Zellen. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration, die zu einer halbmaximalen Zellantwort führt. E_{min}: Minimale Zellantwort (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven), E_{max}: Maximale Zellantwort (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven). Die Kenngrößen beruhen auf den Mittelwertkurven aus Abb. 89; n_H(frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. n.s.: nicht signifikant verschieden von n_H=1 (F-Test, p>0,05); n: Anzahl unabhängiger Experimente. *:Signifikant verschieden von der Kenngröße ohne PTX-Vorinkubation (t-Test, p<0,05).

Die dualsterische Substanz Phth-6-Iper wies ein konzentrationsabhängiges, negativ-gerichtetes Signal an hM₄-CHO-Zellen nach Vorinkubation mit Pertussistoxin auf. Die Wirksamkeit war im Vergleich zu der Wirksamkeit ohne PTX-Behandlung signifikant erniedrigt (t-Test, p<0,05). Es resultierte eine Differenz der Wendepunkte von 1,0 Dekaden, während für die zuvor aufgeführten Liganden Acetylcholin und Iperoxo Differenzen von mehr als 1,5 Dekaden messbar waren (Δ pEC₅₀: Acetylcholin: 1,55 Dekaden; Iperoxo: 1,79 Dekaden).

An hM₂-CHO-Zellen konnte hingegen keine Phth-6-Iper-induzierte G_s-Aktivierung mittels dynamischer Massenumverteilung gemessen werden (siehe 3.1.3.3. sowie Antony et al., 2009).

3.7.3.4. Naph-6-Iper-induzierte dynamische Massenumverteilung an hM₄-CHO-Zellen

Im Folgenden sollte erstmals die durch Naph-6-Iper an PTX vorbehandelten hM₄-CHO-Zellen induzierte DMR untersucht werden. Die intrinsische Aktivität wird in einem späteren Kapitel separat betrachtet (siehe 3.7.3.5.).

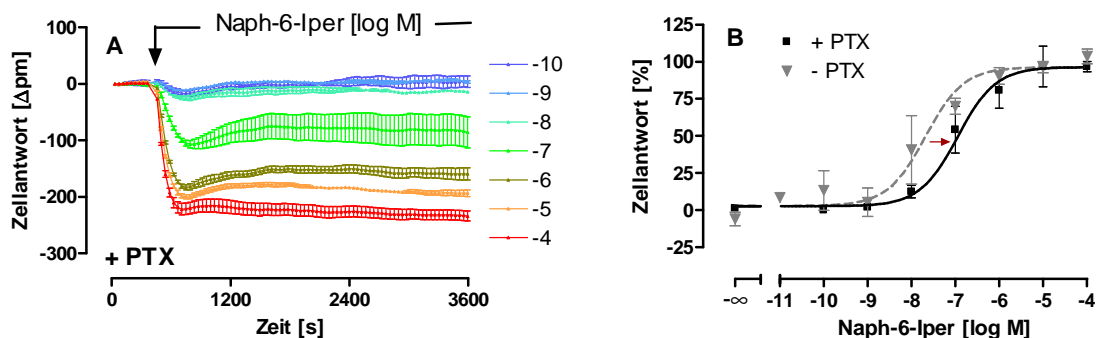


Abb. 90: **A:** Einfluss einer PTX-Vorinkubation auf die durch Naph-6-Iper-induzierte dynamische Massenumverteilung an Flp-InTMhM₄-CHO-Zellen. *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Aufgetragen sind die logarithmierten, molaren Konzentrationen von Naph-6-Iper sowie die durch die jeweilige Konzentration induzierte Zellantwort. Der Pfeil stellt den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Mittelwerte ± Standardfehler eines repräsentativen Experimentes, welches in Dreifachbestimmung erhoben und einmal mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert. **B:** Vergleich der Naph-6-Iper-induzierten Konzentrations-Effekt-Kurven mit (+ PTX) und ohne (- PTX) PTX-Vorbehandlung. *Ordinate:* Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht dem unteren Plateau, 100 % dem oberen Plateau der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration. *Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler aus zwei bis fünf voneinander unabhängigen Experimenten, die je als Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient $n_H = 1$.

Naph-6-Iper	pEC ₅₀	E _{min} [%]	E _{max} [%]	n _H (frei)	n
+ PTX	7,10 ± 0,15	1,0 ± 4,0	94,5 ± 4,6	0,79 ± 0,24 n.s.	2
- PTX	7,68 ± 0,20	2,8 ± 4,3	96,4 ± 4,5	0,59 ± 0,17 n.s.	5

Tab. 65: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Konzentrations-Effekt-Kurven von Naph-6-Iper mit (+ PTX) und ohne (- PTX) PTX-Vorinkubation an Flp-InTMhM₄-CHO-Zellen. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration, die zu einer halbmaximalen Zellantwort führt. E_{min}: Minimale Zellantwort (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven), E_{max}: Maximale Zellantwort (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven). Die Kenngrößen beruhen auf den Mittelwertskurven aus Abb. 90; n_H(frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. n.s.: nicht signifikant verschieden von n_H=1 (F-Test, p>0,05); n: Anzahl unabhängiger Experimente.

Nach Vorinkubation der Zellen mit Pertussistoxin konnte an hM₄-CHO-Zellen ein Naph-6-Iper-induziertes, konzentrationsabhängiges, negativ-gerichtetes Signal detektiert werden. Es resultierte eine erniedrigte Wirksamkeit, die jedoch nicht signifikant verschieden von

der Naph-6-Iper-Wirksamkeit ohne Pertussistoxin-Vorbehandlung war (t-Test, $p > 0,05$). Acetylcholin sowie Iperoxo wiesen Differenzen von mehr als 1,5 Dekaden auf.

An hM_2 -CHO-Zellen zeigte Naph-6-Iper unter diesen Messbedingungen keine dynamische Massenumverteilung (siehe 3.1.3.3. sowie Antony et al., 2009). Somit wiesen die beiden dualsterischen Testsonden Phth-6-Iper und Naph-6-Iper qualitative Unterschiede hinsichtlich der G_s -, nicht aber hinsichtlich der $G_{i/o}$ -Aktivierung zwischen dem M_2 - sowie dem M_4 -Rezeptorsubtypen auf (zur näheren Erläuterung siehe 4.).

3.7.3.5. Maximal induzierbare dynamische Massenumverteilung muskarinischer Liganden nach $G_{i/o}$ -Inhibition (Pertussistoxin) an hM_4 -CHO-Zellen

Neben der Bestimmung der Wirksamkeit wurden zusätzlich die intrinsischen Aktivitäten der untersuchten Liganden ermittelt. Jeder Ligand wurde in einer Konzentration von 100 μ M eingesetzt und die Wellenlängenverschiebung mit der durch Acetylcholin [100 μ M]-induzierten Wellenlängenverschiebung eines Versuchstages verglichen. Für Iperoxo wurde eine Konzentration von 1 μ M gewählt, da sich diese im oberen Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve befindet (siehe 3.7.3.2.) und somit eine maximale Wellenlängenverschiebung induziert. Zuerst soll ein repräsentatives Experiment von bisher nicht unter PTX-Vorbehandlung gezeigten Testsubstanzen aufgeführt werden, um das durch diese Liganden induzierte Epic[®]-Signal zu verdeutlichen.

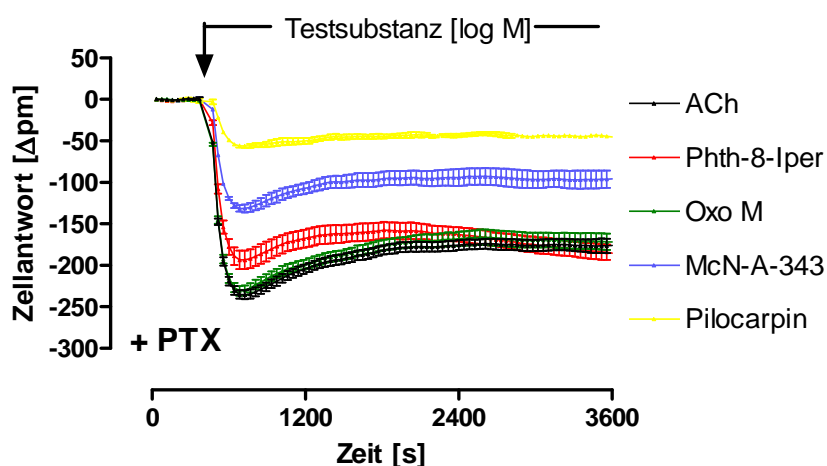


Abb. 91: Agonist-induzierte dynamische Massenumverteilung an Flp-InTM hM_4 -CHO-Zellen nach PTX-Vorinkubation. *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Substanzzugabe an. Mittelwerte \pm Standardfehler eines repräsentativen Experimentes in Vierfachbestimmung, welches zwei- bis neunfach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert. ACh: Acetylcholin; Oxo M: Oxotremorin M.

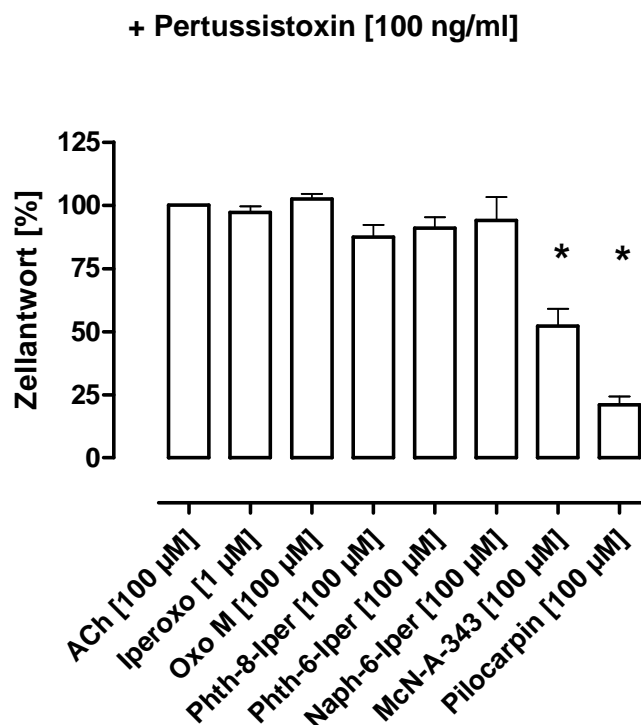


Abb. 92: Maximal-induzierbare, Basislinien-korrigierte dynamische Massenumverteilung muskarinischer Liganden an Flp-InTMhM₄-CHO-Zellen nach PTX-Vorinkubation. *Ordinate:* Prozentuale, maximale Zellantwort normiert auf die durch Acetylcholin [100 µM]-induzierte Massenumverteilung. 0 % entspricht keiner Zellantwort, 100 % der durch Acetylcholin [100 µM]-ausgelösten Zellantwort. *Abszisse:* Untersuchte Liganden mit eingesetzter Konzentration, Mittelwerte ± Standardfehler aus vier bis zehn voneinander unabhängigen Experimenten, jeweils in Drei- oder Vierfachbestimmung erhoben. ACh: Acetylcholin, Oxo M: Oxotremorin M, *: Signifikant verschieden von Acetylcholin [100 µM] (t-Test, p<0,05).

+ PTX	E_{max} ± SEM [%]	n
Acetylcholin [100 µM]	100,0	10
Iperoxo [1 µM]	97,2 ± 2,4	4
Oxotremorin M [100 µM]	102,6 ± 2,1	5
Phth-8-Iper [100 µM]	87,5 ± 4,7	3
Phth-6-Iper [100 µM]	91,0 ± 4,4	3
Naph-6-Iper [100 µM]	93,9 ± 9,3	3
McN-A-343 [100 µM]	52,2 ± 6,8*	4
Pilocarpin [100 µM]	21,1 ± 3,3*	3

Tab. 66: Maximal-induzierbare, Basislinien-korrigierte dynamische Massenumverteilung muskarinischer Liganden an Flp-InTMhM₄-CHO-Zellen nach PTX-Vorinkubation. Die Normierung erfolgte auf die durch Acetylcholin [100 µM]-induzierte dynamische Massenumverteilung des jeweiligen Versuchstages. E_{max}: Maximale Zellantwort, Mittelwert ± Standardfehler (SEM) aus 3-10 Einzelversuchen, die je in Drei- oder Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. n: Anzahl unabhängiger Experimente je Testsubstanz. * Signifikant verschieden von Acetylcholin [100 µM] (t-Test, p<0,05).

An hM₄-CHO-Zellen zeigten alle untersuchten Agonisten außer den Testsubstanzen McN-A-343 sowie Pilocarpin nach Ausschaltung der G_{α_{i/o}}-G-Proteine eine volle intrinsische Aktivität bezogen auf Acetylcholin [100 µM]. Für die Testsubstanzen Pilocarpin und McN-A-343 wurde keine Konzentrations-Effekt-Kurve erhoben, so dass nicht bekannt ist, ob die eingesetzte Konzentration im oberen Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven läge, um eine maximale DMR zu induzieren. Pilocarpin konnte jedoch nicht in einer höheren Konzentration eingesetzt werden, da ab einer Konzentration von 1 mM Rezeptor-unabhängige Signale auftraten (siehe 8.2.1.).

Messungen des M₂-Rezeptors ergaben nur für Iperoxo eine volle intrinsische Aktivität, während für Pilocarpin sowie die dualsterischen Substanzen Phth-6-Iper, Naph-6-Iper und Phth-8-Iper keine signifikante G_s-Aktivierung gemessen werden konnte (siehe 3.1.3.3.).

3.7.4. Vergleich der Acetylcholin-induzierten cAMP-Bildung zwischen hM₄- und hM₂-CHO-Zellen

Vorausgehende Experimente wiesen auf eine stärkere G_s-Aktivierung des M₄-Rezeptorsubtyps gegenüber dem M₂-Rezeptorsubtyp hin. Aus diesem Grund sollte mittels FRET-basierter Messung die Bildung intrazellulärer cAMP-Spiegel verglichen werden. Es wurde der endogene Ligand muskarinischer Rezeptoren Acetylcholin eingesetzt und die Wirksamkeit der Konzentrations-Effekt-Kurven miteinander verglichen. Der Vergleich beider Subtypen erfolgte jeweils parallel auf einer Mikrotiterplatte desselben Versuchstages unter den gleichen Bedingungen, um äußere Einflüsse zu minimieren.

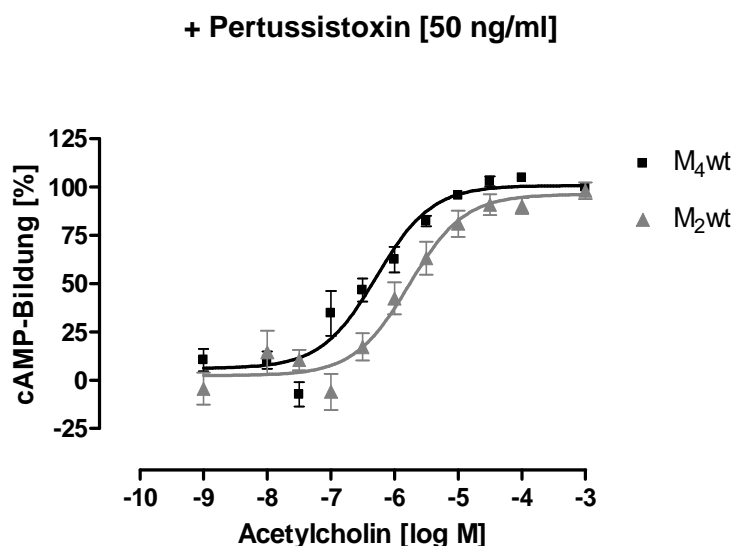


Abb. 93: Acetylcholin-induzierte cAMP-Bildung an Flp-InTMM₄-CHO-Zellen und Flp-InTMM₂-CHO-Zellen nach PTX-Vorinkubation [50 ng/ml, 20 h]. *Ordinate:* Prozentuale cAMP-Bildung. 0 % entspricht dem unteren Plateau, 100 % dem oberen Plateau der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Acetylcholin-Konzentration. *Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler aus fünf voneinander unabhängigen Experimenten, die je als Zweifachbestimmung durchgeführt wurden. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient n_H = 1.

Acetylcholin +PTX	pEC ₅₀	E _{min} [%]	E _{max} [%]	n _H (frei)	n
M ₄ wt	6,39 ± 0,10	0,2 ± 4,0	100,1 ± 3,0	0,72 ± 0,13 n.s.	5
M ₂ wt	5,80 ± 0,11*	1,0 ± 3,5	96,1 ± 3,6	0,95 ± 0,21 n.s.	5

Tab. 67: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurven nach PTX-Vorinkubation. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus der Acetylcholin-Konzentration, die zu einer halbmaximalen cAMP-Bildung führt. E_{min}: Minimale cAMP-Bildung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve), E_{max}: Maximale cAMP-Bildung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). Die Kenngrößen beruhen auf den Mittelwertskurven aus Abb. 93. n_H(frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. *: signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße des M₄-Wildtyps (t-Test, p<0,05).

Die Wirksamkeit von Acetylcholin unterschied sich signifikant zwischen den beiden muskarinischen Rezeptorsubtypen (t-Test, $p < 0,05$). Es resultierte eine um 0,59 Dekaden höhere Wirksamkeit am M_4 -Wildtyp verglichen mit dem M_2 -Rezeptorsubtyp. Die separate Betrachtung des G_s -Signaltransduktionsweges bestätigt somit, dass der M_4 -Rezeptor bei niedrigeren Konzentrationen des endogenen Liganden Acetylcholin schon an G_s -Proteine koppelt als der M_2 -Rezeptorsubtyp.

Diese Beobachtung passt zu den von Mistry et al. (2005) durch Messung des intrazellulären cAMP-Spiegels gefundenen Differenzen anderer muskarinischer Liganden. So führte Methacholin, ein Derivat des Acetylcholin, zu einer um 0,5 Dekaden höheren Wirksamkeit an hM_4 -CHO-Zellen verglichen mit hM_2 -CHO-Zellen unter PTX-Vorinkubation. Oxotremorin M erreichte in selbiger Arbeit unter PTX sogar eine um 1,17 Dekaden höhere Wirksamkeit am M_4 -Rezeptor verglichen mit dem M_2 -Wildtyp.

3.8. Messung der Agonist-induzierten dynamischen Massenumverteilung an Flp-InTMhM₄⁴³⁵Trp→Ala-CHO-Zellen

3.8.1. Messung ohne Vorinkubation der Zellen

Neben der Messung der [³⁵S]GTPγS-Aktivierung wurde in einem weiteren funktionellen Messansatz, der Untersuchung der dynamischen Massenumverteilung, der M₄-Wildtyp mit dem an Position 7.35 mutierten Rezeptor verglichen, um Aussagen über den Einfluss des Epitops auf die Signalwegsaktivierung in lebenden Zellen treffen zu können. An jedem Versuchstag wurde sowohl Atropin, zur Ermittlung von konstitutiver Rezeptoraktivität, als auch Forskolin, als Rezeptor-unabhängiger Aktivator, mitgeführt. An keinem Versuchstag konnte für die untersuchte Rezeptormutante ein inverses Messfenster detektiert werden.

3.8.1.1. Acetylcholin-induzierte dynamische Massenumverteilung an hM₄⁴³⁵Trp→Ala-CHO-Zellen

Zuerst wurde die Wirksamkeit von Acetylcholin an hM₄-CHO-Zellen und hM₄⁴³⁵Trp→Ala-CHO-Zellen verglichen, um eine Aussage über einen Einfluss des Epitopes auf den Wendepunkt treffen zu können.

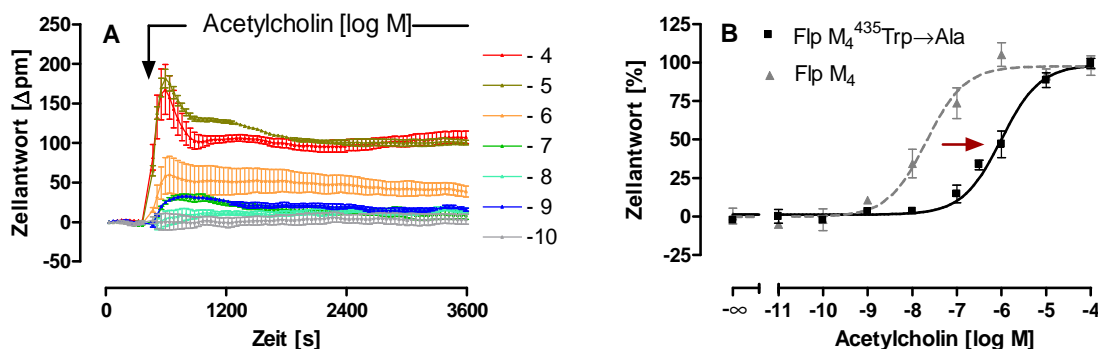


Abb. 94: A: Acetylcholin-induzierte dynamische Massenumverteilung an Flp-InTMhM₄⁴³⁵Trp→Ala-CHO-Zellen. *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Aufgetragen sind die logarithmierten, molaren Konzentrationen von Acetylcholin sowie die durch die jeweilige Konzentration induzierte Zellantwort. Der Pfeil stellt den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Mittelwerte ± Standardfehler eines repräsentativen Experimentes, welches in Drei- oder Vierfachbestimmung erhoben und fünffach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert.

B: Vergleich der Acetylcholin-induzierten Konzentrations-Effekt-Kurven an Flp-InTMhM₄⁴³⁵Trp→Ala und Wildtyp-CHO-Zellen. *Ordinate:* Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht dem unteren Plateau, 100 % dem oberen Plateau der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration. *Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler aus sechs voneinander unabhängigen Experimenten, die je als Drei- oder Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient n_H = 1.

Acetylcholin	pEC ₅₀	E _{min} [%]	E _{max} [%]	n _H (frei)	n
M ₄ ⁴³⁵ Trp→Ala	5,87 ± 0,10*	1,2 ± 1,9	98,7 ± 3,5	0,92 ± 0,21 n.s.	6
M ₄ wt	7,68 ± 0,13	-0,2 ± 3,4	97,7 ± 3,7	0,78 ± 0,18 n.s.	6

Tab. 68: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Konzentrations-Effekt-Kurven von Acetylcholin. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration, die zu einer halbmaximalen Zellantwort führt. E_{min}: Minimale Zellantwort (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven), E_{max}: Maximale Zellantwort (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven). Die Kenngrößen beruhen auf den Mittelwertskurven aus Abb. 94; n_H(frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. n.s.: nicht signifikant verschieden von n_H=1 (F-Test, p>0,05); n: Anzahl unabhängiger Experimente. *: Signifikant verschieden zu der entsprechenden Kenngröße des Wildtyps (t-Test, p<0,05).

Acetylcholin führte an hM₄⁴³⁵Trp→Ala-CHO-Zellen zu einer positiv-gerichteten Wellenlängenverschiebung. Es trat eine Signalspitze auf, die von einem Signalabfall gefolgt wurde. Somit unterschied sich das Signal rein optisch nicht von denen, die durch Messung des Wildtyps oder anderer präferenziell Gα_{i/o}-gekoppelter Rezeptoren in CHO-Zellen detektiert wurden (siehe 3.7.1.1. und 3.1.1.1.). Durch Auftragung der Acetylcholin-Konzentrationen gegen die maximale Zellantwort konnte die Wirksamkeit von Acetylcholin zwischen dem Wildtyp und dem mutierten Rezeptor verglichen werden. Der Austausch der Aminosäure Trp 7.35 zu Alanin führte zu einem signifikanten Wirksamkeitsverlust von 1,81 Dekaden für Acetylcholin. Diese Verschiebung spiegelt den im [³⁵S]GTPγS-Messansatz beobachteten Einfluss von 1,24 Dekaden Rechtsverschiebung gut wider. Die Wirksamkeit von Acetylcholin lag durch Messung der dynamischen Massenumverteilung nur leicht, aber signifikant über der mittels G-Protein-Aktivierung gemessenen (pEC₅₀: 5,44 ± 0,1 vs. 5,87 ± 0,1; t-Test, p<0,05).

3.8.1.2. Iperoxo-induzierte dynamische Massenumverteilung an hM₄⁴³⁵Trp→Ala-CHO-Zellen

Der Einfluss des Epitopes 7.35 auf die Iperoxo-Wirksamkeit wird nachstehend durch einen Vergleich mit dem Wildtyp verdeutlicht, während der Einfluss auf die intrinsische Aktivität in einem späteren Kapitel behandelt wird (siehe 3.8.3.3.).

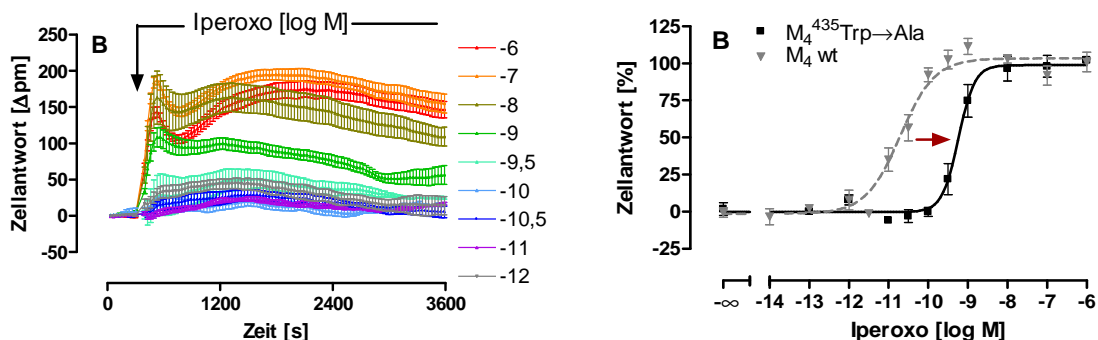


Abb. 95: **A:** Iperoxo-induzierte dynamische Massenumverteilung an Flp-InTMhM₄⁴³⁵Trp→Ala-CHO-Zellen. *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Aufgetragen sind die logarithmierten molaren Konzentrationen von Iperoxo sowie die durch die jeweilige Konzentration induzierte Zellantwort. Der Pfeil stellt den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Mittelwerte ± Standardfehler eines repräsentativen Experimentes, welches in Dreifachbestimmung erhoben und zweifach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert. **B:** Vergleich der Iperoxo-induzierten Konzentrations-Effekt-Kurven an Flp-InTMhM₄⁴³⁵Trp→Ala und Wildtyp-CHO-Zellen. *Ordinate:* Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht dem unteren Plateau, 100 % dem oberen Plateau der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration. *Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler aus drei bis vier voneinander unabhängigen Experimenten, die je als Drei- oder Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient n_H = 1 für den Wildtyp und freilaufender Hill-Koeffizient n_H = 2,12 für die Mutante.

Iperoxo	pEC ₅₀	E _{min} [%]	E _{max} [%]	n _H (frei)	n
M ₄ ⁴³⁵ Trp→Ala	9,24 ± 0,05*	-0,2 ± 2,5	98,9 ± 3,4	2,11 ± 0,41 [#]	3
M ₄ wt	10,73 ± 0,09	-0,1 ± 3,0	103,3 ± 2,4	1,18 ± 0,23 n.s.	4

Tab. 69: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Konzentrations-Effekt-Kurven von Iperoxo. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration, die zu einer halbmaximalen Zellantwort führt. E_{min}: Minimale Zellantwort (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven), E_{max}: Maximale Zellantwort (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven). Für den Wildtyp beruhen die Kenngrößen Die Kenngrößen beruhen auf den Mittelwertskurven aus Abb. 95. n_H(frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. n: Anzahl unabhängiger Experimente. *: Signifikant verschieden zu der entsprechenden Kenngröße des Wildtyps (t-Test, p<0,05), #: Signifikant verschieden von 1 (F-Test, p<0,05).

Iperoxo führte zu einer für Gα_{i/o}-gekoppelte Rezeptoren typischen, positiv-gerichteten Wellenlängenverschiebung, die sich optisch nicht von der des Acetylcholins unterschied. Es resultierte für Iperoxo eine von n_H= 1 signifikant verschiedene Kurvensteilheit von

$n_H = 2,11 \pm 0,41$ (F-Test, $p < 0,05$). Durch Messung der [^{35}S]GTP γ S-Bindung konnte keine gegenüber dem Wildtyp verschiedene Kurvensteilheit gemessen werden (siehe 3.6.3.). Durch Austausch der Aminosäure Trp 7.35 des M_4 -Rezeptors gegen Alanin wurde die Wirksamkeit von Iperoxo um 1,49 Dekaden gesenkt, was in der Größenordnung lag, die auch durch Messung der G-Protein-Aktivierung gemessen wurde (1,56 Dekaden). Es ergab sich jedoch durch Messung der dynamischen Massenumverteilung eine signifikant höhere Iperoxo-Wirksamkeit am mutierten Rezeptor als bei Messung der G-Protein-Aktivierung ($7,39 \pm 0,10$ vs. $9,24 \pm 0,05$; t-Test, $p < 0,05$).

3.8.1.3. Phth-6-Iper-induzierte dynamische Massenumverteilung an $hM_4^{435}\text{Trp} \rightarrow \text{Ala}$ -CHO-Zellen

Im folgenden Abschnitt wurde erstmalig die Signalwegsaktivierung der dualsterischen Testsubstanz Phth-6-Iper zwischen hM_4 -CHO-Zellen und $hM_4^{435}\text{Trp} \rightarrow \text{Ala}$ -CHO-Zellen verglichen, um einen Hinweis auf den Einfluss des Epitopes 7.35 auf die Wirksamkeit dieser Testsubstanz zu erhalten. Die intrinsischen Aktivitäten werden in einem späteren Kapitel separat besprochen (siehe 3.8.3.3.).

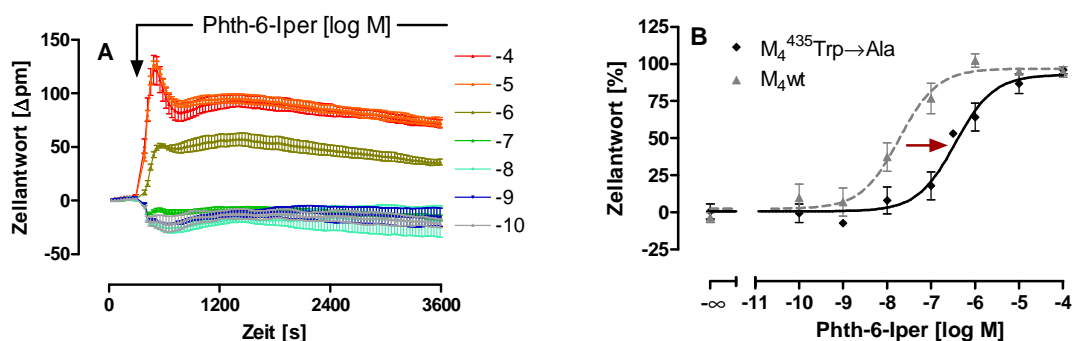


Abb. 96: **A:** Phth-6-Iper-induzierte dynamische Massenumverteilung an Flp-InTM $hM_4^{435}\text{Trp} \rightarrow \text{Ala}$ -CHO-Zellen. *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Aufgetragen sind die logarithmierten, molaren Konzentrationen von Phth-6-Iper sowie die durch die jeweilige Konzentration induzierte Zellantwort. Der Pfeil stellt den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Mittelwerte \pm Standardfehler eines repräsentativen Experimentes, welches in Dreifachbestimmung erhoben und zwei- bis dreifach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert. **B:** Vergleich der Phth-6-Iper-induzierten Konzentrations-Effekt-Kurven an Flp-InTM $hM_4^{435}\text{Trp} \rightarrow \text{Ala}$ - und Wildtyp-CHO-Zellen. *Ordinate:* Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht dem unteren Plateau, 100 % dem oberen Plateau der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration. *Datenpunkte:* Mittelwerte \pm Standardfehler aus zwei bis vier voneinander unabhängigen Experimenten, die je als Drei- oder Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient $n_H = 1$.

Ergebnisse

Phth-6-Iper	pEC ₅₀	E _{min} [%]	E _{max} [%]	n _H (frei)	n
M ₄ ⁴³⁵ Trp→Ala	6,45 ± 0,12*	0,7 ± 3,8	92,8 ± 4,5	0,86 ± 0,23 n.s.	3-4
M ₄ wt	7,72 ± 0,14	2,4 ± 4,4	96,9 ± 3,7	0,86 ± 0,23 n.s.	4

Tab. 70: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Konzentrations-Effekt-Kurven von Phth-6-Iper. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration, die zu einer halbmaximalen Zellantwort führt. E_{min}: Minimale Zellantwort (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven), E_{max}: Maximale Zellantwort (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven). Die Kenngrößen beruhen auf den Mittelwertskurven aus Abb. 96. n_H(frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. n: Anzahl unabhängiger Experimente, *: Signifikant verschieden zu der entsprechenden Kenngröße des Wildtyps (t-Test, p<0,05).

Die dualsterische Testsubstanz Phth-6-Iper zeigte eine konzentrationsabhängige, positivgerichtete Zellantwort mit einer Signalspitze unmittelbar nach Substanzzugabe. Somit unterschied sich das Signal nicht von den Signalen der zuvor beschriebenen Vollagonisten Acetylcholin und Iperoxo an hM₄⁴³⁵Trp→Ala-CHO-Zellen. Die mittels dynamischer Massenumverteilung gemessene Wirksamkeit lag nur schwach, aber signifikant über der durch G-Protein-Aktivierung ermittelten Wirksamkeit (pEC₅₀: 6,45 ± 0,12 vs. 5,92 ± 0,15, t-Test, p<0,05). Sie war jedoch deutlich (1,20 Dekaden) reduziert gegenüber der Phth-6-Iper-vermittelten Wirksamkeit an hM₄-CHO-Zellen (t-Test, p<0,05). Somit zeigte Phth-6-Iper auch in diesem Ganzzellmesssystem einen Einfluss des Epitops 7.35 auf die Wirksamkeit muskarinischer Liganden am M₄-Rezeptor.

3.8.1.4. Naph-6-Iper-induzierte dynamische Massenumverteilung an hM₄⁴³⁵Trp→Ala-CHO-Zellen

Naph-6-Iper bindet wie zuvor gezeigt dualsterisch an den M₄-Wildtyp-Rezeptor. Darüberhinaus konnte an Membranhomogenaten aus hM₄⁴³⁵Trp→Ala-CHO-Zellen bereits ein Einfluss des mutierten Epitopes 7.35 auf die G-Proteinaktivierung untersucht werden. Im Folgenden wurde nun getestet, ob der Austausch des Epitopes 7.35 des M₄-Rezeptors gegen Alanin zu einer Beeinflussung der Signalwegsaktivierung führt. Die intrinsische Aktivität wurde separat bestimmt und wird im nächsten Kapitel besprochen (siehe 3.8.3.3.).

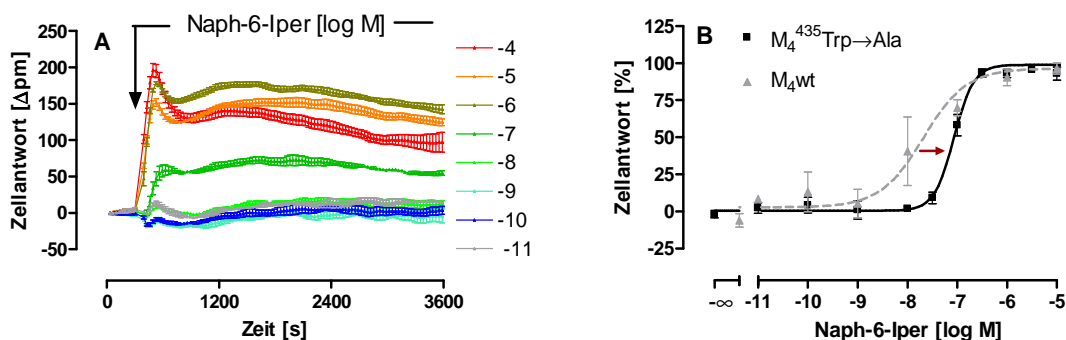


Abb. 97: **A:** Naph-6-Iper-induzierte dynamische Massenumverteilung an Flp-InTMhM₄⁴³⁵Trp→Ala-CHO-Zellen. *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Aufgetragen sind die logarithmierten, molaren Konzentrationen von Naph-6-Iper sowie die durch die jeweilige Konzentration induzierte Zellantwort. Der Pfeil stellt den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Mittelwerte ± Standardfehler eines repräsentativen Experimentes, welches in Dreifachbestimmung erhoben und drei- bis vierfach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert. **B:** Vergleich der Naph-6-Iper-induzierten Konzentrations-Effekt-Kurven an Flp-InTMhM₄⁴³⁵Trp→Ala- und Wildtyp-CHO-Zellen. *Ordinate:* Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht dem unteren Plateau, 100 % dem oberen Plateau der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration. *Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler aus vier bis fünf voneinander unabhängigen Experimenten, die je als Drei- oder Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), variabler Hill-Koeffizienten von $n_H = 2,19$ für die Mutante und $n_H = 1,0$ für den Wildtyp.

Naph-6-Iper	pEC ₅₀	E _{min} [%]	E _{max} [%]	n _H (frei)	n
M ₄ ⁴³⁵ Trp→Ala	7,07 ± 0,04*	0,5 ± 2,2	99,0 ± 2,6	2,19 ± 0,53 [#]	5
M ₄ wt	7,68 ± 0,20	2,8 ± 4,3	96,4 ± 4,5	0,59 ± 0,17 n.s.	5

Tab. 71: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Konzentrations-Effekt-Kurven von Naph-6-Iper. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration, die zu einer halbmaximalen Zellantwort führt. E_{min}: Minimale Zellantwort (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven), E_{max}: Maximale Zellantwort (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven). Die Kenngrößen beruhen auf den Mittelwertskurven aus Abb. 97. n_H(frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. n: Anzahl unabhängiger Experimente. *: Signifikant verschieden zu der entsprechenden Kenngröße des Wildtyps (t-Test, p<0,05), #: Signifikant verschieden von n_H=1 (F-Test, p<0,05).

Die mittels dynamischer Massenumverteilung ermittelte Wirksamkeit von Naph-6-Iper unterschied sich nicht signifikant von der durch Messung der G-Protein-Aktivierung erhobenen (pEC₅₀: 6,86 ± 0,07 vs. 7,07 ± 0,04; t-Test, p>0,05). Die Wirksamkeit von Naph-6-Iper war am punktmultierten Rezeptor jedoch signifikant schwächer als am M₄-Wildtyprezeptor (t-Test, p<0,05). Die Differenz der pEC₅₀-Werte zwischen Wildtyp und hM₄⁴³⁵Trp→Ala-CHO-Zellen betrug 0,61 Dekaden. Für die muskarinischen Liganden Acetylcholin und Iperoxo betragen die Differenzen der pEC₅₀-Werte mehr als 1,5 Dekaden zwischen hM₄-CHO-Zellen und hM₄⁴³⁵Trp→Ala-CHO-Zellen.

3.8.1.5. Maximal-induzierbare dynamische Massenumverteilung muskarinischer Liganden an $hM_4^{435}Trp \rightarrow Ala-CHO$ -Zellen

Im Folgenden wurden die intrinsischen Aktivitäten strukturverschiedener Testsubstanzen an $hM_4^{435}Trp \rightarrow Ala-CHO$ -Zellen miteinander verglichen. Es wurde von jedem Liganden eine Konzentration von 100 μM eingesetzt, um eine maximale, noch Rezeptor-vermittelte Ligand-induzierte Wellenlängenverschiebung zu detektieren. Lediglich Iperoxo konnte in einer Konzentration von 1 μM eingesetzt werden, da der zuvor erhobenen Konzentrations-Effekt-Kurve entnommen werden konnte, dass diese Konzentration eine maximale Zellantwort induziert (siehe 3.8.1.2.). Die Wellenlängenverschiebung jeder Testsubstanz wurde auf die am gleichen Versuchstag erhobene Wellenlängenverschiebung von Acetylcholin in einer supramaximalen Konzentration von 100 μM normiert. Zuerst soll ein repräsentatives Experiment von Acetylcholin und solchen Liganden gezeigt werden, die nicht anhand einer Konzentrations-Effekt-Kurve an diesen Zellen charakterisiert wurden.

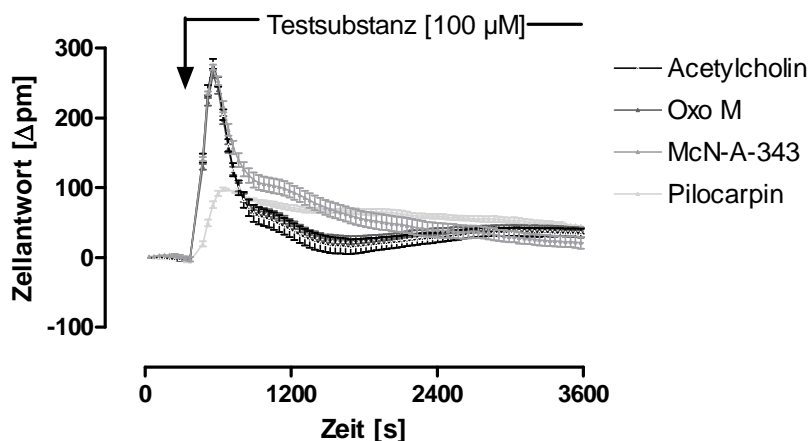


Abb. 98: Agonist-induzierte dynamische Massenumverteilung an Flp-InTM $hM_4^{435}Trp \rightarrow Ala-CHO$ -Zellen. *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Substanzzugabe an. Mittelwerte \pm Standardfehler eines repräsentativen Experimentes in Vierfachbestimmung, welches drei- bis elffach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert. Oxo M: Oxotremorin M.

Alle hier untersuchten Liganden führten wie Acetylcholin zu einer positiv gerichteten Wellenlängenverschiebung an $hM_4^{435}Trp \rightarrow Ala-CHO$ -Zellen. Es konnte zudem für jede Testsubstanz eine Signalspitze mit einem anschließenden Abfall des Signals detektiert werden. Es ist auffällig, dass lediglich Pilocarpin eine schwächere Wellenlängenverschiebung induziert als die anderen untersuchten Testsubstanzen. Im Folgenden sollten die Maxima quantifiziert werden.

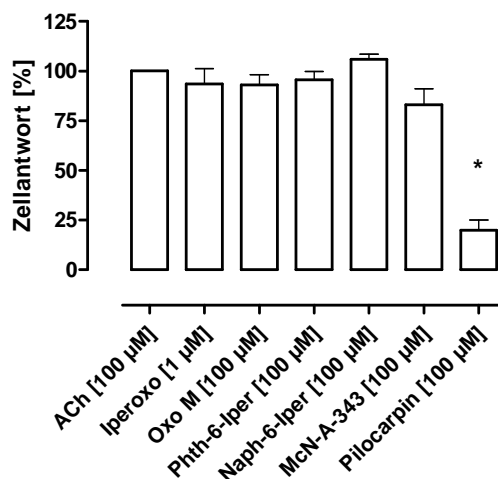


Abb. 99: Maximal induzierbare dynamische Massenumverteilung muskarinischer Liganden an Flp-InTMM₄⁴³⁵-Trp→Ala CHO-Zellen. Die Daten wurden Basislinien-korrigiert und auf die maximale Zellantwort von Acetylcholin [100 μM] der Flp-InTMM₄⁴³⁵-Trp→Ala-CHO-Zellen jedes Versuchstages normiert. * Signifikant verschieden von Acetylcholin [100 μM].

M ₄ ⁴³⁵ -Trp→Ala	E _{max} ± SEM [%]	n
Acetylcholin [100 μM]	100,0	12
Iperoxo [1 μM]	93,5 ± 7,8	4
Oxotremorin M [100 μM]	93,0 ± 5,0	5
Phth-6-lper [100 μM]	95,5 ± 4,2	7
Naph-6-lper [100 μM]	105,9 ± 2,6	5
McN-A-343 [100 μM]	82,9 ± 8,1	6
Pilocarpin [100 μM]	19,8 ± 5,1*	4

Tab. 72: Maximal-induzierbare, Basislinien-korrigierte dynamische Massenumverteilung muskarinischer Liganden an Flp-InTMhM₄⁴³⁵-Trp→Ala-CHO-Zellen. Die Normierung erfolgte auf die durch Acetylcholin [100 μM]-induzierte dynamische Massenumverteilung des jeweiligen Versuchstages. E_{max}: Maximale Zellantwort, Mittelwert ± Standardfehler (SEM) aus vier bis zwölf Einzelversuchen, die je in Drei- oder Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. n: Anzahl unabhängiger Experimente je Testsubstanz. * Signifikant verschieden von Acetylcholin [100 μM] (t-Test, p<0,05).

Alle hier untersuchten Agonisten bis auf die Testsubstanz Pilocarpin wiesen eine im Vergleich zu Acetylcholin nicht signifikant verschiedene, vollagonistische Rezeptoraktivierung auf. Pilocarpin wies an der M₄⁴³⁵-Trp→Ala-Rezeptormutante einen Partialagonismus auf, während es an hM₄-CHO-Zellen vollagonistisch wirkte (vergleiche 3.7.1.5.).

Ein Einfluss des Epitops Trp 7.35 auf die intrinsische Aktivität von Pilocarpin konnte auch durch Messung der G-Proteinaktivierung gefunden werden. In diesen Messungen ergab sich jedoch eine geringere Differenz von $\Delta E_{\max} = 27,4 \%$ (vergleiche 3.6.4.). McN-A-343 zeigte bei Messung der DMR eine leichte Absenkung der Aktivität, die jedoch nicht signifikant verschieden von der des Acetylcholins war. Bei der Messung der [35 S]GTP γ S-Bindung resultierte ebenfalls keine Reduktion des McN-A-3433-Maximums.

3.8.2. Einfluss erhöhter intrazellulärer cAMP-Spiegel (Forskolin) auf die Ligand-induzierte dynamische Massenumverteilung an hM $_4^{435}$ Trp \rightarrow Ala-CHO-Zellen

Ziel dieser Experimente war zu überprüfen, ob ein erhöhter intrazellulärer cAMP-Spiegel einen Einfluss auf die Maxima der untersuchten Testsubstanzen ausübt. Dazu wurden alle Substanzen in einer Konzentration von 100 μ M eingesetzt und die Agonist-induzierte, Rezeptor-vermittelte Wellenlängenverschiebung mit der durch Acetylcholin [100 μ M]-induzierten Wellenlängenverschiebung eines Versuchstages verglichen.

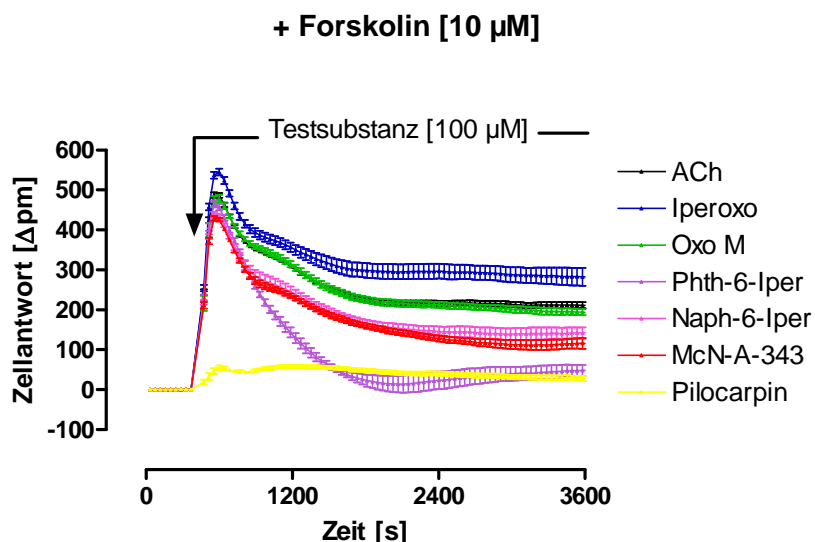


Abb. 100: Agonist-induzierte dynamische Massenumverteilung an Flp-InTMhM $_4^{435}$ Trp \rightarrow Ala-CHO-Zellen nach Forskolin-Vorstimulation. *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δ pm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Substanzzugabe an. Mittelwerte \pm Standardfehler eines repräsentativen Experimentes in Vierfachbestimmung, welches drei- bis elfmal mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert. ACh: Acetylcholin; Oxo M: Oxotremorin M.

Alle untersuchten Testsubstanzen zeigten einen für die Aktivierung G $\alpha_{i/o}$ -gekoppelter Rezeptoren typischen Signalverlauf. Es konnten deutlich höhere Wellenlängenverschiebungen detektiert werden als ohne Forskolin-Vorstimulation (vergleiche Abb. 98).

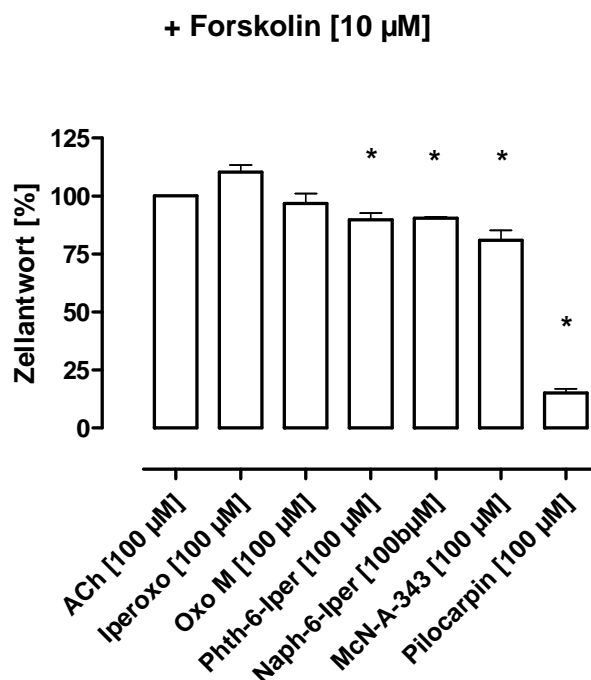


Abb. 101: Maximal induzierbare dynamische Massenumverteilung muskarinischer Liganden an Flp-InTMM₄⁴³⁵Trp→Ala-CHO-Zellen. Die Daten wurden Basislinien-korrigiert und auf die maximale Zellantwort von Acetylcholin [100 µM] der Flp-InTMM₄⁴³⁵Trp→Ala-CHO-Zellen jedes Versuchstages normiert. *: Signifikant verschieden von Acetylcholin [100 µM] (t-Test, p<0,05). ACh: Acetylcholin; Oxo M: Oxotremorin M.

M₄⁴³⁵Trp→Ala + Forskolin	E_{max} ± SEM [%]	n
Acetylcholin [100 µM]	100,0	12
Iperoxo [100 µM]	110,2 ± 3,2	3
Oxotremorin M [100 µM]	96,7 ± 4,3	4
Phth-6-Iper [100 µM]	89,7 ± 2,8*	4
Naph-6-Iper [100 µM]	90,5 ± 0,4*	3
McN-A-343 [100 µM]	80,9 ± 4,3*	5
Pilocarpin [100 µM]	15,1 ± 1,8*	4

Tab. 73: Maximal-induzierbare, Basislinien-korrigierte dynamische Massenumverteilung muskarinischer Liganden an Flp-InTMhM₄⁴³⁵Trp→Ala-CHO-Zellen nach Forskolin-Vorstimulation. Die Normierung erfolgte auf die durch Acetylcholin [100 µM]-induzierte dynamische Massenumverteilung des jeweiligen Versuchstages. E_{max}: Maximale Zellantwort, Mittelwert ± Standardfehler (SEM) aus drei bis zwölf Einzelversuchen, die je in Drei- oder Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. n: Anzahl unabhängiger Experimente je Testsubstanz. * signifikant verschieden von Acetylcholin [100 µM] (t-Test, p<0,05).

Nach Forskolin-Vorstimulation wiesen die Testsubstanzen Oxotremorin M sowie dessen Derivat Iperoxo noch eine volle intrinsische Aktivität auf. Die dualsterischen Hybridsubstanzen Phth-6-Iper sowie Naph-6-Iper zeigten ebenso wie die Testsubstanzen McN-A-343 und Pilocarpin einen partialagonistischen Effekt. An hM_4 -CHO-Zellen wiesen nur McN-A-343 und Pilocarpin nach Forskolin-Vorstimulation der Zellen einen Partialagonismus auf, während alle anderen Substanzen auch nach einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels vollagonistisch wirkten (siehe 3.7.2.2.).

3.8.3. Folgen einer $G\alpha_{i/o}$ -Protein-Inhibition (Pertussistoxin) auf die Ligand-induzierte dynamische Massenumverteilung an hM_4^{435} Trp→Ala-CHO-Zellen

Im Folgenden wurde erstmals der Einfluss einer Inhibition von $G\alpha_{i/o}$ -Proteinen auf die durch muskarinische Liganden induzierte DMR an hM_4^{435} Trp→Ala-CHO-Zellen ermittelt. Anhand dieser Daten sollte überprüft werden, ob das Epitop 7.35 einen Einfluss auf die Signalwegsaktivierung am M_4 -Rezeptor ausübt. Die intrinsischen Aktivitäten der Testsubstanzen wurden separat bestimmt und unter 3.8.3.3. näher erläutert.

3.8.3.1. Acetylcholin-induzierte dynamische Massenumverteilung an hM_4^{435} Trp→Ala-CHO-Zellen

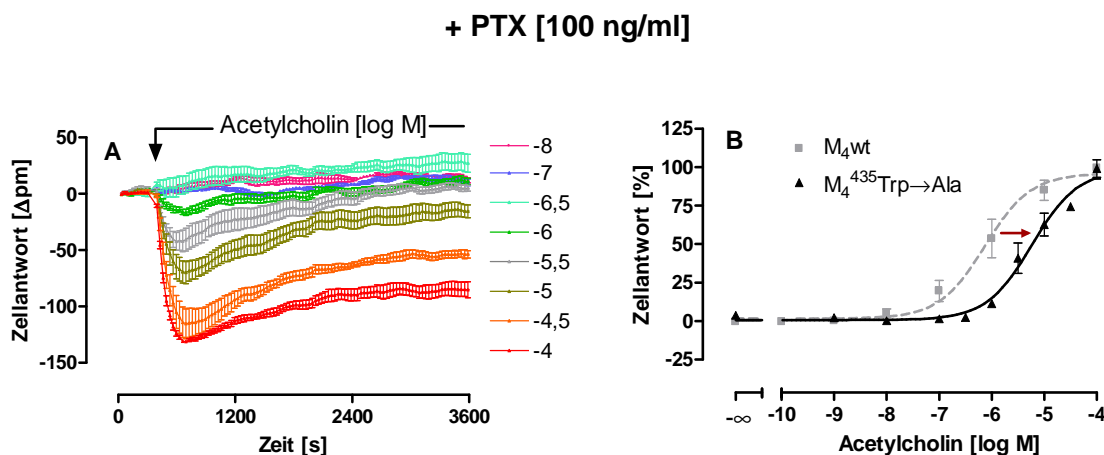


Abb. 102: **A:** Acetylcholin-induzierte dynamische Massenumverteilung an Flp-InTM hM_4^{435} Trp→Ala-CHO-Zellen nach PTX-Vorbehandlung. *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Aufgetragen sind die logarithmierten, molaren Konzentrationen von Acetylcholin sowie die durch die jeweilige Konzentration induzierte Zellantwort. Der Pfeil stellt den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Mittelwerte ± Standardfehler eines repräsentativen Experimentes, welches in Dreifachbestimmung erhoben und dreifach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert.

B: Vergleich der Acetylcholin-induzierten Konzentrations-Effekt-Kurven an Flp-InTMhM₄⁴³⁵Trp→Ala- und Wildtyp-CHO-Zellen nach PTX-Vorbehandlung. *Ordinate:* Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht dem unteren Plateau, 100 % dem oberen Plateau der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration. *Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler aus vier bis sechs voneinander unabhängigen Experimenten, die je als Drei- oder Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient $n_H = 1$.

Acetylcholin +PTX	pEC ₅₀	E _{min} [%]	E _{max} [%]	n _H (frei)	n
M ₄ ⁴³⁵ Trp→Ala	5,23 ± 0,09*	0,7 ± 2,1	98,1 ± 4,7	0,91 ± 0,12 n.s.	4
M ₄ wt	6,13 ± 0,11	1,7 ± 2,4	96,0 ± 4,3	0,63 ± 0,12 n.s.	6

Tab. 74: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Konzentrations-Effekt-Kurven von Acetylcholin nach PTX-Vorbehandlung. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration, die zu einer halbmaximalen Zellantwort führt. E_{min}: Minimale Zellantwort (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven), E_{max}: Maximale Zellantwort (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven). Die Kenngrößen beruhen auf den Mittelwertskurven aus Abb. 102. n_H(frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. n.s.: nicht signifikant verschieden von n_H=1 (F-Test, p>0,05). n: Anzahl unabhängiger Experimente, *: Signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße des Wildtyps (t-Test, p<0,05).

Nach Ausschaltung der Gα_{i/o}-Proteine durch Vorinkubation der Zellen mit Pertussistoxin resultierte für den endogenen, muskarinischen Agonisten Acetylcholin ein negativ-gerichtetes, konzentrationsabhängiges Signal, wie es für die Aktivierung von G_s-gekoppelten Rezeptoren in CHO-Zellen charakteristisch ist (siehe 3.1.3. und 3.2.). Es resultierte eine signifikant schwächere Wirksamkeit an punktmutierten hM₄⁴³⁵Trp→Ala-CHO-Zellen verglichen mit dem Wildtyp ($\Delta pEC_{50} = 0,9$ Dekaden; t-Test, p<0,05).

3.8.3.2. Iperoxo-induzierte dynamische Massenumverteilung an hM₄⁴³⁵Trp→Ala-CHO-Zellen

Im nachfolgenden Abschnitt wird die Wirksamkeit von Iperoxo an hM₄⁴³⁵Trp→Ala-CHO-Zellen bestimmt, um die Auswirkungen der Punktmutation auf die Wirksamkeit von Iperoxo unter PTX-Vorinkubation näher zu untersuchen. Die intrinsische Aktivität wird in Kapitel 3.8.3.3. näher erläutert.

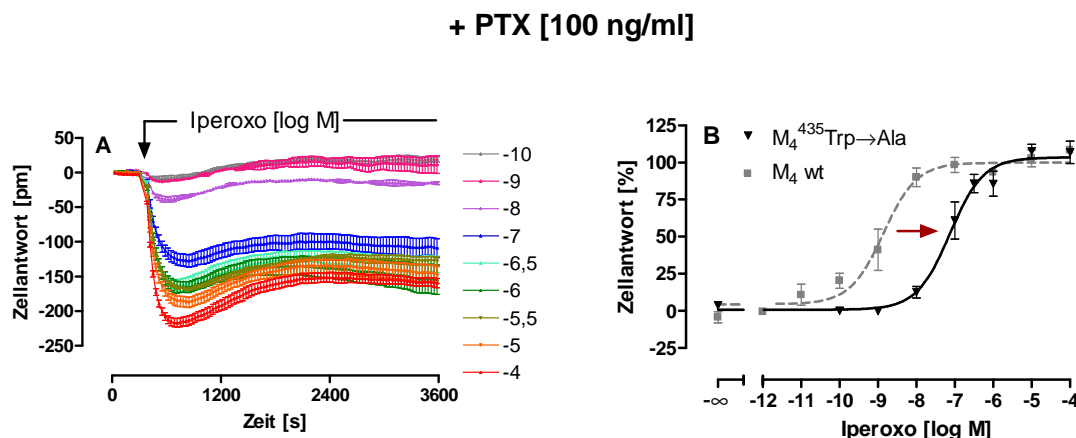


Abb. 103: **A:** Iperoxo-induzierte dynamische Massenumverteilung an Flp-InTM hM₄⁴³⁵Trp→Ala-CHO-Zellen nach PTX-Vorbehandlung. *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Mittelwerte ± Standardfehler eines repräsentativen Experimentes, welches in Dreifachbestimmung erhoben und zweifach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert. **B:** Vergleich der Iperoxo-induzierten Konzentrations-Effekt-Kurven an Flp-InTM hM₄⁴³⁵Trp→Ala- und Wildtyp-CHO-Zellen nach PTX-Vorbehandlung. *Ordinate:* Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht dem unteren Plateau, 100 % dem oberen Plateau der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration. *Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler aus drei bis vier voneinander unabhängigen Experimenten, die je als Drei- oder Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient n_H = 1.

Iperoxo +PTX	pEC ₅₀	E _{min} [%]	E _{max} [%]	n _H (frei)	n
M ₄ ⁴³⁵ Trp→Ala	7,19 ± 0,12*	0,5 ± 3,5	98,8 ± 3,5	0,93 ± 0,21 n.s.	3
M ₄ wt	8,90 ± 0,11	1,1 ± 1,3	99,8 ± 3,1	0,83 ± 0,19 n.s.	3

Tab. 75: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Konzentrations-Effekt-Kurven von Iperoxo nach PTX-Vorbehandlung. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration, die zu einer halbmaximalen Zellantwort führt. E_{min}: Minimale Zellantwort (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven), E_{max}: Maximale Zellantwort (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven). Die Kenngrößen beruhen auf den Mittelwertskurven aus Abb. 103. n_H(frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. n.s.: nicht signifikant verschieden von n_H=1 (F-Test, p>0,05). n: Anzahl unabhängiger Experimente, *: Signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße des Wildtyps (t-Test, p<0,05).

Eine Vorinkubation der stabil transfizierten CHO-Zellen mit Pertussistoxin führte zu einer negativ-gerichteten Zellantwort sowie einer signifikant geringeren Aktivität am mutierten

M₄-Rezeptor verglichen mit dem Wildtyp (1,71 Dekaden, t-Test, p<0,05). Somit zeigte neben Acetylcholin auch die Testsubstanz Iperoxo eine geringere Wirksamkeit unter PTX-Vorinkubation.

3.8.3.3. Maximal-induzierbare dynamische Massenumverteilung muskarinischer Liganden nach G $\alpha_{i/o}$ -Protein-Inhibition (Pertussistoxin) an hM₄⁴³⁵Trp \rightarrow Ala-CHO-Zellen

Im Folgenden soll überprüft werden, ob eine Signalwegsaktivierung strukturverschiedener muskarinischer Liganden nach Ausschaltung der G $\alpha_{i/o}$ -Proteine möglich ist. Dazu wurde eine noch spezifisch über den Rezeptor agierende Ligandkonzentration von 100 μ M eingesetzt. Es soll zuerst ein repräsentatives Experiment solcher Liganden gezeigt werden, die unter PTX-Vorinkubation noch nicht in einem vorangegangenen Kapitel gezeigt wurden.

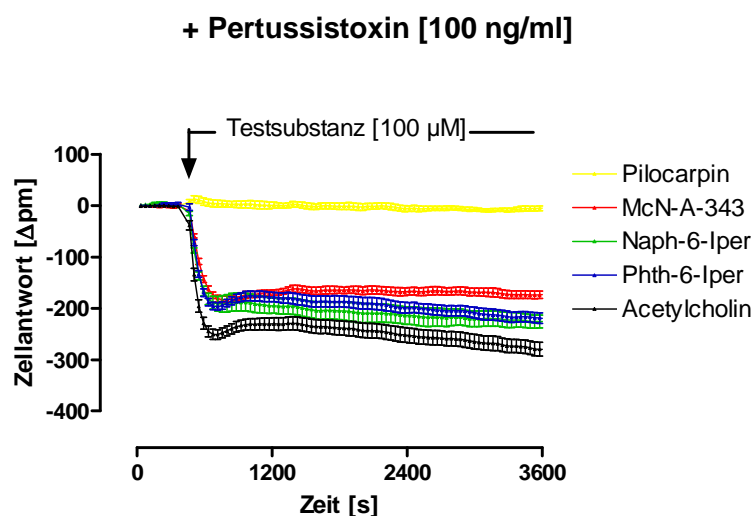


Abb. 104: Agonist-induzierte dynamische Massenumverteilung an Flp-InTMhM₄⁴³⁵Trp \rightarrow Ala-CHO-Zellen nach PTX-Vorinkubation. *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δ pm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Substanzzugabe an. Mittelwerte \pm Standardfehler eines repräsentativen Experimentes in Vierfachbestimmung, welches drei- bis elffach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert.

Alle hier eingesetzten muskarinischen Liganden bis auf die Testsubstanz Pilocarpin waren in der Lage eine messbare dynamische Massenumverteilung zu induzieren. Der Signalverlauf der Testsubstanzen unterschied sich nicht von dem Signalverlauf von Acetylcholin.

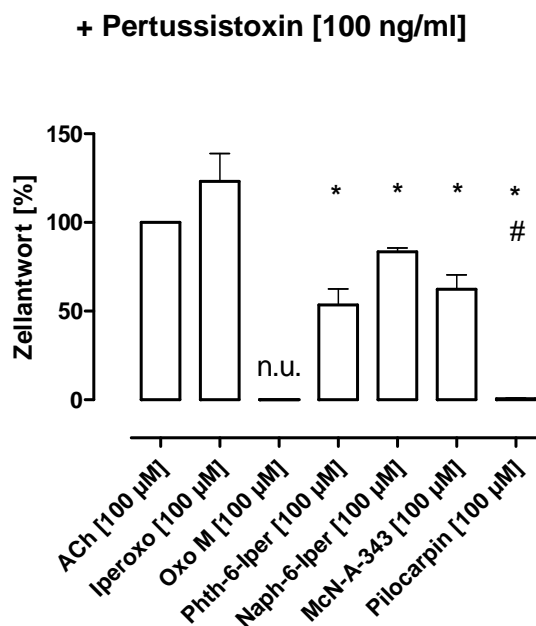


Abb. 105: Maximal induzierbare dynamische Massenumverteilung muskarinischer Liganden an Flp-InTMM₄⁴³⁵Trp→Ala-CHO-Zellen nach PTX-Vorinkubation. Die Daten wurden Basislinien-korrigiert und auf die minimale Zellantwort von Acetylcholin [100 µM] der Flp-InTMM₄⁴³⁵Trp→Ala-CHO-Zellen jedes Versuchstages normiert. *: Signifikant verschieden von Acetylcholin [100 µM] (t-Test, p<0,05), #: nicht signifikant verschieden von 0 (t-Test, p<0,05), n.u.: nicht untersucht.

M ₄ ⁴³⁵ Trp→Ala + PTX	E _{max} ± SEM [%]	n
Acetylcholin [100 µM]	100,0	12
Iperoxo [100 µM]	123,2 ± 15,6	3
Oxotremorin M [100 µM]	nicht untersucht	-
Phth-6-lper [100 µM]	53,7 ± 9,0*	5
Naph-6-lper [100 µM]	83,5 ± 2,3*	4
McN-A-343 [100 µM]	62,3 ± 8,2*	4
Pilocarpin [100 µM]	0,6 ± 0,4*#	4

Tab. 76: Maximal-induzierbare, Basislinien-korrigierte dynamische Massenumverteilung muskarinischer Liganden an Flp-InTMhM₄⁴³⁵Trp→Ala-CHO-Zellen nach PTX-Vorinkubation. Die Normierung erfolgte auf die durch Acetylcholin [100 µM]-induzierte dynamische Massenumverteilung des jeweiligen Versuchstages. E_{max}: Maximale Zellantwort, Mittelwert ± Standardfehler (SEM) aus drei bis zwölf Einzelversuchen, die je in Drei- oder Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. n: Anzahl unabhängiger Experimente je Testsubstanz. *: Signifikant verschieden von Acetylcholin [100 µM] (t-Test, p<0,05). #: nicht signifikant verschieden von 0 (t-Test, p>0,05).

Nach Ausschaltung der Gα_{i/o}-Proteine mit Pertussistoxin zeigte lediglich Iperoxo einen Vollagonismus. Die dualsterischen Substanzen Phth-6-lper und Naph-6-lper sowie die

Testsubstanz McN-A-343 wiesen nur noch einen Partialagonismus auf. Pilocarpin war am punktmultierten M_4 -Rezeptor nicht mehr in der Lage eine G_s -Aktivierung auszuüben. Es ist möglich, dass Pilocarpin in einer submaximalen Konzentration eingesetzt wurde, da Mistry et al. (2005) für den M_4 -Wildtyp nach PTX-Vorinkubation der Zellen durch Messung intrazellulärer cAMP-Spiegel einen pEC_{50} -Wert von $3,96 \pm 0,10$ für Pilocarpin fanden und somit eine Konzentration von $100 \mu\text{M}$ nicht im Maximum der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve liegt. Höhere Pilocarpin-Konzentrationen konnten aufgrund von Rezeptor-unabhängigen Signalen nicht eingesetzt werden. (siehe 8.2.1.).

4. Diskussion

Aus dem vorangegangenen Ergebnisteil dieser Arbeit lassen sich folgende Kernbefunde ableiten:

1. In CHO-Zellen konnte erstmals systematisch die Signalwegsaktivierung unterschiedlich gekoppelter 7-transmembranärer Rezeptoren durch Messung der zellulären dynamischen Massenumverteilung (DMR) untersucht werden. Durch den gezielten Einsatz von Signalwegsaktivatoren und -Inhibitoren konnte für je einen $G_{i/o}$ -, G_s - und $G_{q/11}$ -gekoppelten Rezeptor gezeigt werden, dass die Messsignale eindeutig dem präferenziellen Signaltransduktionsweg des untersuchten Rezeptors zugeordnet werden können. Somit ist es möglich, in CHO-Zellen alle drei Hauptsignaltransduktionswege mit Hilfe des Sonden-freien Messsystems Epic[®] in Echtzeit zu detektieren.
2. Aufgrund eines sich über die Messdauer hinweg verändernden Epic[®]-Signales wurden unterschiedliche Messzeitpunkte je eines präferenziell $G_{i/o}$ -, G_s - und $G_{q/11}$ -gekoppelten Rezeptors im Hinblick auf die Wirksamkeit von Liganden untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Messzeitpunkt keinen Einfluss auf die Parameterwerte der Testsubstanzen ausübt.
3. Durch den gezielten Einsatz von Aktivatoren und Inhibitoren des G_s -Signaltransduktionsweges konnte gezeigt werden, dass der optische Biosensor Epic[®] in CHO-Zellen eine Aktivierung der Proteinkinase A, nicht aber des Epac-Proteins zu detektieren vermag. Eine Toxin- oder Rezeptorinternalisierung konnte hingegen nicht gemessen werden.
4. Für den muskarinischen M_3 -Acetylcholinrezeptor wurde, mit Hilfe der Messung von dynamischer Massenumverteilung, erstmals eine von erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegeln-abhängige $G_{i/o}$ -Aktivierung gefunden.
5. Es konnte gezeigt werden, dass die Hybridverbindungen Phth-6-Iper und Naph-6-Iper dualsterisch an den M_4 -Rezeptor binden, wie es für den M_2 -Rezeptor bereits publiziert ist (Antony et al., 2009). Trotz der gleichen Rezeptorbindung waren die Hybridverbindungen nur am M_4 -Rezeptorsubtyp in der Lage, eine Rezeptor-vermittelte G_s -Kopplung zu induzieren.
7. Durch gezielte Mutagenese des Epitops Trp 7.35 zu Alanin konnte gezeigt werden, dass das konservierte Epitop Trp 7.35 am aktiven M_4 -Rezeptor für die Wirksamkeit von orthosterischen Vollagonisten und dualsterischen Agonisten sowie für die intrinsische Aktivität des Partialagonisten Pilocarpin mitverantwortlich ist.

4.1. Zelluläre dynamische Massenumverteilung (DMR) zur Sonden-freien Signalwegsidentifizierung

Ein erheblicher Anteil dieser Arbeit bestand in der Analyse der dynamischen Massenumverteilung, die mit Hilfe des erst 2006 eingeführten optischen Biosensors Epic[®] (Corning, NY) gemessen wurde. Dies geschah in CHO-Zellen durch Verwendung unterschiedlich gekoppelter 7-transmembranärer Rezeptoren und strukturverschiedener Liganden. Dazu wurde der präferenziell $G_{\alpha_{i/o}}$ -gekoppelte muskarinische M_2 -Rezeptor, der G_{α_s} -gekoppelte β_2 -Adrenozeptor sowie der muskarinische M_3 -Rezeptorsubtyp, welcher eine präferenzielle $G_{\alpha_{q/11}}$ -Kopplung induziert, gewählt.

4.1.1. Identifikation der Hauptsignaltransduktionswege durch Messung zellulärer dynamischer Massenumverteilung in CHO-Zellen

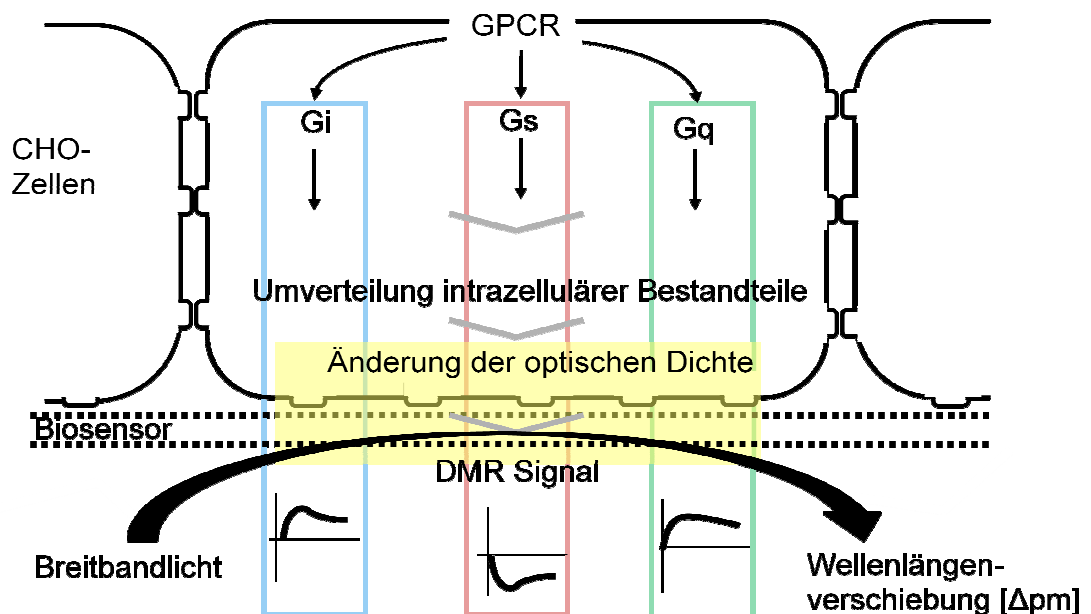


Abb. 106: Zusammenhang zwischen der G-Protein-Kopplung und dem resultierenden Epic[®]-Signal in CHO-Zellen. Schematische Darstellung modifiziert nach Schröder et al. (2010). GPCR: G-Protein gekoppelter Rezeptor; DMR: Dynamische Massenumverteilung, Δpm : Differenz der Wellenlängen in Picometern. Erläuterungen siehe Text.

An G_{α_s} -Protein gekoppelten $h\beta_2$ -CHO-Zellen führte die Rezeptoraktivierung zu einer negativ-gerichteten Wellenlängenverschiebung (siehe Abb. 106). Durch den gezielten Einsatz von Aktivatoren des G_s -Signaltransduktionsweges konnte das $h\beta_2$ -Rezeptor-vermittelte Signal komplett unterbunden werden (siehe 3.2.2.), was folgern lässt, dass es sich tatsächlich um ein Signal handelt, welches über die Aktivierung stimulatorischer G-Proteine verläuft. Dem entgegengesetzt konnten Tran & Fang (2008) nach Aktivierung

des adrenergen β_2 -Rezeptors in HEK293-Zellen eine positiv-gerichtete Wellenlängenverschiebung detektieren. In HEK293-Zellen führte auch eine Aktivierung der G_s -gekoppelten EP2/4-Rezeptoren zu einer positiv-gerichteten Wellenlängenverschiebung (Schröder et al., 2010). Somit kann die Aktivierung desselben Rezeptors je nach zellulärem Kontext eine unterschiedliche Signalausrichtung bewirken. In vorliegender Arbeit konnte eine alternative G-Proteinkopplung des adrenergen β_2 -Rezeptors nach Maskierung des G_s -Signalweges nicht gemessen werden (siehe 3.2.2.), obwohl sowohl eine $G_{\alpha_{i/o}}$ - als auch eine $G_{\alpha_{q/11}}$ -Kopplung für diesen Rezeptor publiziert ist ($G_{\alpha_{i/o}}$ -Kopplung: Asano et al., 1984; Daaka et al., 1997/ $G_{\alpha_{q/11}}$ -Kopplung: Zhu et al., 1994). Wie von Lefkowitz et al. (2002) gezeigt, muss eine alternative Kopplung jedoch nicht unter jeden Messbedingungen und für jeden Zellklon zutreffen.

An hM₂-CHO-Zellen ergab sich ein Agonist-induziertes, positiv gerichtetes Signal, das anschließend wieder abfiel (siehe Abb. 106). Einen gleichartigen Signalverlauf nach Aktivierung $G_{\alpha_{i/o}}$ -gekoppelter Rezeptoren konnte auch an den in dieser Arbeit untersuchten hM₄-CHO-Zellen (siehe 3.7.) sowie bei Lee et al. (2008) für den dopaminergen D₃-Rezeptor gefunden werden. In HEK293-Zellen zeigten Schröder et al. (2010) für den präferenziell G_{α_i} -gekoppelten CRTH2-Rezeptor ebenfalls einen solchen Signalverlauf.

Durch den Einsatz von Pertussistoxin konnte das Phth-6-Iper-induzierte M₂-Rezeptor-vermittelte Signal komplett unterbunden werden, wie es bereits bei Antony et al. (2009) publiziert ist. Dies lässt folgern, dass es sich tatsächlich um ein $G_{\alpha_{i/o}}$ -vermitteltes Signal handeln musste, da Pertussistoxin ausschließlich $G_{\alpha_{i/o}}$ -Proteine inhibiert.

Andere Agonisten führten an hM₂-CHO-Zellen nach Inhibition des $G_{\alpha_{i/o}}$ -Signaltransduktionsweges zu einem negativ-gerichteten Signal (siehe 3.1.3.), wie es nach Aktivierung des G_s -gekoppelten β_2 -Adrenozeptors in CHO-Zellen gefunden wurde (siehe Abb. 106). Dieses negativ-gerichtete Signal war eindeutig einer Aktivierung muskarinischer Acetylcholinrezeptoren zuzuschreiben, da es mit dem inversen Agonisten Atropin antagonisiert werden konnte (siehe 8.3.). Zudem konnte es eindeutig auf eine hM₂-Rezeptor-vermittelte Aktivierung stimulatorischer G-Proteine zurückgeführt werden, da es nach einer Vorstimulation des G_{α_s} -Signalweges komplett maskiert wurde (siehe 8.3.).

Es konnte keine Phth-6-Iper-induzierte hM₂-Rezeptor-vermittelte $G_{\alpha_{q/11}}$ -Aktivierung des muskarinischen M₂-Rezeptors nach Vorinkubation mit YM 254890 (siehe 3.1.4.) detektiert werden. Um auszuschließen, dass das Ausbleiben einer M₂-Rezeptor-anhängigen $G_{\alpha_{q/11}}$ -Aktivierung Ligand-spezifisch war, wurde zusätzlich eine Acetylcholin-

induzierte $G\alpha_{q/11}$ -Aktivierung untersucht. Da für diese Experimente nicht auf den $G\alpha_{q/11}$ -Inhibitor YM 254890 zurückgegriffen werden konnte, wurde eine kombinierte Vorinkubation der hM_2 -CHO-Zellen mit PTX und CTX vorgenommen. Nach Ausschaltung des $G\alpha_{i/o}$ -Signalweges und Maskierung des $G\alpha_s$ -Signalweges konnte keine weitere dynamische Massenumverteilung mehr gemessen werden (siehe 8.3.), was folgern lässt, dass auch Acetylcholin an hM_2 -CHO-zellen nicht in der Lage ist, eine $G\alpha_{q/11}$ -Kopplung zu initiieren. Es ist jedoch nicht sicher, ob der hier eingesetzte M_2 -Rezeptor-Zellklon tatsächlich eine $G\alpha_{q/11}$ -Kopplung eingeht, da alternative Kopplungen Zellklon-abhängig sein können (Lefkowitz et al., 2002).

Am präferenziell $G\alpha_{q/11}$ -gekoppelten M_3 -CHO-Zellen ergab sich eine durch strukturverschiedene Agonisten-induzierte, positiv-gerichtete Wellenlängenverschiebung mit einer Plateaubildung nach ungefähr 1 h Messdauer (siehe Abb. 106). Das Signal unterschied sich trotz gleicher Signalrichtung deutlich von dem des zuvor untersuchten $G\alpha_{i/o}$ -gekoppelten M_2 -Rezeptors, da keine Signalspitze kurz nach Substanzzugabe resultierte. Von Dodgson et al. (2009) konnte ein gleichartiger Signalverlauf eines Agonist-induzierten M_3 -Rezeptor-vermittelten Epic[®]-Signales publiziert werden. Mit dem $G\alpha_{q/11}$ -Inhibitor YM 254890 konnte in der vorliegenden Arbeit das Acetylcholin-induzierte hM_3 -Rezeptor-vermittelte Signal komplett unterbunden werden, so dass gefolgert werden kann, dass dieser Signalweg ebenfalls durch Detektion von dynamischer Massenumverteilung messbar ist. (Zur weiteren Betrachtung der Kopplungseigenschaften des M_3 -Rezeptors siehe 4.2.).

Somit konnte die Rezeptor-vermittelte dynamische Massenumverteilung mit Hilfe von Signalwegsinhibitoren (PTX, YM 254890) oder Aktivatoren (CTX, Forskolin) auf die präferenzielle G-Protein-Kopplung des jeweiligen Rezeptors zurückgeführt werden. Es ließen sich alle klassischen Signaltransduktionswege mit dem Epic[®]-Biosensor messen. Für einen anderen zellulären Kontext (GPR55 in HEK293-Zellen) wurde über diese Arbeit hinaus auch eine Aktivierung des $G\alpha_{12/13}$ -Signalweges mittels dynamischer Massenumverteilung detektiert (Schröder et al., 2010). Die Fähigkeit, dass alle vier G-Protein-induzierbaren Hauptsignaltransduktionswege mit einer Methode erfasst werden können, bietet kaum eine andere Methode, zumal für die Detektion des $G\alpha_{12/13}$ -Signaltransduktionsweges kein klassischer sekundärer Botenstoff bekannt ist (Schröder et al., 2010), der quantifiziert werden könnte.

4.1.2. Erhebung von Agonist-Konzentrations-Effekt-Kurven auf Basis dynamischer Massenumverteilung (DMR)

Wie aus Abb. 106 ersichtlich wird, resultiert bei der Messung von zellulärer dynamischer Massenumverteilung ein sich über die Messdauer hinweg veränderndes Signal. Da unklar war, ob die Auswertung verschiedener Messzeitpunkte zu unterschiedlichen Wirksamkeiten der Testsubstanzen führt, wurden systematisch verschiedene Messzeitpunkte (1200 s, 2400 s, 3600 s) sowie unterschiedliche Signalcharakteristika (Maximum bis 1700 s, AUC: „area under the curve“, Steigung) zur Erhebung von Konzentrations-Effekt-Kurven miteinander verglichen.

An $h\beta_2$ -CHO-Zellen wurden für den Agonisten Orciprenalin und an hM_2 -CHO-Zellen für den endogenen muskarinischen Agonisten Acetylcholin sowie die dualsterische Hybridverbindung Phth-6-Iper die DMR-Signale zu unterschiedlichen Messzeitpunkten analysiert. Es zeigte sich keine Abhängigkeit der jeweiligen Konzentrations-Effekt-Kurve vom Messzeitpunkt. Gleiches gilt für die Acetylcholin-induzierte DMR an hM_3 -CHO-Zellen. Alle Analysemethoden an hM_3 -CHO-Zellen führten zu flachen Kurvensteilheiten mit Hill-Koeffizienten von $n_H < 1$. Von K. Kellershohn (Dissertationsschrift 2007) konnte für Acetylcholin an Membransuspensionen aus hM_3 -CHO-Zellen durch Messung der [35 S]GTP γ S-Bindung ebenfalls eine flache Kurvensteilheit mit $n_H < 1$ festgestellt werden. Demnach ist ein Hill-Koeffizient von $n_H < 1$ der M_3 -Rezeptor-vermittelten Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurven kein charakteristisches Merkmal der Messung von dynamischer Massenumverteilung.

Somit hatte, trotz des sich über die Messdauer hinweg verändernden Epic[®]-Signales, weder die Wahl des Messzeitpunktes noch die Untersuchung eines anderen Signalcharakteristikums einen Einfluss auf die Wirksamkeit und Kurvensteilheit der Testsubstanzen der hier untersuchten Rezeptoren. Wie bei Schröder et al. (zur Publikation angenommen) diskutiert, darf dies jedoch nicht für jeden Liganden und für jeden $G\alpha_{i/o}$ -, $G\alpha_s$ - und $G\alpha_{q/11}$ -gekoppelten Rezeptor pauschalisiert werden. Es empfiehlt sich dies vor der Interpretation der Daten zu prüfen. Kinetische Unterschiede einer Testsubstanz oder zusätzliche Kopplungen an andere Signalwege könnten je nach Auswertungsmethode in unterschiedlichen Wirksamkeiten resultieren.

4.1.3. Vergleich von Agonist-Wirksamkeiten zwischen DMR-Messungen und klassischen Messmethoden

Um einen Eindruck von den mittels DMR-Technologie erhobenen Agonist-Wirksamkeiten unterschiedlich gekoppelter 7-transmembranärer Rezeptoren zu erhalten, wurde ein Vergleich mit klassischen Messmethoden vorgenommen.

An $h\beta_2$ -CHO-Zellen wurde für Orciprenalin mit dem Epic[®]-Biosensor eine signifikant höhere Wirksamkeit gemessen als durch Quantifizierung des intrazellulären cAMP-Spiegels an den gleichen Zellen gefunden wurde ($\Delta pEC_{50} = 1,0$ Dekaden; Schröder et al., 2010). Scott und Peters (2010) fanden für Dopamin am ebenfalls präferenziell $G\alpha_s$ -gekoppelten D_5 -Rezeptor eine um 2,4 Dekaden höhere Wirksamkeit durch Ganzzell-Impedanzmessung verglichen mit der Detektion intrazellulärer cAMP-Spiegel. Vergleiche zwischen der Ganzzell-Impedanzmessung und der Messung von DMR zeigten hingegen keine signifikanten Unterschiede (Peters et al., 2007). Eine mögliche Ursache höherer Wirksamkeiten $G\alpha_s$ -gekoppelter Rezeptoren könnte die zu Grunde liegende Amplifikation von Signalen sein, die bei der Ganzzellmessung, nicht jedoch bei der Detektion sekundärer Botenstoffe (z.B. cAMP) einen Einfluss auf die Wirksamkeit ausübt (Scott & Peters, 2010). Darüberhinaus könnte in DMR-Ganzzellmessungen bereits ein kleiner Anteil der Rezeptoren ausreichen, um eine maximale Wellenlängenverschiebung zu induzieren.

An präferenziell $G\alpha_{i/o}$ -gekoppelten hM_4 -CHO-Zellen zeigte Acetylcholin in dieser Arbeit eine gegenüber der [³⁵S]GTP γ S-Bindung signifikant erhöhte Wirksamkeit ($\Delta pEC_{50} = 1,1$). Während bei Scott und Peters (2010) die Acetylcholin-Wirksamkeit der [³⁵S]GTP γ S-Bindungsmessung gut mit der in dieser Arbeit erhaltenen Acetylcholin-Wirksamkeit der [³⁵S]GTP γ S-Bindungsmessung übereinstimmte ($pEC_{50} = 6,58 \pm 0,07$ vs. 6,42, ohne Streuungsangabe), passte der pEC_{50} -Wert der Ganzzell-Impedanzmessung ($pEC_{50} = 7,82$, ohne Streuungsangabe) gut zu dem pEC_{50} -Wert der DMR-Messung ($pEC_{50} = 7,68 \pm 0,13$). Somit ergab sich auch in ihren Experimenten eine Differenz von 1,4 Dekaden zwischen diesen Messmethoden. Scott & Peters (2010) fanden auch für weitere präferenziell $G\alpha_{i/o}$ -gekoppelte Rezeptoren eine höhere Wirksamkeit im Ganzzell-verglichen mit [³⁵S]GTP γ S-Bindungsexperimenten.

Am präferenziell $G\alpha_{q/11}$ -gekoppelten M_3 -Rezeptor zeigte Acetylcholin bei der DMR-Messung und der Quantifizierung intrazellulärer Inositolmonophosphat Spiegel (IP1) übereinstimmende Wirksamkeiten (siehe 3.3.1.2.). Scott und Peters (2010) konnten für $G\alpha_{q/11}$ -gekoppelte Rezeptoren bei dem Vergleich von Impedanz-Ganzzellmessungen mit

der Quantifizierung intrazellulärer Calcium-Ionen lediglich geringe Diskrepanzen feststellen.

Somit scheinen Agonist-Wirksamkeiten zwischen zwei Ganzzellmessungen gut übereinzustimmen, wohingegen Diskrepanzen zwischen einer (DMR-)Ganzzellmessung und klassischen Messmethoden auftreten können. Dies mag darauf zurückzuführen sein, dass bei der Quantifizierung intrazellulärer sekundärer Botenstoffe auf einer völlig anderen Ebene der Zellfunktion gemessen wird und teils durch Zusatz von Inhibitoren der Degradation des Botenstoffes (z.B. IBMX für cAMP-Messungen oder Li⁺ für IP1-Messungen) unterschiedliche Ausgangsbedingungen geschaffen werden. Die Verwendung von Membransuspensionen, wie sie für die Detektion der [³⁵S]GTPγS-Bindung notwendig sind, beinhaltet sogar ein noch artifizielles Messsystem. Eine unterschiedliche Rezeptorreserve könnte ebenfalls zu Unterschieden zwischen der Agonist-Wirksamkeit zweier Messmethoden führen. Aufgrund dieser Unterschiede, verwundern Diskrepanzen zwischen verschiedenen Messmethoden nicht.

4.2. Einfluss erhöhter intrazellulärer cAMP-Spiegel auf die G-Protein-Kopplung des M₃-Acetylcholinrezeptors

Wie bereits unter 4.1. erläutert, konnte mit Hilfe des Gα_{q/11}-Inhibitors YM 254890 das komplette Acetylcholin [1 μM]-induzierte Signal an hM₃-CHO-Zellen aufgehoben werden, woraus gefolgert werden konnte, dass der Rezeptor unter diesen Umständen keine weiteren Gα_s- oder Gα_{i/o}-Proteine aktivierte. Die Verwendung des Gα_{i/o}-Inhibitors Pertussistoxin führte ebenfalls nicht zu einem veränderten Signalverlauf, was untermauert, dass unter den gewählten Messbedingungen keine Gα_{i/o}-Kopplung des M₃-Rezeptors vorlag, obwohl dies in früheren Arbeiten publiziert ist (Dai et al., 1991).

Dem entgegengesetzt führte die Erhöhung intrazellulärer cAMP-Spiegel überraschenderweise zu einer stärkeren positiv-gerichteten Wellenlängenverschiebung als unter Ausgangsbedingungen gemessen werden konnte. Von McGraw et al. (2003) wurde eine verstärkte M₃-Rezeptor-vermittelte Gα_q-Aktivierung unter erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegeln postuliert, die im Folgenden überprüft wurde.

Nach Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels mit Cholera toxin zeigte die zusätzliche Vorinkubation der Zellen mit Pertussistoxin jedoch erstmalig eine PTX-Sensitivität. Dabei war es gleichgültig, ob die cAMP-Erhöhung durch Aktivierung des G-Proteins oder durch direkte Stimulation der Adenylylcyclase erfolgte (siehe Abb. 107).

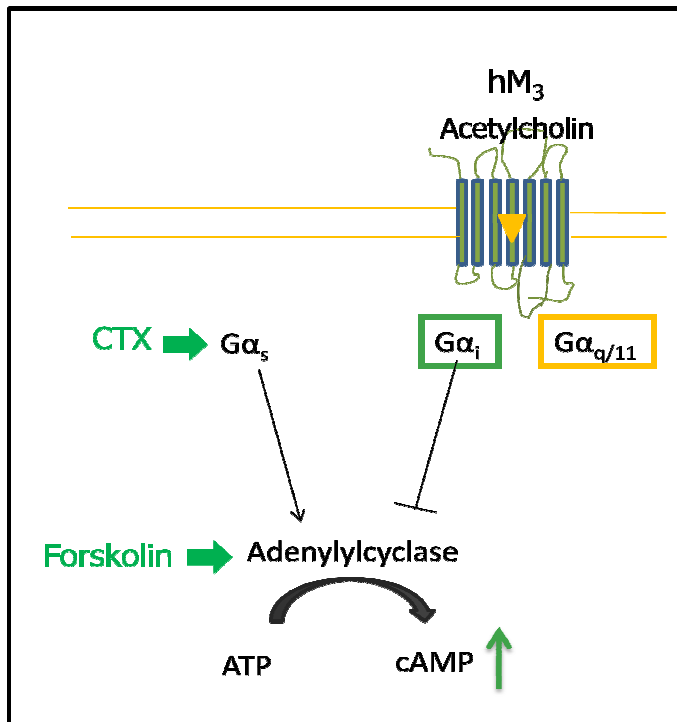


Abb. 107: Schematische Darstellung der präferenziellen G-Proteinkopplung (gelbe Umrandung) und der unter erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegeln angesprochenen alternativen Kopplung (grüne Umrandung) des muskarinischen M₃-Rezeptorsubtyps. Gelbes Dreieck: Muskarinischer Agonist. CTX: Choleratoxin, ATP: Adenosintriphosphat, cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat. Erläuterungen siehe Text.

Untermauert wurden diese Daten durch Experimente, die in Kooperation mit Dr. N. J. Smith (Arbeitskreis Prof. Dr. G. Milligan, Universität Glasgow, UK jetzt Victor Chang Cardiac Research Institute, Sydney, Australien) erhoben wurden. An Membransuspensionen der gleichen Zellen konnte durch Immunopräzipitation ebenfalls eine verstärkte Gα_i-Aktivierung nach Choleratoxin-Vorstimulation gemessen werden (Schröder et al., 2010). Somit erfolgte die Gα_i-Aktivierung des M₃-Rezeptors unabhängig von der zu Grunde liegenden Methode.

Aus diesen Beobachtungen konnte erstmals gefolgert werden, dass der muskarinische M₃-Rezeptor unter erhöhten cAMP-Spiegeln an Gα_i-Proteine koppelt. Die Tatsache, dass eine Gα_i-Kopplung dem unter diesen Bedingungen vorliegendem, erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegel entgegensteuert, zeigte erstmals, dass der Rezeptor auf ein verändertes, intrazelluläres Milieu kompensatorisch „reagiert“, was die Plastizität der Zellantwort verdeutlicht.

Es wäre interessant, durch weitere Experimente auszutesten, ob nicht nur Acetylcholin, sondern auch andere Agonisten, wie beispielsweise dualsterische Hybridverbindungen, ebenfalls in der Lage sind, eine Gα_{i/o}-Aktivierung des M₃-Acetylcholinrezeptors zu induzieren.

Auf glatter Bronchialmuskulatur sind der muskarinische M_3 - und der adrenerge β_2 -Rezeptor miteinander vergesellschaftet. Eine Aktivierung des β_2 -Adrenozeptors resultiert in einer Stimulation des $G\alpha_s$ -Signaltransduktionsweges mit einem Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels, was zu einer Bronchodilatation führt. Aus obigen Befunden könnte abgeleitet werden, dass es bei einer lang anhaltenden Bronchodilatation und somit erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegeln, zu einer über den muskarinischen M_3 -Rezeptor verursachten Gegenregulation kommen kann. Durch alternative Kopplung des M_3 -Rezeptors an inhibitorische $G\alpha_i$ -Proteine würde es zu einer Inhibition der Adenylylcyclase und in Folge dessen zu einem Absinken des intrazellulären cAMP-Spiegels kommen, was eine Bronchokonstriktion bedeuten könnte.

Dem könnte durch Inhibition des M_3 -Rezeptors über selektive muskarinische Antagonisten entgegengewirkt werden. Von Vorteil wäre darüberhinaus ein signalwegeselektiver Antagonist, der lediglich die M_3 -Rezeptor-vermittelte $G\alpha_i$ -Aktivierung aufhebt, ohne die präferenzielle $G\alpha_{q/11}$ -Aktivierung innerhalb der Bronchialmuskulatur zu unterbinden. Solch ein „*biased signalling*“ ist zahlreich publiziert (Urban et al., 2007; Violin & Lefkowitz 2007; Kenakin, 2011) und auch für die in dieser Arbeit untersuchten Hybridverbindungen für den M_2 -Rezeptor bekannt (Antony et al., 2009).

4.3. Analyse einzelner Signalwegskomponenten des $G\alpha_s$ -Signaltransduktionsweges

Um der Frage nachzugehen, welche Signalwegskomponenten mit dem Epic[®]-Biosensor gemessen werden können, wurde systematisch der $G\alpha_s$ -Signaltransduktionsweg durch gezielte Aktivierung und Inhibition einzelner Zellkomponenten untersucht.

Da sowohl eine endozytotische Substanz-Aufnahme als auch eine Rezeptorinternalisierung zu einer Massenumverteilung innerhalb der Zelle führt, wurde überprüft, ob eine Internalisierung generell mit dem Epic[®]-Biosensor messbar ist. Durch eine direkte Applikation von Cholera-Toxin konnte keine Toxin-Internalisierung an CHO-Zellen gemessen werden (siehe 3.4.1.), obwohl es Literaturhinweise einer Cholera-Toxin-Internalisierung gibt (Joseph et al., 1978, 1979; Janicot et al., 1988). Darüberhinaus wurden die Signalmaxima von Adrenalin- und Dopamin-induzierter DMR an $h\beta_2$ -CHO-Zellen zu unterschiedlichen Messzeitpunkten miteinander verglichen, da eine Adrenalin-induzierte, nicht jedoch eine Dopamin-induzierte Rezeptorinternalisierung beschrieben ist (Swaminath et al., 2004). In diesen Experimenten konnten ebenfalls keine Hinweise auf eine Messbarkeit der Rezeptorinternalisierung mittels DMR gefunden werden (siehe 3.4.1.).

Durch Einsatz des membrangängigen direkten Adenylylcyclase-Aktivators Forskolin konnte eine negativ-gerichtete DMR in CHO-Zellen induziert werden, wie sie auch in RMS13-Weichteilsarkomzellen (Tran und Fang, 2009) sowie für MRC5- und INS-1-Zellen (Schröder et al., zur Publikation angenommen) gefunden wurde. Die Beobachtung, dass Forskolin zu einer starken DMR führte zeigt, dass das G_s -vermittelte Epic[®]-Signal von der Aktivierung der Adenylylcyclase ausgeht oder signalabwärts dieser entstehen muss. Aus diesem Grund wurde der Phosphodiesterase-Inhibitor IBMX eingesetzt, welcher die Degradation des sekundären Botenstoffs cAMP unterbindet. IBMX führte selbst zu einem Signal. Die Beobachtung, dass bereits die Inhibition des cAMP-Abbaus zu einer starken DMR führt, lässt folgern, dass das Epic[®]-Messsystem hochsensitiv gegenüber einem Anstieg des cAMP-Spiegels ist. Eine Vorstimulation der Zellen mit einer supramaximalen Orciprenalin- oder Forskolin-Konzentration resultierte in einer verringerten IBMX-induzierten Wellenlängenverschiebung, bei der jedoch ein Restsignal blieb. Die Maskierung zeigte, dass das IBMX-vermittelte Signal zumindest zum Teil über einen cAMP-Anstieg verläuft. Das Restsignal könnte der zusätzlichen IBMX-induzierten Inhibition der Degradation von cGMP geschuldet sein. cAMP ist in der Lage, sowohl die Proteinkinase A (PKA) als auch das Guanosinnukleotid-Austauschprotein Epac („exchange protein directly activated by cAMP“) zu aktivieren (de

Rooji et al., 1998; Kawasaki et al., 1998), weshalb diese beiden Enzyme näher betrachtet wurden. Der Einsatz des selektiven Proteinkinase A-Aktivators N⁶Benzyl-cAMP führte zu einer starken negativ-gerichteten DMR (siehe 3.4.4.), wohingegen die Aktivierung von Epac lediglich ein schwaches Signal erreichte (siehe 3.4.6.). So konnte die Entstehung des Signals vor allem auf eine Aktivierung der Proteinkinase A oder weiter signalwegabwärts dieser zurückgeführt werden.

Eine Überprüfung der PKA-Beteiligung an dem G_s-vermittelten Signal sollte durch Inhibition der Proteinkinase A mit dem PKA-Inhibitor H89 erfolgen. Tran & Fang (2009) setzten diesen Inhibitor bereits im Epic[®]-Messsystem ein, was zu einer signifikanten Reduktion des Forskolin-induzierten Signales führte. In vorliegender Arbeit wurde systematisch die Spezifität der Signale überprüft. Obwohl H89 einen Inhibitor darstellt, konnte eine H89-Konzentrations-Effekt-Kurve mit einer H89-Wirksamkeit von $pEC_{50} = 5,49 \pm 0,07$ erhoben werden. Eine Vorstimulation mit dem G_s-Aktivator Cholera toxin oder mit Forskolin führte zu einer vollständigen Maskierung des Signales (siehe 3.4.5.). Somit ist nicht auszuschließen, dass das H89-vermittelte Signal über einen Anstieg von intrazellulärem cAMP verläuft. Da sich die Befunde mehren, dass H89 neben der PKA-Inhibition zahlreiche weitere Effekte innerhalb der Zelle ausübt (Lochner & Moolmann, 2006; Palacios, 2007; Murray et al., 2008), erscheint diese Substanz im Epic[®]-Messsystem als Sonde ungeeignet zu sein.

Signalwegabwärts der Proteinkinase A konnte aufgrund fehlender selektiver, käuflicher Aktivatoren und Inhibitoren keine Betrachtung mehr erfolgen. Hier wäre der Einsatz von siRNA sinnvoll, um gezielt die Synthese der Enzyme zu inhibieren bzw. zu stimulieren. Es ist bereits publiziert, dass das Cytoskelett eine entscheidende Rolle in der Entstehung des Epic[®]-Signales spielt, da eine Inhibition der Aktin-Filament-Polymerisation mittels Cytochalasin D (Brown & Spudich, 1979; Prentki et al., 1979) zu einer Reduktion des Signales um bis zu 70 % führt (Peters et al., 2010).

4.4. Funktionelle Untersuchungen des humanen M₄-Acetylcholinrezeptors

Für einen Vergleich mit dem ebenfalls präferenziell G $\alpha_{i/o}$ -gekoppelten M₂-Rezeptorsubtyp wurden funktionelle Untersuchungen durch Messung der G-Proteinaktivierung und der dynamischen Massenumverteilung durchgeführt.

4.4.1. Bindungstopographie allo/orthosterischer Hybridagonisten am M₄-Acetylcholinrezeptor

Für einen Vergleich mit dem M₂-Rezeptor musste zuerst überprüft werden, ob die Hybridverbindungen Phth-6-Iper und Naph-6-Iper am M₄-Rezeptor, wie am M₂-Rezeptor (Antony et al., 2009), eine dualsterische Rezeptorbindung eingehen.

Die Untersuchung der Interaktion der Hybridverbindungen mit dem orthosterischen inversen Agonisten Atropin ergab, dass das Maximum der Hybrid-Konzentrations-Effekt-Kurven mit steigenden Atropin-Konzentrationen sank (siehe 3.5.9. sowie 3.5.10.). Dies ist darauf zurückzuführen, dass der agonistische Hybrid-Strukturbaustein mit steigenden Atropin-Konzentrationen aus der orthosterischen Bindungstasche des Rezeptorproteins „verdrängt“ wird. Darüberhinaus führten steigende Atropin-Konzentrationen zu einer sättigbaren Rechtsverschiebung der Hybrid-Konzentrations-Effekt-Kurven am M₄-Rezeptor (siehe 3.5.9 sowie 3.5.10). Dies deutet auf die Bildung ternärer Komplexe aus Orthoster, allosterischem Strukturelement der Hybridverbindungen und Rezeptorprotein hin (siehe Abb. 108). Somit konnte für die Hybridverbindungen gezeigt werden, dass sie in der Lage sind, gleichzeitig an die allosterische und an die orthosterische Bindungsdomäne des M₄-Rezeptorproteins zu binden, weshalb sie als dualsterische Liganden des M₄-Rezeptors bezeichnet werden können.

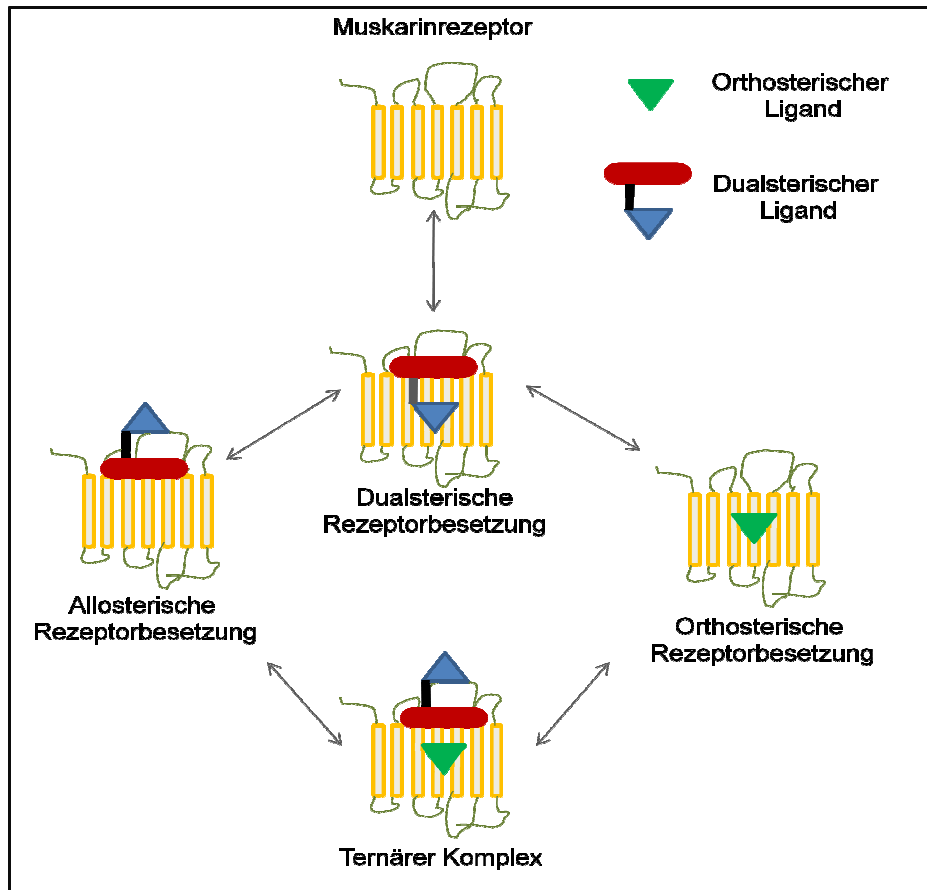


Abb. 108: Bindungsmöglichkeiten orthosterischer und dualsterischer Testsustanzen am muskarinischen Acetylcholinrezeptor (orange). Modifiziert nach Mohr et al. (2010).

Nachfolgende Tabelle zeigt die Kenngrößen der Interaktion zwischen den dualsterischen Testsustanzen Phth-6-Iper bzw. Naph-6-Iper mit Atropin am M_4 -Rezeptor. Die von K. Kellersohn (Dissertationsschrift 2007) am M_2 -Rezeptor erhobenen Kenngrößen sind zusätzlich aufgeführt, obwohl vorliegende Arbeit nicht auf einen Vergleich der Kenngrößen ausgelegt war.

Substanz	$p\alpha$		pK_B		$p(\alpha \cdot K_B)$		pIC_{50}	
	M_4	M_2	M_4	M_2	M_4	M_2	M_4	M_2
Phth-6-Iper	-1,46 $\pm 0,14^*$	-2,36 $\pm 0,24$	8,82 $\pm 0,16$	8,43 $\pm 0,04$	7,40*	6,07	7,55 $\pm 0,07^*$	6,05 $\pm 0,05$
Naph-6-Iper	-1,89 $\pm 0,13^*$	-0,81 $\pm 0,13$	9,59 $\pm 0,15^*$	8,30 $\pm 0,17$	7,70	7,49	7,51 $\pm 0,10$	7,32 $\pm 0,05$

Tab. 77: Vergleich der Kenngrößen für die Interaktion zwischen den dualsterischen Testsubstanzen Phth-6-Iper und Naph-6-Iper und Atropin am M_4 -Rezeptor (Daten aus vorangegangenem Ergebnisteil) bzw. M_2 -Rezeptor (kursiv-beschriftete Daten aus der Dissertationsschrift Kellershohn, 2007). $p\alpha$: Negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors der Interaktion von Atropin und Hybridverbindung. pK_B : negativer dekadischer Logarithmus der Atropin-Konzentration, bei der 50 % der Rezeptoren mit Atropin besetzt sind. $p(\alpha \cdot K_B)$: Affinität von Atropin zum allosterisch Hybrid-besetzten Rezeptor. pIC_{50} : negativer dekadischer Logarithmus der Atropin-Konzentration, bei der der Hybrid-Maximaleffekt auf 50 % gesenkt ist.*: signifikant verschieden von der jeweiligen Kenngröße des M_2 -Rezeptorsubtyps (t-Test, $p < 0,05$).

Für beide Hybridverbindungen resultierte am M_4 -Rezeptorsubtyp eine negative Kooperativität mit Atropin. Diese unterschied sich nicht signifikant zwischen der Atropin-Interaktion mit Naph-6-Iper ($p\alpha$: $-1,89 \pm 0,13$) und der Atropin-Interaktion mit Phth-6-Iper ($p\alpha$: $-1,46 \pm 0,14$) (t-Test, $p > 0,05$). Am M_2 -Rezeptor konnte von K. Kellershohn (Dissertationsschrift 2007) eine stärkere negative Kooperativität der Bindungsaffinität zwischen Phth-6-Iper und Atropin beobachtet werden.

Die Atropin-Affinität zum freien M_4 -Rezeptor unterschied sich signifikant zwischen der Interaktion von Atropin mit Phth-6-Iper und der Interaktion von Atropin mit Naph-6-Iper (vergleiche pK_B -Werte, t-Test, $p < 0,05$), während sich beide pK_B -Werte nicht signifikant von dem pK_B -Wert der Interaktion zwischen Atropin und Iperoxo unterschieden (pK_B -Wert = $9,27 \pm 0,16$; t-Test, $p > 0,05$). Theoretisch dürften die pK_B -Werte für Atropin am M_4 -Rezeptor nicht voneinander abweichen, da dessen Affinität zum freien M_4 -Rezeptor unabhängig von dem Interaktionspartner ist. Wahrscheinlich ist die Diskrepanz auf das kleine Messfenster zurückzuführen, das aus der niedrigen intrinsischen Aktivität beider Hybridverbindungen im [35 S]GTP γ S-Bindungsmessansatz rührt.

Die pK_B -Werte von Atropin zum freien M_4 -Rezeptor waren höher als zum freien M_2 -Rezeptor. Dies konnte auch von D. Klemt (Dissertationsschrift 2005) durch Messung der [35 S]GTP γ S-Bindung festgestellt werden.

Die Atropin-Affinität zum Phth-6-Iper-besetzten M_4 -Rezeptor ($p(\alpha \cdot K_B)$) war signifikant höher als zum Phth-6-Iper-besetzten M_2 -Rezeptor (t-Test, $p < 0,05$). Dies ist in Einklang mit dem Befund, dass am M_4 -Rezeptor eine niedrigere Atropin-Konzentration notwendig war, um den maximalen Phth-6-Iper-Effekt um die Hälfte zu senken (vergleiche pIC_{50} -Werte in Tab. 77). Zwischen den Naph-6-Iper besetzten Rezeptorsubtypen konnte kein signifikanter Unterschied der Atropin-Affinität festgestellt werden (t-Test, $p > 0,05$).

Die Interaktion von Iperoxo mit Atropin ergab eine nicht-sättigbare Rechtsverschiebung und ein gleich bleibendes Maximum der Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurve mit steigenden Atropin-Konzentrationen (siehe 3.5.6.). Dies weist auf eine rein orthosterische Rezeptorbindung von Iperoxo an den M_4 -Acetylcholinrezeptor hin.

Somit konnte, wie am M₂-Rezeptor (Antony et al., 2009; Dissertationsschrift Kebig, 2010), eine dualsterische Rezeptorbindung der Hybridliganden Phth-6-Iper und Naph-6-Iper und eine rein orthosterische Ligandbindung von Iperoxo am M₄-Rezeptorsubtyp gefunden werden. Es liegen folglich die gleichen Bindungstopographien vor wie am M₂-Rezeptor.

4.4.2. M₄-Rezeptor-vermittelte G-Protein-Aktivierung muskarinischer Agonisten

Der erste Schritt funktioneller Untersuchungen liegt in der Messung der G-Protein-Aktivierung, die in vorliegender Arbeit durch Quantifizierung der [³⁵S]GTPγS-Bindung erfolgte.

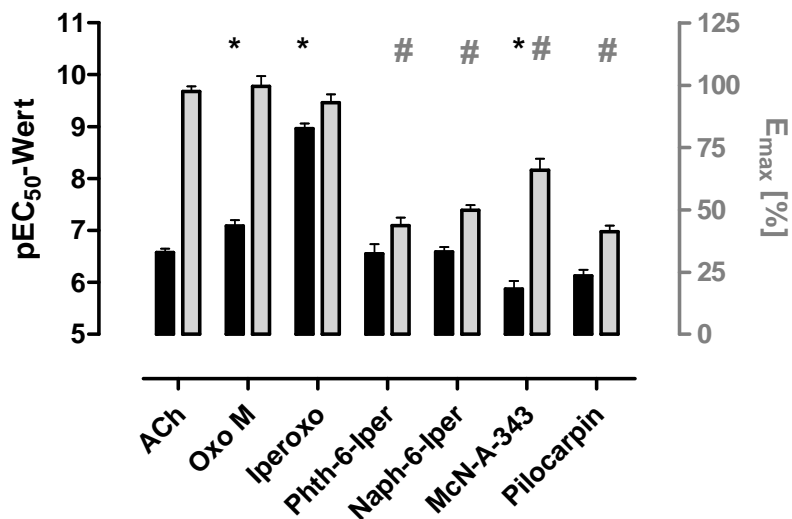


Abb. 109: Kenngrößen ± Standardfehler der G-Proteinaktivierung muskarinischer Agonisten an Membransuspensionen aus hM₄-CHO-Zellen; pEC₅₀-Wert: negativer, dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft, E_{max} [%]: Maximale intrinsische Aktivität der Agonisten normiert auf das obere Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve des am gleichen Versuchstag mitgeführten Vollagonisten Acetylcholin (Oxo M, Iperoxo, Pilocarpin) bzw. Oxotremorin M (McN-A-343, Phth-6-Iper, Naph-6-Iper). Angegeben sind jeweils Mittelwerte ± Standardfehler aus drei bis sechs voneinander unabhängigen Experimenten, die je in Vierfachbestimmung erhoben wurden. Alle Kenngrößen wurden dem Ergebnisteil dieser Arbeit entnommen. *: Signifikant abweichend von dem pEC₅₀-Wert von Acetylcholin. #: Signifikant reduziert zum Maximum von Acetylcholin [ACh] (t-Test, p<0,05). Oxo M: Oxotremorin M.

Die Testsubstanzen Oxotremorin M und Iperoxo zeigten am M₄-Rezeptor im [³⁵S]GTPγS-Messansatz eine gegenüber Acetylcholin signifikant erhöhte Wirksamkeit (ΔpEC₅₀: Oxotremorin M: 0,51 Dekaden; Iperoxo: 2,58 Dekaden) bei gleicher intrinsischer Aktivität. Am M₂-Rezeptor konnte von A. Kebig (Dissertationsschrift 2010) im gleichen Versuchsansatz ebenfalls eine gegenüber Acetylcholin unveränderte

intrinsische Aktivität bei erhöhter Wirksamkeit beider Agonisten festgestellt werden (ΔpEC_{50} : Oxotremorin M: 0,91 Dekaden; Iperoxo: 2,17 Dekaden). Aus der erheblich höheren Wirksamkeit von Iperoxo gegenüber dem endogenen Liganden Acetylcholin könnte für beide Rezeptorsubtypen gefolgert werden, dass diese Liganden entweder von Acetylcholin-differierende oder zusätzliche Bindungsepitope der orthosterischen Bindungstasche nutzen oder beides. Für Iperoxo kann die Verwendung einer weiteren für die Affinität notwendigen Bindungsstelle durch Untersuchungen des M_2 -Rezeptors gestützt werden, bei denen Iperoxo nach gezielter Mutagenese des essentiellen, orthosterischen Epitopes $M_2^{104}\text{Tyr}$ im Vergleich zu Acetylcholin einen Großteil seiner Affinität beibehielt (Dissertationsschrift Kaufel, 2010). Aufgrund der gegenüber Acetylcholin ebenfalls erhöhten Wirksamkeit von Iperoxo am M_4 -Acetylcholinrezeptor, könnte dies auch für die Iperoxo-Bindung an den M_4 -Rezeptorsubtyp zutreffen und müsste durch weitere Mutagenesestudien bestätigt werden.

Die Verknüpfung von Iperoxo mit einem Phthalimid- bzw. Naphthalimidrest über eine C_6 -Zwischenkette in den Hybridsubstanzen führte zu einem Wirksamkeitsverlust gegenüber der Muttersubstanz Iperoxo (siehe Abb. 109), wie es auch für den M_2 -Rezeptor gefunden wurde (Dissertationsschrift Kebig, 2010). Außerdem wurde die maximale Rezeptoraktivierung deutlich auf $E_{\max}(\text{Phth-6-Iper}) = 44 \pm 3 \%$ und $E_{\max}(\text{Naph-6-Iper}) = 50 \pm 2 \%$ reduziert. Am M_2 -Rezeptor stellten beide Hybridverbindungen ebenfalls Partialagonisten, mit jedoch höherer intrinsischer Aktivität als am M_4 -Rezeptor dar ($E_{\max}(\text{Phth-6-Iper}) = 79 \pm 2 \%$ und $E_{\max}(\text{Naph-6-Iper}) = 70 \pm 1 \%$) (Dissertationsschrift Kebig, 2010).

Die zusätzliche Bindung der Hybridverbindungen an allosterische Rezeptorepitope, welche sich am Eingang der orthosterischen Bindungstasche befinden (Jäger et al., 2007), könnte zur Folge haben, dass die Interaktion mit Epitopen der orthosterischen Ligandbindungstasche schwächer ausfällt. Am M_2 -Rezeptor zeigten auch andere dualsterische Testsubstanzen, die aus einem orthosterischen Agonisten über eine C_6 -Zwischenkette mit einem allosterischen Anker verknüpft sind, einen deutlichen Wirksamkeitsverlust gegenüber ihrem orthosterischen Strukturbaustein (Dissertationsschrift Kellershohn, 2007; Dissertationsschrift Kebig, 2010). Durch die Verlängerung der C_6 - auf eine C_8 -Zwischenkette konnte die Wirksamkeit von Iperoxo am M_2 -Rezeptor jedoch nahezu beibehalten werden (Diplomarbeit Michalski, 2009). Dies spricht dafür, dass die orthosterischen Kernepitope durch die Struktur-Verlängerung besser erreicht werden können. Für den M_4 -Rezeptor liegen noch keine Befunde zu der G-Protein-Aktivierung von verlängerten Hybridverbindungen vor, so dass weitere Experimente klären könnten, ob eine Kettenverlängerung auch an diesem

Rezeptorsubtyp eine Wirksamkeitssteigerung mit sich bringt.

Mit Pilocarpin und McN-A-343 wurden zusätzlich zwei bekannte muskarinische Agonisten eingesetzt, deren intrinsische Aktivität gegenüber der von Acetylcholin reduziert war und mit Literaturdaten gut übereinstimmte (McKinney et al., 1991). Außerdem zeigte McN-A-343, nicht aber Pilocarpin, an Membransuspensionen aus hM₄-CHO-Zellen eine gegenüber Acetylcholin signifikant reduzierte Wirksamkeit (siehe Abb. 109). Am M₂-Rezeptor konnte von A. Kebig (Dissertationsschrift 2010) ein deutlicherer Wirksamkeitsverlust von McN-A-343 gegenüber Acetylcholin detektiert werden ($\Delta pEC_{50} = 1,7$ Dekaden). Dies ist jedoch nicht verwunderlich, da McN-A-343 als M₄-prävalenter Agonist publiziert ist (Lazareno et al., 1993).

Ein Vergleich der [³⁵S]GTPγS-Bindung zwischen Membransuspensionen aus hM₄- und hM₂-CHO-Zellen zeigte somit nur wenige Unterschiede zwischen den Rezeptorsubtypen. Auffällig war eine verringerte intrinsische Aktivität der dualsterischen Hybridverbindungen am M₄-Rezeptorsubtyp. Dies könnte auf eine bessere Nutzung der Ligandbindungstasche am M₂-Rezeptor gegenüber dem M₄-Rezeptor zurückzuführen sein, was jedoch durch weitere Untersuchungen belegt werden muss.

4.4.3. Vergleich der Agonist-induzierten Signalwegsaktivierung zwischen hM₄- und hM₂-CHO-Zellen

Neben der G-Proteinaktivierung sollte im weiteren Verlauf dieser Arbeit auch die Signalwegsaktivierung dieser Liganden zwischen hM₄- und hM₂-CHO-Zellen miteinander verglichen werden. Durch Erhebung von Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurven konnte mit Hilfe der Messung von dynamischer Massenumverteilung sowohl für den Gα_{i/o}- als auch für den Gα_s-Signaltransduktionsweg an hM₂- und hM₄-CHO-Zellen gezeigt werden, dass eine Acetylcholin-Konzentration von [100 μM] im oberen Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven lag (siehe 3.1.1.1. und 3.1.3.1. für hM₂-CHO- sowie 3.7.1.1. und 3.7.3.1. für hM₄-CHO-Zellen). Die durch diese supramaximale Acetylcholin-Konzentration induzierte Zellantwort soll im Folgenden miteinander verglichen werden.

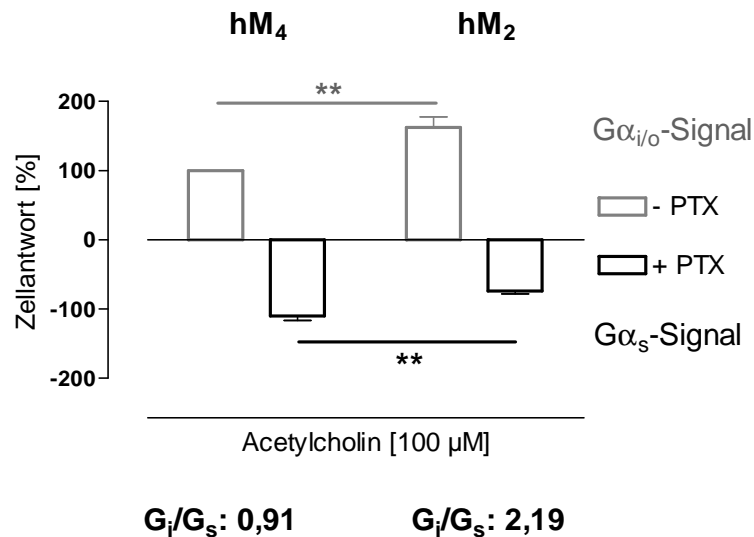


Abb. 110: : Vergleich der Acetylcholin-induzierten, maximalen Zellantworten des M₄- und M₂-Rezeptorsubtypes in DMR-Messungen. Mittelwerte ± SEM aus sechs bis acht voneinander unabhängigen Versuchen, je in Dreifachbestimmung erhoben. Die maximale Zellantwort des M₄-Rezeptors ohne Pertussistoxin (PTX) wurde an jedem Versuchstag auf 100 % gesetzt. G_i/G_s: Verhältnis der Zellantworten des jeweiligen Rezeptors ohne und mit Pertussistoxin. **: sehr signifikant verschieden voneinander (t-Test, p < 0,01).

Bei einer Normierung auf die maximale Zellantwort ohne PTX-Vorbehandlung des M₄-Rezeptors fällt auf, dass das Acetylcholin-induzierte G_{i/o}-Signal des M₂-Rezeptors signifikant größer ist, als das M₄-Rezeptor-vermittelte Signal. Demgegenüber steht die Beobachtung, dass das unter PTX-Vorbehandlung induzierte Acetylcholin-Signal an hM₂-CHO-Zellen signifikant schwächer ist als an hM₄-CHO-Zellen. Ermittelt man den Quotienten der Acetylcholin-induzierten G_i und G_s-Aktivierung jedes Rezeptorsubtyps, wird deutlich, dass das Verhältnis G_i/G_s am M₄-Rezeptor in Richtung der G_s-Aktivierung verschoben ist, während es am M₂-Rezeptor deutlich in Richtung G_i verschoben ist (siehe Abb. 110).

An hM₄-CHO-Zellen zeigte sich eine um ca. 50 % höhere Rezeptorexpression als an hM₂-CHO-Zellen, welche einen Einfluss auf die Signalthöhe der DMR-Messung ausüben könnte. Der Quotient aus G_i- und G_s-Aktivierung innerhalb eines Rezeptorsubtyps ist jedoch unabhängig von der Rezeptorexpression. Demnach scheint der M₄-Rezeptorsubtyp eine höhere Neigung zu haben G_s-Proteine zu aktivieren als der M₂-Rezeptorsubtyp.

Ergänzend zu den Befunden, die für Acetylcholin an beiden Subtypen erhoben wurde, sollen im Folgenden Befunde nicht klassischer, muskarinischer Agonisten zwischen dem M₂- und M₄-Rezeptorsubtyp miteinander verglichen werden. Die Voraussetzung für einen Vergleich der Agonist-induzierten Rezeptor-vermittelten Signalwegsaktivierung zwischen

dem M_2 - und dem M_4 -Rezeptor war durch die Bestätigung der dualsterischen Bindungstopographie von Phth-6-Iper und Naph-6-Iper am M_4 -Rezeptor gegeben (siehe 4.4.1.). Darüberhinaus wurden in vorliegender Arbeit erstmalig überhaupt Konzentrations-Effekt-Kurven dieser Agonisten an hM_4 -CHO-Zellen erhoben, die sicherstellten, dass die für einen Vergleich der intrinsischen Aktivitäten gewählte Ligand-Konzentration von $100 \mu\text{M}$ im oberen Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven lag.

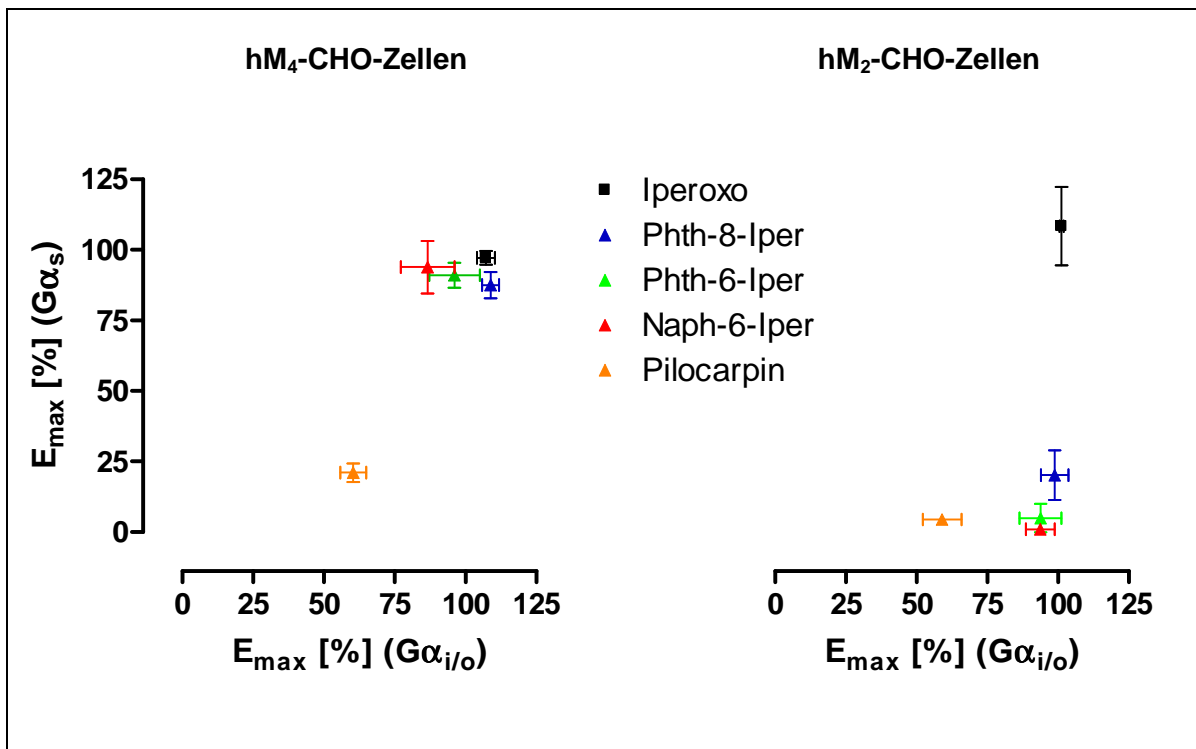


Abb. 111: Vergleich der Agonist-induzierten, maximalen intrinsischen Aktivitäten ($E_{\max} [\%]$) der Messung von dynamischer Massenumverteilung ohne und mit PTX-Vorinkubation zwischen hM_4 - und hM_2 -CHO-Zellen. Maximale intrinsische Aktivität ($E_{\max} [\%]$) normiert auf die durch Acetylcholin [$100 \mu\text{M}$]-induzierte Aktivität des jeweiligen Rezeptors, Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei bis elf voneinander unabhängigen Experimenten, die je als Drei- bzw. Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

Abb. 111 (links) zeigt, dass an hM_4 -CHO-Zellen alle Testsubstanzen, außer Pilocarpin, sowohl hinsichtlich der $G\alpha_{i/o}$ - als auch hinsichtlich der $G\alpha_s$ -Aktivierung vollagonistische Aktivität aufwiesen. Für Phth-6-Iper wurde dies bereits von A. Kebig (Dissertationsschrift 2010) im Anhang ihrer Arbeit angedeutet, allerdings war der Vergleich weniger rigoros angelegt. Für die Hybridverbindungen Phth-8-Iper und Naph-6-Iper wurde eine Diskrepanz der $G\alpha_s$ -Aktivierung zwischen den muskarinischen Subtypen erstmals in dieser Arbeit beobachtet.

An hM_2 -CHO-Zellen führten alle Agonisten, außer Pilocarpin, zu einer vollagonistischen $G\alpha_{i/o}$ -Aktivierung (siehe Abb. 111, rechts). Die dualsterischen Hybridsubstanzen Phth-8-Iper, Phth-6-Iper und Naph-6-Iper sowie Pilocarpin waren an diesen Zellen jedoch nicht

in der Lage den G_s -Signaltransduktionsweg zu aktivieren, wie es bereits von Antony et al., 2009 sowie in der Dissertationsschrift Kebig, 2010 gezeigt werden konnte.

Weiterhin zeigte eine Angleichung der Rezeptorkonzentration pro Kavität in DMR-Messungen mit hM₄- und hM₂-CHO-Zellen eine Hybrid-induzierte $G\alpha_s$ -Aktivierung am M₄-Rezeptor, nicht aber am M₂-Rezeptorsubtyp.

Es ist möglich, dass der M₄-Rezeptor, im Vergleich zum M₂-Rezeptor, leichter in eine Rezeptorkonformation überführt werden kann, die eine $G\alpha_s$ -Aktivierung ermöglicht. Dies würde erklären, warum unterschiedliche muskarinische Agonisten am M₄-Acetylcholinrezeptor eher in der Lage sind, eine $G\alpha_s$ -Aktivierung zu induzieren als am M₂-Rezeptor. Über Unterschiede der Rezeptorkonformationen zwischen den Rezeptorsubtypen ist zurzeit nichts Näheres bekannt. Dockingsimulationen von Agonisten an den M₄- und M₂-Rezeptorsubtyp könnten jedoch interessante neue Einblicke dazu liefern.

Abschließend kann eine subtypselektive Signalwegsaktivierung für die dualsterischen Hybridverbindungen Phth-8-Iper, Phth-6-Iper und Naph-6-Iper postuliert werden. Diese Befunde unterstreichen die bereits für Acetylcholin gezeigte höhere Neigung des M₄-Rezeptors gegenüber dem M₂-Rezeptor eine G_s -Aktivierung einzugehen. Leider ist bis heute nicht bekannt, ob der $G\alpha_s$ -Signaltransduktionsweg neben der präferenziellen $G\alpha_{i/o}$ -Kopplung der muskarinischen M₂- und M₄-Rezeptoren physiologisch eine Rolle spielt, so dass es weiterer Forschung bedarf, diesem auf den Grund zu gehen.

4.5. Einfluss des Epitops $M_4^{435}\text{Trp}$ (Trp 7.35) auf die Wirksamkeit und intrinsische Aktivität strukturverschiedener muskarinischer Liganden

Aus Mutagenesestudien des muskarinischen M_2 -Rezeptors geht hervor, dass die konservierte Aminosäure Trp 7.35 ($M_2^{422}\text{Trp}$) eine entscheidende Rolle für die Affinität bzw. intrinsische Aktivität muskarinischer Liganden spielt. Im Verlauf dieser Arbeit wurde nun der Einfluss des konservierten Epitopes Trp 7.35 des M_4 -Rezeptorproteins durch gezielte Mutagenese der aromatischen Aminosäure Tryptophan gegen die aliphatische Aminosäure Alanin ($M_4^{435}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$) untersucht. Ziel war es die funktionelle Orientierung dieses Epitopes im M_4 -Rezeptorprotein näher zu charakterisieren und die Befunde mit solchen des M_2 -Rezeptors zu vergleichen.

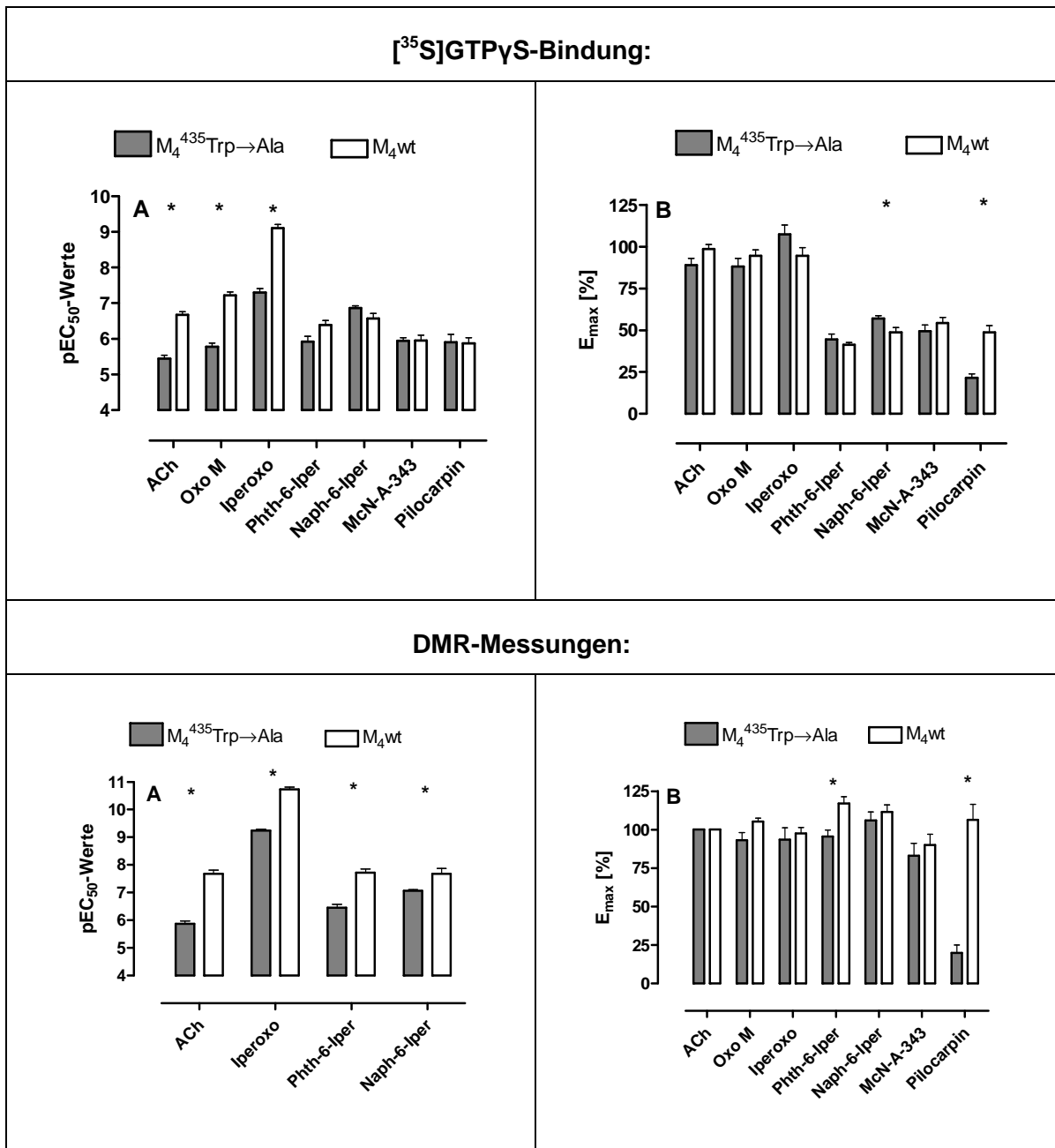


Abb. 112: Vergleich von Wirksamkeiten und intrinsischen Aktivitäten muskarinischer Liganden zwischen dem punktmutierten $hM_4^{435}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptor und dessen M_4 -Wildtyp. **A:** Vergleich der pEC_{50} -Werte: negativer dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration, die eine halbmaximale [^{35}S]GTP γ S-Bindung hervorruft, **B:** E_{max} [%]: Maximale, prozentuale intrinsische Aktivität der Liganden. 100 % ist die durch einen muskarinischen Vollagonisten am M_4 -Wildtyp des gleichen Versuchstages erhaltene maximale [^{35}S]GTP γ S-Bindung (oben) bzw. die durch Acetylcholin [100 μM]-induzierte Wellenlängenverschiebung (unten). Aufgetragen sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei bis fünf voneinander unabhängigen Versuchen, die je als Drei- oder Vierfachbestimmung erhoben wurden. Alle Daten entstammen dem Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit. *: signifikant verschieden zur entsprechenden Kenngröße des Wildtyps (t-Test, $p < 0,05$), ACh: Acetylcholin; Oxo M: Oxotremorin M.

Die gezielte Mutagenese des Epitops Trp 7.35 zu Alanin führte zu einer verringerten Wirksamkeit aller untersuchten Vollagonisten (Acetylcholin, Oxotremorin M, Iperoxo) hinsichtlich der [^{35}S]GTP γ S-Bindung. Das Ausmaß des Wirksamkeitsverlustes entspricht dem Wirksamkeitsverlust am $M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -mutierten Rezeptor gegenüber dem M_2 -Wildtyp (Dissertationsschrift Kebig, 2010). Für Iperoxo und Acetylcholin wurde dies zusätzlich durch Messung der dynamischen Massenumverteilung bestätigt (siehe Abb. 112). Die maximale Rezeptoraktivierung (E_{max}) dieser Vollagonisten wurde im Vergleich zum endogenen Liganden Acetylcholin durch den Aminosäureaustausch jedoch nicht beeinträchtigt, was durch beide funktionelle Messmethoden gezeigt werden konnte. Für die Testsubstanz Iperoxo konnte in vorliegender Arbeit gezeigt werden, dass sie im aktiven M_4 -Rezeptor rein orthosterisch bindet (siehe 4.3.). Der Befund, dass Iperoxo, wie auch die anderen muskarinischen Vollagonisten, einen Wirksamkeitsverlust nach Rezeptormutation erleidet, lässt erstmals den Schluss zu, dass das Epitop Trp 7.35 im aktiven M_4 -Rezeptor, wie am M_2 -Rezeptorsubtyp (Dissertationsschrift Kebig, 2010), Teil der orthosterischen Ligandbindungstasche ist. Demgegenüber steht die Beobachtung, dass es im inaktiven Rezeptor, wie für den M_2 -Rezeptor gezeigt (Dissertationsschrift Antony, 2007) nicht Teil der orthosterischen Bindungstasche ist, da es keinen Einfluss auf die Affinität des inversen Agonisten N-Methylscopolamin aufweist (siehe 8.1.).

Für die Hybrids substanz Phth-6-Iper resultierte nach Austausch des Epitops Trp 7.35 gegen Alanin in beiden funktionellen Messansätzen ebenfalls ein Wirksamkeitsverlust, der jedoch schwächer ausgeprägt war als der Wirksamkeitsverlust der rein orthosterischen Liganden. Die Hybridverbindung Naph-6-Iper wies bei der Messung der G-Protein-Aktivierung keine veränderte Wirksamkeit auf, wohingegen bei der Messung der DMR ein Wirksamkeitsverlust gezeigt werden konnte (siehe Abb. 112). D. Kaufel (Dissertationsschrift 2010) konnte in Bindungsuntersuchungen und A. Kebig (Dissertationsschrift 2010) durch funktionelle Messungen der G-Proteinaktivierung am Trp 7.35 zu Alanin mutierten M_2 -Rezeptor ebenfalls einen schwächeren Wirksamkeitsverlust von Hybridverbindungen detektieren als ihn rein orthosterische Liganden aufwiesen. Es ist möglich, dass die Hybridverbindungen durch die gleichzeitige

Nutzung allosterischer Bindungsepitope in der Lage sind die Mutation des Epitopes Trp 7.35 zu Alanin durch Verwendung anderer Bindungspartner auszugleichen.

Der gegenüber den Vollagonisten geringere Wirksamkeitsverlust könnte zudem auf den Partialagonismus zurückzuführen sein, da die anderen Partialagonisten keinerlei Einfluss der Wirksamkeit erkennen ließen und somit die Hybridverbindungen eine Zwischenstellung einnehmen könnten. Die intrinsische Aktivität von Phth-6-Iper wurde durch Austausch des Epitopes Trp 7.35 gegen Alanin nicht signifikant verändert. Die dualsterische Testsonde Naph-6-Iper zeigte durch Messung der [³⁵S]GTPγS-Bindung eine nur schwache, jedoch signifikante Erhöhung des Maximums um 8 % (siehe Abb. 112, t-Test, p<0,05). In Ganzzellmessungen konnte, möglicherweise aufgrund des vollagonistischen Verhaltens von Naph-6-Iper, kein Gewinn an intrinsischer Aktivität gegenüber dem M₄-Wildtyp gefunden werden. An Membransuspensionen des hM₂⁴²²Trp→Ala-mutierten Rezeptors zeigte A. Kebig (Dissertationsschrift 2010) durch Messung der [³⁵S]GTPγS-Bindung eine deutliche Erhöhung der intrinsischen Aktivität beider Hybridverbindungen gegenüber dem M₂-Wildtyp (ΔE_{\max} : Phth-6-Iper: 12 %; Naph-6-Iper: 28 %). Somit scheint die große aromatische Aminosäure Tryptophan 7.35 für die intrinsische Aktivität der dualsterischen Testsubstanzen am M₄-Rezeptor eine vom M₂-Rezeptor abweichende funktionelle Orientierung einzunehmen.

Die Testsubstanzen Pilocarpin und McN-A-343 zeigten durch Messung der [³⁵S]GTPγS-Bindung an Membransuspensionen aus hM₄⁴³⁵Trp→Ala-CHO-Zellen keinen Wirksamkeitsverlust gegenüber dem M₄-Wildtyp (siehe Abb. 112). In diesen Experimenten und durch Messung der dynamischen Massenumverteilung zeigte sich für Pilocarpin, nicht jedoch für McN-A-343, ein signifikanter Verlust an intrinsischer Aktivität. Am Trp 7.35 zu Alanin-mutierten M₂-Rezeptorsubtyp konnte durch Messung der G-Protein-Aktivierung für beide Testsubstanzen ebenfalls kein Wirksamkeitsverlust gegenüber dem M₂-Wildtyp detektiert werden (Dissertationsschrift Kebig, 2010). Ebenso wie am M₄-Rezeptor zeigte nur Pilocarpin, nicht aber McN-A-343, am M₂-Rezeptor eine Reduktion der intrinsischen Aktivität (Dissertationsschrift Kebig, 2010).

Abschließend kann festgehalten werden, dass das konservierte Epitop Trp 7.35 im inaktiven M₄-Rezeptor, wie bereits für den M₂-Rezeptor gezeigt (z.B. Dissertationsschrift Antony, 2007), nicht an der Wirksamkeit und intrinsischen Aktivität von orthosterischen Liganden beteiligt zu sein scheint. Im aktiven M₄-Rezeptor ist das Epitop Trp 7.35 jedoch für die Reduktion der Wirksamkeit von Vollagonisten und dualsterischen Hybridverbindungen verantwortlich. Darüberhinaus führt ein Austausch der Aminosäure Trp 7.35 gegen Alanin zu einer leicht erhöhten intrinsischen Aktivität der dualsterischen

Testsonde Naph-6-Iper, während es zu einer deutlichen Reduktion der intrinsischen Aktivität von Pilocarpin kommt.

Obwohl die Messfenster des M_4 -Wildtyps und der $M_4^{435}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Mutante bei der Quantifizierung der G-Protein-Aktivierung angepasst wurden (siehe 3.6.), darf nicht außer Acht gelassen werden, dass die Anzahl an Ligandbindungsstellen (B_{max}) für die Membransuspension aus $M_4^{435}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -CHO-Zellen gegenüber dem M_4 -Wildtyp geringer war, was einen Einfluss auf die intrinsische Aktivität und Wirksamkeit der Testsubstanzen nehmen könnte.

Es mehren sich die Hinweise einer Umorientierung des Epitops Trp 7.35 beim Übergang vom inaktiven in den aktiven Rezeptor-Zustand (Jäger et al., 2007; Rasmussen et al., 2011). Darüberhinaus wurde für den muskarinischen M_2 -Rezeptor eine Interaktion dieser Aminosäure mit dem Epitop $M_2^{177}\text{Tyr}$ postuliert (Prilla et al., 2006), welches in der zweiten extrazellulären Schleife des M_2 -Rezeptorproteins lokalisiert ist. An Stelle des Tyrosins befindet sich im M_4 -Rezeptorprotein die ebenfalls aromatische Aminosäure Phenylalanin ($M_4^{186}\text{Phe}$). Für $M_4^{186}\text{Phe}$ konnte kürzlich von Nawaratne et al. (2010) eine Mitbeteiligung an der Bindung von Allosteren gezeigt werden.

Folglich könnte am M_4 -Rezeptor eine ähnliche Interaktion des Epitops Trp 7.35 mit der Aminosäure $M_4^{186}\text{Phe}$ vorliegen, wie es für das Epitop Trp 7.35 des M_2 -Rezeptors mit der entsprechenden Aminosäure $M_2^{177}\text{Tyr}$ gezeigt wurde (Jäger et al., 2007). Im aktiven Rezeptorzustand würde es zu einem Aufbrechen der $\pi\pi$ -Wechselwirkungen zwischen diesen Aminosäuren kommen, so dass diese an der Wirksamkeit und intrinsischen Aktivität im aktiven, nicht aber inaktiven, Rezeptorzustand beteiligt sind. Ein gezielt an den Positionen $M_4^{435}\text{Trp}$ und $M_4^{186}\text{Phe}$ zu Alanin mutiertes Rezeptorprotein könnte Aufschluss darüber geben.

5. Zusammenfassung

Ein methodisch grundlegender Teil dieser Arbeit bestand darin, die Signalwegsaktivierung Sonden-freier, unterschiedlich gekoppelter 7-transmembranärer Rezeptoren mit dem neuen optischen Biosensor Epic[®] (Corning, NY) in Ganzzellmessungen zu untersuchen. Dazu wurde der M₂-Acetylcholinrezeptor, als präferenziell G $\alpha_{i/o}$ -gekoppelter Modellrezeptor, sowie der adrenerge β_2 -Rezeptor, als klassischer präferenziell G α_s -gekoppelter Rezeptor, gewählt. Als Vertreter eines G $\alpha_{q/11}$ -gekoppelten-Rezeptors wurde der M₃-Acetylcholinrezeptor untersucht.

Durch den Einsatz von selektiven Signalwegs-Inhibitoren bzw. -Aktivatoren (PTX, CTX, YM 254890) wurden alle drei Hauptsignaltransduktionswege in CHO-Zellen identifiziert. Die Rezeptor-vermittelten Signale konnten dabei eindeutig dem von ihnen präferenziell angesprochenen Signalweg zugeordnet werden.

Aufgrund des sich über die Messdauer hinweg verändernden Epic[®]-Signals wurde überprüft, ob der Ablesezeitpunkt einen Einfluss auf die Wirksamkeit von Agonisten ausübt. Dabei konnte für je einen präferenziell G $\alpha_{i/o}$ -, G α_s -, sowie G $\alpha_{q/11}$ -gekoppelten Rezeptor gezeigt werden, dass die Wirksamkeit der Liganden unabhängig von den gewählten Ablesezeitpunkten und Analysemethoden war.

Eine systematische Aktivierung und Inhibition von Komponenten des G α_s -Signaltransduktionsweges in CHO-Zellen zeigte, dass der Epic[®]-Biosensor solche Interventionen sehr sensitiv zu detektieren vermag, die eine Steigerung des intrazellulären cAMP-Spiegels bewirken. Nachgeschaltet von cAMP konnte vor allem eine Aktivierung der Proteinkinase A und nur schwach eine Aktivierung von Epac detektiert werden.

Für den muskarinischen M₃-Rezeptor konnte erstmalig eine Kontext-abhängige Rekrutierung von Signalwegen gefunden werden, die sich in einer erst unter erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegeln auftretenden G $\alpha_{i/o}$ -Kopplung äußerte.

Im zweiten Teil dieser Arbeit konnte durch [³⁵S]GTP γ S-Bindungsuntersuchungen an Membransuspensionen aus hM₄-CHO-Zellen eine dualsterische Rezeptorbindung der muskarinischen Hybridliganden Phth-6-Iper und Naph-6-Iper sowie eine rein orthosterische Bindungstopographie ihrer Muttersubstanz Iperoxo festgestellt werden. Für Iperoxo wurde am M₄-Rezeptor eine gegenüber Acetylcholin deutlich erhöhte Wirksamkeit bei voller intrinsischer Aktivität detektiert, die auch durch Messung zellulärer dynamischer Massenumverteilung bestätigt wurde. Die von Iperoxo abgeleiteten

Hybridverbindungen wiesen in diesem Messansatz nur noch einen Partialagonismus und eine Wirksamkeit auf dem Niveau von Acetylcholin auf. In Ganzzell-DMR-Messungen zeigten die Hybridverbindungen ebenfalls eine Wirksamkeit auf dem Acetylcholin-Niveau bei jedoch vollagonistischer intrinsischer Aktivität.

Trotz gleicher Bindungstopographie konnte an hM₄-CHO-Zellen, nicht jedoch an hM₂-CHO-Zellen, eine Hybrid-induzierte Gα_s-Aktivierung gemessen werden. Ein Vergleich der Acetylcholin-induzierten Signalwegsaktivierung untermauerte die Hypothese, dass der M₄-Rezeptor, gegenüber dem M₂-Rezeptor, eine höhere Neigung besitzt, an stimulatorische Gα_s-Proteine zu koppeln.

Durch gezielte Mutagenese der konservierten, aromatischen Aminosäure M₄⁴³⁵Trp (Trp 7.35) zu Alanin konnte gezeigt werden, dass das Epitop im inaktiven M₄-Rezeptor keinen Einfluss auf die Affinität des orthosterischen inversen Agonisten N-Methylscopolamin ausübt. Im aktiven Rezeptor war das Epitop Trp 7.35 jedoch beteiligt an der Wirksamkeit der Vollagonisten Acetylcholin, Oxotremorin M sowie Iperoxo, während die intrinsische Aktivität aufrecht erhalten werden konnte, wie es in vorangegangenen Arbeiten auch für den M₂-Rezeptorsubtyp gezeigt wurde (Dissertationsschrift Kebig, 2010).

Die dualsterischen Testsubstanzen Phth-6-Iper und Naph-6-Iper zeigten ebenfalls eine Reduktion der Wirksamkeit, die jedoch schwächer ausgeprägt war als die der Vollagonisten. Im Gegensatz zum M₂⁴²²Trp→Ala-mutierten Rezeptor konnte ein signifikanter Anstieg der intrinsischen Aktivität im Vergleich zum Wildtyp nur für die Testsubstanz Naph-6-Iper gefunden werden.

Die Wirksamkeit des Partialagonisten Pilocarpin blieb unbeeinflusst von der Mutation M₄⁴³⁵Trp→Ala. Es konnte jedoch, wie am M₂-Rezeptor (Jäger et al., 2007), eine Abnahme der intrinsischen Aktivität beobachtet werden.

Damit scheint der Einfluss des Epitopes Trp 7.35 auf die Wirksamkeit von Vollagonisten und dualsterischen Hybridverbindungen sowie die intrinsische Aktivität von Pilocarpin zwischen dem M₄- und dem M₂-Rezeptor konserviert zu sein.

6. Abkürzungsverzeichnis

AC:	Adenylylcyclase
ACh:	Acetylcholin
Atr.:	Atropin
ATP:	Adenosintriphosphat
cAMP:	cyclisches Adenosinmonophosphat
CHO-Zelle:	„ <i>chinese hamster ovary cell</i> “, Ovarialzellen des chinesischen Seidenhamsters
CMV:	Cytomegalievirus
CTX:	Choleratoxin
DA:	Dopamin
dest.	destillata
DMR:	„ <i>dynamic mass redistribution</i> “, dynamische Massenumverteilung
DMSO:	Dimethylsulfoxid
(c)DNA:	„(copy) deoxyribonucleic acid“, Desoxyribonukleinsäure
E. coli:	Escherichia coli-Bakterium
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
Epac:	“ <i>exchange protein directly activated by cAMP</i> ”
FKS:	Fetales Kälberserum
Fsk:	Forskolin
FRT:	„ <i>Flp-Recombination Target</i> “,
G-Protein:	Guanylnukleotid-bindendes Protein
GDP:	Guanosindiphosphat

Abkürzungsverzeichnis

GIRK:	„ <i>G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channel</i> “
GPCR:	„ <i>G protein-coupled receptor</i> “, G-Protein gekoppelter Rezeptor
GRK:	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase
GTP:	Guanosintriphosphat
h:	human
HBSS:	<i>Hank's balanced salt solution</i> , Pufferlösung für Messungen mit dem Epic [®] -Biosensor
HEK293-Zelllinie:	“ <i>human embryonic kidney cell</i> “, humane, embryonale Nierenzelllinie
HEPES:	(4-(2-Hydroxyethyl)-piperazinyl-1-ethansulfonsäure
H89:	N-[2-Bromocinnamylamino)Ethyl]-5-Isochinolinsulfonamid, Proteinkinase A-Inhibitor
IBMX:	Isobutylmethylxanthin
IP1:	Inositolmonophosphat
LB-Agar/-Medium:	Luria-Bertani-Agar/-Medium
M-Rezeptor:	Muskarinrezeptor
NMS:	N-Methylscopolamin
Orcipr.:	Orciprenalin
Oxo M:	Oxotremorin M
PBS-Puffer:	“ <i>Dulbecco's phosphate-buffered-saline</i> “, Pufferlösung
PDE:	Phosphodiesterase
PKA:	Proteinkinase A
PMT:	Pasteurella multocida Toxin
PP:	Polypropylen

Abkürzungsverzeichnis

Propr.	Propranolol
PTX:	Pertussistoxin
SEM.:	<i>“standard error of the mean”</i> , Standardfehler
SV40:	Simian-Virus 40
TAE-Lösung:	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Trp:	Tryptophan, Abkürzung nach dem Dreibuchstabencode der Aminosäuren
wt:	Wildtyp
ZNS:	Zentrales Nervensystem

7. Literaturverzeichnis

Adam, L. (1996): Palmitoylated Cysteine 341 Modulates Phosphorylation of the beta 2-Adrenergic Receptor by the cAMP-dependent Protein Kinase. In: *Journal of Biological Chemistry* 271 (35), S. 21490–21497.

Akiyama, K.; Vickroy, T. W.; Watson, M.; Roeske, W. R.; Reisine, T. D.; Smith, T. L.; Yamamura, H. I. (1986): Muscarinic cholinergic ligand binding to intact mouse pituitary tumor cells (AtT-20/D16-16) coupling with two biochemical effectors: adenylate cyclase and phosphatidylinositol turnover. In: *J. Pharmacol. Exp. Ther* 236 (3), S. 653–661.

Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. (2008): Molecular biology of the cell. 5. Aufl. New York: *Garland Science*.

Antony, J. (2007): Bindungsstopografie allosterisch/orthosterischer Hybridagonisten an M₂-Acetylcholinrezeptoren. *Dissertationsschrift*, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn

Antony J.; Kellershohn K.; Mohr-Andra M.; Kebig A.; Prilla S.; Muth M. et al. (2009): Dualsteric GPCR targeting: a novel route to binding and signaling pathway selectivity. In: *FASEB J* 23 (2), S. 442–450.

Arunlaskahna, O.; Schild, H. O. (1959): Some quantitative uses of drug antagonists. In: *Br J Pharmacol Chemother* 14 (1), S. 48–58

Asano, T.; Katada, T.; Gilman, AG.; Ross, E.M. (1984): Activation of the inhibitory GTP-binding protein of adenylate cyclase, Gi, by beta-adrenergic receptors in reconstituted phospholipid vesicles. In: *J Biol Chem* 259 (15), S. 9351–9354.

Ballesteros, J. A.; Weinstein, H. (1995): Integrated Methods for the Construction of Three-Dimensional Models and Computational Probing of Structure-Function Relations in G Protein-Coupled Receptors. In: *Methods in Neurosciences* 25, S. 366-428.

Barlow, R.; Blake, J. F. (1989): Hill coefficients and the logistic equation. In: *Trends Pharmacol. Sci* 10 (11), S. 440–441.

Barocelli, E.; Ballabeni, V.; Bertoni, S.; Dallanocce, C.; De Amici, M.; De Micheli, C.; Impicciatore, M. (2000): New analogues of oxotremorine and oxotremorine-M: estimation of their in vitro affinity and efficacy at muscarinic receptor subtypes. In: *Life Sci* 67 (6), S. 717–723.

Bharati, K.; Ganguly, N. K. (2011): Cholera toxin: a paradigm of a multifunctional protein. In: *Indian J. Med. Res* 133 (2), S. 179–187.

Birdsall, N. J.M.; Brown, D. A.; Buckley, N. J.; Christopoulos, A.; Eglen, R. M.; Ehlert, F.; Hammer, R.; Kilbinger, H. J.; Lambrecht, G.; Mitchelson, F.; Mutschler, E.; Nathanson, N. M.; Schwarz R.

D.; Tobin, A. B., Wess, J. Acetylcholine receptors (muscarinic): M₄. Last modified on 2010-06-28. Accessed on 2011-07-08. IUPHAR database (IUPHAR-DB).

Birdsall, N. J.; Farries, T.; Gharagozloo, P.; Kobayashi, S.; Kuonen, D.; Lazareno, S.; Popham, A.; Sugimoto, M. (1997): Selective allosteric enhancement of the binding and actions of acetylcholine at muscarinic receptor subtypes. In: *Life Sci* 60 (13-14), S. 1047–1052.

Bokoch, G. M.; Gilman, A. G. (1984): Inhibition of receptor-mediated release of arachidonic acid by pertussis toxin. In: *Cell* 39 (2 Pt 1), S. 301–308.

Bolton, T. B.; Clark, J. P. (1981): Actions of various muscarinic agonists on membrane potential, potassium efflux, and contraction of longitudinal muscle of guinea-pig intestine. In: *Br. J. Pharmacol* 72 (2), S. 319–334

Bonner, T. I. (1989): New subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. In: *Trends Pharmacol. Sci* Suppl, S. 11–15.

Bourne, H. R.; Meng, E. C. (2000): Structure. Rhodopsin sees the light. In: *Science* 289 (5480), S. 733–734.

Böhm, H. J.; Klebe, G.; Kubinyi, H. (1996): Wirkstoffdesign, *Spektrum Akademischer Verlag*

Bryson, S.E.; Rodger, I.W. (1987): Effects of phosphodiesterase inhibitors on normal and chemically-skinned isolated airway smooth muscle. In: *Br J Pharmacol* 92 (3), S. 673–681.

Buller, S.; Zlotos, D. P.; Mohr, K.; Ellis, J. (2002): Allosteric site on muscarinic acetylcholine receptors: a single amino acid in transmembrane region 7 is critical to the subtype selectivities of caracurine V derivatives and alkane-bisammonium ligands. In: *Mol. Pharmacol* 61 (1), S. 160–168.

Buys, W. E. C. M.; Smith, H. E.; Kamps, A. M. I. E.; Kamp, E. M.; Smits, M. A. (1990): Sequence of the dermonecrotic toxin of *Pasteurella multocida* ssp. *multocida*. In: *Nucl Acids Res* 18 (9), S. 2815–2816.

Calebiro, D.; Nikolaev, V. O.; Persani, L.; Lohse, M. J. (2010): Signaling by internalized G-protein-coupled receptors. In: *Trends Pharmacol. Sci* 31 (5), S. 221–228.

Canals, M.; Jenkins, L.; Kellett, E.; Milligan, G. (2006): Up-regulation of the angiotensin II type 1 receptor by the MAS proto-oncogene is due to constitutive activation of Gq/G11 by MAS. In: *J Biol Chem* 281 (24), S. 16757–16767.

Caulfield, M. P. (1993): Muscarinic receptors--characterization, coupling and function. In: *Pharmacol. Ther* 58 (3), S. 319–379.

Caulfield, M. P.; Birdsall, N. J. (1998): International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. In: *Pharmacol Rev* 50 (2), S. 279–290.

Chan, W. Y.; McKinzie, D. L.; Bose, S.; Mitchell, S. N.; Witkin, J. M.; Thompson, R. C., Christopoulos, A.; Lazareno, S.; Birdsall, N.J.; Bymaster, F.P.; Felder, C.C. (2008): Allosteric modulation of the muscarinic M4 receptor as an approach to treating schizophrenia. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 105 (31), S. 10978–10983.

Chausovsky, A.; Bershadsky, A. D.; Borisy, G. G. (2000): Cadherin-mediated regulation of microtubule dynamics. In: *Nat. Cell Biol* 2 (11), S. 797–804.

Cheng, Y.; Prusoff, W. H. (1973): Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. In: *Biochem. Pharmacol* 22 (23), S. 3099–3108.

Cho-Chung, Y. S.; Clair, T.; Tortora, G.; Yokozaki, H.; Pepe, S. (1991): Suppression of malignancy targeting the intracellular signal transducing proteins of cAMP: the use of site-selective cAMP analogs, antisense strategy, and gene transfer. In: *Life Sci* 48 (12), S. 1123–1132.

Christopoulos, A. (2002): G Protein-Coupled Receptor Allosterism and Complexing. In: *Pharmacological Reviews* 54 (2), S. 323–374.

Christopoulos, A.; Lanzafame, A.; Mitchelson, F.: Allosteric interactions at muscarinic cholinergic receptors. (1998) In: *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol* 25 (3-4), S. 185–194.

Clark, A. L.; Mitchelson, F. (1976): The inhibitory effect of gallamine on muscarinic receptors. In: *Br. J. Pharmacol* 58 (3), S. 323–331.

Conn, P. J.; Jones, C. K.; Lindsley, C. W. (2009): Subtype-selective allosteric modulators of muscarinic receptors for the treatment of CNS disorders. In: *Trends Pharmacol. Sci* 30 (3), S. 148–155.

Daaka, Y.; Luttrell, L. M.; Lefkowitz, R. J. (1997): Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. In: *Nature* 390 (6655), S. 88–91.

Dai, Y. S.; Ambudkar, I. S.; Horn, V. J.; Yeh, C. K.; Kousvelari, E. E.; Wall, S. J.; Li, M.; Yasuda, R.P.; Wolfe, B.B.; Baum, B.J. (1991): Evidence that M3 muscarinic receptors in rat parotid gland couple to two second messenger systems. In: *Am. J. Physiol* 261 (6 Pt 1), S. C1063-73.

Daniels, D. J.; Lenard, N. R.; Etienne, C. L.; Law, P.; Roerig, S. C.; Portoghese, P. S. (2005): Opioid-induced tolerance and dependence in mice is modulated by the distance between pharmacophores in a bivalent ligand series. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 102 (52), S. 19208–19213.

Davies, S. P.; Reddy, H.; Caivano, M.; Cohen, P. (2000): Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. In: *Biochem J* 351 (Pt 1), S. 95–105.

Dawson, J. M.; Heatlie, P. L. (1984): Lowry method of protein quantification: evidence for photosensitivity. In: *Anal Biochem* 140 (2), S. 391–393.

De Amici, M.; Dallanoce, C.; Holzgrabe, U.; Tränkle, C.; Mohr, K. (2010): Allosteric ligands for G protein-coupled receptors: a novel strategy with attractive therapeutic opportunities. In: *Med Res Rev* 30 (3), S. 463–549.

De Blasi, A.; O'Reilly, K.; Motulsky, H. J. (1989): Calculating receptor number from binding experiments using same compound as radioligand and competitor. *Trends Pharmacol Sci* 10: 227–229.

De Jonge, W. J.; Ulloa, L. (2007): The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation. In: *Br. J. Pharmacol* 151 (7), S. 915–929.

De Rooij, J.; Zwartkruis, F. J.; Verheijen, M. H.; Cool, R. H.; Nijman, S. M.; Wittinghofer, A.; Bos, J. L. (1998): Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. In: *Nature* 396 (6710), S. 474–477.

Disingrini, T.; Muth, M.; Dallanoce, C.; Barocelli, E.; Bertoni, S.; Kellershohn, K.; Mohr, K.; De Amici, M.; Holzgrabe, U. (2006): Design, synthesis, and action of oxotremorine-related hybrid-type allosteric modulators of muscarinic acetylcholine receptors. In: *J Med Chem* 49 (1), S. 366–372.

Dittman, A. H.; Weber, J. P.; Hinds, T. R.; Choi, E. J.; Migeon, J. C.; Nathanson, N. M.; Storm, D. R. (1994): A novel mechanism for coupling of m4 muscarinic acetylcholine receptors to calmodulin-sensitive adenylyl cyclases: crossover from G protein-coupled inhibition to stimulation. In: *Biochemistry* 33 (4), S. 943–951.

Dodgson, K.; Gedge, L.; Murray, D. C.; Coldwell, M. (2009): A 100K well screen for a muscarinic receptor using the Epic label-free system--a reflection on the benefits of the label-free approach to screening seven-transmembrane receptors. In: *J Recept Signal Transduct Res* 29 (3-4), S. 163–172.

Dong, G. Z.; Kameyama, K.; Rincken, A.; Haga, T. (1995): Ligand binding properties of muscarinic acetylcholine receptor subtypes (m1-m5) expressed in baculovirus-infected insect cells. In: *J. Pharmacol. Exp. Ther* 274 (1), S. 378–384.

Eckstein, N. (2004): Pharmakologische und biochemische Untersuchungen zur allosterischen Modulation Agonist-induzierter Wirkungen an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren. *Dissertationsschrift*, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.

- Ehlert, F. J. (1988): Estimation of the affinities of allosteric ligands using radioligand binding and pharmacological null methods. In: *Mol. Pharmacol* 33 (2), S. 187–194
- Ellis, J.; Pediani, J. D.; Canals, M.; Milasta, S.; Milligan, G. (2006): Orexin-1 receptor-cannabinoid CB1 receptor heterodimerization results in both ligand-dependent and -independent coordinated alterations of receptor localization and function. In: *J. Biol. Chem* 281 (50), S. 38812–38824.
- Evora, P. R. B.; Cable, D. G.; Chua, Y. L.; Rodrigues, A. J.; Pearson, P. J.; Schaff, H. V. (2007): Nitric oxide and prostacyclin-dependent pathways involvement on in vitro induced hypothermia. In: *Cryobiology* 54 (1), S. 106–113.
- Fang, Y.; Li, G.; Ferrie, A. M.: Non-invasive optical biosensor for assaying endogenous G protein-coupled receptors in adherent cells. In: *J Pharmacol Toxicol Methods* 55 (3), S. 314–322.
- Ferguson, S. S. (2001): Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. In: *Pharmacol. Rev* 53 (1), S. 1–24.
- Figueroa, K. W.; Griffin, M. T.; Ehlert, F. J. (2009): Selectivity of agonists for the active state of M1 to M4 muscarinic receptor subtypes. In: *J Pharmacol Exp Ther* 328 (1), S. 331–342.
- Fisher, S. K.; Bartus, R. T. (1985): Regional differences in the coupling of muscarinic receptors to inositol phospholipid hydrolysis in guinea pig brain. In: *J. Neurochem* 45 (4), S. 1085–1095.
- Fredriksson, R.; Lagerström, M. C.; Lundin, L.G.; Schiöth, H. B. (2003): The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. In: *Mol. Pharmacol* 63 (6), S. 1256–1272.
- Freedman, S. B.; Beer, M. S.; Harley, E. A. (1988): Muscarinic M1, M2 receptor binding. Relationship with functional efficacy. In: *Eur J Pharmacol* 156 (1), S. 133–142.
- Friedman, J. (2002): beta 2-Adrenergic Receptor Lacking the Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase Consensus Sites Fully Activates Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 in Human Embryonic Kidney 293 Cells: Lack of Evidence for Gs/Gi Switching. In: *Molecular Pharmacology* 62 (5), S. 1094–1102.
- Gao, Z. G.; Jacobson, K. A. (2006): Keynote review: allostereism in membrane receptors. In: *Drug Discov. Today* 11 (5-6), S. 191–202.
- George, S. R.; O'Dowd, B. F.; Lee, S. P. (2002): G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery. In: *Nat Rev Drug Discov* 1 (10), S. 808–820.
- Gill, D. M. (1976): The arrangement of subunits in cholera toxin. In: *Biochemistry* 15 (6), S. 1242–1248.

- Gjertsen, B. T.; Mellgren, G.; Otten, A.; Maronde, E.; Genieser, H. G.; Jastorff, B. Vintermyr, O. K.; McKnight, G. S.; Døskeland, S. O. (1995): Novel (Rp)-cAMPS analogs as tools for inhibition of cAMP-kinase in cell culture. Basal cAMP-kinase activity modulates interleukin-1 beta action. In: *J Biol Chem* 270 (35), S. 20599–20607.
- Goldberg, L. I. (1972): Cardiovascular and renal actions of Dopamine: Potential Clinical Applications (March; 24). In: *Pharmacological Reviews* (1), S. 1–29.
- Gomperts, B. D.; Kramer, I. M.; Tatham, P. E. R. (2009): Signal transduction. 2nd. Edition Amsterdam; Boston: *Elsevier/Academic Press*.
- Gosens, R.; Nelemans, S. A.; Grootte Bromhaar, M. M.; McKay, S.; Zaagsma, J.; Meurs, H. (2003): Muscarinic M3-receptors mediate cholinergic synergism of mitogenesis in airway smooth muscle. In: *Am J Respir Cell Mol Biol* 28 (2), S. 257–262.
- Grando, S. A.; Pittelkow, M. R.; Schallreuter, K. U. (2006): Adrenergic and cholinergic control in the biology of epidermis: physiological and clinical significance. In: *J. Invest. Dermatol* 126 (9), S. 1948–1965.
- Gregory, K. J.; Hall, N. E.; Tobin, A. B.; Sexton, P. M.; Christopoulos, A. (2010): Identification of orthosteric and allosteric site mutations in M2 muscarinic acetylcholine receptors that contribute to ligand-selective signaling bias. In: *J. Biol. Chem* 285 (10), S. 7459–7474.
- Griffin, M. T.; Figueroa, K. W.; Liller, S.; Ehlert, F. J. (2007): Estimation of Agonist Activity at G Protein-Coupled Receptors: Analysis of M2 Muscarinic Receptor Signaling through Gi/o, Gs, and G15. In: *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 321 (3), S. 1193–1207.
- Gupta, K. P.; Chandra, O. M.; Dhawan, K. N.; Gupta, G. P. (1970): A Study of the effect of dopamine on adrenergic receptors. In: *Jpn.J.Pharmacol* 20 (3), S. 332–336.
- Haag, S.; Matthiesen, S.; Juergens, U. R.; Racké, K. (2008): Muscarinic receptors mediate stimulation of collagen synthesis in human lung fibroblasts. In: *Eur. Respir. J* 32 (3), S. 555–562.
- Harrison, C.; Traynor, J. R. (2003): The [35S]GTPγS binding assay: approaches and applications in pharmacology. In: *Life Sciences* 74 (4), S. 489–508.
- Hausman, S. Z.; Burns, D. L. (1993): Binding of pertussis toxin to lipid vesicles containing glycolipids. In: *Infect Immun* 61 (1), S. 335–337.
- Hepler, J. R. (2003): RGS protein and G protein interactions: a little help from their friends. In: *Mol. Pharmacol* 64 (3), S. 547–549.

Hern, J. A.; Baig, A. H.; Mashanov, G. I.; Birdsall, B.; Corrie, J. E. T.; Lazareno, S.; Molloy, J. E.; Birdsall, N. J. (2010): Formation and dissociation of M1 muscarinic receptor dimers seen by total internal reflection fluorescence imaging of single molecules. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 107 (6), S. 2693–2698.

Hilf, G.; Gierschik, P.; Jakobs, K. H. (1989): Muscarinic acetylcholine receptor-stimulated binding of guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) to guanine-nucleotide-binding proteins in cardiac membranes. In: *Eur J Biochem* 186 (3), S. 725–731.

Holz, G. G.; Chepurny, O. G.; Schwede, F. (2008): Epac-selective cAMP analogs: new tools with which to evaluate the signal transduction properties of cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factors. In: *Cell. Signal* 20 (1), S. 10–20.

Holzgrabe, U.; De Amici, M. de; Mohr, K. (2006): Allosteric modulators and selective agonists of muscarinic receptors. In: *J. Mol. Neurosci* 30 (1-2), S. 165–168.

Hulme, E. C.; Birdsall, N. J.; Buckley, N. J. (1990): Muscarinic receptor subtypes. In: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* 30, S. 633–673.

Hurley, J. H. (1998): The adenylyl and guanylyl cyclase superfamily. In: *Curr Opin Struct Biol* 8 (6), S. 770–777.

Ilouz, N. (1999): Depolarization Affects the Binding Properties of Muscarinic Acetylcholine Receptors and Their Interaction with Proteins of the Exocytic Apparatus. In: *Journal of Biological Chemistry* 274 (41), S. 29519–29528.

Jäger, D.; Schmalenbach, C.; Prilla, S.; Schrobang, J.; Kebig, A.; Sennwitz, M.; Heller, E.; tränkle, C.; Holzgrabe, U.; Höltje, H.; Mohr, K. (2007): Allosteric small molecules unveil a role of an extracellular E2/transmembrane helix 7 junction for G protein-coupled receptor activation. In: *J. Biol. Chem* 282 (48), S. 34968–34976.

Jakubík, J.; Bacáková, L.; El-Fakahany, E. E.; Tucek, S. (1997): Positive cooperativity of acetylcholine and other agonists with allosteric ligands on muscarinic acetylcholine receptors. In: *Mol. Pharmacol* 52 (1), S. 172–179.

Janicot, M.; Clot, J.P.; Desbuquois, B. (1988): Interactions of cholera toxin with isolated hepatocytes. Effects of low pH, chloroquine and monensin on toxin internalization, processing and action. In: *Biochem J* 253 (3), S. 735–743.

Johnson, M. (1998): The beta-adrenoceptor. In: *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 158 (5 Pt 3), S. S146-53.

Jones, S. V.; Heilman, C. J.; Brann, M. R. (1991): Functional responses of cloned muscarinic receptors expressed in CHO-K1 cells. In: *Mol Pharmacol* 40 (2), S. 242–247.

- Jönsson, M.; Norrgård, O.; Forsgren, S. (2007): Presence of a marked nonneuronal cholinergic system in human colon: study of normal colon and colon in ulcerative colitis. In: *Inflamm. Bowel Dis* 13 (11), S. 1347–1356.
- Joseph, K. C.; Kim, S. U.; Stieber, A.; Gonatas, N. K. (1978): Endocytosis of cholera toxin into neuronal GERL. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 75 (6), S. 2815–2819.
- Kaslow, H. R.; Burns, D. L. (1992): Pertussis toxin and target eukaryotic cells: binding, entry, and activation. In: *FASEB J* 6 (9), S. 2684–2690.
- Kaslow, H. R.; Lim, L. K.; Moss, J.; Lesikar, D. D. (1987): Structure-activity analysis of the activation of pertussis toxin. In: *Biochemistry* 26 (1), S. 123–127.
- Kaufel, D. (2010): Interaktion orthosterisch/allosterischer Antagonist-Hybride mit muskarinischen M₂-Acetylcholinrezeptoren. *Dissertationsschrift*, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.
- Kawasaki, H.; Springett, G. M.; Mochizuki, N.; Toki, S.; Nakaya, M.; Matsuda, M.; Housman, D. E.; Graybiel, A.M. (1998): A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. In: *Science* 282 (5397), S. 2275–2279
- Kebig, A. E. (2010): Signalwegsaktivierung an muskarinischen M₂-Rezeptoren: Einfluss der allosterischen Bindungsstelle. *Dissertationsschrift*, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.
- Kebig, A.; Kostenis, E.; Mohr, K.; Mohr-Andra, M. (2009): An optical dynamic mass redistribution assay reveals biased signaling of dualsteric GPCR activators. In: *J Recept Signal Transduct Res* 29 (3-4), S. 140–145.
- Kellershohn, K. (2007): Allosterisch/orthosterische Hybridliganden des muskarinischen Acetylcholinrezeptors: Rezeptorbindung und -aktivierung. *Dissertationsschrift*, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.
- Kenakin, T. (2011): Functional Selectivity and Biased Receptor Signaling. In: *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 336 (2), S. 296–302.
- Kenakin, T. (2010): A holistic view of GPCR signaling. In: *Nat. Biotechnol.* 28 (9), S. 928–929.
- Kenakin, T. (2004): Principles: receptor theory in pharmacology. In: *Trends Pharmacol. Sci* 25 (4), S. 186–192.
- Kilbinger, H.; Dietrich, C.; Bardeleben, R. S. von (1993): Functional relevance of presynaptic muscarinic autoreceptors. In: *J. Physiol. Paris* 87 (2), S. 77–81.

- Kimura, R.; Ishida, T.; Kuriyama, M.; Hirata, K.; Hayashi, Y. (2010): Interaction of endothelial cell-selective adhesion molecule and MAGI-1 promotes mature cell-cell adhesion via activation of RhoA. In: *Genes to Cells* 15 (4), S. 385–396.
- Kitayama, H.; Sugimoto, Y.; Matsuzaki, T.; Ikawa, Y.; Noda, M. (1989): A ras-related gene with transformation suppressor activity. In: *Cell* 56 (1), S. 77–84.
- Klemt, D. (2005): Allosterische Modulation der Pilocarpin-induzierten G Protein-Aktivierung am muskarinischen M₂- und M₄-Rezeptorsubtyp. *Dissertationsschrift*, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.
- Koelle, M. R. (1997): A new family of G-protein regulators - the RGS proteins. In: *Curr. Opin. Cell Biol* 9 (2), S. 143–147.
- Kong, K. C.; Butcher, A. J.; McWilliams, P.; Jones, D.; Wess, J.; Hamdan, F. F. Werry, T.; Rosethorne, E. M.; Charlton, S. J.; Munson, S. E.; Cragg, H. A.; Smart, A. D.; Tobin, A. B. (2010): M3-muscarinic receptor promotes insulin release via receptor phosphorylation/arrestin-dependent activation of protein kinase D1. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 107 (49), S. 21181–21186.
- Kruh, J. (1982): Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture. In: *Mol Cell Biochem* 42 (2), S. 65–82.
- Kuang, Y. (1995): Selective Coupling of beta2-Adrenergic Receptor to Hematopoietic-specific G Proteins. In: *Journal of Biological Chemistry* 270 (27), S. 16008–16010.
- Laduron, P. M. (1985): Presynaptic heteroreceptors in regulation of neuronal transmission. In: *Biochem. Pharmacol* 34 (4), S. 467–470.
- Lai, C. Y.; Mendez, E.; Chang, D. (1976): Chemistry of cholera toxin: the subunit structure. In: *J. Infect. Dis* 133 Suppl, S. 23–30.
- Lai, C. Y.; Mendez, E.; Chang, D.; Wang, M. (1977): Primary structure of cholera toxin B-subunit. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun* 74 (1), S. 215–222.
- Lambrecht, G.; Moser, U.; Grimm, U.; Pfaff, O.; Hermanni, U.; Hildebrandt, C.; Waelbroeck, M.; Christophe, J.; Mutschler, E. (1993): New functionally selective muscarinic agonists. In: *Life Sci* 52 (5-6), S. 481–488.
- Langmead, C. J.; Watson, J.; Reavill, C. (2008): Muscarinic acetylcholine receptors as CNS drug targets. In: *Pharmacol. Ther* 117 (2), S. 232–243.
- Lanzafame, A.; Christopoulos, A.; Mitchelson, F. (1996): Interactions of agonists with an allosteric antagonist at muscarinic acetylcholine M2 receptors. In: *Eur J Pharmacol* 316 (1), S. 27–32.

- Lax, A. J.; Chanter, N.; Pullinger, G. D.; Higgins, T.; Staddon, J. M.; Rozengurt, E. (1990): Sequence analysis of the potent mitogenic toxin of *Pasteurella multocida*. In: *FEBS Letters* 277 (1-2), S. 59–64.
- Lazareno, S.; Birdsall, N. J. (1993): Pharmacological characterization of acetylcholine-stimulated -GTP gamma S binding mediated by human muscarinic m1-m4 receptors: antagonist studies. In: *Br J Pharmacol* 109 (4), S. 1120–1127.
- Lazareno, S.; Birdsall, N. J. (1995): Detection, quantitation, and verification of allosteric interactions of agents with labeled and unlabeled ligands at G protein-coupled receptors: interactions of strychnine and acetylcholine at muscarinic receptors. In: *Mol Pharmacol* 48 (2), S. 362–378.
- Lazareno, S.; Dolezal, V.; Popham, A.; Birdsall, N. J. M. (2004): Thiochrome enhances acetylcholine affinity at muscarinic M4 receptors: receptor subtype selectivity via cooperativity rather than affinity. In: *Mol. Pharmacol* 65 (1), S. 257–266.
- Lazareno, S.; Farries, T.; Birdsall, N. J. (1993): Pharmacological characterization of guanine nucleotide exchange reactions in membranes from CHO cells stably transfected with human muscarinic receptors m1-m4. In: *Life Sci* 52 (5-6), S. 449–456.
- Lazareno, S.; Gharagozloo, P.; Kuonen, D.; Popham, A.; Birdsall, N. J. (1998): Subtype-selective positive cooperative interactions between brucine analogues and acetylcholine at muscarinic receptors: radioligand binding studies. In: *Mol. Pharmacol* 53 (3), S. 573–589.
- Lazareno, S.; Popham, A.; Birdsall, N. J. M. (2002): Analogs of WIN 62,577 define a second allosteric site on muscarinic receptors. In: *Mol. Pharmacol* 62 (6), S. 1492–1505.
- Leach, K.; Davey, A. E.; Felder, C. C.; Sexton, P. M.; Christopoulos, A. (2011): The Role of Transmembrane Domain 3 in the Actions of Orthosteric, Allosteric, and Atypical Agonists of the M4 Muscarinic Acetylcholine Receptor. In: *Molecular Pharmacology* 79 (5), S. 855–865.
- Lebon, G.; Warne, T.; Edwards, P. C.; Bennett, K.; Langmead, C. J.; Leslie, A. G. W.; Tate, C. G. (2011): Agonist-bound adenosine A2A receptor structures reveal common features of GPCR activation. In: *Nature* 474 (7352), S. 521–525.
- Lee, N. H.; El-Fakahany, E. E. (1991): Allosteric interactions at the m1, m2 and m3 muscarinic receptor subtypes. In: *J. Pharmacol. Exp. Ther* 256 (2), S. 468–479.
- Lee, P. H.; Gao, A.; van Staden, C.; Ly, J.; Salon, J.; Xu, A.; Fang, Y.; Verkleeren, R. (2008): Evaluation of dynamic mass redistribution technology for pharmacological studies of recombinant and endogenously expressed g protein-coupled receptors. In: *Assay Drug Dev Technol* 6 (1), S. 83–94.

- Leemhuis, J.; Boutillier, S.; Schmidt, G.; Meyer, D. K. (2002): The protein kinase A inhibitor H89 acts on cell morphology by inhibiting Rho kinase. In: *J Pharmacol Exp Ther* 300 (3), S. 1000–1007.
- Lefkowitz, R. J. (2002): Dancing with Different Partners: Protein Kinase A Phosphorylation of Seven Membrane-Spanning Receptors Regulates Their G Protein-Coupling Specificity. In: *Molecular Pharmacology* 62 (5), S. 971–974.
- Leppik, R. A.; Miller, R. C.; Eck, M.; Paquet, J. L. (1994): Role of acidic amino acids in the allosteric modulation by gallamine of antagonist binding at the m2 muscarinic acetylcholine receptor. In: *Mol. Pharmacol* 45 (5), S. 983–990.
- Levac, B. A. R.; O'Dowd, B. F.; George, S. R. (2002): Oligomerization of opioid receptors: generation of novel signaling units. In: *Curr Opin Pharmacol* 2 (1), S. 76–81.
- Linial, M.; Ilouz, N.; Parnas, H. (1997): Voltage-dependent interaction between the muscarinic ACh receptor and proteins of the exocytic machinery. In: *J. Physiol. (Lond.)* 504 (Pt 2), S. 251–258.
- Linsel, N. B. (2008): Einfluss von Rezeptorglykosylierung und Lipidmembranumgebung auf die Ligandbindung muskarinischer Acetylcholinrezeptoren unter besonderer Berücksichtigung der allosterischen Bindungsstelle. *Dissertationsschrift*, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.
- Lochner, A.; Moolman, J. A. (2006): The many faces of H89: a review. In: *Cardiovasc Drug Rev* 24 (3-4), S. 261–274.
- Lönnroth, I.; Holmgren, J. (1973): Subunit structure of cholera toxin. In: *J. Gen. Microbiol* 76 (2), S. 417–427.
- Lorenzen, A.; Guerra, L.; Vogt, H.; Schwabe, U. (1996): Interaction of full and partial agonists of the A1 adenosine receptor with receptor/G protein complexes in rat brain membranes. In: *Mol Pharmacol* 49 (5), S. 915–926.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275
- Lüllmann, H.; Ohnesorge, F. K.; Schauwecker, G. C.; Wassermann, O. (1969): Inhibition of the actions of carbachol and DFP on guinea pig isolated atria by alkane-bis-ammonium compounds. In: *Eur. J. Pharmacol* 6 (3), S. 241–247.
- Luo, D.; Broad, L. M.; Bird, G. S.; Putney, J. W. (2001): Signaling pathways underlying muscarinic receptor-induced [Ca²⁺]_i oscillations in HEK293 cells. In: *J. Biol. Chem* 276 (8), S. 5613–5621.

Malta, E.; Raper, C.: Comparison of the effects of (–)-isoprenaline, orciprenaline, terbutaline, and Me506 on heart rate, soleus muscle contractility and pulmonary resistance of anaesthetized cats. In: *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol* 3 (1), S. 49–58.

Matsui, H.; Lazareno, S.; Birdsall, N. J. (1995): Probing of the location of the allosteric site on m1 muscarinic receptors by site-directed mutagenesis. In: *Mol. Pharmacol* 47 (1), S. 88–98.

May, L. T.; Avlani, V. A.; Langmead, C. J.; Herdon, H. J.; Wood, M. D.; Sexton, P. M.; Christopoulos, A. (2007): Structure-Function Studies of Allosteric Agonism at M2 Muscarinic Acetylcholine Receptors. In: *Molecular Pharmacology* 72 (2), S. 463–476.

May, L. T.; Leach, K.; Sexton, P. M.; Christopoulos, A. (2007): Allosteric Modulation of G Protein–Coupled Receptors. In: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* 47 (1), S. 1–51.

McGraw, D. W.; Almoosa, K. F.; Paul, R. J.; Kobilka, B. K.; Liggett, S. B. (2003): Antithetic regulation by beta-adrenergic receptors of Gq receptor signaling via phospholipase C underlies the airway beta-agonist paradox. In: *J Clin Invest* 112 (4), S. 619–626.

McKinney, M.; Miller, J. H.; Gibson, V. A.; Nickelson, L.; Aksoy, S. (1991): Interactions of agonists with M2 and M4 muscarinic receptor subtypes mediating cyclic AMP inhibition. In: *Mol Pharmacol* 40 (6), S. 1014–1022.

Mei, L.; Roeske, W. R.; Yamamura, H. I. (1989): Molecular pharmacology of muscarinic receptor heterogeneity. In: *Life Sci* 45 (20), S. 1831–1851.

Miaczynska, M.; Pelkmans, L.; Zerial, M. (2004): Not just a sink: endosomes in control of signal transduction. In: *Curr. Opin. Cell Biol* 16 (4), S. 400–406.

Michalski, H. (2009): Binding topology and functional properties of allosteric/orthosteric hybrid ligands at muscarinic M2 receptors. *Diplomarbeit*, Mathematisch-Naturwissenschaftliche und Medizinische Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.

Millar, R. P.; Newton, C. L. (2010): The year in G protein-coupled receptor research. In: *Mol. Endocrinol* 24 (1), S. 261–274.

Milligan, G. (1997): Is promiscuity of G protein interaction an issue in the classification of receptors? In: *Ann. N. Y. Acad. Sci* 812, S. 126–132.

Milligan, G. (2003): Principles: extending the utility of [³⁵S]GTP gamma S binding assays. In: *Trends Pharmacol. Sci* 24 (2), S. 87–90.

Milligan, G.; Kostenis, E. (2006): Heterotrimeric G-proteins: a short history. In: *Br. J. Pharmacol* 147 Suppl 1, S. S46-55.

- Mistry, R.; Dowling, M. R.; Challiss, R. A. (2005): An investigation of whether agonist-selective receptor conformations occur with respect to M2 and M4 muscarinic acetylcholine receptor signalling via Gi/o and Gs proteins. In: *Br J Pharmacol* 144 (4), S. 566–575.
- Moffett, S.; Mouillac, B.; Bonin, H.; Bouvier, M. (1993): Altered phosphorylation and desensitization patterns of a human beta 2-adrenergic receptor lacking the palmitoylated Cys341. In: *EMBO J* 12 (1), S. 349–356.
- Mohr, K.; Tränkle, C.; Kostenis, E.; Barocelli, E.; De Amici, M.; Holzgrabe, U. (2010): Rational design of dualsteric GPCR ligands: quests and promise. In: *Br. J. Pharmacol* 159 (5), S. 997–1008.
- Moore, C. A. C.; Milano, S. K.; Benovic, J. L. (2007): Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. In: *Annu. Rev. Physiol* 69, S. 451–482.
- Moss, J.; Tsai, S. C.; Bruni, P.; Adamik, R.; Kanaho, Y.; Hewlett, E. L.; Vaughan, M. (1985): Pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation of adenylate cyclase. Effects of guanyl nucleotides and rhodopsin. In: *Dev Biol Stand* 61, S. 43–49.
- Murray, A. J. (2008): Pharmacological PKA inhibition: all may not be what it seems. In: *Sci Signal* 1 (22), S.4.
- Nagano, N.; Nemeth, E. F. (2005): Functional proteins involved in regulation of intracellular Ca(2+) for drug development: the extracellular calcium receptor and an innovative medical approach to control secondary hyperparathyroidism by calcimimetics. In: *J. Pharmacol. Sci* 97 (3), S. 355–360.
- Nahorski, S. R.; Tobin, A. B.; Willars, G. B. (1997): Muscarinic M3 receptor coupling and regulation. In: *Life Sci* 60 (13-14), S. 1039–1045.
- Nawaratne, V.; Leach, K.; Felder, C. C.; Sexton, P. M.; Christopoulos, A. (2010): Structural determinants of allosteric agonism and modulation at the M4 muscarinic acetylcholine receptor: identification of ligand-specific and global activation mechanisms. In: *J. Biol. Chem* 285 (25), S. 19012–19021.
- Nawaratne, V.; Leach, K.; Suratman, N.; Loiacono, R.E.; Felder, C.C.; Ambruster, B.N.; Roth, B. L.; Sexton, P. M.; Christopoulos, A. (2008): New insights into the function of M4 muscarinic acetylcholine receptors gained using a novel allosteric modulator and a DREADD (designer receptor exclusively activated by a designer drug). In: *Mol Pharmacol* 74 (4), S. 1119–1131.
- Ng, S. S.; Pang, R. T.; Chow, B. K.; Cheng, C. H. (1999): Real-time evaluation of human secretin receptor activity using cytosensor microphysiometry. In: *J Cell Biochem* 72 (4), S. 517–527.
- Niisato, N.; Ito, Y.; Marunaka, Y. (1999): Effects of PKA inhibitors, H-compounds, on epithelial Na⁺ channels via PKA-independent mechanisms. In: *Life Sci* 65 (10), S. PL109-14.

- O'Donnell, S. R. (1970): A selective beta-adrenoreceptor stimulant (Th1165a) related to orciprenaline. In: *Eur J Pharmacol* 12 (1), S. 35–43.
- Offermanns, S.; Wieland, T.; Homann, D.; Sandmann, J.; Bombien, E.; Spicher, K.; Schultz, G.; Jacobs, K. H. (1994): Transfected muscarinic acetylcholine receptors selectively couple to Gi-type G proteins and Gq/11. In: *Mol Pharmacol* 45 (5), S. 890–898.
- Olianas, M. C.; Onali, P.; Neff, N. H.; Costa, E. (1983): Adenylate cyclase activity of synaptic membranes from rat striatum. Inhibition by muscarinic receptor agonists. In: *Mol. Pharmacol* 23 (2), S. 393–398.
- Orth, J. H.; Lang, S.; Taniguchi, M.; Aktories, K. (2005): Pasteurella multocida toxin-induced activation of RhoA is mediated via two families of G{alpha} proteins, G{alpha}q and G{alpha}12/13. In: *J Biol Chem* 280 (44), S. 36701–36707.
- Overington, J. P.; Al-Lazikani, B.; Hopkins, A. L. (2006): How many drug targets are there? In: *Nat Rev Drug Discov* 5 (12), S. 993–996.
- Palacios, N.; Sanchez-Franco, F.; Fernandez, M.; Sanchez, I.; Villuendas, G.; Cacicedo, L. (2007): Opposite effects of two PKA inhibitors on cAMP inhibition of IGF-I-induced oligodendrocyte development: a problem of unspecificity? In: *Brain Res* 1178, S. 1–11.
- Pavlov, V. A.; Tracey, K. J. (2005): The cholinergic anti-inflammatory pathway. In: *Brain Behav. Immun* 19 (6), S. 493–499.
- Penn, R. B.; Parent, J. L.; Pronin, A. N.; Panettieri, R. A. Jr.; Benovic, J. L. (1999): Pharmacological inhibition of protein kinases in intact cells: antagonism of beta adrenergic receptor ligand binding by H-89 reveals limitations of usefulness. In: *J Pharmacol Exp Ther* 288 (2), S. 428–437.
- Perutz, M. F. (1989): Mechanisms of cooperativity and allosteric regulation in proteins. In: *Q. Rev. Biophys* 22 (2), S. 139–237.
- Peters, M. F.; Vaillancourt, F.; Heroux, M.; Valiquette, M.; Scott, C. W. (2010): Comparing label-free biosensors for pharmacological screening with cell-based functional assays. In: *Assay Drug Dev Technol* 8 (2), S. 219–227.
- Pettit, R. K.; Ackermann, M. R.; Rimler, R. B. (1993): Receptor-mediated binding of Pasteurella multocida dermonecrotic toxin to canine osteosarcoma and monkey kidney (vero) cells. In: *Lab. Invest* 69 (1), S. 94–100
- Pittman, M. (1984): The concept of pertussis as a toxin-mediated disease. In: *Pediatr Infect Dis* 3 (5), S. 467–486.

Polo, S.; Di Fiore, P. P. (2006): Endocytosis conducts the cell signaling orchestra. In: *Cell* 124 (5), S. 897–900.

Preuss, I.; Kurig, B.; Nürnberg, B.; Orth, J. H. C.; Aktories, K. (2009): Pasteurella multocida toxin activates Gbetagamma dimers of heterotrimeric G proteins. In: *Cell. Signal* 21 (4), S. 551–558.

Prilla, S. (2006): Muskarinische Acetylcholinrezeptoren: Identifizierung einer Kernregion für allosterisch-orthosterische Rezeptorinteraktionen. *Dissertationsschrift*, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.

Prilla, S.; Schrobang, J.; Ellis, J.; Höltje, H.; Mohr, K. (2006): Allosteric interactions with muscarinic acetylcholine receptors: complex role of the conserved tryptophan M2422Trp in a critical cluster of amino acids for baseline affinity, subtype selectivity, and cooperativity. In: *Mol. Pharmacol* 70 (1), S. 181–193.

Rashid, A. J.; So, C. H.; Kong, M. M. C.; Furtak, T.; El-Ghundi, M.; Cheng, R.; O'Dowd, B. F.; George, S. R. (2007): D1-D2 dopamine receptor heterooligomers with unique pharmacology are coupled to rapid activation of Gq/11 in the striatum. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 104 (2), S. 654–659.

Rasmussen, S. G. F.; Choi, H.; Fung, J.; Pardon, E.; Casarosa, P.; Chae, P. S.; DeVree, B. T.; Rosenbaum, D. M.; Thian, F. S.; Schnapp, A.; Konetzki, I.; Sunahara, R. K.; Gellman, S. H.; Pautsch, A.; Steyaert, J.; Weis, W. I.; Kobilka, B. K. (2011): Structure of a nanobody-stabilized active state of the $\beta(2)$ adrenoceptor. In: *Nature* 469 (7329), S. 175–180.

Reiner, S.; Ambrosio, M.; Hoffmann, C.; Lohse, M. J. (2010): Differential signaling of the endogenous agonists at the beta2-adrenergic receptor. In: *J Biol Chem* 285 (46), S. 36188–36198.

Ribi, H. O.; Ludwig, D. S.; Mercer, K. L.; Schoolnik, G. K.; Kornberg, R. D. (1988): Three-dimensional structure of cholera toxin penetrating a lipid membrane. In: *Science* 239 (4845), S. 1272–1276.

Richards, M. H.; van Giersbergen, P. L. (1995): Human muscarinic receptors expressed in A9L and CHO cells: activation by full and partial agonists. In: *Br. J. Pharmacol* 114 (6), S. 1241–1249.

Rogel, A.; Hanski, E. (1992): Distinct steps in the penetration of adenylate cyclase toxin of Bordetella pertussis into sheep erythrocytes. Translocation of the toxin across the membrane. In: *J Biol Chem* 267 (31), S. 22599–22605.

Ruiz de Azua, I.; Gautam, D.; Guettier, J. M.; Wess, J. (2011): Novel insights into the function of β -cell M3 muscarinic acetylcholine receptors: therapeutic implications. In: *Trends Endocrinol. Metab* 22 (2), S. 74–80.

Saukkonen, K.; Burnette, W. N.; Mar, V. L.; Masure, H. R.; Tuomanen, E. I. (1992): Pertussis toxin has eukaryotic-like carbohydrate recognition domains. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1), S. 118–122.

Schmalenbach, C. (2005): Allosterische Modulation der durch Acetylcholin und weitere Agonisten ausgelösten Aktivierung von muskarinischen M₂-Rezeptoren. *Dissertationsschrift*, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn

Schroeder, R.; Janssen, N.; Schmidt, J.; Kebabian, A.; Merten, N.; Hennen, S.; Müller, A.; Blättermann, S.; Mohr-Andrae, M.; Zahn, S.; Wenzel, J.; Smith, N. J.; Gomeza, J.; Drewke, C.; Milligan, G.; Mohr, K.; Kostenis, E. (2010): Deconvolution of complex G protein-coupled receptor signaling in live cells using dynamic mass redistribution measurements. In: *Nat Biotechnol* 28 (9), S. 943–949.

Schroeder, R., Schmidt, J., Blättermann, S., Peters, L., Janßen, N., Grundmann, M., Seemann, W., Kaufel, D., Merten, N., Drewke, C., Gomeza, J., Milligan, G., Mohr, K., Kostenis, E.: Applying label-free dynamic mass redistribution technology to frame signaling of G protein-coupled receptors noninvasively in living cells; "zur Publikation angenommen"

Scott, C. W.; Peters, M. F. (2010): Label-free whole-cell assays: expanding the scope of GPCR screening. In: *Drug Discov Today* 15 (17-18), S. 704–716.

Selley, D. E.; Cao, C. C.; Liu, Q.; Childers, S. R. (2000): Effects of sodium on agonist efficacy for G-protein activation in mu-opioid receptor-transfected CHO cells and rat thalamus. In: *Br J Pharmacol* 130 (5), S. 987–996.

Shirey, J. K.; Xiang, Z.; Orton, D.; Brady, A. E.; Johnson, K. A.; Williams, R. A.; Rodriguez, A. L.; Wess, J.; Weaver, D.; Niswender, C. M.; Conn, P. J. (2008): An allosteric potentiator of M4 mAChR modulates hippocampal synaptic transmission. In: *Nat. Chem. Biol* 4 (1), S. 42–50.

Shytle, R. D.; Mori, T.; Townsend, K.; Vendrame, M.; Sun, N.; Zeng, J.; Ehrhart, J.; Silver, A. A.; Sanberg, P. R.; Tan, J. (2004): Cholinergic modulation of microglial activation by alpha 7 nicotinic receptors. In: *J. Neurochem* 89 (2), S. 337–343.

Sinnecker, D.; Schaefer, M. (2004): Real-time analysis of phospholipase C activity during different patterns of receptor-induced Ca²⁺ responses in HEK293 cells. In: *Cell Calcium* 35 (1), S. 29–38.

Smith, N. J.; Bennett, K. A.; Milligan, G. (2011): When simple agonism is not enough: emerging modalities of GPCR ligands. In: *Mol. Cell. Endocrinol* 331 (2), S. 241–247.

Steinfeld, T.; Mammen, M.; Smith, J. A. M.; Wilson, R. D.; Jasper, J. R. (2007): A Novel Multivalent Ligand That Bridges the Allosteric and Orthosteric Binding Sites of the M2 Muscarinic Receptor. In: *Molecular Pharmacology* 72 (2), S. 291–302.

Stockton, J. M.; Birdsall, N. J.; Burgen, A. S.; Hulme, E. C. (1983): Modification of the binding properties of muscarinic receptors by gallamine. In: *Mol. Pharmacol* 23 (3), S. 551–557.

Stoddart, L. A.; Brown, A. J.; Milligan, G. (2007): Uncovering the pharmacology of the G protein-coupled receptor GPR40: high apparent constitutive activity in guanosine 5'-O-(3-thio)triphosphate binding studies reflects binding of an endogenous agonist. In: *Mol Pharmacol* 71 (4), S. 994–1005.

Straßmann, V. (2007): Rezeptorepitop-Abhängigkeit der Bindung muskarinischer allosterischer Modulatoren unter verschiedenen ionalen Bedingungen. *Dissertationsschrift*, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn

Swaminath, G.; Xiang, Y.; Lee, T.W.; Steenhuis, J.; Parnot, C.; Kobilka, B. K. (2004): Sequential binding of agonists to the beta2 adrenoceptor. Kinetic evidence for intermediate conformational states. In: *J Biol Chem* 279 (1), S. 686–691.

Szekeres, P. G.; Traynor, J. R. (1997): Delta opioid modulation of the binding of guanosine-5'-O-(3-thio)triphosphate to NG108-15 cell membranes: characterization of agonist and inverse agonist effects. In: *J Pharmacol Exp Ther* 283 (3), S. 1276–1284.

Tahtaoui, C.; Parrot, I.; Klotz, P.; Guillier, F.; Galzi, J. L.; Hibert, M.; Ilien, B. (2004): Fluorescent Pirenzepine Derivatives as Potential Bitopic Ligands of the Human M1 Muscarinic Receptor. In: *J. Med. Chem* 47 (17), S. 4300–4315.

Takasaki, J.; Saito, T.; Taniguchi, M.; Kawasaki, T.; Moritani, Y.; Hayashi, K.; Kobori, M. (2004): A novel Galphaq/11-selective inhibitor. In: *J Biol Chem* 279 (46), S. 47438–47445.

Tesmer, J. J.; Sprang, S. R. (1998): The structure, catalytic mechanism and regulation of adenylyl cyclase. In: *Curr Opin Struct Biol* 8 (6), S. 713–719.

Tobin, A. B.; Butcher, A. J.; Kong, K. C. (2008): Location, location, location...site-specific GPCR phosphorylation offers a mechanism for cell-type-specific signalling. In: *Trends Pharmacol. Sci* 29 (8), S. 413–420.

Tran, E.; Fang, Y. (2009): Label-free optical biosensor for probing integrative role of adenylyl cyclase in G protein-coupled receptor signaling. In: *J Recept Signal Transduct Res* 29 (3-4), S. 154–162.

Trendelenburg, A. U.; Gomeza, J.; Klebroff, W.; Zhou, H.; Wess, J. (2003): Heterogeneity of presynaptic muscarinic receptors mediating inhibition of sympathetic transmitter release: a study with M2- and M4-receptor-deficient mice. In: *Br. J. Pharmacol* 138 (3), S. 469–480.

Trinquet, E.; Fink, M.; Bazin, H.; Grillet, F.; Maurin, F.; Bourrier, E.; Ansanay, H.; Leroy, C.; Michaud, A.; Durroux, T.; Maurel, D.; Malhaire, F.; Goudet, C.; Pin, J. P.; Naval, M.; Hernout, O.; Chrétien, F.; Chapeur, Y.; Mathis, G. (2006): D-myo-inositol 1-phosphate as a surrogate of D-myo-inositol 1,4,5-tris phosphate to monitor G protein-coupled receptor activation. In: *Anal. Biochem* 358 (1), S. 126–135.

Tucek, S.; Musílková, J.; Nedoma, J.; Proska, J.; Shelkownikov, S.; Vorlíček, J. (1990): Positive cooperativity in the binding of alcuronium and N-methylscopolamine to muscarinic acetylcholine receptors. In: *Mol. Pharmacol* 38 (5), S. 674–680.

Tucek, S.; Proska, J. (1995): Allosteric modulation of muscarinic acetylcholine receptors. In: *Trends Pharmacol. Sci* 16 (6), S. 205–212.

Tucek, S.; Michal, P.; Vlachová, V. (2002): Modelling the consequences of receptor-G-protein promiscuity. In: *Trends Pharmacol. Sci* 23 (4), S. 171–176.

Urban, J. D.; Clarke, W. P.; Zastrow, M. von; Nichols, D. E.; Kobilka, B.; Weinstein, H.; Javitch, J. A.; Roth, B. L.; Christopoulos, A.; Sexton, P. M.; Miller, K. J.; Spedding, M.; Mailman, R. B. (2007): Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. In: *J. Pharmacol. Exp. Ther* 320 (1), S. 1–13.

Valant, C.; Gregory, K. J.; Hall, N. E.; Scammells, P. J.; Lew, M. J.; Sexton, P. M.; Christopoulos, A. (2008): A Novel Mechanism of G Protein-coupled Receptor Functional Selectivity: Muscarinic partial agonist McN-A-343 as a bitopic orthosteric/allosteric ligand. In: *Journal of Biological Chemistry* 283 (43), S. 29312–29321.

Van Heyningen, S. (1976): The subunits of cholera toxin: structure, stoichiometry, and function. In: *J. Infect. Dis* 133 Suppl, S. 5–13.

Van Richards, Giersbergen (1995): Human muscarinic receptors expressed in A9L and CHO cells: activation by full and partial agonists. In *Br. J. Pharmacol. March*; 114(6): 1241–1249.

Violin, J. D.; Lefkowitz, R. J. (2007): Beta-arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. In: *Trends Pharmacol. Sci* 28 (8), S. 416–422.

Vogel, W. K.; Mosser, V. A.; Bulseco, D. A.; Schimerlik, M. I. (1995): Porcine m2 muscarinic acetylcholine receptor-effector coupling in Chinese hamster ovary cells. In: *J. Biol. Chem* 270 (26), S. 15485–15493.

Voigtlander, U. (2003): Allosteric Site on Muscarinic Acetylcholine Receptors: Identification of Two Amino Acids in the Muscarinic M2 Receptor That Account Entirely for the M2/M5 Subtype Selectivities of Some Structurally Diverse Allosteric Ligands in N-Methylscopolamine-Occupied Receptors. In: *Molecular Pharmacology* 64 (1), S. 21–31.

- Voigtländer, U.; Mohr, K. (2004): Muscarinische Acetylcholin-Rezeptoren als Zielstruktur für Arzneimittel. Konventionelle und neue Mechanismen. In: *Med Monatsschr Pharm* 27 (6), S. 184-90; quiz 191-2.
- Vroling, B.; Sanders, M.; Baakman, C.; Borrmann, A.; Verhoeven, S.; Klomp, J.; Oliveira, L.; De Vlieg, J.; Vriend, G. (2011): GPCRDB: information system for G protein-coupled receptors. In: *Nucleic Acids Res* 39 (Database issue), S. D309-19.
- Wang, S.Z.; El-Fakahany, E.E. (1993): Application of transfected cell lines in studies of functional receptor subtype selectivity of muscarinic agonists. In: *J Pharmacol Exp Ther* 266 (1), S. 237-243.
- Warne, T.; Serrano-Vega, M. J.; Baker, J. G.; Moukhametzianov, R.; Edwards, P. C.; Henderson, R. Leslie, A.G.; Tate, C.G.; Schertler, G.F. (2008): Structure of a β 1-adrenergic G-protein-coupled receptor. In: *Nature* 454 (7203), S. 486-491.
- Watanabe, A. M.; Hathaway, D. R.; Besch, H. R.: Mechanism of cholinergic antagonism of the effects of isoproterenol on hearts from hyperthyroid rats. In: *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab* 11, S. 423-429.
- Weitl, N.; Seifert, R. (2008): Distinct interactions of human beta1- and beta2-adrenoceptors with isoproterenol, epinephrine, norepinephrine, and dopamine. In: *J Pharmacol Exp Ther* 327 (3), S. 760-769.
- Wess, J. (2004): Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice: novel phenotypes and clinical implications. In: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* 44, S. 423-450.
- Wessler, I.; Kirkpatrick, C. J. (2008): Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. In: *British Journal of Pharmacology* 154 (8), S. 1558-1571.
- Wessler, I.; Reinheimer, T.; Kilbinger, H.; Bittinger, F.; Kirkpatrick, C. J.; Saloga, J.; Knop, J. (2003): Increased acetylcholine levels in skin biopsies of patients with atopic dermatitis. In: *Life Sci* 72 (18-19), S. 2169-2172.
- Widdop, S.; Daykin, K.; Hall, I. P. (1993): Expression of muscarinic M2 receptors in cultured human airway smooth muscle cells. In: *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol* 9 (5), S. 541-546.
- Wisnieski, B. J.; Bramhall, J. S. (1981): Photolabelling of cholera toxin subunits during membrane penetration. In: *Nature* 289 (5795), S. 319-321.
- Xia, Q. C.; Chang, D.; Blacher, R.; Lai, C. Y. (1984): The primary structure of the COOH-terminal half of cholera toxin subunit A1 containing the ADP-ribosylation site. In: *Arch. Biochem. Biophys* 234 (2), S. 363-370.

- Xiao, R. P.; Avdonin, P.; Zhou, Y. Y.; Cheng, H.; Akhter, S. A.; Eschenhagen, T.; Lefkowitz, R. J.; Koch, W. J.; Lakatta, E. G. (1999): Coupling of beta2-adrenoceptor to Gi proteins and its physiological relevance in murine cardiac myocytes. In: *Circ. Res* 84 (1), S. 43–52.
- Zastrow, M. von; Sorkin, A. (2007): Signaling on the endocytic pathway. In: *Curr. Opin. Cell Biol* 19 (4), S. 436–445.
- Zeng, F. Y.; Wess, J. (1999): Identification and molecular characterization of m3 muscarinic receptor dimers. In: *J. Biol. Chem* 274 (27), S. 19487–19497.
- Zhang, W.; Basile, A. S.; Gomeza, J.; Volpicelli, L. A.; Levey, A. I.; Wess, J. (2002): Characterization of central inhibitory muscarinic autoreceptors by the use of muscarinic acetylcholine receptor knock-out mice. In: *J. Neurosci* 22 (5), S. 1709–1717.
- Zheng, H.; Loh, H. H.; Law, P. Y. (2010): Agonist-selective signaling of G protein-coupled receptor: mechanisms and implications. In: *IUBMB Life* 62 (2), S. 112–119.
- Zhong, H.; Neubig, R. R. (2001): Regulator of G protein signaling proteins: novel multifunctional drug targets. In: *J. Pharmacol. Exp. Ther* 297 (3), S. 837–845.
- Zhou, H.; Meyer, A.; Starke, K.; Gomeza, J.; Wess, J.; Trendelenburg, A. U. (2002): Heterogeneity of release-inhibiting muscarinic autoreceptors in heart atria and urinary bladder: a study with M(2)- and M(4)-receptor-deficient mice. In: *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol* 365 (2), S. 112–122.
- Zhu, X.; Gilbert, S.; Birnbaumer, M.; Birnbaumer, L. (1994): Dual signaling potential is common among Gs-coupled receptors and dependent on receptor density. In: *Mol. Pharmacol* 46 (3), S. 460–469.

8. Appendix

In diesem Kapitel sind alle Experimente aufgeführt, die methodisch oder inhaltlich aus dem Kontext des Ergebnisteils herausfielen oder die als Kontrollexperiment dienten. Die resultierenden Daten wurden in den Ergebnisteil miteingebettet.

8.1. „Homologe Konkurrenzexperimente“

Zur Überprüfung der Homogenateigenschaften sowie der Berechnung der Anzahl an Ligandbindungsstellen wurden Bindungsversuche im Gleichgewicht durchgeführt.

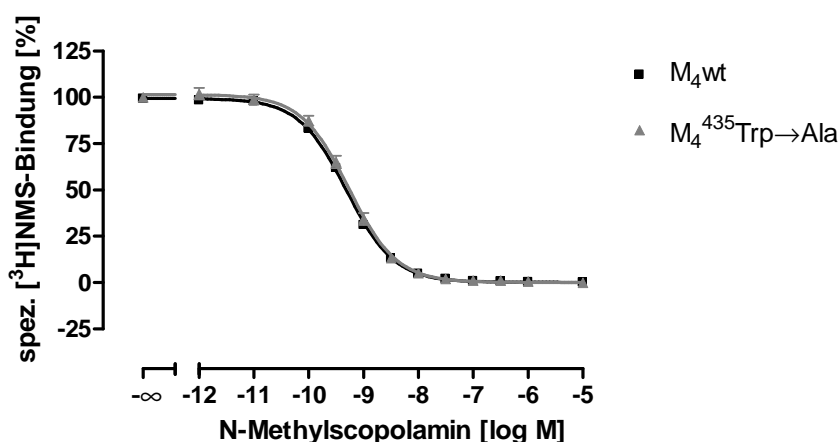


Abb. 113: Gemittelte Konzentrations-Effekt-Kurven aus „Homologen Konkurrenzexperimenten“ an Membransuspensionen aus Flp-InTMM₄- und Flp-InTMM₄⁴³⁵Trp→Ala-CHO-Zellen. *Ordinate:* Prozentuale, spezifische [³H]NMS-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der N-Methylscopolamin-Konzentration. *Kurvenanpassung:* „Vier-Parameter-logistische Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient $n_H = -1$. *Datenpunkte:* Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) aus 7-17 voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung erhoben wurden.

	pIC ₅₀	E _{min} [%]	E _{max} [%]	n _H (frei)	n
M ₄ wt	9,31 \pm 0,02	0,1 \pm 0,6	99,4 \pm 0,8	-1,05 \pm 0,04 n.s.	17
M ₄ ⁴³⁵ Trp→Ala	9,27 \pm 0,03	0,1 \pm 0,8	101,4 \pm 1,4	-1,10 \pm 0,06 n.s.	7

Tab. 78: Kenngrößen \pm Standardfehler der gemittelten N-Methylscopolamin-Konzentrations-Effekt-Kurven. Die Kenngrößen beruhen auf den Mittelwertkurven aus Abb. 113. pIC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der Ligandkonzentration, die eine halbmaximale [³H]NMS-Bindung hervorruft. E_{min}: Minimale [³H]NMS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve) E_{max}: Maximale [³H]NMS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve), n_H(frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit, n.s.: nicht signifikant verschieden von n_H=-1 (F-Test, p>0,05); n: Anzahl unabhängiger Einzelversuche.

Für den M₄-Wildtyp konnte ein pIC₅₀-Wert von 9,31 \pm 0,02 ermittelt werden, der sich nicht signifikant von dem von D. Kaufel (Dissertationsschrift 2010, pIC₅₀: 9,22 \pm 0,06)

unterschied. Der punktmutierte Rezeptor $M_4^{435\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}}$ zeigte ebenfalls keine veränderten Bindungseigenschaften von $[^3\text{H}]\text{NMS}$. Hier liegen keine Vergleichsdaten vor, da dieser Rezeptor erstmals in vorliegender Arbeit untersucht wurde. Homologe Konkurrenzexperimente mit dem an Position 7.35 mutierten M_2 -Rezeptorsubtyp resultierten ebenfalls nicht in einem veränderten pIC_{50} -Wert (Dissertationsschrift Kaufel, 2010). Die Befunde am M_4 -Rezeptor bestätigen, dass das Epitop 7.35 keinen Einfluss auf die Bindung von orthosterischen, inversen Agonisten ausübt, wie es in den vorangegangenen Arbeiten für den M_2 -Rezeptor gezeigt wurde (Dissertationsschrift Antony, 2007; Dissertationsschrift Kaufel, 2010).

Homogenat-bezeichnung	Homogenat-herstellung	Proteingehalt [mg/ml]	pK_D	B_{max} [fmol/mg Protein]
Flp-In TM M_4 -CHO	20.08.08	1,35	9,18	3878
“	22.08.08	1,30	9,58	3965
“	17.10.08	1,90	9,50	2873
“	09.12.08	1,63	9,46	2196
“	16.12.08	1,76	9,62	2259
“	20.02.09	1,53	9,87	1929
“	09.03.10	1,53	9,54	1327
“	20.04.10	3,62	9,85	2620
“	07.09.10	2,39	9,81	2166

Tab. 79: Charakteristika der einzelnen Flp-InTM M_4 -CHO-Membransuspensionen. pK_D : negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichts-Dissoziationskonstante der Radioligandbindung (berechnet aus Gl. 8). B_{max} : Anzahl spezifischer Ligandbindungsstellen der Membransuspension (berechnet durch Gl. 9).

Bezeichnung	Herstellung	Proteingehalt [mg/ml]	pK _D	B _{max} [fmol/mg Protein]
Flp-In TM M ₄ ⁴³⁵ Trp→Ala	14.08.08	2,09	9,05	1457
„	14.10.08	1,90	9,44	1217
„	18.11.08	1,76	9,45	1503
„	31.08.10	2,45	9,68	915

Tab. 80: Charakteristika der einzelnen Flp-InTMM₄⁴³⁵Trp→Ala-CHO-Membransuspensionen. pK_D: negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichts-Dissoziationskonstante der Radioligandbindung (berechnet aus Gl. 8). B_{max}: Anzahl spezifischer Ligandbindungsstellen der Membransuspension (berechnet durch Gl. 9).

Obige Tabellen zeigen die Charakteristika der einzelnen Membransuspensionen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration jeder Charge erfolgte nach 2.6.4. photometrisch mit Hilfe der Methode nach Lowry et al. (1951). Der pK_D-Wert konnte aus „Homologen Konkurrenzexperimenten“, die in Kapitel 2.8.2.1 ausführlich beschrieben sind mit Hilfe der Gleichung von Cheng & Prusoff (1973, Gleichung 8) berechnet werden. Nach De Blasi (1989) kann im Anschluss an ein „Homologes Konkurrenzexperiment“ aus dem IC₅₀ Wert des Kompetitors sowie der spezifischen Bindung des Radioliganden die Anzahl an Ligandbindungsstellen kalkuliert werden. Der M₄-Wildtyp erreichte einen Mittelwert (± Standardfehler) an Bindungsstellen von B_{max}: 2579 ± 291 fmol/mg Protein, während die M₄-Rezeptormutante nur auf einen Mittelwert (± Standardfehler) von B_{max}: 1273 ± 184 fmol/mg Protein kam. Diese Werte weichen signifikant voneinander ab (t-Test, p<0,05). Die verringerte Rezeptorexpression der Rezeptormutante ist wahrscheinlich auf die Punktmutation zurückzuführen, da Wildtyp und Mutante ansonsten strukturidentisch sind. Dafür sprechen B_{max}-Werte aus vorangegangenen Daten, in denen auffällt, dass die entsprechende M₂-Rezeptormutante ebenfalls eine geringere Rezeptorexpression zeigt als der M₂-Wildtyp (Dissertationsschrift Antony, 2007; Dissertationsschrift Kaufel, 2010). Zwar spielt ein unterschiedlicher Herstellungszeitpunkt für die unterschiedlichen Rezeptorexpressionen auch eine Rolle, was darin sichtbar wird, dass sich auch die Rezeptorexpression der einzelnen M₄-Wildtypchargen voneinander unterscheiden. Differierende äußere Einflüsse könnten die CHO-Zellen in ihrer Fähigkeit beeinflussen Rezeptoren an der Membran zu exprimieren. Die Beobachtung, dass die einzelnen Chargen deutlich verschiedene B_{max}-Werte aufweisen kann auch vorangegangenen Arbeiten entnommen werden (zum Beispiel: Dissertationsschrift Kaufel, 2010; Dissertationsschrift Kellershohn, 2007; Dissertationsschrift Antony, 2007). Allerdings erreicht die Rezeptorexpression der Mutante nie eine so hohe Rezeptorexpression wie der Wildtyp.

8.2. Überprüfung der Signalspezifität eingesetzter Agonisten

8.2.1. Überprüfung der Signalspezifität eingesetzter Liganden an untransfizierten Flp-InTM-CHO-Zellen

Die untransfizierten Flp-InTM-CHO-Zellen stellen für alle Flp-In-Zelllinien die Mutterzelllinie dar. Insofern verfügen diese Zellen über den gleichen zellulären Kontext und können zur Untersuchung unspezifischer Effekte herangezogen werden. Zur Erhebung von Konzentrations-Effekt-Kurven und insbesondere dem Vergleich maximal wirksamer Konzentrationen musste überprüft werden, ob die gewählte Ligand-Konzentration zu ausschließlich Rezeptor-abhängigen Signalen führte.

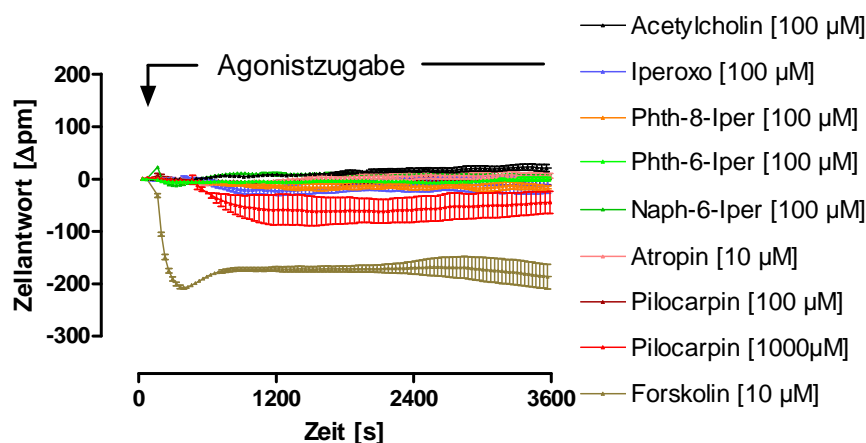


Abb. 114: Agonist-induzierte dynamische Massenumverteilung an Flp-InTMCHO-Zellen. *Ordinate*: Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. *Abszisse*: Messdauer in Sekunden [s]. Der Pfeil stellt den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Mittelwerte \pm Standardfehler eines repräsentativen Experimentes, welches in Dreifachbestimmung erhoben und mindestens zweifach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert.

Obige Abbildung verdeutlicht, dass die verwendeten muskarinischen Agonisten in einer Konzentration von 100 μM keine unspezifischen Effekte aufwiesen. Pilocarpin führte in einer Konzentration von 1 mM zu einem negativ gerichteten Signal an untransfizierten CHO-Zellen, was impliziert, dass dieses Signal nicht rezeptorvermittelt sein kann und Konzentrationen über 100 μM Pilocarpin nicht eingesetzt werden können. Als Positivkontrolle wurde an jedem Versuchstag der direkte Adenylylcyclase-Aktivator Forskolin mitgeführt. Da dieser Rezeptor-unabhängig den intrazellulären cAMP-Spiegel steigert, musste ein negativ gerichtetes Signal auftreten, wie es im obigen Versuch sichtbar ist.

8.2.2. Überprüfung der Signalspezifität adrenerger Liganden an untransfizierten CHO K1-Zellen

Die CHO-K1-Zelllinie stellt die Ausgangszelllinie für die in dieser Arbeit untersuchte, stabil transfierte CHO- β_2 -Zelllinie dar. Wie unter 8.2.1. beschrieben musste auch an dieser Zelllinie überprüft werden, ob die verwendeten Substanzen in den eingesetzten Konzentrationen rein Rezeptor-vermittelt und somit spezifisch wirkten.

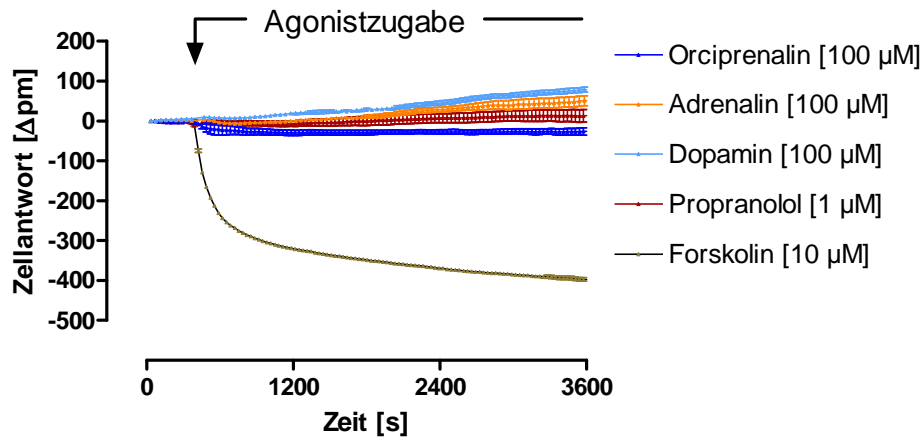


Abb. 115: Agonist-induzierte dynamische Massenumverteilung an CHO K1-Zellen. *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Der Pfeil stellt den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Mittelwerte \pm Standardfehler eines repräsentativen Experimentes, welches in Dreifachbestimmung erhoben und mindestens zweifach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert.

Obige Abbildung verdeutlicht, dass kein am adrenergen β_2 -Rezeptor eingesetzter Ligand in der gewählten, maximalen Konzentration zu einem unspezifischen Signal führte. Dies war eine Voraussetzung für die Analyse der β_2 -Adrenozeptor-vermittelten Signale. Forskolin diente als Rezeptor-unabhängiger Aktivator der Adenylylcyclase der Kontrolle und resultierte in einem starken, negativ-gerichteten Signal.

8.3. Überprüfung des Agonist-induzierten negativ-gerichteten Epic[®]-Signales in hM₂-CHO-Zellen

Um zu überprüfen, ob das negativ-gerichtete hM₂-Rezeptor-vermittelte Signal spezifisch über den Muskarinrezeptor und durch eine Aktivierung von Gα_s-Proteinen generiert wurde, wurde eine kombinierte Vorstimulation der Zellen mit Pertussistoxin und Atropin oder Cholera toxin vorgenommen. Durch die Vorinkubation der Zellen mit PTX wird der präferenzielle Gα_{i/o}-Signaltransduktionsweg unterbunden. Wenn das daraufhin auftretende negativ-gerichtete Signal über muskarinische Rezeptoren vermittelt wird, muss es Atropin-empfindlich sein. Aus diesem Grund wurde eine kombinierte Vorinkubation mit PTX [100 ng/ml] und Atropin [10 μM] durchgeführt.

Cholera toxin ist in der Lage, den Gα_s-Signaltransduktionsweg zu maskieren. Eine kombinierte Vorinkubation mit Pertussistoxin sollte sichergestellt, dass das negativ-gerichtete Signal tatsächlich durch Aktivierung von Gα_s-Proteinen innerviert wird. Somit dürfte bei der kombinierten Vorinkubation von Pertussistoxin und Cholera toxin keine weitere dynamische Massenumverteilung mehr messbar sein. Als Kontrolle wurde Acetylcholin in einer supramaximalen Konzentration von 100 μM mitgeführt, sowie der Einfluss der einzelnen Vorinkubationen überprüft.

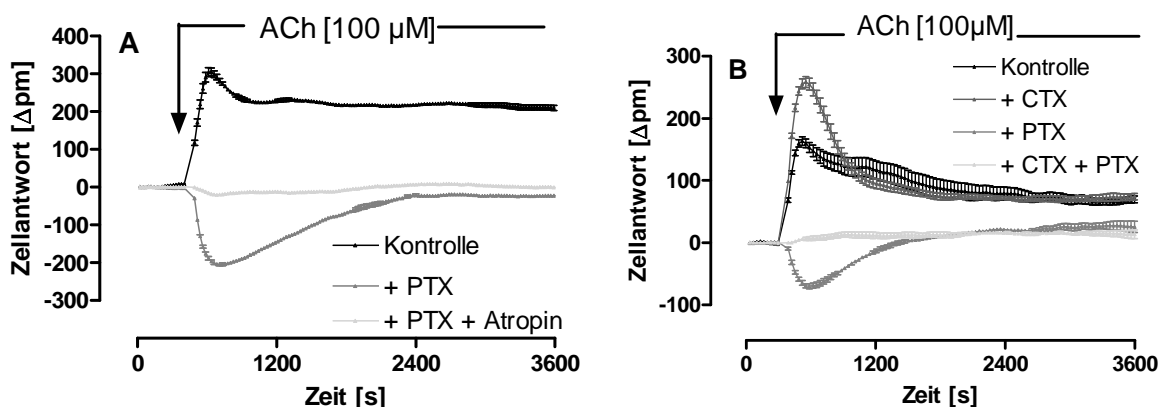


Abb. 116: Acetylcholin [ACh]-induzierte dynamische Massenumverteilung an Flp-InTMhM₂-CHO-Zellen mit und ohne Toxin-Vorinkubation. *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Der Pfeil stellt den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Mittelwerte ± Standardfehler zweier repräsentativer Experimente, welche in Zwei- bis Dreifachbestimmung erhoben und mindestens zweifach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurden. Alle Messpunkte einer Reihenfolge sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert.

Abb. 116 A zeigt, dass das Acetylcholin-induzierte Signal an hM₂-CHO-Zellen nach Pertussistoxin-Vorinkubation [100 ng/ml] negativ-gerichtet war, was auf eine Kopplung des M₂-Rezeptors an stimulatorische Gα_s-Proteine hinweist. Nach einer kombinierten

Vorinkubation mit Pertussistoxin und Atropin konnte keine weitere dynamische Massenumverteilung mehr gemessen werden. Dies lässt den Schluss zu, dass das nach einer PTX-Vorinkubation auftretende, negativ-gerichtete Signal über muskarinische Rezeptoren induziert wurde.

Nach einer kombinierten Vorinkubation der Zellen mit Pertussistoxin und Cholera toxin, wodurch sowohl eine Aktivierung des $G\alpha_{i/o}$ -, als auch des $G\alpha_s$ -Signaltransduktionsweges unterbunden wurde, konnte keine dynamische Massenumverteilung mehr detektiert werden. Dies lässt folgern, dass das negativ-gerichtete Signal tatsächlich auf eine $G\alpha_s$ -Kopplung des M_2 -Rezeptors zurückzuführen war. Außerdem zeigt es erneut, dass keine $G\alpha_{q/11}$ -Aktivierung des hier eingesetzten Zellklones gemessen werden konnte (siehe 3.1.4.).

8.4. Validierung des Einsatzes von Pasteurella multocida-Toxin (PMT) an hM_3 -CHO-Zellen

Im Verlaufe dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob sich das Pasteurella multocida Toxin (PMT) für die Inhibition des $G\alpha_q$ -Signaltransduktionsweges eignet. Dabei handelt es sich um ein von dem gleichnamigen, gram-negativen Bakterium Pasteurella multocida produziertes Toxin von 146.306 Da (Buys et al., 1990; Lax et al., 1990). PMT bindet an membranäre Ganglioside und wird endozytotisch in die Zelle aufgenommen (Pettit et al., 1993). Dort aktiviert das Toxin die $G\alpha_q$ -Untereinheit des G-Proteins und steigert unter anderem die intrazellulären Inositolmonophosphat-Spiegel (Pettit et al. 1993; Lax et al. 1990). Darüberhinaus aktiviert das Toxin die kleine GTPase Rho über eine Aktivierung von $G_{12/13}$ (Orth et al. 2005, Preuß et al. 2009) sowie die $G\beta\gamma$ -Untereinheit trimerer G-Proteine (Preuß et al., 2009). Um einen ersten Bereich einer wirksamen PMT-Konzentration zu bestimmen, wurde auf Literaturdaten zurückgegriffen. Preuß et al. (2009) verwendeten eine PMT-Konzentration im nanomolaren Bereich (1-10 nM) und Orth et al. (2005) wählten zur Maskierung des M_3 -Rezeptorsignales in HEK293-Zellen eine PMT-Konzentration von 700 pM über 24 h. Darüberhinaus wurde eine Acetylcholin-Konzentration aus dem aufsteigenden Teil der Konzentrations-Effekt-Kurve eingesetzt (siehe 3.3.1.1.), um auch kleine Signalveränderungen zu detektieren.

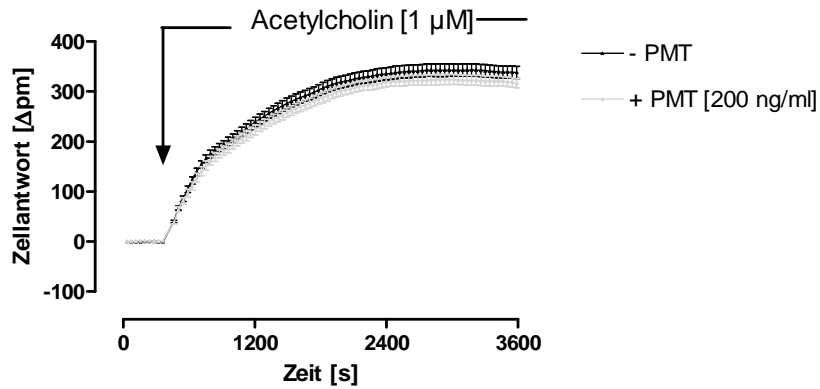


Abb. 117: Einfluss einer *Pasteurella multocida* Vorstimulation [200 ng/ml] der Flp-InTMM₃-CHO-Zellen. *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Der Pfeil stellt den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Mittelwerte ± Standardfehler eines repräsentativen Experimentes, welches in Dreifachbestimmung erhoben und zweifach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Vorinkubation sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert.

Abb. 117 verdeutlicht, dass eine Vorstimulation der Zellen mit dem *Pasteurella multocida* Toxin in einer Konzentration von 200 ng/ml über Nacht zu einer gegenüber der Kontrolle unveränderten Zellantwort führte. Eine Konzentration von 100 ng/ml über Nacht führte ebenfalls zu keinem veränderten Signal. Darüberhinaus wurden Daten mit reduzierter Vorstimulationszeit der Acetylcholin-Antwort von 2,5 h und 4,5 h durchgeführt. Diese resultierten ebenfalls nicht in einer Veränderung. Somit konnte keine Maskierung des M₃-Rezeptor-vermittelten Signales durch die Vorstimulation mit PMT gemessen werden. Zum Einen ist es möglich, dass das eingesetzte Toxin unwirksam war, da bisher kein positiver Beweis der Wirksamkeit erbracht wurde, zum Anderen könnten die zahlreichen weiteren Eigenschaften des *Pasteurella multocida* Toxins das Signal überlappen und somit eine Reduktion des Acetylcholinsignals vertuschen. Da es sich bei PMT um einen Aktivator des G_q-Signalweges handelt, und im Verlaufe dieser Arbeit auf den G_q-Inhibitor YM 254890 zurückgegriffen werden konnte, wurde die Validierung des PMT nicht weiter verfolgt.

8.5. Einfluss der Fibronectinbeschichtung auf die β_2 -Adrenozeptor-vermittelte dynamische Massenumverteilung an CHO-Zellen

Mit diesem Versuchsansatz sollte der Einfluss der Fibronectin-Beschichtung auf die Signalrichtung sowie die Signalintensität der bereits in Kapitel 3.2. beschriebenen stabil mit dem β_2 -Rezeptorgen transfizierten CHO-Zellen überprüft werden. Dies diente dem besseren Verständnis des Signales der Ganzzellmessung mit dem Epic[®]-Biosensor.

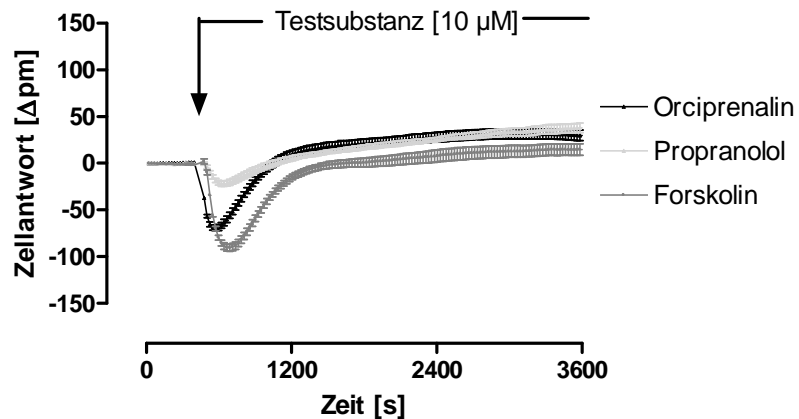


Abb. 118: Ligand-induzierte dynamische Massenumverteilung an β_2 -CHO-Zellen auf einer Fibronectin-beschichteten Biosensorplatte. *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δpm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Der Pfeil stellt den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Mittelwerte \pm Standardfehler eines repräsentativen Experimentes, welches in Vierfachbestimmung erhoben und zweifach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Testsubstanz sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert.

Aus obiger Abbildung geht hervor, dass Orciprenalin über den β_2 -Adrenozeptor in CHO-Zellen auch auf Fibronectin-beschichteten Biosensor-Platten zu einer negativ-gerichteten Zellantwort führte, wie es auf unbeschichteten Biosensor-Platten der Fall war (siehe 3.2.1.1.). Dieses Signal resultierte ebenfalls in einer Absenkung innerhalb der ersten 1200 s nach Substanzzugabe. Anschließend stieg das Signal bei allen Testsubstanzen bis zur Basallinie an, während es auf unbeschichteten Biosensor-Platten über die gesamte Messdauer parallel zur Basislinie verlief. Zudem war das negativ-gerichtete Signal an allen drei Messtagen kleiner ausgeprägt als die Signale ohne Beschichtung der Platte.

8.6. Messung endogen exprimierter Muskarinrezeptoren in HEK293-Zellen

Bei der HEK293-Zelllinie handelt es sich um ein System, welches endogen Muskarinrezeptoren exprimiert. Durch nachfolgenden Versuchsansatz sollte geklärt werden, ob sich die Aktivierung eines endogen-exprimierten muskarinischen Acetylcholinrezeptors in HEK293-Zellen von einem Muskarinrezeptorsignal in stabil mit Muskarinrezeptor-cDNA transfizierten CHO-Zellen unterscheidet.

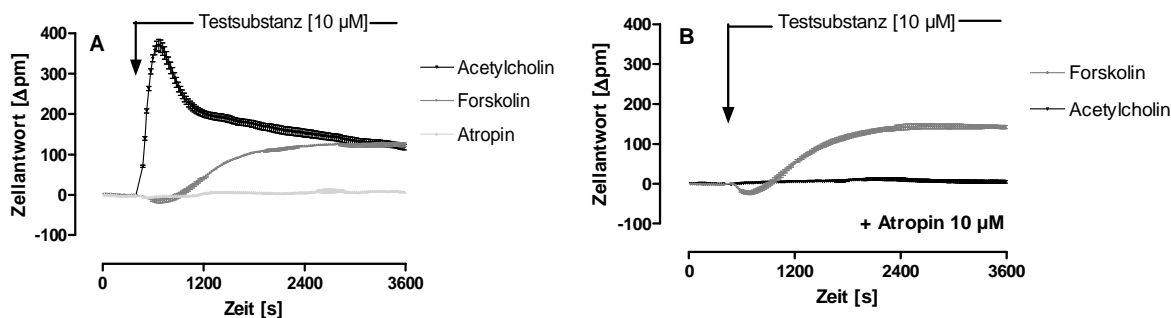


Abb. 119: Durch unterschiedliche Testsubstanzen-induzierte dynamische Massenumverteilung an HEK 293-Zellen auf einer Fibronectin-beschichteten Biosensorplatte. **A:** Ohne Vorinkubation, **B:** Mit einer Atropin [10 μ M]-Vorinkubation über 2,5 h. *Ordinate:* Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [Δ pm]. *Abszisse:* Messdauer in Sekunden [s]. Der Pfeil stellt den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Mittelwerte \pm Standardfehler eines repräsentativen Experimentes, welches in Vierfachbestimmung erhoben und zweifach mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde. Alle Messpunkte einer Testsubstanzen sind durch eine Linie miteinander verbunden sowie Basislinien-korrigiert.

Acetylcholin führte durch Aktivierung endogen exprimierter Muskarinrezeptoren in HEK293-Zellen zu einem stark positiv gerichteten Signal. Die positive Wellenlängenverschiebung war somit nicht verschieden von dem Signal in CHO-Zellen (siehe z.B. 3.1.1. oder 3.3.1.). Forskolin führte ebenfalls zu einer positiven Wellenlängenverschiebung, was sich von dem Forskolin-Signal in CHO-Zellen unterschied. Die Fibronectin-Beschichtung kann nicht verantwortlich für die positive Zellantwort des Forskolin sein, da unter 8.5. gezeigt werden konnte, dass in CHO-Zellen auch auf Fibronectin-beschichteten Platten ein negativ-gerichtetes Forskolin-Signal resultiert. Insofern scheint der zelluläre Kontext zu einer veränderten Signalrichtung zu führen. Die Atropin-Vorinkubation der HEK293 Zellen führte zu einer Inhibition des Acetylcholin-Signales. Somit konnte das Acetylcholin-Signal auf ein spezifisch über Muskarinrezeptoren-induziertes Epic[®]-Signal zurückgeführt werden.

9. Publikationen und Kongressbeiträge

9.1. Publikationen

Schröder, R., Janßen, N., Schmidt, J., Kebig, A., Merten, N., Hennen, S., Müller, A., Blättermann, S., Mohr-Andrä, M., Zahn, S., Wenzel, J., Smith, N.J., Gomeza, J., Drewke, C., Milligan, G., Mohr, K., Kostenis, E.

Deconvolution of complex G protein-coupled receptor signaling in live cells using dynamic mass redistribution measurements

Nature Biotechnology, Volume 28, Nummer 9, September 2010

Schröder, R., Schmidt, J., Blättermann, S., Peters, L., Janßen, N., Grundmann, M., Seemann, W., Kaufel, D., Merten, N., Drewke, C., Gomeza, J., Milligan, G., Mohr, K., Kostenis, E.

Applying label-free dynamic mass redistribution technology to frame signaling of G protein-coupled receptors noninvasively in living cells

(zur Publikation angenommen)

9.2. Abstrakta/ Kongressbeiträge (chronologisch)

Janßen, N., Kebig, A., Mohr-Andrä, M., Mohr, K.

Role of the muscarinic allosteric site for receptor activation: the conserved epitope Trp 7.35 is critical for the potency of acetylcholine at the hM₄ subtype

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, Volume 379 Suppl. 1, April 2009

Janßen, N., Kebig, A., Mohr, K.

Using a new, label-free whole cell assay to get insight into promiscuous signaling of the hM₄-muscarinic acetylcholine receptor

Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG), Oktober 2009, Jena

Janßen, N., Kebig, A., Müller, A., Hennen, S., Kostenis, E., Mohr, K.

Dynamic mass redistribution identifies the signaling pathways of Gi, Gq and Gs-coupled receptors

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, Volume 381 Suppl. 1, March 2010

Janßen, N., Mohr, K.

The Gq-coupled muscarinic M3 receptor gains Gi signaling competence under conditions of enhanced cAMP

Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG), Oktober 2010, Würzburg

Janßen, N., Kebig, A., Mohr, K.

Differential sensitivity of the muscarinic M₂- and M₄ receptor for biased signaling in response to dualsteric agonists

Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology, Volume 383 Suppl. 1, March 2011

Vogel, L., Kaufel, D., Janßen, N., Mohr-Andrä, M., Mohr, K.

Evidence for a differential role of the conserved tryptophan 7.35 in different subtypes of muscarinic acetylcholine receptors

Jahrestagung der Deutschen sowie der Österreichischen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG, ÖPhG), September 2011, Innsbruck, Österreich