

Muskarinische M3-Rezeptoren

Einfluss des orthosterischen / allosterischen Epitops Trp 7.35 auf Ligandbindung, Rezeptoraktivierung und Signalweiterleitung

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Lena Vogel

aus

Köln

Bonn 2015

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

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Klaus Mohr
2. Gutachter: Prof. Dr. Kurt Racké

Tag der Promotion: 17.07.2015

Erscheinungsjahr: 2015

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2010 bis einschließlich Oktober 2014 in der Abteilung Pharmakologie und Toxikologie des Pharmazeutischen Instituts der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Klaus Mohr angefertigt.

Für Papa, Mama und Anna

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Kopplungsverhalten muskarinischer Acetylcholinrezeptoren	3
1.2	Allosterie.....	5
1.2.1	Trp 7.35.....	9
1.3	Dualsterische Substanzen.....	11
1.4	Fragestellung	12
2	Materialien	14
2.1	Eingesetzte Verbindungen	14
2.1.1	Orthosterische Agonisten.....	14
2.1.2	Orthosterische Antagonisten / inverse Agonisten	15
2.1.3	Allosterische Modulatoren.....	16
2.1.4	Dualsterische Substanzen.....	17
2.1.5	Radioliganden.....	18
2.2	Reagenzien und Chemikalien	18
2.3	Lösungen	20
2.4	Geräte.....	22
2.5	Verbrauchsmaterialien.....	24
2.6	Computerprogramme	25
2.7	Datenbanken	25
2.8	Herstellerverzeichnis	25
3	Methoden.....	28
3.1	Zellbiologische Arbeiten	28
3.1.1	Stabile Transfektion der cDNA von M1 W400A	28
3.1.2	Zellkultur.....	30
3.1.3	Herstellung von Membranhomogenaten.....	31
3.1.4	Proteingehaltsbestimmung von Membranhomogenaten (Methode nach Lowry)	32
3.2	Radioligandbindungsversuche.....	33
3.2.1	[³ H]NMS-Dissoziationsexperimente	34
3.2.2	Radioligandbindungsuntersuchungen im Reaktionsgleichgewicht.....	39
3.3	Funktionelle Untersuchungen	49
3.3.1	Das <i>operational model of agonism</i> (Black und Leff, 1983) und die Feststellung eines <i>ligand bias</i>	50
3.3.2	Messung der [³⁵ S]GTPγS-Bindung.....	52

3.3.3	Messung der dynamischen Massenumverteilung (DMR)	54
3.3.4	Messung des intrazellulären IP1-Gehaltes (IP1-Assay)	55
3.3.5	Messung des intrazellulären cAMP-Gehaltes (cAMP-Assay).....	57
3.4	Statistik	58
3.4.1	Der arithmetische Mittelwert und der Standardfehler	58
3.4.2	Statistische Tests	59
4	Ergebnisse.....	62
4.1	Radioligandbindungsversuche.....	62
4.1.1	Das Epitop Trp 7.35 beeinflusst die [³ H]NMS-Dissoziation am M2- und M4-, nicht aber am M1- und M3-Rezeptorsubtyp	62
4.1.2	Das Epitop Trp 7.35 ist nicht relevant für die Gleichgewichtsbindung orthosterischer Antagonisten	64
4.1.3	Das Epitop Trp 7.35 ist an der Bindung allosterischer und dualsterischer Liganden zu Orthosterantagonist-besetzten M3-Rezeptoren beteiligt	68
4.1.4	Die Abhängigkeit der Bindungsaffinität von Trp 7.35 im freien M3-Rezeptorprotein ist ligandgebunden.....	82
4.2	Messung der G-Proteinaktivierung durch [³⁵ S]GTPγS-Bindungsexperimente	97
4.2.1	Optimierung der GDP-Konzentration für [³⁵ S]GTPγS-Bindungsexperimente mit dem muskarinischen M3-Rezeptor	97
4.2.2	An der Acetylcholin- und Iperoxo-induzierten [³⁵ S]GTPγS-Bindung durch den muskarinischen M3-Rezeptor und die M3 Trp7.35→Ala-Mutante ist der Gi-Weg beteiligt	101
4.2.3	Iperoxo und Acetylcholin induzieren eine [³⁵ S]GTPγS-Bindung an M3-Rezeptoren, Iper-6-phthal nicht	105
4.3	Messung der dynamischen Massenumverteilung (DMR)	110
4.3.1	Die in DMR-Experimenten verwendeten CHO-M3-Zellen exprimieren weniger Rezeptoren als CHO-M3 W526A-Zellen	111
4.3.2	Am Iperoxo-induzierten DMR-Signal in CHO-M3-Zellen sind Gq-, Gs-, Gi- und G2/13-vermittelte Effekte beteiligt	111
4.3.3	Am Iperoxo-induzierten DMR-Signal in CHO-M3 W526A-Zellen sind Gq- und Gs-vermittelte Effekte beteiligt, während Gi-Effekte erst bei Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels zu detektieren sind.....	119
4.3.4	Am Iper-6-phthal- und Iper-6-naph-induzierten DMR-Signal in CHO-M3- und CHO-M3 W526A-Zellen sind Gq- und Gs- vermittelte Effekte beteiligt.....	128
4.3.5	Trp 7.35 ist für die Gq-vermittelte Ganzzellantwort von Iper-6-phthal und Iper-6-naph am muskarinischen M3-Rezeptor förderlich.....	133
4.3.6	Trp 7.35 ist für die Gs-vermittelte Ganzzellantwort von Iper-6-phthal und Iper-6-naph am muskarinischen M3-Rezeptor förderlich.....	139
4.4	Messung des intrazellulären IP1-Gehaltes (IP1-Assay)	141

4.4.1	Im IP1-Versuch führt Acetylcholin zu einer Rezeptor-vermittelten Generierung von IP1 in CHO-M3-Zellen	141
4.4.2	Das M3-Rezeptor- Signal im IP1-Versuch ist Gq-vermittelt	142
4.4.3	Die Ausschaltung / Maskierung von Gi- und Gs- Proteinen in CHO-M3 W526A-Zellen erhöht nicht die Iperoxo-, Iper-6-phthal- oder Iper-6-naph-induzierte Generierung von IP1....	145
4.4.4	Agonist-induzierte Generierung von intrazellulärem IP1 durch den muskarinischen M3-Rezeptor unter Berücksichtigung des Einflusses von Trp 7.35.....	146
4.5	Messung des intrazellulären cAMP-Gehaltes (cAMP-Assay)	160
4.5.1	Die in cAMP-Experimenten verwendeten CHO-M3-Zellen wiesen das gleiche Expressionsniveau wie CHO-M3 W526A-Zellen auf, während CHO-M2-Zellen mehr Rezeptoren als CHO-M2 W422A-Zellen exprimierten	160
4.5.2	Methodische Vorversuche mit CHO-M3- und CHO-M3 W526A-Zellen	161
4.5.3	M3 Trp 7.35 ist für die Generierung von cAMP durch Iper-6-phthal und Iper-6-naph nicht hinderlich.....	162
4.5.4	M2 Trp 7.35 ist für die Generierung von cAMP durch Iper-6-phthal- und Iper-6-naph hinderlich.....	165
5	Diskussion.....	169
5.1	Trp 7.35 ist an der Bindungskinetik des Radioliganden [³ H]NMS in Gi-, nicht aber Gq-koppelnden Muskarinrezeptoren beteiligt	169
5.2	Trp 7.35 ist an der Bindung der dualsterischen Substanzen Iper-6-phthal und Iper-6-naph sowie deren allosterischer Fragmente zum orthosterisch besetzten M3-Rezeptor beteiligt	169
5.3	Trp 7.35 trägt zur M2/M3-Subtypselektivität von W84 bei und ist affinitätsgebend für die dualsterischen Liganden Iper-6-phthal und Iper-6-naph	170
5.4	Subtypspezifischer Einfluss von Trp 7.35 auf die Rezeptoraktivierung durch Pilocarpin ...	171
5.5	McN-A-343 zeigt eine von klassischen muskarinischen Agonisten verschiedene Trp 7.35-Abhängigkeit.....	172
5.6	Iperoxo vermittelt Gq-, Gs-, Gi- und G12/13-vermittelte Signale in CHO-M3- Zellen	175
5.7	Die Steigerung des Agonist-vermittelten DMR-Signals in CHO-M3 W526A-Zellen nach Inhibition des Gi- und Maskierung des Gs-Weges im Vergleich zu Kontrollbedingungen geht nicht mit einer Erhöhung des IP3-Gehaltes der Zelle einher	175
5.8	Subtypspezifischer Einfluss der Mutation Trp 7.35→Ala auf die Rezeptoraktivierung durch Iper-6-phthal und Iper-6-naph	176
5.9	Tryptophan 7.35 ist ein konformationssensibles Epitop muskarinischer Acetylcholinrezeptoren	182
6	Zusammenfassung.....	186
7	Literaturverzeichnis.....	188
8	Anhang.....	202

8.1	Kenngrößen der in Bindungs- und [³⁵ S]GTPγS-Versuchen eingesetzten Membranhomogenate	202
8.2	Messung der Bindungsaffinität von Agonisten, Allosteren und Hybridliganden unter Berücksichtigung des Einflusses von Trp 7.35 (Versuche mit Membranhomogenaten)	204
8.2.1	Die Affinität von Acetylcholin zu hoch- und niedrigaffinen Populationen von M2- und M4-Rezeptoren ist Trp 7.35-abhängig.....	204
8.2.2	Trp 7.35 ist ein affinitätsgebendes Epitop für Pilocarpin an M3-, nicht jedoch an M2- und M4- Rezeptoren	206
8.2.3	Trp 7.35 ist nicht an der Affinität von McN-A-343 zu unbesetzten M2- und M3-Rezeptorproteinen beteiligt	208
8.2.4	Trp 7.35 trägt zur M2-Prävalenz von W84 gegenüber dem M3-Rezeptor bei.....	209
8.2.5	Trp 7.35 ist an der Bindung von Iper-6-phthal an orthosterisch besetzten und unbesetzten M3- und M4-Rezeptoren beteiligt.....	211
8.3	Ergebnisse aus [³⁵ S]GTPγS-Bindungsuntersuchungen.....	215
8.3.1	Pilocarpin induziert einen partialagonistischen Effekt an M3-Rezeptoren in [³⁵ S]GTPγS-Bindungsexperimenten	215
8.3.2	Die durch Pilocarpin induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung an M2- Rezeptoren ist nicht von Trp 7.35 abhängig.....	216
8.4	DMR-Messungen	219
8.4.1	Ein Zweistichproben-t-Test bestätigt ein Iperoxo-induziertes DMR-Signal in CHO-M3- und CHO-M3 W526A-Zellen nach Ausschaltung / Maskierung von Gq-, Gs- und Gi-Proteinen .	219
8.5	IP1-Assay	220
8.5.1	CHO-M3- und CHO-M2-Zellen weisen keine spontante IP1-Generierung auf und das Acetylcholin-induzierte Signal ist Muskarinrezeptor-vermittelt.....	220
8.5.2	An der Acetylcholin- und Pilocarpin-induzierten Generierung von IP1 in CHO-M3- und CHO-M3 W526A-Zellen ist der Einfluss von Giβγ-Untereinheiten nicht beteiligt.....	221
8.6	cAMP-Assay	222
8.6.1	Trp 7.35 ist an der Acetylcholin-vermittelten Generierung von intrazellulärem cAMP in CHO-M3-Zellen beteiligt.....	222
8.7	Buchstabencodes der Aminosäuren.....	224
9	Posterpräsentationen.....	225
10	Danksagung	226
11	Lebenslauf	227

1 Einleitung

Nachrichten aus dem Gebiet der Arzneimittelforschung werden von der breiten Öffentlichkeit meist aufmerksam verfolgt. Vor allem Berichte über Innovationen in Therapien seltener Erkrankungen oder die Verleihung hoher Auszeichnungen an internationale Forschergruppen sind in der aktuellen Tagespresse häufig vertreten. Darüber hinaus sind vor allem für Betroffene Informationen über sogenannte Volkskrankheiten wie Herz-Kreislaufkrankungen, Diabetes mellitus oder Asthma bronchiale von großem Interesse. Erkenntnisse über molekulare Wirkungsmechanismen und über die vielzitierten „Risiken und Nebenwirkungen“ sind das Ergebnis jahrelanger Forschung. Dabei stellt die **Charakterisierung einer molekularen Zielstruktur** einen notwendigen Schritt auf dem Weg zur Zulassung eines Arzneistoffes dar. Etwa die Hälfte dieser Strukturen für alle Arzneistoffe, die von der amerikanischen Arzneimittelbehörde FDA zugelassen sind, entfallen auf G-Protein gekoppelte Rezeptoren der Klasse 1, intrazelluläre Rezeptoren, Ligand-gesteuerte sowie auf spannungsabhängige Ionenkanäle (Overington et al., 2006). **G-Protein gekoppelte Rezeptoren** (GPCR, G-protein coupled receptors), die 19 % aller Zielstrukturen von FDA-zugelassenen Arzneimitteln stellen (Stand von 2010; Rask-Andersen et al., 2011), werden in fünf Klassen unterteilt. Mit 672 von etwa 800 bekannten GPCR stellt die erste, auch Rhodopsin-Klasse genannt, die größte dar (Millar und Newton, 2010). Zu ihr gehören beispielsweise purinerge, adrenerge und muskarinische Acetylcholinrezeptoren, die oft therapeutisch genutzt werden. Als weitere Klassen werden die Sekretin-, Adhäsions-, frizzeld/taste- und Glutamatgruppe beschrieben (Millar und Newton, 2010). Diesen Proteinen ist ihre strukturelle Unterteilung in sieben transmembranäre, ringförmig angeordnete Helices gemein, wobei sich das N-terminale Ende extrazellulär und das C-terminale Ende im Cytosol befindet (Caulfield und Birdsall, 1998).

Bei Klasse 1- GPCR liegt die Bindungsstelle für endogene Liganden, die definitionsgemäß als orthosterische Bindungsstelle bezeichnet wird, in der Tiefe der transmembranären Domänen. Die Aktivierung durch einen Agonisten führt bei GPCR zu Konformationsänderungen des Rezeptorproteins, wodurch sich dessen Affinität zu einem in der Nachbarschaft des GPCR gelegenen guanylnukleotidtragenden Proteins (G-Protein) im intrazellulären Bereich erhöht. G-Proteine bestehen aus drei Untereinheiten, die mit α , β und γ bezeichnet werden. Während das Guanylnukleotid (Guanosindiphosphat (GDP) oder Guanosintriphosphat (GTP)) an die α -Untereinheit gebunden vorliegt, ist das Molekül über die $\beta\gamma$ -Untereinheit mit der Zellmembran verbunden (Nishimura et al., 2010). Die Interaktion des G-Proteins mit dem GPCR stellt den Beginn eines Signaltransduktionsweges dar, der extrazelluläre Stimuli in Signale innerhalb der Zelle umwandelt. Der G-Proteinzyklus setzt sich darin fort, dass das im Ruhezustand gebundene GDP durch GTP ausgetauscht wird, wodurch die drei Untereinheiten des G-Proteins dissoziieren. Sowohl die $\beta\gamma$ - als auch die das GTP tragende α -Untereinheit sind in der Lage, je nach G-Proteintyp verschiedene Effektoren innerhalb der Zelle zu beeinflussen. Die α -Untereinheit des G-Proteins besitzt eine GTPase-Aktivität, sodass ein endständiger Phosphatrest des gebundenen GTP abgespalten werden kann. In dieser Situation setzt sich das G-Protein wieder vollständig zusammen und befindet sich wieder im GDP-gebundenen, aktivierbaren Ruhezustand (Milligan und Kostenis, 2006). Dieser Vorgang wird durch RGS-Proteine (regulators of G protein signaling) maßgeblich verstärkt (Dohlman et al., 1997; Clark et al., 2007). Die bis heute entdeckten 16 Subtypen von $G\alpha$ -Untereinheiten werden in die Hauptklassen **Gs**, **Gi/o**, **Gq/11** und **G12/13** unterteilt (Milligan und Kostenis, 2006). Gai/o-Proteine inhibieren das Enzym Adenylatzyklase, wodurch die Konzentration des sekundären

Botenstoffes zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) innerhalb der Zelle sinkt. Gas-Proteine aktivieren das Enzym, wodurch es zum Anstieg von cAMP kommt. $G\alpha_q/11$ -Proteine vermitteln über die Aktivierung der Phospholipase $C\beta$ (PLC β) die Generierung der Botenstoffe Inositol-3-Phosphat und Diacylglycerin aus membranständigem Phosphatidylinositolbisphosphat. Nachgeschaltete Effekte sind ein Anstieg der intrazellulären Calciumionenkonzentration aus dem endoplasmatischen Retikulum und Aktivierung der Proteinkinase C. $G\alpha_{12/13}$ -Proteine stimulieren die Rho-Kinase, wodurch die Kontraktilität des Cytoskeletts beeinflusst wird (Klages et al., 1999; Riobo und Manning, 2005). Effekte, die beispielsweise über die $\beta\gamma$ -Untereinheit des G_i -Proteins vermittelt werden, sind die Aktivierung G-proteinabhängiger Kaliumionenkanäle (GIRK) oder eine Aktivierung der Phospholipase $C\beta$ (Camps et al., 1992; Exton 1996).

Neben G-Protein-abhängigen Mechanismen entfalten GPCR auch G-Protein-unabhängige Effekte. Nach agonistvermittelter Rezeptorphosphorylierung durch sogenannte GRKs (G-Protein gekoppelte Rezeptor-Kinasen) werden β -Arrestine rekrutiert. Wird dadurch der Rezeptor vom G-Protein entkoppelt, wird von Desensibilisierung im engeren Sinne gesprochen. Kann der Komplex aus phosphoryliertem Rezeptor und β -Arrestin nicht mehr aktiviert werden, wird dieser Prozess als „Herunterregulieren“ („downregulation“) oder Desensibilisierung im weiteren Sinne bezeichnet. Dies kann auch Folge einer Internalisierung sein, bei der der Komplex aus phosphoryliertem Rezeptor und β -Arrestin endocytotisch von der Zellmembran ins Cytosol übergeht. Die Rezeptoren können jedoch ihre Ansprechbarkeit im Zellinneren zurückerlangen. Geht dies mit einer erneuten Translokation an die Zelloberfläche einher, spricht man von einem „Rezeptorrecycling“ (Tsuga et al., 1998).

Eine bedeutende Klasse 1-GPCR-Familie stellen die **muskarinischen Acetylcholinrezeptoren** (mAChR) dar. Durch die hohe Sequenzhomologie zu anderen GPCR (Hulme et al., 1990) können Forschungserkenntnisse auf andere Rezeptoren übertragen werden, aber auch durch ihre weite Verbreitung in nahezu allen Geweben und ihre herausragende Rolle als molekulare Zielstrukturen vieler Arzneistoffe sind sie im Fokus vieler nationaler und internationaler Forschungsgruppen.

Als zentrale Rezeptoren des parasympathischen Nervensystems wurden Acetylcholinrezeptoren (benannt nach ihrem endogenen Liganden) erstmals von Dale (1914) beschrieben. Neben nicotinischen Acetylcholinrezeptoren, die ligandgesteuerte Ionenkanäle sind und außer auf postganglionären Neuronen auch im Bereich von motorischen Endplatten lokalisiert sind, entfalten muskarinische Acetylcholinrezeptoren als GPCR ihre Wirkung auf parasympathisch innervierten Organen. Außerdem sind sie im ZNS exprimiert. Bis heute sind fünf Subtypen von mAChR bekannt (M1, M2, M3, M4 und M5) (Bonner et al., 1987).

M1-Rezeptoren werden in der Hirnrinde sowie im Hippocampus, aber auch im Magen exprimiert (Caulfield und Birdsall, 1998). Sie stehen im Fokus intensiver Bemühungen, Therapeutika für die Alzheimersche Krankheit zu finden. In diesem Zusammenhang stellten Marlo et al. (2009) und Ma et al. (2009) beispielsweise Substanzen wie VU0090157 und BQCA vor, die als positive allosterische Modulatoren sowie als allosterische Agonisten (Kapitel 1.2) dieses Subtyps wirken.

M2-Rezeptoren werden im Hinterhirn, auf glatten Muskelzellen und im Herzen exprimiert (Caulfield und Birdsall, 1998). Als Gegenregulation zum Einfluss des Sympathikus wirkt Acetylcholin über diesen Subtyp hier negativ inotrop, negativ chronotrop und negativ dromotrop (Caulfield, 1993).

Muskarinische M3-Rezeptoren werden u.a. im Gehirn (beispielsweise im Hippocampus), im Herzen, auf der Lunge, der Harnblase und auf B-Zellen der Bauchspeicheldrüse exprimiert (Caulfield und

Birdsall, 1998; Gautam et al., 2006a und 2006b; Wess et al., 2007). Ipratropium (Atrovent®) und Tiotropium (Spiriva®) werden als Parasympatholytika in der Therapie der chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) eingesetzt (Simonsson et al., 1975; Keam und Keating, 2004). Durch ihre im Vergleich zu anderen muskarinischen Subtypen langsamere Abdissoziation von M3-Rezeptoren gelten Tiotropium und Umeclidinium (Spiriva®, Incruse®) als „M3-prävalent“ (Disse et al., 1993; Salmon et al., 2013). Dem im Falle der Dranginkontinenz pathologisch erhöhten, M3-vermittelten Tonus des musculus detrusor vesicae (Harnblasenmuskel) wird therapeutisch mit den Antagonisten Oxybutynin (Dridase®), Trospium (Spasmex®), Tolterodin (Detrusitol®), Darifenacin (Emselex®), Fesoterodin (Toviaz®) und Solifenacin (Vesikur®) entgegengewirkt (Postlind et al., 1998; Miyamae et al., 2003; Hedge et al., 2004; Abramov und Sand, 2004; Michel, 2008; Dmochowski et al., 2008). Weiterhin wird das Parasympathomimetikum Pilocarpin (Salagen®) bei Xerostomie in Folge einer Bestrahlungstherapie von Krebspatienten oder bei Morbus Sjögren angewendet. In den Arbeiten von Gautam et al. (2004) und Fox et al. (2001) wird dargestellt, dass der Speichelfluss maßgeblich M3- (und M1-) vermittelt ist und der Einsatz von Pilocarpin in diesem Zusammenhang nicht mit relevanten Wirkungen auf das Herz-Kreislaufsystem einhergeht. Außerdem ist die Aktivierung von M3-Rezeptoren auf B-Zellen der Bauchspeicheldrüse an der Insulinsekretion beteiligt (Gilon et al., 2001; Nakajima et al., 2013). Daher stellt dieser Subtyp ein interessantes „Target“ bei der Suche nach Arzneistoffen gegen Diabetes mellitus dar (Kruse et al., 2014 (I)).

Ohne dass ein entsprechender Arzneistoff bisher zur Marktreife gelangt wäre, stellt der M3-Subtyp potentiell noch in einem weiteren Zusammenhang eine interessante Zielstruktur dar. Wie bereits erwähnt setzen muskarinische Acetylcholinrezeptoren nicht nur G-Protein-abhängige Signalwege in Gang, sondern vermitteln daneben noch weitere intrazelluläre Effekte. Wie für andere Subtypen ist auch für den M3-Rezeptor gezeigt worden, dass es nach Agonistbindung zu Rezeptorphosphorylierung kommt, die nach β -Arrestinrekrutierung zur Internalisierung führt. Poulin et al. (2010) konnten in Mausmodellen zeigen, dass dieser M3-vermittelte, G-Protein-unabhängige Signalweg direkt mit Fähigkeiten bezüglich Lern- und Erinnerungsprozessen der Tiere zusammenhängt. Damit eröffnete sich ein potentieller neuer Weg, zu Arzneistoffen für die Therapie kognitiver Dysfunktionen zu gelangen. Eine Herausforderung stellt in diesem Zusammenhang die Anforderung an die Liganden dar, ein sogenanntes *biased signaling* aufzuweisen, was bedeutet, dass sie in einem ausreichenden Ausmaß den G-Protein-unabhängigen Signalweg bevorzugt aktivieren.

M4-Rezeptoren befinden sich u.a. im basalen Vorderhirn sowie im Striatum. Ihre Modulation wird u.a. mit Arzneistoffen gegen Schizophrenie und Morbus Parkinson ausgenutzt (Wess et al., 2007; Jakubik und El-Fakahany, 2010).

Die Beteiligung von M5-Rezeptoren am Suchtgeschehen, die in der Substantia nigra lokalisiert sind (Caulfield und Birdsall, 1998), rückt die Suche nach Antagonisten dieses Subtyps in den Fokus der Forschung im Gebiet der Entwöhnungstherapie (Wess et al., 2007).

1.1 Kopplungsverhalten muskarinischer Acetylcholinrezeptoren

Der Bereich der orthosterischen Bindungsstelle aller fünf mAChR ist hoch konserviert (Hulme et al., 1990; Wess, 1996). Zum Beispiel ist in allen Subtypen das Asp 3.32 als direkter Bindungspartner des endogenen Agonisten Acetylcholin charakterisiert (Hulme et al., 1995; Wess, 1996). Dabei interagiert der quartäre Stickstoff des Acetylcholins mit der Carboxylgruppe der Asparaginsäure. Ebenso stellt Asp 3.32 einen Interaktionspartner des Antagonisten N-Methylscopolamin dar (Kurtenbach et al., 1990). Für Antagonisten konnte auch Asn 6.52 als Bindungssepitop charakterisiert werden (Wess et

al., 1995). Es sind bis heute keine subtypspezifischen Agonisten oder Antagonisten verfügbar, die als Therapeutika ein deutlich schmaleres Nebenwirkungsspektrum aufweisen würden. Trotz der großen strukturellen Ähnlichkeit der fünf Subtypen kann in Bezug auf die G-Proteinkopplung eine Gi/o-Prävalenz von M2- und M4-Rezeptoren sowie eine vornehmliche Gq/11-Kopplung von M1-, M3- und M5-Rezeptoren beobachtet werden (Wess, 1996; Caulfield und Birdsall, 1998). Der Gq/11-Familie gehören die Gαq-, Gα11-, Gα14- und Gα15 (murin)- bzw. Gα16 (human)-Subtypen an, die neben der durch die Aktivierung der Phospholipase C induzierten Inositol-3-Phosphatgenerierung auch noch andere Signaltransduktionsvorgänge auslösen können (Smrcka et al., 1991; Ho et al., 2001; Hubbard und Hepler, 2006; Milligan und Kostenis, 2006). Es existiert eine Vielzahl von Mutagenesestudien, die die intrazellulären Interaktionspunkte der jeweilig präferenziellen Gα-Untereinheiten charakterisieren. Im Vergleich von präferenziell Gi-koppelnden M2- und vor allem Gq-koppelnden M3-Rezeptoren spielen dabei unter anderem vier Aminosäuren im Übergang der dritten intrazellulären Schleife und der sechsten transmembranären Domäne eine Rolle (AALS-Motiv im M3-, VTIL-Motiv im M2-Rezeptor; Blin et al., 1995; Liu et al., 1995). Durch die Arbeiten von Kruse et al. (2012) und (2013) sowie Haga et al. (2012) ist ein einzigartiger Einblick in die Architekturen der inaktiven Rezeptoren gegeben; für den M2-Rezeptor liegt überdies die Kristallstruktur der aktiven Form vor. Die Autoren postulierten, dass die Kopplungsspezifität mit einer das gesamte Rezeptorprotein involvierenden Konformation zusammenhängt. Nichtsdestotrotz weisen mAChR **Signalwegspromiskuität** auf. Die nachfolgende Tabelle zeigt dies für M2- im Vergleich zu M3-Rezeptoren auf G-Proteinebene auf.

	M2	M3
Gi	Watanabe et al., 1976 Ashkenazi et al., 1987 Michal et al., 2001 Griffin et al., 2007	Offermanns et al., 1994 Burford et al., 1995a Nahorski et al., 1997 Deng et al., 2013
Gs	Michal et al., 2001 Mistry et al., 2005 Michal et al., 2007 Griffin et al., 2007	Jones et al., 1991 Burford et al., 1995b Nahorski et al., 1997 Deng et al., 2013
Gq	Ashkenazi et al., 1987 Vogel et al., 1995 Michal et al., 2007 Griffin et al., 2007	Wess et al., 1989 Hulme et al., 1990 Deng et al., 2013
G12/13	Burstein et al., 1997	Rümenapp et al., 2001 Siehler, 2009 Deng et al., 2013

Tab. 1: Beispielhaft ausgewählte Literaturangaben zur G-Protein-Promiskuität von M2- und M3-Rezeptoren. Fettgedruckte Angaben beziehen sich auf den Kopplungsweg der ersten Wahl.

Spricht man davon, dass ein bestimmter GPCR eine spezielle G-Proteinkopplung aufweist, ist damit in aller Regel gemeint, dass er Mechanismen in Gang setzt, die über die jeweilige Gα-Untereinheit vermittelt ist. Die Giβγ-Untereinheit ist jedoch- wie bereits erwähnt- ebenfalls in der Lage, sich am Signaltransduktionsgeschehen zu beteiligen, in dem durch sie u.a. die Phospholipase C aktiviert werden kann (Camps et al., 1992). Dies konnte sowohl für den M2- (Ashkenazi et al., 1987; Katz et al., 1992; Felder, 1995; Noh et al., 1995; Exton, 1996), als auch für den M3-Rezeptor (Schmidt et al., 1996) beobachtet werden. Dabei kam ein Toxin zum Einsatz, das selektiv Gi-Proteine zu inhibieren

vermag. Es wird aus dem Bakterium *Bordetella pertussis* gewonnen und deshalb mit PTX (Pertussistoxin) bezeichnet (Pittman et al., 1984). Es ist sowohl in der Lage, über die Bindung an Rezeptoren in der Zellmembran intrazelluläre Effekte in Gang zu bringen, als auch nach Penetration in die Zelle ein Adenosindiphosphat-Ribose-Fragment auf einen Cysteinrest der $G_i\alpha$ -Untereinheit zu übertragen (Kaslow und Burns, 1992; Mangmool und Kurose, 2011). Dadurch kann keine Interaktion des G-Proteins mehr mit dem GPCR erfolgen, sodass G_i -vermittelte Effekte nicht mehr an der Zellantwort beteiligt sind.

Neben dem G_i -Protein können auch das G_s - und das G_q -vermittelte Signal moduliert werden, wodurch ein differenzierter Blick auf Rezeptorvermittelte Mechanismen möglich ist. Mit Cholera toxin (CTX; aus *Vibrio cholerae*) kann erreicht werden, dass G_s -vermittelte Effekte nicht mehr detektiert werden können. Dies geschieht nicht durch eine Hemmung, sondern durch eine im Vorhinein maximale Aktivierung des G_s -Proteins. Wenn Zellen mit CTX eine ausreichend lange Zeit vorinkubiert, kann der Rezeptor agonistvermittelt keine weitere G_s -Aktivierung induzieren. Dies geschieht interessanterweise ebenfalls über eine ADP-Ribosylierung der α -Untereinheit. In diesem Fall hat dies jedoch den Effekt, dass die GTPase-Aktivität verloren geht, sodass ein dauerhaft aktivierter Zustand erreicht wird (Sanchez und Holmgren, 2011). Daneben hat der Adenylatzyklaseaktivator Forskolin einen analogen Effekt, mit dem Unterschied, dass er G-Protein-unabhängig agiert, in dem er das nachgeschaltete Effektorprotein beeinflusst (Seamon et al., 1981; Seamon und Daly, 1981).

Mit YM-254890 charakterisierten Takasaki et al. (2004) ein bis dahin als Plättchenaggregationshemmer bekanntes Depsipeptid aus Chromobakterien als selektiven G_q -Inhibitor. Nishimura et al. (2010) beschrieben in einer G_q -Kristallstruktur den genauen Bindungsmodus der Substanz. Demnach verhinderte YM-254890 durch seine Anlagerung zwischen der helikalen und der GTPase-Domäne der α -Untereinheit innerhalb des G_q -Proteins, dass GDP den Komplex verlassen konnte. Dadurch konnte der für die G-Protein-abhängige Signaltransduktion notwendige G-Proteinzyklus nicht ablaufen und G_q -vermittelte Effekte waren nachfolgend nicht mehr an der Ganzzellantwort beteiligt. Die erstmals von Fujioka et al. (1988) aus *Ardisia crenata* (der gekerbten Spitzblume aus der Familie der Myrsinegewächse) isolierte Substanz FR 900359 charakterisierten Nesterov et al. (2010) unter dem Namen 362-63-08. Sie ist strukturell dem YM-254890 nah verwandt und in ähnlicher Weise in der Lage, G_q -vermittelte Effekte wie die Erhöhung intrazellulären Calciums zu inhibieren. Dabei erwies sich 362-63-08 als zehnfach potenter. Auch der erste Schritt des G-Proteinzyklus, der Guanylnukleotidaustausch an der α -Untereinheit des G_q -Proteins, wurde durch die Substanz unterbunden. Unter dem Namen *Gaq-inhibiting component* (QIC; UBO-QIC (FR900359)) kann die Substanz heute über das Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Bonn (Prof. Dr. E. Kostenis und Prof. Dr. Gabriele König) bezogen werden.

Mit PTX, CTX und QIC sind der GPCR-Forschung wertvolle Werkzeuge an die Hand gegeben, einzelne G-Protein-abhängige Signalwege zu untersuchen und die Komplexität von intrazellulären Transduktionsvorgängen detailliert zu beschreiben.

1.2 Allosterie

Aus den griechischen Wörtern *allos* und *stereós* für „anders“ und „Ort“ zusammengesetzt, bezeichnet das Phänomen der Allosterie im Zusammenhang mit der Rezeptorpharmakologie die Einflussnahme eines sich von der orthosterischen Bindungsdomäne für den körpereigenen Botenstoff unterscheidenden Areal auf die Konformation und Funktion des Rezeptorproteins.

Definitionsgemäß sind demnach alle Bindungsstellen als allosterisch zu bezeichnen, die nicht orthosterisch sind. In Bezug auf GPCR gilt also folgerichtig auch die Bindungsdomäne für das G-Protein als allosterische Bindungsstelle, das G-Protein selber als Alloster. Allosterie weisen negative, positive oder neutrale Kooperativität auf, je nachdem ob sie die Affinität eines zweiten Liganden (beispielsweise des endogenen Agonisten Acetylcholin) verringern, erhöhen oder unverändert lassen (Monod et al., 1965) bzw. deren Bindung inhibieren, fördern oder unverändert lassen (Ehlert, 1988). Daneben vermögen allosterische Agonisten ohne die Anwesenheit eines orthosterischen Agonisten Einfluss auf den Rezeptoraktivierungs-Zustand zu nehmen, beispielsweise also bei entsprechender Struktur eine aktive Rezeptorkonformation hervorzurufen.

Lüllmann et al. (1969) beobachteten erstmals einen **nicht kompetitiven Antagonismus** von Alkanbisammoniumverbindungen an Meerschweinchenvorhöfen, einem klassischen M2-Model. Deren Leitstruktur W84 wird auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzt. Die Autoren führten ihre Beobachtungen auf einen bis dahin nur auf Enzymebene beschriebenen allosterischen Effekt der Verbindungen am Rezeptorprotein zurück (Monod et al., 1965; Karlin, 1967). Der nächste Ligand, für den eine allosterische Modulation des endogenen Liganden Acetylcholin an muskarinischen Rezeptoren postuliert wurde, war Gallamin und wurde 1976 von Clark und Mitchelson beschrieben. Sowohl auf Bindungsebene als auch durch funktionelle Experimente konnte in den Jahren darauf eine Vielzahl von Substanzen, die teilweise von großer struktureller Vielfalt waren, als allosterische Modulatoren charakterisiert werden (Birdsall et al., 1983; Stockton et al., 1983; Melchiorre et al., 1987; Melchiorre et al., 1989; Lee und El-Fakahany, 1991). Als starker Hinweis auf allosterisches Verhalten gilt bis heute die Fähigkeit einer Substanz, die Dissoziation eines orthosterischen Liganden zu modulieren (Stockton et al., 1983; Lazareno und Birdsall, 1995). In funktionellen Experimenten fallen allosterische Inhibitoren insoweit auf, dass sie außerstande sind, Konzentration-Effekt-Kurven von Agonisten „endlos“ weiter zu höheren Konzentrationen zu verschieben, wie es für klassische, kompetitive Antagonisten beobachtet werden kann (Arunlakshana und Schild, 1959; Lüllmann et al., 1969; Clark und Mitchelson, 1976).

Allosterische Modulatoren sind für jeden der fünf muskarinischen Rezeptoren gefunden worden. Dabei entfalten sie jedoch unter Umständen je nach Subtyp unterschiedliche Eigenschaften. Beispielsweise erwies sich Alcuronium an M2- und M4-Rezeptoren als positiv kooperativ mit N-Methylscopolamin, einem orthosterischen Antagonisten, während der Modulator an M1-, M3- und M5-Rezeptoren negativ kooperativ war (Jakubik et al., 1995). Interessanterweise stellte sich außerdem heraus, dass die Substanzen in der Mehrheit zum M2-Rezeptor die höchste Affinität aufwiesen, während sie zum M3-Rezeptor deutlich schwächer affin waren (Mitchelson, 1987; Ellis et al., 1991; Jakubik et al., 1995; Conn et al., 2009; Jakubik und El-Fakahany, 2010; Dror et al., 2013). Eine bedeutende Rolle mag dabei die Aminosäure Lys523 im M3-Rezeptor spielen. Im Interaktionsareal allosterischer Modulatoren gelegen, reduziert ihr basischer Charakter die Affinität der in der Regel positiv geladenen Liganden. Im Gegensatz dazu sind in allen anderen fünf Subtypen an analoger Stelle nicht-basische Aminosäuren positioniert (Dror et al., 2013).

Die den orthosterischen Liganden überwiegend fehlende **Subtypselektivität** allosterischer Modulatoren ist unter dem Aspekt der Arzneimittelentwicklung sehr attraktiv. Denn mit dieser Eigenschaft kann es gelingen, gezielter als zuvor einzelne Subtypen anzusprechen, während ihre Effekte an anderen Subtypen nicht zum Tragen kommen. Dieses Prinzip öffnete in Bezug auf die Grundlagenforschung neue Türen und wird- wenn auch bisher nicht auf dem Gebiet der mAChR-bereits therapeutisch ausgenutzt.

Mit Cinacalcet (Mimpara®) hielt 2004 der erste allosterische Modulator Einzug in die Arzneimitteltherapie. Bei Patienten mit sekundärem Hyperparathyreoidismus in Folge einer Niereninsuffizienz kommt es durch die körpereigene Gegenregulation der verminderten Ca^{2+} -Resorption im Darm in Form einer erhöhten Parathormonausschüttung zu einer renalen Osteodystrophie (Calciumfreisetzung durch Knochensubstanzabbau). Die Konzentration an Ca^{2+} wird über einen GPCR registriert, der zur Unterklasse C- oder auch Glutamatklasse gehört; dem sog. calciumsensitiven Rezeptor. Wird dieser durch Cinacalcet positiv allosterisch moduliert, steigt die Empfindlichkeit der Parathormon-bildenden Zellen für Ca^{2+} an, so dass bei einer gegebenen Konzentration von Ca^{2+} weniger Parathormon ausgeschüttet wird (Kebig und Mohr, 2008).

Maraviroc (Celsentri®) ist ein allosterischer Antagonist des CCR5-Rezeptors. Er ist seit 2007 zugelassen und wird in Kombination mit anderen antiretroviral wirksamen Substanzen in der HIV-Therapie eingesetzt. Die Zielstruktur des Arzneistoffs, ein Chemokinrezeptor, ist an der Aufnahme des Virus in die Zielzelle beteiligt. Maraviroc ist der erste Vertreter allosterischer Modulatoren für einen GPCR der Rhodopsinklasse (Abel et al., 2009).

Im Jahr 2009 erhielt Plerixafor (Mozobil®) die Zulassung auf dem deutschen Markt zur Therapie von Patienten mit Lymphom oder multiplen Myelom, die hämatopoetische Stammzellen in Form einer autologen Transplantation erhalten sollen. Dieser allosterische Antagonist am CXCR4-Rezeptor verhindert die Bindung des endogenen Liganden CXCL 12, wodurch es zur verstärkten Mobilisierung der Zellen kommt (Slater, 2012).

Mutmaßten Tuček und Proška (1995) bereits, dass der Bindungsbereich für die gefundenen allosterischen Substanzen im extrazellulären Bereich in der Nähe der orthosterischen Bindungsdomäne positioniert sein muss, deckten dies erst Mutagenesestudien auf. Dabei wurden Bereiche mit schwach ausgeprägter Homologie zwischen den Subtypen genauer untersucht. Die in der zweiten extrazellulären Schleife gelegene EDGE-Sequenz im M2-Subtyp (Glu 172, Asp 173, Gly 174, Glu 175) erwies sich als maßgeblich an der M2-M3-Selektivität von Alcuronium und Gallamin beteiligt (Leppik et al., 1994). Matsui et al. (1995) charakterisierten erstmals das im Übergangsbereich der dritten extrazellulären Schleife und siebter transmembranären Domäne gelegene **Trp 7.35** im M1-Rezeptor (Trp 400) als allosterisches Epitop. Trp 423 und Tyr 177 des M2-Rezeptors wurden von Buller et al. (2002) und Voigtländer et al. (2003) als Bindungsepitope allosterischer Modulatoren von mAChR gefunden. Im M3-Rezeptor ist das Epitop F222, welches die korrespondierende Aminosäure zu M2 Y177 ist, an der optimalen Rezeptorkonformation für die N-Methylscopolaminbindung beteiligt (Martinez- Archundia et al., 2012). Die Arbeit von Prilla et al. (2006) erwies, dass das konservierte Trp 7.35 auch im muskarinischen M2-Rezeptor (Trp 422) an der Bindung von Allosteren beteiligt ist. Es vermittelt laut zuletzt genannten Autoren Basisaffinität sowie Subtypselektivität von allosterischen Modulatoren an mAChR.

Die auf diese Weise für bis dahin bekannte allosterische Modulatoren gefundene Bindungsregion wird in der Literatur häufig als *common allosteric binding site* bezeichnet. Tatsächlich sind manche Substanzen beschrieben worden, die abweichende Bindungsareale aufwiesen. McN-A-343 als muskarinischem Partialagonisten (Roszkowski, 1961) wurde von Valant et al. (2008) ein bitopischer Bindungsmodus an M2-Rezeptoren zugesprochen. Damit ist gemeint, dass ein Ligand sich gleichzeitig sowohl an orthosterische wie auch allosterische Bereiche bindet. Die Substanz zeigte jedoch u.a. in Mutagenesestudien nicht das gleiche Verhalten wie andere allosterische Modulatoren (J. Antony, Dissertationschrift, 2007; vorliegende Arbeit). In den Arbeiten von Lazareno et al. (2000), Lazareno et

al. (2002), Tränkle et al. (2005) und Lanzafame et al. (2006) wurden Substanzen vorgestellt, die offensichtlich allosterisches Verhalten an muskarinischen Rezeptoren aufwiesen, deren Eigenschaften wie die Einflussnahme auf die Dissoziation eines orthosterischen Liganden jedoch darauf schließen ließen, dass sie andere Bindungsdomänen als klassische allosterische Modulatoren wie Gallamin und Strychnin nutzen. In Übereinstimmung mit dieser Vorstellung erwiesen sich die Substanzen WIN 51708 und PG987 als nicht kompetitiv mit diesen „klassischen“ Substanzen (Lazareno et al., 2002).

Die physiologische Funktion einer allosterischen Bindungsregion ist bis heute nicht vollständig geklärt. Es wurde jedoch in mehreren Studien beschrieben (siehe unten), dass der Bereich als „Vorhof zur orthosterischen Bindungsstelle“ teilweise maßgeblich in das Geschehen der Ligandbindung, der Rezeptoraktivierung und des Kopplungsverhalten involviert ist.

Kruse et al. (2012) gelang es, über Moleküldynamiksimulationen zu zeigen, dass der muskarinische Antagonist Tiotropium auf seinem Weg zur orthosterischen Bindungsstelle und bei seinem Austritt aus diesem Bereich für eine bestimmte Zeit einen metastabilen Bindungszustand im allosterischen Areal von M2- und M3-Rezeptoren einnimmt. Die Autoren brachten diese Beobachtungen erstmals mit der unterschiedlichen Halbwertszeit des Liganden zu diesen beiden Subtypen in Verbindung. Wie bereits erwähnt, konnte für das Epitop M3 F222 in der zweiten extrazellulären Schleife, deren analoge Aminosäure im M2-Rezeptor (Y177) als allosterisches Epitop charakterisiert wurde, ein Beitrag zur optimalen Rezeptorkonformation für die N-Methylscopolaminbindung gezeigt werden (Martinez-Archundia et al., 2012). Auch für orthosterische Liganden an β 1- und β 2-Rezeptoren waren metastabile Bindungszustände im allosterischen Bereich nachgewiesen worden (Dror et al., 2011). Darüber hinaus wiesen die Autoren dem allosterischen Areal die Aufgabe zu, an der für die Bindung in der orthosterischen Bindungstasche notwendige Dehydratation der Liganden beteiligt zu sein. Der allosterische Bereich des muskarinischen M2-Rezeptors konnte von Bock et al. (2012) mit der Fähigkeit des Rezeptorproteins in Verbindung gebracht werden, für die Aktivierung und für das promiskuitive Kopplungsverhalten optimale Konformationsübergänge zu gewährleisten. Diese Schlussfolgerungen wurden durch die Untersuchung der Kristallstruktur des aktivierten M2-Rezeptors untermauert (Kruse et al., 2013). Die Autoren waren in der Lage, die schon für β 2- und Adenosin A2A- Rezeptoren (Lebon et al., 2011; Rasmussen et al., 2011) belegten, der Rezeptoraktivierung zugrunde liegenden Molekülbewegungen auf den M2-Subtyp muskarinischer Rezeptoren zu übertragen. Dabei war zu beobachten, dass u.a. durch Auswärtsbewegungen der transmembranären Helices 5 und 6 bei Aktivierung des Rezeptors eine Aufweitung des intrazellulären Areals resultierte, was bereits bei anderen GPCR mit der Rezeptorinteraktion zu G-Proteinen in Verbindung gebracht wurde. Die Ergebnisse von Hu et al. (2010) ließen die Autoren mutmaßen, dass dies auch auf den M3-Rezeptor zutrifft. Darüber hinaus verengte sich im Geschehen der Rezeptoraktivierung des M2-Rezeptors der extrazelluläre Bereich um die orthosterische und allosterische Bindungsdomäne (Kruse et al., 2013). Daran waren vor allem die Helices 5, 6 und 7 beteiligt. Die erwähnten Studien konnten demnach zeigen, dass der allosterische Bereich des muskarinischen M2-Rezeptors maßgeblich an den für die aktive Konformation notwendigen Umgestaltungen des Rezeptorproteins beteiligt ist.

Durch die unterschiedliche Kopplungsprävalenz von M2- und M3-Rezeptoren, zusammen mit einer verhältnismäßig gut etablierten Studienlage, eignet sich der direkte Vergleich dieser beiden Subtypen ganz besonders, um Erkenntnisse über die Dynamik der Rezeptorproteine zu gewinnen, die zu aktiven Konformationen führt (Kruse et al., 2012).

1.2.1 Trp 7.35

Das über alle fünf muskarinische Rezeptorsubtypen konservierte Trp 7.35 (Nomenklatur von Ballesteros und Weinstein, 1995) wies in der Vergangenheit bereits interessante Eigenschaften auf.

In den Sequenzen der einzelnen Subtypen wird es auch mit M1 W400, M2 W422, M3 W526, M4 W435 und M5 W477 bezeichnet, wobei der Buchstabe W im Einbuchstabencode Tryptophan bezeichnet und die anschließende Zahl die Position des Epitops innerhalb der Aminosäuresequenz beginnend mit dem extrazellulär gelegenen Aminoterminus- angibt. Es ist- je nach Subtyp und zugrunde gelegter Quelle- im Übergang der dritten extrazellulären Schleife und der siebten transmembranären Domäne lokalisiert. Abb. 1 zeigt einen sogenannten *snake plot* des humanen M3-Rezeptors, bei dem die gesamte Sequenz in die sieben transmembranären Domänen, den je drei intra- und extrazellulären Schleifen sowie dem extrazellulären Aminoterminus und den intrazellulären Carboxyterminus unterteilt ist. Die ringförmige Anordnung der Helices in der Zellmembran ist der Abbildung nicht zu entnehmen. Trp 7.35 (M3 W526) ist am rechten Bildrand in Rot markiert. Im Vergleich zu den vier anderen Subtypen ist der M3-Rezeptor mit 590 Aminosäuren das größte Protein (M1: 460 AS, M2: 466 AS, M4: 479 AS, M5: 532 AS; Datenbank UniProtKB/Swissprot, Version vom 01.02.1991), das mit einer besonders langen dritten intrazellulären Schleife (240 Aminosäuren) ausgestattet ist.

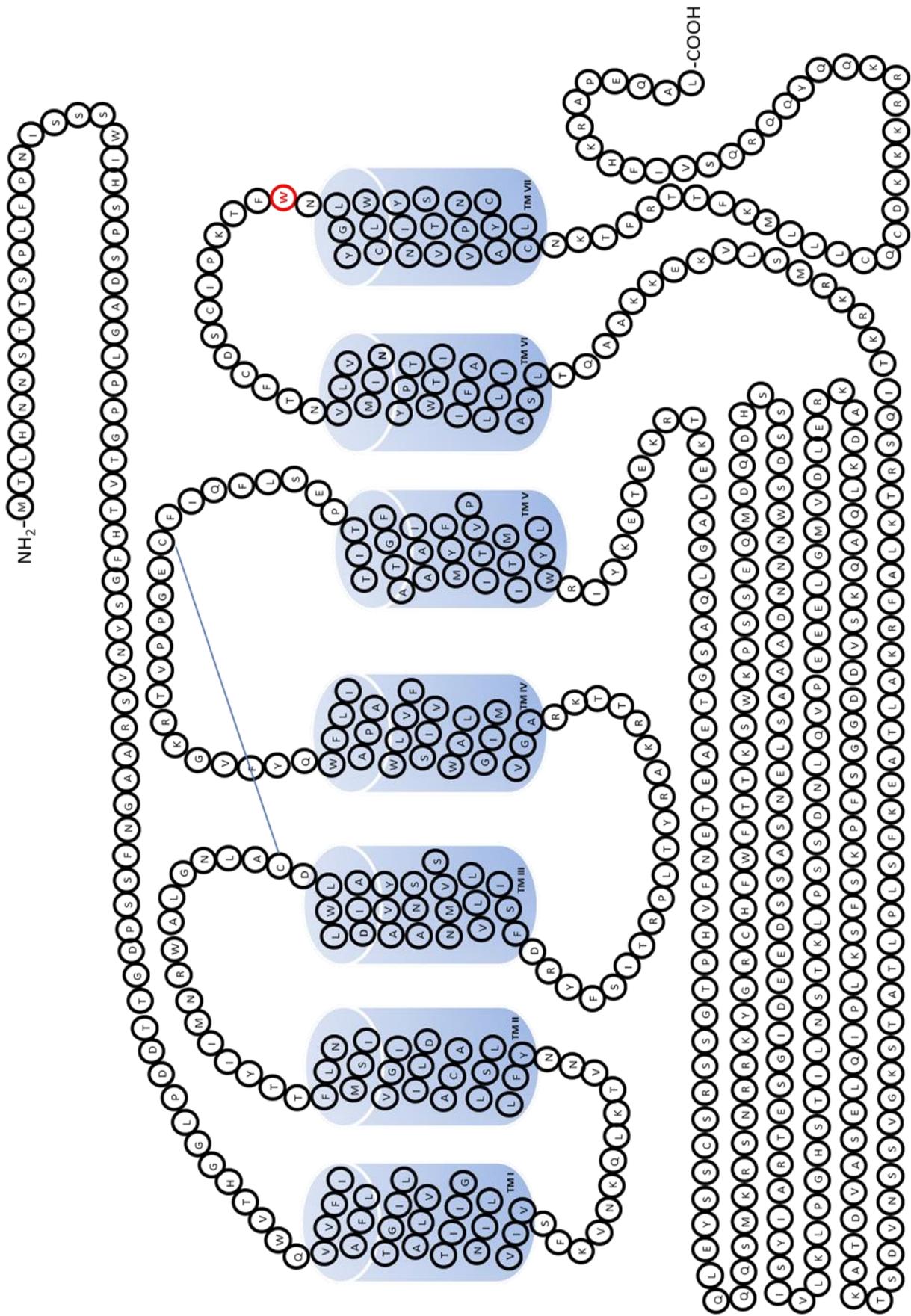


Abb. 1: Snake plot des humanen M3-Rezeptors (nach UniProtKB/Swissprot, Stand 01.02.1991). Rot umrandet ist das Trp 7.35. Die Linie deutet eine Disulfidbrücke zwischen C141 und C221 an. TM I-VII: Transmembranäre Domäne I-VII

Trp 7.35 wurde als Bindungsepitop für allosterische Modulatoren an M2 und M5-Rezeptoren (Prilla et al., 2006) charakterisiert, jedoch nicht für orthosterische Antagonisten (Prilla et al., 2006). Es konnte ebenso als affinitätsgebende Aminosäure für orthosterische Vollagonisten an M2- und M3-Rezeptoren identifiziert werden (Jäger et al., 2007; Li et al., 2007). In Bezug auf den M2-Rezeptor brachte dies dieser Aminosäure den Namen eines „janusköpfigen Epitops“ ein (Jäger et al., 2007), da es so schien, dass es je nach Rezeptorkonformation in Richtung der allosterischen Bindungsstelle (inaktiver Rezeptor) oder in Richtung der orthosterischen Bindungsstelle (aktiver Rezeptor) ausgerichtet sei. In der Kristallstruktur des aktiven M2-Rezeptors in der Arbeit von Kruse et al. (2013) ist zu beobachten, dass es in Richtung des orthosterischen Agonisten Iperoxo zeigt, sich die Stellung des Epitops aber bei gleichzeitiger Besetzung des allosterischen Haftareals durch den positiven allosterischen Modulator LY-2119620 in dessen Richtung ändert.

Analog zur Bindungsabhängigkeit orthosterischer Agonisten von Trp 7.35 erwies es sich im M2-Rezeptor ebenso als ein an der Aktivierung beteiligtes Epitop (Jäger et al., 2007). Dies konnte von Janßen (Dissertationsschrift, 2011) ebenfalls für den M4-Rezeptor beobachtet werden.

Bock et al. (2012) konnten u.a. mithilfe der M2 W422A-Mutante den Bereich der allosterischen Bindungsstelle im M2-Rezeptor als Areal charakterisieren, das Spielraum für zur Rezeptoraktivierung notwendige Konformationsänderungen bereitstellt.

Untersuchungen von Rezeptormutanten, bei denen Trp 7.35 durch eine andere Aminosäure (wie zum Beispiel Alanin) ersetzt wurde, deckten also bereits in der Vergangenheit eine interessante Rolle dieses Epitops an verschiedenen Subtypen muskarinischer Acetylcholinrezeptoren auf. Seine besondere Lage im Übergangsbereich zwischen orthosterischer und allosterischer Bindungsdomäne und seine u.a. durch Mutagenesestudien aufgedeckte, von der aktuellen Rezeptorkonformation abhängige Ausrichtung verleiht Trp 7.35 den Status einer Sonde zur Untersuchung essentieller Konformationsänderungen im extrazellulären Bereich in Folge der Rezeptoraktivierung.

1.3 Dualsterische Substanzen

Dualsterische Substanzen sind Liganden von GPCR, die mit einem Teil des Moleküls Affinität zur orthosterischen Bindungstasche aufweisen, während gleichzeitig ein anderer Teil im Bereich des allosterischen Areals bindet.

Auf dem Gebiet der muskarinischen Acetylcholinrezeptoren ist seit Jahrzehnten der Partialagonist **McN-A-343** bekannt (Roszkowski, 1961), für den eine solche bitopische Bindung im muskarinischen M2-Rezeptor postuliert wurde (May et al., 2007; Valant et al., 2008).

Durch gezieltes Design, u.a. mit Verknüpfung des orthosterischen und allosterischen Molekülteils durch eine Alkylkette, sind erstmals dualsterisch bindende Moleküle von Disingrini et al. (2006), Steinfeld et al. (2007) und Antony et al. (2009) für muskarinische Acetylcholinrezeptoren systematisch entwickelt worden. Während Steinfeld et al. (2007) Untersuchungen mit einem dualsterischen *Antagonisten* durchführten, konnten durch Disingrini et al. (2006) und Antony et al. (2009) dualsterische *Agonisten* identifiziert werden, die als Leitstrukturen den Ausgangspunkt intensiver Forschung auf dem Gebiet der Hybridliganden bildeten. Zwei Substanzen finden Anwendung in der vorliegenden Arbeit, **Iper-6-phthal** und **Iper-6-naph**, deren orthosterischer Molekülteil Iperoxo über eine Alkylkette von sechs C-Atomen mit einem allosterischen Fragment verbunden sind (Abb. 2). Die in den beiden Liganden vorkommenden allosterischen Fragmente sind 6-Phthal und 6-Naph, deren Muttersubstanzen das W84 und das Naphmethonium sind, zwei

langjährig untersuchte, klassische allosterische Modulatoren mit klarer M2- versus M5-Selektivität (Lüllmann et al., 1969; Jepsen et al., 1988; Muth et al., 2003; Prilla et al., 2006).

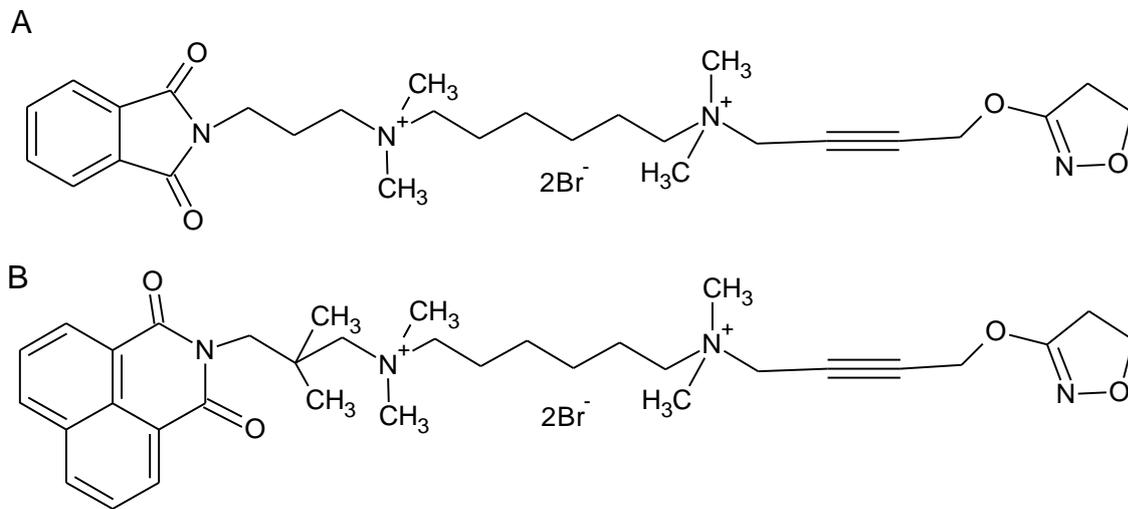


Abb. 2: Strukturformeln von Iper-6-phthal (A) und Iper-6-naph (B)

Als einzigartige Eigenschaft zeigten diese Liganden neben der Fähigkeit, durch den orthosterischen Molekülteil induziert eine Rezeptoraktivierung hervorzurufen, eine über den allosterischen Molekülteil vermittelte **Subtypselektivität** (Antony et al., 2009; Matera et al., 2014).

Die Arbeit von Matera et al. (2014) fokussierte auf die Untersuchung analgetischer Effekte einiger Hybridliganden mit unterschiedlichen orthosterischen und allosterischen Fragmenten sowie Zwischenkettenlängen. Die Rolle von mAChR in antinozizeptiven Vorgängen beschrieben Pan et al. (2008). Matera et al. (2014) konnten u.a. für Iper-6-phthal und Iper-6-naph einen analgetischen Effekt im sogenannten „writhing test“ an Mäusen beobachten.

Hybridliganden mit variierenden Zwischenkettenlängen wurden in der Arbeit von Bock et al. (2012) eingesetzt. Ihr Aktivierungsprofil half bei der Interpretation der unterschiedlichen Reaktion des Rezeptorproteins auf den Aktivierungsimpuls. Die vorgestellten Substanzen stellen **dynamische Liganden** dar, was bedeutet, dass sie sich an Rezeptoren im dualsterischen sowie im rein allosterischen Modus anlagern können. In zuletzt genanntem Fall ist die orthosterische Bindungsdomäne nicht besetzt, da der orthosterische Teil des Moleküls gewissermaßen aus dem Rezeptorprotein herausragt (Antony et al., 2009; Bock et al., 2012; Bock et al., 2014). Das Verhältnis der Bindungsmodi 'dualsterisch versus allosterisch' ist dabei von den jeweiligen Affinitäten der mit dem Rezeptor interagierenden Molekülteile abhängig. Damit ist die Qualität und das Ausmaß der von diesen Substanzen induzierten intrazellulären Transduktionsvorgängen „einstellbar“ über die chemische Struktur und das daraus folgende Verhältnis von dualsterischer zu rein allosterischer Bindung (Bock et al., 2014).

1.4 Fragestellung

Mit vergleichenden Studien an M2- und M3-Rezeptoren gelang es in der Vergangenheit, wertvolle Erkenntnisse über Aufbau, Ligandbindungs- und Aktivierungscharakteristika von GPCR zu gewinnen. Die zu anderen Vertretern dieser Rezeptorfamilie ausgeprägte Sequenzhomologie erlaubte dabei, in gewissen Grenzen auch Rückschlüsse auf die Eigenschaften jener Rezeptoren zu ziehen. Auf dem

Forschungsgebiet der Rezeptorallosterie diene vor allem der M2-Subtyp als „Paradebeispiel“ eines GPCR, da er im Allgemeinen die höchste Affinität zu allosterischen Modulatoren aufwies (Mitchelson, 1987; Ellis et al., 1991; Jakubik et al., 1995; Conn et al., 2009; Jakubik und El-Fakahany, 2010; Dror et al., 2013). Die durch allosterische Liganden bzw. Ligandbausteine erzeugbare Subtypselektivität stellt eine vielversprechende Aussicht dar, therapeutisch nutzbare Liganden zu finden, die ein schmaleres Nebenwirkungsspektrum aufweisen als nicht-subtypselektive Substanzen.

Die bedeutende Rolle des **M3-Rezeptors** als potentielle Zielstruktur für Arzneimittel (Kapitel 1) steigert die Attraktivität dieses Subtyps vor dem Hintergrund der Suche nach subtypselektiven und damit nebenwirkungsärmeren Liganden. In der vorliegenden Arbeit sollte daher der Einfluss des allosterischen Bereichs des M3-Subtyps auf die Ligandbindung und die Rezeptoraktivierung im Vergleich zum M2-Subtyp näher charakterisiert werden. Es wurde drei Fragen nachgegangen.

1. Die Aminosäure Trp 7.35 ist als affinitätsgebendes Epitop für allosterische Modulatoren an M2- und M5- Rezeptoren identifiziert worden. Darüberhinaus ist es an der Bindung orthosterischer Agonisten und deren Rezeptoraktivierung in M2- und M4-Rezeptoren beteiligt (Prilla et al., 2006; Jäger et al., 2007; Janßen, Dissertationsschrift, 2011). Der damit für die Gi-koppelnden Subtypen festgestellte Charakter eines „janusköpfigen“ Epitops (Jäger et al., 2007) an der Nahtstelle zwischen orthosterischem und allosterischem Areal führte zu der Frage, ob eine andersartige Kopplungsprävalenz mit einer andersartigen Rolle von Trp 7.35 für das Bindungs- und Aktivierungsverhalten verbunden ist. Dies sollte mittels der M3 Trp 7.35→Ala-Mutante geklärt werden.
2. Das Muster der Signalwegsaktivierung des in dieser Arbeit stabil in CHO-Zellen transfizierten M3-Rezeptors sollte im Vergleich zur M3 Trp 7.35→Ala- Mutante detailliert aufgeklärt werden. Zur Untersuchung des Beitrages jedes einzelnen G-Protein-Signalweges an der rezeptorvermittelten Ganzzellantwort wurden DMR-Messungen an CHO-M3- und CHO-M3 Trp→Ala-Zellen durchgeführt, um Auswirkungen unterschiedlicher Signalamplifikationsniveaus auszuschießen.
3. Der Einsatz der dualsterischen Liganden Iper-6-phthal und Iper-6-naph sowie die Untersuchung der Auswirkung der Trp 7.35→Ala-Mutation hatte in der Vergangenheit zu der Erkenntnis geführt, dass der allosterische Bereich des vorwiegend Gi-aktivierenden M2-Rezeptors für eine volle Kopplungskompetenz ein gewisses Maß an Flexibilität aufweisen muss (Bock et al., 2012). Die Autoren konnten zeigen, dass die Mutation des Trp 7.35 zu Alanin im M2-Rezeptor die intrinsische Aktivität der dualsterischen Liganden erhöhte. Damit war verdeutlicht worden, dass Konformationsänderungen im extrazellulären Bereich des Rezeptorproteins mit dem Aktivierungsverhalten, das in Form der G-Protein-Kopplung intrazelluläre Prozesse beinhaltet, zusammenhängen. Mit der Untersuchung der Aktivierung des M3-Rezeptors durch die dualsterischen Substanzen Iper-6-phthal und Iper-6-naph und des Einflusses der Trp 7.35→Ala-Mutation auf ihre intrinsische Aktivität sollte geklärt werden, inwieweit sich die Einflussnahme des allosterischen Bereichs auf die Rezeptoraktivierung zwischen präferenziell Gi- und Gq-koppelnden Rezeptoren unterscheidet.

2 Materialien

2.1 Eingesetzte Verbindungen

Im Folgenden werden alle in dieser Arbeit eingesetzten Liganden an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren vorgestellt. Eine Ausnahme stellt der Radioligand [³⁵S]GTPγS dar, der Affinität zu G-Proteinen aufweist.

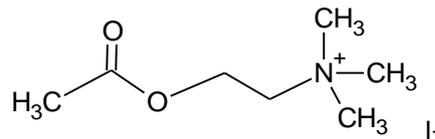
2.1.1 Orthosterische Agonisten

Acetylcholiniodid (ACh)

273,11 g/mol

Artikelnummer/Hersteller:

A7000/Sigma



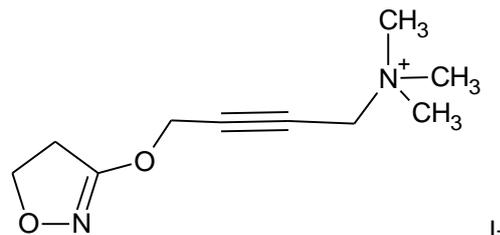
Acetylcholin ist der endogene Agonist sowohl muskarinischer (GPCR) als auch nicotinischer Rezeptoren (ligandgesteuerte Ionenkanäle).

Iperoxiodid

324,16 g/mol

Artikelnummer/Hersteller:

-/ AK Holzgrabe, Universität Würzburg,
Deutschland



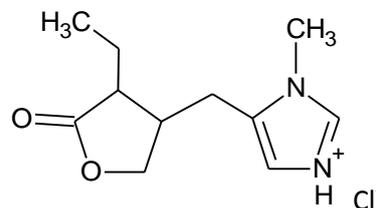
Iperoxo ist ein Superagonist an muskarinischen M2-Rezeptoren (Schrage et al., 2013).

Pilocarpin-HCl

244,7 g/mol

Artikelnummer/Hersteller:

P6503/Sigma



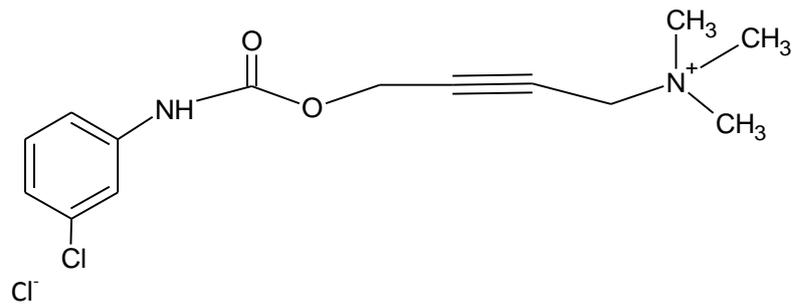
Pilocarpin ist als muskarinischer Partialagonist beschrieben (Figuroa et al., 2008) und wird in der Therapie von Glaukomerkrankungen (Pilomann® 1%) und zur Besserung von Xerostomiesymptomen (Salagen®) genutzt.

McN-A-343

317,2 g/mol

Artikelnummer/Hersteller:

C7041/Sigma



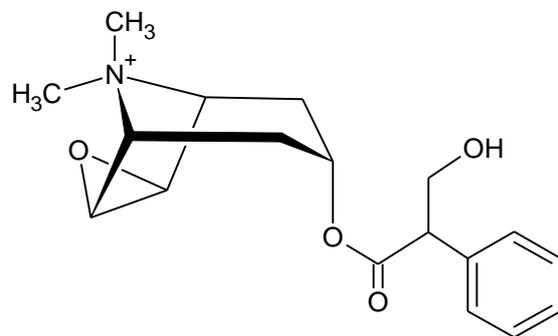
Diese Substanz ist als muskarinischer Partialagonist beschrieben, der am M2-Subtyp eine bitopische Bindungsausrichtung einnimmt (Valant et al., 2008; Mitchelson, 2012).

2.1.2 Orthosterische Antagonisten / inverse Agonisten**N-Methylscopolaminbromid**

398,3 g/mol

Artikelnummer/Hersteller:

S8502/Sigma

Br⁻

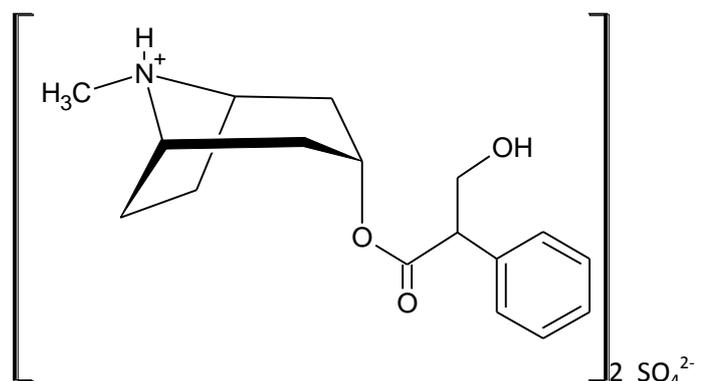
Es handelt sich um einen experimentell einsetzbaren, kompetitiven Muskarinrezeptorantagonisten/ inversen Agonisten.

Atropinsulfat

676,8 g/mol

Artikelnummer/Hersteller:

A0257/Sigma



Atropinsulfat wird als kompetitiver muskarinischer Rezeptorantagonist genutzt, um die Akkommodation auszuschalten (Fachinformation Atropin-POS® 0,5%, Stand Juni 2007).

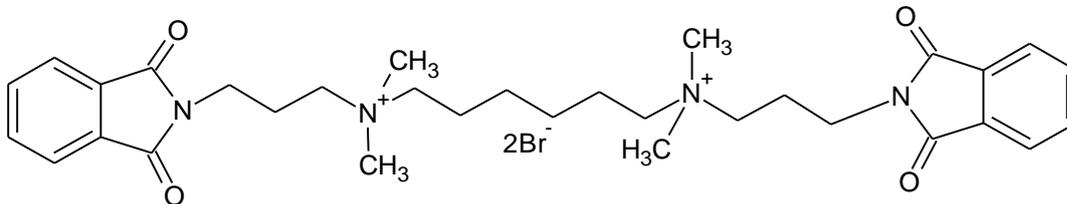
2.1.3 Allosterische Modulatoren

W84 (Hexamethylen-*bis*-[dimethyl-(3-phthalimidopropyl)ammonium]dibromid)

708,5 g/mol

Artikelnummer/Hersteller:

-/Dr.Pfeffer, Universität Kiel, Deutschland



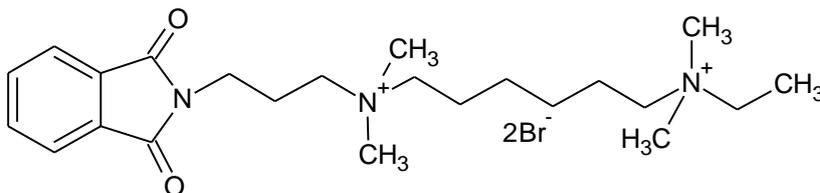
Die Substanz wurde erstmals von Lüllmann et al. (1969) beschrieben.

6-Phthal (Dibromid)

549,38 g/mol

Artikelnummer/Hersteller:

-/AK Holzgrabe, Universität Würzburg,
Deutschland



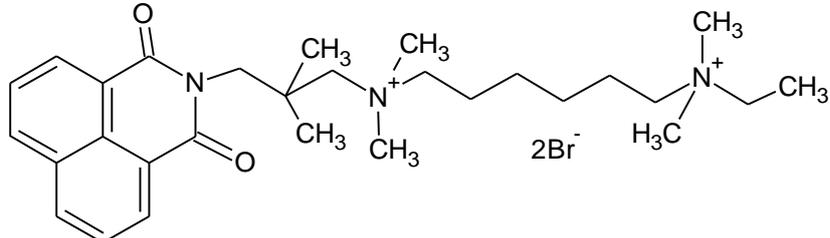
Als Synonym ist der Name „A1“ (Antony et al., 2009) in der Literatur vertreten. Der Synthesename lautet „RM 007“ und wurde von Regina Messerer aus dem AK Holzgrabe vergeben. In den Arbeiten von Bock et al. (2012) und (2014) wird die Substanz mit 6-phth bezeichnet.

6-Naph (Dibromid)

627,49 g/mol

Artikelnummer/Hersteller:

-/AK Holzgrabe, Universität Würzburg,
Deutschland



Als Synonym ist der Name „A2“ (Antony et al., 2009) in der Literatur vertreten. Der Synthesename lautet „RM 008“ und wurde von Regina Messerer aus dem AK Holzgrabe vergeben.

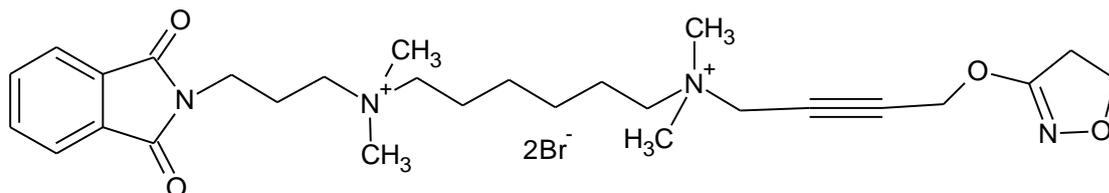
2.1.4 Dualsterische Substanzen

Iper-6-phthal

658,46 g/mol

Artikelnummer/Hersteller:

-/AK Holzgrabe, Universität Würzburg,
Deutschland



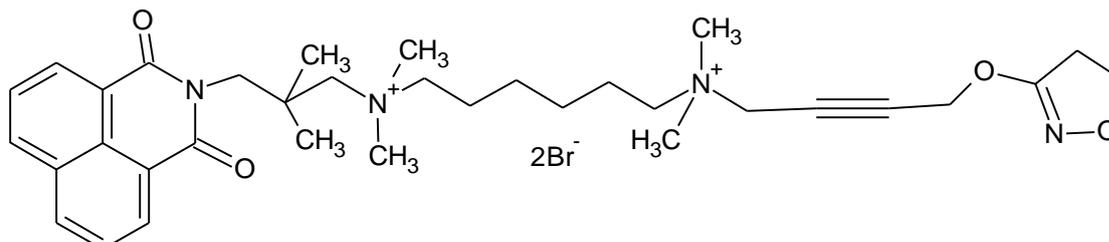
Als Synonym ist der Name „Hybrid 1“ in der Literatur vertreten (Antony et al., 2009). In den Arbeiten von Bock et al. (2012) und (2014) wird die Substanz mit Iper-6-phth bezeichnet.

Iper-6-naph

736,58 g/mol

Artikelnummer/Hersteller:

-/AK Holzgrabe, Universität Würzburg,
Deutschland



Als Synonym ist der Name „Hybrid 2“ in der Literatur vertreten (Antony et al., 2009).

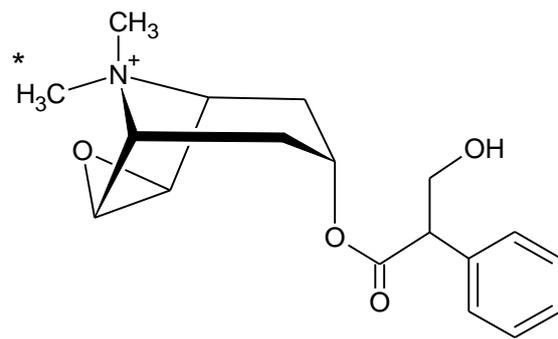
2.1.5 Radioliganden

[³H]N-Methylscopolaminchlorid ([³H]NMS)

398,39 g/mol

Artikelnummer/Hersteller:

NET636001MC/PerkinElmer (D)



Cl⁻

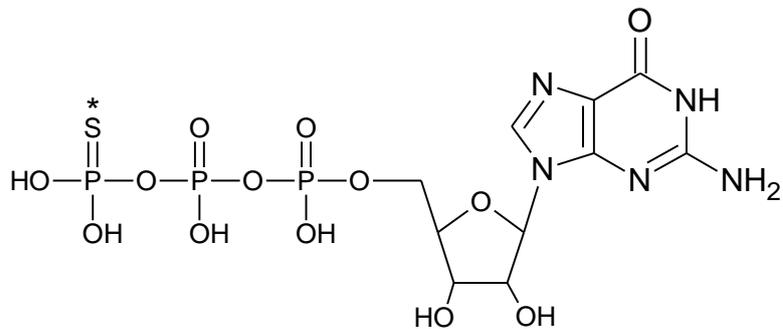
Der Stern (*) markiert die Stelle, an dem ein Wasserstoffatom gegen Tritium ausgetauscht wurde.

[³⁵S]GTPγS

539,2 g/mol

Artikelnummer/Hersteller:

NEG030H250UC/PerkinElmer (D)



Der Stern (*) markiert die Stelle, an dem ein Sauerstoffatom gegen ³⁵S ausgetauscht wurde.

2.2 Reagenzien und Chemikalien

	Bezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
R1	Aluminiumchlorid, ≥ 98%, wasserfrei, sublimiert	CN86.1	Carl Roth
R2	Aqua destillata		Millipore
R3	Aqua pro analysi		Millipore
R4	Calciumchlorid	125747	Grüssing
R5	Choleratoxin (CTX)	P7208	Sigma
R6	DL-Dithiothreitol (DTT)	D0632	Sigma
R7	D(+)-Glucose-Monohydrat	X997.1	Carl Roth
R8	Dimethylsulfoxid (DMSO)	472301	Sigma
R9	Dimethylsulfoxid, steril filtriert (DMSO)	D2438	Sigma
R10	Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	A3567,1000	AppliChem
R11	Dulbeccos phosphatgepufferte Kochsalzlösung (DPBS ohne Ca und Mg)	P04-36500	PAN

R12	Ethylendiaminetetraessigsäure-Dinatriumsalz (EDTA-Natrium), Maßlösung 100mM	20271	Grüssing
R13	Emulsifier Safe™ (Szintillationscocktail)	6013389	PerkinElmer
R14	Ethanol absolut für die Molekularbiologie	3678,0500	AppliChem
R15	Fetales Kälberserum	P30-3702	PAN Sigma
R16	Folin-Ciocalteus Phenolreagenz	1.09001.0500	Merck
R17	Forskolin	F6886	Sigma
R18	Guanosin-5'-diphosphat-Natrium (GDP)	G7127	Sigma
R19	L-Glutaminlösung (200mM)	G7513	Sigma
R20	Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	14025050	Life
R21	HEPES-Natriumsalz	A1040,0100	AppliChem
R22	HEPES-Säure	A1069,0250	AppliChem
R23	HEPES, wässrige Pufferlösung, 1M	15630056	Life
R24	HTRF®-cAMP dynamic 2-kit	62AM4PEC	Cisbio
R25	HTRF®-IP-One Tb-kit	62IPAPEX	Cisbio
R26	Humanes Serumalbumin	A1653	Sigma
R27	Hygromycin B in PBS, 50mg/ml	10687-010	Invitrogen
R28	3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX)	I5879	Sigma
R29	Isopropanol 100%		ZVE
R30	Kaliumchlorid	6781.3	Carl Roth
R31	Kaliumdihydrogenphosphat	30407	Sigma
R32	Kaliumnatriumtartrat-Tetrahydrat	A0651,0250	AppliChem
R33	Kupfersulfat-Pentahydrat	A1034,0500	AppliChem
R34	Lipofectamine™ 2000 Reagent (Transfektionsreagenz)	11668-027	Invitrogen
R35	Lithiumchlorid	62478	Sigma
R36	Magnesiumchlorid	KK36.1	Carl Roth
R37	Magnesiumchlorid-Hexahydrat	31413	Riedel-de-Haën
R38	Natriumbutyrat 98%+	A11079	Alfa Aesar
R39	Natriumcarbonat wasserfrei	A3900,0500	AppliChem
R40	Natriumchlorid	1.06404.1000	Merck
R41	Natriumfluorid, 99,995%	4503.1	Carl Roth
R42	Natronlauge 0,1 M	35263	Fluka
R43	Natronlauge 1 M	35256	Fluka
R44	Nutrient Mixture F-12 HAM	N4888	Sigma
R45	Penicillin/Streptomycin-Lösung 10000 U/ml Penicillin; 10mg/ml Streptomycin	P0781	Sigma
R46	Pertussistoxin (PTX)	BP0372	Biotrend
R47	pOG 44-Plasmid	-	Invitrogen
R48	Phosphorsäure 85%	124715	ZVE

R49	Polyethylenimin-Lösung 50% in Wasser (m/v) (PEI)	P3143	Fluka
R50	QIC (Gαq inhibiting component, UBO-QIC)		Provided by Insitiute of Pharmaceutical Biology, University of Bonn
R51	Ready Protein™ Szintillationscocktail	586604	Beckman
R52	ThermoClean Blau (Stabilisierungskonzentrat für Wasserbäder und Thermostate mit blauem Indikator)	002522-0100	Bioanalytic
R53	N-Tris[Hydroxymethyl]methylglycine (Tricine)	T-0377	Sigma
R54	Trypsin-EDTA	T3924	Sigma

2.3 Lösungen

- L1 **Albuminlösung 2mg/ml**
Je nach gewünschtem Gesamtvolumen wird humanes Serumalbumin (R26) in HEPES-Puffer (L11) gelöst.
- L2 **Aluminiumchloridlösung 2,4mM im Inkubationspuffer für DMR-Messungen (L16)**
Für ein Volumen von 1 ml werden 0,00032g Aluminiumchlorid (R1) im Inkubationspuffer für DMR-Messungen (L16) gelöst.
- L3 **Aluminiumchloridlösung 2,4mM im Inkubationspuffer für IP1-Messungen (Stimulationspuffer-Verdünnung) (L19)**
Für ein Volumen von 1 ml werden 0,00032g Aluminiumchlorid (R1) im Inkubationspuffer für IP1-Messungen (Stimulationspuffer-Verdünnung) (L19) gelöst.
- L4 **Aluminiumfluoridlösung 1,2mM im Inkubationspuffer für DMR-Messungen (L17)**
Aluminiumchloridlösung 2,4mM (L2) und Natriumfluoridlösung 80mM (L24) werden im Verhältnis 1:1 gemischt.
- L5 **Aluminiumfluoridlösung 1,2mM im Inkubationspuffer für IP1-Messungen (Stimulationspuffer-Verdünnung) (L19)**
Aluminiumchloridlösung 2,4mM (L3) und Natriumfluoridlösung 80mM (L25) werden im Verhältnis 1:1 gemischt.
- L6 **Arbeitslösung für die Proteinbestimmung nach Lowry**
In einem Verhältnis von 100:1:1 wird eine 2%ige Natriumcarbonatlösung in 0,1 N Natronlauge (R39 und R42) mit einer 2%igen, wässrigen Natriumkaliumtartratlösung (R32 und R2) und einer 1%igen, wässrigen Kupfersulfatlösung (R33 und R2) gemischt.
- L7 **Dinatriumhydrogenphosphat-Stammlösung (0,5M)**
Für ein Volumen von 2000 ml werden zunächst 178g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (R10) in 1000-1500 ml Aqua destillata (R2) unter Erwärmen gelöst. Danach wird mit Aqua destillata (R2) auf ein Endvolumen von 2000 ml ergänzt.
- L8 **Farblösung für die Proteinbestimmung nach Lowry**
Im Verhältnis 1:4 wird Folin-Ciocalteus Phenolreagenz (R16) mit Aqua destillata (R2) gemischt.
- L9 **GDP-Stammlösung 10mM**
Guanosin-5'-diphosphat-Natrium(R18) wird in Aqua destillata (R2) gelöst und als Aliquota von 50µl bei -20°C gelagert.

- L10 **[³⁵S]GTPγS-Lagerungspuffer**
Mit einer Endkonzentration von je 10mM werden Tricine (R53) und DDT (R6) in Aqua destillata (R2) gelöst. Der pH-Wert wird mit 1M NaOH (R43) auf 7,4 eingestellt (G30).
- L11 **HEPES-Puffer (12,5mM)**
Für ein Volumen von 1000 ml werden 1,085g HEPES-Natriumsalz (R21), 1,986g HEPES-Säure (R22), 2,541g Magnesiumchlorid-Hexahydrat (R37) und 7,305g Natriumchlorid (R40) in Aqua destillata (R2) gelöst und mit 1M NaOH (R43) auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt (G30). Damit ergeben sich Endkonzentrationen von 12,5mM HEPES, 12,5mM Magnesiumchlorid und 125mM Natriumchlorid. Der Puffer wird bei 2-8°C gelagert.
- L12 **HEPES-Stammlösung (200mM)**
Für ein Volumen von 1000 ml werden 17,35g HEPES-Natriumsalz (R21) und 31,77g HEPES-Säure (R22) in Aqua destillata (R2) gelöst und mit 1M Natronlauge (R43) auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt (G30). Die Stammlösung wird bei 2-8°C gelagert.
- L13 **Homogenisationspuffer**
Für ein Volumen von 500 ml werden 50 ml HEPES-Stammlösung (200mM) (L12) mit 50 ml Natrium-EDTA-Lösung (100mM) (R12) und 400 ml Aqua destillata (R2) gemischt. Der Puffer wird bei 2-8°C gelagert.
- L14 **Hygromycin B-haltiges Nährmedium für Flp-InTM-CHO-Zellen (600μM/ml)**
Hygromycinlösung (R27) wird in Nährmedium für Flp-InTM-CHO-Zellen (L21) steril filtriert (). Die Aufbewahrung der Mischung erfolgt in einer Braunglasflasche bei 2-8°C.
- L15 **IBMX-Stammlösung (1M)**
IBMX (R28) wird in DMSO (R9) gelöst und bei -20°C gelagert.
- L16 **Inkubationspuffer für cAMP-Messungen**
IBMX-Stammlösung (L15) wird im Inkubationspuffer für DMR-Messungen (L17) zu einer Endkonzentration von 1mM gelöst.
- L17 **Inkubationspuffer für DMR-Messungen (20mM HEPES in HBSS)**
Für ein Volumen von 500 ml werden 490 ml HBSS-Lösung (R20) mit 10ml 1M HEPES-Lösung (R23) unter einer sterilen Werkbank (G19) gemischt.
- L18 **Inkubationspuffer für IP1-Messungen („Stimulation buffer“, 5x)**
Wegen des zusätzlichen Gebrauchs des im Kit (R25) mitgelieferten *Stimulation buffer*, 5x in Bindungsuntersuchungen wurde er streng nach Herstellervorgabe nachgemischt. Für ein Volumen von 100 ml werden 0,4338g HEPES-Natriumsalz (R21), 0,7944g HEPES-Säure (R22), 0,0555g Calciumchlorid (R4), 0,0238g Magnesiumchlorid (R36), 0,1566g Kaliumchlorid (R30), 4,2661g Natriumchlorid (R40), 0,4954g Glukose (R7) und 1,060g Lithiumchlorid (R35) in Aqua destillata (R2) gelöst und mit 1M NaOH (R43) auf einen pH- Wert von 7,4 eingestellt (G29). Der Puffer wird bei 2-8°C gelagert.
- L19 **Inkubationspuffer für IP1-Messungen (Stimulationspuffer-Verdünnung)**
Der im Kit (R25) mitgelieferte *Stimulation buffer*, 5x bzw. der selbsthergestellte Inkubationspuffer für IP1-Messungen („*Stimulation buffer*“, 5x) (L18) wird für den Versuch 1:5 mit Aqua destillata (R2) verdünnt. Der Puffer wird bei 2-8°C gelagert.
- L20 **Kaliumdihydrogenphosphat-Stammlösung (0,5M)**
Für ein Volumen von 1000 ml werden 68g Kaliumdihydrogenphosphat (R31) in Aqua destillata (R2) gelöst. Die Stammlösung wird unter Lichtausschluss gelagert.
- L21 **Nährmedium für Flp-InTM-CHO-Zellen**
Zu einer Flasche Nutrient Mixture F-12 HAM (500 ml) (R44) werden 50 ml fetales Kälberserum (R15), 6 ml L-Glutaminlösung (R19) und 5ml Penicillin/Streptomycinlösung (R45) unter einer sterilen Werkbank (G19) hinzugegeben. Das Medium wird bei 2-8°C gelagert.

- L22 **Natriumbutyrythaltiges Nährmedium für Flp-InTM-CHO-Zellen (5mM)**
Natriumbutyryrat-Stammlösung (L23) wird in Nährmedium für Flp-InTM-CHO-Zellen (L18) steril filtriert (V22).
- L23 **Natriumbutyryrat-Stammlösung (100mM)**
Natriumbutyryrat (R38) wird in Aqua destillata (R2) gelöst. Die Mischung wird bei 2-8°C gelagert.
- L24 **Natriumfluoridlösung 80mM im Inkubationspuffer für DMR-Messungen (L17)**
Für ein Volumen von 1 ml werden 3,36mg Natriumfluorid (R41) im Inkubationspuffer für DMR-Messungen (L17) gelöst.
- L25 **Natriumfluoridlösung 80mM im Inkubationspuffer für IP1-Messungen (Stimulationspuffer-Verdünnung) (L19)**
Für ein Volumen von 1 ml werden 3,36mg Natriumfluorid (R41) im Inkubationspuffer für IP1-Messungen (Stimulationspuffer-Verdünnung) (L19) gelöst.
- L26 **Natriumkaliumphosphatpuffer („40mM“)**
Für ein Volumen von 450 ml werden 30 ml Dinatriumhydrogenphosphat-Stammlösung (L7) und 6 ml Kaliumdihydrogenphosphat-Stammlösung (L20) mit Aqua destillata (R2) zu 450 ml ergänzt und mit Phosphorsäure (1N) (L28) auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt (G30). Der Puffer wird bei 2-8°C unter Lichtausschluss gelagert.
- L27 **Natriumkaliumphosphatpuffer („6,25mM“), Na K P_i-Puffer**
Für ein Volumen von 800 ml werden 125 ml Natriumkaliumphosphatpuffer („40mM“) (L26) mit Aqua destillata (R2) zu 800 ml ergänzt und mit Phosphorsäure (1N) (L28) auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt (G30). Der Puffer wird bei 2-8°C unter Lichtausschluss gelagert.
- L28 **Phosphorsäure (1N)**
Für ein Volumen von 100 ml werden 2,05 ml Phosphorsäure 85% (R48) mit Aqua destillata (R2) zu 100 ml ergänzt.
- L29 **Polyethylenimin – Stammlösung 1%**
Für ein Gewicht von 500,1 g werden 9,96g Polyethylenimin-Lösung (R49) mit Aqua destillata (R2) zu 500,1 g ergänzt. Die Mischung wird bei 2-8°C gelagert.
- L30 **Polyethyleniminlösung 0,1%, PEI-Lösung**
Für ein Volumen von 500 ml werden 50 ml Polyethylenimin-Stammlösung 1% (L29) mit 450 ml Aqua destillata (R2) gemischt. Die Lösung wird bei 2-8°C gelagert.
- L31 **Zentrifugationspuffer**
Für ein Volumen von 500 ml werden 50 ml HEPES-Stammlösung (200mM) (L12) und 0,5 ml Natrium-EDTA-Lösung (100mM) (R12) mit Aqua destillata (R2) zu 500 ml ergänzt. Der Puffer wird bei 2-8°C gelagert.

2.4 Geräte

	Bezeichnung	Hersteller
G1	Absaugvorrichtung, achtarmig	FM
G2	AccuJet®	Brand
G3	Analysenwaage AG 204	Mettler
G4	Avanti® J-20XP Zentrifuge (Rotoren: JA 25.50, JS 4.3, JS 5.3)	Beckman
G5	Axiovert 25 Mikroskop	Zeiss
G6	Beckmann Coulter LS-60000 SC	Beckman
G7	CyBi®Selma Seriennummer 307001 16 2002	CyBio

G8	Dri-Block® DB-2A	Techne
G9	Eismaschine AF-100	Scotsman
G10	Elix® Wasseraufbereiter	Millipore
G11	EPIC® BT ALPHA 157700 Seriennummer 252787	Corning Life Science
G12	Eppendorf Pipette (0,1-1µl)	Eppendorf
G13	Eppendorf Tischzentrifuge	Eppendorf
G14	Finnpipette Stepper	ThermoForma
G15	Finnpipette 4500 (1-5ml, 200-500µl, 20-200µl, 5-50µl, 1-10µl, 0,2-2µl)	ThermoForma
G16	Finnpipette (20-200µl, 8-Kanal)	ThermoForma
G17	Harvester 96® (Mach III M, Tomtec, Nummer 963589)	PerkinElmer (D)
G18	Harvester 96® (Mach III M, Tomtec, Nummer 990607010)	PerkinElmer (D)
G19	Herasafe Werkbank HS15, Klasse II	Heraeus
G20	Inkubationswasserbad GFL 1083	GFL
G21	Inkubator für CyBi®SELMA (G7): IN 160	Memmert
G22	Inkubator für EPIC®BT ALPHA (G11): IPP 110	Memmert
G23	Mikrowelle NN-E205W EPG	Panasonic
G24	Mikrotiterplatte, 384 Well; 788093	Greiner
G25	Milli-Q® Reinstwasseraufbereitung	Millipore
G26	MS1 Minishaker, 05.002940	IKA
G27	Mithras LB 960	Berthold
G28	„Mr. Frosty“ 5100 Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene
G29	Neubauer Zählkammer	VWR
G30	Φ 390 pH/Temp/mV/ISE Meter 511213	Beckman
G31	Polytron-Homogenisator pT 10-35	Kinematica
G32	Präzisionsküvetten 100-QS	Hellma
G33	Präzisionswaage PB403-S	Mettler
G34	Stickstoffgefrierbehälter LS4800 mit Flüssigstickstoff- Lager- und Transportbehälter XL-100	Taylor-Wharton
G35	Thermo Forma Series II Water Jacketed CO ₂ -Inkubator	ThermoForma
G36	Ultrospec 3300 pro (UV-VIS- Spektrometer)	Bio
G37	Varioklav Dampfsterilisator Typ 135 S	H+P
G38	Variomag Magnetrührer	H+P

G39	Wasserbad Julabo TW12 (beheizbar)	Julabo
G40	1450-Microbeta® Trilux Liquid Scintillation & Luminescence Counter	PerkinElmer (D)

2.5 Verbrauchsmaterialien

	Bezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
V1	Aluminiumfolie Ja!	-	REWE
V2	Cell Assay Plate, 384 Well	5040	Corning
V3	Cellstar®, Cell culture dishes, 145 x 20mm (Zellkulturschalen)	639160	Greiner
V4	Cellstar®, Tubes 50ml	227 261	Greiner
V5	Finntip Stepper 0,5; 1,25; 2,5; 5,0; 12,5	9404170; 9404180; 9404190; 9404200; 9404210	ThermoForma
V6	Injekt® 5ml, Luer Solo	4606051V	B.Braun
V7	MultiLex™ A, 73 x 109 mm	1450-441	PerkinElmer (US)
V8	Nalgene® System 100™ Cryogenic Tubes	5000-1012	Thermo Fisher
V9	NORM-JECT® Einmalspritzen 20ml (24ml) Luer	42000.000V0	HSW
V10	Pasteurpipetten aus Glas (Für den Eimalgebrauch)	7477 15	Brand
V11	Pipettenspitzen 0,5-5ml	702600	Brand
V12	Printed Filtermat A, 90 x 120 mm	1450-421	PerkinElmer (US)
V13	Reaction tubes, 1,5ml	616 201	Greiner
V14	Sample Bag for MicroBeta™	1450-432	PerkinElmer (US)
V15	Szintillationsgefäß 20ml	73.662.500	Sarstedt (D)
V16	Serologische Pipette 25ml, 10ml, 5ml	86.1685.001, 86.1254.001, 86.1253.001	Sarstedt (D)
V17	Sterican® Einmalkanüle zur intramuskulären Injektion (0,9 x 70mm)	4665791	B.Braun
V18	Storage Plate, 384 Well „Source plate“	3657	Corning
V19	Storage Plate, 96 Well, 1,2 ml	12114172 AB-0564	Fisher
V20	Tissue Culture Flask, 75 cm ²	83.1813.002	Sarstedt (US)
V21	Tissue Culture Plate, 6 Well	83.1839.300	Sarstedt (US)
V22	Whatman™ Filter Unit 0,2µM	10 462 200	GE

V23	Zellschaber 25cm	83.1830	Sarstedt (US)
V24	1000µl Blue, Graduated Tip	S1111-2021	Starlab
V25	200µl Yellow, Bevelled Tip	S1111-1006	Starlab

2.6 Computerprogramme

	Bezeichnung	Hersteller
P1	ChemSketch®	ACD / Labs
P2	GraphPad Prism® 5.01	GraphPad
P3	Microsoft® Office Excel 2010	Microsoft
P4	Microsoft® Office PowerPoint 2010	Microsoft
P5	Microsoft® Office Word 2010	Microsoft

2.7 Datenbanken

	Bezeichnung	Herausgeber
D1	IUPHAR (mAChR)	N.J.M. Birdsall, D.A. Brown, N.J. Buckley, A. Christopoulos, R.M. Eglen, F. Ehlert, C.C. Felder, R. Hammer, H.J. Kilbinger, G. Lambrecht, C. Langmead, F. Mitchelson, E. Mutschler, N.M. Nathanson, R.D. Schwarz, A.B. Tobin, J. Wess.
D2	Pubmed	U.S. National Library of Medicine
D3	Rote Liste (Onlineversion, Stand 2014)	Rote Liste® Service GmbH; Frankfurt a.M., Deutschland
D4	UniProtKB/SwissProt	European Informatics Institute, Cambridge, UK; SIB Swiss Institute of Bioinformatics, Genf, Schweiz; Protein Information Resource, Washington D.C., USA

2.8 Herstellerverzeichnis

ACD / Labs	Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, Canada
Alfa Aesar	Alfa Aesar GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland
AppliChem	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
B.Braun	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Beckman	Beckman Coulter Incorporated, Fullerton, CA, USA
Berthold	Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Deutschland
Bioanalytic	Bioanalytic GmbH, Umkirch/Freiburg, Deutschland

Bio	Biochrom Ltd., Cambridge, UK
Biotrend	Biotrend Chemicals AG, Wangen, Zürich
Brand	BRAND GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland
Carl Roth	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Carl Zeiss	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland
Cisbio	Cisbio Bioassays, Codolet, Frankreich
Corning	Corning, Inc., NY, USA
Corning Life Science	Corning Life Science, Tewksbury, MA, USA
CyBio	CyBio AG, Jena, Deutschland
Fisher	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Fluka	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz; seit 2005 Vertrieb der Chemikalien unter Sigma-Aldrich
FM	Feinmechanische Werkstatt der Universität, Bonn, Deutschland
GE	GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK
GFL	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
GraphPad	GraphPad Software Incorporated, Dan Diego, CA, USA
Greiner	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Grüssing	Grüssing GmbH, Filsum, Deutschland
Heraeus	Heraeus, Hilden, Deutschland
HSW	HENKE SASS WOLF, Tuttlingen, Deutschland
Julabo	Julabo Labortechnik, Seelbach, Deutschland
Invitrogen	Invitrogen AG, Darmstadt, Deutschland bzw. Carlsbad, CA, USA; seit 2008 Life Technologies
IKA	IKA® Works do Brasil Ltd a, Taquara, RJ, Brasilien
Life	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland, vor 2008 Invitrogen AG
Merck	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Mettler-Toledo	Mettler-Toledo AG, Gießen, Deutschland
Microsoft	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Millipore	Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland
Nalgene	Nalgene Nunc International Corporation, Rochester, NY, USA
PAN	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Panasonic	Panasonic Manufacturing U.K. Ltd., Cardiff, UK
PerkinElmer (D)	PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau, Germany
PerkinElmer (US)	PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA
REWE	REWE Markt, Köln, Deutschland
Riedel-de-Haën	Riedel-de-Haën, seit 2008 Vertrieb der Chemikalien unter Sigma-Aldrich
Roche	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Sarstedt (D)	Sarstedt AG Co., Nümbrecht, Deutschland
Sarstedt (US)	Sarstedt Inc., Newton, NC, USA
Scotsman	Scotsman Ice Systems, Bettolino di Pogliano, Mailand, Italien
Sigma-Aldrich	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland, bzw. Taufkirchen, Deutschland

Starlab	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
Taylor-Wharton	Taylor-Wharton, Theodore (Alabama), USA
Techne	Techne AG, Jahnsdorf, Deutschland
Thermo Fisher	Thermo Fisher SCIENTIFIC, Rochester, NY, USA
ThermoForma	ThermoForma SCIENTIFIC, Marietta, USA
VWR	VWR International, Langenfeld, Deutschland
Whatman	Whatman GmbH, Dassel, Deutschland
ZVE	Zentrale Chemikalienversorgung Eendenich, Bonn, Deutschland

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Arbeiten

Die Basis der Radioligandbindungsversuche sowie der funktionellen Experimente waren stabil mit humaner cDNA muskarinischer Acetylcholinrezeptoren bzw. deren Mutanten transfizierte CHO Flp-InTM-Zellen (Ovarialzellen des chinesischen Seidenhamsters *Cricetus griseus*, die einen FRT-Schnittstellen-haltigen Vektor enthalten). Bei stabilen Transfektionen wird erreicht, dass fremde DNA in das Genom der Wirtszelle integriert und das entsprechende Genprodukt dauerhaft exprimiert wird. Die untransfizierten CHO Flp-InTM-Zellen wurden dankenswerterweise von Frau Prof. Dr. E. Kostenis aus der Pharmazeutischen Biologie, Universität Bonn zur Verfügung gestellt. Folgende in dieser Arbeit verwendeten, stabil transfizierten CHO Flp-InTM-Zellen standen dankenswerterweise bereits zur Verfügung bzw. wurden im Rahmen dieser Arbeit erstellt.

Zelllinie	Verwendete Bezeichnung in der vorliegenden Arbeit	Durchführung der Herstellung der Plasmid-DNA von	Durchführung der stabilen Transfektion von
CHO Flp-In TM -hM1	CHO-M1	Dr. Marion Mohr-Andrä	Dr. Marion Mohr-Andrä
CHO Flp-In TM -hM2	CHO-M2	Dr. Marion Mohr-Andrä	Dr. Marion Mohr-Andrä
CHO Flp-In TM -hM3	CHO-M3	Dr. Nicole Bick (geb. Janßen)	Dr. Nicole Bick (geb. Janßen)
CHO Flp-In TM -hM4	CHO-M4	Dr. Nicole Bick (geb. Janßen)	Dr. Nicole Bick (geb. Janßen)
CHO Flp-In TM -hM1 W400A	CHO-M1 W400A	Dr. Marion Mohr-Andrä	Lena Vogel
CHO Flp-In TM -hM2 W422A	CHO-M2 W422A	Dr. Marion Mohr-Andrä	Dr. Marion Mohr-Andrä
CHO Flp-In TM -hM3 W526A	CHO-M3 W526A	Dr. Nicole Bick (geb. Janßen)	Dr. Nicole Bick (geb. Janßen)
CHO Flp-In TM -hM4 W435A	CHO-M4 W435A	Dr. Nicole Bick (geb. Janßen)	Dr. Nicole Bick (geb. Janßen)

Tab. 2: Stabil transfizierte CHO Flp-InTM-Zellen, die im Rahmen dieser Arbeit zum Einsatz kamen. Die aufgeführten Personen waren zur Zeit der zellbiologischen Arbeiten Mitglieder der Arbeitsgruppe Pharmakologie und Toxikologie, Pharmazeutisches Institut, Universität Bonn (Prof. Dr. K. Mohr).

3.1.1 Stabile Transfektion der cDNA von M1 W400A

Dieses Kapitel setzt die Kenntnis der in Kapitel 3.1.2.2 beschriebenen Tätigkeiten zur Kultivierung von Zellen voraus.

Die Arbeitsschritte der Transfektion orientierten sich am Vorgehen von N. Janßen (Dissertationsschrift, 2011), bei dem maßgeblich die Anweisungen des LipofectamineTM 2000-Handbuches (07/2006) befolgt wurden.

Das den Rezeptor exprimierende Gen war zuvor in ein pcDNA5/FRT-Expressionsplasmid eingebracht worden (Tab. 2). FRT steht für *Flp Recombination Target* und stellt die Kontaktstelle für das Enzym

Rekombinase (s.u.) dar. Darüber hinaus enthält dieses Plasmid das für die spätere Selektionierung der erfolgreich transfizierten Zellen entscheidende Hygromycin B-Resistenzgen. Es kodiert für eine Kinase, die durch eine Phosphorylierungsreaktion zur Inaktivierung des Aminoglykosidantibiotikums Hygromycin B führt (Gritz und Davies, 1983).

Zunächst wurden untransfizierte CHO Flp-InTM-Zellen in einer 6-Well-Platte (V21) in einer Dichte von 5×10^5 Zellen/2 ml Medium ohne Antibiotikazusatz (L21, ohne Penicillin/Streptomycinlösung (R45)) ausgesät. Diese Zellen enthalten einen pFRT/LacZeocin-Vektor, der zufällig in das Wirtsgenom integriert wird. Wie das Expressionsplasmid enthält auch dieser Vektor eine Rekombinaseschnittstelle (FRT), außerdem verfügt es über ein lacZ-Zeocin-Gen mit SV40-Promotor, welches für die Selektionierung der Wirtszelllinie eine Rolle spielte. Die nach ca. 24 Stunden zu 90-95% konfluenten Zellen wurden nun der Transfektion mit humaner cDNA des muskarinischen M1 W400A-Rezeptors unterzogen.

Dazu wurde zunächst separat in einem Reaktionsgefäß (V13) 3,6µg des pOG 44-Plasmids (enthält das Gen für das Enzym Rekombinase) und 0,4µg der Rezeptor-DNA mit 250ml zusatzfreiem Medium (R44) gemischt.

	DNA-Gehalt	Gewünschtes Gewicht	Einzusetzendes Volumen
pcDNA5/FRT- M1 W400A	1,454 µg/ml	0,4 µg	0,275 µl
cDNA pOG 44-Plasmid	0,77 µg/ml	3,6 µg	4,675 µl

Tab. 3: Ermittlung des einzusetzenden Volumens der Rezeptor-DNA und des pOG 44-Plasmids.

Parallel wurden in einem zweiten Reaktionsgefäß (V13) 250ml zusatzfreies Medium (R44) mit 10µl LipofectamineTM 2000 (R34) vermischt. Beide Reaktionsansätze wurden fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend vereint. Nach zwanzigminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde dieser Komplex tropfenweise auf die zuvor ausgesäten CHO Flp-InTM-Zellen gegeben.

Das Transfektionsreagenz LipofectamineTM2000 (R34) ist eine Zubereitung aus kationischen Liposomen, das über die Methode der Lipofektion Fremd-DNA in die CHO Flp-InTM-Zellen zu verbringen vermag. Dabei kommt es zunächst zu einer Komplexbildung mit der negativ geladenen DNA und den positiv geladenen Liposomen, wodurch die Zellmembran überwunden werden kann. Während der Mitose kann dabei die eingebrachte DNA in den Zellkern gelangen, wodurch die Chance besteht, dass sie stabil in das Wirtsgenom eingebaut werden kann.

Die auf dem pOG 44-Plasmid kodierte Rekombinase wird exprimiert und sorgt nun über die auf dem Expressionsplasmid und dem in das Wirtsgenom integrierten pFRT/LacZeocin-Vektor enthaltenen FRT-Schnittstellen für die Rekombination (Neuanordnung) des genetischen Materials und für den endgültigen Einbau des Rezeptorgens in das Genom der Wirtszelle. Über die nun entstandene räumliche Nähe des SV40-Promotors zum Hygromycin B-Resistenzgen wird dieses aktiviert. Dadurch erhalten nur die erfolgreich transfizierten Zellen die Hygromycin B-Resistenz.

Nach sieben Stunden erfolgte ein Medienwechsel mit Nährmedium für Flp-InTM-Zellen (L21), nach weiteren 17 Stunden wurden die Zellen erstmals in einem Verhältnis von 1:10 in eine

Zellkulturflasche (V20) passagiert. 48 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium durch Hygromycin B-haltiges Medium (L14) ersetzt. Ab diesem Zeitpunkt startete die Selektionierung der erfolgreich transfizierten Zellen, die nun mit „P1“ (Passage 1) bezeichnet wurden. Jede neue Passagierung erhielt eine fortlaufende Nummer.

3.1.2 Zellkultur

Alle Arbeiten mit CHO Flp-InTM-Zellen wurden unter einer sterilen Werkbank (G19) durchgeführt. Die Zellkulturschalen wurden zwischen den Arbeitsschritten in einem Inkubatorschrank (G35) bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂-Gehalt inkubiert. Nährmedien und Puffer wurden vor Gebrauch bei einer Temperatur von 37°C im Wasserbad (G39) erwärmt. Die in Kapitel 3.1.2 beschriebenen Arbeitsschritte richteten sich nach den arbeitsgruppeninternen gebräuchlichen Abläufen.

3.1.2.1 Auftauen der Zellen

In eine Zellkulturschale (V3) wurden 18ml Nährmedium (L21) vorgelegt. Die im Stickstofftank (G34) gelagerten Einfriergefäße (V8) mit der DMSO-haltigen Zellsuspension (siehe Kapitel 3.1.2.4) wurden nach Entnahme schnellstmöglich aufgetaut (Handwärme) und tröpfchenweise auf das Nährmedium gegeben. Nach vorsichtigem Schwenken wurden die Zellen für ca. fünf Stunden im Inkubator (G35) aufbewahrt, wonach sich ein Medienwechsel anschloss.

3.1.2.2 Kultivierung der Zellen

Durchschnittlich wurden die Zellen alle zwei bis drei Tage bei einer Konfluenz von 90-95% passagiert. Dazu wurde das Nährmedium abgesaugt und der Zellrasen mit 10ml DPBS-Puffer (R11) gewaschen. Der Zusatz von 3ml Trypsinlösung (R54) auf die Zellkulturschale (V3) und zweiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur führte zum Ablösen der Zellen. Dabei wurde auf sachte mechanische Unterstützung zurückgegriffen (seitliches Klopfen der Zellkulturschale (V3) gegen eine senkrechte Oberfläche). Nach Zugabe von 7ml Nährmedium (L21) zur Zellsuspension wurde je nach gewünschtem Verhältnis ein bestimmtes Volumen auf eine zuvor mit 18ml Medium (L21) vorbereitete Zellkulturschale (V3) tröpfchenweise überführt. Nach vorsichtigem Schwenken wurden die Zellen bis zur nächsten Passagierung im Inkubator (G35) aufbewahrt.

3.1.2.3 Einstellung der Zellzahl in CHO-Zellsuspensionen für Radioligandbindungsuntersuchungen, IP1-, cAMP- und DMR-Messungen

3.1.2.3.1 CHO-Zellsuspensionen für Radioligandbindungsuntersuchungen

In Radioligandbindungsuntersuchungen wurden Suspensionen mit $1,5 \times 10^6$ Zellen / ml Inkubationspuffer hergestellt. Sollten B_{max}-Werte von Zellen, die in IP1- Versuchen verwendet wurden, ermittelt werden, wurde Puffer (L19) verwendet. Homologe Kompetitionen zur Bestimmung des Expressionniveaus von Zellen aus cAMP- oder DMR-Messungen wurden in Puffer (L17) durchgeführt. Das Nährmedium einer mit CHO-Zellen bewachsenen Zellkulturschale (V3) wurde abgesaugt und der Zellrasen mit 10ml DPBS-Puffer (R11) gewaschen. Der Zusatz von 3ml Trypsinlösung (R54) auf die Zellkulturschale (V3) und zweiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur führte zum Ablösen der Zellen. Dabei wurde auf sachte mechanische Unterstützung zurückgegriffen (seitliches Klopfen der Zellkulturschale (V3) gegen eine senkrechte Oberfläche). Nach Zugabe von 7ml Nährmedium (L21) zur Zellsuspension wurde das gesamte Volumen in ein 50ml-Reaktionsgefäß (V4) überführt und bei 900 rpm (*rounds per minute*, Umdrehungen pro Minute) bei Raumtemperatur für vier Minuten zentrifugiert (G4 mit Rotor JS 4.3). Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet mit ca. 20 ml des jeweiligen Inkubationspuffers resuspendiert. 10 µl dieser Suspension wurden auf eine Neubauer Zählkammer (G29) gegeben und unter dem Mikroskop (G5) betrachtet.

Durch Ermittlung der Zellzahl pro Quadrant und nach Multiplizierung dieses Wertes mit dem Faktor 10000, wurde die Zellzahl / ml der Zellsuspension errechnet. Durch Zentrifugation konnten Zellpellets berechneter Volumina der Suspension erhalten werden, die mit einem zur richtigen Endkonzentration von Zellen führenden Volumen des jeweiligen Inkubationspuffers resuspendiert werden konnten.

3.1.2.3.2 CHO-Zellsuspensionen für IP1- und cAMP-Messungen

Es wurde in analoger Weise zu Kapitel 3.1.2.3.1 vorgegangen. In IP1-Versuchen kamen 100000 Zellen / Well (Volumen: 7µl, Inkubationspuffer (L19)), in cAMP-Versuchen 50000 Zellen / Well (Volumen 5µl, Inkubationspuffer (L16)) zum Einsatz.

3.1.2.3.3 CHO-Zellsuspensionen für DMR-Messungen

Für den Versuch sollten die Zellen in einer Dichte von 12500 Zellen / 30µl (entsprach ca. 416667 Zellen / ml) Nährmedium (L21) ausgesät werden. Das Nährmedium einer mit CHO-Zellen bewachsenen Zellkulturschale (V3) wurde abgesaugt und der Zellrasen mit 10ml DPBS-Puffer (R11) gewaschen. Der Zusatz von 3ml Trypsinlösung (R54) auf die Zellkulturschale (V3) und zweiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur führte zum Ablösen der Zellen. Dabei wurde auf sachte mechanische Unterstützung zurückgegriffen (seitliches Klopfen der Zellkulturschale (V3) gegen eine senkrechte Oberfläche). Nach Zugabe von 7ml Nährmedium (L21) zur Zellsuspension wurde das gesamte Volumen in ein 50ml-Reaktionsgefäß (V4) überführt und ca. 10 ml Nährmedium (L21) ergänzt. Es folgte die Bestimmung der Zellzahl dieser Suspension in analoger Weise zu Kapitel 3.1.2.3.1. Der in diesen Versuchen verhältnismäßig niedrige Bedarf an Zellen führte dazu, dass diese Zellsuspension eine höhere Zellzahl pro Milliliter aufwies als für den Versuch notwendig war. Daher konnte hier das gewünschte Volumen entnommen und mit Inkubationspuffer (L17) auf eine Endkonzentration von 416667 Zellen /ml verdünnt werden.

3.1.2.4 Einfrieren der Zellen

Bei einer Konfluenz von 90-95% wurde das Nährmedium abgesaugt und der Zellrasen mit 10ml DPBS-Puffer (R11) gewaschen. Der Zusatz von 3ml Trypsinlösung (R54) auf die Zellkulturschale (V3) und zweiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur führte zum Ablösen der Zellen. Dabei wurde auf sachte mechanische Unterstützung zurückgegriffen (siehe Kapitel 3.1.2.2). Nach Zugabe von 7ml Nährmedium (L21) zur Zellsuspension wurde das gesamte Volumen in ein 50ml-Reaktionsgefäß (V4) überführt und bei 900 rpm (*rounds per minute*, Umdrehungen pro Minute) bei Raumtemperatur für vier Minuten zentrifugiert (G4 mit Rotor JS 4.3). Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet mit 900µl Nährmedium (L21) resuspendiert und zu 100µl einer in einem Einfriergefäß (V8) vorgelegten DMSO-Lösung (R9) gegeben. Der Zusatz von 10% DMSO verhindert die durch Eiskristalle hervorgerufene Zerstörung der Zellen während des Einfrierens. Das Einfriergefäß (V8) wurde zunächst in einem Einfrierbehälter (G28) bei -80°C gelagert, wodurch es zu einer kontinuierlichen Einfrierrate von 1°C pro Minute kam. Danach wurden die Zellen in den Stickstofftank (G34) zur dauerhaften Lagerung überführt.

3.1.3 Herstellung von Membranhomogenaten

Die in Kapitel 3.1.3 beschriebenen Arbeitsschritte richteten sich nach den arbeitsgruppenintern gebräuchlichen Abläufen. Zur Herstellung eines Membranhomogenates wurde die gewünschte CHO Flip-In™-Zelllinie bis zu einer Menge von in der Regel vierzig vollbewachsenen Zellkulturschalen (V3) vermehrt. Ca. 18-24 Stunden vor der Membranpräparation wurde das Nährmedium (L21) durch natriumbutyrythaltiges Nährmedium (L22) ersetzt, wodurch Teilungsprozesse unterbunden, die

Expressionsrate jedoch erhöht wurde. Am Tag der Membranpräparation wurden nach Absaugen des Mediums pro Schale 2,4ml des auf Eis gelagerten Homogenisationspuffer (L13) zugegeben und der Zellrasen mittels eines Zellschabers (V23) abgelöst. Die Zellsuspensionen wurden in Zentrifugenröhrchen gesammelt. Zur Erhöhung der Ausbeute wurden je fünf abgeerntete Zellkulturschalen (V3) erneut mit 6ml eiskaltem Homogenisationspuffer (L13) gespült. Dieses Volumen wurde mit der Zellsuspension vereint. Anschließend erfolgte die Zerstörung der lebenden CHO Flp-InTM-Zellen und die Homogenisation der Zellsuspension mittels einem Polytron-Homogenisator (G31). Die in der Regel acht mit Zellsuspension gefüllten Zentrifugenröhrchen wurden nacheinander jeweils 25 Sekunden auf Stufe 6 homogenisiert. In einem zweiten Schritt wiederholte sich der Ablauf für je 20 Sekunden pro Zentrifugenröhrchen. Das Membranhomogenat wurde bei 40000 g und 2°C für zehn Minuten zentrifugiert (G4, bei Rotor JA 25.50). Nach Abgießen des Überstandes und Resuspension jedes Pellets mit 15ml Zentrifugationspuffer (L31) erfolgte eine weitere Zentrifugationsphase unter gleichen Bedingungen. Nach erneutem Abgießen des Überstandes und Resuspension mit 15ml Zentrifugationspuffer (L31) schloss sich eine dritte und letzte Zentrifugation an. Die erhaltenen Pellets wurden mit insgesamt 40ml HEPES-Puffer (L11) aufgenommen, sorgfältig resuspendiert (G26) und in Aliquota von 1 oder 0,5ml in Reaktionsgefäße (V13) überführt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.1.4 Proteingehaltsbestimmung von Membranhomogenaten (Methode nach Lowry)

Zur besseren Reproduzierbarkeit von Radioligandbindungs-, sowie [³⁵S]GTPyS-Experimenten wurde die Menge an eingesetztem Membranhomogenat auf einen definierten Proteingehalt eingestellt. Lowry et al. (1951) stellten eine bis heute gebräuchliche Methode vor, den Proteingehalt einer Lösung UV/VIS-spektrometrisch zu erfassen. Dabei wird lineares Licht einer Wellenlänge (in diesem Fall 500nm) durch eine die Probelösung enthaltene Küvette geleitet. Die resultierende Lichtintensität nach Durchtritt durch die zu bestimmende Lösung ist, dem Lambert-Beerschen Gesetz folgend, abhängig von den absorbierenden Eigenschaften der Substanz, der Schichtdicke des Probengefäßes und der Substanzmenge. Die erhaltenen Werte für die Extinktion stehen in proportionalem Zusammenhang mit der Konzentration der zu bestimmenden Substanz. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe von ebenfalls vermessenen, in ihrem Proteingehalt bekannten Lösungen. Trägt man die Extinktion gegen die Konzentration auf, erhält man eine Vergleichsgerade, mit deren Geradengleichung auf die Konzentration der zu bestimmenden Lösung zu schließen ist.

Das Prinzip der Proteinbestimmung nach Lowry beruht auf zwei aufeinanderfolgenden Farbreaktionen, die notwendig sind, die zu bestimmende Lösung spektrometrisch untersuchen zu können. Der Zusatz von Cu²⁺-Ionen in alkalischer Lösung führt zu blauen, planaren Komplexen über die Peptidbindungen der Proteine, welches als Biuretreaktion bezeichnet wird. Durch den oxidativen Abbau aromatischer Aminosäuren werden Cu²⁺- zu Cu⁺-Ionen reduziert, die im Folgenden das im Folin-Ciocalteus Phenolreagenz (R16) enthaltene sechswertige Molybdän zu Molybdänblau (Oxidationsstufen 5-6) reduzieren. Die resultierende Blaufärbung kann spektrometrisch gut erfasst werden.

Zunächst wurde die kupferionenhaltige Arbeitslösung (L6) frisch hergestellt. Das zu bestimmende Membranhomogenat wurde jeweils unverdünnt und in Mischungen mit HEPES-Puffer (L11) in den Verhältnissen 1:2 und 1:4 vermessen, um sicherzustellen, dass sich auswertbare Extinktionen im Bereich des Lambert-Beerschen Gesetzes ergäben. Als Vergleichssubstanz wurde eine frisch hergestellte Albuminlösung (L1) zu den Konzentrationen 0,00; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,50 und 2,00mg/ml verdünnt. Sowohl die Proben- als auch die Vergleichslösungen wurden zunächst mit der

kupferionenhaltigen Arbeitslösung (L6) versetzt und zehn Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend folgte unter Schütteln des Reagenzgefäßes der Zusatz der Farblösung (L8), die das Folin-Ciocalteus Phenolreagenz (R16) enthielt. Nach dreißigminütiger Inkubation bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss erfolgte die UV/VIS-spektrometrische Erfassung (G36) der Proben- und Vergleichslösungen in einer Präzisionsküvette (G32) bei 500nm.

Anhand der Geradengleichung, die mit Hilfe der Extinktionswerte der Albuminverdünnungen erhalten wurde, konnte der Proteingehalt der zu bestimmenden Lösung errechnet werden.

3.2 Radioligandbindungsversuche

Zur Untersuchung von Bindungscharakteristika unterschiedlicher Rezeptorliganden stellt der Einsatz radioaktiv markierter Testsonden ein langerprobtes Messprinzip dar. Innerhalb eines Ligandmoleküls führt der Austausch eines Atoms gegen ein Radionuklid zu Änderung der physikalischen, nicht aber der chemischen Eigenschaften der Ausgangsverbindung. In Versuchsansätzen, in denen dem Rezeptor sowohl ein radioaktivmarkierter, als auch ein „kalter“ (nicht radioaktiv markierter) Ligand gegenüberstehen, kommt es nach dem Massenwirkungsgesetz zur Competition beider Liganden zum Rezeptorprotein. Je nach Affinitäten der eingesetzten Kompetitoren bilden sich Radioligand-Rezeptor-Komplexe, die sich nach Abtrennung des ungebundenen Radioliganden durch verschiedene Szintillationsverfahren quantitativ bestimmen lassen. Dabei dient der radioaktive Zerfall als zählbares Ereignis.

Auf dem Gebiet der muskarinischen Acetylcholinrezeptoren dienen die tritiierten inversen Agonisten Quinuclidinylbenzylat und N-Methylscopolamin ($[^3\text{H}]\text{QNB}$ und $[^3\text{H}]\text{NMS}$) seit Jahrzehnten als Testsonden in Radioligandbindungsstudien. Sie zeichnen sich durch eine gute Stabilität und eine hohe Affinität im Bereich von 0,1-1nM aus. Daneben kommen auch Radioagonisten wie $[^3\text{H}]\text{Acetylcholin}$, $[^3\text{H}]\text{Oxotremorin M}$ und $[^3\text{H}]\text{Iperoxo}$ zum Einsatz. $[^3\text{H}]\text{Iperoxo}$ ist als hochaffiner Radioagonist für alle fünf Subtypen muskarinischer Acetylcholinrezeptoren charakterisiert (Schrage et al., 2014).

Bei allen im Zuge der vorliegenden Arbeit durchgeführten Radioligandbindungsuntersuchungen wurde $[^3\text{H}]\text{N-Methylscopolamin}$ ($[^3\text{H}]\text{NMS}$) als Radiosonde verwendet (Kapitel 2.1.5). Superschwerer Wasserstoff (Tritium, $[^3\text{H}]$) unterscheidet sich von Wasserstoff $[^1\text{H}]$ dadurch, dass es neben einem Proton zwei Neutronen im Atomkern aufweist. Mit einer Halbwertszeit von ca. 12,3 Jahren zerfällt es unter Aussendung eines β^- -Teilchens (Betazerfall) und eines Antineutrinos in das Heliumisotop ^3He . Dabei werden 18,6 keV frei.

Zur quantitativen Bestimmung von Radioaktivität kamen zwei Verfahren zum Einsatz, die Flüssig- und die Feststoffsintillation. Diese Verfahren werden benötigt, um die verhältnismäßig schwache Energie des Betazerfalls von Tritium zu verstärken und sie in einen detektier- und zählbaren Lichtblitz umzuwandeln.

Um die Konzentration einer radioaktiven Testsubstanz einer Lösung zu berechnen, wurden 50 μl in ein Szintillationsgefäß (V15) pipettiert und mit 5ml eines Szintillationscocktails (R13 oder R51) versetzt. Darin sind neben Lösungsmitteln (Alkylbenzole) und Lösungsvermittlern (z.B. Triton X-100) sogenannte primäre und sekundäre Szintillatoren (z.B. 2,5-Diphenyloxazol (PPO) und 1,4-Bis(5-phenyloxazol-2-yl)benzen (POPOP)) enthalten. Das β^- -Teilchen überträgt seine Energie über die Lösungsmoleküle schließlich auf die π -Elektronensysteme der Szintillationen, die ihrerseits die Energie in Form von Lichtblitzen (Photonen) abgeben. Im Flüssigsintillationszähler (G6) werden

diese Lichtblitze mit Photomultipliern verstärkt. Ein Blitz entspricht dabei einem Zerfall. Durch einen im Messgerät integrierten internen Standard können die pro Zeiteinheit gezählten Blitze (*counts per minute*, cpm) in echte Zerfallsereignisse (*disintegrations per minute*, dpm) umgerechnet werden. Die parallele Vermessung reinen Scintillationscocktails ohne Probe diente zum direkten Abzug von unspezifischen Hintergrundsignalen. Die Radioaktivität der Probe ist mit der Angabe von Zerfällen pro Zeiteinheit quantifiziert. Weiterhin gebräuchlich sind auch die Einheiten Curie (1 Ci = $2,22 \cdot 10^{12}$ dpm) und die SI-Einheit Becquerel (1 Bq = 60 dpm). Über folgende Formel konnte auf eine molare Konzentration rückgeschlossen werden.

$$[L] = \frac{A}{A_{spez.} \cdot 2220 \cdot V} \cdot 10^{-9}$$

Gleichung 1

[L]: Konzentration der radioaktiven Probe (mol/l)

A: Gemessene Radioaktivität (dpm)

$A_{spez.}$: Spezifische Aktivität der radioaktiven Probe (Ci/mmol)

2220: Umrechnungsfaktor

V: Eingesetztes Volumen (ml)

Das Verfahren der Feststoffsintillation arbeitet ebenfalls mit dem Verstärken der Energie des Betazerfalls durch Szintillatoren, allerdings befinden sie sich in diesem Fall in der Matrix von Wachsplatten (V7), die auf einen die Radioligandrezeptorkomplexe enthaltenden Filter (V12) aufgeschmolzen werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Radioligandbindungsexperimente in 96-Well-Mikrotiterplatten (V19) durchgeführt. Die Abtrennung der an Rezeptorproteinen gebundenen von ungebundener Radioaktivität erfolgte mit Hilfe der Vakuumfiltration mittels eines Harvester 96 Tomtec (G17). Dabei ragten analog zum Format der Mikrotiterplatte (V19) in jede Kavität (Well) je ein schmales Absaugröhrchen, durch das der Versuchsansatz durch einen im oberen Bereich der Absaugvorrichtung positionierten Filter (V12) gesogen wurde. Dieser war zuvor für eine Dauer von zwei Minuten in ca. 2-8°C kalter 0,1%igen PEI-Lösung (L30) gelegt worden. Radioligandrezeptorkomplexe verblieben während der Filtration an der entsprechenden Stelle auf der Filteroberfläche haften, während flüssige Bestandteile des Versuchsansatzes den Filter passierten und intern aufgefangen wurden. Das Filterpapier (V12) wurde für drei Minuten in einer Mikrowelle (G23) getrocknet und danach zusammen mit einer Szintillationswachsplatte (V7) auf Aluminiumfolie (V1) auf einem Heizblock (G8) soweit erhitzt, bis sich das Wachs vollständig verflüssigte und sich mit dem Filtermaterial verband. Nach Erhärtung bei Raumtemperatur wurde der Filter-/Wachs-Komplex in eine Kunststoffolie (V14) verbracht und in einen Rahmen gespannt, der im 1450-Microbeta® Trilux-Gerät (G40) vermessen wurde.

3.2.1 [³H]NMS-Dissoziationsexperimente

Die Mikrotiterplatten wurden zwischen den Pipettierschritten bei 30°C in einem Schüttelwasserbad (G20) inkubiert.

3.2.1.1 Bestimmung der Halbwertszeit von [³H]NMS

Die Bestimmung der Halbwertszeit des Radioliganden [³H]NMS an verschiedenen Subtypen muskarinischer Acetylcholinrezeptoren und deren Punktmutanten wurde mit Membranhomogenaten durchgeführt. Dafür wurden sie eine definierte Zeit mit [³H]NMS

vorinkubiert, um ein gewisses Level an Radioligandrezeptorkomplexen zu erhalten. In der Praxis hat sich dabei für alle untersuchten Rezeptoren ein Zeitraum von 45 Minuten bewährt. Zu verschiedenen Zeitpunkten vor der Filtration der Mikrotiterplatte (V19) und damit der Beendigung der Reaktion wurde nun in jeweils drei Kavitäten eine vergleichsweise hohe Konzentration von Atropin (Endkonzentration im Well: 3µM) zugesetzt, das als Reassoziationshemmer fungierte. Sobald dem Versuchsansatz Atropin zugesetzt worden war, verhinderte es über die Blockade der orthosterischen Bindungsstelle eine Wiederanlagerung des Radioliganden. Demnach nahm die gebundene Radioaktivität umso mehr ab, je länger Atropin im Versuchsansatz zugegen war. In der Praxis resultierte daraus ein zeitlich gebundenes Protokoll der jeweils versetzten Zugaben von Radioligand und Atropin nach folgendem Muster.

Dauer der Inkubation von Atropin mit den Radioligand-Rezeptorkomplexen	Zugabe des Radioliganden	Zugabe von Atropin	Zeitpunkt der Filtration
Zeitpunkt „2 Minuten“	t – 45 Minuten – 2 Minuten	t – 2 Minuten	t
Zeitpunkt „10 Minuten“	t – 45 Minuten – 10 Minuten	t – 10 Minuten	t

Tab. 4: Beispielhafter Auszug aus einem zeitabhängigen Pipettierprotokolls zur Bestimmung der Halbwertszeit von [³H]NMS an mAChR. t = Zeitpunkt der Abfiltration des Versuchsansatzes in der 96-Well-Mikrotiterplatte (V19).

Parallel zu den Kavitäten, in denen die Auswirkung unterschiedlich langer Inkubationszeiten von Atropin untersucht wurde, enthielten mindestens drei Kavitäten pro Versuch von Beginn an Atropin und das Membranhomogenat. Nach Zusatz von [³H]NMS 45 Minuten vor der Filtration konnte auf diese Weise die unspezifische Radioligandbindung (außerhalb der orthosterischen Bindungstasche) detektiert werden. Bei der Analyse wurde dieser Wert von allen erhaltenen Messwerten abgezogen, um die spezifische Radioligandbindung zu erhalten. Weiteren drei Kavitäten pro Versuch wurde kein Atropin zugesetzt, um die Gesamtbindung des Radioliganden nach 45-minütiger Inkubation zu erhalten. Der Versuch orientierte sich nach folgendem Pipettierschema.

Komponente	Gesamt- bindung (μ l)	Unspezifische Bindung (μ l)	Ansatz zur Bestimmung der Dissoziations- halbwertszeit (μ l)	Eingesetzte Konzentration	Konzentration im Ansatz
Aqua destillata (R2)	50				
Atropin		50	50	30 μ M	3 μ M
CHO- Zellmembran- homogenat (in (L11))	50	50	50	200-400 μ g/ml	20-40 μ g/ml
Puffer (L11)	350	350	350	12,5 mM HEPES	10 mM HEPES
3 H]NMS	50	50	50	20 nM	2 nM

Tab. 5: Pipettierschema zur Bestimmung der Halbwertszeit von [3 H]NMS an mAChR. Wo nicht anders vermerkt, sind die Substanzen in Aqua destillata (R2) gelöst.

Zur Auswertung mit dem Analyseprogramm GraphPad Prism 5.01 (P2) wurden die erhaltenen Zählereignisse gegen die Zeit der Inkubation von Atropin mit den Radioligandrezeptorkomplexen aufgetragen. Dabei stellte die Gesamtbindung die Messwerte für den Zeitpunkt $t = 0$ Minuten dar. Nach Abzug des Mittelwertes für die unspezifische Bindung konnten die Datenpunkte in allen Fällen mit einem monoexponentiellen Abfall charakterisiert werden.

$$[RL]_t = [RL]_0 \cdot e^{-k_{-1} \cdot t}$$

Gleichung 2

$[RL]_t$: Radioligandrezeptorkomplexe zum Zeitpunkt t

$[RL]_0$: Radioligandrezeptorkomplexe ohne Einflussnahme von Atropin

k_{-1} : Geschwindigkeitskonstante der Radioliganddissoziation

$$HWZ = \frac{\ln 2}{k_{-1}}$$

Gleichung 3

HWZ: Halbwertszeit

k_{-1} : Geschwindigkeitskonstante der Radioliganddissoziation

Die auf diese Weise ermittelte Halbwertszeit des Radioliganden [3 H]NMS konnte als subtypspezifisches Charakteristikum mit Literaturdaten verglichen werden und die Auswirkung der Punktmutation Trp 7.35 \rightarrow Ala detektiert werden.

3.2.1.2 Bestimmung des [3 H]NMS-dissoziationsverzögernden Effektes von Allosteren und Hybridliganden

Die Fähigkeit eines Liganden, die Dissoziationsgeschwindigkeit eines Orthosters vom Rezeptor zu modulieren, gilt als starkes Zeichen für allosterisches Verhalten (Stockton et al., 1983; Lazareno und

Birdsall, 1995; Kostenis und Mohr, 1996). Gelingt es, zu zeigen, dass steigende Konzentrationen eines potentiellen, allosterischen Modulators die Halbwertszeit des Radioliganden zu verlangsamen vermögen und es ergibt sich ein sigmoider Kurvenverlauf, sobald die Geschwindigkeitsdissoziationskonstanten gegen die logarithmierten Konzentrationswerte aufgetragen werden, kann der Wendepunkt der erhaltenen Kurve als Maßzahl für die Affinität des allosterischen Modulators zum [³H]NMS-besetzten Rezeptor ($pEC_{0,5 \text{ Diss}}$) herangezogen werden.

Wurden zur präzisen Bestimmung der Halbwertszeit von [³H]NMS die erhaltenen Zählereignisse mehrerer Zeitpunkte nach Zugabe des Reassoziationshemmers Atropin detektiert (Kapitel 3.2.1.1), lässt sich ein potenziell monophasischer, exponentieller Abfall des Radioaktivitätswertes über die Zeit auch durch zwei Messwerte bestimmen; einem Ausgangswert, bei dem Atropin nicht zugegen ist (Wert für die Gesamtbindung nach 45-minütiger Inkubation des Rezeptors mit dem Radioliganden) und einem Wert nach einer definierten Koinkubation mit Atropin, bei dem die Reassoziations des Radioliganden verhindert wurde. Dieses Vorgehen erlaubt es, den Einfluss verschiedener Konzentrationen des zu testenden Liganden in einer Mikrotiterplatte (V19) auf die Radioligandhalbwertszeit hin zu überprüfen. Das Verfahren ist als „Zweipunktkinetisches Experiment“ publiziert (Lazareno und Birdsall, 1995; Kostenis und Mohr, 1996).

Die zweipunktkinetischen Experimente wurden entweder mit Membranhomogenaten oder mit intakten, den jeweilig zu untersuchenden Rezeptor exprimierenden CHO-Zellen durchgeführt. An den entsprechenden Stellen in Kapitel 4 wurde dies zusammen mit den jeweils gewählten Pufferbedingungen vermerkt.

Bei diesem Experiment wurden steigende Konzentrationen des zu testenden allosterischen Modulators und eine fixe Konzentration Atropin in eine Mikrotiterplatte (V19) vorgelegt. In die Kavitäten für die Gesamtbindung wurde statt der Atropin- und der Modulatorlösung Aqua destillata (R2) sowie der Radioligand und Puffer hinzugefügt. In den Kavitäten für die unspezifische Bindung befand sich von Anfang an Aqua destillata (R2), Atropin, Radioligand und Puffer. Parallel werden in einem Reaktionsgefäß (V4) definierte Mengen des Puffers, des Radioliganden und des Membranhomogenates bzw. der Zellsuspension für 45 Minuten vorinkubiert (Mastermix). Nach folgendem Zeitplan erfolgten die jeweiligen Zugaben in die Mikrotiterplatte (V19).

Start der Vorinkubation der Rezeptoren mit dem Radioliganden (Mischung des Mastermixes)	$t - (45 \text{ Minuten} + 1,5 \times HWZ_{RL})$
Zugabe des Membranhomogenates / der Zellsuspension in die Kavitäten der Gesamt- und der unspezifischen Bindung	$t - 45 \text{ Minuten}$
Zugabe des Mastermixes zu Alloster-/Atropinmischung	$t - (1,5 \times HWZ_{RL})$
Zeitpunkt der Filtration	t

Tab. 6: Exemplarischer, zeitlicher Ablauf eines Zweipunktkinetischen Experimentes. HWZ_{RL} : Halbwertszeit des Radioliganden vom zu untersuchenden Rezeptor.

Nachdem alle Zugaben erfolgt waren, enthielten die Messansätze jeweils folgende Komponenten (Tab. 7).

	Gesamt- bindung (μ l)	Unspez. Bindung (μ l)	Ansatz zur Bestimmung der Dissoziationshalbwertszeit (μ l)		Eingesetzte Konz.	Konz. im Ansatz
			+ Alloster	- Alloster		
Aqua destillata (R2) / Puffer	50	50		50		
Atropin		50	50	50	30 μ M	3 μ M
Alloster			50		10 ^{-x}	10 ^{-(x+1)}
Puffer	350	300	300	300		
³ H]NMS	50	50	50	50	20 nM	2 nM
CHO-Zell- membran- homogenat bzw. Zell- suspension	50	50	50	50	200-400 μ g/ml bzw. 1,5 x 10 ⁶ Zellen / ml	20-40 μ g/ml bzw. 1,5 x 10 ⁵ Zellen / ml

Tab. 7: Pipettierschema zur Bestimmung der Dissoziationsverzögerung von [³H]NMS durch allosterische Modulatoren. Im Falle der Verwendung von Membranhomogenaten wurde eine wässrige Lösung des Allostere eingesetzt; ebenso erfolgte analog der ersten Zeile des Pipettierschemas die Zugabe von Aqua destillata (R2). Alle anderen Komponenten waren entweder in Puffer L11 oder in Puffer L27 gelöst. Wurde eine Zellsuspension eingesetzt, waren alle Komponenten im jeweiligen Inkubationspuffer gelöst (Puffer L19 im Falle der Untersuchung von CHO-M3- und CHO-M3-W526A-Zellen, Puffer L17 im Falle der Untersuchungen von CHO-M2 und CHO-M2 W422A-Zellen).

Im Ergebnis wurde eine Schar monoexponentiell abfallender Kurvenverläufe erhalten (Gleichung 2), deren k_{-1} -Werte als Kennzahlen der Dissoziationsgeschwindigkeit des Radioliganden mit steigender Konzentration des allosterischen Modulators entsprechend einer Verlängerung der Halbwertszeit kleiner wurden (Gleichung 3). Nach Auftragung dieser Parameter gegen die logarithmierte Konzentration des allosterischen Modulators konnten die Datenpunkte im Sinne einer nicht linearen Regression mit der von Hill (1910) abgewandelten vier-Parameter-logistischen Gleichung analysiert werden (Goutelle et al., 2008).

$$B = Bottom + \frac{Top - Bottom}{1 + 10^{(\log IC_{50} - \log X) \cdot n_H}}$$

Gleichung 4

B: Geschwindigkeitskonstante der Radioliganddissoziation

Bottom: Unteres Kurvenplateau

Top: Oberes Kurvenplateau

IC_{50} : Konzentration des Kompetitors bei halbmaximaler Radioligand-Dissoziationsverzögerung

X: Konzentration des Kompetitors / Testliganden

n_H : Hillkoeffizient als Maß für die Kurvensteilheit

Die logarithmierte Form derjenigen Konzentration des allosterischen Modulators, die die Halbwertszeit des Radioliganden um die Hälfte verdoppelte ($pEC_{0,5 \text{ Diss}}$), entsprach der Affinität des allosterischen Modulators zum [^3H]NMS-besetzten Rezeptorprotein.

Da die Zeit bis zum Reaktionsgleichgewicht zwischen Radioligand, Rezeptor und allosterischem Modulator bzw. Hybridliganden von der Fähigkeit der zuletzt genannten Substanzen abhängt, inwieweit sie die Dissoziation des Radioliganden von der orthosterischen Bindungsstelle zu verzögern vermögen, ist die Kenntnis dieses Charakteristikums eines allosterischen Modulators bzw. Hybridliganden Voraussetzung dafür, eine ausreichend lange Inkubationszeit für ein Reaktionsgleichgewicht einzuhalten (Kapitel 3.2.2.2 und 3.2.2.3). Dabei gilt, dass die höchste Konzentration an allosterischem Modulator / Hybridliganden die längste Inkubationszeit benötigt. Sie beträgt nach der Gleichung von Lazareno und Birdsall (1995) das Fünffache der Halbwertszeit des Radioliganden in Anwesenheit dieser Konzentration. Daher wurde die Inkubationszeit für Versuche im Reaktionsgleichgewicht für jeden zu untersuchenden allosterischen Modulator bzw. jeden Hybridliganden und für jeden zu untersuchenden Rezeptor nach folgender Formel berechnet.

$$t = 5 \cdot t_{1/2} \cdot \left(1 + \frac{X}{EC_{0,5 \text{ Diss}}}\right)$$

Gleichung 5

t: Inkubationszeit bis zum Reaktionsgleichgewicht

$t_{1/2}$: Halbwertszeit des Radioliganden

X: Höchste Konzentration des allosterischen Modulators / des Hybridliganden

$EC_{0,5 \text{ Diss}}$: Konzentration des allosterischen Modulators / des Hybridliganden, die in zweipunktkinetischen Experimenten die Halbwertszeit des Radioliganden um die Hälfte verdoppelte

3.2.2 Radioligandbindungsuntersuchungen im Reaktionsgleichgewicht

In homologen Konkurrenzexperimenten zur Bestimmung der Anzahl von M3- bzw. M3 W526A-Rezeptoren auf CHO-Zellen, die auch in DMR-Messungen eingesetzt wurden, betrug die Inkubationstemperatur analog zu den funktionellen Experimenten ebenfalls 28°C. In allen anderen Fällen wurde bei 30°C inkubiert. Die Mikrotiterplatten (V19) befanden sich für die gesamte Inkubationszeit in einem Schüttelwasserbad (G20).

Die Zeit zur Erlangung des Reaktionsgleichgewichtes für allosterische Modulatoren und Hybridliganden wurde nach Gleichung 5 berechnet. Im Falle der Konkurrenzversuche mit

orthosterischen Agonisten und Antagonisten wurden fünf Halbwertszeiten (Kapitel 4.1.1, Tab. 17, Seite 63), mindestens jedoch zwei Stunden inkubiert.

3.2.2.1 Homologe Konkurrenzexperimente

Mit „homologen Konkurrenzexperimenten“ sind Versuche gemeint, bei denen sich der Radioligand nur durch seine Radioaktivität vom Kompetitor unterscheidet. Im Falle der vorliegenden Arbeit waren damit Gleichgewichtsreaktionen zwischen einer CHO-Zellmembransuspension bzw. intakten CHO-Zellen, [³H]N-Methylscopolamin ([³H]NMS) und N-Methylscopolamin (NMS) gemeint. Sie dienen der Bestimmung des Expressionsniveaus (B_{max}-Wert) und der Ermittlung der Affinität des muskarinischen Antagonisten NMS.

Nachfolgend sind die Komponenten eines Versuchsansatzes für eine homologe Konkurrenz mit CHO-Zellmembranhomogenaten (Tab. 8) oder einer CHO-Zellsuspension (Tab. 9) aufgeführt.

Komponente	Gesamt- bindung (μ l)	Unspezifische Bindung (μ l)	Homologe Konkurrenz (μ l)	Eingesetzte Konzentration	Konzentration im Ansatz
Aqua destillata (R2)	50				
Atropin		50		30 μ M	3 μ M
NMS			50	10^{-x}	$10^{-(x+1)}$
CHO- Zellmembran- homogenat (in (L11))	50	50	50	200-400 μ g/ml	20-40 μ g/ml
Puffer (L11)	350	350	350	12,5 mM HEPES	10 mM HEPES
³ H]NMS	50	50	50	2 nM	0,2 nM

Tab. 8: Pipettierschema eines homologen Konkurrenzversuches mit CHO-Zellmembranhomogenaten. Wo nicht anders vermerkt, sind die Substanzen in Aqua destillata (R2) gelöst.

Komponente	Gesamt- bindung (μ l)	Unspezifische Bindung (μ l)	Homologe Kompetition (μ l)	Eingesetzte Konzentration	Konzentration im Ansatz
Atropin		50		30 μ M	3 μ M
NMS			50	10^{-x}	$10^{-(x+1)}$
CHO- Zellsuspension	50	50	50	$1,5 \times 10^6$ Zellen / ml	$1,5 \times 10^5$ Zellen / ml
Puffer (L17) oder (L19)	400	350	350		
3 H]NMS	50	50	50	2 nM	0,2 nM

Tab. 9: Pipettierschema eines homologen Wettbewerbsversuches mit CHO-Zellsuspensionen. Alle Komponenten sind im jeweiligen Inkubationspuffer gelöst. Im Falle der Versuche mit CHO-M2- und CHO-M2 W422A-Zellen wurde Puffer (L17) verwendet. Im Falle der Versuche mit CHO-M3- und CHO-M3 W526A-Zellen wurde Puffer (L19) verwendet, wenn die Expressionsdichte von Zellen, die im IP1-Versuch vermessen wurden, ermittelt werden sollt, und es wurde in Puffer (L17) gearbeitet, wenn die Expressionsdichte von Zellen, die im cAMP-Versuch vermessen wurden, ermittelt werden sollte.

Für homologe Wettbewerbsexperimente wurden die Komponenten aus Tab. 8 bzw. Tab. 9 in eine Mikrotiterplatte (V19) pipettiert. Dabei kamen entsprechend verdünnte CHO-Zellmembranhomogenate (Kapitel 3.1.3) oder CHO-Zellsuspensionen (Kapitel 3.1.2.3.1) zum Einsatz. Die Platten wurden für jeweils fünf Halbwertszeiten von 3 H]NMS am jeweiligen Subtyp (Kapitel 4.1.1, Tab. 17, Seite 63), mindestens jedoch für zwei Stunden in einem Schüttelwasserbad (G20) bei 30°C (bzw. 28°C im Falle der Bestimmung von Expressionsniveaus für Zellen aus DMR-Messungen) inkubiert. Die Abtrennung der Radioligand-Rezeptorkomplexe mittels Vakuumfiltration und die Bestimmung der Radioaktivität mittels der Feststoffszintillation wurden in Kapitel 3.2 beschrieben. Trägt man die Radioaktivitätswerte (*counts per minute* (cpm)) gegen die logarithmierten Konzentrationen des NMS auf, kann mittels Gleichung 4 (vier-Parameter-logistische Gleichung) eine sigmoide Kurve mit einem negativen Steilheitsmaß an die Messwerte angepasst werden. Die Cheng-Prusoff-Korrektur (Cheng und Prusoff, 1973) beschreibt den Zusammenhang zwischen dem Wendepunkt einer Wettbewerbskurve, der Konzentration des Radioliganden, der Affinität des Radioliganden zum jeweiligen Rezeptor und der Affinität des Kompetitors (Gleichung 6). Im Spezialfall der homologen Wettbewerbs, bei der der Radioligand und der Kompetitor identisch sind, vereinfacht sich Gleichung 6 zu Gleichung 7.

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{L}{K_D}}$$

Gleichung 6

K_i : Gleichgewichtsdissoziationskonstante des Kompetitors

IC_{50} : Wendepunkt der sigmoidalen Kurve

L: Konzentration des Radioliganden

K_D : Gleichgewichtsdissoziationskonstante des Radioliganden

$$K_D = IC_{50} - L$$

Gleichung 7

K_D : Gleichgewichtsdissoziationskonstante des Radioliganden

IC_{50} : Wendepunkt der sigmoidalen Kurve

L: Konzentration des Radioliganden

Die in Gleichung 6 bzw. Gleichung 7 einfließende Radioligandkonzentration wurde ermittelt, indem die eingesetzte Radioligandlösung an jedem Versuchstag mit Hilfe der Flüssigszintillation (Kapitel 3.2) nach Gleichung 1 berechnet wurde. Die Verdünnung der CHO-Zellmembranhomogenate bzw. der CHO-Zellsuspension (Tab. 8 und Tab. 9) musste so gewählt werden, dass maximal 10% des eingesetzten Radioliganden an die Rezeptoren banden, da unter dieser Voraussetzung die vor dem Versuch ermittelte Radioligandkonzentration mit derjenigen gleichgesetzt werden durfte, die nach Erreichen des Reaktionsgleichgewichtes im Versuchsansatz verblieb.

In der vorliegenden Arbeit wurden Affinitätswerte von Liganden im Reaktionsgleichgewicht durch die logarithmierte Gleichgewichtsdissoziationskonstante angegeben (pK_D - Werte im Falle der homologen Konkurrenz, pK_I -Wert im Falle der heterologen Konkurrenz/Interaktion).

Das Expressionsniveau des eingesetzten CHO-Zellmembranhomogenates oder der CHO-Zellsuspension ließ sich durch die Gleichung von DeBlasi (DeBlasi et al., 1989) bestimmen.

$$B_{max} = \frac{B \cdot IC_{50}}{L}$$

Gleichung 8

B_{max} : Maximale spezifische Radioligandbindung (entspricht der Rezeptorgesamtkonzentration)

B: Anzahl an Radioligand-Rezeptorkomplexen

IC_{50} : Wendepunkt der sigmoidalen Kurve

L: Konzentration des Radioliganden

B_{max} als molare Konzentration an Rezeptoren kann im Falle der Verwendung von CHO-Zellmembranhomogenaten durch die Kenntnis der Proteinkonzentration (Kapitel 3.1.4) in einem Wert in fmol (Rezeptoren) / mg (Protein), einer dafür gängigen Einheit, ausgedrückt werden. Soll die Expressionsdichte von Rezeptoren auf intakten CHO-Zellen ermittelt werden, kann unter Zuhilfenahme der eingesetzten Zellzahl / ml und der Avogadro-Konstante ein B_{max} -Wert in 'Rezeptoren / Zelle' errechnet werden.

Gleichung 1 kann angewendet werden, um aus den Kenndaten „Top“ und „Bottom“ der Konzentrationsbindungskurve, die nach der vier-Parameter-logistischen Gleichung (Gleichung 4) erhalten wurden, die Anzahl an Radioligand-Rezeptorkomplexen B zu berechnen. Gleichung 9 wurde zur Berechnung von B verwendet, wenn im Versuch CHO-Zellmembranhomogenate zum Einsatz kamen.

$$B = \frac{(Top - Bottom) \cdot 2,9}{A_{spez.} \cdot 2220 \cdot V} \cdot 10^{-9} \cdot F \cdot 10$$

Gleichung 9

B: Anzahl an Radioligand-Rezeptorkomplexen
 Top und Bottom: Oberes und unteres Kurvenplateau
 $A_{spez.}$: Spezifische Aktivität der radioaktiven Probe (Ci/mmol)
 2220: Umrechnungsfaktor
 V: Gesamtvolumen im Well
 F: Verdünnungsfaktor des CHO-Zellmembranhomogenates

Der Verdünnungsfaktor F bezeichnete das Verhältnis, mit dem das nach Kapitel 3.1.3 hergestellte CHO-Zellmembranhomogenat für den Versuch verdünnt wurde, um die in Tab. 8 und Tab. 9 aufgeführten, gewünschten Proteingehälter zu erhalten. Wurde beispielsweise ein Milliliter CHO-Zellmembranhomogenat mit vier Milliliter Inkubationspuffer vermischt, entsprach der Verdünnungsfaktor F einem Wert von 5. Die Multiplikation mit dem Wert 10 in Gleichung 9 rührte von der Tatsache, dass ein Volumen von 50 μ l CHO-Zellmembranhomogenat in einem Gesamtvolumen von 500 μ l pro Well enthalten war.

Bei der Anwendung intakter CHO-Zellen in homologen Wettbewerbsversuchen kam folgende Gleichung zum Einsatz.

$$B = \frac{(Top - Bottom) \cdot 2,9}{A_{spez.} \cdot 2220 \cdot V} \cdot 10^{-9}$$

Gleichung 10

B: Anzahl an Radioligand-Rezeptorkomplexen
 Top und Bottom: Oberes und unteres Kurvenplateau
 $A_{spez.}$: Spezifische Aktivität der radioaktiven Probe (Ci/mmol)
 2220: Umrechnungsfaktor
 V: Gesamtvolumen im Well

3.2.2.2 Heterologe Wettbewerbs- / Interaktionsexperimente

Mit „heterologen Wettbewerbsversuchen“ sind Versuche gemeint, bei denen sich der Radioligand vom Kompetitor unterscheidet, sie jedoch um die gleiche Bindungsstelle konkurrieren. Von „heterologen Interaktionsexperimenten“ wird gesprochen, wenn eine sich vom Radioliganden unterscheidende Testsubstanz eingesetzt wird und die Verbindungen nicht um die gleiche Bindungsstelle am Rezeptorprotein konkurrieren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden heterologe Wettbewerbs- / Interaktionsexperimente mit CHO-Zellmembranhomogenaten und CHO-Zellsuspensionen durchgeführt. Sie dienten der Ermittlung der Affinität eines Liganden zum Rezeptorprotein.

Die in die jeweiligen Auswertungen einfließende Konzentration des Radioliganden wurde ermittelt, indem die eingesetzte Radioligandlösung an jedem Versuchstag mit Hilfe der Flüssigszintillation (Kapitel 3.2) nach Gleichung 1 berechnet wurde. Wie bei homologen Wettbewerbsversuchen

musste auch in diesen Versuchen gewährleistet sein, dass die Verdünnung der CHO-Zellmembranhomogenate bzw. der CHO-Zellsuspension so gewählt war, dass maximal 10% des eingesetzten Radioliganden an die Rezeptoren banden, da unter dieser Voraussetzung die vor dem Versuch ermittelte Radioligandkonzentration mit derjenigen gleichgesetzt werden durfte, die nach Erreichen des Reaktionsgleichgewichtes im Versuchsansatz verblieb.

3.2.2.2.1 Heterologe Konkurrenzexperimente mit Orthosteren

Analog zum Vorgehen der homologen Konkurrenz wurden folgende Komponenten in Mikrotiterplatten (V19) pipettiert.

Komponente	Gesamtbindung (µl)	Unspezifische Bindung (µl)	Heterologe Konkurrenz (µl)	Eingesetzte Konzentration	Konzentration im Ansatz
Aqua destillata (R2)	50				
Atropin		50		30 µM	3 µM
Orthoster			50	10^{-x}	$10^{-(x+1)}$
CHO-Zellmembranhomogenat (in (L11))	50	50	50	200-400 µg/ml	20-40 µg/ml
Puffer (L11)	350	350	350	12,5 mM HEPES	10 mM HEPES
^3H NMS	50	50	50	2 nM	0,2 nM

Tab. 10: Pipettierschema eines heterologen Konkurrenzversuches mit CHO-Zellmembranhomogenaten. Wo nicht anders vermerkt, sind die Substanzen in Aqua destillata (R2) gelöst.

Komponente	Gesamtbindung (µl)	Unspezifische Bindung (µl)	Heterologe Konkurrenz (µl)	Eingesetzte Konzentration	Konzentration im Ansatz
Atropin		50		30 µM	3 µM
Orthoster			50	10^{-x}	$10^{-(x+1)}$
CHO-Zellsuspension	50	50	50	$1,5 \times 10^6$ Zellen / ml	$1,5 \times 10^5$ Zellen / ml
Puffer ((L17) und (L19))	400	350	350		
^3H NMS	50	50	50	2 nM	0,2 nM

Tab. 11: Pipettierschema eines heterologen Konkurrenzversuches mit CHO-Zellsuspensionen. Alle Komponenten sind im jeweiligen Inkubationspuffer gelöst. Die Wahl des jeweiligen Inkubationspuffers wurde an entsprechenden Stellen in Kapitel 4 und Kapitel 8 angezeigt.

Die Platten wurden für jeweils fünf Halbwertszeiten von [³H]NMS am jeweiligen Subtyp (Kapitel 4.1.1, Tab. 17, Seite 63), mindestens jedoch für zwei Stunden in einem Schüttelwasserbad (G20) bei 30°C inkubiert. Die Abtrennung der Radioligand-Rezeptorkomplexe mittels Vakuumfiltration und die Bestimmung der Radioaktivität mittels der Feststoffsintillation wurde in Kapitel 3.2 beschrieben. Trägt man die Radioaktivitätswerte (*counts per minute* (cpm)) gegen die logarithmierten Konzentrationen des Orthosters auf, kann mittels Gleichung 4 (vier-Parameter-logistische Gleichung) eine sigmoide Kurve mit einem negativen Steilheitsmaß an die Messwerte angepasst werden. Mittels der Cheng-Prusoff-Korrektur (Cheng und Prusoff, 1973) (Gleichung 6) wurde die Affinität des Kompetitors zum jeweiligen Rezeptor berechnet. In dieser Arbeit wurden die logarithmierten Gleichgewichtsdissoziationskonstanten angegeben (pK_i-Werte). In den Fällen, in denen die Kompetitionskurve einen von -1 abweichenden Hillkoeffizient aufwies, wurde die Affinität als apparente, logarithmierte Dissoziationskonstante bezeichnet (pK_{app}- Wert).

In an entsprechenden Stellen erwähnten Fällen wurden Kurven ermittelt, die mit einer biphasischen Anpassung beschrieben werden konnten.

$$B = Bottom + \left(Span \cdot \frac{F1}{1 + 10^{X - \log EC_{501}}} \right) + \left(Span \cdot \frac{1 - F1}{1 + 10^{X - \log EC_{502}}} \right) \quad \text{Gleichung 11}$$

B: Anzahl an Radioligand-Rezeptorkomplexen

Bottom: Unteres Kurvenplateau

Span: Summe aus oberen und unterem Kurvenplateau

F1: Anteil der hochaffinen Bindungsfraction

X: Konzentration des Kompetitors

EC₅₀₁ und EC₅₀₂: Wendepunkte der Inhibitionskurve (hochaffin und niedrigaffin)

Die aus der Analyse erhaltenen EC₅₀-Werte können mit Hilfe der Cheng-Prusoff-Korrektur (Cheng und Prusoff, 1973) (Gleichung 6) in Affinitätswerte für die zum Liganden höher affine und die niedriger affine Rezeptorpopulation transformiert werden.

3.2.2.2.2 Heterologe Interaktionsexperimente mit allosterischen Modulatoren

Der Versuchsansatz für heterologe Interaktionsexperimente mit allosterischen Modulatoren war aus folgenden Bestandteilen zusammengesetzt (Tab. 12 und Tab. 13).

Komponente	Gesamt- bindung (μ l)	Unspezifische Bindung (μ l)	Heterologe Interaktion (μ l)	Eingesetzte Konzentration	Konzentration im Ansatz
Aqua destillata (R2)	50				
Atropin		50		30 μ M	3 μ M
Alloster			50	10^{-x}	$10^{-(x+1)}$
CHO- Zellmembran- homogenat (in (R11))	50	50	50	200-400 μ g/ml	20-40 μ g/ml
Puffer (R11)	350	350	350	12,5 mM HEPES	10 mM HEPES
3 H]NMS	50	50	50	2 nM	0,2 nM

Tab. 12: Pipettierschema eines heterologen Interaktionsexperimentes mit CHO-Zellmembranhomogenaten. Wo nicht anders vermerkt, sind die Substanzen in Aqua destillata (R2) gelöst.

Komponente	Gesamt- bindung (μ l)	Unspezifische Bindung (μ l)	Heterologe Interaktion (μ l)	Eingesetzte Konzentration	Konzentration im Ansatz
Atropin		50		30 μ M	3 μ M
Alloster			50	10^{-x}	$10^{-(x+1)}$
CHO- Zellsuspension	50	50	50	$1,5 \times 10^6$ Zellen / ml	$1,5 \times 10^5$ Zellen / ml
Puffer ((L17) oder (L19))	400	350	350		
3 H]NMS	50	50	50	2 nM	0,2 nM

Tab. 13: Pipettierschema eines heterologen Interaktionsversuches mit CHO-Zellsuspensionen. Alle Komponenten sind im jeweiligen Inkubationspuffer gelöst. Im Falle der Versuche mit CHO-M2- und CHO-M2 W422A-Zellen wurde Puffer (L17) verwendet, im Falle der Versuche mit CHO-M3- und CHO-M3 W526A-Zellen wurde Puffer (L19) verwendet.

Die Platten wurden für die nach Gleichung 5 berechneten Zeiten in einem Schüttelwasserbad (G20) bei 30°C inkubiert. Die Abtrennung der Radioligand-Rezeptorkomplexe mittels Vakuumfiltration und die Bestimmung der Radioaktivität mittels der Feststoffsintillation wurde in Kapitel 3.2 beschrieben. Trägt man die Radioaktivitätswerte (*counts per minute* (cpm)) gegen die logarithmierten Konzentrationen des allosterischen Modulators auf, kann eine Kurve an die Datenpunkte mittels der Gleichung von Ehlert (1988) angepasst werden (Gleichung 12). Die Analyse ergibt den Affinitätswert des allosterischen Modulators zum Rezeptor (K_A).

$$B_A = B_0 \cdot \frac{L + K_L}{L + K_L \cdot \frac{K_A + A}{K_A + \frac{A}{\alpha}}}$$

B_A : spezifische Radioligandbindung in Anwesenheit des allosterischen Modulators

B_0 : spezifische Radioligandbindung in Abwesenheit des allosterischen Modulators

L : Konzentration des Radioliganden

K_L : Gleichgewichtsdissoziationskonstante des Radioliganden

K_A : Gleichgewichtsdissoziationskonstante des allosterischen Modulators

A : Konzentration des allosterischen Modulators

α : Kooperativitätsfaktor

Nach Ehlerts Kooperativitätsmodell (Ehlert, 1988) ist die Auswirkung des allosterischen Modulators auf die Affinität eines Liganden die gleiche wie die des Liganden auf die Affinität des allosterischen Modulators. Der Kooperativitätsparameter α ist Ausdruck für die Veränderung der Affinität des Radioliganden durch den Einfluss des Modulators (Ehlert, 1988; Tuček und Proška, 1995) und beschreibt das Verhältnis der Affinitäten des Modulators zum radioligandbesetzten und radioligandunbesetzten Rezeptorprotein. Als solches ist α größer 1, wenn sich die Affinität des Radioliganden zum Rezeptor bei gleichzeitiger Anwesenheit des Modulators erniedrigt und kleiner 1 im umgekehrten Fall. Die Validität des Kooperativitätsmodells ist gegeben, wenn der Term $[p\alpha + pK_A]$ mit dem $pEC_{0,5Dis}$ -Wert aus zweipunktkinetischen Experimenten übereinstimmt.

3.2.2.2.3 Heterologe Kompetitions- / Interaktionsexperimente mit Hybridliganden

In diesen Versuchen sollte die Affinität von dualsterischen Substanzen zum Rezeptorprotein ermittelt werden. Aufgrund ihres dynamischen Charakters können Hybridliganden in zwei Modi binden. Einerseits ist es möglich, dass sie eine dualsterische Bindung entfalten, in der der orthosterische Baustein in der endogenen Ligandbindungstasche zu liegen kommt, während der andere Teil des Moleküls (das allosterische Fragment) sich an die allosterische Bindungsstelle anlagert, oder aber der Ligand interagiert nur mit dem allosterischen Baustein, wobei der orthosterische Teil aus dem Rezeptorprotein herausragt (Antony et al., 2009). Daher kann bei diesen Versuchen einerseits von Kompetitionsreaktionen gesprochen werden (der Radioligand und der orthosterische Teil der Substanz konkurrieren um die gleiche Bindungsstelle am Rezeptor), im Falle des allosterischen Bindungsmodus der Substanz muss jedoch von einer Interaktion zwischen Radioligand, Rezeptor und Testsubstanz gesprochen werden.

Der Versuchsansatz für heterologe Kompetitions- / Interaktionsexperimente mit Hybridliganden war aus folgenden Bestandteilen zusammengesetzt (Tab. 14 und Tab. 15).

Komponente	Gesamt- bindung (μ l)	Unspezifische Bindung (μ l)	Heterologe Kompetition / Interaktion (μ l)	Eingesetzte Konzentration	Konzentration im Ansatz
Aqua destillata (R2)	50				
Atropin		50		30 μ M	3 μ M
Hybridligand			50	10^{-x}	$10^{-(x+1)}$
CHO- Zellmembran- homogenat (in (L11))	50	50	50	200-400 μ g/ml	20-40 μ g/ml
Puffer (L11)	350	350	350	12,5 mM HEPES	10 mM HEPES
3 [H]NMS	50	50	50	2 nM	0,2 nM

Tab. 14: Pipettierschema eines heterologen Kompetitions- / Interaktionsexperimentes mit CHO-Zellmembranhomogenaten. Wo nicht anders vermerkt, sind die Substanzen in Aqua destillata (R2) gelöst.

Komponente	Gesamt- bindung (μ l)	Unspezifische Bindung (μ l)	Heterologe Kompetition / Interaktion (μ l)	Eingesetzte Konzentration	Konzentration im Ansatz
Atropin		50		30 μ M	3 μ M
Hybridligand			50	10^{-x}	$10^{-(x+1)}$
CHO- Zellsuspension	50	50	50	$1,5 \times 10^6$ Zellen / ml	$1,5 \times 10^5$ Zellen / ml
Puffer ((L17) oder (L19))	400	350	350		
3 [H]NMS	50	50	50	2 nM	0,2 nM

Tab. 15: Pipettierschema eines heterologen Kompetitions- / Interaktionsversuches mit CHO-Zellsuspensionen. Alle Komponenten sind im jeweiligen Inkubationspuffer gelöst. Im Falle der Versuche mit CHO-M2- und CHO-M2 W422A-Zellen wurde Puffer (L17) verwendet, im Falle der Versuche mit CHO-M3- und CHO-M3 W526A-Zellen wurde Puffer (L19) verwendet.

Die Platten wurden für die nach Gleichung 5 berechneten Zeiten in einem Schüttelwasserbad (G20) bei 30°C inkubiert. Die Abtrennung der Radioligand-Rezeptorkomplexe mittels Vakuumfiltration und die Bestimmung der Radioaktivität mittels der Feststoffszintillation wurde in Kapitel 3.2 beschrieben. Die Radioaktivitätswerte (*counts per minute* (cpm)) werden gegen die logarithmierten Konzentrationen des Hybridliganden aufgetragen. Die Analyse der Datenpunkte erfolgte mit Hilfe des Bindungsmodells für dynamische Liganden (Bock et al., 2012 und 2014) (hier Gleichung 13). Voraussetzung dafür war die Kenntnis der Affinität und des Kooperativitätsfaktors des allosterischen

Fragmentes (Kapitel 3.2.2.2, Gleichung 12), die als Kenngrößen des Hybridliganden im allosterischen Bindungsmodus in die Gleichung einfließen.

$$Y = \frac{X \cdot R_T}{X + K_X \cdot \frac{1 + AB + \left(\frac{K_A + K_B}{K_A \cdot K_B}\right)}{1 + \frac{\alpha' \cdot AB}{K_B}}}$$

Gleichung 13

Y: Spezifische Bindung des Radioliganden

X: Konzentration des Radioliganden

R_T: Rezeptorgesamtkonzentration

K_X: Affinität des Radioliganden

AB: Konzentration des Hybridliganden

K_A: Gleichgewichtsdissoziationskonstante des Hybridliganden im dualsterischen Bindungsmodus

K_B: Gleichgewichtsdissoziationskonstante des Hybridliganden im allosterischen Bindungsmodus

α': Kehrwert des Kooperativitätsfaktors α des Hybridliganden im allosterischen Bindungsmodus

Zur Ermittlung des Anteils des dualsterischen im Vergleich zum allosterischen Bindungsmodus eines Hybridliganden wurden die jeweiligen Affinitätswerte zum Rezeptor ins Verhältnis gesetzt (Gleichung 14).

$$f = \frac{K_B}{K_A + K_B}$$

Gleichung 14

f: Anteil der Hybridligandbindung im dualsterischen Modus

K_A: Gleichgewichtsdissoziationskonstante des Hybridliganden im dualsterischen Bindungsmodus

K_B: Gleichgewichtsdissoziationskonstante des Hybridliganden im allosterischen Bindungsmodus

In den Kapiteln 4, 5 und 8 wird die Affinität des Hybridliganden im dualsterischen Bindungsmodus mit 'pK_{aktiv}' angegeben, denn nur in dieser Position sind die Substanzen in der Lage, den Rezeptor zu aktivieren. Dementsprechend war die Affinität des Liganden im allosterischen Bindungsmodus mit 'pK_{inaktiv}' benannt. Der Anteil der Hybridligandbindung im dualsterischen Bindungsmodus (f, Gleichung 14) wurde mit dem Faktor 100 multipliziert, um als Prozentwert angegeben werden zu können.

3.3 Funktionelle Untersuchungen

Brachten Radioligandbindungsversuche Informationen über die Kontaktaufnahme von Liganden zu den Rezeptoren ein, deckten funktionelle Untersuchungen die durch die Ligand-Rezeptor-Interaktion in Gang gesetzten Signaltransduktionsvorgänge auf. Die graphische Darstellung der Versuche erfolgte durch Auftragung der logarithmierten Konzentration von Liganden (Agonisten oder inverse Agonisten) gegen eine Größe, die die Antwort der CHO-Zellmembranhomogenate (im Falle der Messung der [³⁵S]GTPγS-Bindung, siehe Kapitel 3.3.2) bzw. der CHO-Zellen (im Falle der Messungen

der dynamischen Massenumverteilung (Kapitel 3.3.3), des intrazellulären IP1-Gehaltes (Kapitel 3.3.4) oder des intrazellulären cAMP-Gehaltes (Kapitel 3.3.5)) darstellte. Neben dem in Kapitel 3.3.1 beschriebenen Modell (*operational model of agonism*, Black und Leff, 1983), wurden die erhaltenen Daten mittels der vier-Parameter-logistischen Gleichung (Gleichung 4) ausgewertet, um die Kenngrößen E_{max} (Top), E_{min} (Bottom), n_H (Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit) und pEC_{50} (logarithmierter Wendepunkt der Kurve) als Maß für die Wirksamkeit des Liganden zu erhalten.

3.3.1 Das *operational model of agonism* (Black und Leff, 1983) und die Feststellung eines *ligand bias*

Der E_{max} -Wert eines Partialagonisten aus einer Konzentrations-Effektkurve nach Auswertung mit der vier-Parameter-logistischen Gleichung (Gleichung 4) kann mit der eines Vollagonisten zusammenfallen, wenn in dem System mehr Rezeptoren zur Verfügung stehen, als für eine maximale Systemantwort notwendig sind (Rezeptorreserve). Dies ist umso wahrscheinlicher, je mehr das zu quantifizierende Signal einer Signalamplifikation unterlegen war. Rajagopal et al. (2010) und (2011) beobachteten eine Abhängigkeit der E_{max} - sowie der pEC_{50} -Werte als Ausdruck einer Ligandwirksamkeit von diesen beiden Phänomenen.

Daneben kann die Kopplungseffizienz τ (*transducer ratio*, Black und Leff, 1983) als Maß des Agonismus eines Liganden herangezogen werden und beschreibt das Verhältnis der Gesamtkonzentration an Rezeptoren zu denjenigen, die durch Interaktion mit einem Agonisten für eine halbmaximale Systemantwort nötig sind (Gleichung 15; Black und Leff, 1983).

$$\tau = \frac{B_{max}}{K_E}$$

Gleichung 15

τ : Kopplungseffizienz, *transducer ratio*

B_{max} : Gesamtkonzentration an Rezeptoren

K_E : Agonist-Rezeptorkomplexe für eine halbmaximale Systemantwort

τ quantifiziert die Fähigkeit eines Agonisten, die Bindung zum Rezeptor in eine Zellantwort zu übersetzen. Konzentrations-Effekt-Kurven werden demnach mit dem *operational model of agonism* (Black und Leff, 1983) analysiert.

$$E = \frac{E_{max} \cdot \tau \cdot X}{(K_A + X) + \tau \cdot X}$$

Gleichung 16

E: Systemantwort

E_{max} : Maximale Systemantwort

τ : Kopplungseffizienz

X: Konzentration des Agonisten

K_A : Gleichgewichtsdissoziationskonstante des Agonisten

Durch das *operational model of agonism* (Black und Leff, 1983) wird neben der Kopplungseffizienz τ auch der Affinitätsparameter K_A des Agonisten erhalten. Diese „funktionelle Affinität“ muss nicht

zwangsweise mit dem Parameter übereinstimmen, der in Radioligandbindungsuntersuchungen erhoben wurde. Dabei können Auswirkungen unterschiedlicher Versuchsbedingungen eine Rolle spielen. Auch die im Prozess der Aktivierung ablaufenden Konformationsänderungen des Rezeptorproteins (wie die allosterische Einflussnahme des G-Proteins) führen zu in der Regel höheren Affinitäten im Vergleich zu den in Radioligandbindungsuntersuchungen ermittelten Werten (Keov et al., 2014).

Die Kopplungseffizienz τ als Maß der intrinsischen Aktivität eines Agonisten bietet den Vorteil, dass sie in einen Wert transformiert werden kann, der das Rezeptorexpressionsniveau im Vergleich zu einem Referenzrezeptor berücksichtigt (Gregory et al., 2010; Keov et al., 2014) (Gleichung 17). Dies ist vor dem Hintergrund interessant, wenn es darum geht, die intrinsische Aktivität eines Agonisten zwischen zwei Zelllinien oder Zellmembranhomogenaten mit unterschiedlicher Rezeptorexpression zu vergleichen, da das Expressionsniveau pharmakologische Kenngrößen aus funktionellen Experimenten wie Wirksamkeit (pEC_{50}) und intrinsische Aktivität (E_{max} -Wert) beeinflusst (Stahl et al., 2011; Katzung et al., 2012). Neben einer Logarithmierung wurde in dieser Arbeit die von Keov et al. (2014) verwendete Gleichung 17 so umgestellt, dass zur Korrektur des Wertes $\log \tau$ der Faktor, um den sich der Referenzrezeptor vom Testrezeptor unterscheidet, in der Gleichung sichtbar wird (Gleichung 18).

$$\tau_c = \frac{\tau}{\text{Normierte Rezeptorexpression}}$$

Gleichung 17

τ_c : Korrigierte Kopplungseffizienz

τ : Kopplungseffizienz

Normierte Rezeptorexpression: Anteil der Expression im Vergleich zu einem Referenzrezeptor

$$\log \tau_{korr} = \log \tau + \log F$$

Gleichung 18

$\log \tau_{korr}$: Logarithmierte und korrigierte Kopplungseffizienz

$\log \tau$: Logarithmierte Kopplungseffizienz

F: Korrekturfaktor, um den sich der Referenzrezeptor vom Testrezeptor unterscheidet

Die Anwendung von Gleichung 18 setzt die Kenntnis des Korrekturfaktors F voraus, der durch das Verhältnis der Expressionsniveaus zweier Zelllinien oder Membranhomogenate ermittelt werden kann. Exprimiert Zelllinie A (Referenzrezeptor) das Doppelte von Zelllinie B (Testrezeptor), so kann zur Kopplungseffizienz $\log \tau$ von B nach Gleichung 18 der Term $[\log 2]$ addiert werden. Der erhaltene Wert $\log \tau_{korr}$ entspricht der theoretischen Kopplungseffizienz von B, wenn sich die Expressionsniveaus zwischen den Zelllinien A und B nicht unterschieden hätten.

Auf dem Feld der GPCR kann das *operational model of agonism* (Black und Leff, 1983) der Beantwortung der Frage dienen, ob ein Agonist im Vergleich zu einem Referenzagonisten in der Lage ist, einen Signalweg gegenüber einem anderen zu favorisieren. Diese Eigenschaft wird als *ligand bias* bezeichnet.

Rajagopal et al. (2011) quantifizierten diese Eigenschaft eines Liganden auf der Grundlage des *operational model of agonism* (Black und Leff, 1983) über Biasfaktoren (β -Werte), die über die Ermittlung des *effective signaling* (σ -Werte) errechnet werden konnten. σ -Werte stellen die Kopplungseffizienz eines Liganden in Relation zu einem Referenzagonisten dar (Gleichung 19).

$$\sigma = \log\left(\frac{\tau_{Ligand}}{\tau_{Referenz}}\right)$$

Gleichung 19

σ : effective signaling (Rajagopal et al. (2011))

In einem Koordinatensystem, bei dem auf den beiden Achsen jeweils die σ -Werte eines Liganden auf zwei Signalwegen aufgetragen sind (σ_1 und σ_2), stellt der Abstand des Datenpunktes eines Liganden zur Winkelhalbierenden den Biasfaktor β dar (Gleichung 20).

$$\beta = \frac{\sigma_1 - \sigma_2}{\sqrt{2}}$$

Gleichung 20

β : Biasfaktor (Rajagopal et al., 2011)

Ein signifikanter Unterschied des β -Wertes eines Liganden zu Null (Wert für den Referenzagonisten), ist als *bias* definiert.

Daneben werden zur Ermittlung des *ligand bias* die Transduktionskoeffizienten $\log(\tau / K_A)$ eines Agonisten und eines Referenzagonisten auf zwei Signalwegen ermittelt. Dieser Term vereint in sich die Kopplungseffizienz als Maß für die intrinsische Aktivität und K_A als Maß für die funktionelle Affinität eines Agonisten. In Relation zum Vollagonisten gesetzt, kann der Transduktionskoeffizient des Agonisten als $\Delta \log(\tau / K_A)$ ausgedrückt werden. Dieser Wert bezeichnet nun die relative intrinsische Aktivität des Agonisten auf einem speziellen Signalweg. Als Maßzahl für den *ligand bias* wird schlussendlich der Wert $\Delta \Delta \log(\tau / K_A)$ durch die Subtraktion der beiden relativen Transduktionskoeffizienten der beiden Signalwege ermittelt (Kenakin et al., 2012). Da der Referenzagonist definitionsgemäß keinen *ligand bias* aufweist, ihm also ein Nullwert zugeordnet werden kann, wurde ein *ligand bias* eines Agonisten dann gefunden, wenn der Wert $\Delta \Delta \log(\tau / K_A)$ von Null in einer Weise abwich, bei der die 95%-Konfidenzintervalle den Nullwert nicht umschlossen (Bock et al., 2012).

3.3.2 Messung der [³⁵S]GTP γ S-Bindung

Die radioaktive Substanz [³⁵S]GTP γ S unterscheidet sich von Guanosintriphosphat (GTP) in der Weise, dass ein Sauerstoffatom des γ -ständigen Phosphatrestes durch das radioaktive Isotop [³⁵S] ausgetauscht wurde. In einem Versuchsansatz mit diesem zur α -Untereinheit von G-Proteinen Affinität aufweisenden Radioliganden, einem GPCR und einem Agonisten kommt es durch die Aktivierung des Rezeptors zum Austausch von am G-Protein gebundenen GDP durch das radioaktive [³⁵S]GTP γ S. Damit kann sich der physiologische G-Proteinzyklus nicht weiter fortsetzen, da der Radioligand eine GTPase-Stabilität aufweist und die [³⁵S]GTP γ S-G-Protein-Komplexe akkumulieren.

Damit ist der erhaltene Radioaktivitätswert ein direktes Maß für die Agonist-vermittelte Rezeptoraktivierung.

Da der Radioligand geladen ist und somit seinen Bestimmungsort, das Innere der Zelle, nicht erreichen kann, müssen [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimente mit Zellmembranhomogenaten durchgeführt werden. Für den Versuch wurden folgende Komponenten in eine Mikrotiterplatte (V19) pipettiert.

Komponente	Basale Bindung (μl)	Inverser Agonist (μl)	Testlösung (μl)	Eingesetzte Konzentration	Konzentration im Ansatz
Aqua destillata (R2)	100	50	50		
Atropin		50		30 μM	3 μM
Agonist / Hybridligand			50	10 ^{-x}	10 ^{-(x+1)}
GDP (in (L11))	50	50	50	M2: 100 μM M3: 10 μM	10 μM 1 μM
CHO-Zellmembran-homogenat (in (L11))	50	50	50	400 μg/ml	40 μg/ml
Puffer (L11)	250	250	250	12,5 mM HEPES	10 mM HEPES
[³⁵ S]GTPγS (in (L11))	50	50	50	0,7 nM	0,07 nM

Tab. 16: Pipettierschema eines [³⁵S]GTPγS-Bindungsversuchsmit CHO-Zellmembranhomogenaten. Wo nicht anders vermerkt, sind die Substanzen in Aqua destillata (R2) gelöst.

Durch den Einsatz des inversen Agonisten Atropin sollte ein potentielles inverses Messfenster detektiert werden. Der Zusatz von GDP im Versuchsansatz dient der Vergrößerung des Messfensters für die Agonist-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung, da es leere Nukleotidbindungsstellen der α-Untereinheiten absättigt und somit die basale Radioligandbindung reduziert und dabei eine höhere Affinität zu nicht aktivierten G-Proteinen aufweist (Harrison und Traynor, 2003). Nach der Zugabe des CHO-Zellmembranhomogenates wurde die Mikrotiterplatte (V19) für eine Stunde bei 30°C im Schüttelwasserbad (G20) inkubiert. Dieser Zeitraum zur Akkumulation der an G-Proteine gebundenen Radioliganden erwies sich in der Vergangenheit bereits als geeignet, um ein gut detektierbares Messfenster zu erhalten (Kebig, Dissertationsschrift, 2010; Janßen, Dissertationsschrift, 2011). Zur Abtrennung der Radioligand-G-Protein-Komplexe mittels Vakuumfiltration (G18) wurde der Filter (V12) zuvor für zwei Minuten in Aqua destillata (R2) gelegt. Die Radioaktivität wurde durch Feststoffsintillation ermittelt, wobei analog dem Protokoll für Radioligandbindungsuntersuchungen vorgegangen wurde (siehe Kapitel 3.2). Die Radioaktivitätswerte (*counts per minute* (cpm)) wurden gegen die logarithmierten Konzentrationen des Agonisten bzw. Hybridliganden aufgetragen. Die Analyse der Datenpunkte erfolgte mit Hilfe der vier-Parameter logistischen Gleichung (Gleichung 4) und / oder des *operational model of agonism* (Black und Leff, 1983) (Gleichung 16). Gegebenenfalls wurden die aus Gleichung 16 erhaltenen Kopplungseffizienzen (log τ -Werte) mit Gleichung 18

transformiert, um eine Expressionsfaktor-Korrektur vorzunehmen. Dies wurde an entsprechenden Stellen in den Kapiteln 4 und 8 vermerkt.

3.3.3 Messung der dynamischen Massenumverteilung (DMR)

Die Messung der dynamischen Massenumverteilung (DMR: dynamic mass redistribution) wurde als sondenfreies, funktionelles Versuchsformat von Schröder et al. (2010) und (2011) detailliert beschrieben. Es erlaubt, die Agonist-vermittelten Verlagerungen intrazellulärer Massen in Echtzeit zu detektieren und konnte bereits der Untersuchung einer Reihe von GPCR wie β 2- und muskarinischen Acetylcholinrezeptoren (in rekombinanten Systemen und als endogen exprimierte Rezeptoren) sowie der Detektion aller vier G-Protein-abhängigen Signalkaskaden dienen (Schröder et al., 2010; Janßen, Dissertationsschrift, 2011; Deng et al., 2013).

Das Messprinzip der DMR-Detektion beruht auf der Ligand-induzierten Veränderung der optischen Dichte desjenigen Teils des Intrazellularraums, der unmittelbar auf einem optischen Biosensor positioniert ist. Diese Dichteveränderung wird durch intrazelluläre Massenumverteilungen infolge verschiedener Transduktionsvorgänge verursacht und kann erfasst werden, indem der optische Biosensor auf der zellabgewandten Seite mit Breitbandlicht bestrahlt wird und durch die Interaktion mit Zellbestandteilen ausschließlich Licht einer speziellen Wellenlänge wieder ausgesandt wird. Dabei gilt, dass die reflektierte Wellenlänge (in Picometern; pm) umso größer ist, je mehr „Massen“ sich im Detektionsbereich der Zelle oberhalb des Biosensors befinden, je höher also die optische Dichte in diesem Bereich ist. Im Falle der Detektion einer dynamischen Massenumverteilung durch die Aktivierung eines GPCR mit einem Agonisten verändert sich die optische Dichte im Detektionsbereich abhängig von den angeschalteten Signalwegen. Dabei werden Werte erhalten, die die Verschiebung der Ausgangswellenlänge (ohne Agonist) zur Wellenlänge nach Agonist-Stimulation quantifizieren, also eine Differenz in Picometern (Δ pm). Im Ergebnis wird eine Signatur von Werten der Wellenlängenverschiebung über einen gewählten Zeitraum erhalten, die in ihrer Form, ihrem Ausmaß und ihrer Ausrichtung vom zellulären Kontext, dem aktivierten Rezeptor, den angeschalteten Signalwegen und dem Agonisten abhängt (Schröder et al., 2010; Deng et al., 2013).

Das Protokoll zur Detektion der dynamischen Massenumverteilung nach Agonist-Stimulation von muskarinischen Acetylcholinrezeptoren war maßgeblich der Arbeit von Schröder et al. (2011) entnommen. In eine 384-Wellplatte, deren Boden den für die DMR-Messung benötigten optischen Biosensor bildete (V2), wurden die zu testenden CHO-Zellen pro Well in einer Dichte von 12500 Zellen/30 μ l Nährmedium (L21) ausgesät. Die Zellen in der Platte wurden bei Raumtemperatur für zehn Sekunden bei 800 rpm (*rounds per minute*, Umdrehungen pro Minute) herunterzentrifugiert (G4 mit Rotor JS 5.3) und für ca. 4 Stunden bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ inkubiert (G35). Im Falle von erwünschten Vorinkubationen mit Pertussis- (R46) und / oder Cholera-toxin (R5) wurden diese Substanzen 16-18 Stunden vor dem Waschen der Zellen (siehe unten) in die Wells der Platte (V2) zugegeben (Endkonzentration im Well: je 100 ng/ml, gelöst in Nährmedium für Flp-InTM-CHO-Zellen (L21)). Nach diesem Zeitraum (ca. zwei bis drei Stunden vor der Agonist-Zugabe und damit dem Beginn der aufzuzeichnenden dynamischen Massenumverteilung) bildeten die Zellen auf dem Boden der Wells und somit direkt auf dem optischen Biosensor einen konfluenten Zellrasen. Sogleich wurde das Medium mit Hilfe einer Absaugvorrichtung (G1) entfernt und die Zellen zweimal mit 50 μ l Inkubationspuffer für DMR-Messungen (L17) pro Well gewaschen. Im Falle von erwünschten Vorinkubationen mit QIC ((R50), gelöst in Inkubationspuffer für DMR-Messungen (L17)) und / oder Aluminiumfluoridlösung (L4) wurden diese Substanzen zwei Stunden vor der Agonist-Zugabe und damit dem Beginn der aufzuzeichnenden dynamischen Massenumverteilung zugegeben. Dabei

wurden Endkonzentrationen von 1 μM QIC bzw. 300 μM Aluminiumfluorid eingehalten. Das Endvolumen im Well betrug nach diesen Wasch- bzw. Zugabeschritten 30 μl .

Parallel zur Vorbereitung der Zellplatte (V2) für den Versuch wurde eine 384-Wellplatte (V18) mit den gewünschten Testsubstanzen vorbereitet (*source plate*, (V18)). Dabei wurden in jedes Well 30 μl der Testsubstanzlösung einpipettiert.

Zur Detektion der dynamischen Massenumverteilung wurde ein EPIC® BT ALPHA-Gerät (G11) verwendet. Die Versuchsplatte mit den gegebenenfalls vorbehandelten Zellen (V2) wurde für eine Stunde bei 28°C auf das in einem Inkubator (G22) stehende EPIC®BT ALPHA-Gerät (G11) platziert. Nach dieser Zeit wurde die Messung der dynamischen Massenumverteilung ohne den Einfluss von Testliganden gestartet (*baseline read*). Die laufende Messung wurde kurzzeitig unterbrochen, um die Versuchsplatte von dem das EPIC®BT ALPHA-Gerät (G11) enthaltenen Inkubator (G22) in einen benachbarten, ebenfalls auf 28°C temperierten Inkubator (G21) zu verbringen, in dem der Pipettierroboter CyBi®SELMA (G7) stationiert war. Zuvor war dort der Platte mit den Testliganden (*source plate*, (V18)) durch eine Ansaugvorrichtung aus 384 Hohlspitzen aus jedem Well 10 μl des Volumens an Testligandlösung entnommen worden. In schneller Abfolge wurden diese 10 μl der Testsubstanzlösungen durch die Robotik des Gerätes (G7) nun in die Versuchsplatte mit den Zellen (V2) gegeben. Unmittelbar im Anschluss wurde diese wiederum auf das EPIC®BT ALPHA-Gerät (G11) platziert und mit der Messung wurde für 75 Minuten fortgefahren. Die Werte der Wellenlängenverschiebung (in Δpm) wurden gegen die Zeit (in Sekunden, s) aufgetragen. Auf diese Weise konnte für jedes Well eine Signatur dargestellt werden, die den Effekt der dynamischen Massenumverteilung in den getesteten Zellen durch Einflussnahme der zugegebenen Testsubstanz über die Zeit sichtbar machte. Von jedem Messsignal wurde das durch den Inkubationspuffer (L17) verursachte Signal abgezogen, was zu sogenannten „baselinien-korrigierten“ Werten führte. Eine Ausnahme bildeten die Daten, die in Kapitel 8.4.1 dargestellt wurden; dies wurde jedoch an den entsprechenden Stellen angezeigt und erläutert.

Zur Quantifizierung aller in dieser Arbeit in DMR-Messungen detektierten Ligand-induzierten Effekte in CHO-M3- und CHO-M3 W526A-Zellen wurde die Fläche unter der bis zum Zeitpunkt 3600 s reichenden Signatur ermittelt (AUC, *area under the curve*). Für die Aktivierung von CHO-M3-Zellen durch den endogenen Liganden Acetylcholin konnte gezeigt werden, dass diese Auswertungsmethode mit anderen Varianten wie der Quantifizierung des Wertes nach verschiedenen Ableszeitpunkten in guter Übereinstimmung stand (Schröder et al., 2011). Die Analyse der Datenpunkte erfolgte mit Hilfe der vier-Parameter logistischen Gleichung (Gleichung 4) und / oder des *operational model of agonism* (Black und Leff, 1983) (hier Gleichung 16). Gegebenenfalls wurden die aus Gleichung 16 erhaltenen Kopplungseffizienzen ($\log \tau$ -Werte) mit Gleichung 18 transformiert, um eine Expressionsfaktor-Korrektur vorzunehmen. Dies wurde an entsprechenden Stellen in Kapitel 4 vermerkt.

3.3.4 Messung des intrazellulären IP1-Gehaltes (IP1-Assay)

Die Kopplung von GPCR an Gq/11- und Gi-Proteine kann zur Aktivierung des Enzyms Phospholipase C β führen. Während dies von der α -Untereinheit von Gq/11-Proteinen vermittelt wird, ist es im Falle des Gi-Proteins die $\beta\gamma$ -Untereinheit (Exton, 1996). Phospholipase C β führt zur Katalyse des Phosphatidylinositolbiphosphates in Diacylglycerin und Inositol-3-phosphat; letzteres führt zur Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels. Sowohl Inositol-3-phosphat (oder dessen

Abbauprodukte) als auch die Calciumionen können mit verschiedenen Verfahren bestimmt werden, was der Quantifizierung einer GPCR-vermittelten Zellantwort dienen kann.

Eine einfach anzuwendende Methode, um die $G\alpha_q/11$ -Induktion bzw. den $\beta\gamma$ -Effekt des Gi-Proteins in Folge der Agonist-vermittelten CHO-M3- oder CHO-M2-Aktivierung zu detektieren, ist ein Immunoassay, bei dem das FRET-(Förster-Resonanzenergietransfer)-Signal zwischen einem Europium-markierten Antikörper und einem Farbstoff (d2)-gekoppelten Inositol-1-phosphat quantifiziert wird (HTRF®-IP-One Tb- Kit (R25)). Der Zusatz von Lithiumchlorid im Inkubationspuffer (L19) führt zur Hemmung des Enzyms Inositolmonophosphatase, wodurch die Phospholipase C β -vermittelte Generierung des sekundären Botenstoffes Inositol-3-phosphat zu einer Anreicherung des Abbauproduktes Inositol-1-Phosphat (IP1) führt. Dieses konkurriert nun mit dem im Versuchsansatz vorhandenen d2-gekoppelten IP1 (d2-IP1) um die Bindung an den Europium-markierten Antikörper (Trinquet et al., 2006). Er fungiert als Energiedonor und sendet, nach Anregung bei einer Wellenlänge von 665 nm, Energie aus, die bei 620 nm in einem Fluoreszenzmessgerät (Mithras LB 960, (G27)) ermittelt werden kann. Überträgt der Donor seine Energie auf das d2-IP1 (Akzeptor), emittiert es Energie, die bei einer Wellenlänge von 665 nm ermittelt wird. Im Ergebnis wird ein FRET-Verhältnis erhalten, das durch folgende Formel errechnet wird.

$$Ratio = \frac{A_{665\text{ nm}}}{A_{620\text{ nm}}} \cdot 10^4$$

Gleichung 21

$A_{665\text{ nm}}$: Emission des angeregten Akzeptors

$A_{620\text{ nm}}$: Emission des angeregten Donors

Der nach Gleichung 21 berechnete Wert ist umso höher, je mehr d2-IP1 der Interaktion mit dem Antikörper zur Verfügung steht, je weniger endogenes IP1 also in der Zelle vorliegt. Erhöht sich in der Zelle der Gehalt an endogenem IP1 beispielsweise in Folge der Aktivierung eines GPCR durch einen Agonisten und anschließender G-Protein-vermittelter Induktion der Phospholipase C β , wird die Annäherung des d2-IP1 an den Europium-markierten Antikörper unwahrscheinlicher und das Ratio (Gleichung 21) nimmt kleinere Werte an im Vergleich mit der Situation, wenn kein bzw. weniger endogenes IP1 vorhanden ist. Der nach Gleichung 21 erhaltene Wert wird nach Vorgabe der Herstelleranleitung (R25) in einen Wert *Delta F* nach folgender Formel transformiert.

$$Delta\ F = \frac{Ratio_{Test} - Ratio_{Neg}}{Ratio_{Neg}} \cdot 100$$

Gleichung 22

$Ratio_{Test}$: Nach Gleichung 21 erhaltener Wert für eine Testsubstanz

$Ratio_{Neg}$: Nach Gleichung 21 erhaltener Wert für die Negativkontrolle

Bei der Negativkontrolle handelt es sich um das FRET-Ratio, das durch den alleinigen Zusatz des Europium-markierten Antikörpers detektiert wird.

Für die Versuche wurde das in der Herstelleranleitung des Kits (R25) beschriebene „Zweistufenprotokoll“ befolgt. Die Aussaat der CHO-Zellen, die gegebenenfalls 16-18 Stunden mit

100 ng/ml PTX vorbehandelt waren, erfolgte in einer 384-Well-Mikrotiterplatte (G24). Das Protokoll sah vor, die Zellen in einer Dichte von 100000 Zellen / Well auszusäen. Die Zellsuspension war im Inkubationspuffer für IP1-Messungen (L19) gelöst und das in jedes Well pipettierte Volumen belief sich auf 7 μ l. Nach einer zehneckündigen Zentrifugation bei 800 rpm (*rounds per minute*, Umdrehungen pro Minute) bei Raumtemperatur ((G4) mit Rotor JS 5.3) wurde die Zellplatte (G24) für 20 Minuten inkubiert (G35). Es folgte die Zugabe von 7 μ l der Testlösung in Zweifachkonzentration (Verdünnung im Well: 1:2). Nach 30 Minuten im Inkubator (G35) wurden den Wells in schneller Abfolge zunächst je 3 μ l d2-IP1 und anschließend je 3 μ l Europium-markiertem Antikörper zugesetzt. Die Vermessung der Zellplatte (G24) im Mithras LB 960 (G27) erfolgte zwei Stunden nach Antikörperzugabe.

In den Fällen, in denen das Gq-Protein durch QIC ausgeschaltet werden sollte, wurde das Protokoll leicht variiert. Nach Aussaat der Zellen und der Inkubationszeit von 20 Minuten (siehe oben) erfolgte der Zusatz von 3,5 μ l einer 4 μ M QIC- Lösung in Inkubationspuffer (L19). Zeitgleich wurde den Wells, in denen keine QIC-Vorbehandlung erwünscht war, 3,5 μ l Puffer (L19) zugesetzt. Als Inkubationszeit für QIC wurden 30 Minuten gewählt (Product Information UBO-QIC, 2014), in denen die Zellplatte (G24) inkubiert wurde (G35). Es folgte die Zugabe von 3,5 μ l der vierfachkonzentrierten Testlösung (Verdünnung im Well: 1:4), worauf sich das Protokoll, wie im vorherigen Absatz beschrieben, fortsetzte.

Die nach Gleichung 22 erhaltenen Werte wurden gegen die logarithmierten Konzentrationen des Agonisten bzw. des Hybridliganden aufgetragen. Da das Messsignal zunächst invers war (höhere Gehälter an endogenem IP1 resultierten in kleinen Werten, das Basalniveau stellte den höchsten Wert dar), wurde nach Analyse der Daten durch die vier-Parameter-logistische Gleichung (Gleichung 4, negativer Hill-Koeffizient) zunächst eine Normierung vorgenommen, bei der der „Top-Wert“ (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve) als 0%-Wert und der „Bottom-Wert“ (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve) als 100%-Wert festgesetzt wurde. Weiterhin konnten die so erhaltenen Datenpunkte wiederum mit einer vier-Parameter-logistischen Gleichung (Gleichung 4, positiver Hill-Koeffizient) und dem *operational model of agonism* (Black und Leff, 1983; Gleichung 16) analysiert werden. Gegebenenfalls wurden die aus Gleichung 16 erhaltenen Kopplungseffizienzen (log τ -Werte) mit Gleichung 18 transformiert, um eine Expressionsfaktor-Korrektur vorzunehmen. Dies wurde an entsprechenden Stellen in Kapitel 4 vermerkt.

3.3.5 Messung des intrazellulären cAMP-Gehaltes (cAMP-Assay)

Um die Gs- Aktivierung in CHO-M3, CHO-M3 W526A, CHO-M2- und CHO-M2 W422A-Zellen auf der Ebene des sekundären Botenstoffs zu detektieren, wurde die Agonist- oder Hybridligand-induzierte Erhöhung des Gehaltes an intrazellulärem cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) in Folge der rezeptorvermittelten Aktivierung der Adenylatcyclase ermittelt. Dabei wurde das HTRFcAMP dynamic 2-Kit (R24) verwendet, dessen Messprinzip dem des HTRF-IP-One Tb-Kits (R25) gleicht (Kapitel 3.3.4). In diesem Fall konkurriert endogen von der Zelle produziertes cAMP mit einem dem Versuchsansatz zugeführten d2-cAMP um einen Europium-markierten Antikörper, was zu FRET-Signalen führt, die nach Gleichung 21 ermittelt und durch Gleichung 22 transformiert werden.

Der Versuch wurde nach dem Zweistufenprotokoll der Herstellungsanleitung des Kits (R24) durchgeführt, wobei die Zellen in einer Dichte von 50000 Zellen / Well in einer 384-Well-Mikrotiterplatte (G24) ausgesät wurden. Um dem hemmenden Einfluss auf die Adenylatcyclase und damit auf den cAMP-Gehalt durch das Gi-Protein entgegenzuwirken, wurden die Zellen 16-18

Stunden vor dem Versuch mit 100 ng/ml PTX vorbehandelt. Das im Inkubationspuffer (L16) enthaltene 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (R28) diente zur Phosphodiesterasehemmung und verhinderte so den Abbau des generierten cAMP. Nach Zugabe von 5 µl der Zellsuspension (in (L16)) in die Wells der Mikrotiterplatte (G24) wurde diese für zehn Sekunden mit 800 rpm (*rounds per minute*, Umdrehungen pro Minute) bei Raumtemperatur zentrifugiert ((G4) mit Rotor JS 5.3). Nach 30 minütiger Inkubation (G35) wurden 5 µl der Testsubstanzlösung in Zweifachkonzentration (Verdünnung im Well: 1:2) in die Wells der Zellplatte (G34) zugegeben und für weitere 30 Minuten inkubiert (G35). Daran schloss sich die Zugabe von je 5 µl des d2-cAMP und des Europium-markierten Antikörpers an. Die Vermessung der Zellplatte (G24) im Mithras LB 960 (G27) erfolgte zwei Stunden nach Antikörperzugabe.

Die zunächst inversen Messsignale wurden, wie in Kapitel 3.3.4 beschrieben, umnormiert und mit Hilfe der vier-Parameter-logistischen Gleichung (Gleichung 4) und dem *operational model of agonism* (Black und Leff, 1983; Gleichung 16) analysiert. Gegebenenfalls wurden die aus Gleichung 16 erhaltenen Kopplungseffizienzen ($\log \tau$ -Werte) mit Gleichung 18 transformiert, um eine Expressionsfaktor-Korrektur vorzunehmen. Dies wurde an entsprechenden Stellen in Kapitel 4 vermerkt.

3.4 Statistik

Alle in diesem Kapitel beschriebenen statistischen Werte und Tests wurden im Rahmen dieser Arbeit durch Computerprogramm GraphPad Prism® 5.01 (P2) berechnet bzw. durchgeführt. Die Informationen stammen aus dem internen Hilfsprogramm „GraphPad Prism® User’s Guide“ und dem „GraphPad Prism® Regression Book, Version 4.0“ (Motulsky und Christopoulos, 2004).

3.4.1 Der arithmetische Mittelwert und der Standardfehler

Die in der vorliegenden Arbeit angegebenen Mittelwerte waren arithmetische Mittelwerte (Gleichung 23), als Streuungsmaß wurde der Standardfehler (Gleichung 25) (*standard error of the mean*, S.E.M.) angegeben.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i$$

Gleichung 23

\bar{x} : Arithmetischer Mittelwert

n: Anzahl an unabhängigen Experimenten

x_i : Messwert des i-ten unabhängigen Experimentes

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

Gleichung 24

SD: Standardabweichung
 n: Anzahl an unabhängigen Experimenten
 n-1: Anzahl der Freiheitsgrade
 x_i: Messwerte des i-ten unabhängigen Experimentes
 \bar{x} : Arithmetischer Mittelwert

$$S.E.M. = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

Gleichung 25

S.E.M.: *Standard error of the mean*; Standardfehler
 SD: Standardabweichung (Gleichung 24)
 n: Anzahl an unabhängigen Experimenten

Zur Festlegung des Standardfehlers eines Parameters, der durch die Subtraktion zweier Kenngrößen, die ihrerseits einen Standardfehler haben, ermittelt wurde, kam das Gaußsche Fehlerfortpflanzungsgesetz zum Einsatz.

$$S.E.M. \text{ gesamt} = \sqrt{(S.E.M. a)^2 + (S.E.M. b)^2}$$

Gleichung 26

S.E.M. a: Standardfehler (Gleichung 25) der Kenngröße a
 S.E.M. b: Standardfehler (Gleichung 25) der Kenngröße b
 S.E.M. gesamt: Standardfehler des Parameters [a-b]

3.4.2 Statistische Tests

Mittels eines **F-Tests** wurde überprüft, ob für eine sigmoidale Kurve, die durch eine nichtlineare Regressionsanalyse aus Datenpunkten erhalten wurde, angenommen werden durfte, dass sie eine Steilheit von $n_H = 1$ (bzw. $n_H = -1$) (Nullhypothese) aufwies, oder ob sie mit einem variablen Hillkoeffizienten ($n_H \neq 1$; bzw. $n_H \neq -1$) (Alternativhypothese) angepasst werden musste. Der F-Test beantwortete die Frage, welche Hypothese akzeptiert werden konnte. Damit wurde die Entscheidung getroffen, ob die Nullhypothese verworfen werden musste. Wurde die Kurve mit einem Hillkoeffizienten von 1 bzw. -1 angepasst, galt dieses Modell als das „einfache Modell“, denn es hing nur noch von drei Parametern ab („Bottom“, „Top“, „pEC₅₀“). Hingegen galt die Kurvenanpassung mit dem variablen Steilheitsmaß als „komplexes Modell“, denn es hing von vier Parametern ab („Bottom“, „Top“, „pEC₅₀“, „n_H“). Bei der Entscheidung zwischen den Modellen ermittelte die Software GraphPad Prism® 5.01 (P2) einen F-Wert (Gleichung 27).

$$F = \frac{\frac{(SS_{Null} - SS_{Alt})}{SS_{Alt}}}{\frac{(DF_{Null} - DF_{Alt})}{DF_{Alt}}}$$

Gleichung 27

F: F-Wert

SS_{Null} : Summe der Abstandsquadrate (Nullhypothese)

SS_{Alt} : Summe der Abstandsquadrate (Alternativhypothese)

DF_{Null} : Anzahl der Freiheitsgrade (Nullhypothese)

DF_{Alt} : Anzahl der Freiheitsgrade (Alternativhypothese)

Die Summe der Abstandsquadrate (Gesamtheit der quadrierten Abstände jedes einzelnen Datenpunktes von der Kurve) ist naturgemäß umso kleiner (das bedeutet, dass durch dieses Modell die Datenpunkte besser beschrieben werden), je mehr Parameter die Kurve beschreiben ($SS_{Null} > SS_{Alt}$), wobei sich die Komplexität des Modells erhöht. Damit verbunden reduziert sich im komplexen Modell ebenfalls die Anzahl der Freiheitsgrade (Differenz aus der Summe der unabhängigen Messwerte und der von diesen Messwerten abhängigen Parameter) im Vergleich zum einfacheren Modell ($DF_{Null} > DF_{Alt}$).

Der vom F-Wert abgeleitete p-Wert konnte mit dem Signifikanzniveau von 5 % verglichen werden ($p < 0,05$: Die Alternativhypothese wurde angenommen, die Nullhypothese wurde verworfen. Die Kurve wurde mit einem variablen Steilheitsmaß angepasst.). Erwies sich der p-Wert größer als 0,05, gab es keinen zwingenden Beweis für die Alternativhypothese, demnach wurde die Nullhypothese (das Steilheitsmaß der Kurve entsprach 1 bzw. -1) akzeptiert (Motulsky und Christopoulos, 2004).

Ein ungepaarter, zweiseitiger Zweistichproben-**t-Test** wurde angewendet, wenn es galt zu entscheiden, ob der Unterschied zweier Mittelwerte zufällig zustande gekommen war, oder ob sich die zugrunde liegenden Grundgesamtheiten statistisch unterschieden. Dem ermittelten t-Wert (Gleichung 28) wird durch das Auswerteprogramm (P2) ein p-Wert zugeordnet. In dieser Arbeit wurde ein statistischer Unterschied angenommen, sobald der p-Wert kleiner als 0,05 (Irrtumswahrscheinlichkeit 5 %) war.

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right) \cdot \frac{(n_1 - 1) \cdot SD_1^2 + (n_2 - 1) \cdot SD_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}}$$

Gleichung 28

t: t-Wert

\bar{x} : Arithmetischer Mittelwert

SD: Standardabweichung

n: Anzahl an unabhängigen Experimenten

SD: Standardabweichung

Im Falle eines Einstichproben-t-Testes entschied der dem t-Wert (Gleichung 29) zugeordnete p-Wert, ob ein Mittelwert von einem hypothetischen Wert signifikant abwich.

$$t = \frac{\bar{x} - \mu_0}{S.E.M.}$$

Gleichung 29

t: t-Wert

\bar{x} : Arithmetischer Mittelwert

μ_0 : Hypothetischer Wert

S.E.M.: *Standard error of the mean*; Standardfehler

Auch in diesem Falle galt im Rahmen dieser Arbeit, dass sobald der p-Wert kleiner als 0,05 war, mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % davon ausgegangen wurde, dass sich der Mittelwert signifikant von dem hypothetischen Wert unterschied.

Soweit nicht anderweitig angegeben, bezieht sich die Angabe „t-Test“ im Rahmen dieser Arbeit auf die Verwendung des ungepaarten, zweiseitigen Zweistichproben-t-Test (Gleichung 28).

Um mehr als zwei Mittelwerte auf einen potentiellen, statistischen Unterschied zu testen, wurde die **Analyse der Varianzen (ANOVA)** angewendet (Einfractionelle ANOVA: *One-way ANOVA*; Zweifractionelle ANOVA: *Two-way ANOVA*). Testete man jeden Mittelwert einzeln gegen einen anderen mit Hilfe eines t-Testes, stiege die Irrtumswahrscheinlichkeit erster Art massiv an. Durch Ermittlung der Prüfgröße F_{ANOVA} (Gleichung 30) wurde die Varianz der vereinigten Stichproben mit der Varianz der einzelnen Stichprobe verglichen und entschieden, ob die Nullhypothese (*Alle Mittelwerte sind gleich.*) oder die Alternativhypothese (*Zwischen mindestens zwei Mittelwerten besteht ein Unterschied.*) akzeptiert werden konnte. Die Prüfgröße F_{ANOVA} entspricht dem Verhältnis der mittleren Quadratsummen, die zwischen den Gruppen und innerhalb der Gruppen ermittelt wurden. Die Entscheidung zwischen den Hypothesen beruhte wiederum auf einem p-Wert, der dem Wert F_{ANOVA} zugeordnet wurde. Ein p-Wert $< 0,05$ resultierte in der Annahme der Alternativhypothese.

$$F_{ANOVA} = \frac{SSB/DFB}{SSW/DFW}$$

Gleichung 30

F_{ANOVA} : F-Wert der Varianzanalyse ANOVA

SSB: Quadratsumme zwischen den Gruppen

DFB: Anzahl der Freiheitsgrade zwischen den Gruppen

SSW: Quadratsumme innerhalb der Gruppen

DFW: Anzahl der Freiheitsgrade innerhalb der Gruppen

Entschied die Analyse, dass die Alternativhypothese akzeptiert werden konnte, schloss sich ein Post-Test an, der darüber Auskunft gab, zwischen welchen Mittelwerten ein signifikanter Unterschied bestand. Dabei wurde der *Dunnett's post-Test* angewendet, um potentielle Unterschiede der Mittelwerte zu einem definierten Kontrollmittelwert zu detektieren. Sollten alle Mittelwertspaare untereinander auf Signifikanz getestet werden, wurde der *Bonferroni's post-Test* angewendet.

4 Ergebnisse

4.1 Radioligandbindungsversuche

4.1.1 Das Epitop Trp 7.35 beeinflusst die [³H]NMS-Dissoziation am M2- und M4-, nicht aber am M1- und M3-Rezeptorsubtyp

Der in allen in dieser Arbeit durchgeführten Bindungsuntersuchungen verwendete Radioligand [³H]N-Methylscopolamin bindet in der orthosterischen Bindungsdomäne muskarinischer Rezeptoren und findet breite Anwendung in der Forschung auf Grund seiner Stabilität und im nanomolaren Bereich liegenden Affinität. Durch die Rezeptorarchitektur bedingt, passiert der Ligand bei Assoziations- und Dissoziationsvorgängen den allosterischen Bereich. Für den strukturell sehr ähnlichen Antagonisten Tiotropium konnte gezeigt werden, dass er bei der Passage des muskarinischen M3-Rezeptors gar eine bestimmte Zeitspanne einen metastabilen Bindungszustand in diesem Areal einnimmt (Kruse et al., 2012).

Im Folgenden sollte getestet werden, in wie weit sich die [³H]NMS-Dissoziation zwischen den Subtypen muskarinischer Acetylcholinrezeptoren unterschied und welchen Einfluss das konservierte Tryptophan 7.35 darauf hatte.

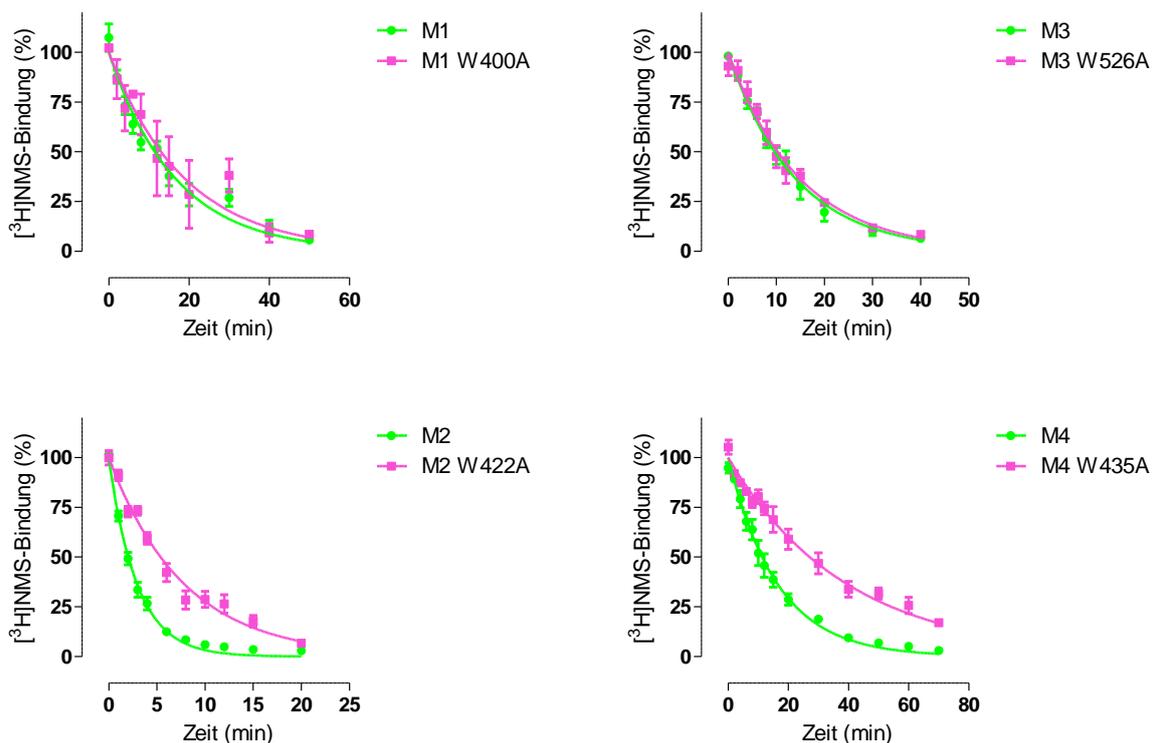


Abb. 3: Dissoziationskinetik von [³H]NMS an Membranhomogenaten von CHO- M1-, M2-, M3- und M4-Zellen sowie den jeweiligen Trp 7.35→Ala-Mutanten (M1 W400A, M2 W422A, M3 W526A und M4 W435A). Es wurde Puffer (L11) verwendet. Die Datenpunkte sind Mittelwerte ± Standardfehler aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Ordinate: Spezifische [³H]NMS-Bindung in Prozent. 100% entspricht der Radioligandbindung in Abwesenheit des Reassoziationsblockers Atropin. 0% entspricht der unspezifischen Bindung. Abszisse: Zeit in min

HWZ (min) ± S.E.M. (n)	Wildtyp	Trp 7.35 → Ala	Faktor Mut/WT
M1	11,64 ± 1,5 (3)	12,64 ± 3,6 ^{NS} (2)	NS
M2	2,04 ± 0,19 (4)	5,36 ± 0,33 ^{***} (5)	x 2,6
M3	10,29 ± 0,69 (3)	10,83 ± 0,35 ^{NS} (3)	NS
M4	11,34 ± 1,36 (5)	27,04 ± 3,16 ^{**} (4)	x 2,4

Tab. 17: Halbwertszeiten der [³H]NMS-Dissoziation an Membranhomogenaten von CHO- M1-, M2-, M3- und M4-Zellen, sowie den jeweiligen Trp 7.35→Ala-Mutanten (M3 W526A, M2 W422A und M4 W435A). Es wurde Puffer (L11) verwendet. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. ^{***}: Signifikanter Unterschied zum Wert des jeweiligen Wildtyps (t-Test, ^{***} p < 0,001, 0,01). ^{NS}: Nicht signifikant verschieden vom Wert des jeweiligen Wildtyps (t-Test, p > 0,05)

Alle Dissoziationsverläufe ließen sich mit einer monophasischen, abfallenden Exponentialfunktion beschreiben.

Die Halbwertszeiten der [³H]NMS-Dissoziation an den Wildtyprezeptoren standen in gutem Einklang mit zuvor erhobenen Daten von Lazareno und Birdsall (1995). Die Autoren führten ihre Versuche in einer Pufferzusammensetzung mit 20mM HEPES, 100mM NaCl und 10mM MgCl₂ durch. Diese Pufferbedingungen ähneln den hier verwendeten (L11). Wie auch in der Literatur beschrieben, wurde am M2-Rezeptor die kürzeste Dissoziationszeit gemessen, sie ist etwa fünfmal geringer als an den anderen getesteten Subtypen (Lazareno und Birdsall, 1995; Krejčí und Tuček, 2001).

Durch die Mutation von Trp 7.35 zu Alanin im M3-Rezeptor änderte sich die Halbwertszeit nicht, während sie sich durch die analoge Mutation am M2- und M4-Rezeptor mehr als verdoppelte. Wenngleich die Rezeptorexpression des M1-, und vor allem des M1 W400A-Membranhomogenates, sehr gering ausfiel (Tab. 18) und damit eine Auswertung der Kurven erschwert wurde, scheint die Schlussfolgerung nahezuliegen, dass hier offensichtlich ebenfalls kein Beitrag der Aminosäure Trp 7.35 auszumachen ist. In Experimenten mit Membranhomogenaten aus COS-7-Zellen in einem dem hier verwendeten sehr ähnlichem Puffer ermittelten Matsui et al. (1995) eine [³H]NMS-Halbwertszeit von 9,4 ± 0,4 Minuten für den M1-Rezeptor, was gut mit dem hier beobachteten Wert übereinstimmt. Allerdings verdoppelte sich in jener Studie die Halbwertszeit durch die Mutation. Für den ebenfalls präferenziell Gq-Proteine koppelnden M5-Rezeptor konnten Prilla et al. (2006) gleichfalls keine Abhängigkeit der [³H]NMS-Dissoziation vom Epitop Trp 7.35 (M5 W477) feststellen. Die gleichen Autoren beobachteten darüber hinaus ebenso wie in der vorliegenden Arbeit eine Verdoppelung der HWZ an der M2 W422A-Mutante. Da die Versuche in der zitierten Arbeit in einem 5mM Na, K, P_i-Puffer durchgeführt wurden, lassen sich absolute Werte mit denen aus der vorliegenden Arbeit, bei dem Puffer (L11) verwendet wurde, nicht vergleichen.

Zusammengefasst wiesen die präferenziell Gq-koppelnden Rezeptoren M3 und M5 eine unabhängig von Trp 7.35 ablaufende [³H]NMS-Dissoziation auf (Prilla et al., 2006; vorliegende Arbeit), während das gleiche Epitop in den überwiegend Gi-koppelnden M2- und M4-Rezeptoren wie ein Dissoziationsbeschleuniger wirkte.

4.1.2 Das Epitop Trp 7.35 ist nicht relevant für die Gleichgewichtsbindung orthosterischer Antagonisten

4.1.2.1 N-Methylscopolamin

Die ausgeprägte Konservierung des orthosterischen Bereichs muskarinischer Acetylcholinrezeptoren führt in aller Regel zu einer fehlenden oder sehr gering ausgeprägten Subtypspezifität muskarinischer Liganden. Für den inversen Agonisten N-Methylscopolamin fanden Prilla et al. (2006) keinen Affinitätsunterschied zwischen humanen M2- und M5-Rezeptoren in Membranhomogenaten von transfizierten CHO-Zellen. In der gleichen Studie konnte kein Einfluss des Epitops Trp 7.35 festgestellt werden. Dies beobachteten auch Matsui et al. (1995) am M1- sowie Janßen (Dissertationsschrift, 2011) am M4-Rezeptor.

Es sollte im Folgenden aufgezeigt werden, welche Affinität N-Methylscopolamin zu muskarinischen M3- Rezeptoren aufwies und ob das Epitop Trp 7.35 an der Bindung dieses Liganden beteiligt war. Da zuvor erhobene Messwerte bei z.T. leicht abgewandelten experimentellen Bedingungen beobachtet wurden und Straßmann (Dissertationsschrift, 2007) zeigen konnte, dass Affinitätswerte verschiedener Liganden im 10mM HEPES- Puffersystem (L11) geringer ausfielen als im 5mM Na, K, P_i- Puffer, wurden hier zur besseren Vergleichbarkeit außerdem erneut die angesprochenen M1-, M2- und M4-Rezeptoren mit ihren jeweiligen Mutanten mituntersucht.

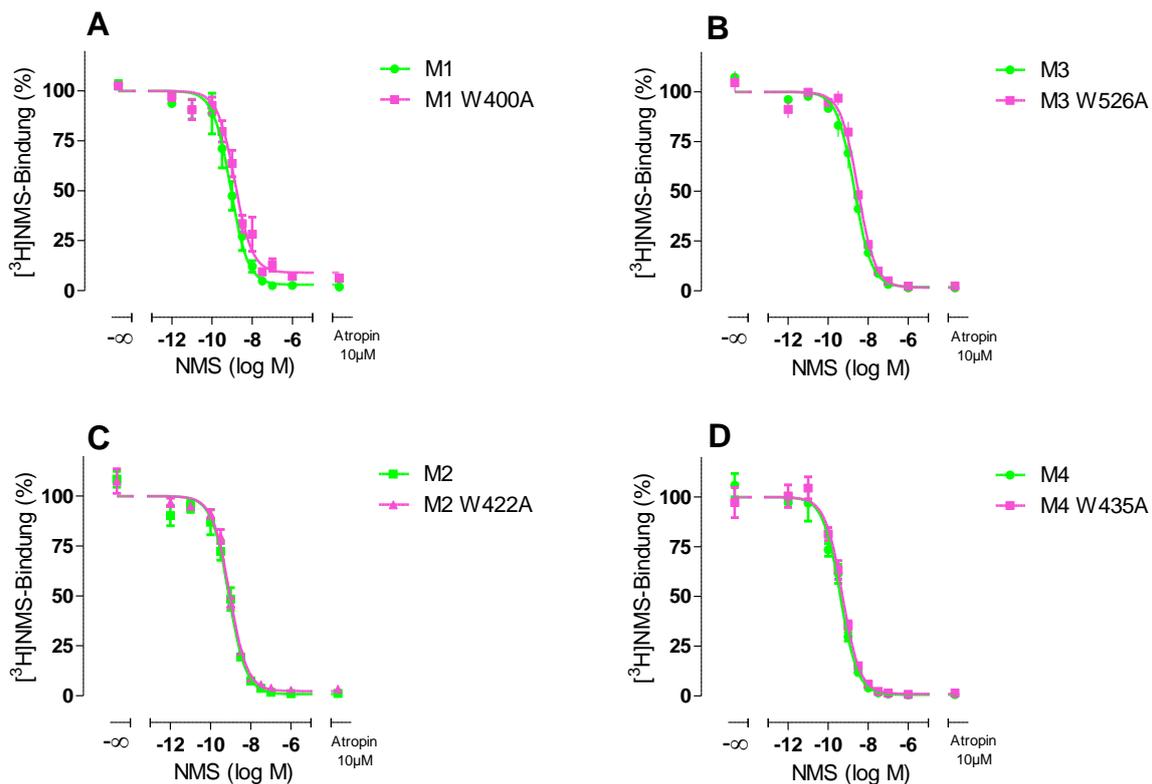


Abb. 4: [³H]NMS-Kompetitionsexperimente unter Gleichgewichtsbedingungen mit N-Methylscopolamin („Homologe Konkurrenz“) an Membranhomogenaten von CHO-M1-, M2-, M3- und M4-Zellen sowie den jeweiligen Trp 7.35→Ala-Mutanten (M1 W400A, M2 W422A, M3 W526A und M4 W435A). Es wurde Puffer (L11) verwendet. Die Datenpunkte sind Mittelwerte ± Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung. Ordinate: Gesamtbindung des Radioliganden in Prozent. 100% entspricht dem jeweiligen oberen Plateau der Kurve. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Ligandkonzentration.

In Übereinstimmung mit zuvor erhobenen Daten veränderte sich die Affinität des inversen Agonisten N-Methylscopolamin mit dem Austausch des Trp 7.35 durch Alanin bei keinem der untersuchten Subtypen (Tab. 18). Alle Kurven waren mit einem normalen Kurvensteilheitsmaß von -1 anpassbar, was für eine einheitliche Rezeptorpopulation und somit eine 1:1-Interaktion zwischen einem Ligand- und einem Rezeptormolekül spricht.

In Bezug auf die vier getesteten Rezeptor-Subtypen wies der Ligand keine Subtypspezifität auf; die Affinitäten unterschieden sich nicht signifikant voneinander (One-way ANOVA, Bonferroni's post-Test, $p > 0,05$).

Neben der Ermittlung der Affinität von N-Methylscopolamin kann mit Hilfe dieses Konkurrenzexperimentes das Ausmaß der Rezeptorexpression bestimmt werden. Wie in vorangegangenen Arbeiten (Prilla, Dissertationsschrift, 2006; Kebig, Dissertationsschrift, 2010; Kaufel, Dissertationsschrift, 2010; Janßen, Dissertationsschrift, 2011) wurde der punktmutierte Rezeptor bei allen vier untersuchten Subtypen schwächer exprimiert als der Wildtyp (Tab. 18).

	n	n_H	pK_D	Bmax (fmol/mg)
M1	3	$-0,84 \pm 0,11^{n.s.}$	$9,69 \pm 0,05$	444 ± 43
M1 W400A	3	$-0,84 \pm 0,10^{n.s.}$	$9,61 \pm 0,20^{NS}$	$113 \pm 28^{**}$
M2	5	$-0,97 \pm 0,10^{n.s.}$	$9,26 \pm 0,13$	1259 ± 209
M2 W422A	5	$-1,15 \pm 0,08^{n.s.}$	$9,17 \pm 0,05^{NS}$	$520 \pm 64^{**}$
M3	4	$-0,90 \pm 0,07^{n.s.}$	$9,41 \pm 0,14$	5913 ± 327
M3 W526A	4	$-1,16 \pm 0,11^{n.s.}$	$9,40 \pm 0,04^{NS}$	$2411 \pm 398^{**}$
M4	3	$-0,90 \pm 0,09^{n.s.}$	$9,67 \pm 0,10$	1278 ± 99
M4 W435A	4	$-0,99 \pm 0,10^{n.s.}$	$9,50 \pm 0,06^{NS}$	$713 \pm 76^{**}$

Tab. 18: Bindungscharakteristika von NMS an Membranhomogenaten von CHO-M1, M2-, M3- und M4-Zellen sowie den jeweiligen Trp 7.35→Ala-Mutanten (M1 W400A, M2 W422A, M3 W526A und M4 W435A). Es wurde Puffer (L11) verwendet. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler. n: Anzahl unabhängiger Experimente. n_H : Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. pK_D : Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D . Bmax: Anzahl maximaler spezifischer Bindungsstellen pro mg Rezeptorprotein. pK_D - und Bmax-Werte beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von -1. ^{n.s.}: Nicht signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß $n_H = -1$ (F-Test, $p > 0,05$). ^{NS}: Nicht signifikant verschieden vom Wert des jeweiligen Wildtyps (t-Test, $p > 0,05$). ^{}: Signifikanter Unterschied zum Wert des jeweiligen Wildtyprezeptors (t-Test, ^{**} $p < 0,01$)**

Bis auf das Verhältnis zwischen M1- und M1 W400A-Rezeptoren war das Ausmaß der Expression bei den Wildtypen etwa doppelt so ausgeprägt wie an den Trp 7.35-Mutanten (Die Kenngrößen aller in dieser Arbeit verwendeten Homogenate sind in Kapitel 8.1, Tab. 91 aufgeführt.). Es muss dabei berücksichtigt werden, dass bei derart niedrigen Expressionsniveaus wie im Falle der M1-Rezeptoren eine Bestimmung der Parameter mit einer großen Fehleranfälligkeit behaftet ist. Möglicherweise hängt die Expression von Rezeptoren auf der Oberfläche von CHO-Zellen von äußeren Faktoren wie dem Zeitpunkt und den Bedingungen der stabilen Transfektion oder der aktuellen Konfluenz des Zellrasens in der Kulturschale ab. Da die Rezeptorexpression von Membranhomogenaten eine

„Momentaufnahme“ der präparierten Zellcharge ist, wurden auch bei homologen Konkurrenzexperimenten an lebenden Zellen teilweise unterschiedliche Expressionsniveaus erreicht. Auf diesen Umstand wird u.a. in Kapitel 4.3.1 hingewiesen.

Messwerte für die Kurvensteilheiten und die Affinität von N-Methylscopolamin zu M2- und M3-Rezeptoren sowie den jeweiligen Trp 7.35→Ala-Mutanten auf intakten CHO-Zellen sind in Tab. 19 aufgeführt. Da diese Versuche primär zum Ziel hatten, die Rezeptorexpression auf intakten Zellen unter Versuchsbedingungen zu ermitteln, die denen von DMR-Versuchen entsprachen, wurde hier ein HBSS+HEPES (20mM)-Puffer (L17) verwendet. Wie an Membranhomogenaten verliefen die Kurven normal steil, also entsprach der Hill-Koeffizient einem Wert von -1. Es konnte keine Abhängigkeit der Bindungsaffinität von N-Methylscopolamin von Trp 7.35 beobachtet werden. Auch hier fehlte eine Subtypspezifität des Liganden (t-Test, $p > 0,05$). Im Vergleich zu den Affinitätswerten an Membranhomogenaten lagen die hier ermittelten pK_D -Werte in der gleichen Größenordnung; der Unterschied beim muskarinischen M3-Rezeptor war statistisch nicht signifikant (t-Test, $p > 0,05$).

	n	n_H	pK_D
M2	6	$-1,00 \pm 0,02$ ^{n.s.}	$9,57 \pm 0,03$
M2 W422A	6	$-1,02 \pm 0,05$ ^{n.s.}	$9,60 \pm 0,03$ ^{NS}
M3	4	$-0,92 \pm 0,05$ ^{n.s.}	$9,71 \pm 0,09$
M3 W526A	4	$-1,00 \pm 0,04$ ^{n.s.}	$9,46 \pm 0,11$ ^{NS}

Tab. 19: Bindungscharakteristika von NMS an M2- und M3-Rezeptoren, sowie den jeweiligen Trp 7.35→Ala-Mutanten (M2 W422A und M3 W526A) auf intakten CHO-Zellen. Es wurde Puffer () verwendet. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler. n: Anzahl unabhängiger Experimente. n_H : Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. pK_D : Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D . Die pK_D -Werte beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von -1. ^{n.s.}: Nicht signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß $n_H = -1$ (F-Test, $p > 0,05$). ^{NS}: Nicht signifikant verschieden vom Wert des jeweiligen Wildtyps (t-Test, $p > 0,05$)

4.1.2.2 Atropin

Um zu überprüfen, ob das Trp 7.35 an der Bindung anderer muskarinischer inverser Agonisten zum M3-Rezeptor beteiligt ist, wurde der dem N-Methylscopolamin strukturverwandte Ligand Atropin hinsichtlich seiner Affinität untersucht.

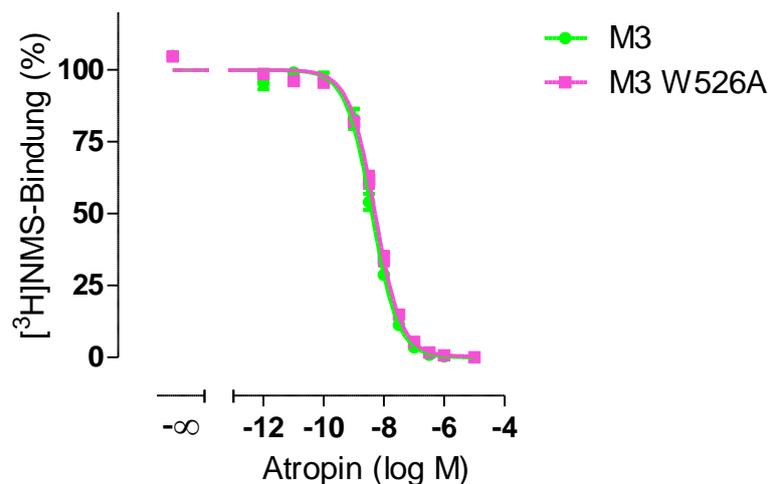


Abb. 5: [³H]NMS-Kompetitionsexperimente unter Gleichgewichtsbedingungen mit Atropin an Membranhomogenaten von CHO-M3- und M3 W526A-Zellen. Es wurde Puffer (L11) verwendet. Die Datenpunkte sind Mittelwerte ± Standardfehler aus vier unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung. Ordinate: Gesamtbindung des Radioliganden in Prozent. 100% entspricht dem jeweiligen oberen Plateau der Kurve. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Ligandkonzentration

Die Kurve des M3-Wildtyprezeptors sowie die der M3 W526A-Mutante wiesen eine normale Steilheit auf (n_H $1,04 \pm 0,05$ bzw. $0,93 \pm 0,04$). Der pK_A -Wert von Atropin zum M3-Rezeptor betrug $8,49 \pm 0,04$ (4). Dieser war nicht signifikant verschieden vom pK_A -Wert des Liganden an der W526A-Mutante ($pK_A = 8,41 \pm 0,04$ (4), t-Test, $p > 0,05$). Kaufel ermittelte einen pK_A -Wert von Atropin von $8,15 \pm 0,03$ zum M3-Rezeptor (Dissertationsschrift, 2010). Antony zeigte in seiner Dissertationsschrift (2007), dass das Trp 7.35 im M2-Rezeptor ebenfalls keinen Einfluss auf die Bindungsaffinität von Atropin hatte. Da in der zitierten Arbeit ein 5mM Na, K, P_i -Puffer verwendet wurde, kann an dieser Stelle keine Aussage zur Subtypspezifität von Atropin getroffen werden. Um diesen Vergleich ziehen zu können und um zu ermitteln, ob sich die Bindungscharakteristika bei Verwendung von intakten Zellen änderten, wurden wiederum Ganzzellversuche durchgeführt.

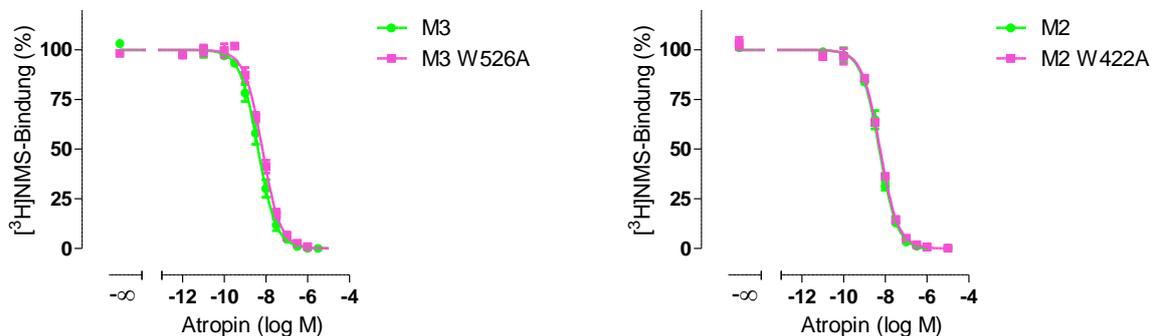


Abb. 6: [³H]NMS-Kompetitionsexperimente unter Gleichgewichtsbedingungen mit Atropin an M2- und M3-Rezeptoren sowie deren Trp 7.35→Ala-Mutanten auf intakten CHO -Zellen. Es wurde Puffer (L19) verwendet. Die Datenpunkte sind Mittelwerte ± Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung. Ordinate: Gesamtbindung des Radioliganden in Prozent. 100% entspricht dem jeweiligen oberen Plateau der Kurve. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Ligandkonzentration.

	n	n _H	pK _A
M2	3	-1,08 ± 0,06 ^{n.s.}	8,59 ± 0,06
M2 W422A	3	-1,00 ± 0,05 ^{n.s.}	8,52 ± 0,01 ^{NS}
M3	3	-0,95 ± 0,06 ^{n.s.}	8,58 ± 0,16
M3 W526A	3	-1,00 ± 0,06 ^{n.s.}	8,33 ± 0,09 ^{NS}

Tab. 20: Bindungscharakteristika von Atropin an M2- und M3-Rezeptoren sowie deren Trp 7.35→Ala-Mutanten auf intakten CHO -Zellen. Es wurde Puffer (L19) verwendet. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler. n: Anzahl unabhängiger Experimente. n_H: Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. pK_A: Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_A. Die pK_A-Werte beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von -1. ^{n.s.}: Nicht signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß n_H = -1 (F-Test, p > 0,05). ^{NS}: Nicht signifikant verschieden vom Wert des jeweiligen Wildtyps (t-Test, p > 0,05)

Alle Kurven konnten mit einem normalen Steilheitsmaß beschrieben werden. Die Affinität von Atropin zu M2- und M3-Rezeptoren wurde durch die Mutation Trp 7.35→Ala nicht beeinflusst. Wie für N-Methylscopolamin konnte beobachtet werden, dass sich auch für Atropin keine Subtypspezifität zeigte; die pK_A-Werte zwischen M2- und M3-Rezeptoren wichen nicht statistisch voneinander ab (t-Test, p > 0,05).

Die Affinitätswerte von Atropin an CHO-M3- und CHO M3 W526A-Membranhomogenaten waren statistisch nicht signifikant verschieden von den hier gefundenen pK_A-Werten, die unter der Verwendung von intakten CHO-Zellen ermittelt wurden (t-Test, p > 0,05).

4.1.3 Das Epitop Trp 7.35 ist an der Bindung allosterischer und dualsterischer Liganden zu Orthosterantagonist-besetzten M3-Rezeptoren beteiligt

Wie in Kapitel 4.1.1 beschrieben, liegt das klassische allosterische Areal muskarinischer Rezeptoren im Zugang zur orthosterischen Bindungstasche (Kruse et al., 2012) und kann die Bindung von orthosterischen Liganden beeinflussen. Binden in diesem Bereich allosterische Modulatoren, wird ihre Dissoziation in aller Regel verzögert (Stockton et al., 1983; Lazareno und Birdsall, 1995; Kostenis und Mohr, 1996).

Modulatoren für die klassische allosterische Bindungsstelle weisen in der Regel schwächere Affinitäten zum M3- im Vergleich zum M2-Rezeptor auf (Brown und Crout, 1970; Mitchelson 1987; Krejčí und Tuček, 2001; Dror et al., 2013). Eine kurze Sequenz innerhalb der zweiten extrazellulären Schleife des M2-Rezeptors („EDGE-Sequenz“, Aminosäure 172-175) ist unter anderem durch ihre negative Ladung maßgeblich für die hohe Affinität von Gallamin, das dreifach positiv geladen ist, verantwortlich (Leppik et al., 1994). Im M3 Rezeptor sind die korrespondierenden Aminosäuren P, P, G und E. Prolin gilt als „Strukturbrecher“ dieses Bereiches und könnte für die reduzierten Affinitäten von allosterischen Modulatoren zum muskarinischen M3-Rezeptor verantwortlich sein (Dr. J. Schrobang, mündliche Mitteilung). Außerdem unterscheidet sich der M3-Rezeptor an der Position 7.32 (8 Å vom allosterischen Bereich entfernt; Dror et al., 2013) von allen anderen muskarinischen Subtypen: An dieser Stelle weist er die basische (kationische) Aminosäure Lysin auf, während an der gleichen Stelle in den anderen muskarinischen Rezeptoren neutrale oder saure Epitope zu finden sind. Da allosterische Modulatoren überwiegend kationischer Natur sind, könnte dies auf deren

niedrigere Affinität zum M3- im Vergleich zu den anderen muskarinischen Rezeptoren schließen lassen.

Neben Arealen in den extrazellulären Schleifen wurde der Bereich am Beginn der siebten transmembranären Domäne als Teil der allosterischen Bindungsstelle des M2- und M5-Rezeptors charakterisiert (Voigtländer et al., 2003; Prilla et al., 2006). Tryptophan 7.35 ist ein entscheidendes Epitop für die Basisaffinität, Subtypselektivität und Kooperativität von klassischen allosterischen Modulatoren. Zuvor fiel das Epitop bereits als affinitätsgebende Aminosäure für Gallamin am M1-Rezeptor auf (Matsui et al., 1995). Im Vergleich zum M1-Wildtyprezeptor war die Affinität von Gallamin an der Trp 7.35→Ala-Mutante etwa um den Faktor 10 an freien sowie an [³H]NMS-besetzten Rezeptoren reduziert (Matsui et al., 1995).

Darauf aufbauend sollten Untersuchungen zum Einfluss ausgewählter allosterischer Modulatoren und Hybridsubstanzen auf die Dissoziation des Radioliganden [³H]N-Methylscopolamin vom M3-Rezeptor sowie der M3 W526A- Mutante aufzeigen, inwieweit sich dieser Rezeptor von den anderen muskarinischen Subtypen unterschied. Darüber hinaus sind diese Experimente die Grundlage für die Ermittlung einer ausreichend langen Inkubationszeit für Radioligandbindungsstudien im Reaktionsgleichgewicht.

4.1.3.1 Affinität von W84 zum [³H]NMS-besetzten M2-, M3- und M4-Rezeptor sowie den jeweiligen Trp 7.35→Ala-Mutanten (Messung mit Membranhomogenaten)

W84 ist der Prototyp der Alkanbisammoniumverbindungen und wurde von Jepsen et al. (1988) erstmals als allosterischer Modulator an Muskarinrezeptoren beschrieben.

Es wurden M2-, M3- und M4-Rezeptoren sowie die jeweiligen Trp 7.35→Ala-Mutanten hinsichtlich der durch W84 ausgelösten [³H]NMS-Dissoziationsverzögerung untersucht.

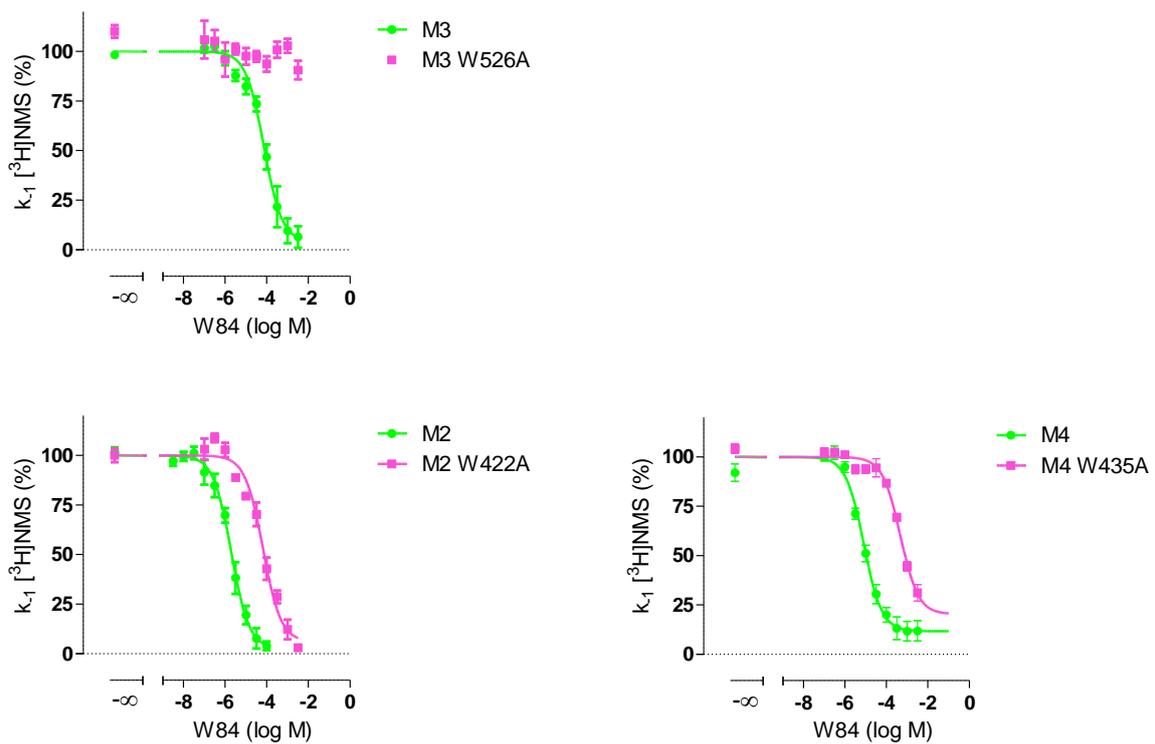


Abb. 7: Ermittlung der Affinität von W84 zum $[^3\text{H}]$ NMS-besetzten M2-, M3- und M4-Rezeptor sowie der jeweiligen Trp 7.35→Ala-Mutanten auf Membranhomogenaten. Es wurde Puffer (L11) verwendet. Die Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Experimenten in Zwei- bis Sechsfachbestimmung. Ordinate: Geschwindigkeitskonstante der $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziation. 100% entspricht dem oberen Kurvenplateau. 0% entspricht einer vollständigen Hemmung der $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziation. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Ligandkonzentration

Bis auf die M3 W526A-Mutante konnte an allen Rezeptoren eine $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziationsverzögerung durch W84 beobachtet werden, was in diesen Fällen für die Ausbildung ternärer Komplexe zwischen Rezeptor, Radioligand und Modulator spricht. Die Datenpunkte für den mutierten M3-Rezeptor ließen sich nicht mit einer Inhibitionskurve anpassen.

	n	n _H	Unteres Plateau (%)	pEC _{0,5Dis}
M2	3	-0,99 ± 0,12 ^{n.s.}	3 ± 2 ^{NS}	5,72 ± 0,13
M2 W422A	3	-0,78 ± 0,12 ^{n.s.}	7 ± 3 ^{NS}	4,22 ± 0,12 ^{**}
M3	4	-0,82 ± 0,12 ^{n.s.}	1 ± 1 ^{NS}	4,07 ± 0,10
M3 W526A	4	-	91 ± 5 ^{##,-}	-
M4	5	-1,09 ± 0,07 ^{n.s.}	11 ± 5 ^{NS}	5,09 ± 0,06
M4 W435A	4	-0,89 ± 0,15 ^{n.s.}	21 ± 4 [#]	3,33 ± 0,01 ^{***}

Tab. 21: Bindungscharakteristika von W84 zu [³H]NMS-besetzten M2, M3 und M4-Rezeptoren sowie den jeweiligen Trp7.35→Ala-Mutanten in Membranhomogenaten. Es wurde Puffer (L11) verwendet. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler. n: Anzahl unabhängiger Experimente. n_H: Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. Unteres Plateau: Unteres Plateau der Kurvenverläufe. Das untere Plateau von M3 W526A entspricht der normierten Geschwindigkeitskonstanten der als höchstes eingesetzten Ligandkonzentration von 3mM. pEC_{0,5Dis}: Negativer dekadischer Logarithmus der Ligandkonzentration, die die [³H]NMS-Dissoziation um den Faktor 2 verzögert. Die Kennwerte „Unteres Plateau“ und „pEC_{0,5Dis}“ beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von -1. ^{n.s.}: Nicht signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß n_H = -1 (F-Test, p > 0,05). ^{##,#}: Signifikant verschieden von einer vollständigen Dissoziationsverzögerung (t-Test, ^{##,#} p < 0,01, 0,05). ^{NS}: Nicht signifikant verschieden von einer vollständigen Dissoziationsverzögerung (t-Test, p > 0,05). ⁻: Nicht signifikant verschieden von einer unbeeinflussten [³H]NMS-Dissoziation (t-Test, ⁻ p > 0,05). ^{***, **}: Signifikant verschieden vom Wert des jeweiligen Wildtyps (t-Test, ^{***, **} p < 0,001, 0,01).

Alle Kurven waren mit einem normalen Steilheitsmaß von -1 anpassbar. Am punktmultierten M4-Rezeptor war eine unvollständige [³H]NMS-Dissoziation zu beobachten. Auch bei der als höchstes eingesetzten W84-Konzentration von 3mM konnte der Radioligand vom Rezeptor abdissoziieren. Die ermittelte Affinität von W84 zum orthosterisch besetzten M2-Rezeptor stand in sehr gutem Einklang mit zuvor von Kaufel (Dissertationsschrift, 2010) beobachteten Wert (5,69 ± 0,09). In Bezug auf die Affinitätsreihenfolge zum besetzten Rezeptor wies W84 eine klare Subtypselektivität auf (M2 > M4 > M3, One-way ANOVA, Bonferroni's post-Test, ^{***} p < 0,001). Prilla et al. (2006) und Kaufel (Dissertationsschrift, 2010) beschrieben W84 als einen allosterischen Modulator mit ausgeprägter M2/M5-Subtypselektivität. In guter Übereinstimmung mit erstgenannter Arbeit reduzierte sich hier die Affinität von W84 zum [³H]NMS-besetzten M2-Rezeptor um ca. 1,5 Dekaden, sobald Trp 7.35 durch Alanin ausgetauscht wurde. Am M4-Rezeptor ließ sich der gleiche Effekt beobachten. Im Gegensatz dazu führte die Mutation im M3-Rezeptor dazu, dass [³H]NMS den Rezeptor bei den eingesetzten Modulatorkonzentrationen unverzögert verlassen konnte. Interessanterweise konnten Prilla et al. (2006) am M5-Rezeptor ein ähnliches Phänomen beobachten: Während W84 am Wildtyprezeptor in der Lage war, die Dissoziation des Radioliganden vollständig zu unterbinden, war der Effekt für die M5 W477A-Mutante äußerst schwach ausgeprägt. Eine Kurvenanpassung war allerdings dennoch möglich und es konnte gezeigt werden, dass durch die Mutation am M5-Rezeptor die Affinität von W84 zum besetzten Rezeptor um ca. den Faktor 100 abnahm. Wird angenommen, dass es sich beim ebenfalls Gq-koppelnden M3-Rezeptor ähnlich verhält, ließe sich womöglich eine Kurve bei höheren Modulatorkonzentrationen anpassen. Es muss erwähnt werden, dass die Bindungsdaten von Prilla in einem 5mM Na K P_i-Puffer bei 23°C aufgenommen wurden (Prilla et al., 2006), während hier mit Puffer (L11) bei 30°C gearbeitet wurde (10mM HEPES im Versuchsansatz). Straßmann zeigte in ihrer Dissertationsschrift (2007), dass die Verwendung von Puffer (L11) im

Vergleich zu 5mM Na K P_i-Puffer zu allgemein niedrigeren Affinitätswerten führte. Damit besteht die Möglichkeit, dass eine [³H]NMS-dissoziationsverzögernde Eigenschaft von W84 an der M3 W526A-Mutante hätte erfasst werden können, wenn höhere Konzentrationen eingesetzt worden wären. Eine zweite Möglichkeit bestünde darin, die Untersuchungen in dem zu höheren Affinitätswerten führenden 5mM Na K P_i-Puffer zu wiederholen. In Bezug auf den M3-Rezeptor kann mit den vorliegenden Daten somit die Frage nicht beantwortet werden, ob sich die Rolle des Trp 7.35 für die Affinität von W84 zum besetzten Rezeptor zu den Gi-koppelnden M2- und M4-Rezeptoren unterscheidet. Unter den gegebenen experimentellen Bedingungen erwies sich Trp 7.35 jedoch im M3-Rezeptor als ein an der Wirkung des allosterischen Modulators W84 beteiligtes Epitop.

Es stellte sich die Frage, ob W84 überhaupt Affinität zum punktmutierten M3-Rezeptor aufwies. Dies sollte in Kapitel 4.1.4.4 näher untersucht werden.

4.1.3.2 Affinität von 6-Phthal, 6-Naph, Iper-6-phthal und Iper-6-naph zum [³H]NMS-besetzten M3- Rezeptor sowie der Trp 7.35→Ala-Mutante (Messung mit intakten CHO-Zellen)

Die [³H]NMS-Dissoziationsverzögerung als Hinweis für allosterisches Verhalten (Lee und El-Fakahany, 1991) sollte nun im Speziellen für die in dieser Arbeit im Mittelpunkt stehenden Liganden am muskarinischen M3-Rezeptor untersucht werden. Dabei sollte einerseits die Bindungsabhängigkeit der Liganden von Trp 7.35 untersucht werden, andererseits sind diese Experimente die Grundlage für die Ermittlung einer ausreichend langen Inkubationszeit für Radioligandbindungsstudien im Reaktionsgleichgewicht. Da die Informationen aus diesen Untersuchungen zu einem späteren Zeitpunkt mit Daten aus funktionellen Experimenten in Beziehung gesetzt werden sollten, wurden hier intakte CHO-M3- und CHO-M3 W526-Zellen und Puffer (L19) verwendet.

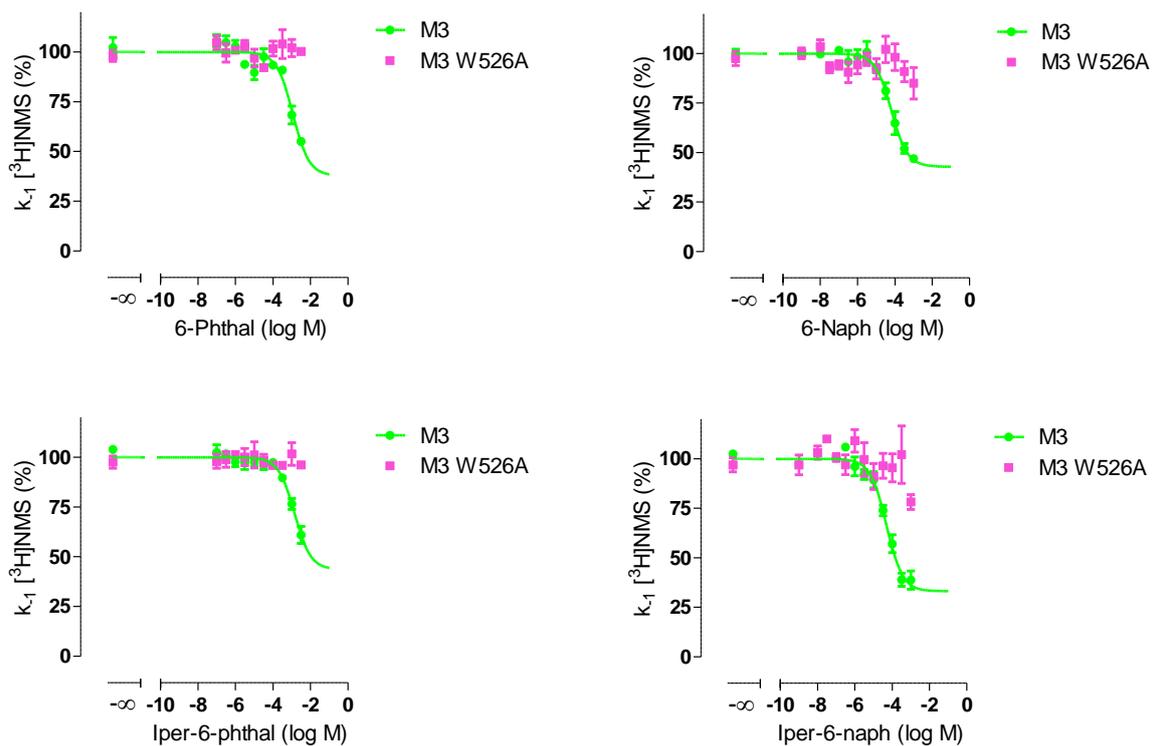


Abb. 8: Ermittlung der Affinität von 6-Phthal, 6-Naph, Iper-6-phthal und Iper-6-naph zum $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -besetzten M3- und M3 W526A-Rezeptor auf intakten CHO-Zellen. Es wurde Puffer (L19) verwendet. Die Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Experimenten in Zwei- bis Sechsfachbestimmung. Ordinate: Geschwindigkeitskonstante der $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation. 100% entspricht dem Wert ohne allosterische Modulation. 0% entspricht einer verminderten $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Ligandkonzentration

Alle vier getesteten Liganden waren in der Lage, die Radioliganddissoziation vom M3-Rezeptor zu verlangsamen, was sich in einer dosisabhängigen Verminderung der Geschwindigkeitskonstanten äußert. Im Gegensatz dazu konnten an die Datenwerte der M3 W526A-Mutante keine Kurven angepasst werden, auch wenn sich bei 6-Naph und Iper-6-naph eine Tendenz zur Verzögerung der $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation bei den höchsten Ligandkonzentrationen abzeichnete. Aus Gründen der Substanzlöslichkeit konnten maximal 3mM 6-Phthal und Iper-6-Phthal sowie 1mM 6-Naph und Iper-6-Naph eingesetzt werden. Somit konnte an dieser Stelle nur für den M3-Wildtyprezeptor geschlossen werden, dass sich ternäre Komplexe aus Rezeptor, Radioligand und Modulator ausgebildet hatten. Die Kenndaten aus den in Abb. 8 dargestellten Kurven sind in Tab. 22 zusammengefasst.

		n	n _H	Unteres Plateau (%)	pEC _{0,5Diss}
6-Phthal	M3	3	-0,76 ± 0,32 ^{n.s.}	37 ± 3 ^{##,**}	2,93 ± 0,07
	M3 W526A	3	-	100 ± 1 ^{###,-}	-
6-Naph	M3	3	-1,08 ± 0,22 ^{n.s.}	43 ± 3 ^{##,**}	4,16 ± 0,13
	M3 W526A	6	-	85 ± 8 ^{##,-}	-
Iper-6-phthal	M3	3	-0,82 ± 0,28 ^{n.s.}	44 ± 8 ^{#,**,NS}	2,84 ± 0,05 ^{NS}
	M3 W526A	3	-	96 ± 1 ^{###,-,NS}	-
Iper-6-naph	M3	3	-0,93 ± 0,16 ^{n.s.}	33 ± 3 ^{#,**,NS}	4,28 ± 0,09 ^{NS}
	M3 W526A	6	-	78 ± 4 ^{##,*,NS}	-

Tab. 22: Bindungscharakteristika von 6-Phthal, 6-Naph, Iper-6-phthal und Iper-6-naph zum [³H]NMS-besetzten M3- und M3 W526A-Rezeptor auf intakten CHO-Zellen. Es wurde Puffer (L19) verwendet. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler. n: Anzahl unabhängiger Experimente. n_H: Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. Unteres Plateau: Unteres Plateau der Kurvenverläufe an M3-Rezeptoren. Die hier aufgeführten Werte für die M3 W526A-Mutante entsprechen den normierten Geschwindigkeitskonstanten der als höchstes eingesetzten Ligandkonzentration von 3mM bzw. 1mM für 6-Phthal und Iper-6-phthal bzw. 6-Naph und Iper-6-naph. pEC_{0,5Diss}: Negativer dekadischer Logarithmus der Ligandkonzentration, die die [³H]NMS-Dissoziation um den Faktor 2 verzögert. Die Kennwerte „Unteres Plateau“ und „pEC_{0,5Diss}“ des M3-Rezeptors beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von -1. ^{n.s.}: Nicht signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß n_H = -1 (F-Test, p > 0,05). ^{###,##,#}: Signifikant verschieden von einer vollständigen [³H]NMS-Dissoziationsverzögerung (t-Test, ^{###,##,#} p < 0,001, 0,01, 0,05). ^{**,*}: Signifikant verschieden von einer unbeeinflussten [³H]NMS-Dissoziation (t-Test, ^{**,*} p < 0,01, 0,05). ⁻: Nicht signifikant verschieden von einer unbeeinflussten [³H]NMS-Dissoziation (t-Test, p > 0,05). ^{NS}: Nicht signifikant verschieden vom Wert des jeweiligen allosterischen Fragments (t-Test, p > 0,05)

Die Anpassung der M3-Kurven war jeweils mit einem normalen Steilheitsmaß möglich. Im Gegensatz zum allosterischen Modulator W84 war zu beobachten, dass selbst bei der höchsten Konzentration das Fragment 6-Phthal die [³H]NMS-Dissoziation nicht vollständig verzögern konnte (unteres Plateau 37 ± 3%). Dies galt auch für 6-Naph und die Hybridliganden Iper-6-phthal und Iper-6-naph.

Da in der Situation, in der das orthosterische Haftareal vom Radioliganden besetzt ist, einem Hybridmolekül nur der rein allosterisch ausgerichtete Bindungsmodus bleibt, verwundert es nicht, dass sich die Affinitätswerte von Iper-6-phthal bzw. Iper-6-naph zum [³H]NMS-besetzten Rezeptor nicht von denen von 6-Phthal bzw. 6-Naph unterschieden. Es war zu beobachten, dass der pEC_{0,5Diss}-Wert von Iper-6-phthal knapp 1,5 Dekaden unter der von Iper-6-naph lag. Analog dazu betrug der Unterschied zwischen den pEC_{0,5Diss}-Werten von 6-Phthal und 6-Naph etwa 1,2 Dekaden. Im Falle von 6-Naph konnte beobachtet werden, dass sich die k₋₁-Werte, die an der M3 W526A-Mutante ermittelt wurden, bei hohen Konzentrationen reduzierten. Wie eingangs schon erwähnt, konnten wegen Problemen mit der Substanzlöslichkeit keine weiteren Datenpunkte für höhere Konzentrationen erhoben werden. Im Falle der räumlich größten hier getesteten Substanz Iper-6-naph verringerte sich die Dissoziationskonstante k₋₁ am punktmutierten M3-Rezeptor auf 78 ± 4% des Kontrollwertes durch die höchste Konzentration von 1mM. Dieser Wert unterschied sich signifikant von einer unverzögerten Radioliganddissoziation. Durch die Wahl eines anderen Puffersystems (5mM Na K P_i-Puffer, (L27)), für den in der Vergangenheit gezeigt werden konnte, dass er zu höheren

Affinitätswerten führte als physiologische Puffer (Straßmann, Dissertationsschrift, 2007), sollte in Kapitel 4.1.3.3 getestet werden, ob eine dosisabhängige Veränderung der $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziationsgeschwindigkeit durch die Liganden 6-Phthal, 6-Naph, Iper-6-phthal und Iper-6-naph an der M3 W526A-Mutante detektierbar war.

Wie durch 6-Phthal konnten auch hohe Konzentrationen 6-Naph die Radioliganddissoziation vom M3-Rezeptor nicht vollständig unterbinden (unteres Plateau bei $43 \pm 3\%$). Die Kurve schien allerdings hier im Gegensatz zu der von 6-Phthal in einem „echten Plateau“ auszuschwingen. In diesem Punkt wie in der Affinität zum orthosterisch besetzten Rezeptor unterschieden sich 6-Naph und Iper-6-naph nicht signifikant.

Die Befunde zeigten, dass die Substanz-Rezeptor-Interaktion der hier getesteten allosterischen Modulatoren und Hybridliganden von Trp 7.35 im M3-Rezeptor abhängig war.

4.1.3.3 Detektion eines $[^3\text{H}]$ NMS-dissoziationsverzögernden Effekts durch die Wahl eines anderen Puffersystems (Na K P_i-Puffer)

Die folgenden Experimente sollten offenlegen, ob durch die eingesetzten Liganden an der M3 W526A-Mutante die Radioliganddissoziation generell nicht verzögert werden konnte, oder ob der Effekt durch die Wahl eines zu höheren Affinitätswerten führenden Puffersystems sichtbar zu machen sein würde. Dazu wurden die Versuche aus Kapitel 4.1.3.2 in Puffer (L27) (5mM Na K P_i-Puffer im Versuchsansatz) und mit Membranhomogenaten von CHO-M3 und CHO-M3 W526A-Zellen wiederholt. Die Arbeitstemperatur von 30°C wurde beibehalten.

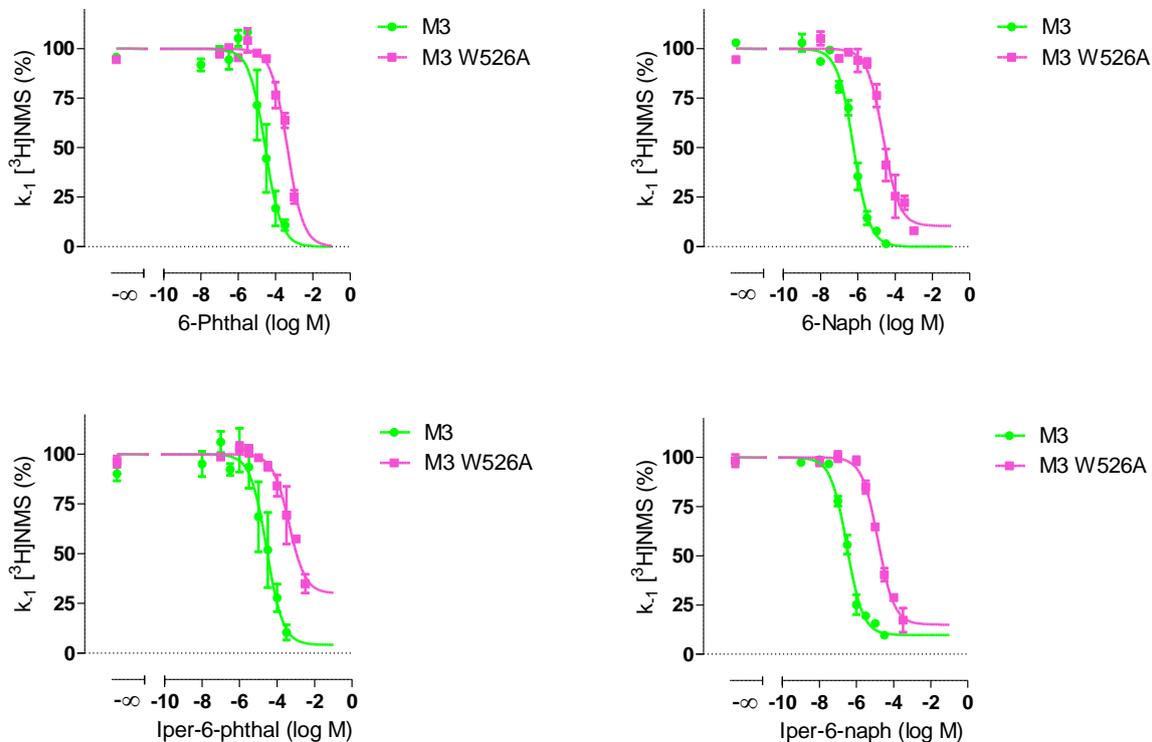


Abb. 9: Ermittlung der Affinität von 6-Phthal, 6-Naph, Iper-6-phthal und Iper-6-naph zum $[^3\text{H}]$ NMS-besetzten M3- und M3 W526A-Rezeptor in Membranhomogenaten. Es wurde Puffer (L27) verwendet. Die Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten in Zwei- bis Sechsfachbestimmung. Ordinate: Geschwindigkeitskonstante der $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziation. 100% entspricht dem Wert ohne allosterische Modulation. 0% entspricht einer verminderten $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziation. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Ligandkonzentration

Allein die Änderung der ionalen Bedingungen von Puffer (L19) zu Puffer (L27) ließ nun die Beobachtung zu, dass die eingesetzten Liganden in der Lage waren, auch an der M3 W526A-Mutante die Radioliganddissoziation zu verzögern und somit ternäre Komplexe aus Rezeptor, Radioligand und Modulator vorlagen. Tab. 23 gibt die pharmakologischen Kenndaten der zweipunktkinetischen Experimente aus Abb. 9 wieder. Die Wirksamkeiten der Liganden zum orthosterisch besetzten M3-Rezeptor lagen in diesem Puffersystem um im Schnitt zwei Dekaden über denen mit Puffer (L19) ermittelten Größen. Dabei fiel jedoch die Differenz der Wirksamkeit zwischen 6-Phthal und 6-Naph bzw. Iper-6-phthal und Iper-6-naph in den gleichen Größenordnungsbereich wie bei Verwendung des Puffers (L19).

Mit Ausnahme von Iper-6-phthal an der M3 W526A-Mutante sind alle Liganden an beiden Rezeptoren in der Lage, die Radioliganddissoziation in diesem Puffersystem komplett zu inhibieren. Im Falle der Experimente mit 6-Phthal und Iper-6-phthal ist dabei zu berücksichtigen, dass das Erreichen eines unteren Kurvenplateaus maßgeblich durch eine computergestützte Extrapolation des Kurvenverlaufs zustande kommt. Anhand der $pEC_{0,5Dis}$ -Werte ist zu erkennen, dass die Affinität der Liganden zum orthosterisch besetzten M3-Rezeptor durch die Punktmutation Trp 7.35→Ala verringert wurde. Die Affinitätsunterschiede belaufen sich auf etwa 1,2-1,6 Dekaden. Für den M2-Rezeptor wurden für die eingesetzten Liganden Differenzen der $pEC_{0,5Dis}$ -Werte zur M2 W422A-Mutante von 1,4-2,1 Dekaden gefunden (Prilla, Dissertationsschrift, 2006; Antony et al., 2009). Somit ist der Einfluss des konservierten Tryptophan 7.35 auf die Affinität von 6-Phthal, 6-Naph, Iper-6-phthal und Iper-6-naph zum orthosterisch besetzten Rezeptor zwischen M2- und M3-Rezeptoren als ähnlich einzustufen.

		n	n _H	Unteres Plateau (%)	pEC _{0,5Diss}
6-Phthal	M3	3	-1,49 ± 0,55 ^{n.s.}	1 ± 1 ^{NS}	4,58 ± 0,29
	M3 W526A	3	-1,20 ± 0,17 ^{n.s.}	5 ± 5 ^{NS}	3,43 ± 0,09 [*]
6-Naph	M3	3	-1,09 ± 0,10 ^{n.s.}	0 ± 1 ^{NS}	6,22 ± 0,09
	M3 W526A	3	-1,20 ± 0,21 ^{n.s.}	8 ± 2 ^{NS}	4,59 ± 0,16 ^{***}
Iper-6-phthal	M3	3	-1,08 ± 0,05 ^{n.s.}	0 ± 1 ^{NS}	4,57 ± 0,33 [§]
	M3 W526A	3	-0,97 ± 0,18 ^{n.s.}	30 ± 6 [#]	3,35 ± 0,24 ^{*,§}
Iper-6-naph	M3	3	-1,25 ± 0,14 ^{n.s.}	7 ± 4 ^{NS}	6,40 ± 0,09 [§]
	M3 W526A	3	-1,11 ± 0,20 ^{n.s.}	14 ± 5 ^{NS}	4,83 ± 0,07 ^{***,§}

Tab. 23: Bindungscharakteristika von 6-Phthal, 6-Naph, Iper-6-phthal und Iper-6-naph zum [³H]NMS-besetzten M3- und M3 W526A-Rezeptor in Membranhomogenaten. Es wurde Puffer (L27) verwendet. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler. n: Anzahl unabhängiger Experimente. n_H: Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. Unteres Plateau: Unteres Plateau der Kurvenverläufe. pEC_{0,5Diss}: Negativer dekadischer Logarithmus der Ligandkonzentration, die die [³H]NMS-Dissoziation um den Faktor 2 verzögert. Die Kennwerte „Unteres Plateau“ und „pEC_{0,5Diss}“ beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von -1. ^{n.s.}: Nicht signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß n_H = -1 (F-Test, p > 0,05). [#]: Signifikant verschieden von einer vollständigen [³H]NMS-Dissoziationsverzögerung (t-Test, [#] p < 0,05). ^{NS}: Nicht signifikant verschieden von einer vollständigen Dissoziationsverzögerung (t-Test, p > 0,05). ^{***}: Signifikant verschieden vom Wert des jeweiligen Wildtyps (t-Test, ^{***} p < 0,001, 0,05). [§]: Nicht signifikant verschieden vom Wert des jeweiligen allosterischen Fragments (t-Test, p > 0,05)

4.1.3.4 Affinität von 6-Phthal, 6-Naph, Iper-6-phthal und Iper-6-naph zum [³H]NMS-besetzten M2- Rezeptor sowie der Trp 7.35→ Ala-Mutante (Messung mit intakten CHO-Zellen)

Im Folgenden sollte der Einfluss der Trp 7.35→Ala-Mutation auf die Affinität der Hybridliganden Iper-6-phthal und Iper-6-naph sowie deren allosterischen Fragmenten zum orthosterisch besetzten M2-Rezeptor untersucht werden. Unter anderen experimentellen Bedingungen (Verwendung von Membranhomogenaten; Inkubationspuffer 5mM Na K P_i-Puffer, Inkubationstemperatur 23°C) wurden diese Untersuchungen bereits von Prilla (Dissertationsschrift, 2006) und Antony et al. (2009) durchgeführt. Da es jedoch in der vorliegenden Arbeit das Ziel war, Bindungsdaten mit funktionellen Untersuchungen in Beziehung setzen zu können, wurden die Experimente mit den jeweiligen Rezeptor exprimierenden, intakten CHO-Zellen und in einem 20mM HBSS+HEPES-Puffer (L17) durchgeführt. Unter diesen Bedingungen untersuchten Bock et al. (2014) die Substanzen bereits am M2-Rezeptor. Um einen adäquaten Vergleich der Ligandwirksamkeiten zwischen dem M2- Rezeptor und der M2 W422A-Mutante zu ermöglichen, wurden die Experimente am M2-Wildtyprezeptor in einem Einzelexperiment wiederholt und mit den Literaturparametern verglichen.

Diese Versuche dienen darüber hinaus dem Zweck, die korrekte Inkubationszeit für Experimente im Reaktionsgleichgewicht zu ermitteln.

Abb. 10 zeigt die Geschwindigkeitskonstanten der Radioliganddissoziation in Abhängigkeit von der Ligandkonzentration.

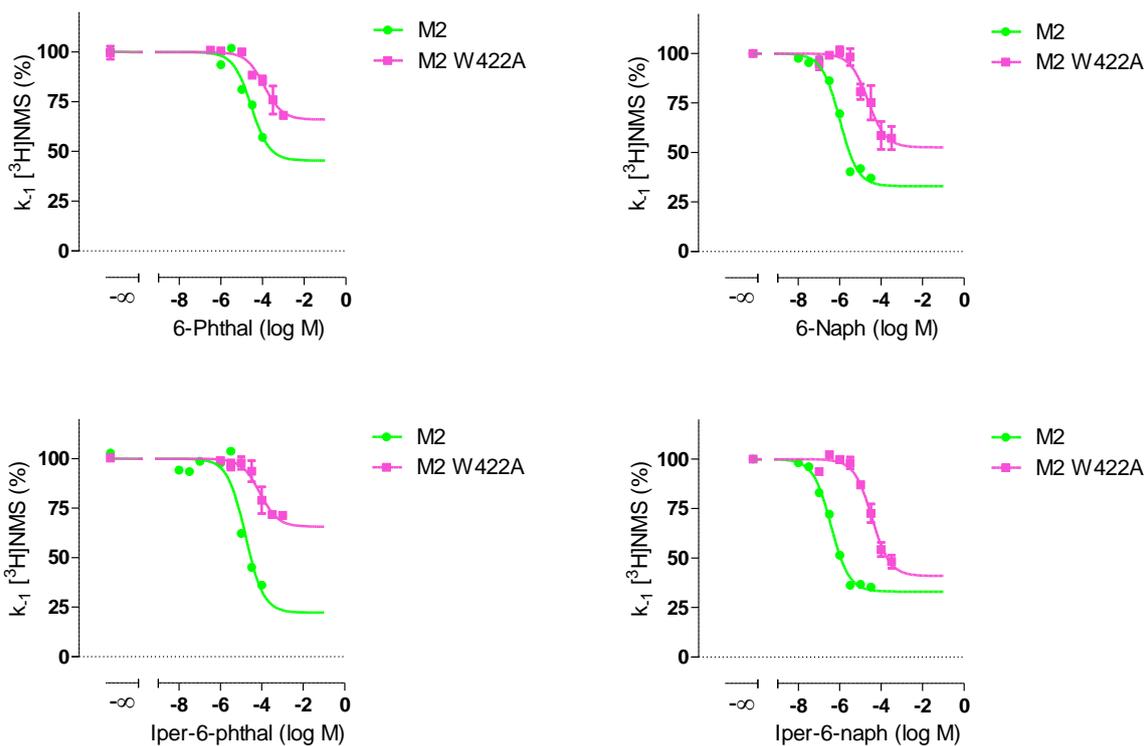


Abb. 10: Ermittlung der Affinität von 6-Phthal, 6-Naph, Iper-6-phthal und Iper-6-naph zum $[^3\text{H}]$ NMS-besetzten M2- und M2 W422A-Rezeptor auf intakten CHO-Zellen. Es wurde Puffer (L17) verwendet. Die Datenpunkte der Kurven für M2 W422A sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten in Zwei- bis Sechsfachbestimmung. Alle Kurven des M2-Rezeptors entstammen einer Einzelmessung. Ordinate: Geschwindigkeitskonstante der $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziation. 100% entspricht dem Wert ohne allosterische Modulation. 0% entspricht einer vollständig verminderten $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziation. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Ligandkonzentration

Die eingesetzten Liganden vermochten am Wildtyp- und punktmutiertem Rezeptor die Geschwindigkeit der $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziation zu verlangsamen, was sich in einer dosisabhängigen Reduktion der Geschwindigkeitskonstante k_{-1} zeigte. Im Falle von Iper-6-phthal war eine sinnvolle Kurvenanpassung nur möglich, indem eine Steilheit von -1 vorgegeben wurde. Ansonsten wurden Kurvensteilheiten von -1 beobachtet. Die unteren Plateaus der Kurven für die Trp 7.35-Mutante unterschieden sich signifikant von Null (Tab. 24). Dies ist ein Indiz dafür, dass trotz hoher Ligandkonzentration immer noch eine Radioliganddissoziation möglich war, da die Geschwindigkeitskonstante k_{-1} nicht weiter reduziert werden konnte. Da auf der Basis eines Einzelexperimentes keine validen Aussagen getroffen werden können, wurden die ermittelten unteren Plateaus der Wildtypkurven nicht weiter interpretiert. Einer mündlichen Mitteilung von A. Bock zufolge verhinderten jedoch ausreichend hohe Ligandkonzentrationen die Radioliganddissoziation vom M2-Wildtyprezeptor komplett, das heißt, dass die Kurven auf einem von Null nicht signifikant verschiedenen Niveau ausklangen.

Die hier ermittelten $\text{pEC}_{0,5\text{Dis}}$ -Werte als Ausdruck der Ligandaffinität zum orthosterisch besetzten M2-Rezeptorprotein waren nach ihrer Einzelbestimmung in sehr guter Übereinstimmung mit denen von Bock et al. (2014) (Tab. 25). Daher wurde auf weitere Bestimmungen an CHO-M2-Zellen verzichtet. Der Einfluss der Mutation auf die Affinität der untersuchten Liganden wurde durch den Vergleich der Literaturwerte und der hier gefundenen $\text{pEC}_{0,5\text{Dis}}$ -Werte für die M2 W422A-Mutante ermittelt

(Tab. 25). Dabei wurde ersichtlich, dass Trp 7.35 an der Bindung von 6-Phthal, 6-Naph, Iper-6-phthal und Iper-6-naph zum orthosterisch besetzten M2-Rezeptor beteiligt war.

		n	n _H	Unteres Plateau (%)	pEC _{0,5Diss}
6-Phthal	M2	1	-1,02 ± 0,06 ^{n.s.}	45 ± 12	4,54 ± 0,24
	M2 W422A	3	-1,08 ± 0,16 ^{n.s.}	66 ± 6 ^{##}	3,49 ± 0,35 [§]
6-Naph	M2	1	-1,44 ± 0,28 ^{n.s.}	33 ± 4	6,00 ± 0,10
	M2 W422A	3	-1,19 ± 0,27 ^{n.s.}	53 ± 5 ^{##}	4,62 ± 0,18 [*]
Iper-6-phthal	M2	1	-1	22 ± 13	4,79 ± 0,22
	M2 W422A	3	-1	66 ± 5 ^{##,NS}	4,11 ± 0,12 ^{NS,*}
Iper-6-naph	M2	1	-1,03 ± 0,11 ^{n.s.}	33 ± 2	6,42 ± 0,05
	M2 W422A	3	-1,26 ± 0,17 ^{n.s.}	41 ± 4 ^{##,NS}	4,47 ± 0,11 ^{NS,**}

Tab. 24: Bindungscharakteristika von 6-Phthal, 6-Naph, Iper-6-phthal und Iper-6-naph zum [³H]NMS-besetzten M2- und M2 W422A-Rezeptor auf intakten CHO-Zellen. Es wurde Puffer (L17) verwendet. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler. n: Anzahl unabhängiger Experimente. n_H: Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. Unteres Plateau: Unteres Plateau der Kurvenverläufe. pEC_{0,5Diss}: Negativer dekadischer Logarithmus der Ligandkonzentration, die die [³H]NMS-Dissoziation um den Faktor 2 verzögert. Die Kennwerte „Unteres Plateau“ und „pEC_{0,5Diss}“ beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von -1. ^{n.s.}: Nicht signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß n_H = -1 (F-Test, p > 0,05). ^{##}: Signifikant verschieden von einer vollständigen Dissoziationsverzögerung (t-Test, ^{##} p < 0,01). ^{NS}: Nicht signifikant verschieden vom Wert des jeweiligen allosterischen Fragments (t-Test, p > 0,05). ^{**}: Signifikant verschieden vom Wert des M2-Wildtyprezeptors (einseitiger t-Test, ^{**} p < 0,01, 0,05). [§]: Nicht signifikant verschieden vom Wert des M2-Wildtyprezeptors (einseitiger t-Test, p > 0,05)

		pEC _{0,5Diss}
6-Phthal	M2 (Bock et al., 2014)	4,51 ± 0,09
	[M2 (Einzelbestimmung)]	[4,54 ± 0,24]
	M2 W422A	3,49 ± 0,35 [*]
6-Naph	M2 (Bock et al., 2014)	6,09 ± 0,08
	[M2 (Einzelbestimmung)]	[6,00 ± 0,10]
	M2 W422A	4,62 ± 0,18 ^{**}
Iper-6-phthal	M2 (Bock et al., 2014)	4,83 ± 0,07
	[M2 (Einzelbestimmung)]	[4,79 ± 0,22]
	M2 W422A	4,11 ± 0,12 ^{**}
Iper-6-naph	M2 (Bock et al., 2014)	6,54 ± 0,11
	[M2 (Einzelbestimmung)]	[6,42 ± 0,05]
	M2 W422A	4,47 ± 0,11 ^{***}

Tab. 25: Affinität von 6-Phthal, 6-Naph, Iper-6-phthal und Iper-6-naph zum [³H]NMS-besetzten M2- und M2 W422A-Rezeptor auf intakten CHO-Zellen. pEC_{0,5Diss}: Negativer dekadischer Logarithmus der Ligandkonzentration, die die [³H]NMS-Dissoziation um den Faktor 2 verzögert. *Kursivgedruckte Werte für den M2-Wildtyprezeptor entstammen der Arbeit von Bock et al. (2014). Die Werte in eckigen Klammern [] entstammen der Einzelbestimmung aus der vorliegenden Arbeit (Tab. 24). Es wurde Puffer (L17) verwendet. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten. ****, ***, **, * : Signifikant verschieden vom Wert des M2- Wildtyprezeptors aus der Arbeit von Bock et al. (2014) (t-Test, ****, ***, **, * p < 0,001, 0,01, 0,05)*

Die Affinitäten der allosterischen Fragmente lagen in der gleichen Größenordnung wie die der jeweiligen dualsterischen Substanz. Für den M2 W422A-Rezeptor unterschieden sich die Werte jeweils statistisch nicht signifikant (Tab. 24). Dies stimmte mit der Vorstellung überein, dass bei Besetzung der orthosterischen Bindungsstelle durch [³H]NMS die dualsterischen Liganden nur im rein allosterischen Modus binden können und somit einen gleichen oder ähnlichen Effekt auf die Verzögerung der Radioliganddissoziation ausüben. Es fiel auf, dass sich an der M2 W422A-Mutante auch in Bezug auf die unteren Niveaus der Kurven die Hybridsubstanzen und ihre Fragmente nicht unterschieden (Tab. 24). Es schien also so zu sein, dass durch den Austausch von Trp 7.35 zu Alanin weder das Fragment noch das vollständige Hybrid in der Lage war, auch bei sehr hohen Ligandkonzentrationen den Dissoziationsweg des Radioliganden komplett zu versperren.

Wie am M3-Rezeptor wiesen 6-Phthal und Iper-6-phthal am M2 Rezeptor eine im Vergleich zu 6-Naph und Iper-6-naph um ca. 1,5-1,7 Dekaden verringerte Affinität auf (Tab. 24 und Tab. 25). Außerdem war zu erkennen, dass die getesteten Liganden generell zum orthosterisch besetzten M2-Rezeptor eine höhere Affinität als zum orthosterisch besetzten M3-Rezeptor aufwiesen. Dies soll Tab. 26 noch einmal verdeutlichen. Es muss darauf hingewiesen werden, dass die Experimente mit CHO-M2-Zellen in einem 20mM HBSS+HEPES-Puffer (L17), die mit CHO-M3-Zellen im Inkubationspuffer für IP1-Messungen (L19) durchgeführt wurden.

	M2	M3	Δ M2-M3
6-Phthal	4,51 ± 0,09	2,93 ± 0,07 ^{***}	1,58
6-Naph	6,09 ± 0,08	4,16 ± 0,13 ^{***}	1,93
Iper-6-phthal	4,83 ± 0,07	2,84 ± 0,05 ^{***}	1,99
Iper-6-naph	6,54 ± 0,11	4,28 ± 0,09 ^{***}	2,26

Tab. 26: $pEC_{0,5Diss}$ -Werte von 6-Phthal, 6-Naph, Iper-6-phthal und Iper-6-naph an M2- und M3-Rezeptoren auf intakten CHO-Zellen. $pEC_{0,5Diss}$: Negativer dekadischer Logarithmus der Ligandkonzentration, die die [3 H]NMS-Dissoziation um den Faktor 2 verzögert. Werte für den M2-Wildtyprezeptor entstammen der Arbeit von Bock et al., 2013 und sind *kursiv* gedruckt. Für Untersuchungen am M2-Rezeptor wurde Puffer (L17) verwendet. Für Untersuchungen am M3-Rezeptor wurde Puffer (L19) verwendet. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten. ^{***}: Signifikant verschieden vom Wert des M2-Rezeptors (t-Test, ^{***} $p < 0,001$)

4.1.3.5 McN-A-343

Mit McN-A-343 wurde eine Substanz in die Betrachtungen einbezogen, für die erstmals ein bitopischer Bindungsmodus an muskarinischen Rezeptoren (M2-Subtyp) aufgezeigt werden konnte (Valant et al., 2008; Mitchelson, 2012). Es handelt sich um einen bezüglich der intrinsischen Aktivität M1-prävalenten Agonisten, der allerdings ähnliche Bindungsaffinitäten zu allen fünf muskarinischen Subtypen aufweist. Im Bindungsverhalten hängt diese Substanz nicht oder nur zum Teil von klassischen als orthosterische oder allosterische Aminosäuren eingestuft Epitopen ab (May et al., 2007; Valant et al., 2008, Mitchelson, 2012). Eine für allosterisches Bindungsverhalten sprechende [3 H]NMS-Dissoziationsverzögerung konnte am M2-Rezeptor von May et al. (2007) und Valant et al. (2008) bereits beobachtet werden. Hier sollte untersucht werden, ob dies auch am M3-Rezeptor möglich war. Außerdem sollte die Frage beantwortet werden, inwieweit die Bindung der Substanz zum orthosterisch besetzten Rezeptor von Trp 7.35 als klassischem allosterischem Bindungsepitop abhing. Aus diesem Grund wurden zweipunktkinetische Experimente an M2- und M3-Rezeptoren sowie der jeweiligen Trp 7.35→Ala-Mutanten durchgeführt.

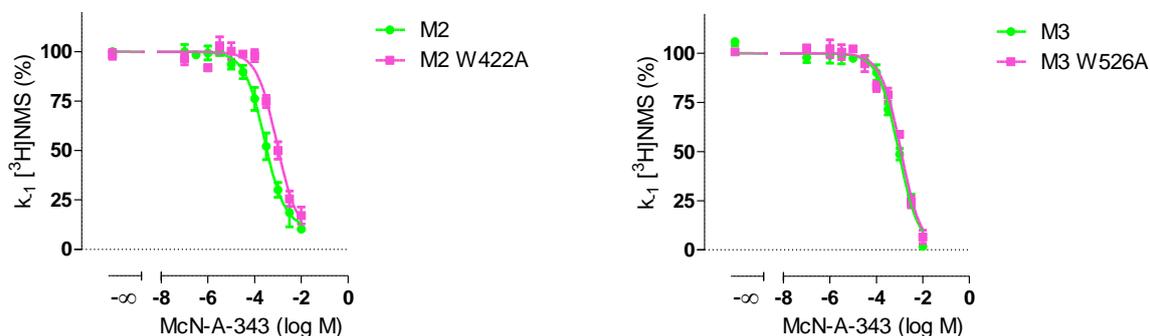


Abb. 11: Ermittlung der Affinität von McN-A-343 zum [3 H]NMS-besetzten M2- und M3-Rezeptor sowie der jeweiligen Trp 7.35→Ala-Mutanten (M2 W422A und M3 526A) auf Membranhomogenaten. Es wurde Puffer (L11) verwendet. Die Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Experimenten in Zwei- bis Sechsfachbestimmung. Ordinate: Geschwindigkeitskonstante der [3 H]NMS-Dissoziation. 100% entspricht dem Wert ohne allosterische Modulation. 0% entspricht einer verminderten [3 H]NMS-Dissoziation. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Ligandkonzentration

Die Verzögerung der Radioliganddissoziation durch McN-A-343 an M2- und M3- Rezeptoren sowie deren Trp 7.35→Ala-Mutanten spricht für die Ausbildung ternärer Komplexe aus Rezeptor, Radioligand und der Testsubstanz (Abb. 11). Für beide Rezeptoren konnte beobachtet werden, dass McN-A-343 in der Lage war, die Radioliganddissoziation komplett zu inhibieren (Tab. 27).

	n	n _H	Unteres Plateau (%)	pEC _{0,5Dis}
M2	7	-1,13 ± 0,13 ^{n.s.}	11 ± 5 ^{NS}	3,63 ± 0,13
M2 W422A	4	-1,29 ± 0,19 ^{n.s.}	7 ± 4 ^{NS}	3,04 ± 0,04 ^{**}
M3	4	-0,93 ± 0,07 ^{n.s.}	5 ± 3 ^{NS}	3,09 ± 0,01 [#]
M3 W526A	4	-0,96 ± 0,08 ^{n.s.}	4 ± 4 ^{NS}	2,99 ± 0,07 [§]

Tab. 27: Bindungscharakteristika von McN-A-343 zum [³H]NMS-besetzten M2- und M3-Rezeptor sowie der jeweiligen Trp 7.35→Ala-Mutanten (M2 W422A und M3 W526A) auf Membranhomogenaten. Es wurde Puffer (L11) verwendet. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler. n: Anzahl unabhängiger Experimente. n_H: Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. Unteres Plateau: Unteres Plateau der Kurvenverläufe. pEC_{0,5Dis}: Negativer dekadischer Logarithmus der Ligandkonzentration, die die [³H]NMS-Dissoziation um den Faktor 2 verzögert. Die Kennwerte „Unteres Plateau“ und „pEC_{0,5Dis}“ beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von -1. ^{n.s.}: Nicht signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß n_H = -1 (F-Test, p > 0,05). ^{NS}: Nicht signifikant verschieden von einer vollständigen Dissoziationsverzögerung (t-Test, p > 0,05). ^{**}: Signifikant verschieden vom Wert des jeweiligen Wildtyps (t-Test, ^{**} p < 0,01). [§]: Nicht signifikant verschieden vom Wert des jeweiligen Wildtyps (t-Test, p > 0,05). [#]: Signifikant verschieden vom Wert des M2-Wildtyprezeptors (t-Test, [#] p < 0,05)

Die Affinität der Substanz zum orthosterisch besetzten M2-Rezeptor lag zwar über der zum M3-Rezeptor, allerdings lagen beide Werte in der gleichen Größenordnung. Während sich der pEC_{0,5Dis}-Wert an der M2 W422A-Mutante im Vergleich zum M2-Wildtyp leicht verringerte, war er im Falle der M3 W526A-Mutante nicht signifikant verschieden vom M3-Wildtyp.

Somit konnte für den M2-, nicht aber für den M3-Rezeptor, eine Beteiligung von Trp 7.35 an der Bindung von McN-A-343 zum orthosterisch besetzten Rezeptorprotein beobachtet werden.

4.1.4 Die Abhängigkeit der Bindungsaffinität von Trp 7.35 im freien M3-Rezeptorprotein ist ligandgebunden

4.1.4.1 Vollagonisten: Acetylcholin und Iperoxo

Der endogene Ligand Acetylcholin nutzt die orthosterische Bindungsstelle muskarinischer Acetylcholinrezeptoren (Wess, 1996), der zwischen den Subtypen hochkonserviert ist (Hulme et al., 1990). Diese befindet sich in der Tiefe der sieben transmembranären Domänen und wird ebenfalls von anderen klassischen Agonisten wie Carbachol genutzt (Hulme et al., 1990; Wess, 1996; Li et al., 2007). Es wurden verschiedene, für Agonisten affinitätsgebende Epitope identifiziert. Die über alle fünf Subtypen konservierte Asp 3.32 ist an der Bindung orthosterischer Agonisten und Antagonisten beteiligt (Wess, 1996; Li et al., 2007). Die in Kapitel 1.2.1 beschriebene konservierte Aminosäure Trp 7.35 des M3-Rezeptors sollte nun in Bezug auf Ihr Bindungsverhalten zu Vollagonisten untersucht werden.

4.1.4.1.1 Intakte CHO-Zellen

Zur Einhaltung identischer experimenteller Bedingungen wie bei funktionellen Versuchen wurden Bindungsuntersuchungen an Rezeptoren auf intakten CHO-Zellen in Puffer (L19) durchgeführt. Es

sollte getestet werden, inwieweit die Affinität der orthosterischen Vollagonisten Acetylcholin und Iperoxo von der Aminosäure Trp 7.35 im muskarinischen M3-Rezeptor abhängt.

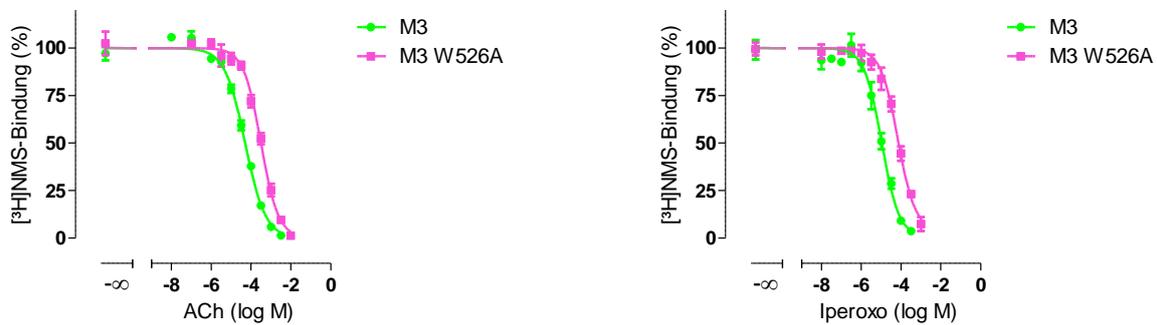


Abb. 12: [³H]NMS-Kompetitionsexperimente unter Gleichgewichtsbedingungen mit Acetylcholin (ACh) und Iperoxo an intakten CHO-M3- und CHO-M3 W526A-Zellen. Es wurde Puffer (L19) verwendet. Die Datenpunkte sind Mittelwerte ± Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Ordinate: Spezifische Gesamtbindung des Radioliganden in Prozent. 100% entspricht dem jeweiligen oberen Plateau der Kurve. 0% entspricht der unspezifischen Bindung. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Ligandkonzentration

		n	n _H	pK _{1/app}
Acetylcholin	M3	3	-0,85 ± 0,06 ⁺	4,42 ± 0,02
	M3 W526A	3	-0,93 ± 0,10 ^{n.s.}	3,60 ± 0,07 ^{***}
Iperoxo	M3	3	-0,97 ± 0,15 ^{n.s.}	5,04 ± 0,09 ^{###}
	M3 W526A	3	-0,86 ± 0,11 ^{n.s.}	4,22 ± 0,07 ^{**}

Tab. 28: Bindungscharakteristika von Acetylcholin und Iperoxo an M3- und M3 W526A-Rezeptoren auf intakten CHO-Zellen. Es wurde Puffer (L19) verwendet. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler. n: Anzahl unabhängiger Experimente. n_H: Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. pK_{1/APP}: Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_i bzw. K_{app}. Der Kennwert „pK_i“ beruht auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von -1 (Acetylcholinkurve an der M3 W526A-Mutante, Iperoxokurven am M3-Rezeptor und der W526A-Mutante). ^{n.s.}: Nicht signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß n_H = -1 (F-Test, p > 0,05). ⁺: Signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß von -1 (F-Test, ⁺ p < 0,05). ^{***, **}: Signifikant verschieden vom Wert des M3-Wildtyprezeptors (t-Test, ^{***, **} p < 0,001, 0,01). ^{###}: Signifikant verschieden vom Acetylcholinwert des M3-Wildtyprezeptors (t-Test, ^{###} p < 0,01)

Die [³H]NMS-Inhibitionsexperimente ergaben, dass die Kurvensteilheiten für Iperoxo an beiden getesteten Rezeptoren sowie für Acetylcholin an der M3 W526A-Mutante nicht verschieden von -1 waren und somit davon auszugehen war, dass es sich bei der Interaktion um eine 1:1-Reaktion zwischen Ligand und Rezeptor handelte. Die Acetylcholinkurve, die am M3-Wildtyprezeptor aufgenommen wurde, wies eine Kurvensteilheit von knapp unter 1,0 auf, die möglicherweise auf das Vorhandensein von mehr als einer Rezeptorpopulation zurückzuführen ist. So könnte in diesem System ein gewisser Anteil der Rezeptoren an G-Proteine gekoppelt vorliegen. Die Tendenz zu flacheren Kurvensteilheiten ist überdies bei beiden getesteten Vollagonisten an beiden Zelllinien zu erkennen (Tab. 28).

Jakubik et al. (1997) ermittelten einen pK_I -Wert für Acetylcholin am M3-Rezeptor von $4,54 \pm 0,08$, was in Einklang zum hier erhobenen Wert steht. Die Autoren verwendeten in ihren Versuchen Membranhomogenate und einen nahezu gleichen Puffer, der einem intakten zellulären System ähnlich GTP enthielt. Auf diese Weise konnte der Affinitätswert zum G-Protein-entkoppelten Rezeptor gemessen werden. Die Kurve in der zitierten Arbeit wies überdies eine normale Steilheit auf.

Kaufel vermaß in ihrer Dissertation (2010) Iperoxo in Radioligandbindungsuntersuchungen an Membranhomogenaten unter ähnlichen Pufferbedingungen wie in der vorliegenden Arbeit. Aufgrund eines verminderten Gehaltes an Guanylnukleotiden konnten in jener Arbeit biphasische Agonistbindungskurven aufgenommen werden. Für die niedrig affine (G-Protein-entkoppelte) Rezeptorfraction ermittelte sie einen Wert von $5,19 \pm 0,06$, der sich statistisch nicht von der hier ermittelten Affinität von Iperoxo am M3-Rezeptor auf intakten CHO-Zellen unterschied (t-Test, $p > 0,05$).

Es ist somit anzunehmen, dass die hier für die beiden Zelllinien ermittelten Affinitätswerte von Acetylcholin und Iperoxo der Affinität zum niedrigaffinen (G-Protein-entkoppelten) Rezeptor entsprechen.

Die pK_I -Werte (für Inhibitionskurven mit einem Hill-Koeffizienten von -1) der M3-W526A-Mutante waren im Vergleich zum pK_{app} -Wert (für die flache Inhibitionskurve) bzw. pK_I -Wert (für die Inhibitionskurve mit dem Hill-Koeffizienten von -1) des M3-Wildtyprezeptors reduziert. Damit ist für Acetylcholin und Iperoxo gezeigt worden, dass M3 Trp 7.35 als ein affinitätsgebendes Epitop angesehen werden kann. Dies steht im Einklang mit der Arbeit von Li et al. (2007), die beobachteten, dass sich am M3-Rezeptor der Ratte, bei dem Trp 7.35 durch Arginin ausgetauscht worden war, die Affinität von Carbachol um etwa den Faktor 10 im Vergleich zum M3-Wildtyprezeptor reduzierte.

Darüber hinaus erwies sich Iperoxo als der affinere Agonist zum M3-Rezeptor als Acetylcholin. Dies konnte von Kaufel unter anderen Versuchsbedingungen für alle fünf muskarinische Subtypen ebenfalls gezeigt werden (Dissertationschrift, 2010).

Die Affinität von Acetylcholin und Iperoxo wurde unter identischen Versuchsbedingungen zusätzlich an M2-Rezeptoren untersucht. Es wurden pK_I -Werte von $5,52 \pm 0,07$ bzw. $7,71 \pm 0,04$ in jeweils drei unabhängigen Experimenten ermittelt, die signifikant über denen für den M3-Rezeptor (Tab. 28, Seite 83) lagen (t-Test, $p < 0,001$). Die Kurven wiesen eine normale Steilheit auf. Diese in Bezug auf Acetylcholin als endogenen Liganden aller fünf muskarinischen Subtypen unerwartete Subtypselektivität konnte schon in früheren Arbeiten beobachtet werden (Lazareno und Birdsall, 1995; Kaufel, Dissertationsschrift, 2010). Kapitel 8.2.1 zeigte Ergebnisse von Radioligand-Bindungsexperimenten, die mit Acetylcholin an M2- und M4-Membranhomogenaten durchgeführt wurden und die diese Beobachtungen bestätigten. Darüber hinaus wurde auch an den geradzahigen Subtypen der Einfluss von Trp 7.35 auf die Bindung des endogenen Agonisten Acetylcholin untersucht.

4.1.4.1.2 Membranhomogenate

Um für beide Zelllinien zu verifizieren, dass die Vollagonisten Acetylcholin und Iperoxo in der Lage waren, bei verringertem Angebot an Guanylnukleotiden zwischen dem hochaffinen (G-Protein-gekoppelten) und niedrigaffinen (G-Protein-entkoppelten) Rezeptorzustand zu unterscheiden,

wurden die Versuche aus Kapitel 4.1.4.1.1 unter der Verwendung von Membranhomogenaten anstelle lebender Zellen durchgeführt.

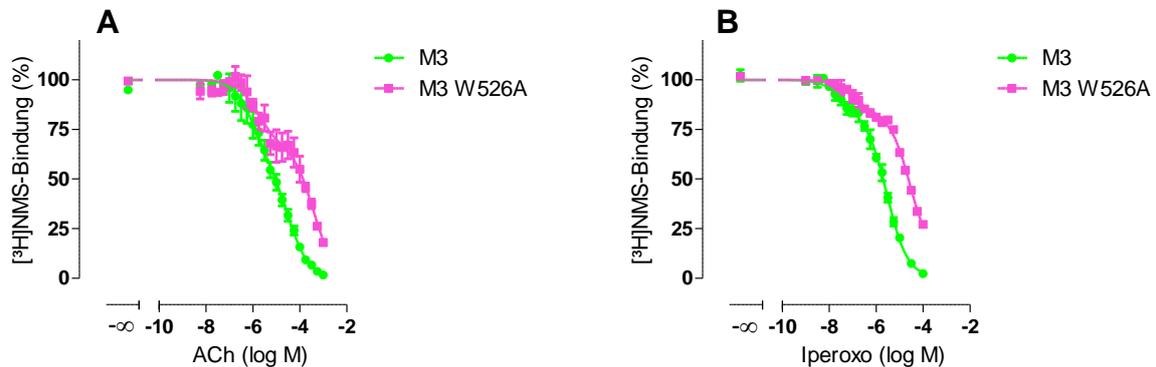


Abb. 13: [³H]NMS-Kompetitionsexperimente unter Gleichgewichtsbedingungen mit Acetylcholin (ACh) (A) und Iperoxo (B) an M3- und M3 W526A-Rezeptoren in Membranhomogenaten. Es wurde Puffer (L11) verwendet. Die Datenpunkte sind Mittelwerte ± Standardfehler aus drei bis fünf unabhängigen Experimenten in Drei- oder Vierfachbestimmung. Die Datenpunkte wurden mit Gleichung 11 biphasisch analysiert. Ordinate: Spezifische Gesamtbindung des Radioliganden in Prozent. 100% entspricht dem jeweiligen oberen Plateau der Kurve. 0% entspricht der unspezifischen Bindung. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Ligandkonzentration.

		Bi vs. Mono	pK _{app} HOCH	pK _{app} NIEDRIG	Hochaffine Fraktion (%)
Acetylcholin	M3	3/2	6,43 ± 0,50	4,26 ± 0,13	55 ± 14
	M3 W526A	3/1	6,18 ± 0,41 ^{NS}	3,44 ± 0,09 ^{**}	33 ± 10 ^{NS}
Iperoxo	M3	2/1	7,68 ± 0,05 ^{###}	5,75 ± 0,11 ^{###}	16 ± 2 ^{n.s.}
	M3 W526A	3/0	7,20 ± 0,22 ^{NS}	4,74 ± 0,04 ^{***}	18 ± 1 ^{NS}

Tab. 29: Bindungscharakteristika von Acetylcholin und Iperoxo an M3- und M3 W526A-Rezeptoren in Membranhomogenaten. Es wurde Puffer (L11) verwendet. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler. pK_{app} HOCH und pK_{app} NIEDRIG: Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_{app} HOCH für die hochaffine Rezeptorpopulation und K_{app} NIEDRIG für die niedrigaffine Rezeptorpopulation. ^{***}, ^{**}: Signifikant verschieden vom Wert des M3-Wildtyprezeptors (t-Test, ^{***}, ^{**} p < 0,001, 0,01). ^{NS}: Nicht signifikant verschieden vom Wert des M3-Wildtyprezeptors (t-Test, ^{NS} p > 0,05). ^{###}: Signifikant verschieden vom Acetylcholinwert des M3-Wildtyprezeptors (t-Test, ^{###} p < 0,001). ^{n.s.}: Nicht signifikant verschieden vom Acetylcholinwert des M3-Wildtyprezeptors (t-Test, ^{n.s.} p > 0,05)

Bei einem überwiegenden Teil der Einzelversuche war hier eine biphasische Kurvenanpassung (Gleichung 11) an die Datenpunkte statistisch besser möglich als eine monophasische Kurvenanpassung (Gleichung 4). Die zwei Affinitätswerte, die für jeden Agonisten ermittelt wurden, unterschieden sich jeweils signifikant voneinander (t-Test, p < 0,001).

Iperoxo erwies sich als affinerer Agonist als Acetylcholin am M3-Rezeptor und der M3-W526A-Mutante.

Die Größe der hochaffinen Fraktion unterschied sich innerhalb der Zelllinien nicht signifikant voneinander. Aufgrund der hohen Streuung war nicht abschließend zu bewerten, ob Acetylcholin, das eine numerisch größere hochaffine Fraktion „erkannte“, in dieser Hinsicht Iperoxo überlegen war.

In Bezug auf die Affinität zur hochaffinen Fraktion konnte kein Unterschied zwischen Wildtyp und punktmutiertem Rezeptor detektiert werden. Es fiel allerdings auf, dass der mutierte Rezeptor in Bezug auf die Affinität von Acetylcholin und Iperoxo zum G-Protein entkoppelten Rezeptor dem Wildtyp unterlegen war; die Affinität von Acetylcholin reduzierte sich um 0,82, die von Iperoxo um 1,01 Dekaden. Die Werte stimmten überwiegend gut mit den Affinitätsparametern aus den Untersuchungen mit Rezeptoren auf intakten CHO-Zellen überein (Tab. 28). Es ist wahrscheinlich, dass im letztgenannten Fall die Affinität der Agonisten zum G-Protein-entkoppelten Zustand gemessen wurde.

Analog zum M2- und zum M4-Rezeptor (Jäger et al., 2007; Kapitel 8.2.1) stellte sich Trp 7.35 im M3-Rezeptor als ein an der Bindung muskarinischer Vollagonisten bedeutendes Epitop dar.

4.1.4.2 Pilocarpin

Jäger et al. (2007) fanden, dass sich die Affinität des muskarinischen Partialagonisten Pilocarpin am M2 W422A-Rezeptor nicht von der des M2 Wildtyprezeptors unterscheidet. Sie postulierten, dass die Fähigkeit des Pilocarpin, den Rezeptor vom Ausgangszustand in die aktive Konformation zu transformieren, schwächer ausgeprägt ist als beim Vollagonisten Acetylcholin. Folglich ergäbe sich auch eine andere Umgestaltung des Übergangsbereichs zwischen dem orthosterischen und dem allosterischen Haftareal, wobei sich Trp 7.35 nicht wie beim Acetylcholin in Richtung der orthosterischen Bindungsdomäne ausrichtet.

Die nachfolgenden Experimente sollten aufzeigen, ob die Affinität von Pilocarpin zum muskarinischen M3-Rezeptor von Trp 7.35 abhängt. Analog zu den Versuchen in Kapitel 4.1.4.1.1 wurden hier intakte CHO-Zellen eingesetzt und in Puffer (L19) gearbeitet.

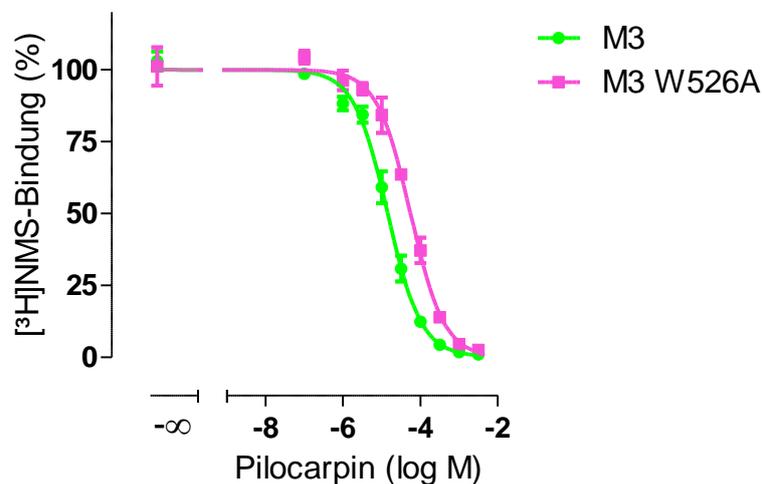


Abb. 14: [³H]NMS-Kompetitionsexperimente unter Gleichgewichtsbedingungen mit Pilocarpin an intakten CHO- M3- und CHO- M3 W526A-Zellen. Es wurde Puffer (L19) verwendet. Die Datenpunkte sind Mittelwerte ± Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Ordinate: Spezifische Gesamtbindung des Radioliganden in Prozent. 100% entspricht dem jeweiligen oberen Plateau der Kurve. 0% entspricht der unspezifischen Bindung. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Ligandkonzentration

		n	n _H	pK _i
Pilocarpin	M3	3	-0,99 ± 0,08 ^{n.s.}	5,04 ± 0,13
	M3 W526A	3	-0,97 ± 0,10 ^{n.s.}	4,45 ± 0,13 [*]

Tab. 30: Bindungscharakteristika von Pilocarpin an M3- und M3 W526A-Rezeptoren auf intakten CHO-Zellen. Es wurde Puffer (L19) verwendet. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler. n: Anzahl unabhängiger Experimente. n_H: Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. pK_i: Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_i. Der Kennwert „pK_i“ beruht auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von -1. ^{n.s.}: Nicht signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß von -1 (F-Test, p > 0,05). ^{*}: Signifikant verschieden vom Wert des M3-Wildtyprezeptors (t-Test, ^{*} p < 0,05)

Die erhaltenen Kurven konnten mit einem normalen Steilheitsmaß von -1 angepasst werden, sodass davon ausgegangen werden konnte, dass es sich bei der Interaktion zwischen Agonist und Rezeptor um eine bimolekulare Reaktion handelte. Dies könnte damit zusammenhängen, dass Pilocarpin, anders als Acetylcholin unter den gegebenen experimentellen Voraussetzungen, nur ein Rezeptorkollektiv „erkennt“. In Kapitel 8.2.2 wird dieser Gesichtspunkt näher beleuchtet.

Die hier ermittelte Affinität von Pilocarpin zum muskarinischen M3-Rezeptor steht in sehr gutem Einklang mit dem zuvor von Jakubik et al. (1997) ermittelten Wert von 5,09 ± 0,04. Wie in Kapitel 4.1.4.1.1 beschrieben, wurden in diesen Untersuchungen Membranhomogenaten eingesetzt und ein GTP-haltiger Puffer verwendet.

Interessanterweise erwies sich Pilocarpin als affinerer Agonist als Acetylcholin an M3-Rezeptoren (t-Test, ^{**} p < 0,01) (Tab. 28 und Tab. 30), was die Autoren Jakubik et al. (1997) ebenfalls beobachteten. Pilocarpin wies die gleiche Affinität wie Iperoxo zu M3-Rezeptoren auf (Tab. 28 und Tab. 30) (t-Test, p > 0,05).

Die Affinität von Pilocarpin war an der M3 W526A-Mutante im Vergleich zum M3-Wildtyp reduziert. Dies steht im Kontrast zu den Beobachtungen, die am M2- und M4-Rezeptor gemacht wurden (Jäger et al., 2007; Kapitel 8.2.2). Dieser Aspekt wird in Kapitel 5.4 näher erläutert werden.

4.1.4.3 McN-A-343

McN-A-343 wurde in einer Übersicht von Mitchelson (2012) als in Bindungsuntersuchungen völlig subtypenspezifischer muskarinischer Ligand beschrieben. U.a. verweist der Autor auf eine Studie von Jakubik et al. (1997), bei dem in einem GDP-haltigen, 10mM HEPES-Puffer K_i-Werte von etwa 10µM an Membranhomogenaten von M1-M4-Rezeptoren ermittelt wurden.

In Kapitel 4.1.3.5 konnte gezeigt werden, dass McN-A-343 sowohl an M2-als auch M3-Rezeptoren in der Lage war, die Dissoziation des Radioliganden [³H]NMS zu verzögern, was für eine Affinität der Substanz zur allosterischen Bindungsstelle an beiden Subtypen spricht. Dies steht in Bezug zum M2-Rezeptor im Einklang mit dem postulierten orthosterisch / allosterischen (bitopischen) Bindungsmodus von McN-A-343 (Valant et al., 2008). Die Fähigkeit der [³H]NMS-Dissoziationsverzögerung war aber nur im Falle des M2-Rezeptors von Trp 7.35 abhängig.

Im Folgenden sollte getestet werden, inwieweit Trp 7.35 einen Einfluss auf die Affinität zum orthosterisch unbesetzten M3-Rezeptor aufwies.

Da bei der Erhebung der Daten für die vorliegende Arbeit die Substanz McN-A-343 zunächst in funktionellen Experimenten untersucht worden war und in den entsprechenden Experimenten ein

Vollagonismus feststellbar war (Kapitel 4.4.4.4), wurde vermutet, dass in Bindungsuntersuchungen womöglich hoch- und niedrigaffine Rezeptorzustände zu beobachten wären. Deshalb wurden sehr engmaschige Konzentrationsstufen des Liganden eingesetzt, da dadurch eine präzisere Kurvenanpassung möglich ist und eine potentiell biphasisch zu beschreibende Interaktion (Gleichung 11) besser detektiert werden könnte.

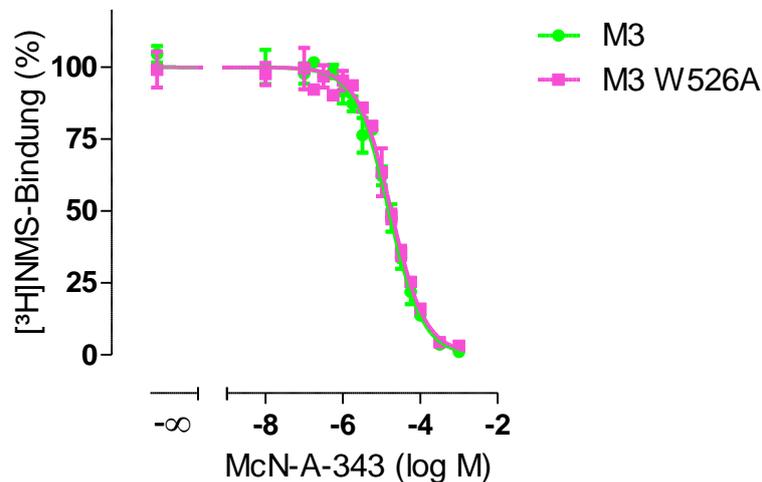


Abb. 15: [³H]NMS-Kompetitionsexperimente unter Gleichgewichtsbedingungen mit McN-A-343 an intakten CHO- M3- und CHO- M3 W526A-Zellen. Es wurde Puffer (L19) verwendet. Die Datenpunkte sind Mittelwerte ± Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Ordinate: Spezifische Gesamtbindung des Radioliganden in Prozent. 100% entspricht dem jeweiligen oberen Plateau der Kurve. 0% entspricht der unspezifischen Bindung. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Ligandkonzentration

		n	n _H	pK _i
McN-A-343	M3	3	-0,96 ± 0,07 ^{n.s.}	5,10 ± 0,07
	M3 W526A	3	-1,02 ± 0,09 ^{n.s.}	5,00 ± 0,06 ^{NS}

Tab. 31: Bindungscharakteristika von McN-A-343 an M3- und M3 W526A-Rezeptoren auf intakten CHO-Zellen. Es wurde Puffer (L19) verwendet. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler. n: Anzahl unabhängiger Experimente. n_H: Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. pK_i: Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_i. Der Kennwert „pK_i“ beruht auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von -1. ^{n.s.}: Nicht signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß von -1 (F-Test, p > 0,05). ^{NS}: Nicht signifikant verschieden vom Wert des M3-Wildtyrezeptors (t-Test, ^{NS} p > 0,05)

Die Inhibitionskurve von McN-A-343 mit [³H]NMS an muskarinischen M3- und M3 W526A-Rezeptoren wies eine normale Kurvensteilheit auf. Dies liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit an dem bei der Verwendung intakter Zellen als Basis für Bindungsuntersuchungen hohen Gehalt von Guanylnukleotiden, die eine ausschließlich G-Protein-entkoppelte Rezeptorpopulation verursachen. Eine biphasische Anpassung nach Gleichung 11 war nicht möglich. Der Affinitätsparameter pK_i des M3-Rezeptors (5,10 ± 0,07) entsprach in guter Näherung den in der Literatur genannten Werten (5,06 ± 0,07, Jakubik et al., 1997). Da die Interaktionskurve auf einem nicht von Null verschiedenen unteren Niveau ausschwang (t-Test, p > 0,05), kann an dieser Stelle entweder von einem kompetitiven (orthosterische oder dualsterische Bindung) oder einem sehr stark negativ kooperativen Verhalten (allosterische Bindung) ausgegangen werden.

Die Bindung von McN-A-343 erwies sich als unabhängig von Trp 7.35 am M3-Rezeptor, wodurch sich dieser Subtyp nicht vom M2-Rezeptor unterschied (Antony, Dissertationsschrift, 2007; Kapitel 8.2.3) und McN-A-343 als muskarinischer Agonist somit an beiden Subtypen ein untypisches Bindungsverhalten aufwies.

4.1.4.4 W84

Der allosterische Modulator W84 war nicht in der Lage, die [³H]NMS-Dissoziation am M3 W526A-Rezeptor zu verlangsamen (Kapitel 4.1.3.1). Auf der Basis dieses Befundes konnte nicht ausgeschlossen werden, dass der Ligand zum M3 W526A-Rezeptor keine Affinität aufweist.

Im Folgenden wurde die Affinität von W84 zum orthosterisch unbesetzten M3-Rezeptor untersucht. Es sollte überprüft werden, ob auch hier wie im Falle der orthosterisch besetzten Rezeptoren eine M2/M3-Selektivität zu beobachten war und ob die Affinität dieses allosterischen Modulators zum M3-Rezeptor von Trp 7.35 abhängt.

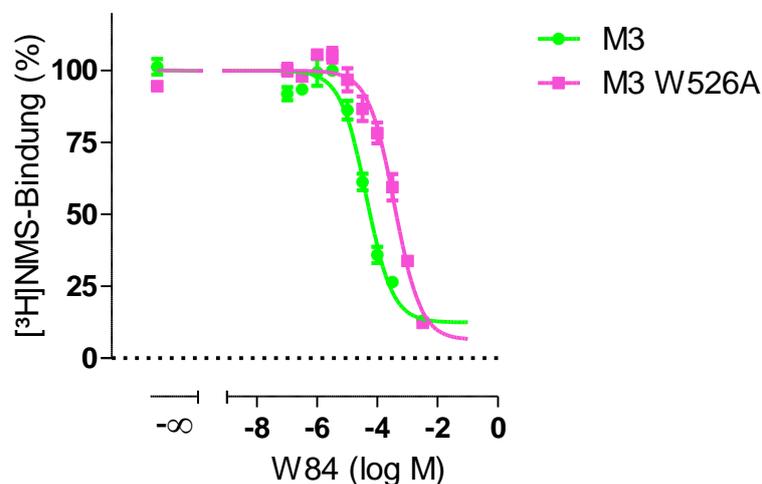


Abb. 16: [³H]NMS-Interaktionsexperimente unter Gleichgewichtsbedingungen mit W84 an Membranhomogenaten von CHO-M3- und CHO-M3 W526A-Zellen. Es wurde Puffer (L11) verwendet. Die Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei bis fünf unabhängigen Experimenten in Drei- bis Sechsfachbestimmung. Ordinate: Spezifische Gesamtbindung des Radioliganden in Prozent. 100% entspricht dem jeweiligen oberen Plateau der Kurve. 0% entspricht der unspezifischen Bindung. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Ligandkonzentration

		n	pK _A	p α	p α +pK _A	pEC _{0,5Diss}
W84	M3	3	4,45 \pm 0,07	-1,01 \pm 0,06	3,44	4,07 \pm 0,10
	M3 W526A	3	3,80 \pm 0,21*	-1,29 \pm 0,02	2,51	-

Tab. 32: Bindungscharakteristika von W84 an Membranhomogenaten von CHO-M3- und CHO-M3 W526A-Zellen. Es wurde Puffer (L11) verwendet. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler. n: Anzahl unabhängiger Experimente. pK_A: Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissociationskonstanten K_A. p α : Negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors α . pEC_{0,5Diss}: Negativer dekadischer Logarithmus der Ligandkonzentration, die die [³H]NMS-Dissoziation um den Faktor 2 verzögert. *: Signifikant verschieden zum Wert des M3-Wildtyprezeptors (t-Test, * p < 0,05)

Steigende Konzentrationen von W84 reduzierten die [³H]NMS-Bindung. Die computergestützte Analyse mittels einer vier-Parameter-logistischen Gleichung (Gleichung 4) ergab, dass beide Kurven auf ein von Null nicht verschiedenes Niveau zustrebten (t-Test, p > 0,05). Somit ist aufgrund der hier

vorliegenden Daten kein Rückschluss darauf zulässig, ob sich ternäre Komplexe aus Rezeptor, Radioligand und allosterischem Modulator ausgebildet hatten. Da sich W84 jedoch als allosterischer Antagonist an M2-Rezeptoren herausgestellt hatte (Lüllmann et al., 1969; Jepsen et al., 1988), wurde zur Analyse das für allosterische Modulatoren anzuwendende Ehlert-Modell (1988) angewendet. Der sich daraus ergebende Affinitätsparameter des Liganden zum M3-Wildtyprezeptor pK_A erwies sich als signifikant höher im Vergleich zu dem der M3 W526A-Mutante. Interessanterweise konnten Prilla et al. (2006) einen Affinitätsabfall des W84 von 1,55 Dekaden zwischen M2- und M2 W422A-Rezeptor feststellen, während die Trp 7.35-Abhängigkeit im M5-Rezeptor weniger stark ausgeprägt war: Der Affinitätsunterschied zwischen M5- und M5 W477A-Rezeptor betrug dort 0,75 Dekaden. In der vorliegenden Arbeit konnte für den M3-Rezeptor eine in der gleichen Größenordnung liegende Trp 7.35-Abhängigkeit (ΔpK_A Wildtyp-Mutante: 0,65) beobachtet werden. Die Tendenz der bei präferenziell G_i-koppelnden Subtypen stärker ausgeprägter Abhängigkeit der W84-Bindungsaffinität von Trp 7.35 als bei vorwiegend G_q-koppelnden Rezeptoren konnte somit durch die hier vorgestellten Daten bestätigt werden (siehe auch Kapitel 8.2.4). Die Affinitätsparameter pK_A von W84 zu M3- und M5-Rezeptoren lagen überdies in der gleichen Größenordnung (M3: $4,45 \pm 0,07$, vorliegende Arbeit; M5: $4,37 \pm 0,08$, Kaufel, Dissertationschrift, 2010). In der zitierten Arbeit wurden die Experimente unter gleichen Versuchsbedingungen wie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt.

Trp 7.35 erwies sich als ein affinitätsgebendes Epitop von W84 zum M3-Rezeptor. Darin unterscheidet sich dieser Ligand von orthosterischen Antagonisten.

Nach dem Kooperativitätsmodell (Ehlert, 1988) entspricht der Ausdruck $[p\alpha + pK_A]$ dem $pEC_{0,5Dis}$ -Wert aus zweipunktkinetischen Experimenten. Wie allerdings auch in der Arbeit von Großmüller et al. (2006) dargelegt, kann ein nicht von Null verschiedenes unteres Niveau einer Gleichgewichtsbindungskurve (entsprechend einer starken negativen Kooperativität) mit einem allosterischen Modulator dazu führen, dass oben genannter mathematischer Zusammenhang zwischen pK_A - und $pEC_{0,5Dis}$ -Werten nicht zu beobachten ist. Dementsprechend weicht der Term $[p\alpha + pK_A]$ (Tab. 32) vom $pEC_{0,5Dis}$ -Wert aus Tab. 21, Seite 71 ab. Darüber hinaus kann für die M3 W526A-Mutante diese Überlegung nicht angestellt werden, da keine [³H]NMS-dissoziationsverzögernde Eigenschaft für diesen Rezeptor zu beobachten war (Kapitel 4.1.3.1).

4.1.4.5 Affinität von 6-Phthal, 6-Naph, Iper-6-phthal und Iper-6-naph am muskarinischen M2-Rezeptor unter Berücksichtigung des Einflusses von Trp 7.35

Mit dem " Bindungsmodell für dynamische Liganden" (May et al., 2007, Bock et al., 2012 und 2014) ist es möglich, die Affinität von Hybridliganden im rein allosterischen Bindungsmodus von derjenigen im dualsterischen Bindungsmodus zu unterscheiden. Dazu werden die allosterischen Fragmente der Hybridliganden benötigt. Ihre Affinität zur allosterischen Bindungsstelle des Rezeptors wird als Affinität für den allosterischen Bindungsmodus der Hybridsubstanz angenommen. Über Gleichung 14 kann anhand der Affinitätsparameter abgeleitet werden, wie hoch der Anteil dualsterischer zu rein allosterischer Bindung ist. An M2-Rezeptor-Membranhomogenaten haben Bock et al. (2014) für Iper-6-phthal und Iper-6-naph ein Verhältnis von 93 % zu 7%, bzw. 79% zu 21% ermittelt. An intakten CHO-Zellen, die den M2-Rezeptor exprimierten, kamen die Autoren zu den Verhältnissen 77% / 23% bzw. 80% / 20%. Damit überwog am M2-Rezeptor der dualsterische Bindungsmodus der Hybridliganden. Darüber hinaus konnten die gleichen Autoren zeigen, dass die Mutation von Trp 7.35 zu Alanin eine verbesserte Rezeptoraktivierung der untersuchten Hybridliganden Iper-6-phthal und Iper-6-naph zur Folge hatte. Die Autoren folgerten unter anderem daraus, dass ein flexibler

allosterischer „Vorhof“ zur orthosterischen Bindungsstelle eine entscheidende Rolle für die optimale aktive Rezeptorkonformation spielt.

Um zu testen, inwieweit sich die Mutation im Übergangsbereich vom allosterischen zum orthosterischen Rezeptorareal auf das Verhältnis der Bindungsmodi von Hybridliganden auswirkt, wurden Bindungsuntersuchungen der allosterischen Fragmente sowie der Hybridsubstanzen an CHO-M2- und CHO-M2 W422A-Zellen durchgeführt (Abb. 17).

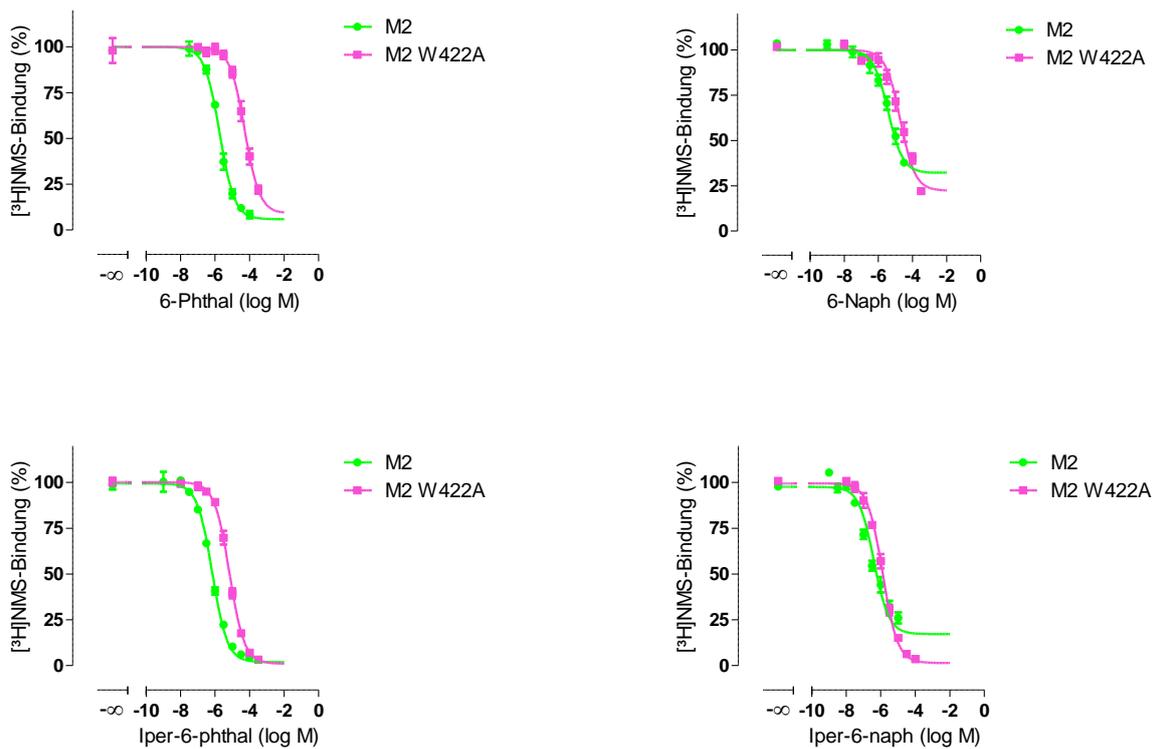


Abb. 17: [³H]NMS-Interaktionssexperimente unter Gleichgewichtsbedingungen mit 6-Phthal, 6-Naph, Iper-6-phthal und Iper-6-naph an intakten CHO-M2- und CHO-M2 W422A-Zellen. Es wurde Puffer (L17) verwendet. Die Datenpunkte sind Mittelwerte ± Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Die Datenanpassung erfolgte durch Gleichung 12 für die allosterischen Modulatoren und durch Gleichung 13 für die Hybridliganden. Ordinate: Spezifische Gesamtbindung des Radioliganden in Prozent. 100% entspricht dem jeweiligen oberen Plateau der Kurve. 0% entspricht der unspezifischen Bindung. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Ligandkonzentration

		M2	M2 W422A	Δ Wt-Mut
6-Phthal	$pK_{\text{inaktiv}} \pm \text{S.E.M.}$	$5,98 \pm 0,03$	$4,52 \pm 0,06$ ***	1,46
	$\alpha \pm \text{S.E.M.}$	29 ± 9	19 ± 10	
6-Naph	$pK_{\text{inaktiv}} \pm \text{S.E.M.}$	$5,62 \pm 0,08$	$4,92 \pm 0,07$ **	0,70
	$\alpha \pm \text{S.E.M.}$	5 ± 1	7 ± 1	
Iper-6-phthal	$pK_{\text{inaktiv}} \pm \text{S.E.M.}$	$5,98 \pm 0,03$	$4,52 \pm 0,06$ ***	1,46
	$pK_{\text{aktiv}} \pm \text{S.E.M.}$	$6,21 \pm 0,03$	$5,36 \pm 0,03$ ***	
Iper-6-naph	$pK_{\text{inaktiv}} \pm \text{S.E.M.}$	$5,62 \pm 0,08$	$4,92 \pm 0,07$ **	0,70
	$pK_{\text{aktiv}} \pm \text{S.E.M.}$	$6,57 \pm 0,04$	$6,12 \pm 0,03$ ***	

Tab. 33: Bindungscharakteristika von 6-Phthal, 6-Naph, Iper-6-phthal und Iper-6-naph an M2- und M2 W422A-Rezeptoren auf intakten CHO-Zellen. Es wurde Puffer (L17) verwendet. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Die Analyse der Messwerte der allosterischen Modulatoren erfolgte mit Hilfe von Gleichung 12. Die Analyse der Messwerte der Hybridliganden erfolgte mit Hilfe von Gleichung 13. pK_{inaktiv} ist die Affinität des allosterischen Fragmentes und wurde mit der des Hybridliganden im rein allosterischen Bindungsmodus gleichgesetzt. pK_{aktiv} ist die Affinität des Hybridliganden im dualsterischen Bindungsmodus. α ist der Kooperativitätsfaktor für die Interaktion der allosterischen Modulatoren mit dem orthosterischen Liganden [^3H]NMS. ***: Signifikanter Unterschied zum Wert des M2-Wildtyprezeptors (t-Test, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$)

Die Affinitätsparameter der Hybridliganden und allosterischen Modulatoren, die für den M2-Wildtyp ermittelt wurden, stehen in gutem Einklang mit zuvor von Bock et al. (2014) erhobenen Daten. Für 6-Phthal und 6-Naph fanden die Autoren pK_{inaktiv} -Werte von $5,84 \pm 0,04$ und $6,04 \pm 0,04$, die gleichzeitig für den Affinitätsparameter des jeweiligen Hybridliganden im allosterischen Bindungsmodus angenommen wurden. Die pK_{aktiv} -Werte betragen bei Bock et al. (2014) $6,37 \pm 0,05$ und $6,64 \pm 0,04$ für Iper-6-phthal und Iper-6-naph.

Das Epitop Trp 7.35 des M2-Rezeptors war für die Bindung aller untersuchten allosterischen Fragmente und dualsterischen Liganden affinitätsgebend. Es fiel auf, dass der Affinitätsverlust bei den allosterischen Fragmenten stärker ausgeprägt war als bei den Hybridliganden. Analog ermittelte Antony für Iper-6-phthal und Iper-6-naph einen Affinitätsverlust durch die Mutation von 0,9 bzw. 0,82 Dekaden (Dissertationsschrift, 2007). Untersuchungen der Muttersubstanzen von 6-Phthal und 6-Naph (W84 und Naphmethonium) ergaben einen Unterschied von 1,55 bzw. 1,61 Dekaden zwischen Wildtyp und punktmutiertem M2-Rezeptor (Prilla, Dissertationsschrift, 2006). Da in diesen Arbeiten die Untersuchungen an Membranhomogenaten und in einem Na K P_i-Puffer-System erfolgten, sind absolute Werte von Affinitäten und Kooperativitätsfaktoren nicht vergleichbar mit dieser Arbeit, bei der ganze Zellen und ein HEPES-haltiger HBSS-Puffer verwendet wurden. Vergleiche von Differenzen zwischen Werten des Wildtyps und der mutierten Rezeptoren erscheinen jedoch zulässig.

Die Hybridliganden wiesen ein negatives Kooperativitätsverhalten mit [^3H]NMS auf, wie es sowohl von Antony et al. (2009) als auch von Bock et al. (2014) beobachtet werden konnte. In dieser Arbeit wie bei Antony et al. (2009) wurde durch die Mutation diese Eigenschaft nicht verändert.

Der allosterische Baustein 6-Phthal erwies sich sowohl am M2-Wildtyprezeptor als auch an der Punktmutante als negativ kooperativ mit [³H]NMS. In Bezug auf den M2-Wildtyprezeptor unterschieden sich die Daten damit nicht von denen von Bock et al. (2014). W84 als Muttersubstanz von 6-Phthal erwies sich an beiden Rezeptoren ebenfalls als negativ kooperativ (Prilla, Dissertationsschrift, 2006).

Im Gegensatz zu den hier erhobenen Daten, in denen sich 6-Naph als negativ kooperativ mit [³H]NMS am M2-Rezeptor zeigte, ermittelten Bock et al. (2014) eine leicht positive [³H]NMS-Kooperativität mit 6-Naph an lebenden CHO-M2-Zellen ($p\alpha = 0,93 \pm 0,09$). Die allosterische Muttersubstanz Naphmethonium zeigte in der Vergangenheit ebenfalls eine positive Kooperativität (Prilla, Dissertationsschrift, 2006; Jäger et al., 2007). Diese Eigenschaft war bei der im Vergleich zu 6-Naph räumlich größeren Substanz stärker ausgeprägt. Aus der Beobachtung, dass die Inhibitionskurve des Iper-6-phthal an M2-Rezeptoren im Gegensatz zu der von Iper-6-naph ein von Null nicht verschiedenes unteres Niveau aufwies, schlossen die Autoren Bock et al. (2014) auf den Einfluss des jeweiligen allosterischen Fragmentes der Hybridliganden: 6-Phthal im Iper-6-phthal bewirkte durch seinen negativ kooperativen Einfluss eine starke negative Kooperativität der Hybridsubstanz. Dahingegen bewirkte der positiv kooperative Einfluss von 6-Naph ein von Null verschiedenes unteres Niveau der Interaktionskurve von Iper-6-naph (Bock et al., 2014).

Die hier gezeigten Interaktionskurven der Hybridliganden an M2-Rezeptoren wiesen ein vergleichbares Bild auf (Tab. 34). Das untere Plateau der Iper-6-phthal-Inhibitionskurve wich zwar statistisch von Null ab, unterschied sich jedoch signifikant von dem der Iper-6-naph-Inhibitionskurve.

	M2	M2 W422A
6-Phthal	6 ± 2 (3) ^{NS}	9 ± 5 (3) ^{NS}
6-Naph	22 ± 4 (5) ^{**}	32 ± 4 (3) [*]
Iper-6-phthal	5 ± 1 (4) [*]	1 ± 1 (3) ^{NS}
Iper-6-naph	28 ± 2 (3) ^{**###}	4 ± 1 (3) ^{NS,n.s.}

Tab. 34: Untere Plateaus der Interaktionskurven von 6-Phthal, 6-Naph, Iper-6-phthal und Iper-6-naph an M2- und M2 W422A-Rezeptoren auf intakten CHO-Zellen in % der spezifischen Gesamtbindung des Radioliganden. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler (n; Anzahl unabhängiger Experimente). Die Analyse der Messwerte erfolgte mit Hilfe von Gleichung 4. ^{}: Signifikant verschieden von Null (t-Test, ^{**} p < 0,01, 0,05). ^{NS}: Nicht signifikant verschieden von Null (t-Test, p > 0,05). ^{###}: Signifikant verschieden von der jeweiligen Iper-6-phthal-Kenngröße (t-Test, ^{###} p < 0,001). ^{n.s.}: Nicht signifikant verschieden von der jeweiligen Iper-6-phthal-Kenngröße (t-Test, p > 0,05)**

Aus welchem Grund ungeachtet dessen 6-Naph am M2-Rezeptor in der vorliegenden Arbeit eine negative Kooperativität aufwies, konnte nicht erklärt werden. Für weitere Betrachtungen wurden deshalb die Ergebnisse, die Bock et al. (2014) für 6-Naph ermittelt hatten, zugrunde gelegt (pK_{aktiv} -Wert $6,04 \pm 0,04$, $\alpha = 0,93 \pm 0,09$).

Sowohl die allosterischen Fragmente als auch die Hybridliganden erwiesen sich am M2 W422A-Rezeptor als negativ kooperativ (Tab. 33). Greift man auf die Beobachtung von Bock et al. (2014) zurück, kehrt sich somit durch die Mutation Trp 7.35→Ala das Kooperativitätsverhalten der Substanz 6-Naph von positiv zu negativ um. Analog dazu beobachteten Jäger et al. (2007) eine Umkehrung im kooperativen Verhalten von Naphmethonium, der Muttersubstanz von 6-Naph, und [³H]NMS

zwischen dem M2-Rezeptor und der M2 W422A-Mutante: während Naphmethonium die Bindung des Radioliganden am M2-Wildtyprezeptor förderte, wurde sie an der M2 W422A-Mutante gehemmt.

Um eine Aussage darüber machen zu können, in welchem Verhältnis die Hybridliganden einen dualsterischen bzw. allosterischen Bindungsmodus einnehmen, können die jeweiligen Affinitätswerte nach Gleichung 14 in Beziehung gesetzt werden. Im Falle von Iper-6-naph am M2-Wildtyprezeptor wurde die von Bock et al. (2014) ermittelte Affinität des Bausteins 6-Naph ($pK_{\text{inaktiv}} = 6,04 \pm 0,04$) für die Affinität des Hybridliganden im allosterischen Bindungsmodus angenommen. Dies führte zu einer Affinität im dualsterischen Bindungsmodus von $pK_{\text{aktiv}} = 6,79 \pm 0,03$.

Für Iper-6-phthal und Iper-6-naph am M2-Rezeptor wurden Verhältnisse *dualsterische Bindung vs. allosterische Bindung* von 63% vs. 37% bzw. 85% vs. 15% erhalten. Damit lagen die ermittelten Werte im Größenordnungsbereich von zuvor erhobenen Daten (Iper-6-phthal: 77% zu 23%; Iper-6-naph: 80% zu 20%; Bock et al., 2014). Lag also Iper-6-phthal am M2-Wildtyprezeptor zu 63% dualsterisch vor, erhöhte sich dieser Anteil am punktmultierten Rezeptor auf 88% bei gleichzeitigem Anteil rein allosterischer Bindung von 12%. Ebenso stieg der Anteil dualsterischer Bindung von Iper-6-naph von 85% am Wildtyprezeptor auf 94% an der M2 W422A-Mutante.

Der Anteil des dualsterischen Bindungsmodus` der Hybridliganden Iper-6-phthal und Iper-6-naph wurde durch die Mutation Trp 7.35→Ala im M2-Rezeptor erhöht.

4.1.4.6 Affinität von 6-Phthal, 6-Naph, Iper-6-phthal und Iper-6-naph am muskarinischen M3-Rezeptor unter Berücksichtigung des Einflusses von Trp 7.35

Im Folgenden sollte untersucht werden, wie sich die Mutation 7.35 am muskarinischen M3-Rezeptor auf die Affinität der allosterischen Fragmente sowie der Hybridliganden auswirkte. Ferner wurden die Verhältnisse der Bindungsmodi der dualsterischen Substanzen ermittelt.

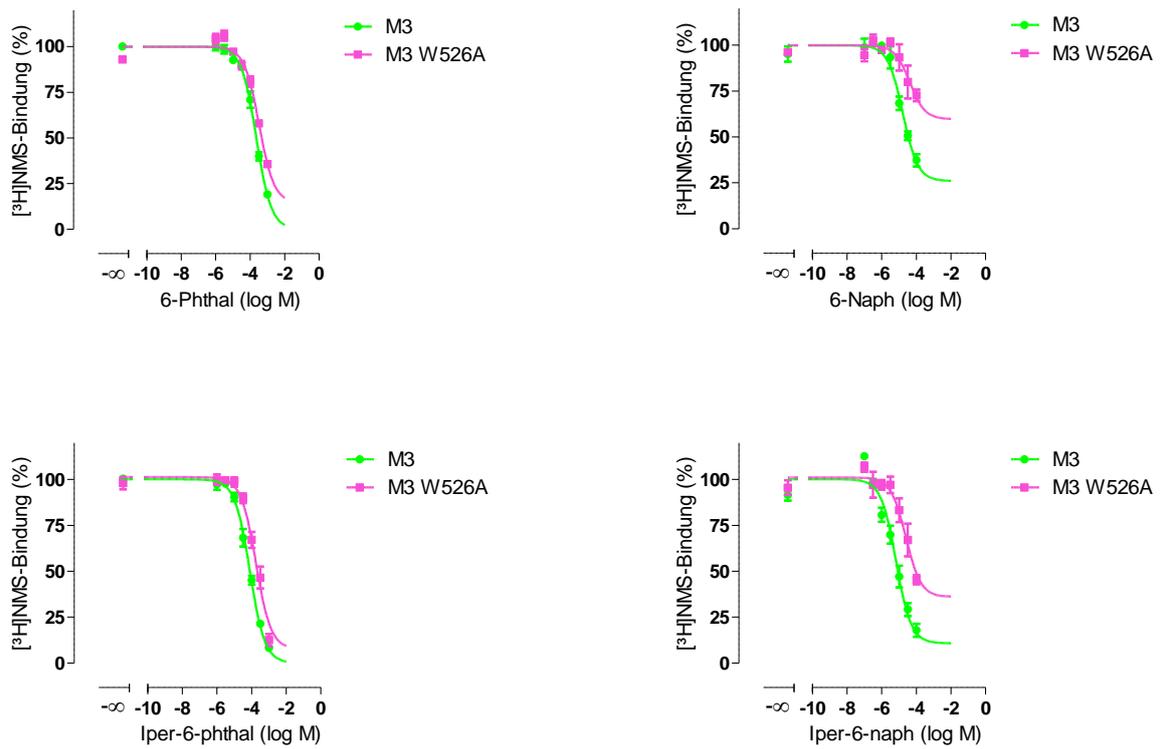


Abb. 18: $[^3\text{H}]$ NMS-Interaktionsexperimente unter Gleichgewichtsbedingungen mit 6-Phthal, 6-Naph, Iper-6-phthal und Iper-6-naph an intakten CHO-M3- und CHO-M3 W526A-Zellen. Es wurde Puffer (L19) verwendet. Die Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Die Datenanpassung erfolgte durch Gleichung 12 für die allosterischen Modulatoren und durch Gleichung 13 für die Hybridliganden. Ordinate: Spezifische Gesamtbindung des Radioliganden in Prozent. 100% entspricht dem jeweiligen oberen Plateau der Kurve. 0% entspricht der unspezifischen Bindung. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Ligandkonzentration

		M3	M3 W526A	Δ Wt-Mut
6-Phthal	$pK_{\text{inaktiv}} \pm \text{S.E.M.}$	$3,92 \pm 0,04$	$3,73 \pm 0,08^{\text{NS}}$	0,19
	$\alpha \pm \text{S.E.M.}$	> 1000	12 ± 7	
6-Naph	$pK_{\text{inaktiv}} \pm \text{S.E.M.}$	$5,00 \pm 0,10$	$4,52 \pm 0,33^{\text{NS}}$	0,48
	$\alpha \pm \text{S.E.M.}$	6 ± 2	$2 \pm 0,8$	
Iper-6-phthal	$pK_{\text{inaktiv}} \pm \text{S.E.M.}$	$3,92 \pm 0,04$	$3,73 \pm 0,08^{\text{NS}}$	0,19
	$pK_{\text{aktiv}} \pm \text{S.E.M.}$	$4,20 \pm 0,05$	$3,69 \pm 0,10^{**}$	
Iper-6-naph	$pK_{\text{inaktiv}} \pm \text{S.E.M.}$	$5,00 \pm 0,10$	$4,52 \pm 0,33^{\text{NS}}$	0,48
	$pK_{\text{aktiv}} \pm \text{S.E.M.}$	$5,22 \pm 0,10$	$4,49 \pm 0,11^{**}$	

Tab. 35: Bindungscharakteristika von 6-Phthal, 6-Naph, Iper-6-phthal und Iper-6-naph an M3- und M3 W526A-Rezeptoren auf intakten CHO-Zellen. Es wurde Puffer (L19) verwendet. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Die Datenanalyse für die allosterischen Modulatoren erfolgte mit Hilfe von Gleichung 12, die der Hybridliganden mit Hilfe von Gleichung 13. pK_{inaktiv} ist die Affinität des allosterischen Fragmentes und wurde mit der des Hybridliganden im rein allosterischen Bindungsmodus gleichgesetzt. pK_{aktiv} ist die Affinität des Hybridliganden im dualsterischen Bindungsmodus. α ist der Kooperativitätsfaktor für die Interaktion der allosterischen Modulatoren mit dem orthosterischen Liganden [^3H]NMS. **: Signifikanter Unterschied zum Wert des M3-Wildtyprezeptors (t-Test, ** $p < 0,01$). NS: Nicht signifikant verschieden vom Wert des M3-Wildtyprezeptors (t-Test, $p > 0,05$)

Das Epitop Trp 7.35 im muskarinischen M3-Rezeptor war für die Bindung der dualsterischen Liganden Iper-6-phthal und Iper-6-naph affinitätsgebend. Im Gegensatz dazu erwies es sich nicht an der Bindung der allosterischen Fragmente 6-Phthal und 6-Naph beteiligt. In dieser Hinsicht unterschieden sich M3- von M2- Rezeptoren, bei denen die Mutation Trp 7.35→Ala zu einem Affinitätsabfall beider Substanzen geführt hatte (Tab. 33, Kapitel 4.1.4.5). Für W84 als Muttersubstanz von 6-Phthal konnte in den Kapiteln 4.1.4.4 und 8.2.4 beobachtet werden, dass die Trp 7.35-Abhängigkeit im M3-Rezeptor deutlich geringer ausgeprägt war als an M2- und M4-Rezeptoren. Der Affinitätsabfall durch die Mutation entsprach bei M3-Rezeptoren 0,65 Dekaden, bei M2- und M4-Rezeptoren 1,52 bzw. 1,43 Dekaden.

Setzt man nun die Affinitäten der Hybridliganden im dualsterischen sowie im allosterischen Bindungsmodus nach Gleichung 14 in Beziehung, erhält man für Iper-6-phthal und Iper-6-naph am M3-Rezeptor ein Verhältnis von 67% zu 33% bzw. von 62% zu 38%. Am punktmultierten M3-Rezeptor wurde für beide Substanzen ein Verhältnis von 48% dualsterischer zu 52% allosterischer Bindung ermittelt.

Der Anteil des dualsterischen Bindungsmodus` der Hybridliganden Iper-6-phthal und Iper-6-naph wurde durch die Mutation Trp 7.35→Ala im M3-Rezeptor erniedrigt.

Ob die Reduktion des Anteils dualsterischer Bindung der Hybridliganden durch die Mutation Trp 7.35 zu Alanin im M3-Rezeptor auch Auswirkungen auf die Rezeptoraktivierung aufwies, wurde in den Kapiteln 4.4.4.5 und 4.5.3 untersucht.

4.2 Messung der G-Proteinaktivierung durch [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimente

Den ersten Schritt von G-Protein-abhängigen Transduktionsvorgängen muskarinischer Acetylcholinrezeptoren stellt der Austausch von GDP zu GTP an der α-Untereinheit von G-Proteinen dar. Die Detektion der agonistvermittelten Bindung des GTPase-stabilen GTP-Analogon [³⁵S]GTPγS erfasst diesen frühen Effekt der Signalkaskade und ermöglicht so eine prinzipiell für alle fünf Subtypen muskarinischer Rezeptoren anwendbare funktionelle Untersuchung. Ein Vorteil dieses Messsystems gegenüber „second messenger“- sowie DMR- Untersuchungen ist die minimale Signalamplifikation (Harrison und Traynor, 2003).

4.2.1 Optimierung der GDP-Konzentration für [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimente mit dem muskarinischen M3-Rezeptor

Milligan (2003) diskutierte die Möglichkeit, den [³⁵S]GTPγS-Bindungsversuch auf den M3-Rezeptor anzuwenden und stellte dabei Unterschiede in der Anwendbarkeit dieses Assays zwischen überwiegend Gi- und überwiegend Gq-koppelnden Rezeptoren heraus. Die Beobachtungen, dass der GDP-GTP-Austausch an Gi-Proteinen deutlich schneller vonstatten geht als an Gq- oder Gs-Proteinen sowie deren höheren Expressionsraten im Vergleich zu anderen G-Proteinen in den meisten Säugetierzellen (50 % der G- Proteine in CHO-Zellen sind Gi-Proteine (Milligan, 2003)), erklärten die gute Anwendbarkeit dieses Verfahrens für M2- und M4-Rezeptoren (Harrison und Traynor, 2003; Milligan, 2003; Bock et al., 2012). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass M3-vermittelte Effekte unter Umständen nicht erfassbar waren. Akam et al. (2001) und Odagaki et al. (2013) wendeten eine elegante Methode der Immunopräzipitation und Antikörper-gestützten Detektion an, um gezielt [³⁵S]GTPγS-gebundene Gαq-Proteine zu detektieren. Allerdings besteht auch die Möglichkeit der Optimierung einer für den zu untersuchenden Rezeptor adäquaten GDP-Konzentration im Versuchsansatz, um ein gutes Messfenster zu erhalten (Lazareno und Birdsall, 1993; Breivogel et al., 1998; DeLapp et al., 1999; Akam et al., 2001; Harrison und Traynor, 2003). GDP wurde eingesetzt, um die basale [³⁵S]GTPγS-Bindung an inaktive G-Proteine zu reduzieren, da es sich an die Nukleotidbindestellen anlagerte. Dadurch resultierte das Messsignal ausschließlich von einem durch die Aktivierung des Rezeptors hervorgerufenen, spezifischen Austausch von GDP zum nicht hydrolysierbaren, radioaktiven GTP-Analogon.

Im Folgenden wurden zur Optimierung des Signals durch M3-Rezeptoren die basale, sowie die Acetylcholin- und Pilocarpin-vermittelte M3-Aktivierung bei verschiedenen GDP-Konzentrationen verglichen (Abb. 19). Aufgrund der weit verbreiteten Anwendung von 10μM GDP für Experimente mit dem M2-Rezeptor (Akam et al., 2001; Kebig, Dissertationsschrift, 2010; Janßen, Dissertationsschrift, 2011) und einer zehnfach geringeren Konzentration für den M3-Rezeptor (Akam et al., 2001; Kellershohn, Dissertationsschrift, 2007), wurden diese beiden Konzentrationen im Hinblick auf die im Versuch erreichte Signalstärke getestet. Dabei wurde Pilocarpin mitgeführt, um auszuloten, ob auch noch ein partialagonistischer Effekt zu sehen sein würde. Die eingesetzten Konzentrationen der Agonisten lagen im oberen Niveau von deren Konzentrationswirkungskurven (Kapitel 4.2.3.1 und 8.3.1).

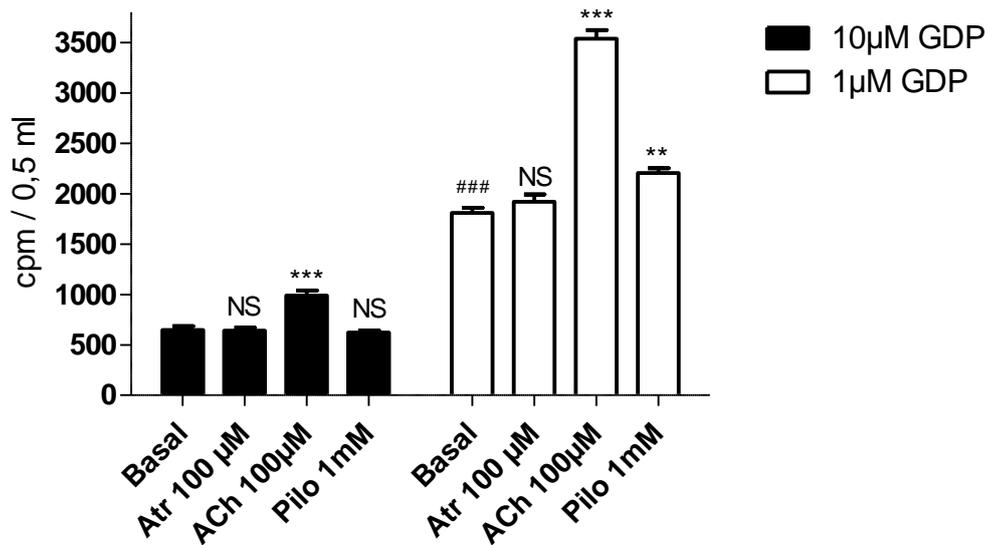


Abb. 19: Signalintensität im [³⁵S]GTPγS-Bindungsversuch an M3-CHO-Zellmembranhomogenaten in Abhängigkeit von der GDP-Konzentration. Die Werte sind Mittelwerte ± S.E.M. von drei unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung. Aufgeführt sind *counts per minute* (cpm, Zerfälle pro Minute) im Versuchsansatz (0,5ml) unter Basalbedingungen (Inkubationspuffer), Atropin (100μM), Acetylcholin (100μM) und Pilocarpin (1mM). ***: Signifikant verschieden vom jeweiligen Basalsignal (One-way ANOVA, Dunnett's post-Test, **** p < 0,001, 0,01). NS: Nicht signifikant verschieden vom jeweiligen Basalsignal (One-way ANOVA, Dunnett's post-Test, p > 0,05). ###: Signifikant verschieden vom Basalsignal mit 10μM GDP im Versuchsansatz (t-Test, ### p < 0,001)

Wie erwartet erhöhte sich durch den Einsatz einer geringeren Konzentration an GDP die basale [³⁵S]GTPγS-Bindung (Tab. 27), da vermehrt Bindungsstellen an den G-Proteinen durch den Radioliganden besetzt wurden. Zu vermerken war, dass durch den Einsatz des inversen Agonisten Atropin in keinem der Fälle eine Absenkung der basalen [³⁵S]GTPγS-Bindung zu beobachten war. Dies galt für alle im Rahmen in dieser Arbeit durchgeführten Versuche am M3-Rezeptor und der M3 W526A-Mutante in diesem Messsystem. Dadurch ließ sich auf eine fehlende konstitutive, Agonist-unabhängige Rezeptoraktivität dieses Subtyps und der punktmutierten Rezeptorvariante schließen, wodurch sie sich vom M2-Rezeptor unterschieden (Kebig, Dissertationsschrift, 2010; vorliegende Arbeit, Tab. 101, Seite 218).

Erhöhte sich durch den Einsatz von 100μM Acetylcholin das Signal im Vergleich zum Basalwert in beiden Fällen signifikant, vermochte 1mM Pilocarpin in Gegenwart von 10μM GDP keine detektierbare Radioligandbindung zu vermitteln. Bei der zehnfach niedrigeren GDP-Konzentration von 1μM öffnete sich ein Messfenster für den Partialagonisten.

Bei Testung einer breiteren Konzentrationsspanne von GDP (10μM, 3μM, 1μM, 0,3μM, 0,1μM, 0,03μM) (Tab. 36), vergrößerten sich die Messfenster immer stärker.

GDP-Konzentration		cpm / 0,5ml	Messfenster ($\Delta_{\text{Agonist-Basal}}$)
10 μM	Basal	648 \pm 38	-
	Atropin 100 μM	640 \pm 29	NS
	ACh 100 μM	989 \pm 51	341 ^{***}
	Pilocarpin 1mM	623 \pm 18	NS
3 μM	Basal	1328 \pm 95	-
	Atropin 100 μM	1339 \pm 87	NS
	ACh 100 μM	2350 \pm 267	1022 ^{**}
	Pilocarpin 1mM	1431 \pm 112	103 ^{NS}
1 μM	Basal	1811 \pm 50	-
	Atropin 100 μM	1920 \pm 74	NS
	ACh 100 μM	3537 \pm 86	1726 ^{***}
	Pilocarpin 1mM	2206 \pm 48	395 ^{**}
0,3 μM	Basal	2937 \pm 101	-
	Atropin 100 μM	3023 \pm 170	NS
	ACh 100 μM	5741 \pm 107	2804 ^{***}
	Pilocarpin 1mM	3762 \pm 56	825 ^{***}
0,1 μM	Basal	4624 \pm 178	-
	Atropin 100 μM	4656 \pm 213	NS
	ACh 100 μM	7692 \pm 169	3068 ^{***}
	Pilocarpin 1mM	5869 \pm 216	1245 ^{***}
0,03 μM	Basal	6926 \pm 344	-
	Atropin 100 μM	6928 \pm 277	NS
	ACh 100 μM	10247 \pm 273	3321 ^{***}
	Pilocarpin 1mM	8904 \pm 176	1978 ^{***}

Tab. 36: Signale im [³⁵S]GTP γ S-Bindungsversuch in Abhängigkeit der GDP-Konzentration am M3-Rezeptor. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung. cpm/0,5ml: Counts per minute (Zerfälle pro Minute) im Versuchsansatz (0,5ml). ^{***}: Signifikant verschieden vom jeweiligen Basalwert (One-way ANOVA, Dunnett's post-Test, ^{***}, ^{**} p < 0,001, 0,01). ^{NS}: Nicht signifikant verschieden vom jeweiligen Basalwert (One-way ANOVA, Dunnett's post-Test, p > 0,05)

Mit abnehmender GDP-Konzentration erhöhte sich sowohl das Basalniveau als auch das Agonist-vermittelte Messfenster. Letzterer Effekt wird damit erklärt, dass es auch in Anwesenheit eines Agonisten zur Konkurrenz zwischen GDP und [³⁵S]GTP γ S zur spezifischen Bindungsstelle kommen kann (Harrison und Traynor, 2003). 1 μM erwies sich als die höchste GDP-Konzentration, bei der noch ein messbarer, Partialagonist-vermittelter Effekt sichtbar war.

Um festzustellen, ob sich durch Variation der GDP-Konzentration der Wendepunkt als Ausdruck der Wirksamkeit eines Agonisten veränderte, wurden mit Einsatz von 10 μ M und 1 μ M GDP Konzentrations-Effekt-Kurven des Vollagonisten Iperoxo am M3-Rezeptor aufgenommen. Um zu prüfen, ob Vergleiche zu zuvor erhobenen Daten am M2-Rezeptor zulässig waren, wurde dieser Subtyp hier ebenfalls untersucht.

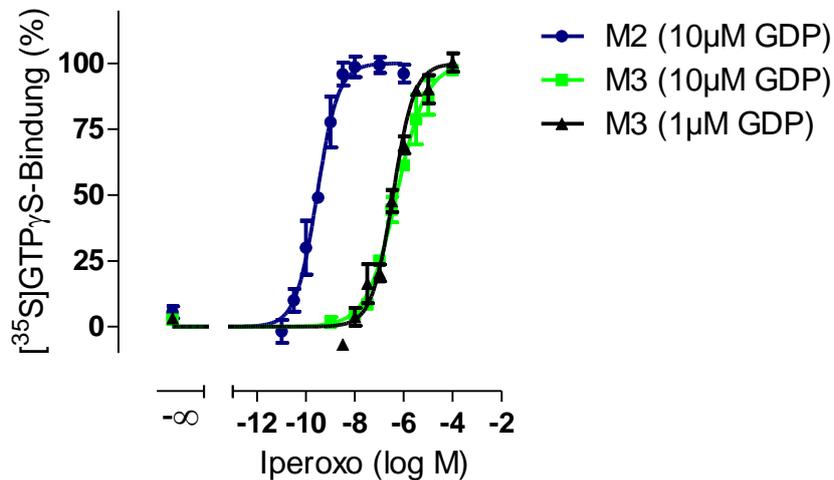


Abb. 20: Iperoxo-induzierte [35 S]GTP γ S-Bindung an M2- und M3-CHO-Zellmembranhomogenate bei den angegebenen GDP-Konzentrationen. Die Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei bis fünf unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Ordinate: Prozentuale [35 S]GTP γ S-Bindung. 0 % und 100 % entsprechen den jeweiligen unteren und oberen Plateaus der Konzentrations-Effekt-Kurven. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration

Aus Abb. 20 ging nicht hervor, dass die basale sowie die Agonist-vermittelte [35 S]GTP γ S-Bindung an den M2-Homogenaten höher lag als an den M3-Homogenaten. Bei Normierung auf das untere und obere Niveau der M2-Kurve begannen die M3-Kurven bei -102 % und erreichten bei maximaler Iperoxo-vermittelter Aktivierung -13%. Daran war abzulesen, dass der basale Guanylnukleotidaustausch in Membranen mit M2-Rezeptoren deutlich ausgeprägter war als in Membranen mit M3-Rezeptoren. Da das Basalsignal im erstgenannten Fall durch den Einsatz von Atropin signifikant reduziert werden konnte ($-97 \pm 10\%$ (3)), war von einer spontanen Aktivität des M2-Rezeptors auszugehen, wie sie schon von Kebig (Dissertationsschrift, 2010) und Janßen (Dissertationsschrift, 2011) beobachtet werden konnte.

Die hier ermittelte Wirksamkeit von Iperoxo wich nicht von zuvor erhobenen Daten ab (Bock et al., 2012; Kebig, Dissertationsschrift, 2010). Im Vergleich zum M2-Rezeptor war die Wirksamkeit von Iperoxo am M3-Rezeptor um den Faktor 1000 reduziert (Tab. 37). Dabei spielte es keine Rolle, ob 1 μ M oder 10 μ M GDP eingesetzt wurden. Bis auf die M3-Kurve, die mit 10 μ M GDP aufgenommen wurde (Hill-Koeffizient $0,71 \pm 0,06$), erwiesen sich die anderen Konzentrations-Effekt-Beziehungen als normal steil. Kellershohn (Dissertationsschrift, 2007) fand, dass die Wirksamkeit von Acetylcholin, die mit 1 μ M GDP am M3-Rezeptor ermittelt wurde ($pEC_{50} 5,88 \pm 0,03$), über der lag, die mit 10 μ M GDP aufgenommen wurde ($pEC_{50} 5,44 \pm 0,04$). Trotzdem wurde in der zitierten Arbeit für [35 S]GTP γ S-Versuche an M3-Zellmembranhomogenaten eine Konzentration von 1 μ M GDP eingehalten.

	GDP-Konzentration	n	n _H	pEC ₅₀
M2	10 μM	3	1,02 ± 0,12 ^{n.s.}	9,52 ± 0,04
M3	10 μM	3	0,71 ± 0,06 ⁺⁺⁺	6,28 ± 0,11 ^{***}
M3	1 μM	5	0,87 ± 0,08 ^{n.s.}	6,48 ± 0,09 ^{***,NS}

Tab. 37: Kenngrößen der Iperoxo-vermittelten [³⁵S]GTPγS-Bindungskurven durch M2- und M3-CHO-Zellmembranhomogenaten bei den angegebenen GDP-Konzentrationen. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler. n: Anzahl unabhängiger Experimente. n_H: Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus derjenigen Agonistkonzentration, die zu einem halbmaximalen Effekt führt. Die pEC₅₀-Werte an M2-Rezeptoren und M3-Rezeptoren in Gegenwart von 1μM GDP entspringen einer Kurvenanpassung mit einem Hillkoeffizienten von 1. ^{n.s.}: Nicht signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß n_H = 1 (F-Test, p > 0,05). ⁺⁺⁺: Signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß n_H = 1 (F-Test, p > 0,05). ^{***}: Signifikant verschieden vom Wert am M2-Rezeptor (1way ANOVA, Dunnett's post-Test, ^{***} p < 0,001). ^{NS}: Nicht signifikant verschieden vom Wert am M3-Rezeptor bei 10μM GDP (t-Test, p > 0,05)

Die Beobachtungen, dass sich durch Zusatz von 1μM GDP zu dem Versuchsansatz mit M3-CHO-Zellmembranhomogenaten ein Messfenster für den Partialagonisten Pilocarpin ergab und die Wirksamkeiten von Iperoxo bei 1μM und 10μM GDP nicht verschieden waren, führten zu dem Entschluss, dass bei [³⁵S]GTPγS-Versuchen am M3-Rezeptor der Zusatz von 1μM GDP eingehalten wurde.

4.2.2 An der Acetylcholin- und Iperoxo-induzierten [³⁵S]GTPγS-Bindung durch den muskarinischen M3-Rezeptor und die M3 Trp7.35→Ala-Mutante ist der Gi-Weg beteiligt

In welcher Form der für M3-Rezeptoren präferenzielle Gq-, aber auch sekundäre Signalwege wie der Gi- und Gs-Weg am Agonist-induzierten Signal des M3-Rezeptors im [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperiment beteiligt waren, sollte durch den Einsatz von Membranhomogenaten untersucht werden, die mit Pertussistoxin alleine oder einer Kombination dieser Substanz mit Cholera toxin vorbehandelt wurden. Unterschiede zu Signalen, die mit unvorbehandelten Membranhomogenaten aufgenommen wurden, sollten Rückschlüsse auf den jeweiligen Anteil des G-Proteins am Kontrollsignal zulassen.

Zunächst wurden Acetylcholin- und Iperoxo-Effekte anhand von Konzentrations-Effekt-Kurven unter verschiedenen Bedingungen der G-Protein-Kopplung verglichen (Abb. 21). Eingesetzt wurden ein Kontrollhomogenat ohne Vorbehandlung, ein PTX-Homogenat und ein PTX/CTX-Homogenat. Durch den Einsatz von PTX war die Kopplung der Rezeptoren zum Gi-Protein verhindert. CTX hob die GTPase-Aktivität der Gas-Untereinheit auf, wodurch es dauerhaft maximal stimuliert vorlag. Das [³⁵S]GTPγS konnte somit nicht mehr spezifisch binden, wodurch ein Gs-vermittelter Effekt maskiert war.

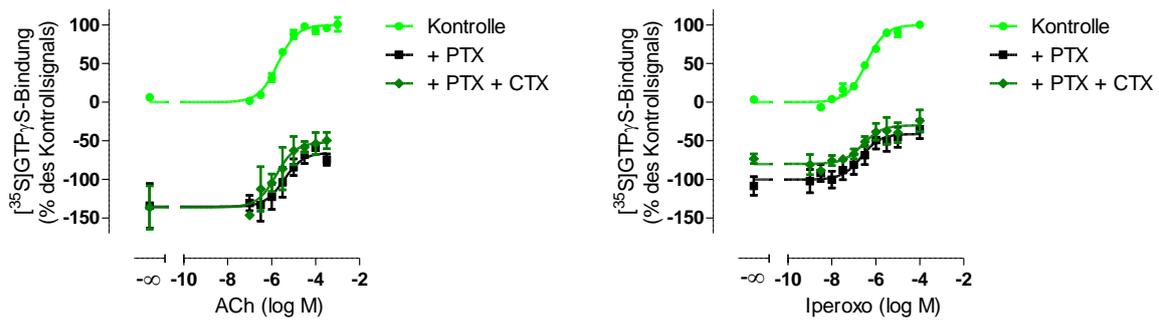


Abb. 21: Acetylcholin- und Iperoxo-vermittelte $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung an M3-CHO-Zellmembranhomogenaten ohne und mit Vorbehandlung von PTX bzw. PTX und CTX. Die Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus zwei bis zehn unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Ordinate: Prozentuale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung. 0 % und 100 % entsprechen dem unteren und oberen Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve des Kontrollhomogenates. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration

Die Kurven, die mit PTX-vorbehandelten M3-CHO-Zellmembranhomogenaten aufgenommen wurden, wiesen ein im Vergleich zu denen mit dem Kontrollmembranhomogenat reduziertes Niveau auf. Daran konnte eine starke Beteiligung des Gi-Weges an der basalen Aktivität und der Agonist-induzierten $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung des M3-Rezeptors aufgedeckt werden. Ein ähnliches Ergebnis beobachteten Burford et al. (1995a), die im Vergleich zu Kontrollbedingungen stark reduzierte Carbachol-signale mit PTX-vorbehandelten M3-Membranhomogenaten fanden. In Tab. 38 sind die Kenndaten der Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abb. 21 zusammengefasst.

		Kontrolle	+ PTX	+ PTX + CTX
Acetylcholin	n_H	$1,20 \pm 0,12^{n.s.}$	$1,24 \pm 0,27^{n.s.}$	$-0,81 \pm 0,52^{n.s.}$
	pEC_{50}	$5,71 \pm 0,05^{NS}$	$5,42 \pm 0,33^{NS}$	$5,78 \pm 0,32^{NS}$
	E_{min} (%)	0	$-135 \pm 8^*$	$-136 \pm 12^{\$,*}$
	E_{max} (%)	100	$-65 \pm 10^*$	$-52 \pm 9^{\$,*}$
		n	10	2
Iperoxo	n_H	$0,87 \pm 0,08^{n.s.}$	$0,77 \pm 0,20^{n.s.}$	$0,95 \pm 0,05^{n.s.}$
	pEC_{50}	$6,48 \pm 0,09^{NS}$	$6,65 \pm 0,30^{NS}$	$6,60 \pm 0,26^{NS}$
	E_{min} (%)	0	$-100 \pm 6^{***}$	$-80 \pm 4^{\$,**}$
	E_{max} (%)	100	$-41 \pm 7^{***}$	$-30 \pm 5^{\$,**}$
		n	5	8

Tab. 38: Kenngrößen der Acetylcholin- und Iperoxo-vermittelten [³⁵S]GTPγS-Bindungskurven an M3-CHO-Zellmembranhomogenaten ohne und mit Vorbehandlung durch PTX bzw. PTX und CTX. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler. n: Anzahl unabhängiger Experimente. n_H : Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. pEC_{50} : Negativer dekadischer Logarithmus derjenigen Agonistkonzentration, die zu einem halbmaximalen Effekt führt. E_{min} : Basale [³⁵S]GTPγS-Bindung, entsprechend dem unteren Niveau der Konzentrations-Effekt-Kurve, normiert auf die Kurve des Kontrollhomogenates. E_{max} : Maximale, Agonist-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung, entsprechend dem oberen Niveau der Konzentration-Effekt-Kurve, normiert auf die Kurve des Kontrollhomogenates. Die Kenngrößen pEC_{50} , E_{min} - und E_{max} -Wert entspringen einer Kurvenanpassung mit einem Hillkoeffizienten von 1. ^{n.s.}: Nicht signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß $n_H = 1$ (F-Test, $p > 0,05$). ^{NS}: Kein signifikanter Unterschied zwischen den Wirksamkeiten des jeweiligen Agonisten (One-way ANOVA, Bonferroni's post-Test, $p > 0,05$). [§]: Nicht signifikant verschieden vom E_{min} bzw. E_{max} -Wert des jeweiligen Agonisten am PTX-Homogenat (t-Test, $p > 0,05$). ^{***,**,*}: Signifikant verschieden vom E_{min} bzw. E_{max} -Wert des jeweiligen Agonisten am Kontrollhomogenat (t-Test, ^{***,**,*} $p < 0,001, 0,01, 0,05$)

	E_{min} (Iperoxo)	Atropin 100μM
Kontrolle	0 (5)	-7 ± 7 (8) ^{NS}
+ PTX	-100 ± 6 (8)	-95 ± 10 (8) ^{NS}
+ PTX + CTX	-80 ± 4 (3)	-75 ± 12 (3) ^{NS}

Tab. 39: Vergleich der basalen Niveaus der Konzentrations-Effekt-Kurven von Iperoxo (Tab. 38) mit der [³⁵S]GTPγS-Bindung unter dem Einfluss von 100μM Atropin an M3-CHO-Zellmembranhomogenaten ohne und mit Vorbehandlung durch PTX bzw. PTX und CTX. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler (n; Anzahl unabhängiger Experimente). ^{NS}: Nicht signifikant verschieden vom jeweiligen E_{min} -Wert (t-Test, $p > 0,05$)

Da durch den Einsatz von 100μM Atropin kein Einfluss auf die basale [³⁵S]GTPγS-Bindung des Kontroll- oder des PTX-Homogenates beobachtet werden konnte (Tab. 39), wurde gefolgert, dass das Toxin eine Rezeptor-unabhängig stattfindende, basale G-Protein-Aktivität verhinderte (Tab. 38). Alle Kurven ließen sich mit einem normalen Steilheitsmaß anpassen. Die Kenngrößen pEC_{50} , E_{min} - und E_{max} -Wert der Acetylcholin- und Iperoxo- vermittelten Aktivierung der Rezeptoren im PTX- und PTX/CTX-

Homogenat unterschieden sich nicht voneinander (Tab. 38). Es liegt daher der Schluss nahe, dass ausschließlich eine Gi- und Gq-Aktivierung am Kontrollsignal des M3-Rezeptors an der agonistvermittelten [³⁵S]GTPγS-Bindung beteiligt war. Interessanterweise wurden die Wirksamkeiten (pEC₅₀-Werte) der getesteten Agonisten Acetylcholin und Iperoxo nicht durch den Einsatz von PTX oder der Kombination aus PTX und CTX beeinflusst. Die Werte stehen in gutem Einklang mit zuvor erhobenen Daten (Lazareno und Birdsall, 1993; Kellershohn, Dissertationsschrift, 2007). In den Versuchen mit dem unvorbehandelten M3-CHO-Zellmembranhomogenaten zeigte sich Iperoxo als deutlich potenterer Agonist als Acetylcholin, denn sein pEC₅₀-Wert (Tab. 38) erwies sich als höher (t-Test, *** p < 0,001).

Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass nach Ausschaltung des Gi-Proteins ein nahezu reines Gq-Signal resultierte. Aufgrund des hohen Verbrauchs von G-Proteinmodulatoren bei Vorbehandlung von Zellen für eine Membranpräparation und der begrenzten Verfügbarkeit konnte dies nicht durch den Einsatz des Gq-Inhibitors QIC verifiziert werden. Aus demselben Grund wurde darauf verzichtet, ein Membranhomogenat aus PTX- und CTX-vorbehandelten CHO-M3 W526A-Zellen herzustellen. Um einen Einblick in die Rolle des Trp 7.35 für die Aktivierung des Gq-Weges zu erlangen, wurde ein unvorbehandeltes Kontrollhomogenat von CHO-M3 W526A-Zellen mit einem nach PTX-Vorbehandlung hergestellten Homogenat in Bezug auf die Aktivierbarkeit durch Acetylcholin und Iperoxo im [³⁵S]GTPγS-Bindungsversuch verglichen.

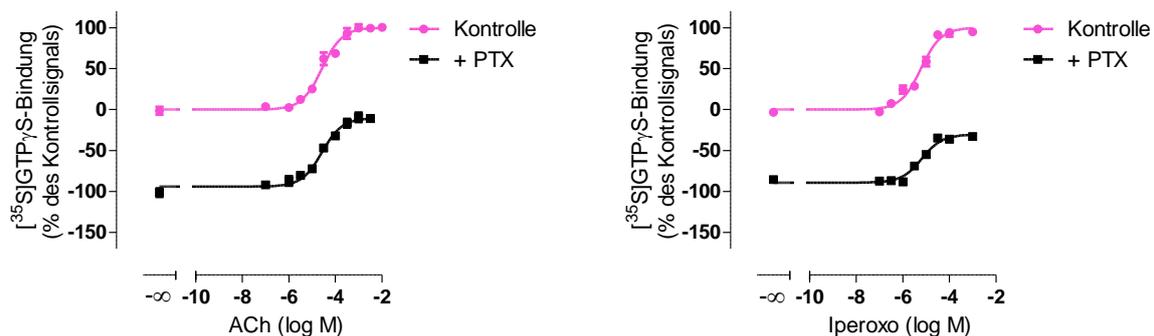


Abb. 22: Acetylcholin- und Iperoxo-vermittelte [³⁵S]GTPγS-Bindung an M3 W526A-CHO-Zellmembranhomogenaten ohne und mit Vorbehandlung von PTX. Die Datenpunkte sind Mittelwerte ± Standardfehler aus einem (Iperoxokurve des PTX-vorbehandelten Homogenates) bis vier unabhängigen Experimenten Dreifachbestimmung. Ordinate: Prozentuale [³⁵S]GTPγS-Bindung. 0 % und 100 % entsprechen dem unteren und oberen Plateau der Konzentration-Effekt-Kurve des Kontrollhomogenates. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration

Wie bei der Darstellung, die mit M3-Wildtyp-Homogenaten aufgenommen wurde (Abb. 21), reduzierte die Anwesenheit von PTX die basale Aktivität sowie die agonistvermittelte G-Protein-Aktivierung in M3 W526A-Homogenaten (Abb. 22). Es ist zu beachten, dass die Messung mit Iperoxo am PTX-vorbehandelten M3 W526A-Homogenat auf Grund seiner begrenzten Verfügbarkeit nur einmalig durchgeführt werden konnte. Es zeigte sich jedoch das gleiche Resultat wie bei den Messungen mit Acetylcholin. Tab. 40 fasst die Kenngrößen der Konzentrations-Effekt-Beziehungen aus Abb. 22 zusammen.

		Kontrolle	+ PTX
Acetylcholin	n_H	$0,92 \pm 0,09^{n.s.}$	$0,77 \pm 0,12^{n.s.}$
	pEC_{50}	$4,58 \pm 0,05$	$4,58 \pm 0,08^{NS}$
	E_{min} (%)	0	$-94 \pm 2^{***}$
	E_{max} (%)	100	$-10 \pm 3^{***}$
	n	3	3
Iperoxo	n_H	$0,98 \pm 0,11^{n.s.}$	$1,43 \pm 0,33^{n.s.}$
	pEC_{50}	$5,22 \pm 0,05$	$5,18 \pm 0,12$
	E_{min} (%)	0	-89 ± 2
	E_{max} (%)	100	-31 ± 3
	n	4	1

Tab. 40: Kenngrößen der Acetylcholin- und Iperoxo-vermittelten [³⁵S]GTPγS-Bindungskurven an M3 W526A-CHO-Zellmembranhomogenaten ohne und mit Vorbehandlung durch PTX. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler. n: Anzahl unabhängiger Experimente. n_H : Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. pEC_{50} : Negativer dekadischer Logarithmus derjenigen Agonistkonzentration, die zu einem halbmaximalen Effekt führt. E_{min} : Basale [³⁵S]GTPγS-Bindung, entsprechend dem unteren Niveau der Konzentrations-Effekt-Kurve, normiert auf die Kurve des Kontrollhomogenates. E_{max} : Maximale, agonistinduzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung, entsprechend dem oberen Niveau der Konzentrations-Effekt-Kurve, normiert auf die Kurve des Kontrollhomogenates. Die Kenngrößen pEC_{50} , E_{min} - und E_{max} -Wert entspringen einer Kurvenanpassung mit einem Hillkoeffizienten von 1. ^{n.s.}: Nicht signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß $n_H = 1$ (F-Test, $p > 0,05$). ^{NS}: Nicht signifikant verschieden zum Wert des Kontrollhomogenates (t-Test, $p > 0,05$). ^{***}: Signifikant verschieden vom E_{min} bzw. E_{max} -Wert des Kontrollhomogenates (t-Test, ^{***} $p < 0,001$)

Alle Kurven konnten mit einer normalen Steilheit angepasst werden. Wie bei M3-Rezeptoren veränderte der Einsatz von PTX in M3 W526A-Zellmembranhomogenaten nicht die Wirksamkeit der Agonisten Acetylcholin und Iperoxo.

Wie für den Wildtyprezeptor konnte für die M3 W526A-Mutante geschlussfolgert werden, dass es zur Signalfortleitung durch Gq- und Gi-Proteine kam.

Auf den Einfluss der Mutation auf die Rezeptoraktivierung wird in dem nun folgenden Kapitel 4.2.3 eingegangen.

4.2.3 Iperoxo und Acetylcholin induzieren eine [³⁵S]GTPγS-Bindung an M3-Rezeptoren, Iper-6-phthal nicht

Wie schon in Kapitel 4.2.2 erwähnt, war es wegen der begrenzten Verfügbarkeit an den G-Proteinmodulatoren QIC, PTX und CTX nicht möglich, umfangreich entsprechend vorbehandelte Homogenate in [³⁵S]GTPγS-Bindungsversuchen einzusetzen. Wie aber die Ergebnisse zeigten, entsprachen die Wirksamkeiten von Acetylcholin und Iperoxo unter Kontrollbedingungen an beiden zu testenden Rezeptoren denen nach PTX-Vorbehandlung, also nach Ausschaltung des Gi-Weges. Da für den M3-Rezeptor eine Gs-Beteiligung an der agonistvermittelten [³⁵S]GTPγS-Bindung vernachlässigt werden konnte (Abb. 21 und Tab. 38) und sich die Wirksamkeiten der Agonisten nicht

durch das Ausschalten des Gi-Weges veränderten (Tab. 38 und Tab. 40), wurden die in den Kapiteln 4.2.3.1 und 4.2.3.2 an Kontrollhomogenaten ermittelten Wirksamkeiten einer überwiegend durch Gq-Proteine ausgelösten Rezeptoraktivierung zugeordnet. Bei der Interpretation der E_{\max} -Werte als Ausdruck der intrinsischen Aktivität musste von der Beteiligung sowohl von Gq- als auch von Gi-Effekten ausgegangen werden. Die nun folgenden Experimente zielten darauf ab, den Einfluss der Mutation Trp 7.35→Ala auf die [35 S]GTP γ S-Bindung durch M3-Rezeptoren zu untersuchen.

4.2.3.1 Iperoxo ist ein Superagonist an M3- sowie an M3 W526A- Rezeptoren in [35 S]GTP γ S-Bindungsexperimenten

Schrage et al. (2013) charakterisierten Iperoxo als Superagonist am muskarinischen M2-Rezeptor. Die Autoren stellten die dem Acetylcholin als endogenen Vollagonisten überlegene Affinität, Wirksamkeit und Kopplungseffizienz dar. Sowohl in [35 S]GTP γ S-Bindungsversuchen als auch in DMR-Experimenten unterschieden sich die E_{\max} -Werte der Konzentrations-Effekt-Kurven nicht zwischen den beiden Liganden (Schrage et al., 2013).

Es sollte getestet werden, inwieweit sich die Acetylcholin- von der Iperoxo-vermittelten [35 S]GTP γ S-Bindung an M3-Rezeptoren unterschied und welchen Einfluss Trp 7.35 auf das Geschehen der Rezeptoraktivierung entfaltete (Abb. 23). Jäger et al. (2007) und Janßen (Dissertationsschrift, 2011) charakterisierten Trp 7.35 als ein an der Aktivierung muskarinischer M2- und M4-Rezeptoren beteiligtes Epitop. Es wurde der Frage nachgegangen, ob die Rolle des Trp 7.35 zwischen den Subtypen auf funktioneller Ebene konserviert war.

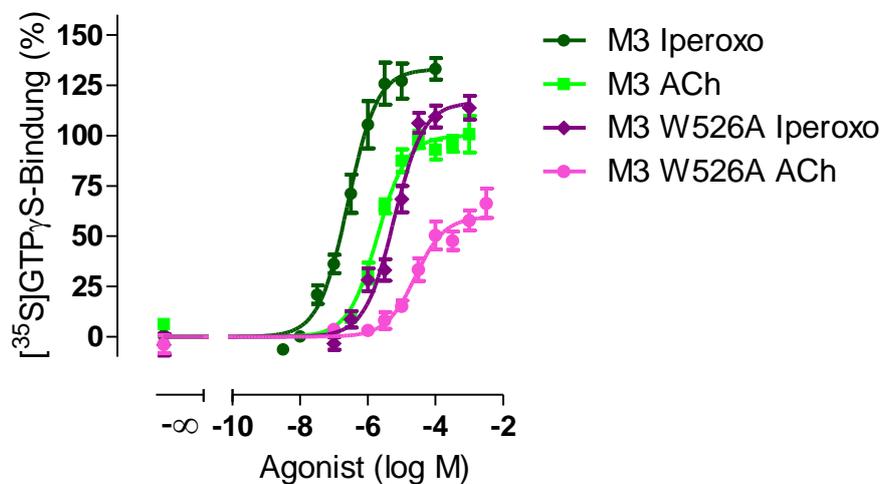


Abb. 23: Acetylcholin- und Iperoxo-vermittelte [35 S]GTP γ S-Bindung an M3- und M3 W526A-CHO-Zellmembranhomogenaten. Die Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus vier bis zwölf unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Ordinate: Prozentuale [35 S]GTP γ S-Bindung. 0 % entspricht den jeweiligen unteren Plateaus der Konzentrations-Effekt-Kurven, 100 % entspricht dem oberen Plateau der Acetylcholincurve des M3-Rezeptors. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration

Die Konzentrationseffektkurven von Iperoxo und Acetylcholin im [35 S]GTP γ S-Bindungsversuch mit M3- und M3 W526A-Membranhomogenaten wiesen jeweils normale Steilheiten auf (Tab. 41). Die Betrachtungen von Iperoxo am M3-Wildtyprezeptor entspringen einer anderen Messreihe als die, welche in Kapitel 4.2.2 dargestellt wurde. Am M3-Rezeptor zeigte Iperoxo eine im Vergleich zu Acetylcholin höhere Wirksamkeit und einen höheren E_{\max} -Wert. Am punktmultierten M3-Rezeptor war dies ebenfalls zu beobachten (Tab. 41). Im direkten Vergleich der Kennwerte beider Agonisten

am M3-Wildtyprezeptor und der M3 W526A-Mutante konnte beobachtet werden, dass die Wirksamkeiten (pEC_{50} -Werte) und die E_{max} -Werte jeweils durch die Mutation Trp 7.35→Ala reduziert wurden (Tab. 41).

		M3	M3 W526A
Acetylcholin	η_H	$1,20 \pm 0,12^{n.s.}$	$0,89 \pm 0,20^{n.s.}$
	pEC_{50}	$5,71 \pm 0,05$	$4,59 \pm 0,11^{***}$
	E_{max} (%)	100	$60 \pm 3^{***}$
	n	10	7
Iperoxo	η_H	$0,97 \pm 0,15^{n.s.}$	$0,97 \pm 0,14^{n.s.}$
	pEC_{50}	$6,58 \pm 0,07^{+++}$	$5,22 \pm 0,07^{***,++}$
	E_{max} (%)	$133 \pm 4^{+++}$	$117 \pm 4^{*,+++}$
	n	12	4

Tab. 41: Kenngrößen der Acetylcholin- und Iperoxo-vermittelten [35 S]GTP γ S- Bindungskurven an M3- und M3 W526A-CHO-Zellmembranhomogenaten. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler. n: Anzahl unabhängiger Experimente. η_H : Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. pEC_{50} : Negativer dekadischer Logarithmus derjenigen Agonistkonzentration, die zu einem halbmaximalen Effekt führt. E_{max} : Maximale, agonistinduzierte [35 S]GTP γ S-Bindung, entsprechend dem oberen Niveau der Konzentrations-Effekt-Kurve. 100 % entspricht der maximalen, durch Acetylcholin ausgelösten Aktivierung des M3-Rezeptors. Die Kenngrößen pEC_{50} , E_{min} - und E_{max} -Wert entsprechen einer Kurvenanpassung mit einem Hillkoeffizienten von 1. $n.s.$: Nicht signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß $\eta_H = 1$ (F-Test, $p > 0,05$). $***$: Signifikant verschieden vom jeweiligen Wert des Wildtyprezeptors (t-Test, $***$, $p < 0,001$, 0,05). $+++$, $++$: Signifikant verschieden vom jeweiligen Wert nach Acetylcholinstimulation (t-Test, $+++$, $++$, $p < 0,001$, 0,01)

Anhand der Parameter Wirksamkeit und E_{max} -Wert erwies sich Iperoxo an beiden Rezeptoren als der stärkere Agonist im Vergleich zu Acetylcholin.

An M2- und M4-Rezeptoren wiesen beide Agonisten ein nicht signifikant verschiedenes oberes Niveau auf (Kebig, Dissertationsschrift, 2010; Janßen, Dissertationschrift, 2011; Schrage et al., 2013). Vermutlich spielte dabei eine höhere Rezeptorreserve eine Rolle (Putney et al., 1980; Stahl et al., 2011). Dies bedeutet, dass im Falle der M2- und M4-Aktivierung durch Acetylcholin möglicherweise mehr Rezeptoren zur Verfügung standen, als für eine maximale [35 S]GTP γ S-Bindung nötig war. Die sich von diesen Ergebnissen unterscheidende Beobachtung an M3-Rezeptoren, dass das Maximum der Iperoxokurve höher war als das der Acetylcholinkurve (Tab. 41), spiegelte mit großer Wahrscheinlichkeit wider, dass die beiden geradzahligen Rezeptoren eine andere G-Proteinkopplungsprävalenz als der M3-Rezeptor zeigen und dieser Assay -wie bereits erwähnt- deshalb unterschiedlich gut auf die verschiedenen muskarinischen Subtypen anzuwenden ist.

Zur Überprüfung, ob Iperoxo auch kopplungseffizienter als Acetylcholin war, wurde das *operational model of agonism* (Black und Leff, 1983) angewendet und der Kopplungsparameter $\log \tau$ ermittelt. Dabei diente Iperoxo in beiden Zelllinien als Referenzagonist, dessen oberes Plateau dazu auf 100 % normiert wurde.

log τ [³⁵ S]GTP γ S \pm S.E.M. (n)		
	Iperoxo	ACh
M3	1,67 \pm 0,07 (12)	0,50 \pm 0,01 (10)***
M3 W526A	1,46 \pm 0,11 (4)	0,02 \pm 0,01 (7)***

Tab. 42: Kopplungsparameter log τ von Iperoxo und Acetylcholin auf Grundlage von [³⁵S]GTP γ S-Bindungsuntersuchungen an M3- und M3 W526A-CHO-Zellmembranhomogenaten. Die Normierung der zugrunde gelegten Konzentrations-Effekt-Kurven erfolgte jeweils auf die Aktivierung durch Iperoxo. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler. n: Anzahl unabhängiger Experimente. ***: Signifikanter Unterschied zum jeweiligen Iperoxowert (t-Test, *** p < 0,001)

Wie schon an den Kenngrößen Wirksamkeit und Emax-Wert konnte auch für den Parameter Kopplungseffizienz beobachtet werden, dass Iperoxo bei der Aktivierung des M3-Wildtyprezeptors und der M3 W526A-Mutante dem Acetylcholin überlegen war.

Auf Basis dieser Daten und denen aus Kapitel 4.1.4.1.1 bzw. 4.1.4.1.2 konnte gezeigt werden, dass Iperoxo am muskarinischen M3-Rezeptor affiner und potenter sowie kopplungseffizienter war als der endogene Agonist Acetylcholin. Somit wurde angenommen, dass Iperoxo ein Superagonist am M3-Rezeptor ist, wie es für den M2-Rezeptor ebenfalls beschrieben worden ist (Schrage et al., 2013). Diese Eigenschaft wurde durch die Mutation des für die Rezeptoraktivierung wichtigen Epitops Trp 7.35 nicht verändert.

Da der [³⁵S]GTP γ S-Bindungsversuch nicht die alleinige Detektion eines einzelnen G-Proteinsignalweges des M3-Rezeptors ermöglichte (Kapitel 4.2.2), wird später gezeigt werden, dass der Superagonismus von Iperoxo anhand eines die Gq-Aktivierung als präferenziellen Weg des M3-Rezeptors abgreifenden IP1-Assays bestätigt werden kann (Kapitel 4.4.4.2).

Durch die Mutation wurden die Wirksamkeit und der Emax-Wert beider Agonisten im Vergleich zum Wildtyprezeptor reduziert. Augenscheinlich stellte sich das Trp 7.35 hier als ein an der Aktivierung des muskarinischen M3-Rezeptors beteiligtes Epitop dar. Jäger et al. (2007) und Janßen (Dissertationsschrift, 2011) schlussfolgerten letzteres auch für den M2- und den M4-Rezeptor auf Basis des [³⁵S]GTP γ S-Versuchs. Allerdings wiesen wie in vorangegangenen Arbeiten (Antony, Dissertationsschrift, 2007; Kebig, Dissertationsschrift, 2010; Janßen, Dissertationsschrift, 2011) die Membranhomogenate der punktmultierten Rezeptoren eine geringere Rezeptorexpression auf als die der Wildtyprezeptoren. Die Kenngrößen aller in der vorliegenden Arbeit verwendeten Homogenate wurden in Kapitel 8.1 aufgeführt. Durchschnittlich lag die Expression der Wildtyprezeptoren doppelt so hoch wie die der punktmultierten Rezeptoren. Diese Experimente wurden mit einem M3-CHO-Zellmembranhomogenat durchgeführt, das eine Rezeptorexpression von 2755 \pm 260 Femtomol pro Milligramm [fmol/mg] Protein aufwies. Das M3 W526A-CHO-Zellmembranhomogenat exprimierte 1294 \pm 193 fmol/mg. Damit unterschied sich die Expression der Wildtyprezeptoren um den Faktor 2,13 von der der Punktmutante. Das Expressionsniveau beeinflusst pharmakologische Kenngrößen aus funktionellen Experimenten wie Wirksamkeit und intrinsische Aktivität (Stahl et al., 2011; Katzung et al., 2012). Dadurch sind diese Parameter zwischen dem M3-Wildtyprezeptor und der M3 W526A-Mutante bei den hier dargestellten Experimenten nicht vergleichbar.

Die Kopplungseffizienz τ (Black und Leff, 1983), die als Maß für die Rezeptoraktivierung herangezogen werden kann, lässt sich um einen Faktor korrigieren, der das unterschiedliche

Expressionsniveau zweier Zelllinien ausgleicht (Gregory et al., 2010; Keov et al., 2014). Zur Berücksichtigung der Tatsache, dass der Wildtyp eine gegenüber der punktmultierten Rezeptorvariante um den Faktor 2,13 höhere Expression zeigte, wurde zur Korrektur der durch die Analyse erhaltene Kopplungseffizienz τ der Mutantendaten folgende Gleichung angewendet:

$$\log \tau_{\text{korr}} = \log \tau + \log 2,13$$

(Gleichung 18). Zeigte die M3 W526A-Mutante gegenüber dem Wildtyp reduzierte Wirksamkeiten und Emax-Werte, war nicht auszuschließen, dass dieser Unterschied ausschließlich durch das geringere Expressionsniveau zutage trat (Katzung et al., 2012). Deshalb wurden nun die korrigierten $\log \tau$ -Werte als Ausdruck der intrinsischen Aktivität (Keov et al., 2014) von Acetylcholin und Iperoxo, die an der M3 W526A-Mutante ermittelt wurden, mit denen des Wildtyps verglichen.

$\log \tau [{}^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S} \pm \text{S.E.M. (n)}$		
	M3	M3 W526A _{korr}
Iperoxo	1,67 ± 0,07 (12)	1,79 ± 0,11 (4) ^{NS}
Acetylcholin	0,50 ± 0,01 (10)	0,35 ± 0,01 (7) ^{***}

Tab. 43: Kopplungsparameter $\log \tau$ von Iperoxo und Acetylcholin auf Grundlage von [³⁵S]GTP γ S-Bindungsuntersuchungen an M3- und M3 W526A-CHO-Zellmembranhomogenaten. Die Normierung der zugrunde gelegten Konzentration-Effekt-Kurven erfolgte jeweils auf die Aktivierung durch Iperoxo. Die Daten sind Mittelwerte ± Standardfehler. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Der Zusatz „korr“ bezeichnet die Transformation des Kopplungsparameters $\log \tau$ durch den Expressionskorrekturfaktor $\log 2,13$ zu $\log \tau_{\text{korr}}$. ***: Signifikanter Unterschied zum entsprechenden Wert des M3-Wildtyprezeptors (t-Test, *** p < 0,001, 0,05). NS: Nicht signifikant verschieden vom entsprechenden Wert des M3-Wildtyprezeptors (t-Test, NS p > 0,05)

Während sich der korrigierte $\log \tau$ -Wert von Iperoxo an der Mutante nicht vom $\log \tau$ -Wert von Iperoxo des Wildtyps unterschied, reduzierte sich die Kopplungseffizienz von Acetylcholin durch die Punktmutation signifikant. Damit lag die Schlussfolgerung nahe, dass in Bezug auf die Acetylcholin-vermittelte [³⁵S]GTP γ S-Bindung als Maß für die Rezeptoraktivierung Trp 7.35 ein für den M3-Rezeptor bedeutendes Epitop ist.

Anhand von IP1-Messungen sollte dies ebenfalls untersucht werden (Kapitel 4.4.4.2).

4.2.3.2 Iper-6-phthal induziert keine [³⁵S]GTP γ S-Bindung an M3- und M3 W526A-Rezeptoren

Kellershohn (Dissertationsschrift, 2007) untersuchte die Aktivierbarkeit des M3-Rezeptors in CHO-Zellmembranhomogenaten im [³⁵S]GTP γ S-Assay durch die Hybridsubstanzen Iper-6-phthal und Iper-6-naph. Während durch Iper-6-phthal keine Aktivierbarkeit festzustellen war, konnte durch Iper-6-naph ein Emax-Wert von 20 ± 1 % normiert auf eine Acetylcholin-Kurve ermittelt werden. Da es ein Ziel dieser Arbeit war, die Aktivierbarkeit des M3-Rezeptors durch diese Hybridverbindungen unter Berücksichtigung von Trp 7.35 zu untersuchen, sollte getestet werden, ob die Mutante M3 W526A in der Lage war, eine durch Iper-6-phthal induzierte [³⁵S]GTP γ S-Bindung zu vermitteln (Abb. 24).

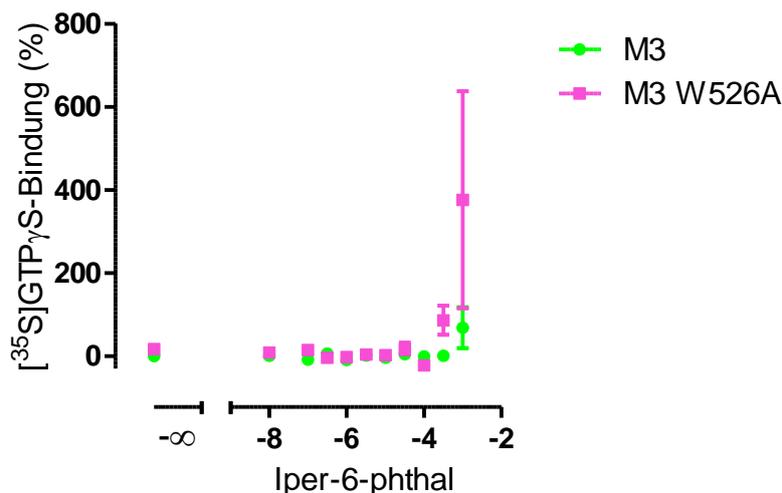


Abb. 24: Einsatz verschiedener Konzentrationen von Iper-6-phthal in einem [³⁵S]GTPγS-Bindungsversuch mit M3- und M3 W526A-CHO-Zellmembranhomogenaten. Die Datenpunkte sind Mittelwerte ± Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Ordinate: Prozentuale [³⁵S]GTPγS-Bindung. 0 % entspricht der jeweiligen basalen [³⁵S]GTPγS-Bindung, 100 % ist das obere Plateau der Acetylcholincurve des jeweiligen Rezeptors. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration

Keine der eingesetzten Iper-6-phthal-Konzentrationen induzierte eine vom Basalniveau verschiedene prozentuale [³⁵S]GTPγS-Bindung (t-Test, $p > 0,05$). Anhand der Messergebnisse war klar ersichtlich, dass keine spezifische Aktivierbarkeit des M3-Rezeptors sowie der M3 W526A-Mutante durch Iper-6-phthal zu detektieren war. Ob die Hybrids substanz grundsätzlich nicht in der Lage war, eine intrinsische Rezeptoraktivität an diesem Subtyp hervorzurufen, oder ob sie zu wenige oder keine Gi-vermittelten Effekte am M3-Rezeptor induzierte (siehe dazu Kapitel 4.2.2), sollte anhand von DMR-, IP1- und cAMP-Messungen geklärt werden (Kapitel 4.3.5, 4.3.6, 4.4.4.5 und 4.5.3).

4.3 Messung der dynamischen Massenumverteilung (DMR)

Stabil mit dem humanen muskarinischen M3-Rezeptor transfizierte CHO-Zellen waren hinsichtlich der Agonist-induzierten dynamischen Massenumverteilung von Schröder et al. (2010) sowie von Janßen (Dissertation, 2011) untersucht worden. Bei zuletzt genannter Autorin waren ebenfalls die M3-induzierten Zellantworten durch Oxotremorin M, Iperoxo, Iper-6-phthal, Iper-6-naph, McN-A-343 und Pilocarpin untersucht worden. Seemann (Dissertation, 2012) testete die Oxotremorin M-induzierte Zellantwort in diesem Messsystem an CHO-M3-Zellen. Neben dem primären Gq-vermittelten Signal konnte auch die Aktivierung von Gi-Proteinen detektiert werden. Für eine supramaximale Konzentration von 100µM Acetylcholin konnten Schröder et al. (2010) und Janßen (Dissertationschrift, 2011) letztere jedoch erst nach Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels beobachten, während Seemann in Ihrer Dissertationschrift dies mit 100µM Oxotremorin M auch unter Kontrollbedingungen fand.

Zunächst wurden die G-Proteinsignalwege des in dieser Arbeit verwendeten CHO-Zell-Einzelklones des muskarinischen M3-Rezeptors sowie der M3 W526A-Mutante sukzessive inhibiert bzw. maskiert, um aufzudecken, welchen Einfluss einzelne Signalwege auf die Iperoxo-vermittelte Ganzzellantwort in diesem Messsystem ausübten. Dabei wurden Iperoxo-induzierte Effekte in CHO-Zellen, die mit G-Proteinmodulatoren vorbehandelt worden waren, mit denen ohne Vorbehandlung („Kontrollbedingungen“) verglichen.

In erster Linie sollte aufgeklärt werden, ob die Hybridliganden Iper-6-phthal und Iper-6-naph in der Lage waren, den M3-Rezeptor zu aktivieren und welchen potentiellen Einfluss dabei Trp 7.35 ausübte. Durch die Kombination von G-Proteinmodulatoren sollte der Versuch unternommen werden, Ganzzellantworten einzelner Signalwege zu detektieren.

4.3.1 Die in DMR-Experimenten verwendeten CHO-M3-Zellen exprimieren weniger Rezeptoren als CHO-M3 W526A-Zellen

Da pharmakologische Kenngrößen wie die intrinsische Aktivität und die Wirksamkeit von Agonisten vom Expressionsniveau des untersuchten Rezeptors abhängen (Stahl et al., 2011; Katzung et al., 2012), ist es für Aussagen über den Einfluss des Epitops Trp 7.35 auf die agonistvermittelte Aktivierung wichtig, das Ausmaß der jeweiligen Expression zu kennen. Dazu wurden homologe Konkurrenzexperimente an lebenden CHO-Zellen, die den jeweiligen Rezeptor exprimierten, durchgeführt und der Bmax-Wert ermittelt.

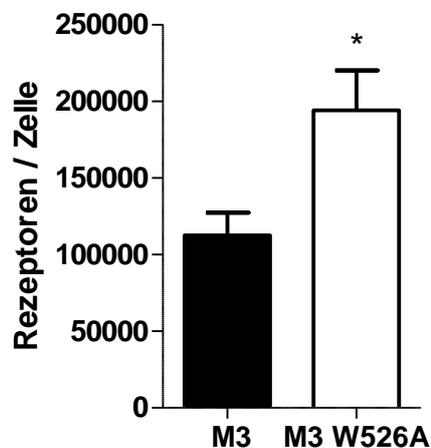


Abb. 25: Rezeptorexpressionsniveau der in DMR-Messungen verwendeten Zelllinien CHO-M3 und CHO-M3 W526A. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler von vier unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung. *: Signifikant verschieden vom Wert des Wildtyprezeptors (t-Test, $p < 0,05$)

Die Expressionsniveaus der verwendeten Zelllinien unterschieden sich signifikant voneinander (112603 ± 14599 versus 194014 ± 26137 Rezeptoren pro Zelle für den M3-Rezeptor bzw. die M3 W526A-Mutante). Damit wies der M3-Wildtyp ca. 58 % der Expression vom punktmutierten Rezeptor auf (Korrekturfaktor 0,58).

4.3.2 Am Iperoxo-induzierten DMR-Signal in CHO-M3-Zellen sind Gq-, Gs-, Gi- und G2/13-vermittelte Effekte beteiligt

Im Folgenden ist der Einfluss von G-Protein-Modulatoren auf die Iperoxo-induzierte Ganzzellantwort von M3-Rezeptoren tragenden CHO-Zellen dargestellt. Eine Iperoxokonzentration von $10\mu\text{M}$ lag im oberen Plateau ihrer Konzentrationseffektkurve (Janßen, Dissertationsschrift, 2011). QIC inhibiert den Gq- und PTX den Gi-Weg, während CTX den Gs-Weg maskiert.

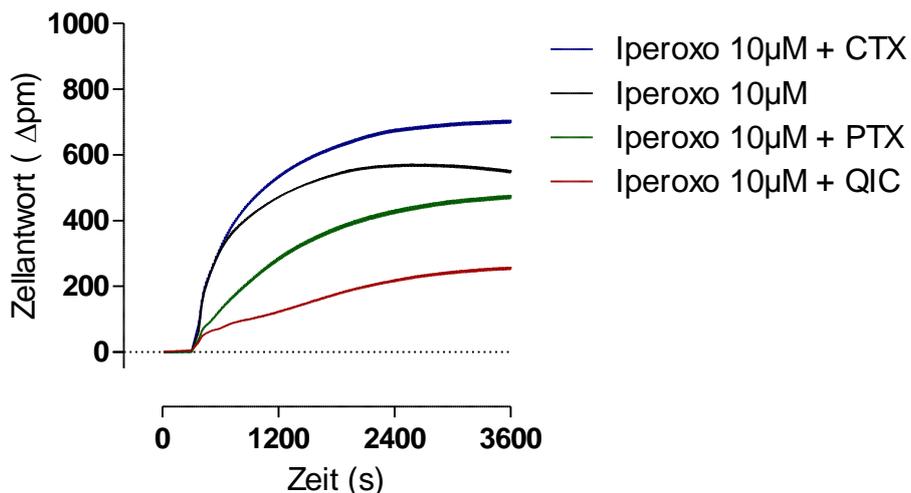


Abb. 26: Iperoxo-induzierte dynamische Massenumverteilung an CHO-M3-Zellen unter Kontrollbedingungen und nach Vorbehandlung mit G-Protein-Modulatoren. Dargestellt sind repräsentative, baselinien-korrigierte Originalsignaturen. Die Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardfehler einer Doppelbestimmung. Ordinate: Wellenlängenverschiebung in Picometern. Abszisse: Zeit in Sekunden

In CHO-Zellen führte die Aktivierung des M3-Rezeptors zu einem positiv gerichteten DMR-Signal, das zunächst kontinuierlich seinem Maximum entgegenstrebte. Dieses Bild steht in gutem Einklang mit zuvor erhobenen Signaturen (Schröder et al., 2010). Der Einsatz von PTX und QIC führte zu einer signifikanten Verringerung des Messsignals, während es unter CTX-Vorbehandlung vergrößert wurde (Tab. 44).

	Iperoxo 10μM	+ QIC	+ PTX	+CTX
Emax (%)	100	37 \pm 2 ^{***}	82 \pm 2 ^{***}	125 \pm 6 ^{***}
n	17	11	13	11

Tab. 44: Maximale Iperoxo-induzierte dynamische Massenumverteilung an CHO-M3-Zellen. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler. Emax: Maximale Zellantwort, normiert auf den Wert unter Kontrollbedingungen. n: Anzahl unabhängiger Experimente. ^{***}: Signifikant verschieden von der Zellantwort unter Kontrollbedingungen, (One-way ANOVA, Dunnett's post-Test, ^{***} p < 0,001)

An CHO-M2-Zellen konnte ein in den negativen Bereich unterhalb der Nulllinie weisendes DMR-Signal der Aktivierung stimulatorischer G-Proteine zugeordnet werden, da die Signatur des G-Protein-unabhängigen Adenylatzyclase-Stimulators Forskolin in diesem Messsystem ebenfalls negative Werte annimmt (Kebig et al., 2009). Auch für CHO-M3-Zellen konnte dies erwartungsgemäß gezeigt werden (Abb. 27).

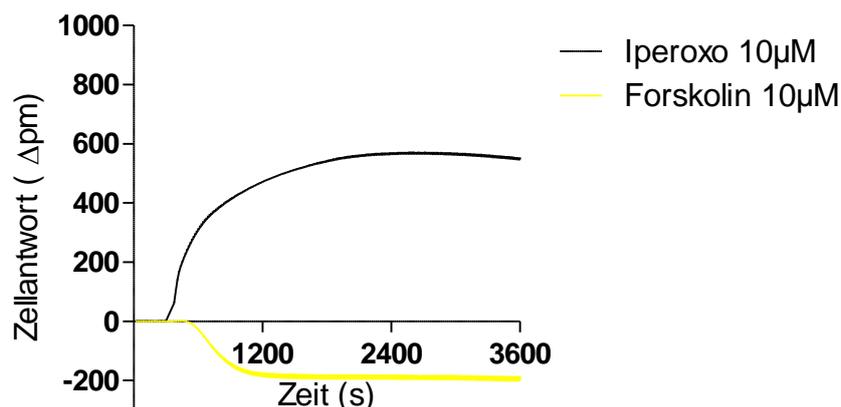


Abb. 27: Iperoxo- und Forskolin- induzierte dynamische Massenumverteilung an CHO-M3-Zellen. Dargestellt sind repräsentative, baselinien-korrigierte Originalsignaturen. Die Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardfehler einer Doppel- und einer Dreifachbestimmung. Ordinate: Wellenlängenverschiebung in Picometern. Abszisse: Zeit in Sekunden

Es ist daher wahrscheinlich, dass sich durch das Wegfallen einer Komponente der Ganzzellantwort, die negative Werte annimmt, das Agonistsignal erhöht. Somit wurde angenommen, dass der Zugewinn an Signalintensität nach CTX-Vorbehandlung dem Gs-Weg zugeordnet werden konnte.

Die Sensitivität des Iperoxosignals auf alle drei G-Protein-Modulatoren führte zu der Annahme, dass sowohl Gq- als auch Gs- und Gi-abhängige Signaltransduktionsvorgänge an der Ganzzellantwort des M3-Rezeptors beteiligt sind. In Bezug auf die PTX-Sensitivität stand dieses Ergebnis im Gegensatz zu zuvor erhobenen Daten (Schröder et al., 2010), die einen direkten Einfluss von PTX auf die Acetylcholin-induzierte Ganzzellantwort nicht beobachten konnten. Die Fähigkeit des M3-Rezeptors, Gq- und Gs-Proteine zu aktivieren, wird durch funktionelle Experimente, welche die Generierung klassischer sekundärer Botenstoffe detektieren, in den Kapiteln 4.4 und 4.5 näher charakterisiert werden.

Um den Beitrag einzelner G-Protein-abhängiger Signalwege an der Ganzzellantwort darzustellen, wurden nun die Modulatoren kombiniert.

Einsatz von Toxinen	PTX und CTX	QIC und PTX	QIC und CTX	QIC, PTX und CTX
Ausgeschaltete / maskierte G-Proteine	Gi und Gs	Gq und Gi	Gq und Gs	Gq, Gi und Gs
Funktionelle G-Proteine	Gq G12/13	Gs G12/13	Gi G12/13	G12/13

Tab. 45: Auswirkung der Kombination von G-Proteinmodulatoren auf die agonistvermittelte Ganzzellantwort in DMR-Experimenten.

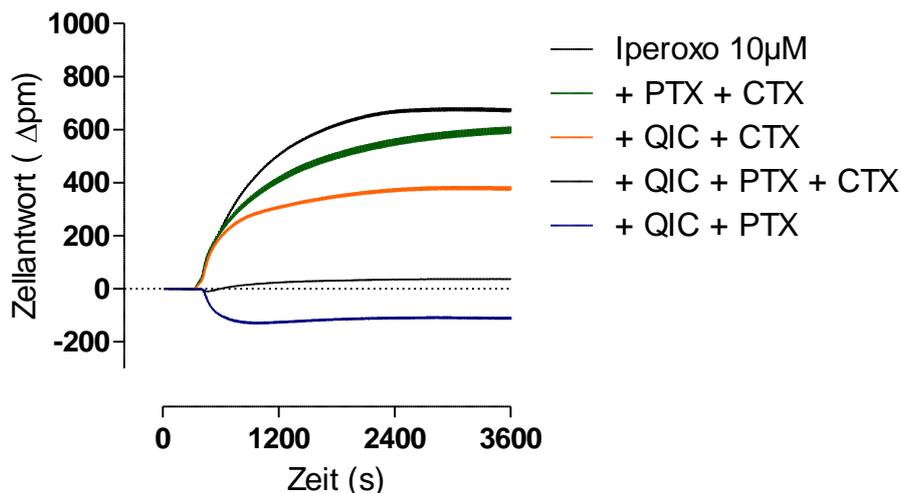


Abb. 28: Iperoxo-induzierte dynamische Massenumverteilung an CHO-M3-Zellen unter Kontrollbedingungen und nach Vorbehandlung mit G-Protein-Modulatoren. Dargestellt sind repräsentative, baselinien-korrigierte Originalsignaturen. Die Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardfehler in Doppel- oder Dreifachbestimmung. Ordinate: Wellenlängenverschiebung in Picometern. Abszisse: Zeit in Sekunden

Im Falle der Ausschaltung des Gi- und der Maskierung des Gs-Weges reduzierte sich das Iperoxosignal um 21%, während die Ausschaltung des Gq- und die Maskierung des Gs-Weges zu einem um 35% verminderten Signal führte (Tab. 46).

	Iperoxo 10 μ M	+ PTX + CTX	+ QIC + CTX	+ QIC + PTX	+ QIC + PTX + CTX
Emax (%)	100	79 \pm 4 ^{***}	65 \pm 4 ^{***}	-32 \pm 4 ^{***}	8 \pm 3 ^{***,#}
n	18	12	13	15	8

Tab. 46: Maximale Iperoxo-induzierte dynamische Massenumverteilung an CHO-M3-Zellen unter dem Einfluss der genannten G-Protein-Modulatoren. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler. Emax: Maximale Zellantwort, normiert auf den Wert unter Kontrollbedingungen. n: Anzahl unabhängiger Experimente. ^{***}: Signifikant verschieden von der Zellantwort unter Kontrollbedingungen, (One-way ANOVA, Dunnett's post-Test, ^{***} p < 0,001). [#]: Signifikant verschieden von Null, (t-Test, p < 0,05)

Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, dass am Iperoxosignal des M3-Rezeptors besonders Gq- und daneben Gi-vermittelte Effekte beteiligt sind.

Unter Inhibition des Gq- und des Gi- Weges mit QIC und PTX konnte ein negatives DMR-Signal detektiert werden. In Anlehnung an die Beobachtungen aus Abb. 26 und Abb. 27 konnte dieses Signal der Ganzzellantwort durch Gs-abhängige Effekte zugeordnet werden.

Interessanterweise blieb nach Ausschaltung bzw. Maskierung der erwähnten drei G-Protein-Signalwege ein Restsignal von 8 % übrig, das sich signifikant vom Basalwert unterschied. Dabei wurde ein Einstichproben-t-Test verwendet, der den Mittelwert des Restsignals gegen „0%“ testete. In Kapitel 8.4.1 wurde gezeigt, dass sich dieses Signal auch im Zweistichproben-t-Test vom Basalwert unterschied.

Um zu testen, ob es sich bei dem Signal um eine G-Protein-vermittelte Ganzzellantwort handelte, wurden die Zellen neben den drei G-Proteinmodulatoren mit dem Pan-G-Aktivator Aluminiumfluorid

vorstimuliert (Abb. 29). Die Substanz bindet irreversibel das an der α -Untereinheit des G-Proteins gebundene GDP und imitiert einen dritten, γ -ständigen Phosphatrest dergestalt, dass es zur Abdissoziation der α -Untereinheit kommt. Die Bindung des Aluminiumfluorids führt zu einer Daueraktivierung der $G\alpha$ -Untereinheit, da es aufgrund der starken Elektronegativität des Fluorids nicht hydrolysiert werden kann (Li, 2003). Die Vorstimulation mit Aluminiumfluorid hat zur Folge, dass eine agonistvermittelte G-Protein-abhängige Ganzzellantwort nicht mehr detektierbar ist.

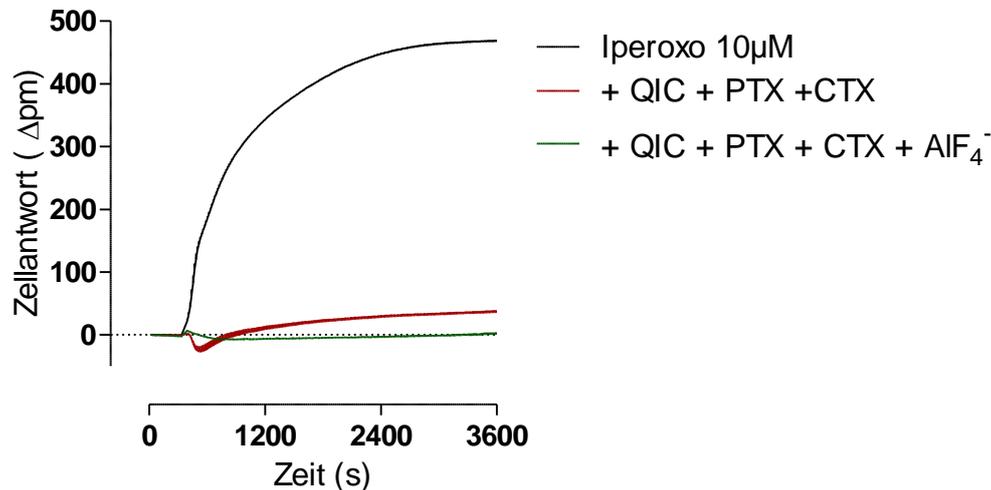


Abb. 29: Iperoxo-induzierte dynamische Massenumverteilung an CHO-M3-Zellen unter Kontrollbedingungen und nach Vorbehandlung mit G-Protein-Modulatoren. Dargestellt sind repräsentative, basislinien-korrigierte Originalsignaturen. Die Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardfehler in Doppel- oder Dreifachbestimmung. Ordinate: Wellenlängenverschiebung in Picometern. Abszisse: Zeit in Sekunden

Durch Zugabe von Iperoxo konnte nach maximaler Aktivierung sämtlicher G-Proteine keine detektierbare dynamische Massenumverteilung beobachtet werden.

	Iperoxo 10 μ M	+ QIC + PTX + CTX	+ QIC + PTX + CTX + AlF ₄ ⁻
Emax (%)	100	8 \pm 3 ^{***, #}	2 \pm 3 ^{***, NS, n.s.}
n	18	8	7

Tab. 47: Maximale Iperoxo-induzierte dynamische Massenumverteilung an CHO-M3-Zellen unter dem Einfluss der genannten G-Protein-Modulatoren. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler. Emax: Maximale Zellantwort, normiert auf den Wert unter Kontrollbedingungen. n: Anzahl unabhängiger Experimente. ^{***}: Signifikant verschieden von der Zellantwort unter Kontrollbedingungen, (One-way ANOVA, Dunnett's post-Test, ^{***} p < 0,001). [#]: Signifikant verschieden von Null, (t-Test, p < 0,05). ^{NS}: Nicht signifikant verschieden von Null, (t-Test, p > 0,05). ^{n.s.}: Nicht signifikant verschieden vom Iperoxo-induzierten Signal nach Vorbehandlung mit QIC, PTX und CTX, (t-Test, p > 0,05)

Das Iperoxosignal nach Inaktivierung bzw. Maskierung von Gq-, Gi- und Gs-Proteinen unterschied sich nicht signifikant von dem mit zusätzlicher Aktivierung sämtlicher noch funktioneller G-Proteine. Allerdings war letzteres im Gegensatz zu ersterem nicht signifikant verschieden vom Basalwert (Tab. 47). Somit konnte vermutet werden, dass das verbliebene Signal nach Inaktivierung bzw. Maskierung des Gq-, Gi- und Gs-Weges ebenfalls G-Protein-vermittelt war. Analog zu den Befunden für den GPR55-Rezeptor, der von Schröder et al. (2010) untersucht wurde, konnte es sich bei dem

beschriebenen Iperoxo-induzierten Signal des muskarinischen M3-Rezeptors um die Ganzzellantwort nach Aktivierung von G12/13-Proteinen handeln. Dies wurde in Kapitel 5.6 näher diskutiert.

Da nach Aktivierung sämtlicher G-Proteine in CHO-M3-Zellen keine iperoxovermittelte dynamische Massenumverteilung messbar war, konnten G-Protein-unabhängige Komponenten an der Ganzzellantwort in diesem Messsystem nicht detektiert werden.

Anhand des Einflusses der G-Protein-Modulatoren auf Konzentrations-Effekt-Beziehungen sollte nun der Versuch unternommen werden, Unterschiede in der Wirksamkeit von Iperoxo nach Inhibition bzw. Maskierung einzelner G-Protein-Signalwege zu detektieren.

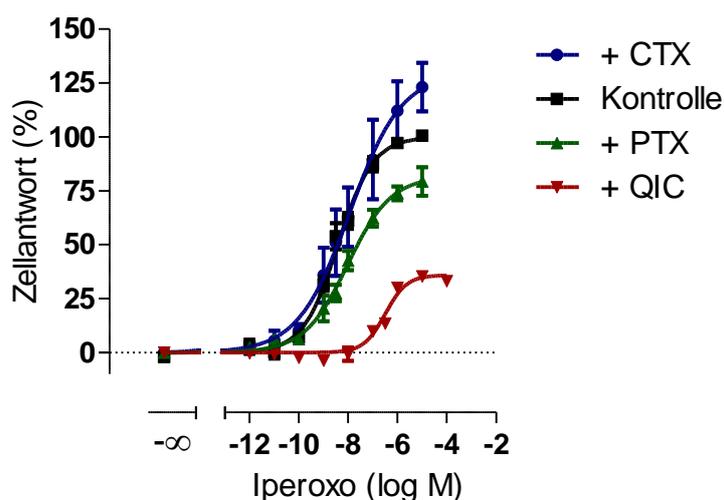


Abb. 30: Iperoxo-induzierte dynamische Massenumverteilung an CHO-M3-Zellen unter Kontrollbedingungen und nach Vorbehandlung mit G-Protein-Modulatoren. Die Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Experimenten in Doppel- oder Dreifachbestimmung. Ordinate: Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht den jeweiligen unteren Plateaus der Konzentrations-Effekt-Kurven, 100 % ist das obere Plateau der Kurve unter Kontrollbedingungen. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration.

	Kontrolle	+ QIC	+ PTX	+CTX
Emax (%)	100	36 \pm 1 ^{***}	75 \pm 1 ^{NS,++}	130 \pm 12 [*]
pEC ₅₀	8,36 \pm 0,11	6,55 \pm 0,15 ^{***}	8,05 \pm 0,21 ^{NS}	7,91 \pm 0,52 ^{NS}
η_H	0,61 \pm 0,04 [#]	1,18 \pm 0,23 ^{n.s.}	0,49 \pm 0,07 [#]	0,41 \pm 0,13 [#]
n	5	3	4	3

Tab. 48: Kenngrößen der Iperoxo-induzierten dynamischen Massenumverteilung an CHO-M3-Zellen unter dem Einfluss der genannten G-Protein-Modulatoren. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler. Emax: Maximale Zellantwort, normiert auf den Wert unter Kontrollbedingungen. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus derjenigen Agonistkonzentration, die zu einer halbmaximalen Zellantwort führt. Im Falle der Vorbehandlung mit QIC entspringen die Kenngrößen pEC₅₀ und Emax-Wert einer Kurvenanpassung mit einem Hillkoeffizienten von 1. η_H : Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. n: Anzahl unabhängiger Experimente. ^{***}: Signifikant verschieden vom jeweiligen Wert unter Kontrollbedingungen (One-way ANOVA, Dunnett's post-Test, ^{***}, * p < 0,001, 0,05). ^{NS}: Nicht signifikant verschieden vom Wert unter Kontrollbedingungen (One-way ANOVA, Dunnett's post-Test). ⁺⁺: Signifikant verschieden von 100 % (t-Test, ⁺⁺ p < 0,01). [#]: Signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß $\eta_H = 1$ (F-Test, p < 0,05). ^{n.s.}: Nicht signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß $\eta_H = 1$ (F-Test, p > 0,05)

Die Wirksamkeit und die flache Kurvensteilheit von Iperoxo unter Kontrollbedingungen standen in gutem Einklang mit Daten aus der Dissertation von Janßen (2011) (pEC_{50} : $8,54 \pm 0,15$; n_H : $0,60 \pm 0,16$). Die oberen Plateaus der Kurven spiegelten das Ergebnis aus Abb. 26 (Seite 112) wider; der Einsatz des Gq-Inhibitors QIC führte zu einer stärkeren Reduktion der intrinsischen Aktivität als der Einfluss des Gi-Inhibitors PTX. Eine Vorstimulation mit CTX führte wiederum zu einer Erhöhung des Signals unter Kontrollbedingungen. Die pEC_{50} -Werte von Iperoxo unter dem Einfluss von PTX und CTX unterschieden sich nicht signifikant von derjenigen ohne Vorbehandlung, während einzig die Inhibition des Gq-Weges zu einer Reduktion der Wirksamkeit von Iperoxo um annähernd den Faktor 100 führte. Außer im zuletzt genannten Fall ließen sich die Kurven signifikant besser mit einer freilaufenden, flacheren Steilheit beschreiben. Seemann konnte an PTX-vorbehandelten CHO-M3-Zellen eine mit einer flachen Kurvensteilheit angepasste Oxotremorin M-Kurve in diesem Messsystem aufnehmen, deren Wendepunkt sich ebenfalls nicht von dem unter Kontrollbedingungen unterschied (Seemann, Dissertationsschrift, 2012).

Durch die Kombination der G-Proteinmodulatoren sollte nun der Einfluss einzelner G-Protein-vermittelter Komponenten auf die Wirksamkeit von Iperoxo ermittelt werden.

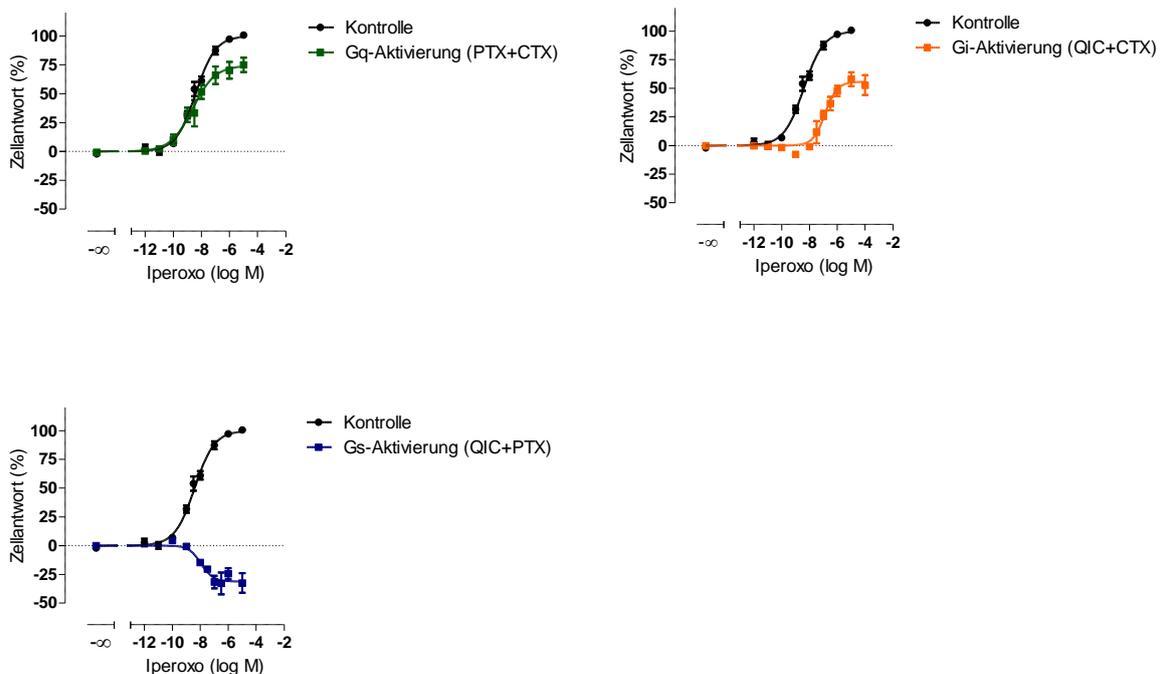


Abb. 31: Iperoxo-induzierte dynamische Massenumverteilung an CHO-M3-Zellen unter Kontrollbedingungen und nach Vorbehandlung mit G-Protein-Modulatoren. Die Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Experimenten in Doppel- oder Dreifachbestimmung. Ordinate: Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht den jeweiligen unteren Plateaus der Konzentrations-Effekt-Kurven, 100 % ist das obere Plateau der Kurve unter Kontrollbedingungen. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration

	Kontrolle	+ PTX + CTX	+ QIC + PTX	+ QIC + CTX
Emax (%)	100	72 ± 7 [*]	-36 ± 10 ^{***}	60 ± 7 ^{***}
pEC ₅₀	8,36 ± 0,11	8,89 ± 0,10 [*]	8,10 ± 0,07 ^{NS}	6,80 ± 0,16 ^{***}
n _H	0,61 ± 0,04 [#]	0,55 ± 0,11 [#]	-1,67 ± 2,24 ^{n.s.}	1,01 ± 0,25 ^{n.s.}
n	5	4	3	6

Tab. 49: Kenngrößen der Iperoxo-induzierten dynamischen Massenumverteilung an CHO-M3-Zellen unter dem Einfluss der genannten G-Protein-Modulatoren. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler. Emax: Maximale Zellantwort, normiert auf den Wert unter Kontrollbedingungen. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus derjenigen Agonistkonzentration, die zu einer halbmaximalen Zellantwort führt. n_H: Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Im Falle der Vorbehandlung mit QIC + PTX bzw. QIC + CTX entspringen die Kenngrößen pEC₅₀ und Emax-Wert einer Kurvenanpassung mit einem Hillkoeffizienten von -1 bzw. 1. ^{***}: Signifikant verschieden vom jeweiligen Wert unter Kontrollbedingungen (One-way ANOVA, Dunnett's post-Test, ^{***}, ^{*} p < 0,001, 0,05). ^{NS}: Nicht signifikant verschieden vom Wert unter Kontrollbedingungen (One-way ANOVA, Dunnett's post-Test). [#]: Signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß n_H = 1 (F-Test, p < 0,05). ^{n.s.}: Nicht signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß n_H = 1 („QIC+CTX“), bzw. n_H = -1 („+QIC+PTX“) (F-Test, p > 0,05)

Nach Ausschaltung bzw. Maskierung des Gi- und Gs-Weges (Einsatz von PTX und CTX) reduzierte sich die intrinsische Aktivität um 28%, jedoch erhöhte sich die Wirksamkeit im Vergleich zum Iperoxosignal in unvorbehandelten CHO-M3-Zellen. Im Falle der Inhibition des Gq- und des Gi-Weges (Einsatz von QIC und PTX) kehrten sich die Signale der dynamischen Massenumverteilung in den negativen Bereich, jedoch änderte sich der pEC₅₀-Wert von Iperoxo im Vergleich zu der Situation unter Kontrollbedingungen nicht. Bei Inhibition des Gq- und Maskierung des Gs-Weges (Einsatz von QIC und CTX) konnte eine deutliche Reduktion des Emax-Wertes um 40% beobachtet werden, ebenso eine verringerte Wirksamkeit um ca. 1,6 Dekaden. Es war somit anzunehmen, dass der Beitrag inhibitorischer G-Proteine (Gi) an der Ganzzellantwort durch Iperoxo derjenigen von Gq- und Gs-Proteinen untergeordnet ist.

Während die Kurven unter Kontrollbedingungen sowie nach PTX- und CTX-Vorbehandlung signifikant besser mit einem flachen Steilheitsmaß angepasst werden konnten, wiesen die beiden Kurven, bei denen jeweils der Gq-Inhibitor QIC zum Einsatz kam, einen normal steilen Verlauf auf.

Hinsichtlich der Fähigkeit des M3-Rezeptors, eine Abstufung zwischen dem Gq- und dem Gs- Weg vorzunehmen, kann der Vergleich der Wirksamkeiten und der jeweiligen Kopplungseffizienz dienlich sein. Um eine Aussage darüber zu treffen, inwieweit sich in diesem Punkt der M3-Rezeptor vom M2-Subtyp unterschied, werden in nachfolgender Tabelle die Kennzahlen aus dieser Arbeit und aus Bock et al. (2012) gegenübergestellt. Zitierte Werte sind *kursiv* gedruckt.

		Gq (M3) / Gi (M2) (1)	Gs (2)	Δ_{1-2}
M3	pK_A	7,39 ± 0,27	6,29 ± 0,17	1,10 [*]
	pEC_{50}	8,89 ± 0,10	8,10 ± 0,07	0,79 ^{**}
	$\log \tau$	1,51 ± 0,23	1,80 ± 0,10	-0,29 ^{NS}
M2	pK_A	8,40 ± 0,11	6,86 ± 0,32	1,54 [*]
	pEC_{50}	9,43 ± 0,10	8,55 ± 0,14	0,88 ^{**}
	$\log \tau$	0,86 ± 0,08	1,65 ± 0,31	-0,79 ^{NS}

Tab. 50: Affinität, Wirksamkeit und Kopplungseffizienz von Iperoxo an M3- und M2-Rezeptoren. pK_A - und $\log \tau$ -Werte wurden aus der Analyse der Daten mit dem *operational model of agonism* (Black und Leff, 1983) erhalten. Im Falle des M3-Rezeptors lagen Konzentrations-Effekt-Beziehungen aus DMR-Messungen zugrunde, bei denen die Zellen mit PTX und CTX (Gq, (1)) oder mit PTX und QIC (Gs, (2)) vorstimuliert wurden. Die Kennzahlen des M2-Rezeptors sind der Arbeit von Bock et al. (2012) entnommen. Dabei lagen Konzentrationseffektbeziehungen aus [³⁵S]GTP γ S- (Gi, (1)) und cAMP-Versuchen (Gs, (2)) zugrunde. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. ^{*}, ^{**}: Signifikanter Unterschied zwischen Kennzahlen von (1) und (2) (t-Test, ^{**}, $p < 0,01$, $0,05$). ^{NS}: Kein signifikanter Unterschied zwischen den Kennzahlen von (1) und (2) (t-Test, $p > 0,05$)

Bezüglich der Affinitäts- und Wirksamkeitsparameter erwiesen sich der Gq-Weg im Falle des M3-Rezeptors und der Gi-Weg im Falle des M2-Subtypes als dem Gs-Weg jeweils als überlegen. Damit stehen diese Ergebnisse mit den in der Literatur beschriebenen Kopplungsprävalenzen dieser beiden Subtypen (Caulfield und Birdsall, 1998) in Einklang. Die ermittelten Kopplungseffizienzen von Iperoxo auf den beiden Signalwegen unterschieden sich jeweils nicht signifikant. Dies unterstrich den starken Hang zur Signalwegspromiskuität beider Rezeptorsubtypen in CHO-Zellen. Es konnte geschlossen werden, dass M3- und M2-Rezeptoren in diesem Kontext zur gleichen Abstufung zwischen dem Signalweg der ersten und der zweiten Wahl fähig waren.

4.3.3 Am Iperoxo-induzierten DMR-Signal in CHO-M3 W526A-Zellen sind Gq- und Gs-vermittelte Effekte beteiligt, während Gi-Effekte erst bei Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels zu detektieren sind

Wie zuvor beschrieben, kommt dem Epitop Trp 7.35 in muskarinischen Acetylcholinrezeptoren eine besondere Rolle zu. Neben den in der Einleitung erwähnten besonderen Eigenschaften und der Einflussnahme sowohl auf das Bindungs- als auch das Aktivierungsverhalten von muskarinischen Liganden an den Subtypen M2 und M4 konnten in der vorliegenden Arbeit bereits Ähnlichkeiten und Unterschiede in der Trp 7.35-Abhängigkeit zum M3-Rezeptor aufgezeigt werden.

Dass sich der Austausch der Aminosäure Trp 7.35, die im extrazellulären Bereich zwischen orthosterischer und allosterischer Bindungsstelle positioniert ist, auf die agonistvermittelte Ganzzellantwort auswirkte, konnten Kebig (Dissertationsschrift, 2010) und Janßen (Dissertationsschrift, 2011) am Beispiel der beiden überwiegend Gi-koppelnden M2- und M4-Rezeptoren zeigen. Der an der Stelle Trp 7.35 punktmutierte M3-Rezeptor sollte im Folgenden hinsichtlich der Signalwegscharakteristika von Iperoxo untersucht werden.

Aufgrund einer unterschiedlich stark ausgeprägten Rezeptorexpression (Kapitel 4.3.1) sowie einer durch andere Faktoren beeinflussten Unterschiedlichkeit der in den DMR-Messungen ermittelten Signaturen wurde auf einen unmittelbaren Vergleich der intrinsischen Aktivität (Emax-Wert) verzichtet.

Zunächst sollte der Einfluss einzelner G-Proteinmodulatoren auf das Iperoxo-vermittelte Signal untersucht werden. Dabei wurde eine Konzentration von 100µM gewählt, da es sich dabei um eine Konzentration nahe dem oberen Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve handelte, wie später in Abb. 37 (Seite 125) dargestellt wurde.

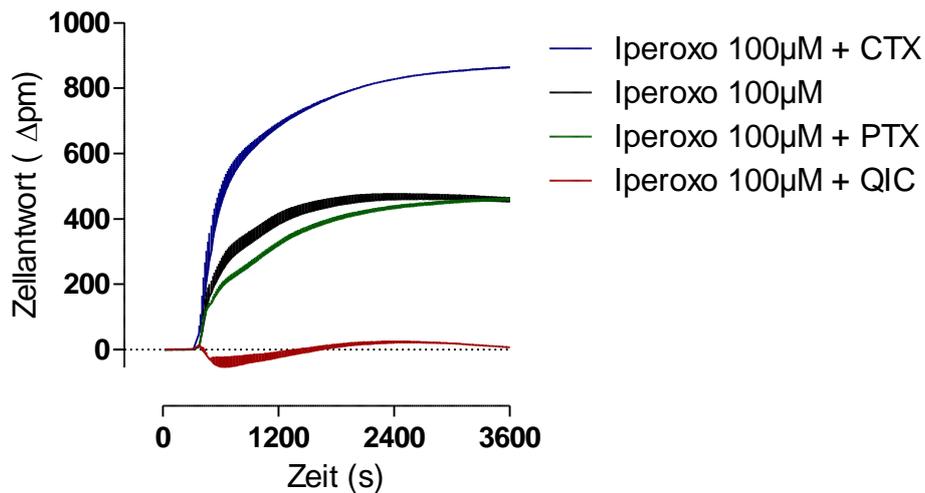


Abb. 32: Iperoxo-induzierte dynamische Massenumverteilung an CHO-M3 W526A-Zellen unter Kontrollbedingungen und nach Vorbehandlung mit G-Protein-Modulatoren. Dargestellt sind repräsentative, basislinien-korrigierte Originalsignaturen. Die Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardfehler einer Doppelbestimmung. Ordinate: Wellenlängenverschiebung in Picometern. Abszisse: Zeit in Sekunden

In CHO-Zellen führte die Aktivierung des M3 W526A-Rezeptors zu einem positiv gerichteten DMR-Signal, das zunächst kontinuierlich seinem Maximum entgegenstrebte. Somit entsprach die Signaturform des Signals dem des M3-Wildtyprezeptors (Abb. 26, Seite 112). Der Einsatz des Gq-Inhibitors QIC führte zu einer signifikanten Verringerung des Messsignals, während es unter CTX-Vorbehandlung vergrößert wurde (Tab. 51).

	Iperoxo 100µM	+ QIC	+ PTX	+CTX
Emax (%)	100	13 \pm 4 ^{***}	89 \pm 5 ^{NS,+}	201 \pm 13 ^{***}
n	16	9	10	11

Tab. 51: Maximale Iperoxo-induzierte dynamische Massenumverteilung an CHO-M3 W526A-Zellen unter dem Einfluss der genannten G-Protein-Modulatoren. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler. Emax: Maximale Zellantwort, normiert auf den Wert unter Kontrollbedingungen. n: Anzahl unabhängiger Experimente. ^{***}: Signifikant verschieden von der Zellantwort unter Kontrollbedingungen, (One-way ANOVA, Dunnett's post-Test, ^{***} p < 0,001). ^{NS}: Nicht signifikant verschieden vom Wert unter Kontrollbedingungen (One-way ANOVA, Dunnett's post-Test). ⁺: Signifikant verschieden von 100 % (t-Test, ⁺ p < 0,05)

Analog zum M3-Wildtyprezeptor (siehe Abb. 27, Seite 113) nahm das Signal des direkten Adenylylzyklaseaktivators Forskolin in CHO-Zellen, die mit der M3 W526A-Mutante transfiziert

wurden, negative Werte an (Abb. 33). Somit war für diese Zellen anzunehmen, dass auch eine rezeptorvermittelte Gs-Aktivierung eine Signatur mit diesem Vorzeichen zeigt. Dies wurde in Abb. 34 auf Seite 121 bestätigt.

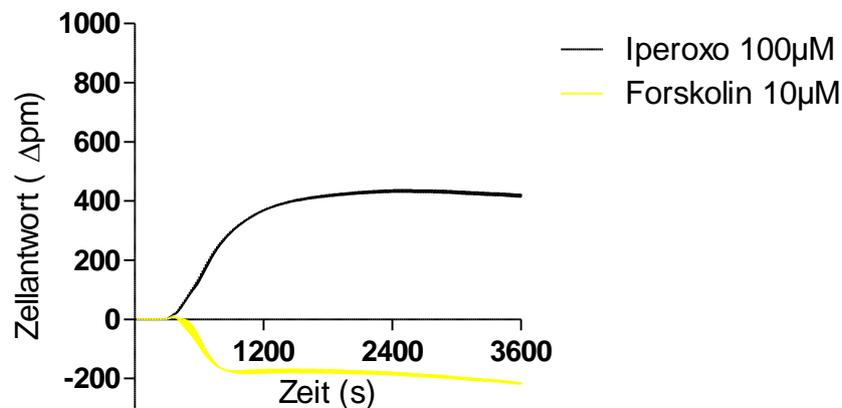


Abb. 33: Iperoxo- und Forskolin- induzierte dynamische Massenumverteilung an CHO-M3 W526A-Zellen. Dargestellt sind repräsentative, basislinien-korrigierte Originalsignaturen. Die Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardfehler einer Doppel- und einer Dreifachbestimmung. Ordinate: Wellenlängenverschiebung in Picometern. Abszisse: Zeit in Sekunden

Im Vergleich zu den Befunden, die am M3-Wildtyprezeptor beobachtet wurden (Tab. 44, Seite 112), führte an der M3 W526A-Mutante eine Hemmung inhibitorischer G-Proteine durch PTX zu einer geringfügig kleineren Hemmwirkung auf das Iperoxosignal (Tab. 51). In der Varianzanalyse (ANOVA) war dieser Unterschied nicht signifikant zu dem Wert unter Kontrollbedingungen; testete man ihn jedoch separat mit einem t-Test gegen 100%, konnte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% angenommen werden, dass sich PTX statistisch signifikant hemmend auf das Kontrollsignal auswirkte. Eine eindeutige Aussage, ob die M3 W526A-Mutante unter Kontrollbedingungen an inhibitorische G-Proteine koppelte, war somit an dieser Stelle nicht zu treffen.

Um den Beitrag einzelner G-Protein-abhängiger Signalwege an der Ganzzellantwort darzustellen, wurden nun die Modulatoren kombiniert.

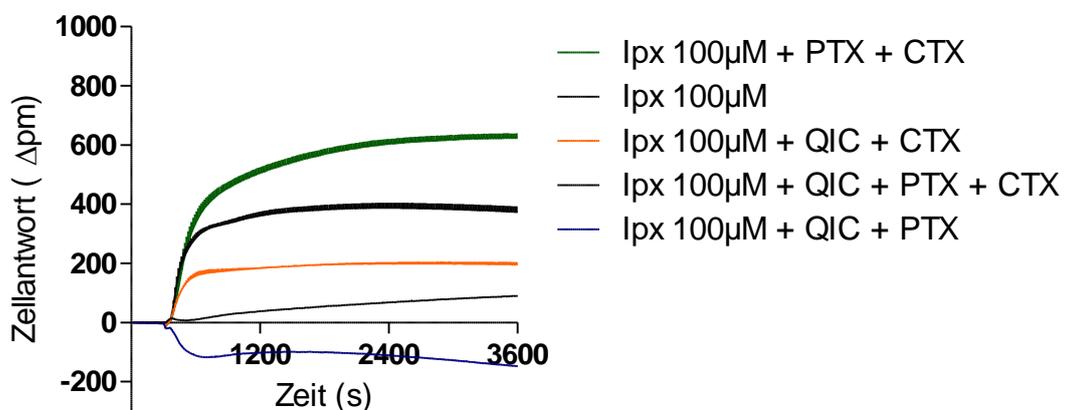


Abb. 34: Iperoxo-induzierte dynamische Massenumverteilung an CHO-M3 W526A-Zellen unter Kontrollbedingungen und nach Vorbehandlung mit G-Protein-Modulatoren. Dargestellt sind repräsentative, basislinien-korrigierte Originalsignaturen. Die Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardfehler in Doppel- oder Dreifachbestimmung. Ordinate: Wellenlängenverschiebung in Picometern. Abszisse: Zeit in Sekunden

Interessanterweise erhöhte sich das Iperoxo-vermittelte Signal an der M3 W526A-Mutante, sobald Gi-Proteine ausgeschaltet und der Gs-Weg maskiert wurde (Abb. 34; Tab. 52). Im Gegensatz zum M3-Wildtyprezeptor schien es bei der M3 W526A-Mutante so zu sein, dass die alleinige Aktivierung von Gq-Proteinen zu einer gesteigerten Rezeptoraktivierung führte, vergleicht man es mit der Situation, in der alle drei G-Proteine zur Verfügung standen (Kontrollbedingungen).

Welche Ursache der gesteigerten Signalintensität in CHO-M3 W526A-Zellen zugrunde lag, wenn der Gi- Weg inhibiert und der Gs-Weg maskiert wurde, konnte an dieser Stelle nicht erklärt werden. Es war offen, ob dieser Effekt durch die Mutation von Trp 7.35 zu Alanin zustande kam.

Im Falle der Ausschaltung des Gq- und der Maskierung des Gs-Weges reduzierte sich das Iperoxosignal um 47% (Tab. 52). Somit ist es wahrscheinlich, dass die M3 W526A-Mutante an Gi-Proteine koppelte, wenn der intrazelluläre cAMP-Spiegel durch den Einsatz von CTX erhöht wurde.

Die Ausschaltung des Gq- und des Gi-Weges führte zu einem Signal von 31% unterhalb der Nulllinie (Tab. 52). Dabei glich das Verhalten der M3 W526A-Mutante dem des M3-Wildtypes (Tab. 46, Seite 114).

	Iperoxo 100µM	+ PTX + CTX	+ QIC + CTX	+ QIC + PTX	+ QIC + PTX + CTX
Emax (%)	100	151 ± 15 ^{***}	53 ± 6 ^{***}	-31 ± 4 ^{***}	7 ± 1 ^{***,#}
n	16	11	9	14	6

Tab. 52: Maximale Iperoxo-induzierte dynamische Massenumverteilung an CHO-M3 W526A-Zellen unter dem Einfluss der genannten G-Protein-Modulatoren. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler. Emax: Maximale Zellantwort, normiert auf den Wert unter Kontrollbedingungen. n: Anzahl unabhängiger Experimente. *: Signifikant verschieden von der Zellantwort unter Kontrollbedingungen, (One-way ANOVA, Dunnett's post-Test, *** p < 0,001). #: Signifikant verschieden von Null, (t-Test, p < 0,05)**

Auch am punktmultierten M3-Rezeptor blieb ein Signal von 7% des Iperoxosignals unter Kontrollbedingungen erhalten, wenn Gq- und Gi-Proteine inhibiert und der Gs-Weg maskiert wurde (Tab. 52). In Kapitel 8.4.1 (Seite 219) wird der signifikante Unterschied dieses Signals zum Basalwert durch einen zusätzlichen Zweistichproben-t-Test untermauert.

Um einen G-Protein-abhängigen Ursprung dieses Signals zu ermitteln, wurde ebenso wie am M3-Wildtyprezeptor zusätzlich zur Vorbehandlung mit allen drei G-Proteinmodulatoren mit Aluminiumfluorid vorstimuliert (Abb. 35). Dadurch wurden sämtliche G-Proteine rezeptorunabhängig aktiviert und ein zusätzlicher Agonist-vermittelter Effekt konnte nicht mehr beobachtet werden.

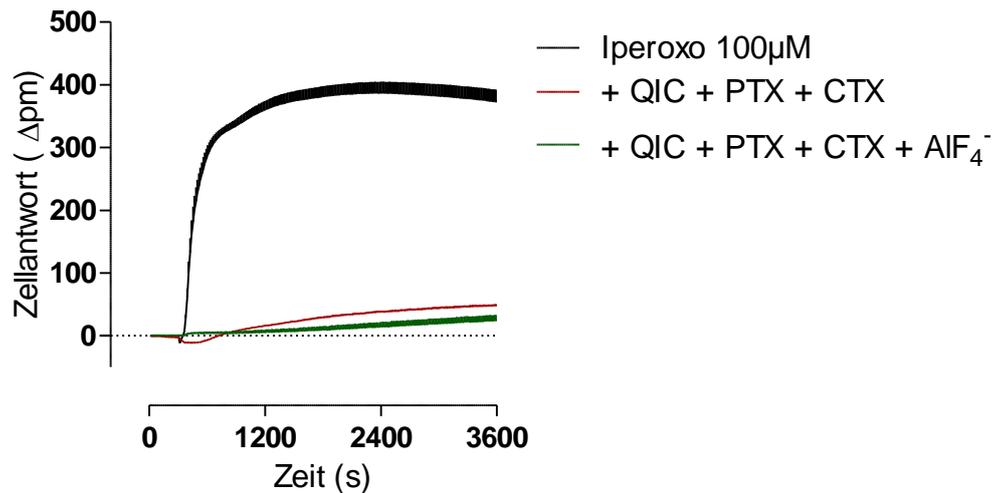


Abb. 35: Iperoxo-induzierte dynamische Massenumverteilung an CHO-M3 W526A-Zellen unter Kontrollbedingungen und nach Vorbehandlung mit G-Protein-Modulatoren. Dargestellt sind repräsentative, basislinien-korrigierte Originalsignaturen. Die Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardfehler in Doppel- oder Dreifachbestimmung. Ordinate: Wellenlängenverschiebung in Picometern. Abszisse: Zeit in Sekunden

Durch Iperoxo konnte nach maximaler Aktivierung sämtlicher G-Proteine keine dynamische Massenumverteilung mehr beobachtet werden.

	Iperoxo 100μM	+ QIC + PTX + CTX	+ QIC + PTX + CTX + AlF ₄ ⁻
Emax (%)	100	7 \pm 1 ^{***, #}	5 \pm 3 ^{***, NS, n.s.}
n	16	6	2

Tab. 53: Maximale Iperoxo-induzierte dynamische Massenumverteilung an CHO-M3 W526A-Zellen unter dem Einfluss der genannten G-Protein-Modulatoren. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler. Emax: Maximale Zellantwort, normiert auf den Wert unter Kontrollbedingungen. n: Anzahl unabhängiger Experimente. ^{***}: Signifikant verschieden von der Zellantwort unter Kontrollbedingungen, (One-way ANOVA, Dunnett's post-Test, ^{***} p < 0,001). [#]: Signifikant verschieden von Null, (t-Test, [#] p < 0,05). ^{NS}: Nicht signifikant verschieden von Null, (t-Test, p > 0,05). ^{n.s.}: Nicht signifikant verschieden vom Iperoxo-induzierten Signal nach Vorbehandlung mit QIC, PTX und CTX, (t-Test, p > 0,05)

Durch den Einsatz von Aluminiumfluorid zusätzlich zu allen drei G-Proteinmodulatoren konnte ein vom Basalwert nicht signifikant verschiedenes Signal detektiert werden (Tab. 53). Trotz der hohen Streuung kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass auch die M3 W526A-Mutante neben der Gq, Gs- und Gi-Aktivierung zu einem weiteren G-Protein-abhängigen Signalweg (G12/13-Proteine) in der Lage ist (siehe dazu Kapitel 5.6).

Bezüglich der Fähigkeit der M3 W526A-Mutante, Gi-Proteine-vermittelte Effekte zu induzieren, war aufgefallen, dass dies nur unter der Voraussetzung im Vorfeld erhöhter intrazellulärer cAMP-Spiegel detektierbar gewesen war (Tab. 52, Seite 122; Abb. 36).

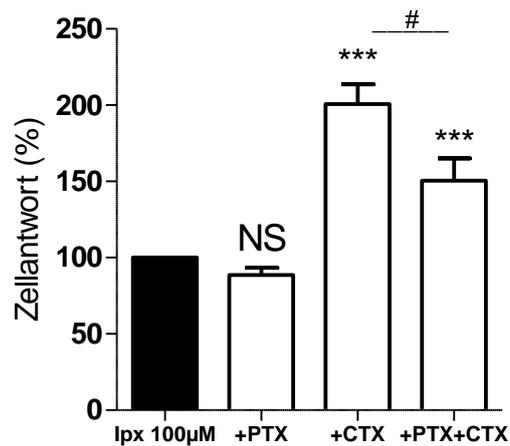


Abb. 36: Maximale Iperoxo-induzierte dynamische Massenumverteilung an CHO-M3 W526A-Zellen unter Kontrollbedingungen und nach Vorbehandlung mit G-Proteinmodulatoren. Aufgeführt sind Mittelwerte \pm Standardfehler von 10 bis 16 unabhängigen Experimenten in Doppel- oder Dreifachbestimmung. Ordinate: Prozentuale Zellantwort normiert auf den Wert unter Kontrollbedingungen. Abszisse: Einsatz G-Proteinmodulatoren. ***: Signifikant verschieden von der Zellantwort unter Kontrollbedingungen, (One-way ANOVA, Dunnett's post-Test, *** $p < 0,001$). NS: Nicht signifikant verschieden vom Wert unter Kontrollbedingungen (One-way ANOVA, Dunnett's post-Test). #: Signifikanter Unterschied zwischen Vorstimulation mit CTX und Vorstimulation mit PTX und CTX (t-Test, $p < 0,05$)

Während der alleinige Einsatz von PTX keinen Effekt auf das DMR-Kontrollsignal in M3 W526A-Zellen ausgeübt und die Maskierung von Gs-Effekten zu einer Signalverstärkung geführt hatte, reduzierte sich das Signal nach Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels um 50% durch Inhibition von Gi-Proteinen (Abb. 36). Diese Beobachtung und die Tatsache, dass unter der Vorbehandlung mit QIC und CTX ein messbares Iperoxosignal erhalten blieb, das durch den zusätzlichen Einsatz von PTX weiter reduzierbar gewesen war (Tab. 52, Seite 122), deutete auf eine Gi-Kopplung des M3 W526A-Rezeptors nach Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels hin.

Ebenso wie der M3-Wildtyprezeptor sollte die M3 W526A-Mutante hinsichtlich des Einflusses der G-Proteinmodulatoren auf die Wirksamkeit von Iperoxo untersucht werden.

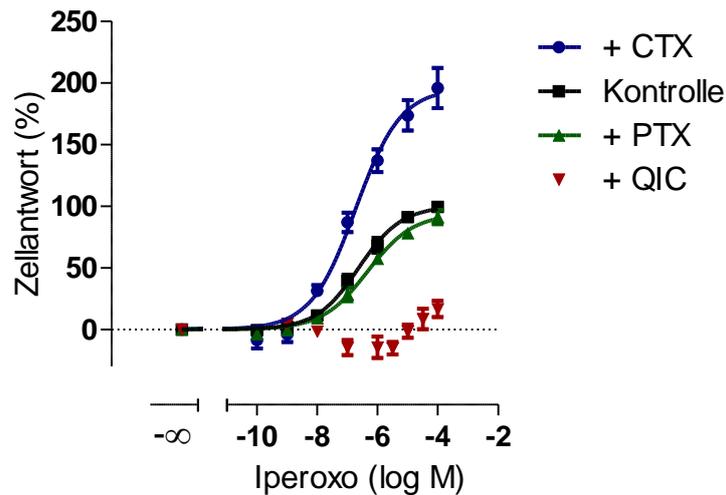


Abb. 37: Iperoxo-induzierte dynamische Massenumverteilung an CHO-M3 W526A-Zellen unter Kontrollbedingungen und nach Vorbehandlung mit G-Protein-Manipulatoren. Die Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Experimenten in Doppel- oder Dreifachbestimmung. Ordinate: Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht den jeweiligen unteren Plateaus der Konzentrations-Effekt-Kurven. Im Falle der Vorstimulation mit QIC entspricht 0% dem durch den Inkubationspuffer ausgelösten Effekt. 100 % ist das obere Plateau der Kurve unter Kontrollbedingungen. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration

	Kontrolle	+ QIC	+ PTX	+CTX
Emax (%)	100	16 \pm 7 ^{***}	93 \pm 7 ^{NS}	189 \pm 15 ^{***}
pEC ₅₀	6,59 \pm 0,15	-	6,37 \pm 0,19 ^{NS}	6,82 \pm 0,01 ^{NS}
η_H	0,61 \pm 0,05 [#]	-	0,58 \pm 0,08 [#]	0,58 \pm 0,09 [#]
n	5	4	3	3

Tab. 54: Kenngrößen der Iperoxo-induzierten dynamischen Massenumverteilung an CHO-M3 W526A-Zellen unter dem Einfluss der genannten G-Protein-Modulatoren. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler. Emax: Maximale Zellantwort, normiert auf den Wert unter Kontrollbedingungen. Im Falle der Vorstimulation mit QIC lag dabei die durch 100 μ M Iperoxo induzierte Zellantwort zugrunde. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus derjenigen Agonistkonzentration, die zu einer halbmaximalen Zellantwort führt. η_H : Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. n: Anzahl unabhängiger Experimente. ^{***}: Signifikant verschieden vom jeweiligen Wert unter Kontrollbedingungen (One-way ANOVA, Dunnett's post-Test, ^{***} p < 0,001). ^{NS}: Nicht signifikant verschieden vom Wert unter Kontrollbedingungen (One-way ANOVA, Dunnett's post-Test). [#]: Signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß $\eta_H = 1$ (F-Test, p < 0,05)

Der pEC₅₀-Wert von Iperoxo reduzierte sich durch die W526A-Mutation am M3-Rezeptor um 1,77 Dekaden (Tab. 54: pEC₅₀: 6,59 \pm 0,15 im Vergleich mit Wirksamkeit von Iperoxo am M3-Wildtyprezeptor unter Kontrollbedingungen (pEC₅₀: 8,36 \pm 0,11); Tab. 48, Seite 116; ^{***} p < 0,001). An dieser Stelle konnte bereits gefolgert werden, dass das Trp 7.35 des M3-Rezeptors in DMR-Experimenten ein an der Wirksamkeit des Agonisten Iperoxo beteiligtes Epitop war, denn wie in Abb. 25 (Seite 111) dargestellt wurde, wiesen die M3 W526A-Zellen gar ein höheres Expressionsniveau im Vergleich zu M3-CHO-Zellen auf. In [³⁵S]GTP γ S-Experimenten war Trp 7.35 bereits als ein an der Acetylcholin-Aktivierung muskarinischer M3-Rezeptoren beteiligtes Epitop charakterisiert worden (Kapitel 4.2.3.1, Tab. 43, Seite 109).

Die oberen Plateaus der Kurven spiegelten wider, was durch den Einsatz der einzelnen G-Protein-Modulatoren auf eine Stimulation der M3 W526A-Zellen mit 100 μ M Iperoxo bereits beobachtet werden konnte (Abb. 32 auf Seite 120). Durch den Einsatz des Gq- Inhibitors QIC konnte keine Kurve an die Datenpunkte der verschiedenen Iperoxo-Konzentrationen angepasst werden. Die durch 100 μ M Iperoxo induzierte Zellantwort in QIC-vorstimulierten M3 W526A-Zellen war im Vergleich zu dem Emax-Wert unter Kontrollbedingungen stärker reduziert als durch den Einfluss des Gi-Inhibitors PTX. Sowohl die intrinsische Aktivität als auch die Wirksamkeit und die flache Kurvensteilheit nach PTX-Vorbehandlung unterschieden sich nicht von denen unter Kontrollbedingungen.

Eine Vorstimulation mit CTX führte ebenso wie am M3-Wildtyprezeptor (Tab. 48, Seite 116) zu einer deutlichen Erhöhung des Signals (Tab. 54). Die pEC₅₀-Werte von Iperoxo unter dem Einfluss von PTX bzw. CTX unterschieden sich nicht signifikant von derjenigen ohne Vorbehandlung. Wie am M3-Wildtyprezeptor waren die hier aufgenommenen Kurven ausschließlich besser mit einer freilaufenden, flachen Kurvensteilheit zu beschreiben.

In einem weiteren Schritt sollte nun durch die Kombination der Modulatoren der Einfluss einzelner G-Protein-vermittelter Komponenten auf der Wirksamkeit von Iperoxo ermittelt werden.

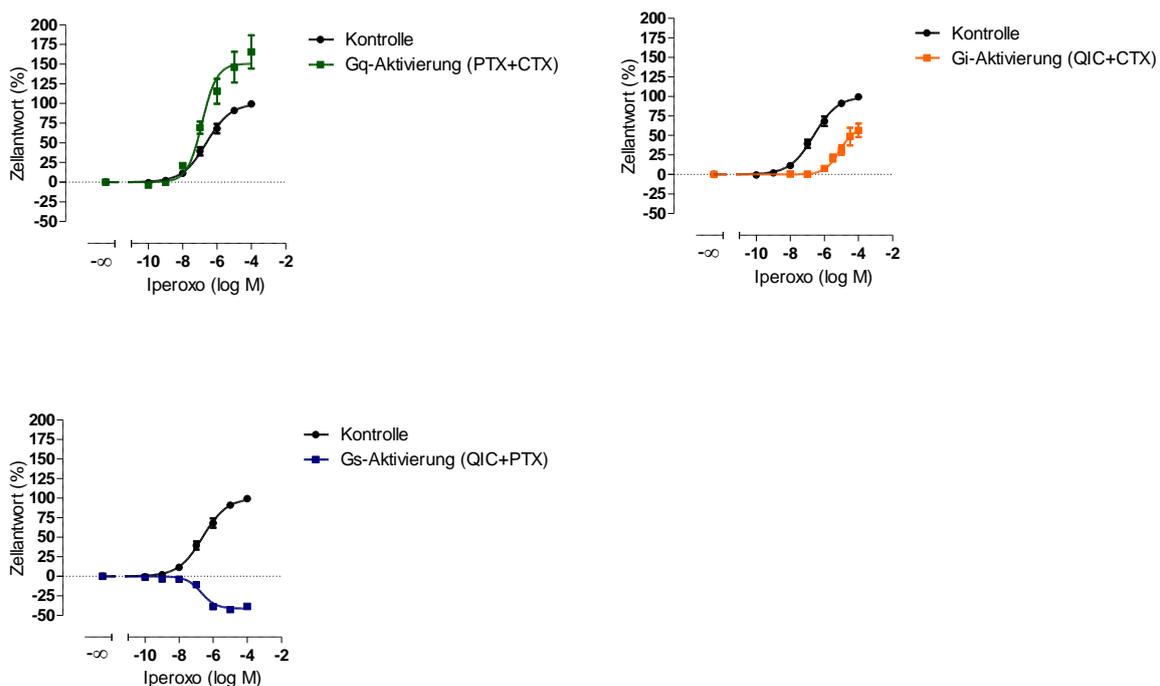


Abb. 38: Iperoxo-induzierte dynamische Massenumverteilung an CHO-M3 W526A-Zellen unter Kontrollbedingungen und nach Vorbehandlung mit G-Protein-Modulatoren. Die Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus mindestens vier unabhängigen Experimenten in Doppel- oder Dreifachbestimmung. Ordinate: Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht den jeweiligen unteren Plateaus der Konzentrations-Effekt-Kurven, 100 % ist das obere Plateau der Kurve unter Kontrollbedingungen. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration

	Kontrolle	+ PTX + CTX	+ QIC + PTX	+ QIC + CTX
Emax (%)	100	166 ± 20 ^{***}	-43 ± 4 ^{***}	53 ± 5 [*]
pEC ₅₀	6,59 ± 0,15	6,66 ± 0,10 ^{NS}	6,72 ± 0,13 ^{NS}	5,04 ± 0,04 ^{***}
n _H	0,61 ± 0,05 [#]	0,59 ± 0,14 ^{n.s.}	-1,82 ± 0,92 ^{n.s.}	0,84 ± 0,30 ^{n.s.}
n	5	7	4	4

Tab. 55: Kenngrößen der Iperoxo-induzierten dynamischen Massenumverteilung an CHO-M3 W526A-Zellen unter dem Einfluss der genannten G-Protein-Modulatoren. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler. Emax: Maximale Zellantwort, normiert auf den Wert unter Kontrollbedingungen. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus derjenigen Agonistkonzentration, die zu einer halbmaximalen Zellantwort führt. n_H: Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Im Falle der Vorbehandlung mit PTX + CTX bzw. QIC + CTX entspringen die Kenngrößen pEC₅₀ und Emax-Wert einer Kurvenanpassung mit einem Hillkoeffizienten von 1. Im Falle der Vorbehandlung mit QIC + PTX entspringen die Kenngrößen pEC₅₀ und Emax-Wert einer Kurvenanpassung mit einem Hillkoeffizienten von -1. ^{***}: Signifikant verschieden vom jeweiligen Wert unter Kontrollbedingungen (One-way ANOVA, Dunnett's post-Test, ^{***} p < 0,001, 0,05). ^{NS}: Nicht signifikant verschieden vom Wert unter Kontrollbedingungen (One-way ANOVA, Dunnett's post-Test). [#]: Signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß n_H = 1 (F-Test, p < 0,05). ^{n.s.}: Nicht signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß n_H = 1 („+PTX+CTX“ und „+QIC+CTX“), bzw. n_H = -1 („+QIC+PTX“) (F-Test, p > 0,05)

Während der Einsatz von PTX und CTX die durch Iperoxo induzierte Signalintensität im Vergleich zu Kontrollbedingungen erhöhte, wurde sie durch die Kombination von QIC und PTX sowie von QIC und CTX reduziert (vergleiche auch Tab. 52, Seite 122). Die Wirksamkeit von Iperoxo auf dem Gq-Weg (PTX und CTX) war im Vergleich zu Kontrollbedingungen nicht verändert (Tab. 55). Nach Ausschaltung von Gq- und Gi- Proteinen (QIC und PTX) zeigte sich eine in den negativen Bereich ragende Konzentrations-Effekt-Kurve, wie sie für eine Gs-Aktivierung typisch war (Abb. 34, Seite 121). Auch hier unterschied sich die Wirksamkeit nicht von der ohne Vorbehandlung. Anders als am M3-Wildtyprezeptor wies Iperoxo an der M3 W526A-Mutante auf dem Gq- und dem Gs-Weg die gleiche Wirksamkeit auf (t-Test, p > 0,05, Vergleich mit Tab. 50, Seite 119). Im Vergleich zu Kontrollbedingungen war sie jedoch um 1,55 Dekaden reduziert, wenn nur noch funktionelle Gi-Proteine für die Signaltransduktion zur Verfügung standen. Dies konnte für den M3-Wildtyprezeptor ebenfalls beobachtet werden (Tab. 49, Seite 118).

Somit wurde auch für den punktmultierten M3-Rezeptor gefunden, dass der Beitrag von Gi-vermittelten Effekten an der Ganzzellantwort schwächer ausfiel als der von Gq- und Gs-Proteinen.

Wie am M3-Wildtyprezeptor konnten die Kurven mit QIC und PTX sowie mit QIC und CTX-Vorbehandlung mit einem normal steilen Hill-Koeffizienten angepasst werden, während unter Kontrollbedingungen die Anpassung signifikant besser mit einer freilaufenden, flachen Kurvensteilheit beschrieben wurde. Im Falle alleiniger Gq-Aktivierung kam es hier zu einem normal steilen Kurvenverlauf, was am M3-Wildtyprezeptor nicht beobachtet wurde.

4.3.4 Am Iper-6-phthal- und Iper-6-naph-induzierten DMR-Signal in CHO-M3- und CHO-M3 W526A-Zellen sind Gq- und Gs- vermittelte Effekte beteiligt

Um zu testen, ob und in welcher Form der M3-Rezeptor durch die dualsterischen Substanzen Iper-6-phthal und Iper-6-naph aktivierbar war und welchen Einfluss die Punktmutation W526A darauf ausübte, wurden Messungen der dynamischen Massenumverteilung durchgeführt.

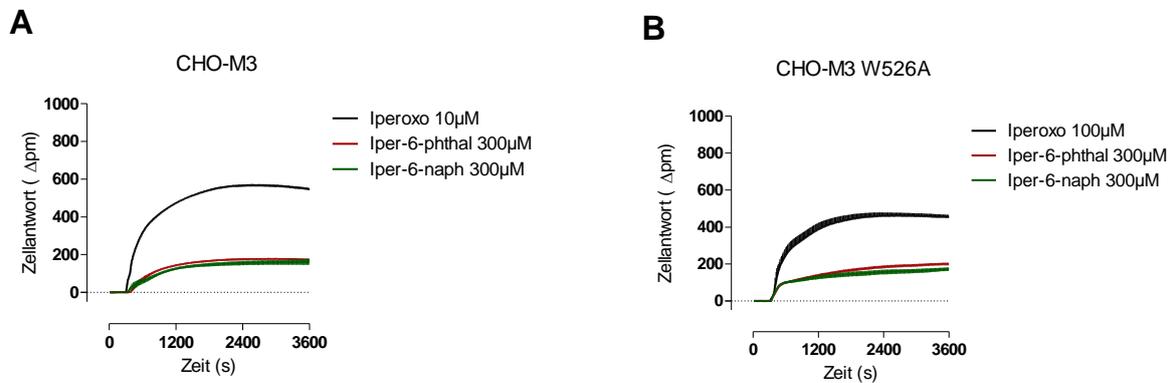
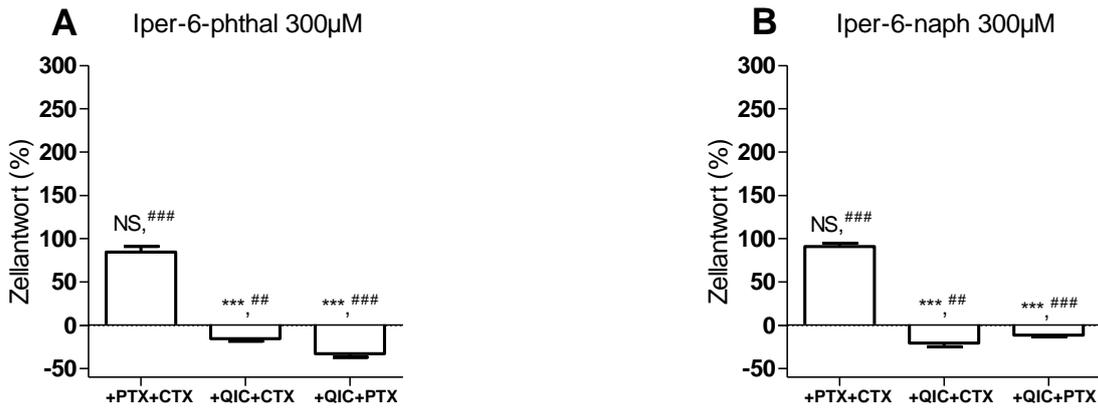


Abb. 39: Iper-6-phthal und Iper-6-naph-induzierte dynamische Massenumverteilung an CHO-M3- (A) und CHO-M3 W526A-Zellen (B). Dargestellt sind repräsentative, basislinien-korrigierte Originalsignaturen. Die Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardfehler in Doppel- oder Dreifachbestimmung. Ordinate: Wellenlängenverschiebung in Picometern. Abszisse: Zeit in Sekunden

Während durch [35 S]GTP γ S-Bindungsexperimente am M3- sowie dem M3 W526A-Rezeptor nicht beobachtet werden konnte, dass Iper-6-phthal zu einer Rezeptoraktivierung führte (Abb. 24, Seite 110), zeigte sich hier ein anderes Bild (Abb. 39). Die Signaturform des Signals der dualsterischen Substanzen war an beiden Rezeptoren der von Iperoxo ähnlich. Auch hier erhöhte sich das Signal kontinuierlich, bis ein Maximum erreicht wurde. Die Konzentration 300 μ M lag im oberen Plateau der Konzentrations-Effekt-Beziehung (Abb. 42, Seite 134).

Wie schon bei den Betrachtungen für die Ganzzellantwort durch Iperoxo wurden nun G-Proteinmodulatoren eingesetzt, um die Aktivierung von Signalwegen selektiv zu erfassen.

CHO-M3



CHO-M3 W526A

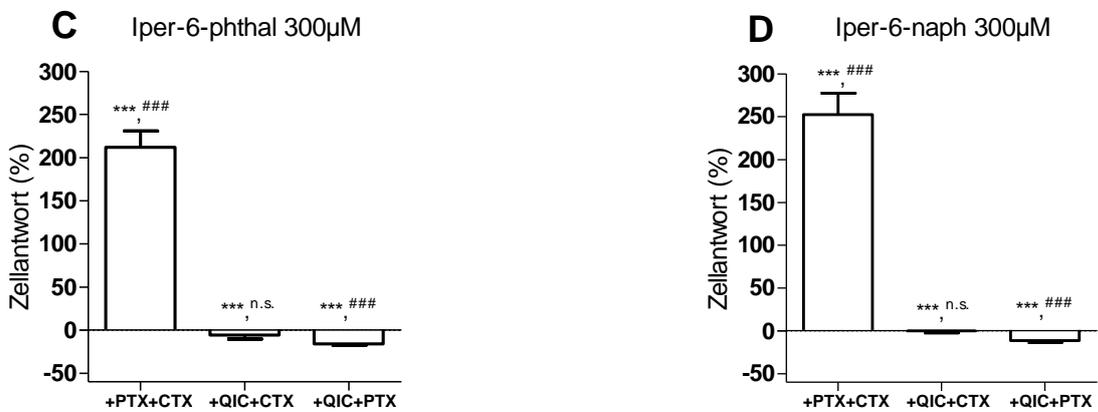


Abb. 40: Dynamische Massenumverteilung durch je 300µM Iper-6-phthal und Iper-6-naph an CHO-M3- (A, B) und CHO-M3 W526A-Zellen (C, D) nach Vorbehandlung mit G-Proteinmodulatoren. Aufgeführt sind Mittelwerte \pm Standardfehler von 4 bis 12 unabhängigen Experimenten in Doppel- oder Dreifachbestimmung. Ordinate: Prozentuale Zellantwort. 100% stellt die durch die jeweilige Substanz am jeweiligen Rezeptor ermittelte Ganzzellantwort ohne Modulatorzusatz dar. Abszisse: Einsatz G-Proteinmodulatoren. ***: Signifikant verschieden von der Zellantwort unter Kontrollbedingungen, (One-way ANOVA, Dunnett's post-Test, *** $p < 0,001$). NS: Nicht signifikant verschieden vom Wert unter Kontrollbedingungen (One-way ANOVA, Dunnett's post-Test). ###, ##: Signifikanter Unterschied zum Basalwert (t-Test, $p < 0,001, 0,01$). n.s.: Nicht signifikant verschieden vom Basalwert (t-Test, $p > 0,05$)

		Emax (%) ± S.E.M (n)		
		+ PTX + CTX	+ QIC + CTX	+ QIC + PTX
M3	Iper-6-phthal	84 ± 6 (7) ^{NS,###}	-16 ± 3 (6) ^{***,##}	-33 ± 4 (10) ^{***,###}
	Iper-6-naph	91 ± 4 (7) ^{NS,###}	-21 ± 4 (7) ^{***,##}	-12 ± 2 (9) ^{***,###}
M3 W526A	Iper-6-phthal	212 ± 19 (10) ^{***,###}	-6 ± 5 (5) ^{***,n.s.}	-16 ± 2 (11) ^{***,###}
	Iper-6-naph	252 ± 25 (9) ^{***,###}	0 ± 2 (4) ^{***,n.s.}	-11 ± 2 (12) ^{***,###}

Tab. 56: Maximale dynamische Massenumverteilung durch je 300µM Iper-6-phthal und Iper-6-naph an CHO-M3- und CHO-M3 W526A-Zellen nach Vorbehandlung mit G-Proteinmodulatoren. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler. Emax: Maximale Zellantwort, normiert auf den durch die jeweilige Substanz ermittelten Wert unter Kontrollbedingungen. n: Anzahl unabhängiger Experimente. ***: Signifikant verschieden von der Zellantwort unter Kontrollbedingungen, (One-way ANOVA, Dunnett's post-Test, *** p < 0,001). NS: Nicht signifikant verschieden vom Wert unter Kontrollbedingungen (One-way ANOVA, Dunnett's post-Test). ###, ##: Signifikanter Unterschied zum Basalwert (t-Test, p < 0,001, 0,01). n.s.: Nicht signifikant verschieden vom Basalwert (t-Test, p > 0,05)

Nach Ausschaltung von Gi- und Maskierung von Gs-Proteinen verringerte sich die maximale Ganzzellantwort, die mit den dualsterischen Substanzen am M3-Wildtyprezeptor beobachtet wurde, nicht signifikant im Vergleich zu Kontrollbedingungen (Tab. 56). Mit Iperoxo reduzierte sich das Signal unter diesen Bedingungen (Tab. 46, Seite 114 und Tab. 49, Seite 118). Es war somit davon auszugehen, dass bezüglich des Emax-Wertes im Gegensatz zum Vollagonisten die hybridvermittelte Ganzzellantwort in CHO-M3-Zellen ohne G-Proteinmodulatoren ausschließlich die Gq-Aktivierung widerspiegelte.

Am punktmultierten M3-Rezeptor erhöhte sich das Signal nach Vorbehandlung mit PTX und CTX um über 100% (Tab. 56). Dieses Verhalten der Hybridverbindungen ähnelt dem von Iperoxo, bei dem der Emax-Wert um etwas mehr als 50% anstieg, wenn der Gi-Weg inhibiert und der Gs-Weg maskiert wurde (Tab. 52, Seite 122 und Tab. 55, Seite 127).

Durch Inhibition des Gq- und Maskierung des Gs-Weges wurden am M3-Wildtyprezeptor durch die Hybridverbindungen Signale unterhalb der Nulllinie beobachtet (Tab. 56), die nicht mit den klassischen, in den positiven Bereich ragenden Effekten für eine Gi-vermittelte Ganzzellantwort in CHO-M3-Zellen in Einklang zu bringen waren. Durch zusätzlichen Einsatz von PTX veränderten sich diese Signale nicht (Tab. 57).

		Emax (%) ± S.E.M. (n)	
		+ QIC + CTX	+ QIC + CTX + PTX
Iper-6-phthal 300µM		-16 ± 3 (6) ^{***,##}	-19 ± 8 (5) ^{***,NS}
Iper-6-naph 300µM		-21 ± 4 (7) ^{***,##}	-12 ± 10 (6) ^{***,NS}

Tab. 57: Maximale dynamische Massenumverteilung durch Iper-6-phthal und Iper-6-naph an CHO-M3-Zellen nach Vorbehandlung mit G-Proteinmodulatoren. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler. Emax: Maximale Zellantwort, normiert auf den durch die jeweilige Substanz ermittelten Wert unter Kontrollbedingungen. n: Anzahl unabhängiger Experimente. ***: Signifikant verschieden von der Zellantwort unter Kontrollbedingungen, (One-way ANOVA, Dunnett's post-Test, *** p < 0,001). ##: Signifikanter Unterschied zum Basalwert (t-Test, p < 0,01). NS: Nicht signifikant verschieden vom Basalwert (t-Test, p > 0,05)

Der Effekt, der mit den QIC- und CTX-vorbehandelten CHO-M3-Zellen durch 300µM Iper-6-phthal bzw. Iper-6-naph beobachtet wurde, konnte durch den Gi-Inhibitor PTX nicht beeinflusst werden (Tab. 57). Da auch eine Dosisabhängigkeit dieses Effektes nicht zu beobachten war (Daten nicht abgebildet), war nicht davon auszugehen, dass es sich bei den Signalen nach QIC- und CTX-Vorbehandlung um Gi-vermittelte Effekte der Hybridliganden in CHO-M3-Zellen handelte. Damit bestätigte sich in DMR-Experimenten die schon unter Kapitel 4.2.3.2 angestellte Vermutung, dass die Substanzen unter den gegebenen Umständen nicht in der Lage waren, den Gi-Weg am M3-Rezeptor zu aktivieren. Für den primär Gi-koppelnden M2-Rezeptor konnte im Unterschied dazu Bock et al. (2012) gar einen Bias in Richtung dieses Signalweges detektieren.

Iper-6-phthal und Iper-6-naph konnten nach Inhibition des Gq- und Maskierung des Gs-Weges in CHO-M3 W526A-Zellen kein detektierbares Signal der dynamischen Massenumverteilung mehr vermitteln (Tab. 56). Somit galt auch für den punktmultierten M3-Rezeptor, dass Gi-abhängige Effekte durch die dualsterischen Liganden unter den gewählten Messbedingungen keine Rolle an der Ganzzellantwort spielten. In [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimenten war ebenfalls kein Signal detektierbar gewesen (Kapitel 4.2.3.2). Für den an der Stelle Trp 7.35 zu Alanin mutierten M2-Rezeptor war eine im Vergleich zum Wildtyprezeptor erhöhte Signalintensität in DMR-Messungen beobachtet worden (Bock et al., 2012).

Durch Vorbehandlung mit QIC und PTX konnten für beide Rezeptoren negative, sich vom Basalwert unterscheidende Signale durch die Hybridverbindungen beobachtet werden (Tab. 56). Dies sprach dafür, dass neben der oben genannten Gq- auch eine Gs-Aktivierung an der Ganzzellantwort beteiligt war.

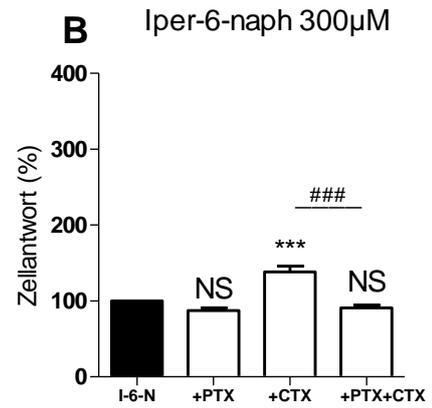
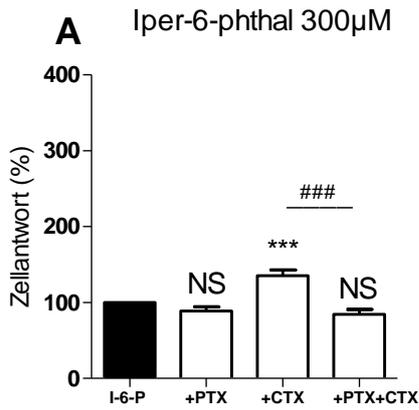
Nach Ausschaltung von Gq- und Gi- sowie Maskierung von Gs-Proteinen konnte für beide Substanzen kein vom Basalwert verschiedenes Signal in CHO-M3-Zellen mehr aufgenommen werden (Tab. 57). Gleiches galt für Iper-6-phthal und Iper-6-naph in CHO-M3 W526A-Zellen (Tab. 58).

	Iper-6-phthal 300µM	Iper-6-naph 300µM
+ QIC + CTX + PTX	-5 ± 4 (4) ^{NS}	6 ± 6 (4) ^{NS}

Tab. 58: Maximale dynamische Massenumverteilung durch Iper-6-phthal und Iper-6-naph an CHO-M3 W526A-Zellen nach Vorbehandlung mit G-Proteinmodulatoren in Prozent des durch die jeweilige Hybridsubstanz induzierten Signals unter Kontrollbedingungen. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler (n; Anzahl unabhängiger Experimente). NS: Nicht signifikant verschieden vom Basalwert (t-Test, p > 0,05)

Da an der M3 W526A-Mutante Gi-vermittelte Effekte durch den Vollagonisten Iperoxo auftraten, wenn die Konzentration des intrazellulären cAMPs erhöht wurde (Abb. 36, Seite 124), sollte nun getestet werden, ob unter diesen Umständen eine Gi-Kompetenz der Hybridliganden für die beiden Rezeptoren beobachtet werden konnte.

CHO-M3



CHO-M3 W526A

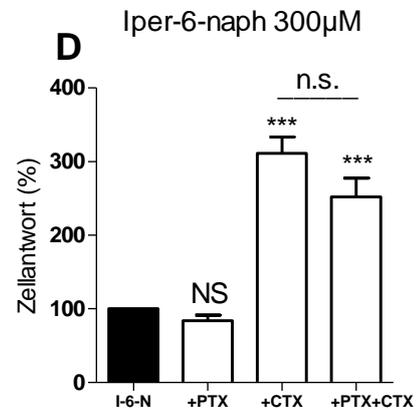
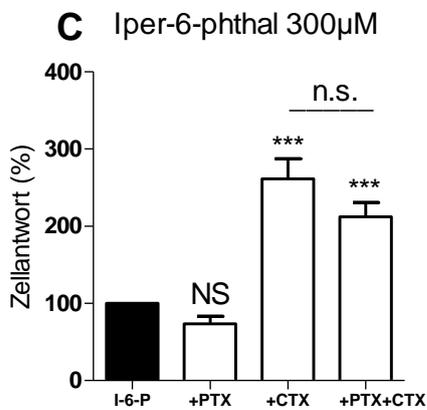


Abb. 41: Dynamische Massenumverteilung von je 300 μ M Iper-6-phthal- (A, C) und Iper-6-naph (B, D) an CHO-M3- (A, B) und CHO-M3 W526A-Zellen (C, D) unter Kontrollbedingungen und nach Vorbehandlung mit G-Proteinmodulatoren. Aufgeföhrt sind Mittelwerte \pm Standardfehler von 6 bis 15 unabhängigen Experimenten in Doppel- oder Dreifachbestimmung. Ordinate: Prozentuale Zellantwort normiert auf den Wert unter Kontrollbedingungen. Abszisse: Einsatz G-Proteinmodulatoren. ***: Signifikant verschieden von der Zellantwort unter Kontrollbedingungen, (One-way ANOVA, Dunnett's post-Test, *** $p < 0,001$). NS: Nicht signifikant verschieden vom Wert unter Kontrollbedingungen (One-way ANOVA, Dunnett's post-Test). ###: Signifikanter Unterschied zwischen Vorstimulation mit CTX und Vorstimulation mit PTX und CTX (t-Test, $p < 0,001$). n.s.: Kein signifikanter Unterschied zwischen Vorstimulation mit CTX und Vorstimulation mit PTX und CTX, (t-Test, $p > 0,05$)

		Emax (%) ± S.E.M (n)			
		Kontrolle	+ PTX	+ CTX	+ PTX + CTX
M3	Iper-6-phthal	100	89 ± 5 (6) ^{NS}	136 ± 7 (7) ^{***}	84 ± 6 (7) ^{NS,###}
	Iper-6-naph	100	88 ± 3 (6) ^{NS}	138 ± 8 (6) ^{***}	91 ± 4 (7) ^{NS,###}
M3 W526A	Iper-6-phthal	100	73 ± 10 (7) ^{NS}	262 ± 26 (8) ^{***}	212 ± 19 (10) ^{***,n.s.}
	Iper-6-naph	100	84 ± 8 (7) ^{NS}	311 ± 22 (7) ^{***}	252 ± 25 (9) ^{***,n.s.}

Tab. 59: Maximale dynamische Massenumverteilung durch je 300µM Iper-6-phthal und Iper-6-naph an CHO-M3- und CHO-M3 W526A-Zellen nach Vorbehandlung mit G-Proteinmodulatoren. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler. Emax: Maximale Zellantwort, normiert auf den durch die jeweilige Substanz ermittelten Wert unter Kontrollbedingungen. n: Anzahl unabhängiger Experimente. ***: Signifikant verschieden von der Zellantwort unter Kontrollbedingungen, (One-way ANOVA, Dunnett's post-Test, ** p < 0,001). ^{NS}: Nicht signifikant verschieden vom Wert unter Kontrollbedingungen (One-way ANOVA, Dunnett's post-Test). ###: Signifikanter Unterschied zum Wert mit CTX-Vorbehandlung (t-Test, p < 0,001). ^{n.s.}: Nicht signifikant verschieden vom Wert mit CTX-Vorbehandlung (t-Test, p > 0,05)

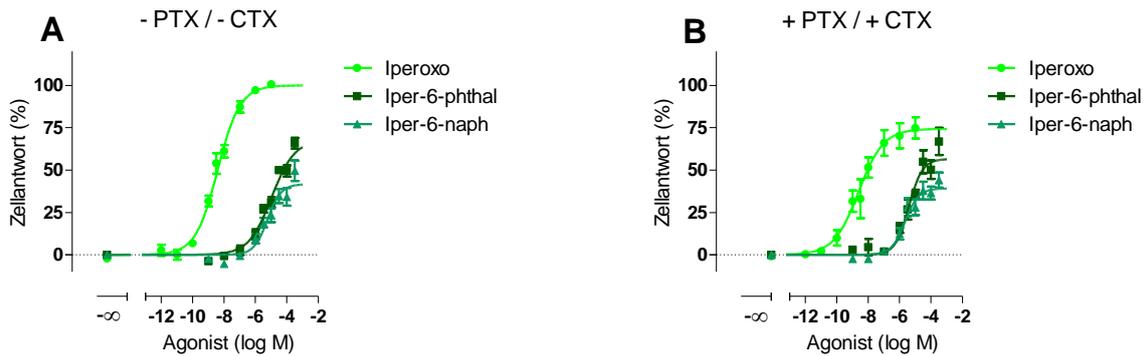
Aus Abb. 41 und Tab. 59 geht hervor, dass für beide Rezeptoren und beide Liganden eine alleinige Vorbehandlung mit PTX nicht ausreichte, um das Kontrollsignal zu beeinflussen. Unter diesen Umständen war also keine Beteiligung inhibitorischer G-Proteine (Gi) zu beobachten. Die Maskierung des Gs-Weges mittels CTX führte in beiden Zelllinien zu einem im Vergleich zur Kontrolle erhöhten Signal der dualsterischen Liganden. Dies war für den Vollagonisten Iperoxo ebenfalls beobachtet worden (Tab. 44, Seite 112 und Tab. 51, Seite 120) und steht im Zusammenhang mit einer Gs-Protein-abhängigen Komponente der Ganzzellantwort. Wurde der intrazelluläre cAMP-Gehalt mit CTX erhöht und gleichzeitig die Gi-Proteine mit PTX inhibiert, resultierte daraus beim M3-Wildtyprezeptor eine Reduktion der Signalstärke. Dies sprach für eine Gi-Kopplung bei erhöhtem intrazellulären cAMP-Spiegel. Dieser Effekt war bei der M3 W526A-Mutante nicht detektierbar. Somit war der punktmutierte M3-Rezeptor auch nach Erhöhung von intrazellulärem cAMP nicht in der Lage, nach Aktivierung durch die dualsterischen Substanzen Iper-6-phthal und Iper-6-naph an Gi-Proteine zu koppeln.

Daher konnte angenommen werden, dass neben Gq- und Gs-Effekten kein weiterer G-Protein-abhängiger Signalweg an der Iper-6-phthal- und Iper-6-naph-vermittelten Ganzzellantwort der beiden Rezeptoren beteiligt war.

4.3.5 Trp 7.35 ist für die Gq-vermittelte Ganzzellantwort von Iper-6-phthal und Iper-6-naph am muskarinischen M3-Rezeptor förderlich

Wie in Kapitel 4.3.4 dargestellt wurde, konnten für M3- und M3-W526A-Rezeptoren Gq- sowie Gs-vermittelte Effekte durch die dualsterischen Substanzen Iper-6-phthal und Iper-6-naph in DMR-Experimenten detektiert werden. Im Folgenden sollten die hybridvermittelten Konzentrations-Effekt-Beziehungen unter dem simultanen Einsatz von PTX und CTX betrachtet werden, sodass die Gq-Aktivierung als präferenzialer Kopplungsweg muskarinischer M3-Rezeptoren untersucht werden konnte. Dies ist in Abb. 42 dargestellt.

CHO-M3



CHO-M3 W526A

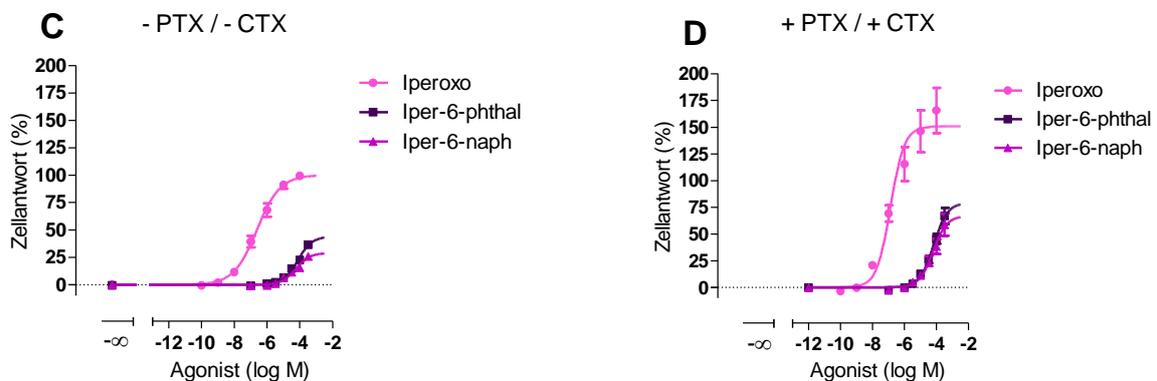


Abb. 42: Dynamische Massenumverteilung nach Aktivierung durch Iperoxo, Iper-6-phthal und Iper-6-naph in CHO-M3- (A, B) und CHO-M3 W526A-Zellen (C, D) unter Kontrollbedingungen (A, C) und nach Vorbehandlung mit PTX und CTX (B, D). Die Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus mindestens fünf unabhängigen Experimenten in Doppel- oder Dreifachbestimmung. Ordinate: Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht den jeweiligen unteren Plateaus der Konzentrations-Effekt-Kurven, 100 % ist das obere Plateau der Iperoxokurve unter Kontrollbedingungen der jeweiligen Zelllinie. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration

Die dualsterischen Substanzen wiesen an beiden untersuchten Rezeptoren einen Partialagonismus auf. Bis auf die Konzentrations-Effekt-Beziehung von Iper-6-phthal am M3-Wildtyprezeptor unter Kontrollbedingungen konnten alle Kurven der Hybridliganden mit einem normalen Steilheitsmaß von $n_H = 1$ angepasst werden (Tab. 62, Seite 136).

Nach Vorbehandlung der CHO-M3-Zellen mit PTX und CTX unterschieden sich die pharmakologischen Kennzahlen Wirksamkeit (pEC_{50}) und E_{max} -Wert der Hybridliganden nicht von denen unter Kontrollbedingungen (Tab. 60, Seite 135 und Tab. 61, Seite 136). Da die maximale, Iperoxo-vermittelte Rezeptoraktivierung durch die G-Proteinmodulatoren im Vergleich zum Kontrollsignal reduziert wurde (Tab. 61, Seite 136), musste berücksichtigt werden, dass bei der vorgenommenen Normierung dadurch die Gq-vermittelte intrinsische Aktivität der dualsterischen Substanzen hätte unterschätzt werden können. Normierte man die sich nach PTX und CTX-Vorstimulation ergebenden Kurven von Iper-6-phthal und Iper-6-naph auf die unter gleichen Bedingungen aufgenommene Iperoxokurve, wiesen die Substanzen E_{max} -Werte von $65 \pm 4\%$ (Iper-6-phthal) und $50 \pm 8\%$ (Iper-6-naph) auf (Tab. 63, Seite 137). Diese Werte unterschieden sich nicht von denen, die unter Kontrollbedingungen ermittelt worden waren ($59 \pm 5\%$ für Iper-6-phthal und $43 \pm 7\%$ für Iper-6-

naph; Tab. 61, Seite 136; t-Test, $p > 0,05$). Somit spiegelte bezüglich des E_{max} -Wertes das Kontrollsignal die Gq-Aktivierung der dualsterischen Substanzen am M3-Wildtyprezeptor wider.

Im Gegensatz dazu zeigten die eingesetzten Agonisten in CHO M3 W526A-Zellen eine im Vergleich zu Kontrollbedingungen erhöhte intrinsische Aktivität, wenn der Gi-Weg blockiert und der Gs-Weg maskiert wurde. Dieses Phänomen sollte in Kapitel 4.4.3 näher untersucht werden.

Es zeigte sich, dass durch die Mutation Trp 7.35 zu Alanin die Wirksamkeiten aller eingesetzten Agonisten auf dem Gq-Weg verringert wurde (Tab. 60). Durch die höhere Expression des punktmutierten M3-Rezeptors (Kapitel 4.3.1) wurde diese Reduktion eher noch unterschätzt.

		pEC ₅₀ ± S.E.M (n)	
		Kontrolle	+ PTX + CTX (Gq)
M3	Iperoxo	8,36 ± 0,11 (5)	8,89 ± 0,10 (4)*
	Iper-6-phthal	5,11 ± 0,09 (6)	5,52 ± 0,17 (5) ^{NS}
	Iper-6-naph	5,10 ± 0,16 (6)	5,41 ± 0,16 (5) ^{NS}
M3 W526A	Iperoxo	6,59 ± 0,15 (5) ^{###}	6,66 ± 0,10 (7) ^{NS,###}
	Iper-6-phthal	4,25 ± 0,17 (6) ^{###}	4,10 ± 0,15 (7) ^{NS,###}
	Iper-6-naph	4,64 ± 0,14 (6) ^{n.s.}	4,26 ± 0,09 (7) ^{*,###}

Tab. 60: Wirksamkeiten (pEC₅₀) von Iperoxo, Iper-6-phthal und Iper-6-naph in CHO-M3- und CHO-M3 W526A-Zellen unter Kontrollbedingungen und nach Vorbehandlung mit PTX und CTX. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Im Falle der Kurven von Iper-6-naph unter Kontrollbedingungen und beiden Hybrids-substanzen nach Vorbehandlung mit PTX und CTX in CHO-M3-Zellen entspringt die Kenngröße pEC₅₀-Wert einer Kurvenanpassung mit einem Hillkoeffizienten von 1. Im Falle der Kurven beider Hybrids-substanzen unter Kontrollbedingungen und aller drei Agonisten nach Vorbehandlung mit PTX und CTX in CHO-M3 W526A-Zellen entspringt die Kenngröße pEC₅₀-Wert einer Kurvenanpassung mit einem Hillkoeffizienten von 1. *: Signifikanter Unterschied zum Wert unter Kontrollbedingungen (t-Test, * $p < 0,05$). ^{NS}: Nicht signifikant verschieden vom Wert unter Kontrollbedingungen (t-Test, $p > 0,05$). ^{###}: Signifikanter Unterschied zum Wert des M3-Rezeptors (Two-way ANOVA, Bonferroni's post-Test, ^{###} $p < 0,001$). ^{n.s.}: Nicht signifikant verschieden vom Wert des M3-Rezeptors (Two-way ANOVA, Bonferroni's post-Test, $p > 0,05$)

		Emax (%) ± S.E.M (n)	
		Kontrolle	+ PTX + CTX (Gq)
M3	Iperoxo	100 ± 0 (5)	72 ± 7 (5) [*]
	Iper-6-phthal	59 ± 5 (6)	54 ± 6 (5) ^{NS}
	Iper-6-naph	43 ± 7 (6)	40 ± 4 (5) ^{NS}
M3 W526A	Iperoxo	100 ± 0 (5)	166 ± 20 (7) [*]
	Iper-6-phthal	41 ± 7 (6)	85 ± 13 (7) [*]
	Iper-6-naph	21 ± 4 (6)	64 ± 11 (7) ^{**}

Tab. 61: Maximale dynamische Massenumverteilung nach Aktivierung durch Iperoxo, Iper-6-phthal und Iper-6-naph in CHO-M3- und CHO-M3 W526A-Zellen unter Kontrollbedingungen und nach Vorbehandlung mit PTX und CTX. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler. Emax: Maximale Zellantwort, normiert auf den durch Iperoxo ermittelten Wert unter Kontrollbedingungen. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Im Falle der Kurven von Iper-6-naph unter Kontrollbedingungen und beiden Hybridssubstanzen nach Vorbehandlung mit PTX und CTX in CHO-M3-Zellen entspringt die Kenngröße Emax-Wert einer Kurvenanpassung mit einem Hillkoeffizienten von 1. Im Falle der Kurven beider Hybridssubstanzen unter Kontrollbedingungen und aller drei Agonisten nach Vorbehandlung mit PTX und CTX in CHO-M3 W526A-Zellen entspringt die Kenngröße Emax-Wert einer Kurvenanpassung mit einem Hillkoeffizienten von 1. ^{**}: Signifikanter Unterschied zum Wert unter Kontrollbedingungen (t-Test, p < 0,01, 0,05). ^{NS}: Nicht signifikant verschieden vom Wert unter Kontrollbedingungen (t-Test, p > 0,05)

		n _H	
		Kontrolle	+ PTX + CTX (Gq)
M3	Iperoxo	0,61 ± 0,04 (5) [#]	0,55 ± 0,11 (5) [#]
	Iper-6-phthal	0,59 ± 0,12 (6) [#]	0,61 ± 0,15 (5) ^{n.s.}
	Iper-6-naph	0,52 ± 0,18 (6) ^{n.s.}	0,76 ± 0,21 (5) ^{n.s.}
M3 W526A	Iperoxo	0,61 ± 0,05 (5) [#]	0,59 ± 0,14 (7) ^{n.s.}
	Iper-6-phthal	0,72 ± 0,16 (6) ^{n.s.}	0,86 ± 0,19 (7) ^{n.s.}
	Iper-6-naph	0,71 ± 0,20 (6) ^{n.s.}	0,77 ± 0,24 (7) ^{n.s.}

Tab. 62: Hillkoeffizienten (n_H) als Maß für die Steilheiten der Kurven aus Abb. 42. [#]: Signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß n_H = 1 (F-Test, p < 0,05). ^{n.s.}: Nicht signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß n_H = 1 (F-Test, p > 0,05)

Im Folgenden sollte eine direkte Gegenüberstellung der Gq-vermittelten M3-Wildtyp- sowie M3 W526A-Aktivierung durch die dualsterischen Substanzen aufgezeigt werden. Dafür wurden die Kurven aus Abb. 42 B und D (Seite 134) auf das jeweilige, durch Iperoxo induzierte Signal normiert.

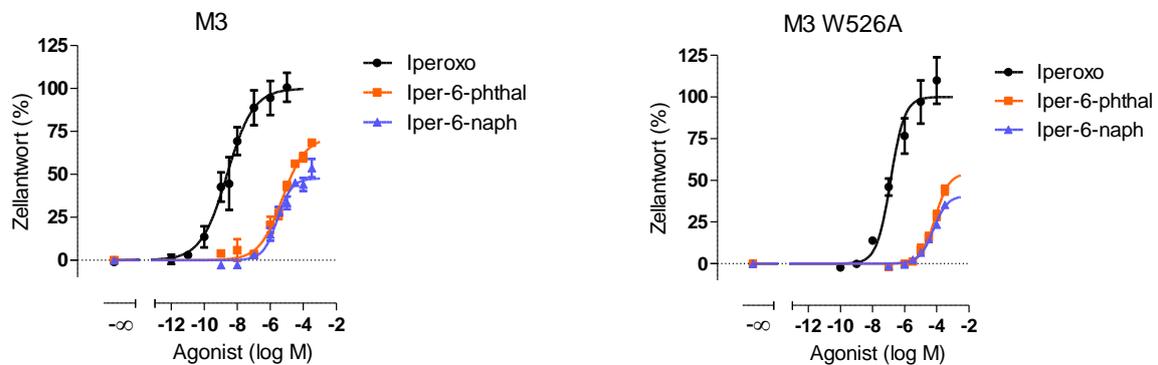


Abb. 43: Dynamische Massenumverteilung nach Aktivierung durch Iperoxo, Iper-6-phthal und Iper-6-naph in CHO-M3- (links) und CHO-M3 W526A-Zellen (rechts) nach Vorbehandlung mit PTX und CTX. Die Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus mindestens fünf unabhängigen Experimenten in Doppel- oder Dreifachbestimmung. Ordinate: Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht den jeweiligen unteren Plateaus der Konzentrations-Effekt-Kurven, 100 % ist das obere Plateau der Iperoxokurve der jeweiligen Zelllinie. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration

	Emax (%) \pm S.E.M. (n)	
	M3	M3 W526A
Iper-6-phthal	65 \pm 4 (5)	53 \pm 5 (7) ^{NS}
Iper-6-naph	50 \pm 8 (5) ^{n.s.}	39 \pm 4 (7) ^{NS,+}

Tab. 63: Maximale dynamische Massenumverteilung nach Aktivierung durch Iper-6-phthal und Iper-6-naph in CHO-M3- und CHO-M3 W526A-Zellen nach Vorbehandlung mit PTX und CTX. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler. Emax: Maximale Zellantwort, normiert auf den durch Iperoxo ermittelten Wert der jeweiligen Zelllinie. n: Anzahl unabhängiger Experimente. ^{NS}: Nicht signifikant verschieden vom Wert des M3-Wildtyprezeptors (t-Test, $p > 0,05$). ⁺: Signifikant verschieden zum Wert von Iper-6-phthal (t-Test, $p < 0,05$). ^{n.s.}: Nicht signifikant verschieden von jeweiliger Iper-6-phthal-Kenngröße (t-Test, $p > 0,05$)

Während die intrinsische Aktivität von Iper-6-phthal derjenigen von Iper-6-naph in CHO-M3-W526A-Zellen überlegen war, wies sie in CHO-M3-Zellen keinen Unterschied zu Iper-6-naph auf (Tab. 63). Die Wirksamkeiten unterschieden sich jeweils nicht voneinander (M3-Rezeptor: pEC_{50} von Iper-6-phthal $5,52 \pm 0,17$ und Iper-6-naph $5,41 \pm 0,16$ ^{NS} (t-Test, $p > 0,05$); M3 W526A-Rezeptor: pEC_{50} von Iper-6-phthal $4,10 \pm 0,15$ und Iper-6-naph $4,26 \pm 0,09$ ^{NS} (t-Test $p > 0,05$); Tab. 60, Seite 135). Für den M2- und den M4-Rezeptor konnte dies auf dem präferenziellen Signalweg (Gi) ebenfalls von Kebig (Dissertationsschrift, 2010) und Janßen (Dissertationsschrift, 2011) beobachtet werden. In Kapitel 4.4.4.5 (Tab. 82, Seite 159) wurde diese Beobachtung ebenfalls bei der Detektion agonistvermittelter Generierung von intrazellulärem IP1 gemacht.

Die Mutation von Trp 7.35 zu Alanin hatte keinen Einfluss auf den Gq-vermittelten Emax-Wert der dualsterischen Liganden. Im Gegensatz dazu beobachteten Bock et al. (2012) in DMR-Untersuchungen mit CHO-M2- und CHO-M2 W422A-Zellen, dass der Emax-Wert der dualsterischen Liganden sowohl auf dem Gi- als auch auf dem Gs-Weg durch die Mutation Trp 7.35 \rightarrow Ala erhöht wurde.

Eine korrekte Aussage darüber, in welchem Ausmaß die Mutation am M3-Rezeptor die Rezeptoraktivierung durch Iperoxo und durch die dualsterischen Liganden beeinflusst hatte, war durch das unterschiedliche Expressionsniveau der beiden Zelllinien erschwert (Kapitel 4.3.1). Wie in Kapitel 4.2.3.1 wurden deshalb die Datenpunkte aus den Untersuchungen der dynamischen Massenumverteilung mit dem *operational model of agonism* (Black und Leff, 1983) analysiert und der Kopplungsparameter τ bzw. $\log \tau$ bestimmt. Zur Korrektur des Parameters für die M3 W526A-Mutante wurde folgende Gleichung angewendet:

$$\log \tau_{\text{korr}} = \log \tau + \log 0,58$$

	log τ Gq \pm S.E.M. (n)		
	M3	M3 W526A	M3 W526A _{korr}
Iperoxo	1,51 \pm 0,23 (4)	0,98 \pm 0,09 (7) [*]	0,74 \pm 0,09 (7) ^{**}
Iper-6-phthal	0,21 \pm 0,05 (5)	0,10 \pm 0,06 (7) ^{NS}	-0,14 \pm 0,06 (7) ^{**}
Iper-6-naph	-0,09 \pm 0,06 (5) ^{**}	-0,19 \pm 0,06 (7) ^{NS,**}	-0,43 \pm 0,06 (7) ^{**,**}

Tab. 64: Kopplungsparameter log τ von Iperoxo, Iper-6-phthal und Iper-6-naph auf Grundlage von Messungen der dynamischen Massenumverteilung nach Vorbehandlung mit PTX und CTX. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Der Zusatz „korr.“ bezeichnet die Transformation des Kopplungsparameters log τ durch den Expressionskorrekturfaktor 0,58 zu log τ_{korr} . ^{*}: Signifikanter Unterschied zum Wert von Iper-6-phthal (t-Test, ^{**} p < 0,01). ^{**}: Signifikanter Unterschied zum Wert des M3-Wildtyprezeptors (One-way ANOVA, Dunnett's post-Test, ^{**} p < 0,01, 0,05). ^{NS}: Nicht signifikant verschieden vom Wert des M3-Wildtyprezeptors (One-way ANOVA, Dunnett's post-Test, p > 0,05)

Konnte für den M3-Wildtyprezeptor anhand der pharmakologischen Kenngrößen keine Überlegenheit des einen über den anderen Agonisten aufgedeckt werden, erzielte Iper-6-phthal eine höhere Kopplungseffizienz als Iper-6-naph (Tab. 64). Somit konnte für beide Rezeptoren gezeigt werden, dass Iper-6-phthal der stärkere Agonist auf dem präferenziellen Kopplungsweg (Gq) ist. Dies konnten Bock et al. (2012) und Bock et al. (2014) für den M2-Rezeptor auf dem bei diesem Subtyp favorisierten Gi-Weg ebenfalls beobachten.

Es fiel auf, dass im Vergleich zum Wildtyprezeptor der punktmutierte M3-Rezeptor nur mit Iperoxo, nicht aber mit den dualsterischen Substanzen eine Reduktion der Kopplungseffizienz aufwies. Nach Korrektur um den Expressionsfaktor reduzierten sich die log τ -Werte der Hybridliganden signifikant (Tab. 64). Somit war gezeigt worden, dass die Mutation Trp 7.35 zu Alanin im M3-Rezeptor zu einer Reduktion der Kopplungseffizienz von Iperoxo, Iper-6-phthal und Iper-6-naph als Maßzahl der intrinsischen Aktivität führte. Das Epitop erwies sich demnach als förderlich für die Aktivierung des M3-Rezeptors durch die getesteten Agonisten auf dem präferenziellen Kopplungsweg. Im Gegensatz dazu hatte Trp 7.35 im M2-Rezeptor eine negative Auswirkung auf die Gi-vermittelte Kopplungseffizienz des M2-Rezeptors (Bock et al., 2012).

Zur Absicherung der für den M3-Rezeptor gefundenen Ergebnisse sollte die Trp 7.35-abhängige Aktivierung durch Iper-6-phthal und Iper-6-naph auch in einem die IP1-Generierung detektierenden Messsystem überprüft werden (Kapitel 4.4.4.5).

4.3.6 Trp 7.35 ist für die Gs-vermittelte Ganzzellantwort von Iper-6-phthal und Iper-6-naph am muskarinischen M3-Rezeptor förderlich

Nach der Betrachtung der Gq-Aktivierung durch die Hybridliganden im vorangegangenen Kapitel sollte nun getestet werden, welchen Einfluss die Punktmutation Trp 7.35 zu Alanin auf die Aktivierung des sekundär favorisierten G-Protein-vermittelten Signalwegs im muskarinischen M3-Rezeptor aufwies.

Wie in Kapitel 4.3.4 gezeigt werden konnte, waren die dualsterischen Liganden in der Lage, den M3-Wildtyprezeptor sowie die M3 W526A-Mutante außer über Gq- ebenfalls über stimulatorische G-Proteine zu aktivieren (Tab. 56, Seite 130). Deshalb wurden die den jeweiligen Rezeptor exprimierenden CHO-Zellen mit QIC und PTX vorbehandelt, sodass nach Ausschaltung von Gq- und Gi-Proteinen ausschließlich Gs-vermittelte Effekte detektierbar waren.

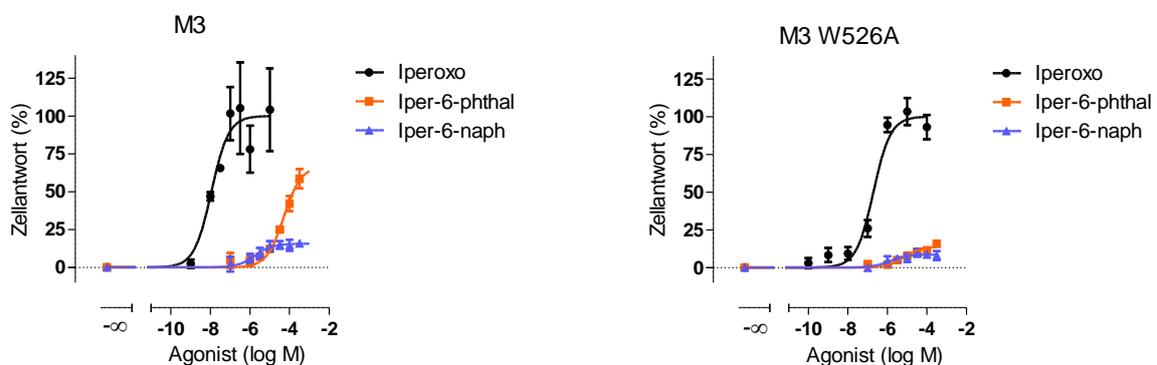


Abb. 44: Dynamische Massenumverteilung nach Aktivierung durch Iperoxo, Iper-6-phthal und Iper-6-naph in CHO-M3- (links) und CHO-M3 W526A-Zellen (rechts) nach Vorbehandlung mit QIC und PTX. Die Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus mindestens vier unabhängigen Experimenten in Doppel- oder Dreifachbestimmung. Ordinate: Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht den jeweiligen unteren Plateaus der Konzentrations-Effekt-Kurven, 100 % ist das obere Plateau der Iperoxokurve der jeweiligen Zelllinie. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration

		M3	M3 W526A
Iper-6-phthal	Emax (%)	71 ± 10	14 ± 2 ⁺⁺⁺
	pEC ₅₀	4,26 ± 0,12	5,15 ± 0,14 ⁺⁺
	n _H	0,68 ± 0,18 ^{n.s.}	0,45 ± 0,18 ^{n.s.}
	n	4	6
Iper-6-naph	Emax (%)	16 ± 2 ^{**}	11 ± 1 ^{NS,+}
	pEC ₅₀	5,78 ± 0,47 [*]	5,79 ± 0,25 ^{NS,§}
	n _H	0,89 ± 0,57 ^{n.s.}	0,92 ± 0,80 ^{n.s.}
	n	4	6

Tab. 65: Kenngrößen der Iperoxo-, Iper-6-phthal- und Iper-6-naph- induzierten dynamischen Massenumverteilung in CHO-M3- und CHO-M3 W526A-Zellen nach Vorstimulation mit QIC und PTX. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler. Emax: Maximale Zellantwort, normiert auf den Wert von Iperoxo der jeweiligen Zelllinie. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus derjenigen Agonistkonzentration, die zu einer halbmaximalen Zellantwort führt. n_H: Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Die Kenngrößen pEC₅₀- und Emax-Wert entspringen einer Kurvenanpassung mit einem Hillkoeffizienten von 1. ^{**,*}: Signifikant verschieden von jeweiliger Iper-6-phthal-Kenngröße (t-Test, ^{***} p < 0,01, 0,05). ^{NS}: Nicht signifikant verschieden von jeweiliger Iper-6-phthal-Kenngröße (t-Test, p > 0,05). ⁺⁺⁺, ⁺⁺⁺: Signifikant verschieden von M3-Wildtyp-Kenngröße (t-Test, ⁺⁺⁺, ⁺⁺⁺ p < 0,001, 0,01, 0,05). [§]: Nicht signifikant verschieden von M3-Wildtyp-Kenngröße (t-Test, p > 0,05). ^{n.s.}: Nicht signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß n_H = 1 (F-Test, p > 0,05)

Während sich im M3-Wildtyprezeptor die dualsterischen Liganden in Bezug auf intrinsische Aktivität und Wirksamkeit (pEC₅₀) auf dem Gq- Weg annähernd ähnlich verhielten (Tab. 60, Seite 135 und Tab. 63, Seite 137), unterschieden sie sich auf dem hier dargestellten Signalweg der zweiten Wahl hinsichtlich ihrer pharmakologischen Kennzahlen (Tab. 65). Während Iper-6-phthal Iper-6-naph in Bezug auf den Emax-Wert überlegen war, konnte bei letzterem eine um 1,52 Dekaden höhere Wirksamkeit beobachtet werden. Die intrinsische Aktivität von Iper-6-phthal am punktmultierten M3-Rezeptor war gegenüber der M3-Wildtypkenngröße reduziert; der Emax-Wert von Iper-6-naph wurde durch die Punktmutation nicht verändert (Tab. 65). Während sich die Wirksamkeit von Iper-6-naph durch die Mutation Trp 7.35→Ala nicht signifikant veränderte, erhöhte sie sich in Bezug auf Iper-6-phthal um 0,89 Dekaden im Vergleich zum M3-Wildtyp.

Analog zu den Betrachtungen in Kapitel 4.3.5 sollte der Vergleich der Kopplungseffizienzen darüber Aufschluss geben, inwieweit sich die Hybridliganden untereinander an der jeweiligen Zelllinie unterschieden und vor allem, welchen Einfluss die Mutation von Trp 7.35 zu Alanin auf die Aktivierung des M3-Rezeptors auf dem Gs-Weg aufwies. Dabei wurde die gleiche Korrektur der Werte der M3 W526A-Mutante herangezogen wie in Kapitel 4.3.5.

$$\log \tau_{\text{korr}} = \log \tau + \log 0,58$$

	log τ Gs \pm S.E.M. (n)		
	M3	M3 W526A	M3 W526A _{korr}
Iperoxo	1,80 \pm 0,10 (3)	1,60 \pm 0,02 (4) [*]	1,36 \pm 0,02 (4) ^{***}
Iper-6-phthal	0,32 \pm 0,17 (4)	-0,81 \pm 0,06 (6) ^{***}	-1,05 \pm 0,06 (6) ^{***}
Iper-6-naph	-0,71 \pm 0,05 (4) ⁺⁺	-0,91 \pm 0,05 (6) ^{*,n.s.}	-1,15 \pm 0,05 (6) ^{***,n.s.}

Tab. 66: Kopplungsparameter log τ von Iperoxo, Iper-6-phthal und Iper-6-naph auf Grundlage von Messungen der dynamischen Massenumverteilung nach Vorbehandlung mit QIC und PTX. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Der Zusatz „korr.“ bezeichnet die Transformation des Kopplungsparameters log τ durch den Expressionskorrekturfaktor 0,58 zu log τ korr. ⁺⁺: Signifikanter Unterschied zum Wert von Iper-6-phthal (t-Test, ⁺⁺ p < 0,01). ^{n.s.}: Nicht signifikant verschieden vom Wert von Iper-6-phthal (t-Test, p > 0,05). ^{***}: Signifikanter Unterschied zum Wert des M3-Wildtyprezeptors (One-way ANOVA, Dunnett's post-Test, ^{***} p < 0,001, 0,05)

Auch auf dem Gs-Weg wies Iper-6-phthal am M3-Wildtyprezeptor eine höhere Kopplungseffizienz als Iper-6-naph auf (Tab. 66). Dies war für die Gq-Aktivierung ebenfalls gezeigt worden (Tab. 64, Seite 138). Dieser Unterschied war bei dem punktmultierten M3-Rezeptor nicht mehr zu beobachten. Es fiel auf, dass selbst ohne Einbeziehung des Korrekturfaktors die Kopplungseffizienzen der getesteten Agonisten durch die Mutation Trp 7.35 zu Alanin abnahmen. Damit bestätigte sich auch für den Signalweg der zweiten Wahl, dass sich das Epitop Trp 7.35 förderlich für die Aktivierung des muskarinischen M3-Rezeptors auswirkte. Im Gegensatz dazu konnten Bock et al. (2012) in Messungen der dynamischen Massenumverteilung in CHO-M2 W422A-Zellen eine Erhöhung des Gs-vermittelten Emax-Wertes im Vergleich zu CHO-M2-Zellen beobachten; Trp 7.35 war also in diesem Subtyp als für die Aktivierung hinderliches Epitop charakterisiert worden.

Zur Absicherung der für den M3-Rezeptor gefundenen Ergebnisse sollte die Trp 7.35-abhängige Aktivierung durch Iper-6-phthal und Iper-6-naph in einem die cAMP-Generierung detektierenden Messsystem überprüft werden (Kapitel 4.5.3).

4.4 Messung des intrazellulären IP1-Gehaltes (IP1-Assay)

Die Generierung sekundärer Botenstoffe als Folge einer Rezeptoraktivierung lässt sich durch geeignete Messsysteme quantifizieren und stellt somit ein wertvolles Werkzeug in der Charakterisierung von Agonisten und gegebenenfalls inversen Agonisten bzw. deren intrazellulär in Gang gesetzten Signalkaskaden dar. Der in Kapitel 3.3.4 beschriebene IP1-Assay, bei dem Inositol-1-phosphat als Surrogatgröße für das durch Phospholipase C-Aktivierung entstehende Inositoltriphosphat durch eine Antikörperreaktion detektiert wird (Trinquet et al., 2006), sollte in vorliegender Arbeit als funktioneller Assay für den M3-Rezeptor angewendet werden. In der Abfolge der durch Rezeptoraktivierung in Gang gesetzten Transduktionsvorgänge greift dieses Messsystem zwischen der „vorgeschalteten“ G-Proteinaktivierung (³⁵S]GTP γ S-Assay) und der „nachgeschalteten“ dynamischen Massenumverteilung (DMR) die Generierung des sekundären Botenstoffs IP3 ab. Auf diese Weise unterliegen die hier beobachteten Ergebnisse bereits einer Signalamplifikation.

4.4.1 Im IP1-Versuch führt Acetylcholin zu einer Rezeptor-vermittelten Generierung von IP1 in CHO-M3-Zellen

Zur Validierung des Messsystems sollte zunächst getestet werden, ob die erhaltenen Signale nach Agoniststimulation in diesem Versuchsansatz durch den jeweilig transfizierten Rezeptor zustande

kamen, oder ob die verwendeten CHO-Zellen unspezifische Signale beisteuerten, die die Interpretation der Beobachtungen hätten erschweren können. Daher wurden untransfizierte CHO- und CHO-M3-Zellen mit Acetylcholin stimuliert und im IP1-Versuch vermessen.

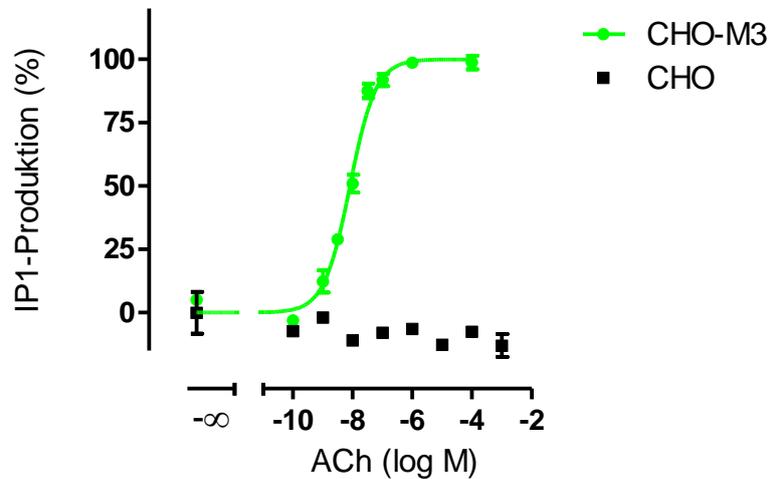


Abb. 45: Generierung von intrazellulärem IP1 durch Acetylcholin in untransfizierten CHO- und in CHO-M3-Zellen. Die Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Experimenten in Zwei- bis Dreifachbestimmung. Ordinate: Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht den jeweiligen unteren Plateaus der Konzentrations-Effekt-Kurven, 100 % ist das obere Plateau der Acetylcholinkurve der CHO-M3-Zellen. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration

Untransfizierte CHO-Zellen vermittelten im gewählten Versuchsansatz kein messbares Signal. Dies bestätigt die Beobachtungen von Trinquet et al. (2006) und Peters (Masterarbeit, 2010). Mit der cDNA des humanen M3-Rezeptors stabil transfizierte Zellen erhöhten konzentrationsabhängig den Gehalt an intrazellulärem IP1. An keinem der in dieser Arbeit getesteten Rezeptoren wurde in diesem Versuch eine konstitutive Rezeptoraktivität beobachtet (Kapitel 8.5.1: Abb. 72, Seite 221). Die Kurve konnte mit einem Hill-Koeffizienten von 1 angepasst werden ($n_H = 1,04 \pm 0,08$, ^{n.s.} von 1, F-test, $p > 0,05$) und es ergab sich ein pEC_{50} -Wert von $8,08 \pm 0,07$, der in drei unabhängigen Experimenten bestimmt wurde. Die hier ermittelte Wirksamkeit des Acetylcholins am M3-Rezeptor wich damit ca. um den Faktor 10 von der ab, die Janßen (Dissertationsschrift, 2011) bestimmte ($pEC_{50} 7,02 \pm 0,07$ (3)). Im Gegensatz zur zitierten Arbeit wurde in den bei der vorliegenden Studie dargestellten Experimenten ein Einzelklon von CHO-M3-Zellen verwendet, der möglicherweise eine höhere Expressionsdichte zeigte. In einem Radioaktivassay zur Bestimmung von Inositolphosphaten ermittelten Stahl et al. (2011) einen pEC_{50} -Wert von Acetylcholin von $7,40 \pm 0,04$, was in der gleichen Größenordnung wie der hier ermittelte Messwert lag.

Zusammen mit den Ergebnissen aus Kapitel 8.5.1, aus denen hervorging, dass durch eine Vorbehandlung mit dem muskarinischen Antagonisten Atropin kein Acetylcholinsignal mehr detektierbar war, konnte geschlossen werden, dass das resultierende Messsignal von CHO-M3-Zellen auf die M3-Rezeptor-vermittelte Generierung von intrazellulärem IP1 zurückzuführen war.

4.4.2 Das M3-Rezeptor-Signal im IP1-Versuch ist Gq-vermittelt

Der sekundäre Botenstoff Inositoltriphosphat entsteht neben Diacylglycerol aus der durch Phospholipase C katalysierten Spaltung von Phosphatidylinositolbisphosphat. Die Aktivierung der Phospholipase C kann durch $G\alpha_q$ -Proteine und durch $G\beta\gamma$ -Untereinheiten erfolgen (Exton, 1996;

Rhee et al., 2001). In der Literatur finden sich vielfältige Belege dafür, dass der M3-Rezeptor in der Lage ist, sowohl Gq- als auch Gi-Proteine zu aktivieren (Hulme et al., 1990; Offermanns et al., 1994; Burford et al., 1995a; Nahorski et al., 1997). Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte dies anhand von DMR-Untersuchungen bestätigt werden (Kapitel 4.3). Schmidt et al. (1996) fanden, dass die M3-vermittelte Aktivierung der Phospholipase C teilweise PTX-sensitiv war und schlossen somit auf eine Beteiligung von Gi-Proteinen. Es sollte daher untersucht werden, ob es mittels des IP1-Assays möglich war, die am Agonist-induzierten Signal beteiligten G-Protein-vermittelten Effekte zu detektieren. Es wurde in der Vergangenheit entdeckt, dass auch der M2-Rezeptor Signalwegspromiskuität in Bezug auf Gi- und Gq- Aktivierungen zeigte (Caulfield und Birdsall, 1998; Mistry et al., 2005; Michal et al., 2007) und dieser Subtyp eine PTX-sensitive Erhöhung von Inositolphosphaten vermittelte (Katz et al., 1992; Wess, 1996). Darum wurde der M2-Rezeptor als Kontrolle mitgeführt.

Zunächst wurden CHO-M3 und CHO-M2-Zellen mit und ohne PTX-Vorbehandlung eingesetzt und die Acetylcholin-vermittelte Zellantwort bestimmt.

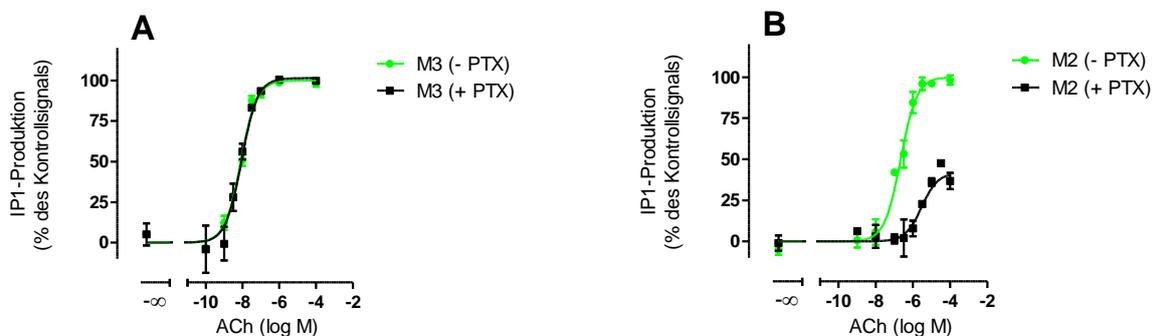


Abb. 46: Generierung von intrazellulärem IP1 durch Acetylcholin in CHO-M3- (A) und CHO-M2-Zellen (B) ohne und mit PTX-Vorbehandlung. Die Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei bis vier unabhängigen Experimenten in Zwei- bis Dreifachbestimmung. Ordinate: Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht den jeweiligen unteren Plateaus der Konzentrations-Effekt-Kurven, 100 % ist das jeweilige obere Plateau der Acetylcholinkurve unter Kontrollbedingungen. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration

Alle Kurven konnten mit einer normalen Steilheit angepasst werden (Tab. 67). Die Acetylcholinkurven, die mit CHO-M3-Zellen mit und ohne PTX-Vorbehandlung aufgenommen wurden, waren nahezu deckungsgleich (Abb. 46, A).

		- PTX	+ PTX
M3	Emax (%)	100	101 ± 4 ^{NS}
	pEC ₅₀	8,08 ± 0,07	8,06 ± 0,09 ^{NS}
	n _H	1,04 ± 0,08 ^{n.s.}	1,27 ± 0,26 ^{n.s.}
	n	3	3
M2	Emax (%)	100	42 ± 4 ^{***}
	pEC ₅₀	6,66 ± 0,07 ⁺⁺⁺	5,54 ± 0,18 ^{**,+++}
	n _H	0,96 ± 0,15 ^{n.s.}	1,64 ± 0,68 ^{n.s.}
	n	4	4

Tab. 67: Kenngrößen des Acetylcholin-induzierten Anstiegs von intrazellulärem IP1 in CHO-M3- und CHO-M2 –Zellen mit und ohne PTX-Vorbehandlung. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler. Emax: Maximale Zellantwort, normiert auf den jeweiligen Wert unter Kontrollbedingungen (- PTX). pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus derjenigen Agonistkonzentration, die zu einer halbmaximalen Zellantwort führt. n_H: Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Die Kenngrößen pEC₅₀- und Emax-Wert entspringen Kurvenanpassungen mit einem Hill-Koeffizienten von 1. ^{n.s.}: Nicht signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß n_H = 1 (F-Test, p > 0,05). ^{***}: Signifikant verschieden vom jeweiligen Wert unter Kontrollbedingungen (- PTX) (t-Test, ^{***} p < 0,001, 0,01). ^{NS}: Nicht signifikant verschieden vom jeweiligen Wert unter Kontrollbedingungen (- PTX) (t-Test, p > 0,05). ⁺⁺⁺: Signifikant verschieden von jeweiliger M3-Kenngröße (t-Test, ⁺⁺⁺ p < 0,001)

In Bezug auf die Wirksamkeit (pEC₅₀) und den Emax-Wert unterschieden sich die beiden Kurven, die mit unvorbehandelten und PTX-behandelten CHO-M3-Zellen aufgenommen worden, nicht voneinander (Tab. 67). Die Ergebnisse ließen die Schlussfolgerung zu, dass kein messbarer Einfluss von Giβy-Effekten auf die Acetylcholin-induzierte Generierung von IP1 in CHO-M3-Zellen vorlag.

In Kapitel 8.5.2 wurde gezeigt, dass ein Pilocarpin-induziertes Messsignal von CHO-M3-Zellen ebenfalls nicht durch die Vorbehandlung mit PTX im Vergleich zu Kontrollbedingungen verändert wurde. Dies galt auch für die Acetylcholin- und Pilocarpin-induzierte Zellantwort in CHO-M3 W526A-Zellen (Abb. 73, Seite 222).

Demgegenüber reduzierten sich die Wirksamkeit und der Emax-Wert von Acetylcholin in CHO-M2-Zellen nach PTX-Vorstimulation signifikant im Vergleich zu Kontrollbedingungen (Tab. 67). Dies zeigte, dass Gi-vermittelte Effekte an der Generierung intrazellulären IP1 in CHO-M2-Zellen beteiligt waren.

Um zu verifizieren, dass die im IP1-Assay detektierten Signale die reine Gq-Aktivierung von M3-Rezeptoren widerspiegelte, wurde der Gq-Inhibitor QIC eingesetzt. Parallel wurde getestet, ob QIC einen Einfluss auf das in Abb. 46 B (dunkle Kurve) dargestellte M2-Signal ausübte.

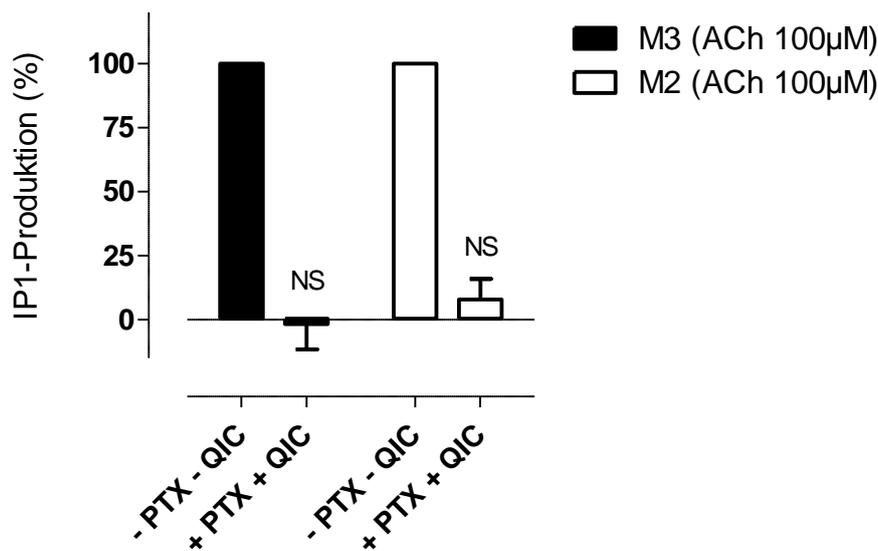


Abb. 47: Maximale Acetylcholin-vermittelte Generierung von IP1 in CHO-M3- und CHO-M2-Zellen unter Kontrollbedingungen und nach PTX- und QIC-Vorbehandlung (Acetylcholin: 100µM). Aufgeführt sind Mittelwerte \pm Standardfehler von drei bis fünf unabhängigen Experimenten in Doppel- oder Dreifachbestimmung. Ordinate: Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht dem jeweiligen Basalwert und 100 % entspricht dem durch Acetylcholin am jeweiligen Subtyp ermittelten Wert. Abszisse: Eingesetzte G-Protein-Modulatoren. NS: Nicht signifikant verschieden vom Basalwert (t-Test, $p > 0,05$)

In CHO-M3-Zellen führte die Vorbehandlung mit PTX und die Inhibition von Gq-Proteinen durch QIC zu einem nicht vom Basalwert verschiedenen Signal (Abb. 47). Damit lag die Schlussfolgerung nahe, dass dieses Messsystem die pure Gq-Aktivierung muskarinischer M3-Rezeptoren widerspiegelte.

Das in CHO-M2-Zellen detektierte Restsignal (Abb. 46 B), das Acetylcholin nach PTX-Vorbehandlung zu induzieren vermochte, konnte durch den zusätzlichen Einsatz des Gq-Inhibitors QIC vollständig aufgehoben werden (Abb. 47). Somit konnte gefolgert werden, dass die Bildung von IP1 durch M2-Rezeptoren Gq- und Gi-vermittelt war.

4.4.3 Die Ausschaltung / Maskierung von Gi- und Gs- Proteinen in CHO-M3 W526A-Zellen erhöht nicht die Iperoxo-, Iper-6-phthal- oder Iper-6-naph-induzierte Generierung von IP1

Die in Kapitel 4.3.5 dargestellten DMR-Experimente zeigten eine sich im Vergleich zu Kontrollbedingungen erhöhende intrinsische Aktivität von Iperoxo, Iper-6-phthal und Iper-6-naph in CHO-M3 W526A-Zellen, wenn der Gi-Weg mittels PTX inhibiert und gleichzeitig der Gs-Weg durch CTX maskiert wurde. Es sollte der Frage nachgegangen werden, ob dieser Effekt durch die Erhöhung von intrazellulärem IP3 zustande gekommen war. Dazu wurde der IP1-Gehalt in CHO-M3 W526A-Zellen nach Iperoxo-, Iper-6-phthal und Iper-6-naph-Stimulation unter Kontrollbedingungen und nach Vorbehandlung der Zellen mit PTX und CTX untersucht (Abb. 48).

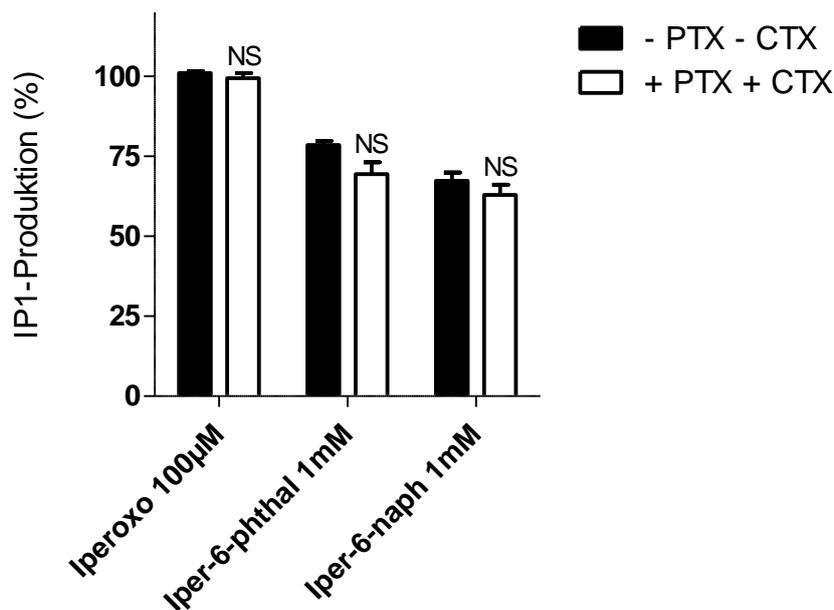


Abb. 48: Maximale agonistvermittelte Generierung von IP1 in CHO-M3 W526A-Zellen unter Kontrollbedingungen und nach PTX- und CTX-Vorbehandlung. Aufgeführt sind Mittelwerte \pm Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Ordinate: Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht dem Basalwert und 100 % entspricht dem durch 100µM Iperoxo vermittelten Wert. Abszisse: Eingesetzte Agonisten (Iperoxo: 100µM, Iper-6-phthal: 1mM, Iper-6-naph: 1mM). NS: Nicht signifikant verschieden vom jeweiligen Wert unter Kontrollbedingungen (t-Test, $p > 0,05$)

Eine Testung supramaximaler Konzentrationen von Iperoxo, Iper-6-phthal und Iper-6-naph auf die IP1-Generierung in CHO-M3 W526A-zellen ergab kein vom Kontrollwert verschiedenes Signal nach PTX- und CTX-Vorbehandlung. Es war somit keine Veränderung des Agonist-vermittelten, intrazellulären IP1-Gehaltes nach Ausschaltung von Gi- und Maskierung von Gs-Proteinen detektierbar. Das in Kapitel 4.3.5 (Tab. 61, Seite 136) beschriebene, erhöhte DMR-Signal nach Stimulation mit Iperoxo, Iper-6-phthal und Iper-6-naph dieser Zelllinie musste demnach einen anderen Ursprung als die vermehrte Bildung des hier untersuchten sekundären Botenstoffs aufweisen. Dies wurde in Kapitel 5.7 diskutiert.

4.4.4 Agonist-induzierte Generierung von intrazellulärem IP1 durch den muskarinischen M3-Rezeptor unter Berücksichtigung des Einflusses von Trp 7.35

4.4.4.1 Die in IP1-Experimenten verwendeten CHO-M3-Zellen exprimieren mehr Rezeptoren als CHO-M3 W526A-Zellen

Analog zu Kapitel 4.3.1 musste zum adäquaten Vergleich von Kennzahlen der Rezeptoraktivierung zwischen zwei Zelllinien das Expressionsverhältnis bekannt sein. Aus diesem Grund wurden auch hier homologe Konkurrenzexperimente an intakten CHO-M3 und CHO-M3 W526A-Zellen zur Bestimmung der Rezeptorzahl pro Zelle durchgeführt.

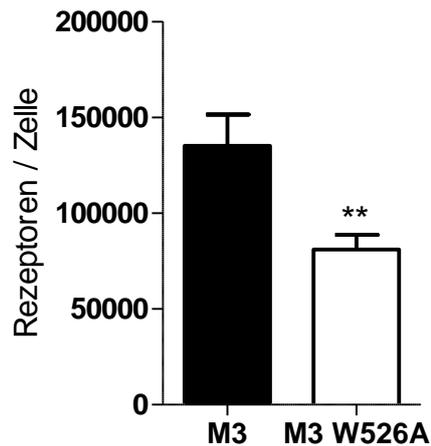


Abb. 49: Rezeptorexpressionsniveau der in IP1-Messungen verwendeten Zelllinien CHO-M3 und CHO-M3 W526A. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler von 30-31 unabhängigen Experimenten in Drei- bis Vierfachbestimmung. **: Signifikant verschieden vom Wert des Wildtyprezeptors (t-Test, $p < 0,01$)

Die CHO-M3-Zellen wiesen ein ähnliches Expressionsniveau wie bei den Messungen der dynamischen Massenumverteilung auf (135057 ± 16402 (31) Rezeptoren pro Zelle; nicht signifikant verschieden zur Expression von M3-Rezeptoren bei DMR-Messungen; t-Test, $p > 0,05$). Die Expression der M3 W526A-Mutante fiel in diesen Versuchsreihen geringer aus (81013 ± 7588 (30) Rezeptoren pro Zelle). Damit wies der M3-Wildtyp 167 % (Faktor 1,67) der Expression vom punktmutierten Rezeptor auf (Abb. 49).

4.4.4.2 M3 Trp 7.35 ist an der Acetylcholin- und Iperoxo-induzierten Generierung von IP1 beteiligt

Durch Testung von Acetylcholin und Iperoxo in diesem Messsystem hinsichtlich ihrer Fähigkeit, den M3- sowie den M3 W526A-Rezeptor zu aktivieren, sollte der in $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Messungen (Kapitel 4.2.3.1) gefundene Superagonismus von Iperoxo an diesem Subtyp auf dem präferenziellen Kopplungsweg überprüft und die Abhängigkeit dieser Eigenschaft vom Epitop Trp 7.35 untersucht werden. Abb. 50 stellt die Iperoxo- und Acetylcholin-induzierte Generierung von IP1 in CHO-M3- und CHO-M3 W526A-Zellen dar.

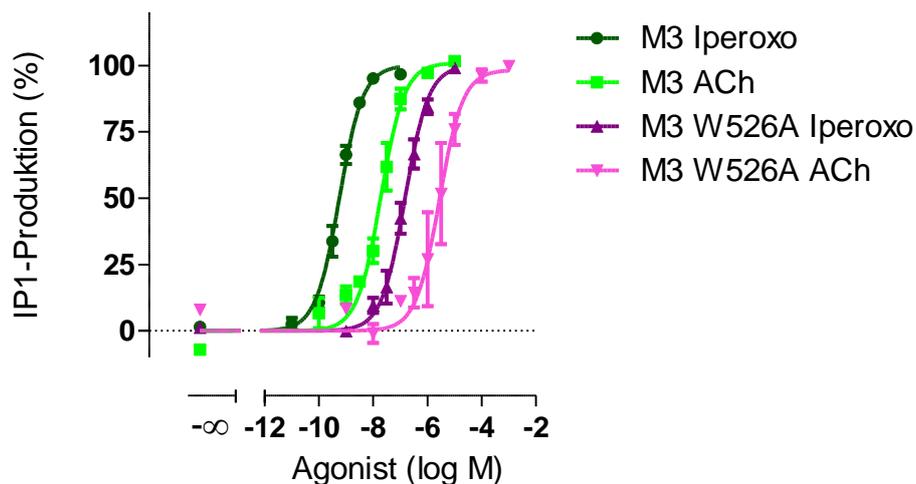


Abb. 50: Generierung von intrazellulärem IP1 durch Acetylcholin und Iperoxo in CHO- M3- und CHO-M3 W526A-Zellen. Die Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei bis sieben unabhängigen Experimenten in Zwei- bis Dreifachbestimmung. Ordinate: Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht den jeweiligen unteren Plateaus der Konzentrations-Effekt-Kurven, 100 % ist das jeweils obere Plateau der Iperoxokurven. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration

		M3	M3 W526A
Iperoxo	Emax (%)	100	100
	pEC ₅₀	9,25 \pm 0,03	6,83 \pm 0,04 ^{***}
	n _H	1,12 \pm 0,07 ^{n.s.}	0,93 \pm 0,09 ^{n.s.}
	n	5	7
Acetylcholin	Emax (%)	101 \pm 3 [§]	98 \pm 8 ^{NS,§}
	pEC ₅₀	7,72 \pm 0,06 ⁺⁺⁺	5,56 \pm 0,14 ^{***,+++}
	n _H	0,88 \pm 0,11 ^{n.s.}	0,86 \pm 0,27 ^{n.s.}
	n	3	3

Tab. 68: Kenngrößen des Iperoxo- und Acetylcholin- induzierten Anstiegs von intrazellulärem IP1 in CHO-M3- und CHO-M3 W526A -Zellen. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler. Emax: Maximale Zellantwort, normiert auf den jeweiligen Iperoxowert. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus derjenigen Agonistkonzentration, die zu einer halbmaximalen Zellantwort führt. n_H: Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Die Kenngrößen pEC₅₀- und Emax-Wert entspringen einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von 1. ^{n.s.}: Nicht signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß n_H = 1 (F-Test, p > 0,05). ^{***}: Signifikant verschieden vom jeweiligen Wert des M3-Wildtypes (t-Test, ^{***} p < 0,001). ^{NS}: Nicht signifikant verschieden vom Wert des M3-Wildtypes (t-Test, p > 0,05). ⁺⁺⁺: Signifikant verschieden von jeweiliger Iperoxokenngröße (t-Test, ⁺⁺⁺ p < 0,001). [§]: Nicht signifikant verschieden von jeweiliger Iperoxokenngröße (t-Test, p > 0,05)

Alle vier hier dargestellten Kurven konnten mit einem Steilheitsmaß von 1 angepasst werden (Tab. 68). Mittels eines t-Tests wurde verifiziert, dass sich das Maximum der Iperoxokurve, die mit dem punktmutierten M3-Rezeptor aufgenommen wurde, nicht signifikant von demjenigen des M3-

Wildtyprezeptors unterschied (t-Test, $p > 0,05$). Dies ist bei der hier dargestellten Normierung nicht ersichtlich.

Die Punktmutation führte zu einem Wirksamkeitsverlust beider Agonisten von über 2 Dekaden.

Acetylcholin und Iperoxo erreichten in beiden Zelllinien ein jeweils gleiches oberes Plateau. Dies stand im Gegensatz zu den Beobachtungen aus [³⁵S]GTPγS-Versuchen, bei denen die Emax-Werte des Iperoxo an M3- und M3 W526A-CHO-Zellmembranhomogenaten gegenüber denen von Acetylcholin erhöht waren (Kapitel 4.2.3.1, Abb. 23, Seite 106). Die hier gemachte Beobachtung ist möglicherweise auf die Rolle der Signalamplifikation zurückzuführen.

In Bezug auf die Wirksamkeiten erwies sich Iperoxo an beiden Rezeptoren dem Acetylcholin überlegen (Tab. 68). Da es sich um eine andere Messreihe der Acetylcholin-induzierten Generierung von IP1 in CHO-M3-Zellen handelte als in Kapitel 4.4.2, wich der hier ermittelte pEC₅₀-Wert von 7,72 ± 0,06 leicht von dem in Tab. 67 aufgeführten Wert von 8,08 ± 0,07 ab (t-Test, * $p < 0,05$). Für beide Messreihen galt jedoch, dass die Wirksamkeit des Acetylcholins im Vergleich zu der von Iperoxo reduziert war (t-Test, *** $p < 0,001$).

Neben der Betrachtung von pEC₅₀- und Emax-Werten diene die Ermittlung des Kopplungsparameters log τ dazu, eine Aussage darüber zu treffen, inwieweit die beiden Agonisten fähig waren, die Rezeptoren zu aktivieren.

	log τ IP1 ± S.E.M. (n)	
	Iperoxo	ACh
M3	2,17 ± 0,05 (5)	1,94 ± 0,07 (3) *
M3 W526A	1,54 ± 0,02 (7) ###	1,44 ± 0,02 (3) **,###

Tab. 69: Kopplungsparameter log τ von Iperoxo und Acetylcholin auf Grundlage des IP1-Assays an M3- und M3 W526A-Rezeptoren. Die Normierung der zugrunde gelegten Konzentrations-Effekt-Kurven erfolgte jeweils auf die Aktivierung durch Iperoxo. Die Daten sind Mittelwerte ± Standardfehler. n: Anzahl unabhängiger Experimente. **: Signifikanter verschieden zum jeweiligen Iperoxowert (t-Test, ** $p < 0,01, 0,05$). ###, **: Signifikant verschieden zum jeweiligen Wert des M3-Wildtyprezeptors (t-Test, ###, ** $p < 0,001, 0,01$)

Iperoxo erwies sich an M3- und M3 W526A-Rezeptoren als kopplungseffizienter als Acetylcholin (Tab. 69). Damit bestätigt sich für die reine Gq-Aktivierung dieser Rezeptoren, was anhand von [³⁵S]GTPγS-Assays (Tab. 42, Seite 108), bei dem die Signale sowohl Gi- als auch Gq-induziert waren, gezeigt werden konnte. Es wird daher geschlussfolgert, dass Iperoxo ein Superagonist an M3-Rezeptoren ist und diese Eigenschaft durch die Mutation Trp 7.35→Ala erhalten blieb.

Schrage et al. (2013) charakterisierten Iperoxo als Superagonist an M2-Rezeptoren unter anderem anhand einer im Vergleich zu Acetylcholin höheren Kopplungseffizienz. Im Unterschied zum Vorgehen in der vorliegenden Arbeit, bei der analog zu Bock et al. (2012) und Bock et al. (2014) bei der Analyse durch das *operational model of agonism* (Black und Leff, 1983) eine funktionelle Affinität der Agonisten in die Kurvenanpassung einging, gaben Schrage et al. (2013) in der Anpassung der Kurven an die Datenpunkte die zuvor in Radioligandbindungsuntersuchungen ermittelten Affinitäten der Liganden vor. Bei Anwendung dieser Auswertungsvariante ergaben sich folgende Kopplungseffizienzen von Iperoxo und Acetylcholin an M3- und M3 W526A-Rezeptoren.

log τ IP1 \pm S.E.M. (n)		
	Iperoxo	ACh
M3	3,93 \pm 0,17 (4)	3,40 \pm 0,11 (4) [*]
M3 W526A	2,98 \pm 0,12 (5) ^{###}	2,45 \pm 0,10 (5) ^{** ,###}

Tab. 70: Kopplungsparameter log τ von Iperoxo und Acetylcholin auf Grundlage des IP1-Assays an M3- und M3 W526A-Rezeptoren. Die Normierung der zugrunde gelegten Konzentrations-Effekt-Kurven erfolgte jeweils auf die Aktivierung durch Iperoxo. Zur Analyse wurden die Affinitäten beider Agonisten aus Radioligandbindungsuntersuchungen miteinbezogen (Tab. 28, Seite 83). Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler. n: Anzahl unabhängiger Experimente. ^{**}: Signifikant verschieden zum jeweiligen Iperoxowert (t-Test, ^{**} p < 0,01, 0,05). ^{###,###}: Signifikant verschieden vom jeweiligen Wert des M3-Wildtyprezeptors (t-Test, ^{###,###} p < 0,001, 0,01). Modifiziert nach „Iperoxo displays superagonism on muscarinic M3 receptors“; Vogel L., Schrage R., Holzgrabe U. und Mohr K.; Posterpräsentation zur DPhG-Jahrestagung 2013, Innsbruck

Die Kopplungseffizienzen von Acetylcholin waren an beiden Rezeptoren im Vergleich zu denen von Iperoxo reduziert (Tab. 70). Somit änderte die Auswertungsvariante nicht das Ergebnis, dass Iperoxo kopplungseffizienter als Acetylcholin an M3- und M3-W526A-Rezeptoren in diesem Messsystem war.

Die in Radioligandbindungsstudien gemessenen Affinitätsparameter waren im Vergleich zu den funktionellen Affinitätswerten aus dem *operational model of agonism* (Black und Leff, 1983) reduziert (Tab. 71).

		pK _{I/app}	pK _A (OP _{IP1})
Iperoxo	M3	5,04 \pm 0,09	7,06 \pm 0,03 ^{***}
	M3 W526A	4,22 \pm 0,07	5,28 \pm 0,13 ^{***}
Acetylcholin	M3	4,42 \pm 0,02	5,76 \pm 0,14 ^{***}
	M3 W526A	3,60 \pm 0,07	4,08 \pm 0,32 ^{NS}

Tab. 71: Vergleich von in Radioligandbindungsuntersuchungen ermittelten Affinitätsparametern (pK_{I/app}) (siehe Tab. 28, Seite 83) mit funktionellen Affinitätswerten (pK_A (OP_{IP1})) aus dem *operational model of agonism* von Iperoxo und Acetylcholin an M3- und M3 W526A-Rezeptoren. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler von drei bis sieben unabhängigen Versuchen in Zwei- bis Vierfachbestimmung. ^{***}: Signifikant verschieden vom jeweiligen pK_{I/app}-Wert (t-Test, ^{***} p < 0,001). ^{NS}: Nicht signifikant verschieden vom jeweiligen pK_{I/app}-Wert (t-Test, p > 0,05)

Im Falle von Acetylcholin am M3 W526A-Rezeptor war der Unterschied der beiden Affinitätsparameter statistisch nicht signifikant. In allen anderen Fällen wiesen die funktionellen Affinitäten höhere Werte auf als die in Radioligandbindungsstudien ermittelten Parameter (Tab. 71). Keov et al. (2014) konnten ebenfalls beobachten, dass die in Ihren Untersuchungen am M1-Rezeptor gefundenen funktionellen Affinitäten im Allgemeinen höhere Werte annahmen als die, die sie in Radioligandbindungsuntersuchungen ermittelt hatten. Die Autoren fanden jedoch heraus, dass diese Werte bis auf zwei Ausnahmen gut korrelierten. Sie schlussfolgerten daraus, dass der Unterschied der beiden Affinitätsparameter in aller Regel durch sich unterscheidende Versuchsbedingungen zwischen Bindungsexperimenten und funktionellen Assays zustande gekommen war. Für die Agonisten, bei denen eine solche Korrelation nicht beobachtet werden konnte, mutmaßten Keov et al. (2014), dass die funktionellen Affinitätswerte durch eine spezielle Rezeptorkonformation erhalten

wurden, die in Radioligandbindungsuntersuchungen so nicht detektiert werden konnte. Aus Tab. 71 war ersichtlich, dass der Abstand der beiden Affinitätswerte für Iperoxo deutlicher ausgeprägt war als für Acetylcholin. Dies konnte am Wildtyp und am punktmultierten Rezeptor beobachtet werden. Da die Bindungsuntersuchungen analog zum IP1-Assay in Puffer (L19) und an intakten Zellen durchgeführt wurden, lag der Schluss nahe, dass im vorliegenden Fall die durch das *operational model of agonism* (Black und Leff, 1983) erhaltenen Affinitätswerte eine andere Rezeptorkonformation widerspiegeln als die aus den Bindungsuntersuchungen. Möglicherweise machte sich hier der positive allosterische Effekt des Gq-Proteins bemerkbar.

Zur Beurteilung, ob Trp 7.35 einen Einfluss auf die M3-Aktivierung durch Iperoxo und Acetylcholin entfaltet, wurde wiederum durch Einsatz eines Korrekturfaktors aufzudecken versucht, ob die im Vergleich zum Wildtyp verminderten Kennzahlen Wirksamkeit (pEC_{50} , Tab. 68, Seite 148) und Kopplungseffizienz (Tab. 69, Seite 149; Tab. 70, Seite 150) durch die geringere Expressionsrate zustande kamen (Abb. 49, Seite 147) oder auf die Punktmutation zurückgeführt werden konnten. Die $\log \tau$ -Werte für M3 W526A aus Tab. 69 (Seite 149) wurden mit folgender Gleichung transformiert:

$$\log \tau_{\text{korr}} = \log \tau + \log 1,67$$

	log τ IP1 \pm S.E.M. (n)	
	M3	M3 W526A _{korr}
Iperoxo	2,17 \pm 0,05 (5)	1,76 \pm 0,02 (7) ***
Acetylcholin	1,94 \pm 0,07 (3)	1,65 \pm 0,02 (3) *

Tab. 72: Kopplungsparameter $\log \tau$ von Iperoxo und Acetylcholin auf Grundlage des IP1-Assays an M3- und M3 W526A-Rezeptoren. Die Normierung der zugrunde gelegten Konzentrations-Effekt-Kurven erfolgte jeweils auf die Aktivierung durch Iperoxo. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Der Zusatz „korr“ bezeichnet die Transformation des Kopplungsparameters $\log \tau$ durch den Expressionskorrekturfaktor $\log 1,67$ zu $\log \tau_{\text{korr}}$. ***: Signifikanter Unterschied zum jeweiligen Wert des M3-Wildtyprezeptors (t-Test, ***, * $p < 0,001, 0,05$)

Auch nach Berücksichtigung des Expressionsniveaus stellten sich die Kopplungseffizienzen beider Agonisten am M3 W526A-Rezeptor als niedriger im Vergleich zum Wildtyp dar (Tab. 72). Im [35 S]GTP γ S-Assay war dies mit Iperoxo nicht beobachtet worden (Kapitel 4.2.3.1: Tab. 43, Seite 109).

Auch mit der Auswertemethode, die die aus Radioligandbindungsuntersuchungen entnommenen Agonistaffinitäten mit einbezog, konnte die Abhängigkeit der M3-Aktivierung durch Acetylcholin und Iperoxo von Trp 7.35 bezüglich der Kopplungseffizienz beobachtet werden (Tab. 73).

	log τ IP1 \pm S.E.M. (n)	
	M3	M3 W526A _{korr}
Iperoxo	3,93 \pm 0,17 (4)	3,20 \pm 0,12 (5)**
Acetylcholin	3,40 \pm 0,11 (4)	2,67 \pm 0,10 (5)**

Tab. 73: Kopplungsparameter log τ von Iperoxo und Acetylcholin auf Grundlage des IP1-Assays an M3- und M3 W526A-Rezeptoren. Die Normierung der zugrunde gelegten Konzentrations-Effekt-Kurven erfolgte jeweils auf die Aktivierung durch Iperoxo. Zur Analyse wurden die Affinitäten beider Agonisten aus Radioligandbindungsuntersuchungen miteinbezogen (Tab. 28, Seite 83). Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Der Zusatz „korr“ bezeichnet die Transformation des Kopplungsparameters log τ durch den Expressionskorrekturfaktor log 1,67 zu log τ *korr*. **: Signifikanter Unterschied zum jeweiligen Wert des M3-Wildtyprezeptors (t-Test, ** p < 0,01)

Somit konnte angenommen werden, dass Trp 7.35 in diesem Messsystem ein für die Iperoxo- und Acetylcholin-induzierte Aktivierung des M3-Rezeptors wichtiges Epitop war.

4.4.4.3 M3 Trp 7.35 ist an der Pilocarpin-induzierten Generierung von IP1 beteiligt

Zur Überprüfung, ob die Rezeptoraktivierung von M3-Rezeptoren durch Partialagonisten ebenfalls von Trp 7.35 abhing, wurde Pilocarpin an M3- und M3 W526A-Rezeptoren im IP1-Assay eingesetzt. Diese Versuche wurden mit Zelllinien durchgeführt, deren Expressionsniveau um den Faktor 4,07 unterschiedlich war (Expressionslevel für CHO-M3- bzw. CHO-M3 W526A-Zellen: 423299 \pm 27743 (13) vs. 104105 \pm 6396 (9) Rezeptoren pro Zelle; t-Test, *** p < 0,001; Ermittlung durch homologe Konkurrenzexperimente mit intakten Zellen in Puffer (L19)). Darum wurde Acetylcholin als interne Referenz mitgeführt.

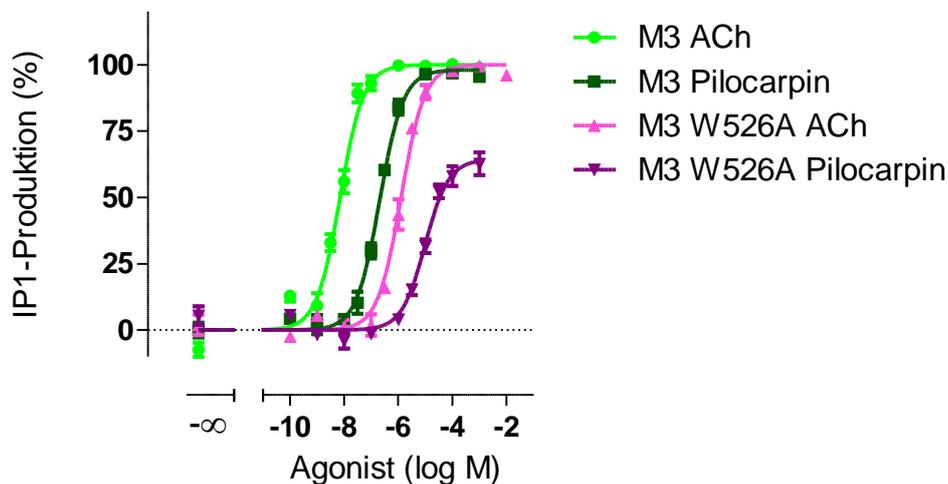


Abb. 51: Generierung von intrazellulärem IP1 durch Acetylcholin und Pilocarpin in CHO- M3- und CHO-M3 W526A-Zellen. Die Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus vier bis sechs unabhängigen Experimenten in Zwei- bis Dreifachbestimmung. Ordinate: Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht den jeweiligen unteren Plateaus der Konzentrations-Effekt-Kurven, 100 % ist das jeweils obere Plateau der Acetylcholinkurven. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration

Alle in Abb. 51 dargestellten Kurven wiesen eine normale Kurvensteilheit auf (Tab. 74). Mittels eines t-Tests wurde verifiziert, dass sich die oberen Plateaus der Acetylcholinkurven des M3-Wildtypes sowie der M3 W526A-Mutante nicht unterschieden (t-Test, p > 0,05). Dies ging aus Abb. 51 nicht

hervor. Damit wiederholte sich die Beobachtung aus Abb. 50 (Seite 148), dass Acetylcholin am M3-Wildtyp und an der M3 W526A-Mutante das gleiche Maximum erreichten.

		M3	M3 W526A
Acetylcholin	Emax (%)	100	100
	pEC ₅₀	8,15 ± 0,04	5,89 ± 0,04 ^{***}
	n _H	1,05 ± 0,10 ^{n.s.}	1,19 ± 0,12 ^{n.s.}
	n	6	4
Pilocarpin	Emax (%)	98 ± 1 [§]	64 ± 2 ^{***,+++}
	pEC ₅₀	6,68 ± 0,03 ⁺⁺⁺	5,01 ± 0,07 ^{***,+++}
	n _H	1,14 ± 0,08 ^{n.s.}	1,17 ± 0,17 ^{n.s.}
	n	6	6

Tab. 74: Kenngrößen des acetylcholin- und pilocarpininduzierten Anstiegs von intrazellulärem IP1 in CHO-M3- und CHO-M3 W526A -Zellen. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler. Emax: Maximale Zellantwort, normiert auf den jeweiligen Acetylcholinwert. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus derjenigen Agonistkonzentration, die zu einer halbmaximalen Zellantwort führt. n_H: Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Die Kenngrößen pEC₅₀- und Emax-Wert entspringen Kurvenanpassungen mit einem Hill-Koeffizienten von 1. ^{n.s.}: Nicht signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß n_H = 1 (F-Test, p > 0,05). ^{***}: Signifikant verschieden vom jeweiligen Wert des M3-Wildtypes (t-Test, ^{***} p < 0,001). ⁺⁺⁺: Signifikant verschieden von jeweiliger Acetylcholinkenngröße (t-Test, ⁺⁺⁺ p < 0,001). [§]: Nicht signifikant verschieden von jeweiliger Acetylcholinkenngröße (t-Test, p > 0,05)

Pilocarpin erreichte in CHO-M3-Zellen den gleichen Emax-Wert wie der endogene Vollagonist Acetylcholin (Tab. 74). Es ist wahrscheinlich, dass sich darin eine hohe Rezeptorreserve widerspiegelte, was in Anbetracht der vergleichsweise hohen Expressionsrate plausibel erschien (Vogel et al., 1995). In [³⁵S]GTPγS-Experimenten war der Emax-Wert des Pilocarpin im Vergleich zum Plateau der Acetylcholinkurve reduziert (Kapitel 8.3.1: Abb. 69, Seite 215). Sykes et al. (2009) beobachteten analog dazu, dass sich Pilocarpin im [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperiment als schwacher Partialagonist an M3-Rezeptoren darstellte, während in Calciumakkumulationsassays eine vollagonistische Aktivierung zu beobachten war. Wie in Kapitel 4.2.2 dargestellt wurde, griffen [³⁵S]GTPγS-Assays mit M3-CHO-Zellmembranhomogenaten vor allem den Gq- und den Gi- Weg ab, während in IP1-Experimenten die alleinige Gq-Aktivierung gemessen wurde (Kapitel 4.4.2), nachdem sie bereits einer gewissen Signalamplifikation unterlegen war. Sykes et al. (2009) mutmaßen ebenfalls, dass der vollagonistische Effekt des Pilocarpin am M3-Rezeptor im Calciumakkumulationsexperiment mit einer im Vergleich zum [³⁵S]GTPγS-Versuch höheren Signalamplifikation zusammenhing.

Auch anhand des Wendepunktes der Acetylcholinkurve des M3-Rezeptors, die signifikant weiter links von der aus Abb. 50 (Seite 148) angesiedelt war (t-Test, ^{***} p < 0,001), wurde deutlich, wie sehr Kennzahlen von Konzentrations-Effekt-Kurven vom Expressionsniveau abhängen.

Ob Pilocarpin trotz des nicht von Acetylcholin verschiedenen Emax-Wertes als Partialagonist am M3-Rezeptor bezeichnet werden konnte, sollte anhand von Kopplungseffizienzen ermittelt werden.

log τ IP1 \pm S.E.M. (n)		
	ACh	Pilocarpin
M3	2,00 \pm 0,01 (6)	1,57 \pm 0,12 (6) **
M3 W526A	1,93 \pm 0,08 (4)	0,26 \pm 0,08 (6) ***

Tab. 75: Kopplungsparameter log τ von Acetylcholin und Pilocarpin auf Grundlage des IP1-Assays an M3- und M3 W526A-Rezeptoren. Die Normierung der zugrunde gelegten Konzentrations-Effekt-Kurven erfolgte jeweils auf die Aktivierung durch Acetylcholin. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler. n: Anzahl unabhängiger Experimente. ***, **: Signifikanter Unterschied zum jeweiligen Acetylcholinwert (t-Test, ***, ** p < 0,001, 0,001)

Die log τ -Werte von Pilocarpin waren an beiden Rezeptoren gegenüber denen von Acetylcholin reduziert (Tab. 75). Somit erwies sich Pilocarpin in diesem Messsystem als Partialagonist an M3-Rezeptoren. Damit bestätigten sich die Ergebnisse von Richards und van Giersbergen (1995) und Ehlert et al. (1999), die dies an im Vergleich zu Carbachol reduzierten Emax-Werten von Pilocarpin in Radioaktiv-IP1-Assays beobachteten.

Die Wirksamkeit von Pilocarpin lag bei der M3 W526A-Mutante 1,67 Dekaden unter der des Wildtyprezeptors, während sich der Emax-Wert um 34 Prozentpunkte reduzierte (Tab. 74, Seite 153). Ob der sich auf diese Weise negativ darstellende Effekt auf die Aktivierung von M3-Rezeptoren durch die Mutation Trp 7.35 \rightarrow Ala auf das verminderte Expressionsniveau oder die Punktmutation zurückzuführen war, sollte anhand von korrigierten Kopplungseffizienzen ermittelt werden. Dazu wurde der log τ -Wert der Mutante folgendermaßen transformiert:

$$\log \tau_{\text{korr}} = \log \tau + \log 4,07$$

log τ IP1 \pm S.E.M. (n)		
	M3	M3 W526A _{korr}
Pilocarpin	1,57 \pm 0,12 (6)	0,87 \pm 0,08 (6) ***

Tab. 76: Kopplungsparameter log τ von Pilocarpin auf Grundlage des IP1-Assays an M3- und M3 W526A-Rezeptoren. Die Normierung der zugrunde gelegten Konzentrations-Effekt-Kurven erfolgte jeweils auf die Aktivierung durch Acetylcholin. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Der Zusatz „korr“ bezeichnet die Transformation des Kopplungsparameters log τ durch den Expressionskorrekturfaktor log 4,07 zu log τ_{korr} . ***: Signifikanter Unterschied zum Wert des M3-Wildtyprezeptors (t-Test, *** p < 0,001)

Die Kopplungseffizienz von Pilocarpin nahm durch die Punktmutation Trp 7.35 \rightarrow Ala des M3-Wildtyprezeptors ab (Tab. 76).

Daraus konnte geschlussfolgert werden, dass die Aktivierung des M3-Rezeptors durch Pilocarpin in diesem Messsystem von Trp 7.35 abhing.

4.4.4.4 Die McN-A-343-induzierte Generierung von IP1 in CHO-M3-Zellen ist unabhängig von Trp 7.35

Mit McN-A-343 wurde eine Substanz in die Betrachtungen einbezogen, die sich in Bezug auf ihr Bindungsverhalten von anderen muskarinischen Agonisten unterschieden hatte. In Kapitel 4.1.4.3 wurde dargestellt, dass die Affinität dieses Liganden zum M3-Rezeptor nicht von Trp 7.35 abhing, wodurch kein Unterschied zum M2-Rezeptor beobachtet werden konnte. Auch die Affinität zum [³H]NMS-besetzten Rezeptor erwies sich als unabhängig von diesem Epitop (4.1.3.5). Deshalb sollte hier überprüft werden, ob die Aktivierung des M3-Rezeptors durch McN-A-343 von Trp 7.35 abhing und die Substanz sich damit ähnlich zu bereits getesteten muskarinischen Agonisten verhielt (Abb. 52).

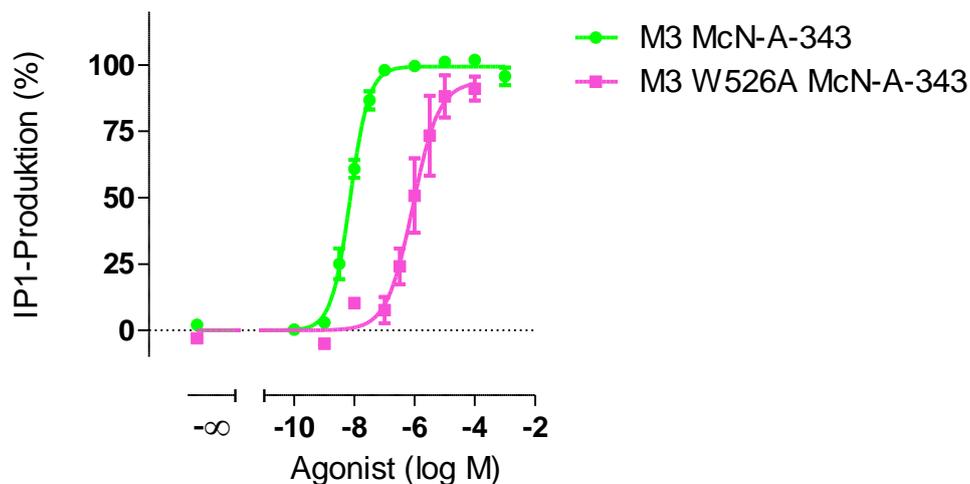


Abb. 52: Generierung von intrazellulärem IP1 durch McN-A-343 in CHO- M3- und CHO-M3 W526A-Zellen. Die Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei bis vier unabhängigen Experimenten in Zwei- bis Dreifachbestimmung. Ordinate: Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht den jeweiligen unteren Plateaus der Konzentrations-Effekt-Kurven, 100 % entspricht der jeweiligen, durch Acetylcholin induzierten Zellantwort. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration

Die Konzentrationseffektkurve von McN-A-343 an M3-Rezeptoren wies einen von 1 abweichenden Hillkoeffizienten auf, während die der M3 W526A-Mutante normal steil verlief (Tab. 77).

		M3	M3 W526A
McN-A-343	E _{max} (%)	99 ± 1	94 ± 5 ^{NS}
	pEC ₅₀	8,14 ± 0,03	6,06 ± 0,11 ^{***}
	n _H	1,39 ± 0,11 ^{###}	1,07 ± 0,27 ^{n.s.}
	n	4	3

Tab. 77: Kenngrößen des McN-A-343-induzierten Anstiegs von intrazellulärem IP1 in CHO-M3- und CHO-M3 W526A - Zellen. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler. E_{max}: Maximale Zellantwort, normiert auf den jeweiligen Acetylcholinwert. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus derjenigen Agonistkonzentration, die zu einer halbmaximalen Zellantwort führt. n_H: Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Im Falle der McN-A-343-Kurve, die mit CHO-M3 W526A-Zellen aufgenommen wurde, entspringen die Kenngrößen pEC₅₀- und E_{max}-Wert einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von 1. ^{n.s.}: Nicht signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß n_H = 1 (F-Test, p > 0,05). ^{###}: Signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß n_H = 1 (F-Test, ^{###} p < 0,001). ^{***}: Signifikant verschieden vom jeweiligen Wert des M3-Wildtypes (t-Test, ^{***} p < 0,001). ^{NS}: Nicht signifikant verschieden vom jeweiligen Wert des M3-Wildtypes (t-Test, p > 0,05)

Beide Kurven erreichten dasselbe Maximum. Dieses unterschied sich nicht signifikant von dem von Acetylcholin, dessen Kurven in Abb. 52 nicht gezeigt wurden. In Bezug auf die Kopplungseffizienz (Tab. 78) erwies sich die Substanz dennoch als Partialagonist. Dies war in der Literatur ebenfalls so beschrieben worden (Mitchelson, 2012).

	log τ IP1 ± S.E.M. (n)	
	ACh	McN-A-343
M3	2,03 ± 0,03 (4)	1,58 ± 0,07 (4) ^{**}
M3 W526A	1,90 ± 0,07 (5)	1,22 ± 0,25 (3) [*]

Tab. 78: Kopplungsparameter log τ von Acetylcholin und McN-A-343 auf Grundlage des IP1-Assays an M3- und M3 W526A-Rezeptoren. Die Normierung der zugrunde gelegten Konzentrations-Effekt-Kurven erfolgte jeweils auf die Aktivierung durch Acetylcholin. Die Daten sind Mittelwerte ± Standardfehler. n: Anzahl unabhängiger Experimente. ^{**}: Signifikanter Unterschied zum jeweiligen Acetylcholinwert (t-Test, ^{**} p < 0,01, 0,05)

McN-A-343 erreichte die gleiche Kopplungseffizienz an M3-Rezeptoren wie Pilocarpin (Tab. 75, Seite 154) (t-Test, p > 0,05).

Die Wirksamkeit von McN-A-343 wurde durch die Punktmutation Trp 7.35→Ala um 2,08 Dekaden vermindert (Tab. 77). Zum Vergleich der intrinsischen Aktivitäten zwischen den Zelllinien wurde wiederum der log τ-Wert der M3-W526A-Mutante um das unterschiedliche Expressionsniveau korrigiert.

$$\log \tau \text{ korr} = \log \tau + \log 1,67$$

log τ IP1 \pm S.E.M. (n)		
	M3	M3 W526A _{korr}
McN-A-343	1,58 \pm 0,07 (4)	1,44 \pm 0,25 (3) ^{NS}

Tab. 79: Kopplungsparameter log τ von McN-A-343 auf Grundlage des IP1-Assays an M3- und M3 W526A-Rezeptoren. Die Normierung der zugrunde gelegten Konzentrations-Effekt-Kurven erfolgte jeweils auf die Aktivierung durch Acetylcholin. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Der Zusatz „korr“ bezeichnet die Transformation des Kopplungsparameters log τ durch den Expressionskorrekturfaktor log 1,67 zu log τ korr. ^{NS}: Nicht signifikant verschieden vom Wert des M3-Wildtyprezeptors (t-Test, $p > 0,05$)

Die Kopplungseffizienz von McN-A-343 unterschied sich nicht signifikant zwischen M3- und M3 W526A-Rezeptoren. Am M2-Rezeptor ergab sich in Bezug auf die Trp 7.35-Abhängigkeit der Rezeptoraktivierung durch diesen Agonisten ebenfalls kein Unterschied zwischen M2- und M2 W422A-Rezeptoren (Kebig, Dissertationsschrift, 2010). Mit ausdrücklicher Erlaubnis der zitierten Autorin wurden die von ihr erhobenen Daten zur M2- und M2 W422A-Rezeptoraktivierung durch Acetylcholin und McN-A-343 im [³⁵S]GTP γ S-Assay mit dem *operational model of agonism* (Black und Leff, 1983) analysiert und folgende Kenndaten ermittelt (Tab. 80).

	M2	M2 W422A
pK _A (OP[³⁵ S]GTP γ S)	5,36 \pm 0,13	5,17 \pm 0,09 ^{NS}
log τ	0,37 \pm 0,06	0,37 \pm 0,04 ^{NS}
n	3	3

Tab. 80: Funktionelle Affinität und Kopplungsparameter log τ von McN-A-343 auf Grundlage des [³⁵S]GTP γ S-Assays mit M2- und M2 W422A-Rezeptoren. Die Experimente wurden von Kebig im Rahmen Ihrer Dissertationsschrift (2010) erhoben und wurden mit ihrem Einverständnis mit dem *operational model of agonism* (Black und Leff, 1983) analysiert. Die Normierung der zugrunde gelegten Konzentrations-Effekt-Kurven erfolgte jeweils auf die Aktivierung durch Acetylcholin. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler. n: Anzahl unabhängiger Experimente. ^{NS}: Signifikanter Unterschied zum Wert des M2-Wildtyprezeptors (t-Test, $p > 0,05$)

Anhand des Kopplungsparameters log τ von McN-A-343, der sich nicht signifikant zwischen M2- und M2 W422A-Rezeptoren unterschied, wurde bestätigt, dass die Aktivierung des M2-Rezeptors durch diesen Liganden unabhängig von Trp 7.35 war. Das Verhältnis der funktionellen Affinitäten spiegelt den Befund aus Radioligandbindungsuntersuchungen (Kapitel 8.2.3) wider; auch hier konnte keine Trp 7.35-Abhängigkeit beobachtet werden.

Somit konnte für M2- und M3-Rezeptoren geschlussfolgert werden, dass die McN-A343-induzierte Rezeptoraktivierung ohne Beteiligung des Epitops Trp 7.35 ablief.

Der unter Vorbehalt gezogene Vergleich der Kopplungseffizienzen von McN-A-343 an M3-(Tab. 79, Seite 157) und M2-Rezeptoren (Tab. 80), deren Grundlage unterschiedliche Messsysteme waren, ergab einen deutlich stärkeren Agonismus der Substanz an zuerst genanntem Subtyp (t-Test, ^{***} $p < 0,001$).

Tab. 81 vergleicht die durch Radioligandbindungsuntersuchungen ermittelten Affinitäten von McN-A-343 an M3- sowie an M3 W526A-Rezeptoren (Kapitel 4.1.4.3) mit den Werten für die funktionellen

Affinitäten, die durch die Analyse der Daten mit dem *operational model of agonism* (Black und Leff, 1983) erhalten wurden.

	pK_i	$pK_A (OP_{IP_1})$
M3	$5,10 \pm 0,07$	$6,53 \pm 0,07$ ⁺⁺⁺
M3 W526A	$5,00 \pm 0,06$ ^{NS}	$4,77 \pm 0,15$ ^{***,§}

Tab. 81: Vergleich von in Radioligandbindungsuntersuchungen ermittelten Affinitätsparametern (pK_i) (siehe Tab. 31) mit funktionellen Affinitätswerten ($pK_A (OP_{IP_1})$) aus dem *operational model of agonism* von McN-A-343 an M3- und M3 W526A-Rezeptoren. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler von drei bis vier unabhängigen Versuchen in Zwei- bis Vierfachbestimmung. ^{***}: Signifikant verschieden vom jeweiligen Wert des M3-Wildtyprezeptors (t-Test, ^{***} $p < 0,001$). ^{NS}: Nicht signifikant verschieden vom jeweiligen Wert des M3-Wildtyprezeptors (t-Test, $p > 0,05$). ⁺⁺⁺: Signifikant verschieden vom jeweiligen pK_i -Wert (t-Test, ⁺⁺⁺ $p < 0,001$). [§]: Nicht signifikant verschieden vom jeweiligen pK_i -Wert (t-Test, $p > 0,05$)

Interessanterweise ergab der Vergleich, dass die funktionelle Affinität von McN-A-343 an der M3-W526A-Mutante im Vergleich zum M3-Wildtyp reduziert war, während in Bindungsuntersuchungen kein Unterschied zwischen den beiden Rezeptoren detektiert werden konnte. Für dieses Phänomen lag keine Erklärung vor.

Nach der Analyse der vorliegenden Daten konnte gemutmaßt werden, dass die Aktivierung des M3-Rezeptors durch McN-A-343 nicht von Trp 7.35 abhing. Damit bestätigte sich die Einschätzung des besonderen Charakters von McN-A-343 im Vergleich zu anderen muskarinischen Agonisten.

4.4.4.5 M3 Trp 7.35 ist für die Generierung von IP1 durch Iper-6-phthal und Iper-6-naph nicht hinderlich

In Kapitel 4.3.5 wurde beschrieben, dass sich die Mutation Trp 7.35→Ala des M3-Rezeptors als hemmend auf die Aktivierung durch die Hybridsubstanzen Iper-6-phthal und Iper-6-naph in DMR-Experimenten erwies. Durch die Inhibition des Gi- und Maskierung des Gs-Weges wurde dabei der reine Gq-Effekt beobachtet. Nun sollte dies anhand eines klassischen *second messenger*-Assays, der die Generierung des IP1 detektierte, verifiziert werden (Abb. 53). In diesen Versuchsreihen wurde Iperoxo als orthosterische Muttersubstanz der Hybridliganden mitgeführt, sodass zu einem späteren Zeitpunkt das *operational model of agonism* (Black und Leff, 1983) angewendet werden konnte.

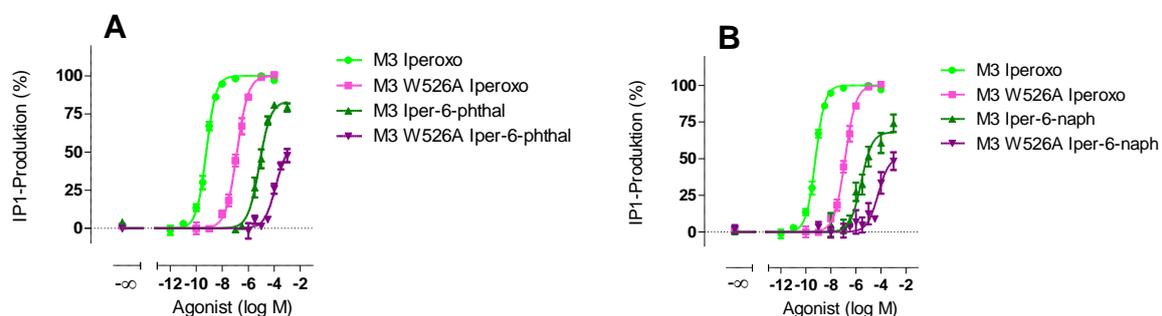


Abb. 53: Generierung von intrazellulärem IP1 durch Iperoxo, Iper-6-phthal (A) und Iper-6-naph (B) in CHO-M3- und CHO-M3 W526A-Zellen. Die Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus vier bis elf unabhängigen Experimenten in Zwei- bis Dreifachbestimmung. Ordinate: Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht den jeweiligen unteren Plateaus der Konzentrations-Effekt-Kurven, 100 % entspricht der jeweiligen, durch Iperoxo induzierten Zellantwort. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration

		M3	M3 W526A
Iper-6-phthal	E _{max} (%)	84 ± 2	56 ± 6 ^{**}
	pEC ₅₀	5,15 ± 0,12	3,88 ± 0,07 ^{***}
	n _H	1,12 ± 0,18 ^{n.s.}	1,55 ± 0,39 ^{n.s.}
	n	4	4
Iper-6-naph	E _{max} (%)	69 ± 7 [§]	51 ± 5 ^{NS,§}
	pEC ₅₀	5,58 ± 0,18 [§]	4,52 ± 0,38 ^{*,§}
	n _H	0,68 ± 0,16 ^{n.s.}	0,63 ± 0,32 ^{n.s.}
	n	5	6

Tab. 82: Kenngrößen des Iper-6-phthal- und Iper-6-naph-induzierten Anstiegs von intrazellulärem IP1 in CHO-M3- und CHO-M3 W526A -Zellen. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler. E_{max}: Maximale Zellantwort, normiert auf den jeweiligen Iperoxowert. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus derjenigen Agonistkonzentration, die zu einer halbmaximalen Zellantwort führt. n_H: Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Die Kenngrößen pEC₅₀- und E_{max}-Wert entspringen Kurvenanpassungen mit einem Hill-Koeffizienten von 1. ^{n.s.}: Nicht signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß n_H = 1 (F-Test, p > 0,05). ^{***}, ^{***}, ^{*}: Signifikant verschieden vom jeweiligen Wert des M3-Wildtypes (t-Test, ^{***}, ^{***}, ^{*} p < 0,001, 0,01, 0,05). ^{NS}: Nicht signifikant verschieden vom jeweiligen Wert des M3-Wildtypes (t-Test, p > 0,05). [§]: Nicht signifikant verschieden von jeweiliger Iper-6-phthal-Kenngröße (t-Test, p > 0,05)

Wie in den DMR-Messungen mit PTX- und CTX-Vorstimulation wiesen die Konzentrations-Effekt-Kurven der Hybridsubstanzen an beiden Rezeptoren eine normale Steilheit auf (Tab. 82). Anhand der pharmakologischen Kenngrößen pEC₅₀- und E_{max}- Wert unterschieden sich die beiden Liganden untereinander jeweils nicht signifikant. Im Gi-detektierenden [³⁵S]GTPγS-Assay erreichten die Liganden am M2-Rezeptor E_{max}-Werte in der gleichen Größenordnung, waren jedoch dort um mehr als den Faktor 100 potenter als am M3-Rezeptor (Iper-6-phthal: pEC₅₀ = 7,63 ± 0,08; Iper-6-naph: pEC₅₀ = 8,07 ± 0,03; Bock et al., 2012).

Durch die Punktmutation Trp 7.35→Ala reduzierte sich die Wirksamkeit sowie auch der E_{max}-Wert von Iper-6-phthal (Tab. 82) im Vergleich zum Wildtyprezeptor. Im Falle von Iper-6-naph war der pEC₅₀-Wert an der M3 W526A-Mutante geringer als am M3-Wildtyprezeptor. Die Kopplungseffizienzen der beiden Hybridliganden sind in Tab. 83 zusammengefasst; bei den Mutantenkenngrößen wurde folgende Korrektur berücksichtigt:

$$\log \tau_{\text{korr}} = \log \tau + \log 1,67$$

log τ IP1 \pm S.E.M. (n)		
	M3	M3 W526A _{korrr}
Iper-6-phthal	0,66 \pm 0,04 (4)	0,31 \pm 0,10 (4) [*]
Iper-6-naph	0,28 \pm 0,11 (5) ⁺	0,04 \pm 0,07 (6) ^{NS,§}

Tab. 83: Kopplungsparameter log τ von Iper-6-phthal und Iper-6-naph auf Grundlage des IP1-Assays an M3- und M3 W526A-Rezeptoren. Die Normierung der zugrunde gelegten Konzentrations-Effekt-Kurven erfolgte jeweils auf die Aktivierung durch Iperoxo. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Der Zusatz „korrr“ bezeichnet die Transformation des Kopplungsparameters log τ durch den Expressionskorrekturfaktor log 1,67 zu log τ korrr. ^{*}: Signifikanter Unterschied zum Wert des M3-Wildtyprezeptors (t-Test, ^{*} p < 0,05). ^{NS}: Nicht signifikant verschieden vom Wert des M3-Wildtyprezeptors (t-Test, p > 0,05). ⁺: Signifikanter Unterschied zu jeweiliger Iper-6-phthal-Kenngröße (t-Test, ⁺ p < 0,05). [§]: Nicht signifikant verschieden zu jeweiliger Iper-6-phthal-Kenngröße (t-Test, p > 0,05)

Die Kopplungseffizienz von Iper-6-naph war im Vergleich zu der von Iper-6-phthal am M3-Wildtyprezeptor reduziert (Tab. 83). Wie auch in den entsprechenden DMR-Messungen erwies sich somit Iper-6-phthal als der stärkere Agonist als Iper-6-naph am M3-Rezeptor (Tab. 64, Seite 138). Die korrigierten log τ -Werte der Hybrids-substanzen waren an der M3 W526A-Mutante geringer als am M3-Wildtyprezeptor. Einen statistischen Unterschied ergab sich allerdings nur für Iper-6-phthal. Bei Messungen der dynamischen Massenumverteilung, bei denen mit PTX und CTX vorstimuliert wurde, war die Kopplungseffizienz für beide Hybridliganden durch die Trp 7.35 \rightarrow Ala-Mutation reduziert worden (Tab. 64, Seite 138).

Auf diese Weise bestätigte sich das in Kapitel 4.3.5 gefundene Ergebnis, dass durch die Mutation Trp 7.35 \rightarrow Ala im M3-Rezeptor die intrinsische Aktivität der dualsterischen Hybridliganden Iper-6-phthal und Iper-6-naph auf dem präferenziellen Kopplungsweg nicht zunimmt, was im Gegensatz zu den Beobachtungen am M2-Rezeptor steht (Bock et al., 2012).

4.5 Messung des intrazellulären cAMP-Gehaltes (cAMP-Assay)

Analog zum IP1-Assay diente ein antikörperbasiertes Messsystem im folgenden Kapitel dazu, die agonistvermittelte Erhöhung eines sekundären Botenstoffs zu detektieren. In diesem Fall handelte es sich um das durch eine Gs-Protein-Aktivierung entstehende zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP). Zu diesem Zweck wurden die im Versuch eingesetzten Zellen mit Pertussistoxin vorbehandelt, um Gi-vermittelte Effekte auszuschalten.

Es hatte sich in DMR-Untersuchungen gezeigt, dass Trp 7.35 im M3-Rezeptor ein für die Gs-vermittelte Iperoxo- sowie Iper-6-phthal- und Iper-6-naph-induzierte Rezeptoraktivierung wichtiges Epitop war (Kapitel 4.3.6: Tab. 66, Seite 141). Dies sollte anhand der Messung des Agonist-vermittelten Anstiegs von intrazellulärem cAMP bestätigt werden.

4.5.1 Die in cAMP-Experimenten verwendeten CHO-M3-Zellen wiesen das gleiche Expressionsniveau wie CHO-M3 W526A-Zellen auf, während CHO-M2-Zellen mehr Rezeptoren als CHO-M2 W422A-Zellen exprimierten

Wie in den Kapiteln 1.3.1 und 4.4.4.1 wurden zur Bestimmung des Expressionsverhältnisses zwischen CHO-M3- und CHO-M3 W526A-Zellen sowie CHO-M2- und CHO-M2 W422A-Zellen homologe Kompetitionsexperimente zur Ermittlung der Rezeptorzahl pro Zelle durchgeführt (Abb. 54).

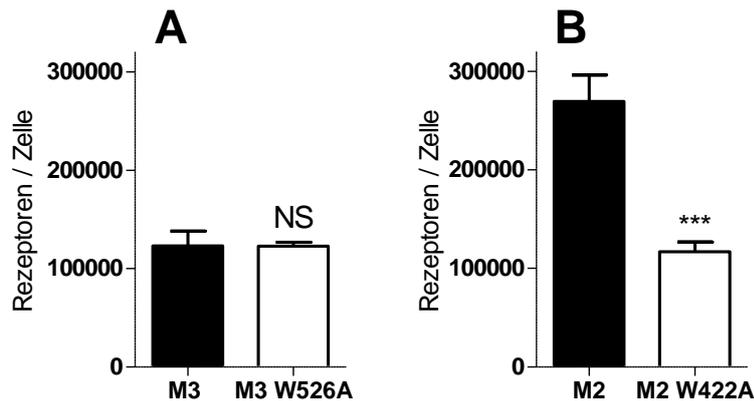


Abb. 54: Rezeptorexpressionsniveau der in cAMP-Messungen verwendeten Zelllinien CHO-M3, CHO-M3 W526A (A), CHO-M2- und CHO-M2 W422A (B). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler von fünf bis sechs unabhängigen Experimenten in Drei- bis Vierfachbestimmung. NS: Nicht signifikant verschieden vom Wert des M3-Wildtyprezeptors (t-Test, $p > 0,05$). ***: Signifikant verschieden vom Wert des M2-Wildtyprezeptors (t-Test, *** $p < 0,001$)

Für CHO-M3-Zellen wurde ein Wert von 122989 ± 15102 (6) Rezeptoren pro Zelle ermittelt, von dem sich die Expression auf CHO-M3-W526A-Zellen (122686 ± 3903 (6)) nicht signifikant unterschied. Hingegen reduzierte sich die Expression von 269419 ± 26736 (5) Rezeptoren pro CHO-M2-Zelle auf 116852 ± 9846 (5) Rezeptoren pro CHO-M2 W422A-Zelle. Für zuletzt genannte Zelllinien ergab sich demnach, dass der M2-Wildtyp um den Faktor 2,31 höher exprimiert war als die M2 W422A-Mutante.

4.5.2 Methodische Vorversuche mit CHO-M3- und CHO-M3 W526A-Zellen

Der rezeptorunabhängige Aktivator der Adenylatzyklase Forskolin diente zur Abschätzung eines maximal möglichen Messfensters in CHO-M3- und CHO-M3 W526A-Zellen. Wie bereits in Messungen der dynamischen Massenumverteilung wurde eine Konzentration von $10\mu\text{M}$ eingesetzt (Abb. 55). Seemann zeigte im Rahmen Ihrer Dissertationsarbeit (2012), dass diese Konzentration im oberen Plateau der Kurve an CHO-M2-Zellen lag. Wie in später folgenden Versuchen gezeigt, war mit $100\mu\text{M}$ eine Iperoxkonzentration gewählt, die ebenfalls als rezeptorsättigend angesehen werden konnte (Abb. 56, Seite 163). Aus Abb. 74 (Seite 223) ging hervor, dass eine Konzentration von 10mM im oberen Plateau der jeweiligen Acetylcholincurven lag (Kapitel 8.6.1). Der Einsatz von Atropin ($100\mu\text{M}$) diente zur Detektion einer potentiell vorhandenen spontanen Rezeptoraktivität.

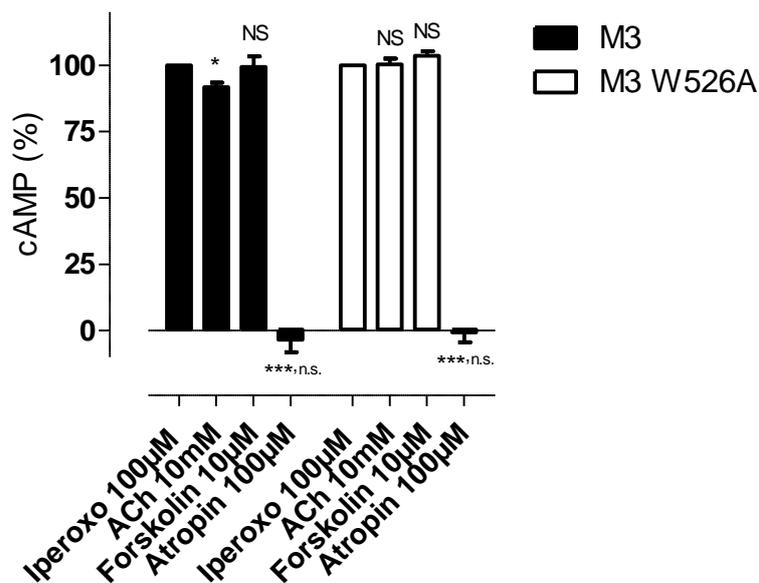


Abb. 55: Maximale Generierung von cAMP in CHO-M3- und CHO-M3 W526A-Zellen durch supramaximale Konzentrationen von Iperoxo, Acetylcholin, Forskolin und Atropin. Aufgeführt sind Mittelwerte \pm Standardfehler von fünf bis sechs unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Ordinate: Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht dem jeweiligen Basalwert und 100 % entspricht dem jeweils durch 100µM Iperoxo vermittelten Wert. Abszisse: Eingesetzte Substanzen (Iperoxo: 100µM, ACh: 10mM, Forskolin: 10µM, Atropin: 100µM). *,***: Signifikant verschieden vom jeweiligen Iperoxowert (t-Test, ***,* $p < 0,001, 0,05$). NS: Nicht signifikant verschieden vom jeweiligen Iperoxowert (t-Test, $p > 0,05$). n.s.: Nicht signifikant verschieden vom jeweiligen Basalwert (t-Test, $p > 0,05$)

Während die maximale cAMP-Generierung durch Acetylcholin minimal unterhalb derer von Iperoxo in CHO-M3-Zellen lag, erreichen beide Agonisten an der M3 W526A-Mutante das gleiche Niveau (Abb. 55). Durch Iperoxo wurde ein Maximum an intrazellulärem cAMP generiert, das auch vom direkten Adenylatzyklaseaktivator Forskolin nicht übertroffen wurde.

Beide Rezeptoren zeigten keine konstitutive Rezeptoraktivität, da der basale cAMP-Gehalt durch den Einsatz des inversen Agonisten Atropin nicht weiter reduziert wurde.

4.5.3 M3 Trp 7.35 ist für die Generierung von cAMP durch Iper-6-phthal und Iper-6-naph nicht hinderlich

In Kapitel 4.3.4 wurde beschrieben, dass die Hybridsubstanzen Iper-6-phthal und Iper-6-naph in DMR-Versuchen in der Lage waren, durch den M3-Rezeptor eine Gq- sowie eine Gs-vermittelte Signaltransduktion in Gang zu setzen. Die Mutation Trp 7.35→Ala wirkte sich dergestalt auf die Gs-Aktivierung durch die Hybridliganden aus, dass die intrinsische Aktivität abnahm (Kapitel 4.3.6: Tab. 66, Seite 141). Dies sollte anhand eines Messsystems verifiziert werden, das direkt den Gehalt des zentralen Botenstoffs detektierte. Wiederum wurde Iperoxo als orthosterische Muttersubstanz der Hybridliganden mitgeführt und später das *operational model of agonism* (Black und Leff, 1983) angewendet.

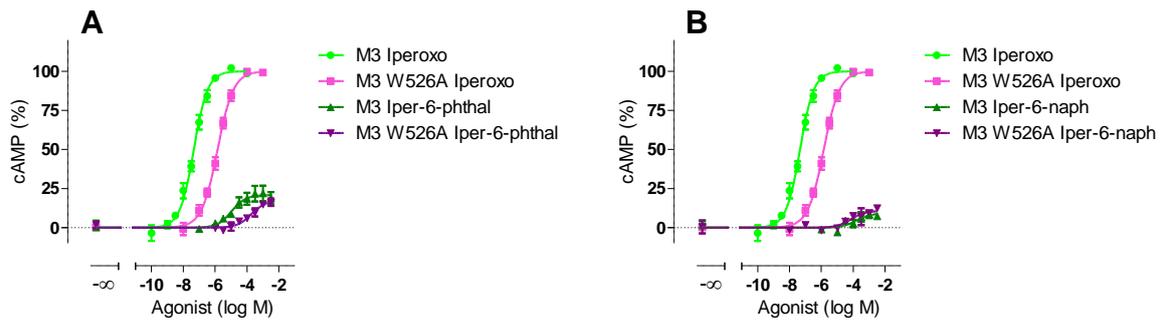


Abb. 56: Generierung von intrazellulärem cAMP durch Iperoxo, Iper-6-phthal (A) und Iper-6-naph (B) in CHO- M3- und CHO-M3 W526A-Zellen. Die Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei bis sechs unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Ordinate: Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht den jeweiligen unteren Plateaus der Konzentrations-Effekt-Kurven, 100 % entspricht der jeweiligen, durch Iperoxo induzierten Zellantwort. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration

Die Hybridsubstanzen Iper-6-phthal und Iper-6-naph führten im cAMP-Assay zu im Vergleich zum IP1-Versuch deutlich kleineren E_{max} -Werten (Vergleich von Werten aus Tab. 84, Seite 164 und Tab. 82, Seite 159). Die gefundenen, kleinen Messfenster in diesem Versuch gingen teilweise mit größeren Streuungen der pharmakologischen Kennzahlen einher, wie es beispielsweise anhand der Hill-Koeffizienten der Hybridkurven (Tab. 84) zu erkennen war. Die Konzentrationseffektbeziehungen der Hybridliganden erwiesen sich an beiden Rezeptoren als normal steil.

		M3	M3 W526A
Iperoxo	E _{max} (%)	100	100
	pEC ₅₀	7,38 ± 0,10	5,90 ± 0,06 ^{***}
	n _H	0,91 ± 0,06 ^{n.s.}	0,87 ± 0,06 [#]
	n	5	3
Iper-6-phthal	E _{max} (%)	19 ± 4	18 ± 2 ^{NS}
	pEC ₅₀	5,03 ± 0,11	3,46 ± 0,14 ^{***}
	n _H	0,95 ± 0,40 ^{n.s.}	0,84 ± 0,34 ^{n.s.}
	n	5	5
Iper-6-naph	E _{max} (%)	11 ± 3	11 ± 2 ^{NS,§}
	pEC ₅₀	3,99 ± 0,23 ⁺⁺	4,27 ± 0,09 ^{NS,++}
	n _H	1,59 ± 1,61 ^{n.s.}	1,78 ± 1,44 ^{n.s.}
	n	6	3

Tab. 84: Kenngrößen des Iperoxo-, Iper-6-phthal- und Iper-6-naph-induzierten Anstiegs von intrazellulärem cAMP in CHO-M3- und CHO-M3 W526A -Zellen. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler. E_{max}: Maximale Zellantwort, normiert auf den jeweiligen Iperoxowert. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus derjenigen Agonistkonzentration, die zu einer halbmaximalen Zellantwort führt. n_H: Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Bis auf die Iperoxokurve mit M3 W526A-Zellen entspringen die Kennzahlen pEC₅₀- und E_{max}-Wert Kurvenanpassungen mit einem Hill-Koeffizienten von 1. ^{n.s.}: Nicht signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß n_H = 1 (F-Test, p > 0,05). [#]: Signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß n_H = 1 (F-Test, p > 0,05). ^{***}: Signifikant verschieden vom jeweiligen Wert des M3-Wildtypes (t-Test, ^{***} p < 0,001). ^{NS}: Nicht signifikant verschieden vom jeweiligen Wert des M3-Wildtypes (t-Test, p > 0,05). ⁺⁺: Signifikant verschieden von jeweiliger Iper-6-phthal-Kenngröße (t-Test, ⁺⁺ p < 0,01). [§]: Nicht signifikant verschieden von jeweiliger Iper-6-phthal-Kenngröße (t-Test, p > 0,05)

In Bezug auf ihren E_{max}-Wert erwiesen sich die Hybridliganden untereinander als nicht verschieden und konnten als schwache Partialagonisten an beiden Rezeptoren in diesem Messsystem bezeichnet werden (Tab. 84). Interessanterweise erwies sich Iper-6-phthal am Wildtyprezeptor als potenter im Vergleich zu Iper-6-naph, während es an der M3 W526A-Mutante genau andersherum war. Am M2-Wildtyprezeptor wies Iper-6-phthal ebenfalls einen höheren pEC₅₀-Wert auf als Iper-6-naph (Bock et al., 2012; vorliegende Arbeit: Kapitel 4.5.4: Tab. 86, Seite 167).

Durch die Punktmutation Trp 7.35→Ala wurden die Maxima der Hybridliganden nicht verändert, ebenso unterschied sich die Wirksamkeit von Iper-6-naph nicht zwischen M3-Wildtyp und M3 W526A-Mutante (Tab. 84). Im Falle von Iper-6-phthal war die zuletzt genannte Kenngröße reduziert. Durch das gleiche Expressionsniveau der beiden Zelllinien (Kapitel 4.5.1: Abb. 54 A, Seite 161) konnte an dieser Stelle bereits die Schlussfolgerung gelten, dass sich die Punktmutation Trp 7.35→Ala im M3-Rezeptor auf die Gs-Aktivierung durch Iper-6-phthal als hemmend herausstellte, wobei sie bei der Iper-6-naph-induzierten Zellantwort keine Auswirkung zeigte. In Bezug auf die

Kopplungseffizienzen war dies ebenfalls für die Gq-Aktivierung gezeigt worden (Kapitel 4.4.4.5: Tab. 83, Seite 160). Daher sollten die hier beobachteten Ergebnisse durch die Ermittlung von log τ -Werten überprüft werden. In diesem Fall war keine Korrektur der Mutantenkenngrößen notwendig.

log τ cAMP \pm S.E.M. (n)		
	M3	M3 W526A
Iperoxo	1,75 \pm 0,10 (5)	1,54 \pm 0,09 (3) ^{NS}
Iper-6-phthal	-0,63 \pm 0,12 (5) ^{###}	-0,61 \pm 0,04 (5) ^{NS,###}
Iper-6-naph	-0,94 \pm 0,09 (6) ^{§,###}	-0,96 \pm 0,12 (3) ^{NS,+,###}

Tab. 85: Kopplungsparameter log τ von Iperoxo, Iper-6-phthal und Iper-6-naph auf Grundlage des cAMP-Assays an M3- und M3 W526A-Rezeptoren. Die Normierung der zugrunde gelegten Konzentrations-Effekt-Kurven erfolgte jeweils auf die Aktivierung durch Iperoxo. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler. n: Anzahl unabhängiger Experimente. ^{NS}: Nicht signifikant verschieden vom jeweiligen M3-Wildtypwert (t-Test, $p > 0,05$). [†]: Signifikant verschieden von jeweiliger Iper-6-phthal-Kenngröße (t-Test, $^+ p < 0,05$). [§]: Nicht signifikant verschieden von jeweiliger Iper-6-phthal-Kenngröße (t-Test, $p > 0,05$). ^{###}: Signifikant verschieden von jeweiliger Iperoxokenngröße (t-Test, ^{###} $p < 0,001$)

Die log τ -Werte der Hybridliganden waren im Vergleich zu Iperoxo stark reduziert und nahmen sogar negative Werte an (Tab. 85). Darin zeigt sich einmal mehr ein jeweils sehr schwacher Partialagonismus der Substanzen auf dem Gs-Weg (Vergleiche Kapitel 4.3.6, Tab. 66 (Seite 141)). Die Werte von Iper-6-naph lagen jeweils im Vergleich zu Iper-6-phthal noch stärker im negativen Bereich, allerdings wies diese Veränderung nur am M3 W526A-Rezeptor statistische Signifikanz auf. Damit erwies sich Iper-6-phthal als ein stärkerer Agonist als Iper-6-naph in M3 W526A-Zellen.

In Bezug auf die Kopplungseffizienzen hatte die Punktmutation Trp 7.35→Ala keine Auswirkung auf die intrinsische Aktivität der Substanzen. In Messungen der dynamischen Massenumverteilung, bei denen der Gi- und der Gq-Weg durch PTX und QIC inhibiert worden waren, reduzierten sich die Kopplungseffizienzen der Hybridliganden durch die Punktmutation (Tab. 66, Seite 141).

An den erhobenen Daten ist zu erkennen, dass auch in Bezug auf die Generierung intrazellulären cAMPs keine Verbesserung der intrinsischen Aktivität von Iper-6-phthal und Iper-6-naph durch die Mutation Trp 7.35→Ala im M3-Rezeptor beobachtet werden konnte. Vielmehr wies das Epitop in diesem Zusammenhang keinen Beitrag zur Rezeptoraktivierung auf.

4.5.4 M2 Trp 7.35 ist für die Generierung von cAMP durch Iper-6-phthal- und Iper-6-naph hinderlich

Bock et al. (2012) zeigten die Verbesserung der intrinsischen Aktivität der Hybridliganden Iper-6-phthal und Iper-6-naph durch die Punktmutation Trp 7.35→Ala im M2-Rezeptor auf. Dabei griffen die Autoren durch Wahl des [³⁵S]GTP γ S-Assays den Kopplungsweg der ersten Wahl ab (Gi-Aktivierung; Milligan, 2003). Es stellte sich die Frage, ob diese Beobachtung auch auf die Aktivierung eines Signalweges der zweiten Wahl zutrifft. Daher wurden die Substanzen in CHO-M2- und CHO-M2 W422A-Zellen im cAMP-Assay vermessen (Abb. 57). Darüber hinaus erlaubte dieses Vorgehen, den Einfluss der Punktmutation Trp 7.35→Ala auf die Hybrid-induzierte Aktivierung zwischen M2- und M3-Rezeptoren auf der Ebene des gleichen G-Proteinsignalweges zu analysieren.

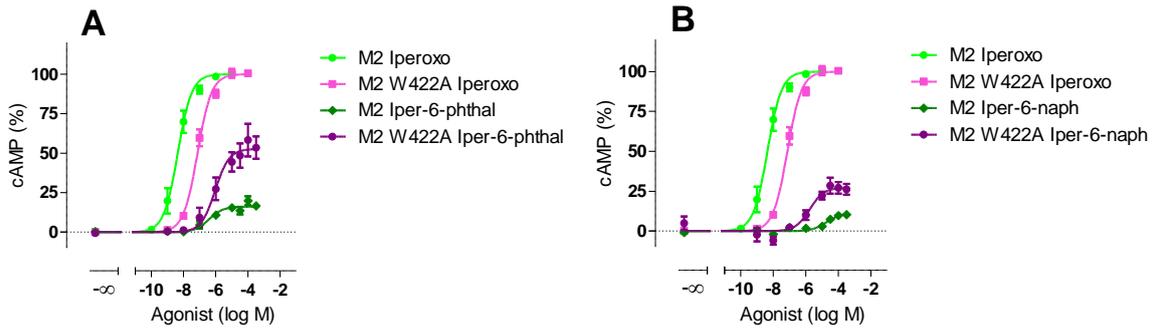


Abb. 57: Generierung von intrazellulärem cAMP durch Iperoxo, Iper-6-phthal und Iper-6-naph in CHO- M2- und CHO-M2 W422A-Zellen. Die Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei bis fünf unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Ordinate: Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht den jeweiligen unteren Plateaus der Konzentrations-Effekt-Kurven, 100 % entspricht der jeweiligen, durch Iperoxo induzierten Zellantwort. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration

Alle hier dargestellten Kurven wiesen eine normale Steilheit auf (Tab. 86). Die Hybride Iper-6-phthal und Iper-6-naph erreichten am M2-Rezeptor E_{max} -Werte, die in der gleichen Größenordnung wie die entsprechenden Kenngrößen des M3-Rezeptors im selben Messsystem lagen (Tab. 84, Seite 164 und Tab. 86, Seite 167).

Die für den Wildtyp ermittelten Kenngrößen (Tab. 86) stehen in gutem Einklang mit zuvor von Bock et al. (2012) erhobenen Daten. In Bezug auf das Maximum und den pEC_{50} -Wert war Iper-6-phthal dem Iper-6-naph in diesem Messsystem überlegen. Auch dieses Ergebnis bestätigt die Beobachtungen von Bock et al. (2012).

		M2	M2 W422A
Iperoxo	Emax (%)	100	100
	pEC ₅₀	8,37 ± 0,17	7,12 ± 0,11 ^{**}
	n _H	0,91 ± 0,10 ^{n.s.}	0,95 ± 0,08 ^{n.s.}
	n	3	3
Iper-6-phthal	Emax (%)	16 ± 1	52 ± 6 ^{**}
	pEC ₅₀	6,65 ± 0,15	6,06 ± 0,22 ^{NS}
	n _H	0,67 ± 0,20 ^{n.s.}	0,96 ± 0,40 ^{n.s.}
	n	3	5
Iper-6-naph	Emax (%)	11 ± 1 ⁺	30 ± 6 ^{*,+}
	pEC ₅₀	4,67 ± 0,10 ⁺⁺⁺	5,75 ± 0,25 ^{*,§}
	n _H	0,63 ± 0,22 ^{n.s.}	1,08 ± 0,58 ^{n.s.}
	n	3	3

Tab. 86: Kenngrößen des Iperoxo-, Iper-6-phthal- und Iper-6-naph-induzierten Anstiegs von intrazellulärem cAMP in CHO-M2- und CHO-M2 W422A -Zellen. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler. Emax: Maximale Zellantwort, normiert auf den jeweiligen Iperoxowert. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus derjenigen Agonistkonzentration, die zu einer halbmaximalen Zellantwort führt. n_H: Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Die Kenngrößen pEC₅₀- und Emax-Wert entspringen Kurvenanpassungen mit einem Hill-Koeffizienten von 1. ^{n.s.}: Nicht signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß n_H = 1 (F-Test, p > 0,05). ^{**,*}: Signifikant verschieden vom jeweiligen Wert des M3-Wildtypes (t-Test, ^{**} p < 0,01, ^{*} p < 0,05). ^{NS}: Nicht signifikant verschieden vom jeweiligen Wert des M3-Wildtypes (t-Test, p > 0,05). ⁺⁺⁺: Signifikant verschieden von jeweiliger Iper-6-phthal-Kenngröße (t-Test, ⁺⁺⁺ p < 0,001, ^{0,05}). [§]: Nicht signifikant verschieden von jeweiliger Iper-6-phthal-Kenngröße (t-Test, p > 0,05)

Die Punktmutation Trp 7.35→Ala wirkte sich durch eine signifikante Erhöhung des Emax-Wertes beider Hybridliganden aus, was am M3-Rezeptor nicht beobachtet wurde (Abb. 56, Seite 163). Im Falle von Iper-6-naph erhöhte sich darüber hinaus die Wirksamkeit (pEC₅₀) im Vergleich zum Wildtyprezeptor. Wie in Kapitel 4.5.1 dargestellt, exprimierten die CHO-M2 Zellen 231 % des Rezeptoranteils auf CHO-M2 W422A-Rezeptoren. Dies hatte zur Folge, dass der hier beobachtete Gewinn in Bezug auf die Rezeptoraktivierung durch die Punktmutation Trp 7.35→Ala eher noch unterschätzt wurde.

Damit konnte für einen Signalweg der zweiten Wahl (die Gs-Aktivierung) bestätigt werden, was Bock et al. (2012) bereits in funktionellen Untersuchungen des Gi-Weges beobachten konnten. Die Autoren fanden im [³⁵S]GTPγS-Assay, dass sich der Emax-Wert von Iper-6-phthal durch die Punktmutation Trp 7.35→Ala von 79 ± 2 % auf 91 ± 2 % erhöhte, im Falle von Iper-6-naph veränderte sich das Maximum von 70 ± 1 % am Wildtyp auf 98 ± 3 % an der M2 W422A-Mutante. Darüber hinaus erwiesen sich die Hybridliganden auf dem Gi-Weg am M2 W422A-Rezeptor als kopplungseffizienter als am M2-Wildtyp (Bock et al., 2012). Durch die Anwendung des *operational model of agonism*

(Black und Leff, 1983) sollte dies auch für den Gs-Weg untersucht werden. Die log τ -Werte der Mutantendaten wurden nach folgender Gleichung transformiert:

$$\log \tau_{\text{korr}} = \log \tau + \log 2,31$$

	log τ cAMP \pm S.E.M. (n)		
	M2	M2 W422A	M2 W422A _{korr}
Iperoxo	1,69 \pm 0,30 (3)	1,71 \pm 0,39 (3) ^{NS}	2,07 \pm 0,39 (3) ^{NS}
Iper-6-phthal	-0,70 \pm 0,03 (3) ⁺⁺⁺	0,04 \pm 0,03 (5) ^{***,+++}	0,41 \pm 0,03 (5) ^{***,+++}
Iper-6-naph	-0,89 \pm 0,06 (3) ^{+++,#}	-0,42 \pm 0,04 (3) ^{***,+++,###}	-0,06 \pm 0,04 (3) ^{***,+++,###}

Tab. 87: Kopplungsparameter log τ von Iperoxo, Iper-6-phthal und Iper-6-naph auf Grundlage des cAMP-Assays an M2- und M2 W422A-Rezeptoren. Die Normierung der zugrunde gelegten Konzentrations-Effekt-Kurven erfolgte jeweils auf die Aktivierung durch Iperoxo. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler. n: Anzahl unabhängiger Experimente. ***: Signifikant verschieden vom jeweiligen M2-Wildtypwert (t-Test, *** p < 0,001). NS: Nicht signifikant verschieden vom jeweiligen M2-Wildtypwert (t-Test, p > 0,05). +++: Signifikant verschieden von jeweiliger Iperoxokenngröße (t-Test, +++ p < 0,001). ###, #: Signifikant verschieden von jeweiliger Iper-6-phthal-Kenngröße (t-Test, ###, # p < 0,001, 0,05)

Die Analyse ergab einen schwachen Partialagonismus von Iper-6-phthal und Iper-6-naph an beiden Rezeptoren im cAMP-Assay, der die Gs-Aktivierung widerspiegelte (Tab. 87). Im Gegensatz dazu präsentierten sich die Substanzen auf dem präferenziellen Gi-Weg als kopplungseffizienter am M2-Rezeptor (Bock et al., 2012). Wie in der zitierten Arbeit und anhand der hier dargestellten pharmakologischen Kenngrößen (Tab. 86, Seite 167) erkennbar war, bestätigte sich auch in Bezug auf die Kopplungseffizienz Iper-6-phthal als stärkerer Agonist gegenüber Iper-6-naph an beiden Rezeptoren (Tab. 87). Während die Punktmutation Trp 7.35→Ala keinen Einfluss auf den log τ -Wert von Iperoxo aufwies, konnte bereits ohne Korrektur der Mutantenwerte um den Expressionsfaktor ein Zugewinn an Kopplungseffizienz durch die Punktmutation Trp 7.35→Ala beobachtet werden, der selbstverständlich unter Einbeziehung des unterschiedlichen Expressionsniveaus noch stärker ausgeprägt war (Tab. 87). Die Substanzen zeigten auf der Basis von [³⁵S]GTP γ S-Bindungsexperimenten ebenfalls höhere log τ -Werte an der M2 W422A-Mutante (Bock et al., 2012).

Die Mutation Trp 7.35→Ala im M2-Rezeptor führte zu einer erhöhten intrinsischen Aktivität der Hybridliganden Iper-6-phthal und Iper-6-naph auf dem Gs-Weg. Somit war der Effekt der Punktmutation Trp 7.35→Ala im M2-Subtyp in Bezug auf die Rezeptoraktivierung durch die Hybridliganden über die Kopplungswege der ersten (Gi; Bock et al., 2012) und zweiten Wahl (Gs; vorliegende Arbeit) konserviert.

5 Diskussion

5.1 Trp 7.35 ist an der Bindungskinetik des Radioliganden [³H]NMS in Gi-, nicht aber Gq-koppelnden Muskarinrezeptoren beteiligt

Der allosterische Bereich von Muskarinrezeptoren als Vorhof zur orthosterischen Bindungstasche beeinflusst Bindungs- und Aktivierungsvorgänge orthosterischer Liganden. So wiesen Kruse et al. (2012) einen metastabilen Bindungszustand von Tiotropium auf seinem Weg in und auf seinem Weg aus der orthosterischen Bindungstasche muskarinischer M2- und M3-Rezeptoren nach. Bock et al. (2012) zeigten, dass die Flexibilität des allosterischen Haftareals in M2-Rezeptoren für die Signalintensität und das G-Protein-Kopplungsverhalten eine Rolle spielt.

Trp 7.35 ist an der Schnittstelle zwischen orthosterischer und allosterischer Bindungsdomäne in muskarinischen M2-Rezeptoren positioniert (Jäger et al., 2007; Kruse et al., 2013) und wurde hinsichtlich seiner Einflussnahme auf die Dissoziation des Radioliganden [³H]NMS an M1-, M2-, M3- und M4-Rezeptoren untersucht (Kapitel 4.1.1). Am M2- und M4-Subtyp verdoppelte sich die Dissoziationsgeschwindigkeit durch die Trp 7.35→Ala- Mutation, während sie im Vergleich zum jeweiligen Wildtyprezeptor an den M1- und M3 Trp 7.35→Ala-Mutanten unverändert blieb (Kapitel 4.1.1). Damit kommt dem Epitop in vorwiegend Gi-, nicht aber Gq-koppelnden Subtypen die Rolle eines Beschleunigers der Radioorthoster-Dissoziationsszeit zu. Da die Affinität von [³H]NMS zu allen untersuchten Subtypen im Reaktionsgleichgewicht nicht von Trp 7.35 abhing (Kapitel 4.1.2.1), kann geschlossen werden, dass in M2- und M4-Rezeptoren die Einflussnahme des Epitops Trp 7.35 auf die Dissoziation des Liganden die gleiche ist wie auf seine Assoziation. Beim Vergleich der Trp 7.35-Abhängigkeiten der [³H]NMS-Dissoziation in M2- und M5-Rezeptoren war Prilla (Dissertationsschrift, 2006) ebenfalls aufgefallen, dass Trp 7.35 die Kinetik des Liganden im präferenziell Gq-koppelnden M5-Rezeptor nicht veränderte, sie im Falle von M2-Rezeptoren hingegen beschleunigte. Die Autorin postulierte daraufhin einen in Hinblick auf die Dissoziationszeit positiven Einfluss des Indolrings der Aminosäure Tryptophan 7.35 im M2-Rezeptor, der sich darin äußerte, dass die Interaktion zwischen Ligand und Epitop für die schnelle Bindungskinetik von Vorteil ist.

Zusammen mit den hier erhobenen Daten konnte demnach gezeigt werden, dass Trp 7.35 an der Dissoziation von [³H]NMS in Gi-koppelnden, nicht aber in Gq-koppelnden Muskarinrezeptoren beteiligt ist. Dies kann als Hinweis auf Ähnlichkeiten der Rezeptorarchitektur innerhalb der Gi- bzw. Gq-Klasse gedeutet werden.

5.2 Trp 7.35 ist an der Bindung der dualsterischen Substanzen Iper-6-phthal und Iper-6-naph sowie deren allosterischer Fragmente zum orthosterisch besetzten M3-Rezeptor beteiligt

In Kapitel 4.1.3.2 wurde dargestellt, dass selbst die höchsten Konzentrationen der allosterischen Modulatoren 6-Phthal und 6-Naph sowie der Hybridliganden Iper-6-phthal und Iper-6-naph an der M3 Trp 7.35→Ala-Mutante im Vergleich zum Wildtyp nicht mehr in der Lage waren, die Dissoziation des Radioliganden [³H]NMS von der orthosterischen Bindungsstelle zu verzögern. Durch die Wahl eines Puffersystems, für das in der Vergangenheit gezeigt wurde, dass es zu generell höheren Affinitätswerten im Vergleich zu „physiologischeren“ Puffern führt (Straßmann, Dissertationsschrift, 2007), konnte beobachtet werden, dass die Liganden auch an der M3 W526A-Mutante in der Lage

waren, die Dissoziation des Radioliganden zu verlangsamen (Kapitel 4.1.3.3). Wie am M3-Wildtyp wurde die Radioliganddissoziation durch 6-Naph und Iper-6-naph am punktmutierten M3-Rezeptor gar völlig unterbunden. Dazu waren 6-Phthal und Iper-6-phthal am M3-Wildtyprezeptor ebenfalls in der Lage.

Auffällig war, dass durch die Anlagerung des allosterischen Fragments des Iper-6-phthal-Moleküls im orthosterisch besetzten M3 W526A-Rezeptor eine unvollständige Verzögerung der Radioliganddissoziation auftrat (Kapitel 4.1.3.3, Abb. 9, Seite 75). Das im Gegensatz dazu stehende Ergebnis einer vollständigen [³H]NMS-Dissoziationsverzögerung des allosterischen Bausteins 6-Phthal im M3 W526A-Rezeptor wurde nicht weiter verfolgt.

Im gleichfalls Gq-koppelnden M5-Rezeptor zeigte 6-Phthal (synonym zu SH30) an der Trp 7.35→Ala-Mutante keinen Radioligand-dissoziationsverzögernden Effekt (Prilla, Dissertationsschrift, 2006), während er am Wildtyprezeptor beobachtet werden konnte. Im Gegensatz dazu änderte sich die allosterische Wirkung in Form des Ausmaßes der [³H]NMS-Dissoziationsverzögerung durch die Mutation Trp 7.35→Ala im M2-Subtyp nicht. Prilla (Dissertationsschrift, 2006) beschrieb Moleküldynamiksimulationen an M5- und M5 W477A-Rezeptoren, die von Frau J. Schrobang und Herrn Prof. H.-D. Höltje (Institut für pharmazeutische und medizinische Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschland) durchgeführt worden waren. Diese zeigten, dass sich durch die Substitution des Trp 7.35 im M5-Rezeptor durch die viel kleinere Aminosäure Alanin ein zweiter „Fluchtweg“ für den orthosterischen Liganden ergab, der es ermöglichte, dass das [³H]NMS den Rezeptor ungehindert zu verlassen vermochte.

Durch die in die gleiche Richtung weisenden Beobachtungen mit dem muskarinischen M3-Rezeptor ist es möglich, dass sich der Bereich um das Epitop Trp 7.35 der beiden Gq-koppelnden Subtypen in diesem Punkt dergestalt gleicht, dass innerhalb der präferenziell Gq-koppelnden M3- und M5-Rezeptoren an der beschriebenen Stelle mehr Raum zur Verfügung steht als im M2-Subtyp.

Trp 7.35 erwies sich als ein an der Bindung der untersuchten Hybridliganden sowie deren allosterischer Fragmente zum orthosterisch besetzten M3-Rezeptor beteiligtes Epitop.

5.3 Trp 7.35 trägt zur M2/M3-Subtypselektivität von W84 bei und ist affinitätsgebend für die dualsterischen Liganden Iper-6-phthal und Iper-6-naph

In Bindungsuntersuchungen des allosterischen Modulators W84 und der Hybridverbindungen Iper-6-phthal und Iper-6-naph zum freien M3-Rezeptor wurde ein Affinitätsbeitrag von Trp 7.35 beobachtet (Kapitel 4.1.4.4 und 4.1.4.6). In Bezug auf W84 erstreckte sich somit der von Prilla (Dissertationsschrift, 2006) für M2- und M5-Rezeptoren beschriebene, basisaffinitätsverleihende Charakter dieses Epitops ebenfalls auf M3-Rezeptoren.

Darüber hinaus zeigte W84 einen Affinitätsabfall zwischen M2-, M4- und M3-Rezeptoren (Kapitel 4.1.4.4 und 8.2.4) von jeweils einer knappen Dekade. Damit wies W84 eine klare M2/M3-Selektivität von 1,77 Dekaden Affinitätsunterschied auf. Prilla (Dissertationsschrift, 2006) war neben einer M2/M5 Selektivität (Affinitätsabfall 2,35 Dekaden) überdies aufgefallen, dass der durch die Trp 7.35→Ala-Mutation entstandene Affinitätsabfall von W84 an M2- stärker als an M5-Rezeptoren ausfiel. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass Trp 7.35 an der M2/M5-Subtypselektivität von W84 beteiligt ist. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten einen mit M5-Rezeptoren vergleichbar

schwachen Affinitätsabfall von W84 durch die M3 Trp 7.35→Ala-Mutation, vergleicht man ihn mit M2- bzw. M2 Trp 7.35→Ala-Rezeptoren (vorliegende Arbeit: Kapitel 4.1.4.4, Affinitätsverlust: 0,65 Dekaden (M3-Rezeptor); Prilla, Dissertationsschrift, 2006, Affinitätsverlust 0,75 Dekaden (M5-Rezeptor), 1,55 Dekaden (M2-Rezeptor)). Interessanterweise erwies sich die Affinität des verkürzten W84-Derivats 6-Phthal zum freien M3-Rezeptor gänzlich unabhängig von Trp 7.35, während am M2-Rezeptor ein Affinitätsabfall von 6-Phthal an der Trp 7.35→Ala-Mutante zu beobachten war (Kapitel 4.1.4.5 und 4.1.4.6). Gleiches traf auf das allosterische Fragment 6-Naph zu (Kapitel 4.1.4.5 und 4.1.4.6).

Die Ergebnisse aus Kapitel 8.2.4 zeigten einen zwischen M2- und M4-Rezeptoren vergleichbaren Affinitätsverlust von W84 an der jeweiligen Trp 7.35→Ala-Mutante (1,52 bzw. 1,43 Dekaden).

Somit kann postuliert werden, dass Trp 7.35 an der M2/M3 Subtypselektivität von W84 beteiligt ist. Der Beitrag des Epitops zur Affinität von W84 zum freien Rezeptorprotein ist zwischen vorwiegend Gi-koppelnden sowie präferenziell Gq-koppelnden Rezeptoren konserviert.

5.4 Subtypspezifischer Einfluss von Trp 7.35 auf die Rezeptoraktivierung durch Pilocarpin

Bei Untersuchungen zur Abhängigkeit der Pilocarpin-induzierten M2- und M3-Rezeptoraktivierung von Trp 7.35 lagen jeweils Messsysteme zugrunde, die den präferenziellen Kopplungsweg dieser beiden muskarinischen Subtypen erfassen. Der [³⁵S]GTPγS-Bindungsversuch detektiert die Gi-Kopplung des M2-Rezeptors (Milligan, 2003), während in IP1-Versuchen mit CHO-M3-Zellen ausschließlich die Gq-Aktivierung quantifiziert wurde (Trinquet et al., 2006; vorliegende Arbeit: Kapitel 4.4.2). Pilocarpin erwies sich als Partialagonist an M2- und M3-Rezeptoren (Kapitel 4.4.4.3: Tab. 75, Seite 154 und Kapitel 8.3.2: Tab. 100, Seite 218). Auf der Grundlage der vorliegenden Daten war Pilocarpin am M3-Rezeptor wirksamer und kopplungseffizienter als am M2-Rezeptor und besaß eine höhere intrinsische Aktivität (siehe Kapitel 4.4.4.3 und 8.3.2, Zusammenfassung in Tab. 88).

	Bmax	pEC ₅₀	E _{max}	Log τ
M2 ([³⁵ S]GTPγS)	1259 ± 209 (5) fmol/mg	5,72 ± 0,12	40 ± 2	-0,18 ± 0,05
M3 (IP1)	423299 ± 27743 (13) Rezeptoren/Zelle	6,68 ± 0,03 ^{***}	98 ± 1 ^{***}	1,57 ± 0,12 ^{***}

Tab. 88: Kenndaten aus [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimenten mit M2-CHO-Zellmembranhomogenaten und IP1-Versuchen an CHO-M3-Zellen mit Pilocarpin. Bmax: Expressionsniveau des M2-CHO-Zellmembranhomogenates in fmol/mg bzw. der CHO-M3-Zellen in Rezeptoren pro Zelle. Die Werte wurden durch homologe Konkurrenzexperimente ermittelt und sind Mittelwerte ± Standardfehler (n; Anzahl unabhängiger Experimente). pEC₅₀, E_{max}- und log τ-Werte sind die Wirksamkeiten, oberen Plateaus der Konzentrations-Effekt-Kurven (normiert auf die Aktivierung durch Acetylcholin) und Kopplungseffizienzen von Pilocarpin an M2-Rezeptoren aus [³⁵S]GTPγS-Versuchen und an M3-Rezeptoren aus IP1-Versuchen. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler von drei bis sechs unabhängigen Versuchen in Zwei- bis Dreifachbestimmung. ^{***}: Signifikant verschieden von jeweiliger M2-Kenngröße (t-Test, p < 0,001)

Pilocarpin erwies sich als ein stärkerer Agonist an M3- im Vergleich zu M2-Rezeptoren (Tab. 88). Jedoch bezog sich der Vergleich auf zwei verschiedene Messsysteme und es konnte nicht von einer gleichstarken Signalamplifikation ausgegangen werden. Janßen (Dissertationsschrift, 2011) ermittelte allerdings einen auf die Aktivierung durch Acetylcholin normierten E_{max}-Wert von Pilocarpin mit CHO-M2-Zellen in DMR-Experimenten von 59 ± 3,9 % (4). Die Signale in DMR-Experimenten

unterliegen einer hohen Signalamplifikation. Dieser für den M2-Rezeptor ermittelte Emax-Wert von Pilocarpin ist ebenfalls signifikant kleiner als der hier für den M3-Rezeptor in IP1-Versuchen ermittelte Wert (Tab. 88; t-Test, *** $p > 0,001$). Daher kann geschlussfolgert werden, dass Pilocarpin ein stärkerer Agonist an M3- im Vergleich zu M2-Rezeptoren ist.

Figuroa et al. (2009) fanden, dass Pilocarpin eine funktionelle Selektivität in Richtung M1- und M3- gegenüber M2- und M4-Rezeptoren aufwies. Tatsächlich wird Pilocarpin (Salagen® 5mg; Novartis Pharma, Nürnberg) in der Therapie des Sjögren-Syndroms angewendet, bei dem es durch Autoimmunprozesse zur verminderten Tätigkeit der Speichel- und Tränendrüsen und damit zu trockenen Mund- und Augenschleimhäuten kommt. Die Therapie mit Parasympathomimetika zielt darauf ab, dieses Defizit durch muskarinische Agonisten auszugleichen. Gautam et al. (2004) fanden, dass der Speichelfluss überwiegend von auf den entsprechenden Drüsenzellen lokalisierten M1- und M3-Rezeptoren vermittelt wird. Der Einsatz von Pilocarpin bei dieser Erkrankung und dem entsprechenden Therapieregime geht laut Fox et al. (2001) nicht mit ausgeprägten unerwünschten Wirkungen auf das Herz-Kreislaufsystem einher. Es häufen sich daher die Hinweise, dass Pilocarpin eine gewisse Subtypselektivität in Richtung von M3- (und M1-)-Rezeptoren gegenüber M2- (und M4-) Rezeptoren aufweist.

Dies war vor dem Hintergrund interessant, dass neben dem stärkeren Agonismus der Substanz an M3- im Vergleich zu M2-Rezeptoren auffiel, dass die Aktivierung des erstgenannten Rezeptors durch Pilocarpin von Trp 7.35 abhing, während aus den Versuchen aus Kapitel 8.3.2 hervorging, dass bei der Aktivierung des M2-Rezeptors dieses Epitop keine Rolle spielte. Auch in Bezug auf die Bindung von Pilocarpin war dieser Unterschied zwischen den Subtypen aufgefallen (Kapitel 4.1.4.2 und 8.2.2). Dies könnte darin begründet sein, dass Pilocarpin in der Lage war, im M3-Rezeptor eine Rezeptorkonformation hervorzurufen, die ähnlich wie Iperoxo und Acetylcholin eine Umorientierung des Areal im oberen Bereich der transmembranären Domänen zur Folge hatte. Trp 7.35 nähme dabei eine Orientierung in Richtung der orthosterischen Bindungsstelle ein, was plausibel erscheinen ließe, dass sowohl die Affinität von Pilocarpin als auch die Rezeptoraktivierung von Trp 7.35 abhing. Die fehlende Trp 7.35-Abhängigkeit in Bezug auf die Bindung und Aktivierung des M2-Rezeptors durch Pilocarpin sprach dafür, dass bei diesem Subtyp Unterschiede in der Umgestaltung der Agonist-induzierten Rezeptorstruktur existierten, die den M2- vom M3-Rezeptor unterschieden. Mutmaßlich zeigte sich dies in einem schwächeren Agonismus an M2-im Vergleich zu M3-Rezeptoren.

Somit könnte die Bindungs- und Aktivierungsabhängigkeit vom Epitop Trp 7.35 ein Indikator für die Stärke eines Agonisten sein, eine aktive Rezeptorkonformation hervorzurufen. Um diese Hypothese zu testen, müssten weitere klassische, muskarinische Partialagonisten wie Bethanachol an verschiedenen Subtypen von Muskarinrezeptoren in Bezug auf die Abhängigkeit von Trp 7.35 für die Ligandbindung und Rezeptoraktivierung untersucht werden.

5.5 McN-A-343 zeigt eine von klassischen muskarinischen Agonisten verschiedene Trp 7.35-Abhängigkeit

McN-A-343 als muskarinischer Partialagonist (Mitchelson, 2012; A. Kebig, Dissertationsschrift, 2010; Kapitel 4.4.4.4) unterschied sich in Bezug auf sein Bindungs- und Aktivungsverhalten von anderen, klassischen muskarinischen Agonisten. In Gleichgewichtsbindungsuntersuchungen mit der Radiosonde [³H]NMS konnte keine Abhängigkeit der Affinität zu M2- und M3-Rezeptoren von Trp 7.35 ausgemacht werden (Antony, Dissertationsschrift, 2007; vorliegende Arbeit: Kapitel 4.1.4.3 und

8.2.3). Valant et al. (2008) postulierten einen bitopischen Bindungsmodus der Substanz an M2-Rezeptoren, was gut mit der Beobachtung übereinstimmte, dass die [³H]NMS-Dissoziation durch den Liganden im M2-Rezeptor verzögert wurde (Kapitel 4.1.3.5). In der vorliegenden Arbeit konnte dasselbe Phänomen erstmals an M3-Rezeptoren beobachtet werden (Kapitel 4.1.3.5). Dies kann als starker Hinweis darauf gewertet werden, dass der Ligand Affinität zur allosterischen Bindungstasche des M3-Rezeptors aufwies. Anders als bei M2-Rezeptoren war am M3-Subtyp allerdings keine Abhängigkeit der Bindung zum orthosterisch besetzten Rezeptor von Trp 7.35 beobachtet worden, was in Bezug auf den M3-Rezeptor wiederum dafür sprach, dass McN-A-343 eine andere Bindungsorientierung im Rezeptorprotein einnahm als klassische muskarinische Allosterie.

Ob analog zum M2-Rezeptor auch für den M3-Rezeptor ein bitopischer Bindungsmodus für McN-A-343 angenommen werden konnte, ließ sich auf der Basis der vorliegenden Daten nicht beurteilen.

In Bezug auf den Bindungsmodus der Substanz im M3-Rezeptor sind zwei Alternativen denkbar. Es ist möglich, dass McN-A-343 den Rezeptor über die orthosterische oder die allosterische Bindungsstelle aktiviert (sog. „allosterischer Agonist“). Als Bindungsposition bietet sich ein dualsterischer, rein allosterischer und / oder rein orthosterischer Bindungsmodus an. Die zuletzt genannte Alternative steht nicht im Gegensatz zu dem Ergebnis, dass der Ligand in der Lage ist, die [³H]NMS-Dissoziation zu verlangsamen, wenn angenommen wird, dass ein Ligand sowohl für die orthosterische als auch für die allosterische Bindungsstelle im Rezeptorprotein Affinität aufweisen kann. Die Tatsache, dass die Inhibitionskurve des Liganden mit [³H]NMS auf 0 % ausschwang, kann bedeuten, dass es sich um ein kompetitives (durch orthosterische oder dualsterische Bindung) oder ein stark negativ kooperatives Bindungsverhalten von der allosterischen Bindungsstelle aus handelte.

Anhand von Kopplungseffizienzen wurde ermittelt, dass McN-A-343 als starker Partialagonist an M3-Rezeptoren einzuschätzen war, was in der Form für M2-Rezeptoren nicht beobachtet wurde (Kapitel 4.4.4.4: Tab. 79 (Seite 157) und Tab. 80, (Seite 157)). Diese Schlussfolgerung musste allerdings unter Vorbehalt gezogen werden, da mit dem [³⁵S]GTPγS- und dem IP1-Versuch zwei verschiedene Messsysteme zugrunde gelegt wurden. Diese griffen den jeweilig prävalenten Signalweg des zu untersuchenden Subtyps ab (Milligan, 2003; Trinquet et al., 2006; vorliegende Arbeit: Kapitel 4.4.2). Anders als klassische muskarinische Agonisten erwies sich die Aktivierung von M2- und M3-Rezeptoren durch McN-A-343 als unabhängig von Trp 7.35 (Kebig, Dissertationsschrift, 2010; vorliegende Arbeit: Kapitel 4.4.4.4: Tab. 79 (Seite 157) und Tab. 80 (Seite 157)). Bei der Ermittlung der funktionellen Affinitäten durch die Anwendung des *operational model of agonism* (Black und Leff, 1983) fiel jedoch auf, dass sich diese an der M3 W526A-Mutante im Vergleich zum Wildtyp reduzierte. Analog zu den Überlegungen von Keov et al. (2014) könnte dieses Ergebnis, das im Gegensatz zu Radioligandbindungsuntersuchungen (Kapitel 4.1.4.3: Tab. 31 (Seite 88)) stand, dafür sprechen, dass sich die Umgestaltung des Rezeptorproteins im Prozess der Aktivierung in diesem Fall dergestalt auswirkte, dass der Bereich um Trp 7.35 am Geschehen beteiligt war, was sich allerdings nicht –wie bereits erwähnt– auf die Rezeptoraktivierung auswirkte. In Bezug auf die funktionelle Affinität unterschied sich das Verhalten der Substanz zwischen M3- und M2-Rezeptoren, zumal bei letztgenanntem Subtyp analog zu Bindungsuntersuchungen kein Unterschied der funktionellen Affinität zwischen M2- und M2 W422A-Rezeptoren beobachtet werden konnte (Kapitel 4.1.4.3: Tab. 80 (Seite 157)).

Die Beobachtungen der Trp 7.35-Abhängigkeit in der Bindung der Substanz zum orthosterisch besetzten M2-Rezeptor (im Gegensatz zum M3-Rezeptor) (Kapitel 4.1.3.5: Abb. 11 (Seite 81)) sowie

in Bezug auf die funktionelle Affinität zum M3-Subtyp (im Gegensatz zum M2-Rezeptor) (*operational model of agonism* (Black und Leff, 1983); Kapitel 4.4.4.4, Tab. 81 (Seite 158) und Tab. 80 (Seite 157)), ließen auf ein leicht unterschiedliches Bindungsverhalten der Substanz McN-A-343 in M2- und M3-Rezeptoren schließen.

Ob die Substanz McN-A-343 im M3-Rezeptor wie im M2-Subtyp einen bitopischen Bindungsmodus einnahm, könnte durch die Einbeziehung von Rezeptormutanten aufgeklärt werden, bei denen Epitope der allosterischen sowie orthosterischen Bindungsstelle mutiert sind. Beispielsweise böten sich klassische, konservierte orthosterische Kernepitope wie Asp 3.32 oder Tyr 3.33 an (Wess, 1996; Caulfield und Birdsall, 1998; Lu et al., 2002). Gregory et al. (2010) fanden einen Beitrag von Asp 3.32 an der McN-A-343-Bindung zum M2-Rezeptor. Dieselben Autoren konnten allerdings genau wie Antony (Dissertationsschrift, 2007) keine Abhängigkeit im Bindungsverhalten von McN-A-343 zu Tyr 3.33 im M2-Rezeptor beobachten. Interessanterweise konnte jedoch die Substanz den M2 Y104A-Rezeptor (Mutation von Tyr 3.33 des M2-Rezeptors zu Alanin) nicht mehr aktivieren (Kebig, Dissertationsschrift, 2010).

Zur Klärung des Bindungsmodus von McN-A-343 im M3-Rezeptor wäre es darüber hinaus denkbar, die Affinität der Substanz zu einer M3 F222A-Mutante im Vergleich zum M3-Wildtyp zu untersuchen, bei der der Einfluss des Phenylalanins in der zweiten extrazellulären Schleife überprüft würde, das in Analogie zu einem Tyrosin im M2-Rezeptor steht, welches als Epitop der allosterischen Bindungsstelle an diesem Subtyp charakterisiert werden konnte (Buller, Dissertationsschrift, 2002; Voigtländer et al., 2003; Prilla et al., 2006). M3 F222 wurde allerdings ebenfalls als ein für die optimale Rezeptorkonformation für die NMS-Bindung beteiligtes Epitop gefunden (Martinez-Archundia et al., 2012). Interessanterweise beschrieben May et al. (2007), dass Mutationen des M2-Rezeptors in diesem Bereich zu einer Erhöhung des Anteils der hochaffinen Bindungsfraction der Substanz und zu einer Verstärkung der intrinsischen Aktivität auf dem ERK1/2-Signalweg führte, sobald dieses Epitop gegen Alanin ausgetauscht wurde (May et al., 2007; Valant et al., 2008). Kebig konnte dies auf der Ebene der G-Proteinaktivierung nicht beobachten, wohl aber durch Detektion der dynamischen Massenumverteilung (Dissertationsschrift, 2010). Ob dieses Phänomen damit zusammenhing, dass die Mutation des Tyrosins der extrazellulären Schleife dazu führte, dass die Substanz besseren Kontakt zur orthosterischen Bindungsdomäne erhielt, ließe sich durch Untersuchung der Doppelmutante M2 Y177A Y104A untersuchen. Parallel dazu könnten Experimente mit den analogen M3-Mutanten darüber Aufschluss geben, inwieweit sich diese Auswirkung eines räumlich entfernten, im extrazellulären Rezeptorbereich lokalisierten Epitops auf die Rezeptoraktivierung auch in Subtypen mit anderer G-Protein-Kopplungsprävalenz beobachten ließe.

Wie für den M2-Rezeptor bereits publiziert (May et al., 2007; Valant et al., 2008), konnte im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen gezeigt werden, dass McN-A-343 Affinität zur allosterischen Bindungsdomäne im muskarinischen M3-Rezeptor aufweist. Der Unterschied bezüglich der Trp 7.35-Abhängigkeit der McN-A-343-Affinität zu orthosterisch besetzten M2- und M3-Rezeptoren spricht für eine unterschiedliche Bindungstopographie der Substanz zwischen beiden Subtypen. Zur Bestimmung des Bindungsmodus` der Substanz McN-A-343 im muskarinischen M3-Rezeptor bedarf es Versuchen mit weiteren Rezeptormutanten, bei denen der Einfluss verschiedener orthosterischer und allosterischer Epitope auf die Bindungsaffinität untersucht wird.

5.6 Iperoxo vermittelt Gq-, Gs-, Gi- und G12/13-vermittelte Signale in CHO-M3-Zellen

In den Kapiteln 4.3.2, 4.3.3 und 8.4.1 konnten sowohl für CHO-M3- als auch für CHO-M3 W526A-Zellen Signale der dynamischen Massenumverteilung detektiert werden, nachdem die Zellen mit QIC, PTX und CTX vorbehandelt worden waren. Durch die im Vorfeld der Agoniststimulation vorgenommene Daueraktivierung aller G α - Untereinheiten in den Zellen durch den Pan-G-Protein-Aktivator Aluminiumfluorid konnte keine vom Basalwert verschiedene dynamische Massenumverteilung mehr detektiert werden (Kapitel 4.3.2, 4.3.3 und 8.4.1), was für einen G-Protein-abhängigen Ursprung des Signals sprach.

Neben der Möglichkeit, dass es sich bei dem Signal nach Vorbehandlung mit QIC, PTX und CTX um ein Signal nach Aktivierung von G12/13-Proteinen handelte, konnte es alternativ auch sein, dass die eingesetzten G-Protein-Modulatoren nicht alle Subtypen der jeweiligen G-Protein-Familie mit gleicher Intensität zu hemmen vermochten. Für nahezu alle Subtypen der G α s- und der G α i/o-Familie konnte die gewünschte Modulation durch CTX und PTX nachgewiesen werden (Milligan und Kostenis, 2006). Für den Gq-Inhibitor QIC ist dies in der Form noch nicht publiziert. Zeigten Nesterov et al. (2010), dass die Substanz Gq/11-induzierte Transduktionsvorgänge inhibierte, wiesen die Autoren daneben auf die enge strukturelle Verwandtschaft zu YM-254890 hin. Diese Substanz wurde aus Chromobakterien isoliert und ist ebenfalls als selektiver Gq-Inhibitor charakterisiert (Takasaki et al., 2004; Nishimura et al., 2010). Es konnte gezeigt werden, dass YM-254890 als selektiver Hemmer von G α q-, G α 11- und G α 14-Proteinen angesehen werden kann, nicht jedoch von G α 15 (murin)- bzw. G α 16-Proteinen (human). Unter der Annahme, dass sich YM-254890 und QIC in diesen Eigenschaften gleichen, war nicht auszuschließen, dass das Signal nach Vorbehandlung mit den G-Protein-Modulatoren PTX, CTX und QIC G α 15- bzw. G α 16-vermittelt war. Diese Subtypen der Gq-Familie führen u.a. zur Öffnung von Kaliumkanälen in der Zellmembran (Milligan und Kostenis, 2006) und können somit auch zu detektierbaren dynamischen Massenumverteilungen führen. G α 15- bzw. G α 16-Proteine sind allerdings nicht ubiquitär vorhanden, sondern wurden bisher nur in blutbildenden Zellen nachgewiesen (Amatruda et al., 1991; Wilkie et al., 1991).

Es wurde daher geschlussfolgert, dass durch die DMR-Messungen alle vier G-Protein-abhängigen Signalwege (Gq, Gi/o, Gs und G12/13) in den hier verwendeten CHO-M3-Zellen nachgewiesen werden konnten.

5.7 Die Steigerung des Agonist-vermittelten DMR-Signals in CHO-M3 W526A-Zellen nach Inhibition des Gi- und Maskierung des Gs-Weges im Vergleich zu Kontrollbedingungen geht nicht mit einer Erhöhung des IP3-Gehaltes der Zelle einher

Die Inhibition des Gi- und Maskierung des Gs-Weges durch Vorbehandlung mit PTX und CTX hat in Messungen der dynamischen Massenumverteilung in CHO-M3-W526A-Zellen zu der Beobachtung geführt, dass die Signalintensität im Vergleich zu der in unvorbehandelten Zellen erhöht war (Kapitel 4.3.5: Abb. 42 C und D (Seite 134) und Tab. 61 (Seite 136)). Durch eine zusätzliche Inhibition des Gq-Weges durch QIC wurde dieses Signal stark reduziert. Dies fasst Tab. 89 noch einmal zusammen.

	+ PTX + CTX	+ QIC + PTX + CTX
Iperoxo 100µM	151 ± 15 (11)	7 ± 1 (6) ***
Iper-6-phthal 300µM	212 ± 19 (10)	-5 ± 4 (4) ***
Iper-6-naph 300µM	252 ± 25 (9)	6 ± 6 (4) ***

Tab. 89: Maximale dynamische Massenumverteilung durch Iperoxo, Iper-6-phthal und Iper-6-naph in CHO-M3 W526A-Zellen nach Vorbehandlung mit G-Proteinmodulatoren in Prozent des durch den jeweiligen Agonisten induzierten Signals unter Kontrollbedingungen (ohne Vorbehandlung). Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler (n; Anzahl unabhängiger Experimente). *** : Signifikant verschieden vom Wert nach Vorbehandlung mit PTX und CTX (t-Test, *** p < 0,001)

In Messungen der Agonist-vermittelten Generierung von IP1 wurde überprüft, inwieweit die Bildung intrazellulären, sekundären Botenstoffs an den erhöhten Signalen der dynamischen Massenumverteilung beteiligt gewesen war. Es zeigte sich kein zu Kontrollbedingungen verschiedenes, Iperoxo-, Iper-6-phthal- und Iper-6-naph-induziertes Signal in Zellen, in denen der Gi-Weg inhibiert und der Gs-Weg maskiert war (Kapitel 4.4.3, Abb. 48, Seite 146). Demnach war der in DMR-Experimenten beobachtete Effekt nicht auf die Generierung intrazellulären IP1 zurückzuführen.

Felder et al. (1992) beschrieben einen von IP3 unabhängigen Ca²⁺-Einstrom aus dem Extrazellulärraum nach Carbacholstimulation eines M3-Rezeptors. Die Mutmaßung der Autoren, dass dieser Effekt Gq-Protein-unabhängig ablief, stand im Gegensatz zu den Beobachtungen, die in der vorliegenden Arbeit gemacht wurden (Tab. 89). Auch Schneider et al. (2004) beobachteten eine M3-vermittelte Erhöhung intrazellulären Ca²⁺ mit Beteiligung von in der Zellmembran positionierten, spannungsabhängigen L-Typ-Calciumkanälen. Dieser Effekt war durch einen Phospholipase C-Inhibitor unbeeinflusst.

Somit handelte es sich bei dem in Kapitel 4.3.5 beobachteten Effekt möglicherweise um einen rezeptorvermittelten Anstieg intrazellulären Ca²⁺, der unabhängig von einem durch Phospholipase C induzierten IP3-Anstieg ablief. Um zu testen, ob der Effekt durch den Einstrom von Ca²⁺ aus dem Extrazellulärraum zustande gekommen war, könnten Versuche mit einem calciumfreien Inkubationspuffer durchgeführt werden.

Die hier beschriebene Beobachtung wurde nicht näher untersucht.

5.8 Subtypspezifischer Einfluss der Mutation Trp 7.35→Ala auf die Rezeptoraktivierung durch Iper-6-phthal und Iper-6-naph

Bock et al. (2012) fanden, dass der allosterische Bereich des muskarinischen M2-Rezeptors in das Geschehen der Rezeptoraktivierung involviert ist, obwohl er räumlich entfernt vom G-Protein-Interaktionsareal lokalisiert ist. Die Autoren bedienten sich dazu Hybridmolekülen mit unterschiedlichen Kettenlängen zwischen orthosterischem und allosterischem Fragment sowie der Untersuchung der Auswirkung der Mutation Trp 7.35→Ala. Es wurde postuliert, dass der durch den Austausch von Tryptophan zu Alanin in diesem Bereich erlangte Freiraum die sterische Einengung der Rezeptorbeweglichkeit kompensieren könnte, welche durch den voluminösen, allosterischen Substituenten verursacht wird. Infolgedessen könne sich die intrinsische Aktivität verbessern (Bock et al., 2012). In Übereinstimmung mit dieser Vorstellung zeigte die Kristallisation des aktiven M2-Rezeptors (Kruse et al., 2013), dass das Erlangen einer aktiven Rezeptorkonformation mit einer Verengung im Bereich der extrazellulären Domänen einhergeht.

Ob es sich bei den von Bock et al. (2012) gefundenen Beobachtungen um einen generellen, subtypunabhängigen Mechanismus handelte, sollte durch die Untersuchung des prävalent Gq-koppelnden M3-Rezeptors aufgedeckt werden.

Dazu wurde zunächst der Einfluss der Mutation Trp 7.35→Ala auf den Anteil dualsterischer zu rein allosterischer Bindung der Hybridmoleküle an M2- und M3-Rezeptoren untersucht. Die Basis dafür waren Radioligandbindungsuntersuchungen mit den Hybridliganden und deren allosterischen Fragmenten. Dabei wurde die Affinität der allosterischen Fragmente zum Rezeptorprotein mit der Affinität des dualsterischen Liganden im rein allosterischen Bindungsmodus gleichgesetzt.

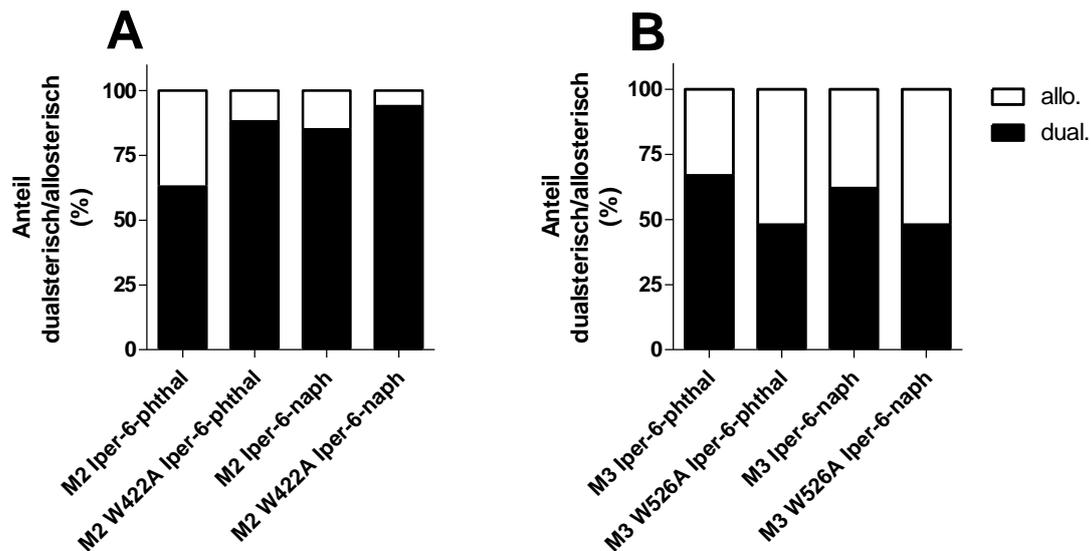


Abb. 58: Einfluss der Mutation Trp 7.35→Ala auf den Anteil dualsterischer zu rein allosterischer Bindung von Iper-6-phthal und Iper-6-naph an M2 (A)- und M3-Rezeptoren (B). Grundlage der abgebildeten Daten sind die in Kapitel 4.1.4.5 und 4.1.4.6 errechneten Verhältnisse.

Während sich der Anteil des dualsterischen Bindungsmodus im M2-Rezeptor durch die Mutation Trp 7.35→Ala jeweils erhöhte, wurde beim M3-Rezeptor der gegenteilige Effekt beobachtet.

Bei Versuchen am M2-Rezeptor fiel auf, dass der Affinitätsabfall der allosterischen Fragmente zum M2-Rezeptor durch die Mutation stärker ausgeprägt war als der der Hybridliganden (Kapitel 4.1.4.5, Tab. 33, Seite 92). Es stellte sich daher die Frage, welche Ausrichtung das Tryptophan 7.35 im dualsterischen Bindungsmodus der Liganden im M2-Rezeptor einnahm.

Kruse et al. (2013) veröffentlichten Bilder der Kristallstruktur des M2-Rezeptors, aus denen zu entnehmen war, dass bei gleichzeitiger Bindung von Iperoxo und des positiven, allosterischen Modulators LY2119620 das Trp 7.35 in Richtung der allosterischen Bindungsstelle ausgerichtet war. Der hier beobachtete Befund, dass Trp 7.35 an der Bindung der allosterischen Fragmente 6-Phthal und 6-Naph zum M2-Rezeptor beteiligt war (Kapitel 4.1.4.5, Tab. 33, Seite 92), legte die Schlussfolgerung nahe, dass durch Wegfallen dieses Epitops durch die Mutation der *allosterische* Bindungsmodus zugunsten des *dualsterischen* reduziert wurde. Der im Vergleich zum *allosterischen* Bindungsmodus verhältnismäßig kleinere Affinitätsverlust der Liganden durch die Mutation im *dualsterischen* Bindungsmodus führte zu der Vermutung, dass das Epitop im *dualsterischen* Modus

ähnlich der von Kruse et al. (2013) veröffentlichten Kristallstruktur in Richtung des allosterischen Fragmentes ausgerichtet war.

Trp 7.35 zeigte sich an der Bindung der allosterischen Fragmente und damit der Hybridliganden im *allosterischen* Bindungsmodus zum M3-Rezeptor als nicht beteiligt, war allerdings für den *dualsterischen* Bindungsmodus affinitätsgebend (Kapitel 4.1.4.6, Tab. 35, Seite 96). Durch die Mutation des Epitops im M3-Subtyp reduzierte sich der Anteil der dualsterischen Bindung. Vor diesem Hintergrund wäre es daher interessant, zu erfahren, welche Ausrichtung das Tryptophan 7.35 im M3-Subtyp im dualsterischen Bindungsmodus der Hybride aufweist. Die hier erhobenen Daten sprechen dafür, dass es bei dualsterischer Bindung ein Epitop der orthosterischen Bindungsstelle ist.

Auf funktioneller Ebene ergab sich ebenfalls ein subtypspezifischer Unterschied in Bezug auf die Abhängigkeit der Hybridliganden von Trp 7.35. Die Beobachtungen von Bock et al. (2012) sowie die in Kapitel 4.5.4 dargestellten Daten zeigten, dass die Mutation im M2-Subtyp förderlich für die Rezeptoraktivierung ist. Der Interpretation der zitierten Autoren folgend war dies auf eine Erhöhung der Flexibilität im Bereich der allosterischen Bindungsstelle zurückzuführen, was räumliche Veränderungen innerhalb des Rezeptorproteins erleichterte. Ebenso wurde postuliert, dass die Mutation einen optimalen Sitz des Hybridmoleküls im Rezeptorprotein ermöglichte, der eine Konformation initiierte, die für die volle Aktivierung notwendig war. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gefundene Erhöhung des Anteils an dualsterischem, und damit zur Aktivierung führenden Bindungsmodus durch die Trp 7.35→Ala-Mutation (Kapitel 4.1.4.5) trägt vermutlich ebenfalls zu der verbesserten intrinsischen Aktivität der Hybridliganden an der M2 Trp 7.35→Ala-Mutante im Vergleich zum M2-Wildtyprezeptor bei.

Im M3-Rezeptor *erniedrigte* sich der Anteil an dualsterischem Bindungsmodus der Hybridliganden durch die Trp 7.35→Ala-Mutation (Kapitel 4.1.4.6), was sich hemmend auf die Iper-6-phthal- und Iper-6-naph-vermittelte Rezeptoraktivierung auswirkte (Kapitel 4.3.5 und 4.3.6). Die Punktmutation führte also hier nicht zu einem auf eine Verbesserung der konformationellen Flexibilität des allosterischen Bereichs zurückzuführenden verstärkten Signal. Trp 7.35 stellte sich demnach im M3-Rezeptor nicht als hinderlich in Bezug auf die Rezeptoraktivierung durch die Hybridliganden heraus.

Der zwischen M2- und M3-Rezeptoren beobachtete Unterschied in Bezug auf den Einfluss der Mutation Trp 7.35→Ala auf die intrinsische Aktivität der Hybridspezies Iper-6-phthal und Iper-6-naph warf die Frage auf, ob die Notwendigkeit eines flexiblen Vorhofs zur orthosterischen Bindungsstelle im Hinblick auf die Kopplungskompetenz des Rezeptors zwischen den beiden Subtypen konserviert war.

Bock et al. (2012) stellten fest, dass Iper-6-phthal und Iper-6-naph einen *ligand bias* in Richtung des präferenziellen (Gi-)-Weges aufwiesen. Durch die Besetzung des allosterischen Bereichs durch die dualsterischen Substanzen war die Fähigkeit des Rezeptors, eine für den Gs-Signalweg notwendige Rezeptorkonformation einzunehmen, eingeschränkt. Die Verlängerung der Zwischenkette von sechs auf acht C-Atome hatte im Falle des Iper-8-naph interessanterweise den Effekt, dass der Ligand nun wieder die gleiche Kopplungskompetenz wie der Referenzagonist aufwies. Die Autoren begründeten dies damit, dass der voluminöse allosterische Baustein in diesem Fall räumlich entfernter von den kritischen Interaktionsarealen des allosterischen Bereiches lokalisiert war, wodurch die für ein volles G-Proteinkopplungsrepertoire notwendige Flexibilität wieder gegeben war.

Abb. 59 stellt die mit Hilfe der Vorgehensweise von Rajagopal et al. (2011) ermittelten σ -Werte (Gleichung 19) von Iper-6-phthal und Iper-6-naph an M3- und M2-Rezeptoren auf den jeweiligen Signalwegen der ersten (Gq bzw. Gi) und zweiten Wahl (Gs) dar. Dabei entsprechen die Abstände der Datenpunkte der Liganden von der Winkelhalbierenden (Referenzebene) dem Biasfaktor β (Gleichung 20). Diese β -Werte sind in Abb. 60 aufgeführt. Die Kopplungseffizienzen der Liganden an M2-Rezeptoren zur Ermittlung der hier dargestellten Parameter entstammen der Arbeit von Bock et al. (2012).

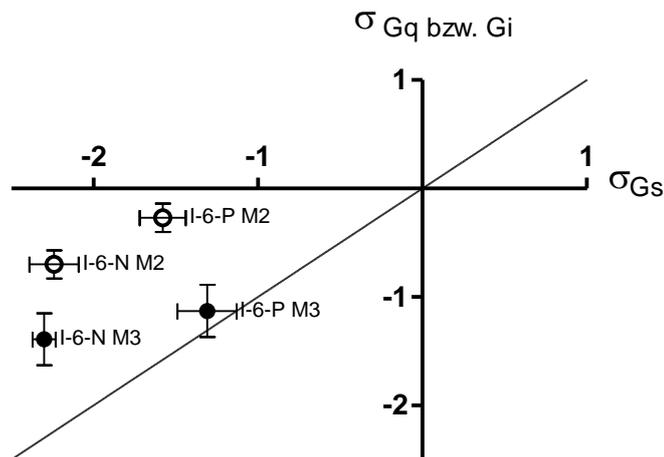


Abb. 59: σ -Werte (Gleichung 19) der dualsterischen Substanzen Iper-6-phthal (I-6-P) und Iper-6-naph (I-6-N) an M3- (geschlossene Symbole; Signalweg der ersten Wahl: Gq; ermittelt in DMR-Experimenten mit Vorbehandlung der CHO-M3-Zellen mit PTX und CTX (Kapitel 4.3.5). Signalweg der zweiten Wahl: Gs; ermittelt in DMR-Experimenten mit Vorbehandlung der CHO-M3-Zellen mit QIC und PTX (Kapitel 4.3.6)) und M2-Rezeptoren (offene Symbole; Signalweg der ersten Wahl: Gi; ermittelt in [35 S]GTP γ S-Bindungsexperimenten. Signalweg der zweiten Wahl: Gs; ermittelt in Versuchen zur Messung der intrazellulären cAMP-Generierung. Die Werte für den M2-Rezeptor entstammen der Arbeit von Bock et al. (2012)). Die Winkelhalbierende stellt die Ebene von Liganden dar, die keinen *bias* aufweisen. Im Falle des M3-Rezeptors diene Iperoxo, beim M2-Rezeptor Acetylcholin als Referenzagonist. Die zugrunde liegenden Kopplungseffizienzen von Acetylcholin an M2-Rezeptoren auf dem Gi- und dem Gs-Weg unterscheiden sich nicht signifikant von den Kopplungseffizienzen von Iperoxo auf dem Gi- und dem Gs-Weg (t-Test, $p > 0,05$). Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei bis fünf unabhängigen Experimenten in Doppel- oder Dreifachbestimmung

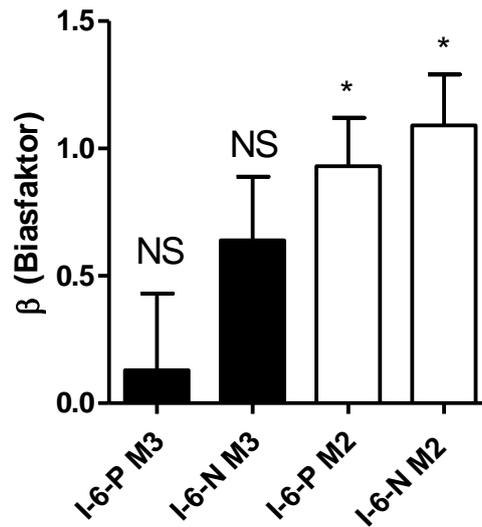


Abb. 60: Biasfaktor β (Gleichung 20) der dualsterischen Substanzen Iper-6-phthal (I-6-P) und Iper-6-naph (I-6-N) an M3- und M2-Rezeptoren. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei bis fünf unabhängigen Experimenten in Doppel- und Dreifachbestimmung. NS: Nicht signifikant verschieden von Null (t-Test, $p > 0,05$). *: Signifikant verschieden von Null (t-Test, $p < 0,05$)

Durch die Analyse der Kopplungseffizienzen auf den Signalwegen der ersten und zweiten Wahl ließ sich kein *bias* der dualsterischen Liganden Iper-6-phthal und Iper-6-naph an M3-Rezeptoren nachweisen, während die selben Substanzen am M2-Rezeptor einen *bias* in Richtung des Gi-Weges aufwiesen.

Bock et al. (2012) quantifizierten den *ligand bias* der Hybrids-substanzen Iper-6-phthal und Iper-6-naph am M2-Rezeptor auf den Signalwegen der ersten und zweiten Wahl unter Einbeziehung der durch das *operational model of agonism* (Black und Leff, 1983) erhaltenen Affinitätsparameter und die dadurch ermöglichte Berechnung des Wertes $\Delta\Delta\log(\tau / K_A)$ (Erklärung in Kapitel 3.3.1). Abb. 61 stellt die *bias*-Parameter $\Delta\Delta\log(\tau / K_A)$ der Testsubstanzen an M2- und M3-Rezeptoren dar. Lagen im Falle des M3-Rezeptors wiederum die Gq- bzw. Gs-vermittelten Effekte, die mithilfe der dynamischen Massenumverteilung ermittelt wurden (Kapitel 4.3.5 und 4.3.6), zugrunde, stellten [³⁵S]GTP γ S-Experimente und Messungen des intrazellulären cAMP-Gehaltes die Basis zur Detektion von Gi- und Gs-vermittelten Effekten durch den M2-Rezeptor dar. Die Werte für den M2-Rezeptor sind der Arbeit von Bock et al. (2012) entnommen.

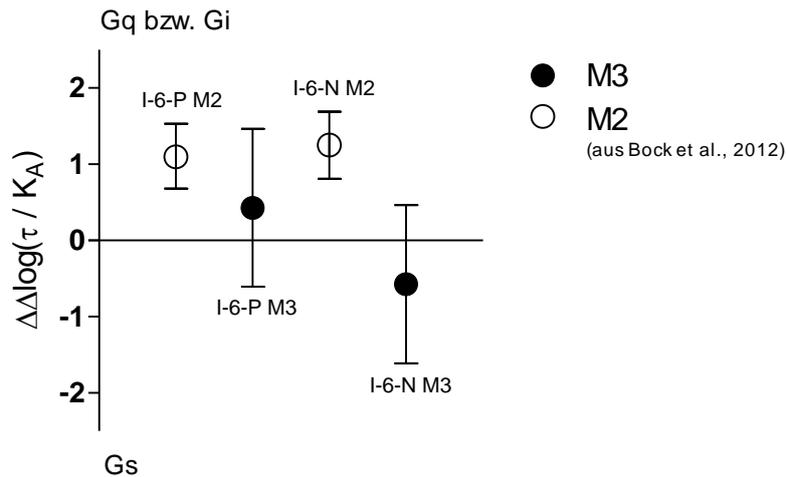


Abb. 61: $\Delta\Delta\log(\tau / K_A)$ -Werte der dualsterischen Substanzen Iper-6-phthal (I-6-P) und Iper-6-naph (I-6-N) an M3- (geschlossene Symbole; Signalweg der ersten Wahl: Gq; ermittelt in DMR-Experimenten mit Vorbehandlung der CHO-M3-Zellen mit PTX und CTX (Kapitel 4.3.5). Signalweg der zweiten Wahl: Gs; ermittelt in DMR-Experimenten mit Vorbehandlung der CHO-M3-Zellen mit QIC und PTX (Kapitel 4.3.6)) und M2-Rezeptoren (offene Symbole; Signalweg der ersten Wahl: Gi; ermittelt in [35 S]GTP γ S-Bindungsexperimenten. Signalweg der zweiten Wahl: Gs; ermittelt in Versuchen zur Messung der intrazellulären cAMP-Generierung. Die Werte für den M2-Rezeptor entstammen der Arbeit von Bock et al. (2012)). Im Falle des M3-Rezeptors diente Iperoxo, beim M2-Rezeptor Acetylcholin als Referenzagonist. Die zugrunde liegenden Kopplungseffizienzen von Acetylcholin an M2-Rezeptoren auf dem Gi- und dem Gs-Weg unterscheiden sich nicht signifikant von den Kopplungseffizienzen von Iperoxo auf dem Gi- und dem Gs-Weg (t-Test, $p > 0,05$). $\Delta\Delta\log(\tau / K_A)$ -Werte basieren auf der Analyse der Konzentrations-Effekt-Beziehungen mit dem *operational model of agonism* (Black und Leff, 1983). Positive Werte repräsentieren einen *bias* in Richtung des Signalweges der ersten Wahl (Gq für M3 und Gi für M2), wenn die Konfidenzintervalle die Nulllinie nicht schneiden. Negative Werte repräsentieren einen *Gs-bias* (jeweiliger Signalweg der zweiten Wahl), wenn die Konfidenzintervalle die Nulllinie nicht schneiden. Die Werte sind Mittelwerte \pm Konfidenzintervalle (Konfidenzniveau: 95%)

Die Analyse ergab, dass die dualsterischen Substanzen Iper-6-phthal und Iper-6-naph keinen *ligand bias* in Richtung des einen oder des anderen Signalweges in CHO-M3-Zellen aufwiesen. Offensichtlich wirkte sich die Präsenz der Liganden im Bereich der allosterischen Bindungstasche im M3-Rezeptor nicht dergestalt aus, dass die volle Kopplungskompetenz verloren ging.

Rückschlüsse auf eine sich zwischen den Subtypen unterscheidende Rezeptorarchitektur können auf der Basis der vorliegenden Daten nur unter Vorbehalt gezogen werden. Die Beobachtungen in Bezug auf den Einfluss der Punktmutation Trp 7.35→Ala am M2-Rezeptor (Bock et al., 2012; vorliegende Arbeit: Kapitel 4.5.4, Tab. 87 (Seite 168)) stehen im Einklang mit Befunden von Kruse et al. (2013), die den Unterschied zwischen der aktiven und inaktiven Rezeptorkonformation des M2-Subtyps detailliert beschrieben, wenn angenommen werden kann, dass die Mutation Trp 7.35→Ala die für die aktive Rezeptorkonformation notwendige Verengung im oberen Bereich der transmembranären Domänen ermöglichte. Da am M3-Rezeptor durch die Mutation Trp 7.35→Ala keine Verbesserung der intrinsischen Aktivität durch die Hybridliganden beobachtet werden konnte (Kapitel 4.3.5: Tab. 64 (Seite 138); Kapitel 4.3.6: Tab. 66 (Seite 141); Kapitel 4.4.4.5: Tab. 83 (Seite 160); Kapitel 4.5.3: Tab. 85 (Seite 165)), lag der Schluss nahe, dass sich der Übergang von inaktiver zur aktiven Rezeptorkonformation zwischen den Subtypen unterscheidet. Dies wird durch die Beobachtung gestützt, dass Agonisten, die gleichzeitig mit orthosterischer und allosterischer Domäne interagieren, im M2-Rezeptor die Fähigkeit, den Signalweg der zweiten Wahl anzuschalten, reduzierten, während dieselben Liganden die Kopplungskompetenz des M3-Rezeptors nicht einschränkten (Abb. 60 und Abb. 61).

5.9 Tryptophan 7.35 ist ein konformationssensibles Epitop muskarinischer Acetylcholinrezeptoren

Vorangegangene Untersuchungen und die eigenen Befunde zeigten, dass Trp 7.35 im Übergangsbereich der dritten extrazellulären Schleife und der siebten transmembranären Domäne muskarinischer Acetylcholinrezeptoren je nach Rezeptorkonformation eine andere Position innerhalb des Rezeptorproteins einnahm.

In M2- und M5-Rezeptoren erwies sich Trp 7.35 als ein Bindungsepitop für allosterische Antagonisten (Prilla et al., 2006). Dies konnte durch Bindungsuntersuchungen und durch molekulares Modeling gezeigt werden. Ebenso erwies sich die Affinität von W84 als klassischem Vertreter allosterischer Modulatoren aus der Familie der Alkanbisammoniumverbindungen in M3- und M4-Rezeptoren als Trp 7.35-abhängig (Kapitel 4.1.4.4 und 8.2.4).

Bilder aus molekularem Modeling, die die Position von Antagonisthybridliganden im M2-Rezeptor zeigen, legten die zum allosterischen Bereich hin ausgerichtete Position von Trp 7.35 offen (Schmitz et al., 2014). Dies galt sowohl für die von Scopolamin abgeleiteten Liganden Sco-6-phth und Sco-6-naph wie für die von Atropin abgeleiteten Substanzen Atr-6-phth und Atr-6-naph, wobei nur für letztere eine affinitätsgebende Rolle des Trp 7.35 ermittelt werden konnte (Schmitz et al., 2014).

Obwohl die Autoren einen leichten Zugewinn an Bindungsaffinität von Atropin zum Trp 7.35→Ala-mutierten M2-Rezeptor im Vergleich zum Wildtyprezeptor ermittelten, mehrten sich die Hinweise, dass die Affinität orthosterischer Antagonisten nicht von dieser Aminosäure abhängt. Schmitz et al. (2014) ermittelten für M2- sowie für M2 W422A-Rezeptoren eine gleiche Affinität von Scopolamin. Prilla et al. (2006) zeigten anhand von N-Methylscopolamin an M2- und M5-Rezeptoren, dass die Bindung nicht von Trp 7.35 abhing. Janßen (Dissertationsschrift, 2011) fand, dass dies ebenfalls auf den M4-Rezeptor zutraf. In der vorliegenden Arbeit zeigten die Ergebnisse aus Kapitel 4.1.2.1 (Seite 64), dass sich die Affinität von N-Methylscopolamin zu M1, M2-, M3- und M4-Rezeptoren nicht durch die Mutation Trp 7.35→Ala verändert. Antony (Dissertationsschrift, 2007) ermittelte keine Abhängigkeit von Trp 7.35 für die Bindung von Atropin zum M2-Rezeptor, was in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte (Kapitel 4.1.2.1). Ebenfalls erwies sich die Bindung von Atropin als unabhängig von Trp 7.35 im M3-Rezeptor (Kapitel 4.1.2.2).

Somit kann für die inaktive Konformation muskarinischer Acetylcholinrezeptoren zusammengefasst werden, dass Trp 7.35 ein auf die allosterische Bindungsdomäne ausgerichtetes Epitop ist.

Durch den Einfluss von Agonisten verändert sich die dreidimensionale Gestalt von Rezeptorproteinen hin zu aktiven Rezeptorkonformationen. Das Gefüge der Epitope wird dabei einer Neuordnung unterworfen. War die Bindung von orthosterischen Antagonisten unbeeinflusst von der Trp 7.35→Ala-Mutation, erwies sich das Epitop als an der Bindung des endogenen Agonisten Acetylcholin zu M2-, M3- und M4-Rezeptoren beteiligt (Jäger et al., 2007; vorliegende Arbeit: Kapitel 4.1.4.1.1, 4.1.4.1.2 und 8.2.1). Auch die Affinität des muskarinischen Superagonisten Iperoxo (Schrage et al., 2013) war M2 W422- bzw. M3 W526A-abhängig (Bock et al., 2012; vorliegende Arbeit: Kapitel 4.1.4.1.1 und 4.1.4.1.2). Die Ausrichtung des Epitops in Richtung dieses Agonisten konnte in der Kristallstruktur des aktiven M2-Rezeptors ebenfalls beobachtet werden (Kruse et al., 2013). In diesem Zusammenhang bemerkenswert war, dass die Bindung des muskarinischen Partialagonisten Pilocarpin im M3-Rezeptor von Trp 7.35 abhing, im M2-Rezeptor nicht (Jäger et al., 2007; vorliegende Arbeit: Kapitel 4.1.4.2 und 8.2.2). Dieses Phänomen wurde in Kapitel 5.4 diskutiert. Als Ausnahme

von der hier beschriebenen Epitopabhängigkeit muskarinscher Agonisten erwies sich die Affinität von McN-A-343 als unabhängig von Trp 7.35 sowohl an M2- als auch an M3-Rezeptoren (Antony, Dissertationsschrift, 2007; vorliegende Arbeit: Kapitel 4.1.4.3 und 8.2.3).

Über die Ausrichtung des Trp 7.35 im Rezeptorprotein, an das ein allosterischer Agonist angelagert ist, liegen keine Daten vor. Bei simultaner Bindung von Iperoxo und dem allosterischen Agonisten LY 2119620 im M2-Rezeptorprotein allerdings ragt das Epitop in Richtung des zuletzt genannten Liganden (Kruse et al., 2013).

Iper-6-phthal und Iper-6-naph sind dualsterische Substanzen, bei denen der Superagonist Iperoxo den orthosterischen Teil darstellt und verkürzte Derivate von W84 und Naphmethonium (zweier allosterischer Antagonisten), namentlich 6-Phthal und 6-Naph, die allosterischen Fragmente sind. Die Ergebnisse aus Kapitel 4.1.4.6 zeigen, dass die Affinität dieser beiden Substanzen im allosterischen Bindungsmodus nicht von Trp 7.35 im M3-Rezeptor abhing, sich jedoch bei dualsterischer Bindung ein Affinitätsverlust der Liganden zum M3-W526A-Rezeptor im Vergleich zum Wildtyp ergab. Da eine dualsterische im Vergleich zur rein allosterischen Einflussnahme der Substanzen Umgestaltungen des Rezeptorproteins in Richtung einer aktiven Konformation nach sich zieht, war wahrscheinlich, dass Trp 7.35 in Richtung des Iperoxoteils des Liganden ausgerichtet war. Diese Vermutung wurde durch die Beobachtung untermauert, dass sich der Anteil dualsterischer Bindung nach Trp 7.35→Ala-Mutation verringerte (Kapitel 4.1.4.6). Die Beobachtung, dass die Mutation Trp 7.35→Ala im M2-Rezeptor zu einem stärkeren Affinitätsabfall der allosterischen Bausteine als des Hybridmoleküls im dualsterischen Bindungsmodus führt, ließ vermuten, dass hier das Trp 7.35 in Richtung des allosterischen Fragmentes ausgerichtet ist. Im Einklang mit dieser Vorstellung verursachte die Mutation eine Reduktion des allosterischen Bindungsmodus der Hybridliganden im M2-Rezeptor (Kapitel 4.1.4.5).

Die Beobachtungen sprachen demnach für eine sich zwischen den Subtypen M2 und M3 unterscheidende Einflussnahme des Bereiches im Übergang zwischen orthosterischem und allosterischem Bindungsareal auf die Bindungstopographie und somit auch auf die Aktivierung durch die Hybridliganden.

Abb. 62 soll die hier vorgestellten Erkenntnisse über die Positionierung des Trp 7.35 je nach Rezeptorkonformation zusammenfassen.

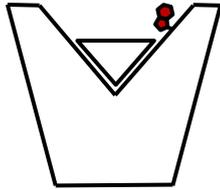
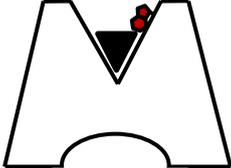
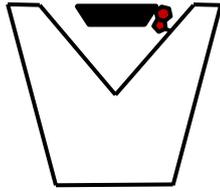
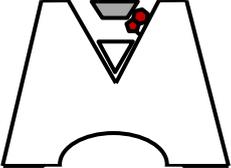
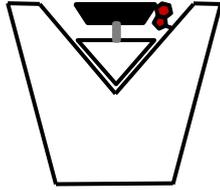
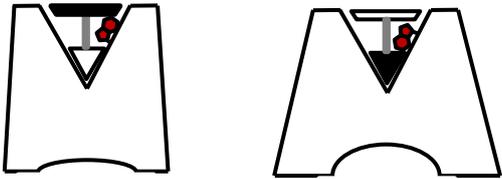
	Inaktive Konformation	Aktive Konformation
Orthosterisch		
Allosterisch		
Dualsterisch		 M2 M3

Abb. 62: Ausrichtung des Epitops Trp 7.35 je nach Rezeptorkonformation muskarinischer Acetylcholinrezeptoren. Offene Symbole stellen Liganden / Ligandbausteine dar, deren Affinität nicht von Trp 7.35 abhing bzw. für die durch molekulares Modeling offengelegt wurde, dass Trp 7.35 nicht in deren Richtung ausgerichtet war. Geschlossene Symbole stehen für Liganden / Ligandbausteine, für die eine Bindungsabhängigkeit von Trp 7.35 gefunden wurde bzw. für die durch molekulares Modeling offengelegt wurde, dass Trp 7.35 in deren Richtung ausgerichtet war. Symbolerklärung: siehe Tab. 90

Symbol	Erklärung
	Orthosterischer Antagonist
	Orthosterischer Agonist
	Allosterischer Antagonist
	Allosterischer Agonist
	Hybridantagonist
	Hybridagonist
	Trp 7.35 in Ausrichtung auf die allosterische / orthosterische Bindungsstelle

Tab. 90: Symbolerklärung für Abb. 62

Die Flexibilität von Trp 7.35 im Übergangsbereich zwischen allosterischer und orthosterischer Bindungsdomäne spiegelt den dynamischen Charakter von muskarinischen Acetylcholinrezeptoren als „Paradebeispiel“ von GPCR wider.

6 Zusammenfassung

Die Charakterisierung der allosterischen Bindungsstelle muskarinischer Acetylcholinrezeptoren ebnet den Weg, subtypselektive Liganden zu identifizieren, die entweder experimentell oder gar therapeutisch von hohem Wert sind. Vor allem für den M2-Subtyp ist der als Vorhof zum orthosterischen Haftareal zu verstehende allosterische Bereich in zahlreichen Studien beschrieben worden. Zuletzt war dem Areal um das Epitop Trp 7.35 eine Einflussnahme auf die für die Ligand-induzierte intrinsische Aktivität relevanten Rezeptorkonformationen nachgewiesen worden (Bock et al., 2012 und 2014). Die Autoren bedienten sich dabei der Untersuchung der an Muskarinrezeptoren dualsterisch bindenden Substanzen Iper-6-phthal und Iper-6-naph. Prilla et al. (2006) identifizierten das zwischen orthosterischer und allosterischer Bindungsstelle gelegene Trp 7.35 als ein für die Basisaffinität, Subtypselektivität, Effektivität und Kooperativität allosterischer Modulatoren entscheidendes Schlüsselepitop am M2-Rezeptor. Darüber hinaus war von Jäger et al. (2007) ein „janusköpfiger“ Charakter von M2 Trp 7.35 postuliert worden, da es offenbar je nach Rezeptorkonformation in Richtung des allosterischen (inaktiver Rezeptor) oder des orthosterischen (aktiver Rezeptor) Rezeptorareals ausgerichtet ist. In der vorliegenden Arbeit sollte anhand von Untersuchungen des muskarinischen M3-Subtyps und der M3 Trp 7.35→Ala-Mutante in Radioligandbindungsstudien und funktionellen Experimenten die Rolle des allosterischen Bereichs eines vorwiegend Gq-koppelnden Subtyps muskarinischer Acetylcholinrezeptoren mit der Rolle des allosterischen Bereichs des präferenziell Gi-koppelnden M2-Rezeptors verglichen werden.

Die Dissoziationsgeschwindigkeit des orthosterischen Radioliganden [³H]NMS wurde durch Trp 7.35 in M2- und M4-Rezeptoren beschleunigt, während in den Subtypen M1 und M3 keine Veränderung der Radioorthoster-Kinetik an den Trp 7.35→Ala-Mutanten zu beobachten war. Damit war in diesen Versuchen ein Epitop der allosterischen Bindungsstelle in Gi-, nicht aber in Gq-koppelnden Rezeptoren an der Interaktion mit einem orthosterischen Liganden beteiligt.

Wie für M2-Rezeptoren bereits beschrieben, erwies sich Trp 7.35 im M3-Rezeptor als wichtig für die Gleichgewichtsbindung des klassischen allosterischen Modulators W84, verschiedener orthosterischer Agonisten und der dualsterischen Liganden Iper-6-phthal und Iper-6-naph, während es für die Affinität der orthosterischen Antagonisten N-Methylscopolamin und Atropin nicht relevant war. In Untersuchungen zur Rezeptoraktivierung durch orthosterische und dualsterische Agonisten in DMR-Experimenten reduzierte sich die intrinsische Aktivität an der M3 Trp 7.35→Ala-Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Somit war Trp 7.35 auch im M3-Rezeptor als konformationssensibles Epitop charakterisiert. Im Falle von W84 trug Trp 7.35 zur M2/M3-Prävalenz bei.

Der dualsterische Bindungsmodus der Hybridsubstanzen Iper-6-phthal und Iper-6-naph am M3-Rezeptorprotein wurde durch die Mutation Trp 7.35→Ala zugunsten der rein allosterischen Bindungstopographie verschoben. Die Affinität der allosterischen Fragmente der Testsubstanzen 6-Phthal und 6-Naph war unabhängig vom Epitop Trp 7.35 des M3-Rezeptors. Dies führte zu der Annahme, dass das Epitop bei gleichzeitiger Besetzung der orthosterischen und allosterischen Bindungsstelle durch die Hybridliganden in Richtung des Iperoxoteils ausgerichtet ist.

Im Gegensatz dazu reduzierte am M2-Subtyp die Trp 7.35→Ala-Mutation den Anteil rein allosterischer Bindung zugunsten des dualsterischen Bindungsmodus von Iper-6-phthal und Iper-6-naph. Somit ist am M2-Rezeptor bei dualsterischer Rezeptorbesetzung Trp 7.35 funktionell ein Epitop

der allosterischen Bindungsdomäne. Im Einklang damit wies die Affinität der allosterischen Fragmente 6-Phthal und 6-Naph an M2 im Gegensatz zu M3 eine Trp 7.35-Abhängigkeit auf.

Iperoxo als orthosterische Muttersubstanz der Hybridverbindungen Iper-6-phthal und Iper-6-naph konnte an M3-Rezeptoren in [³⁵S]GTPS-Bindungsexperimenten und IP1-Versuchen als Superagonist identifiziert werden.

Durch den Einsatz von selektiven Modulatoren (QIC, CTX, PTX) für die drei Hauptsignalwege des M3-Rezeptors (Gq, Gs, Gi) sowie des PAN-G-Protein-Aktivators Aluminiumfluorid wurde in DMR-Untersuchungen eine Beteiligung von Gq-, Gs-, Gi- und indirekt G12/13-Effekten an der Iperoxo-induzierten Ganzzellantwort von CHO-M3-Trp 7.35→Ala-Zellen gezeigt. In CHO-M3-Trp 7.35→Ala-Zellen induzierte Iperoxo Gq- und Gs-vermittelte Effekte; eine Gi-Beteiligung an der Ganzzellantwort war nach Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels zu beobachten. Im Falle der dualsterischen Substanzen Iper-6-phthal und Iper-6-naph ging die Gi-Kopplungskompetenz am punktmultierten Rezeptor verloren. Die Gq- und daneben die Gs-Kopplung erwiesen sich als die Signalwege der ersten und zweiten Wahl der dualsterischen Substanzen Iper-6-phthal und Iper-6-naph sowohl in CHO-M3- als auch in CHO-M3-Trp 7.35→Ala-Zellen.

Folgerter Bock et al. (2012) aus der an der M2-Trp 7.35→Ala-Mutante im Vergleich zum Wildtyprezeptor beobachteten erhöhten intrinsischen Aktivität der Hybridliganden Iper-6-phthal und Iper-6-naph auf dem Kopplungsweg der ersten Wahl (Gi), dass durch die Mutation die Flexibilität des allosterischen Bereichs zugunsten der Signalintensität zunahm, konnte dies in der vorliegenden Arbeit am M3-Rezeptor nicht beobachtet werden. Weder in DMR-Messungen, noch in Untersuchungen zur Generierung der sekundären Botenstoffe IP3 und cAMP wurde die intrinsische Aktivität der Hybridliganden durch die Mutation M3-Trp 7.35→Ala verbessert.

Am M3-Rezeptor konnte weder für Iper-6-phthal noch für Iper-6-naph im Vergleich zu Iperoxo ein *bias* in Richtung des Signalweges der ersten (Gq) oder der zweiten Wahl (Gs) detektiert werden. Die Interaktion der Liganden mit der allosterischen Bindungsdomäne wirkte sich demnach nicht negativ auf die Kopplungskompetenz des aktivierten Rezeptors auf. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Befunden von Bock et al. (2012) am M2-Rezeptor, bei denen ein *bias* der Hybridverbindungen in Richtung des Signalweges der ersten Wahl (Gi) festgestellt wurde.

Somit zeigt die vorliegende Arbeit, dass der allosterische Bereich des M3-Rezeptors anders in das Geschehen der Ligand-induzierten Signalwegsaktivierung eingebunden ist als der des M2-Rezeptors.

Für die Entwicklung von Muskarinrezeptor-Modulatoren mit einem gezielt veränderten Muster der Signalwegsaktivierung bedarf es somit Rezeptorsubtyp-spezifischer molekularer Strategien.

7 Literaturverzeichnis

Abel, S; Back, DJ; Vourvahis, M. (2009). Maraviroc: pharmacokinetics and drug interactions. *Antivir Ther* 14 (5), 607–618.

Abramov, Y; Sand, PK. (2004). Oxybutynin for treatment of urge urinary incontinence and overactive bladder: an updated review. *Expert Opin Pharmacother* 5 (11), 2351–2359.

Akam, EC; Challiss, RA; Nahorski, SR. (2001). G(q/11) and G(i/o) activation profiles in CHO cells expressing human muscarinic acetylcholine receptors: dependence on agonist as well as receptor-subtype. *Br J Pharmacol* 132 (4), 950–958.

Amatruda, TT 3rd; Steele, DA; Slepak, VZ; Simon, MI. (1991). G alpha 16, a G protein alpha subunit specifically expressed in hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (13), 5587–5591.

Antony, J. (2007). Bindungsstopographie allosterisch/orthosterischer Hybridagonisten an M2-Acetylcholinrezeptoren. Dissertationsschrift, Bonn.

Antony, J; Kellershohn, K; Mohr-Andrä, M; Kebig, A; Prilla, S; Muth, M; Heller, E; Disingrini, T; Dallanoce, C; Bertoni, S; Schrobang, J; Tränkle, C; Kostenis, E; Christopoulos, A; Höltje, HD; Barocelli, E; Amici, M de; Holzgrabe, U; Mohr, K. (2009). Dualsteric GPCR targeting: a novel route to binding and signaling pathway selectivity. *FASEB J* 23 (2), 442–450.

Arunlakshana, O; Schild, HO. (1959). Some quantitative uses of drug antagonists. *Br J Pharmacol Chemother* 14 (1), 48–58.

Ashkenazi, A; Winslow, JW; Peralta, EG; Peterson, GL; Schimerlik, MI; Capon, DJ; Ramachandran, J. (1987). An M2 muscarinic receptor subtype coupled to both adenylyl cyclase and phosphoinositide turnover. *Science* 238 (4827), 672–675.

Ballesteros, JA; Weinstein, H. (1995). Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. *Methods in Neuroscience* 25, 366–428.

Birdsall, NJ; Burgen, AS; Hulme, EC; Stockton, JM; Zigmond, MJ. (1983). The effect of McN-A-343 on muscarinic receptors in the cerebral cortex and heart. *Br J Pharmacol* 78 (2), 257–259.

Black, JW; Leff, P. (1983). Operational models of pharmacological agonism. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 220 (1219), 141–162.

Blin, N; Yun, J; Wess, J. (1995). Mapping of single amino acid residues required for selective activation of Gq/11 by the m3 muscarinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem* 270 (30), 17741–17748.

Bock, A; Chirinda, B; Krebs, F; Messerer, R; Bätz, J; Muth, M; Dallanoce, C; Klingenthal, D; Tränkle, C; Hoffmann, C; Amici, M de; Holzgrabe, U; Kostenis, E; Mohr, K. (2014). Dynamic ligand binding dictates partial agonism at a G protein-coupled receptor. *Nat Chem Biol* 10 (1), 18–20.

Bock, A; Merten, N; Schrage, R; Dallanoce, C; Bätz, J; Klöckner, J; Schmitz, J; Matera, C; Simon, K; Kebig, A; Peters, L; Müller, A; Schrobang-Ley, J; Tränkle, C; Hoffmann, C; Amici, M de; Holzgrabe, U; Kostenis, E; Mohr, K. (2012). The allosteric vestibule of a seven transmembrane helical receptor controls G-protein coupling. *Nat Commun* 3, 1044.

Bonner, TI; Buckley, NJ; Young, AC; Brann, MR. (1987). Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science* 237 (4814), 527–532.

Breivogel, CS; Selley, DE; Childers, SR. (1998). Cannabinoid receptor agonist efficacy for stimulating 35SGTPgammaS binding to rat cerebellar membranes correlates with agonist-induced decreases in GDP affinity. *J Biol Chem* 273 (27), 16865–16873.

Brown, BR Jr; Crout, JR. (1970). The sympathomimetic effect of gallamine on the heart. *J Pharmacol Exp Ther* 172 (2), 266–273.

Buller, S; Zlotos, DP; 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. *Mol Pharmacol* 61 (1), 160–168.

Buller, S. (2002). Identifizierung von Rezeptorepitopen für die subtypeselektive Interaktion allosterischer Modulatoren mit muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren anhand von Mutagenese-Untersuchungen. *Dissertationsschrift, Bonn*.

Burford, NT; Tobin, AB; Nahorski, SR. (1995a). Coupling of muscarinic m1, m2 and m3 acetylcholine receptors, expressed in Chinese hamster ovary cells, to pertussis toxin-sensitive/insensitive guanine nucleotide-binding proteins. (I). *Eur J Pharmacol* 289 (2), 343–351.

Burford, NT; Tobin, AB; Nahorski, SR. (1995b). Differential coupling of m1, m2 and m3 muscarinic receptor subtypes to inositol 1,4,5-trisphosphate and adenosine 3',5'-cyclic monophosphate accumulation in Chinese hamster ovary cells. (II). *J Pharmacol Exp Ther* 274 (1), 134–142.

Burstein, ES; Bräuner-Osborne, H; Spalding, TA; Conklin, BR; Brann, MR. (1997). Interactions of muscarinic receptors with the heterotrimeric G proteins Gq and G12: transduction of proliferative signals. *J Neurochem* 68 (2), 525–533.

Camps, M; Hou, C; Sidiropoulos, D; Stock, JB; Jakobs, KH; Gierschik, P. (1992). Stimulation of phospholipase C by guanine-nucleotide-binding protein beta gamma subunits. *Eur J Biochem* 206 (3), 821–831.

Caulfield, MP. (1993). Muscarinic receptors--characterization, coupling and function. *Pharmacol Ther* 58 (3), 319–379.

Caulfield, MP; Birdsall, NJ. (1998). International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* 50 (2), 279–290.

Cheng, Y; Prusoff, WH. (1973). Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 22 (23), 3099–3108.

CHRM3 - Muscarinic acetylcholine receptor M3 - Homo sapiens (Human). <http://www.uniprot.org/uniprot/P20309>. Accessed 13 November 2014.

Clark, AL; Mitchelson, F. (1976). The inhibitory effect of gallamine on muscarinic receptors. *Br J Pharmacol* 58 (3), 323–331.

Clark, MA; Sethi, PR; Lambert, NA. (2007). Active Galpha(q) subunits and M3 acetylcholine receptors promote distinct modes of association of RGS2 with the plasma membrane. *FEBS Lett* 581 (4), 764–770.

Conn, PJ; Jones, CK; Lindsley, CW. (2009). Subtype-selective allosteric modulators of muscarinic receptors for the treatment of CNS disorders. *Trends Pharmacol Sci* 30 (3), 148–155.

Dale HH. (1914). The action of certain esters and ethers of choline and their relation to muscarine. *J Pharmacol* (6), 147–190.

DeBlasi, A; O'Reilly, K; Motulsky, HJ. (1989). Calculating receptor number from binding experiments using same compound as radioligand and competitor. *Trends Pharmacol Sci* 10 (6), 227–229.

DeLapp, NW; McKinzie, JH; Sawyer, BD; Vandergriff, A; Falcone, J; McClure, D; Felder, CC. (1999). Determination of ³⁵Sguanosine-5'-O-(3-thio)triphosphate binding mediated by cholinergic muscarinic receptors in membranes from Chinese hamster ovary cells and rat striatum using an anti-G protein scintillation proximity assay. *J Pharmacol Exp Ther* 289 (2), 946–955.

Deng, H; Sun, H; Fang, Y. (2013). Label-free cell phenotypic assessment of the biased agonism and efficacy of agonists at the endogenous muscarinic M3 receptors. *J Pharmacol Toxicol Methods* 68 (3), 323–333.

Disingrini, T; Muth, M; Dallanoce, C; Barocelli, E; Bertoni, S; Kellershohn, K; Mohr, K; Amici, M de; Holzgrabe, U. (2006). Design, synthesis, and action of oxotremorine-related hybrid-type allosteric modulators of muscarinic acetylcholine receptors. *J Med Chem* 49 (1), 366–372.

Disse, B; Reichl, R; Speck, G; Traunecker, W; Ludwig Rominger, KL; Hammer, R. (1993). Ba 679 BR, a novel long-acting anticholinergic bronchodilator. *Life Sci* 52 (5-6), 537–544.

Dmochowski, RR; Sand, P.K; Zinner, NR; Staskin, DR. (2008). Trospium 60 mg once daily (QD) for overactive bladder syndrome: results from a placebo-controlled interventional study. *Urology* 71 (3), 449–454.

Dohlman, HG; Thorner, J. (1997). RGS proteins and signaling by heterotrimeric G proteins. *J Biol Chem* 272 (7), 3871–3874.

Dror, RO; Green, HF; Valant, C; Borhani, DW; Valcourt, JR; Pan, AC; Arlow, D.H; Canals, M; Lane, JR; Rahmani, R; Baell, JB; Sexton, PM; Christopoulos, A; Shaw, DE. (2013). Structural basis for modulation of a G-protein-coupled receptor by allosteric drugs. *Nature* 503 (7475), 295–299.

Dror, RO; Pan, AC; Arlow, DH; Borhani, DW; Maragakis, P; Shan, Y; Xu, H; Shaw, DE. (2011). Pathway and mechanism of drug binding to G-protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (32), 13118–13123.

- Ehlert, FJ. (1988). Estimation of the affinities of allosteric ligands using radioligand binding and pharmacological null methods. *Mol Pharmacol* 33 (2), 187–194.
- Ehlert, FJ; Griffin, MT; Sawyer, GW; Bailon, R. (1999). A simple method for estimation of agonist activity at receptor subtypes: comparison of native and cloned M3 muscarinic receptors in guinea pig ileum and transfected cells. *J Pharmacol Exp Ther* 289 (2), 981–992.
- Ellis, J; Huyler, J; Brann, MR. (1991). Allosteric regulation of cloned m1-m5 muscarinic receptor subtypes. *Biochem Pharmacol* 42 (10), 1927–1932.
- Exton, JH. (1996). Regulation of phosphoinositide phospholipases by hormones, neurotransmitters, and other agonists linked to G proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36, 481–509.
- Felder, CC; Poulter, MO; Wess, J. (1992). Muscarinic receptor-operated Ca²⁺ influx in transfected fibroblast cells is independent of inositol phosphates and release of intracellular Ca²⁺. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (2), 509–513.
- Felder, CC. (1995). Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. *FASEB J* 9 (8), 619–625.
- Figuroa, KW; Griffin, MT; Ehlert, FJ. (2009). Selectivity of agonists for the active state of M1 to M4 muscarinic receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* 328 (1), 331–342.
- Fox, RI; Konttinen, Y; Fisher, A. (2001). Use of muscarinic agonists in the treatment of Sjogren's syndrome. *Clin Immunol* 101 (3), 249–263.
- Fujioka, M; Koda, S; Morimoto, Y; Biemann, K. (1988). Structure of FR900359, a cyclic depsipeptide from *Ardisia crenata* sims. *J Org Chem* 53 (12), 2820–2825.
- Gautam, D; Gavrilova, O; Jeon, J; Pack, S; Jou, W; Cui, Y; Li, JH; Wess, J. (2006a). Beneficial metabolic effects of M3 muscarinic acetylcholine receptor deficiency. (II). *Cell Metab* 4 (5), 363–375.
- Gautam, D; Han, SJ; Hamdan, FF; Jeon, J; Li, B; Li, JH; Cui, Y; Mears, D; Lu, H; Deng, C; Heard, T; Wess, J. (2006b). A critical role for beta cell M3 muscarinic acetylcholine receptors in regulating insulin release and blood glucose homeostasis in vivo. (I). *Cell Metab* 3 (6), 449–461.
- Gautam, D; Heard, TS; Cui, Y; Miller, G; Bloodworth, L; Wess, J. (2004). Cholinergic stimulation of salivary secretion studied with M1 and M3 muscarinic receptor single- and double-knockout mice. *Mol Pharmacol* 66 (2), 260–267.
- Gilon, P; Henquin, JC. (2001). Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic beta-cell function. *Endocr Rev* 22 (5), 565–604.
- Goutelle, S; Maurin, M; Rougier, F; Barbaut, X; Bourguignon, L; Ducher, M; Maire, P. (2008). The Hill equation: a review of its capabilities in pharmacological modelling. *Fundam Clin Pharmacol* 22 (6), 633–648.
- Gregory, KJ; Hall, NE; Tobin, AB; Sexton, PM; Christopoulos, A. (2010). Identification of orthosteric and allosteric site mutations in M2 muscarinic acetylcholine receptors that contribute to ligand-selective signaling bias. *J Biol Chem* 285 (10), 7459–7474.

Griffin, MT; Figueroa, KW; Liller, S; Ehlert, FJ. (2007). Estimation of agonist activity at G protein-coupled receptors: analysis of M2 muscarinic receptor signaling through Gi/o,Gs, and G15. *J Pharmacol Exp Ther* 321 (3), 1193–1207.

Gritz, L; Davies, J. (1983). Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 25 (2-3), 179–188.

Grossmüller, M; Antony, J; Tränkle, C; Holzgrabe, U; Mohr, K. (2006). Allosteric site in M2 acetylcholine receptors: evidence for a major conformational change upon binding of an orthosteric agonist instead of an antagonist. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 372 (4), 267–276.

Haga, K; Kruse, AC; Asada, H; Yurugi-Kobayashi, T; Shiroishi, M; Zhang, C; Weis, WI; Okada, T; Kobilka, BK; Haga, T; Kobayashi, T. (2012). Structure of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist. *Nature* 482 (7386), 547–551.

Harrison, C; Traynor, JR. (2003). The 35SGTPgammaS binding assay: approaches and applications in pharmacology. *Life Sci* 74 (4), 489–508.

Hegde, SS; Mammen, M; Jasper, JR. (2004). Antimuscarinics for the treatment of overactive bladder: current options and emerging therapies. *Curr Opin Investig Drugs* 5 (1), 40–49.

Ho, MK; Yung, LY; Chan, JS; Chan, JH; Wong, CS; Wong, YH. (2001). G α (14) links a variety of G(i)- and G(s)-coupled receptors to the stimulation of phospholipase C. *Br J Pharmacol* 132 (7), 1431–1440.

Hu, J; Wang, Y; Zhang, X; Lloyd, JR; Li, JH; Karpiak, J; Costanzi, S; Wess, J. (2010). Structural basis of G protein-coupled receptor-G protein interactions. *Nat Chem Biol* 6 (7), 541–548.

Hubbard, KB; Hepler, JR. (2006). Cell signalling diversity of the Gq α family of heterotrimeric G proteins. *Cell Signal* 18 (2), 135–150.

Hulme, EC; Birdsall, NJ; Buckley, NJ. (1990). Muscarinic receptor subtypes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30, 633–673.

Jäger, D; Schmalenbach, C; Prilla, S; Schrobang, J; Kebig, A; Sennwitz, M; Heller, E; Tränkle, C; Holzgrabe, U; Höltje, HD; Mohr, K. (2007). Allosteric small molecules unveil a role of an extracellular E2/transmembrane helix 7 junction for G protein-coupled receptor activation. *J Biol Chem* 282 (48), 34968–34976.

Jakubík, J; Bacakova, L; El-Fakahany, EE; Tuček, S. (1995). Subtype selectivity of the positive allosteric action of alcuronium at cloned M1-M5 muscarinic acetylcholine receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 274 (3), 1077–1083.

Jakubík, J; Bacakova, L; El-Fakahany, EE; Tuček, S. (1997). Positive cooperativity of acetylcholine and other agonists with allosteric ligands on muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* 52 (1), 172–179.

Jakubík, J; El-Fakahany, EE. (2010). Allosteric Modulation of Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Pharmaceuticals* 3 (9), 2838–2860.

- Janßen, N. (2011). Zelluläre dynamische Massenumverteilung zur Erfassung der Signalwegsaktivierung 7-transmembranärer Rezeptoren unter besonderer Berücksichtigung des M4-Acetylcholinrezeptors. Dissertationsschrift, Bonn.
- Jepsen, K; Lüllmann, H; Mohr, K; Pfeffer, J. (1988). Allosteric stabilization of 3H-N-methylscopolamine binding in guinea-pig myocardium by an antidote against organophosphate intoxication. *Pharmacol Toxicol* 63 (3), 163–168.
- Jones, SV; Heilman, CJ; Brann, MR. (1991). Functional responses of cloned muscarinic receptors expressed in CHO-K1 cells. *Mol Pharmacol* 40 (2), 242–247.
- Karlin, A. (1967). On the application of "a plausible model" of allosteric proteins to the receptor for acetylcholine. *J Theor Biol* 16 (2), 306–320.
- Kaslow, HR; Burns, DL. (1992). Pertussis toxin and target eukaryotic cells: binding, entry, and activation. *FASEB J* 6 (9), 2684–2690.
- Katz, A; Wu, D; Simon, MI. (1992). Subunits beta gamma of heterotrimeric G protein activate beta 2 isoform of phospholipase C. *Nature* 360 (6405), 686–689.
- Katzung, BG., Masters, SB., Trevor, AJ. (2012). *Basic & clinical pharmacology*, 12th ed. McGraw-Hill Medical; McGraw-Hill [distributor], New York, London, xiii, 1229.
- Kaufel, D. (2010). Interaktion orthosterisch/allosterischer Antagonist-Hybride mit muskarinischen M2-Acetylcholinrezeptoren. Dissertationsschrift, Bonn.
- Keam, SJ; Keating, GM. (2004). Tiotropium bromide. A review of its use as maintenance therapy in patients with COPD. *Treat Respir Med* 3 (4), 247–268.
- Kebig, A; Mohr, K. (2008). Cinacalcet - an allosteric enhancer at the Ca²⁺-receptor. *Dtsch Med Wochenschr* 133 (33), 1681–1683.
- Kebig, A. (2010). Signalwegsaktivierung an muskarinischen M2-Rezeptoren: Einfluss der allosterischen Bindungsstelle. Dissertationsschrift, Bonn.
- Kellershohn, K. (2007). Allosterisch/orthosterische Hybridliganden des muskarinischen Acetylcholinrezeptors: Rezeptorbindung und -aktivierung. Dissertationsschrift, Bonn.
- Kenakin, T; Watson, C; Muniz-Medina, V; Christopoulos, A; Novick, S. (2012). A simple method for quantifying functional selectivity and agonist bias. *ACS chemical neuroscience* 3 (3), 193–203.
- Keov, P; Lopez, L; Devine, SM; Valant, C; Lane, JR; Scammells, PJ; Sexton, PM; Christopoulos, A. (2014). Molecular mechanisms of bitopic ligand engagement with the M1 muscarinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem* 289 (34), 23817–23837.
- Klages, B; Brandt, U; Simon, MI; Schultz, G; Offermanns, S. (1999). Activation of G12/G13 results in shape change and Rho/Rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets. *J Cell Biol* 144 (4), 745–754.

Kostenis, E; Drewke, C; König, G; Kehraus S. (2014). Product information "Galpha q inhibiting component (UBO-QIC)". Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität. <http://www.pharmbio.uni-bonn.de/aktuelles>.

Kostenis, E; Mohr, K. (1996). Two-point kinetic experiments to quantify allosteric effects on radioligand dissociation. *Trends Pharmacol Sci* 17 (8), 280–283.

Krejčí, A; Tuček, S. (2001). Changes of cooperativity between N-methylscopolamine and allosteric modulators alcuronium and gallamine induced by mutations of external loops of muscarinic M(3) receptors. *Mol Pharmacol* 60 (4), 761–767.

Kruse, AC; Hu, J; Pan, AC; Arlow, DH; Rosenbaum, DM; Rosemond, E; Green, HF; Liu, T; Chae, PS; Dror, RO; Shaw, DE; Weis, WI; Wess, J; Kobilka, BK. (2012). Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* 482 (7386), 552–556.

Kruse, AC; Kobilka, BK; Gautam, D; Sexton, PM; Christopoulos, A; Wess, J. (2014a). Muscarinic acetylcholine receptors: novel opportunities for drug development. (I). *Nat Rev Drug Discov* 13 (7), 549–560.

Kruse, AC; Li, J; Hu, J; Kobilka, BK; Wess, J. (2014b). Novel insights into M3 muscarinic acetylcholine receptor physiology and structure. (II). *J Mol Neurosci* 53 (3), 316–323.

Kruse, AC; Ring, AM; Manglik, A; Hu, J; Hu, K; Eitel, K; Hübner, H; Pardon, E; Valant, C; Sexton, PM; Christopoulos, A; Felder, CC; Gmeiner, P; Steyaert, J; Weis, WI; Garcia, KC; Wess, J; Kobilka, BK. (2013). Activation and allosteric modulation of a muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* 504 (7478), 101–106.

Kurtenbach, E; Curtis, CA; Pedder, EK; Aitken, A; Harris, AC; Hulme, EC. (1990). Muscarinic acetylcholine receptors. Peptide sequencing identifies residues involved in antagonist binding and disulfide bond formation. *J Biol Chem* 265 (23), 13702–13708.

Lanzafame, AA; Sexton, PM; Christopoulos, A. (2006). Interaction studies of multiple binding sites on m4 muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* 70 (2), 736–746.

Lazareno, S; Birdsall, NJ. (1993). Pharmacological characterization of acetylcholine-stimulated 35S-GTP gamma S binding mediated by human muscarinic m1-m4 receptors: antagonist studies. *Br J Pharmacol* 109 (4), 1120–1127.

Lazareno, S; Birdsall, NJ. (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. *Mol Pharmacol* 48 (2), 362–378.

Lazareno, S; Popham, A; Birdsall, NJ. (2000). Allosteric interactions of staurosporine and other indolocarbazoles with N-methyl-(3)Hscopolamine and acetylcholine at muscarinic receptor subtypes: identification of a second allosteric site. *Mol Pharmacol* 58 (1), 194–207.

Lazareno, S; Popham, A; Birdsall, NJ. (2002). Analogs of WIN 62,577 define a second allosteric site on muscarinic receptors. *Mol Pharmacol* 62 (6), 1492–1505.

- Lebon, G; Warne, T; Edwards, PC; Bennett, K; Langmead, CJ; Leslie, AG; Tate, CG. (2011). Agonist-bound adenosine A2A receptor structures reveal common features of GPCR activation. *Nature* 474 (7352), 521–525.
- Lee, NH; El-Fakahany, EE. (1991). Allosteric antagonists of the muscarinic acetylcholine receptor. *Biochem Pharmacol* 42 (2), 199–205.
- Leppik, RA; Miller, RC; Eck, M; Paquet, JL. (1994). Role of acidic amino acids in the allosteric modulation by gallamine of antagonist binding at the m2 muscarinic acetylcholine receptor. *Mol Pharmacol* 45 (5), 983–990.
- Li, B; Scarselli, M; Knudsen, CD; Kim, SK; Jacobson, KA; McMillin, SM; Wess, J. (2007). Rapid identification of functionally critical amino acids in a G protein-coupled receptor. *Nat Methods* 4 (2), 169–174.
- Li, L. (2003). The biochemistry and physiology of metallic fluoride: action, mechanism, and implications. *Crit Rev Oral Biol Med* 14 (2), 100–114.
- Liu, J; Conklin, BR; Blin, N; Yun, J; Wess, J. (1995). Identification of a receptor/G-protein contact site critical for signaling specificity and G-protein activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (25), 11642–11646.
- Lowry, OH; Rosebrough, NJ; Farr, AL; Randall, RJ. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193 (1), 265–275.
- Lu, ZL; Saldanha, JW; Hulme, EC. (2002). Seven-transmembrane receptors: crystals clarify. *Trends in Pharmacological Sciences* 23 (3), 140–146.
- Lüllmann, H; Ohnesorge, FK; Schauwecker, GC; Wassermann, O. (1969). Inhibition of the actions of carbachol and DFP on guinea pig isolated atria by alkane-bis-ammonium compounds. *Eur J Pharmacol* 6 (3), 241–247.
- Ma, L; Seager, MA; Wittmann, M; Jacobson, M; Bickel, D; Burno, M; Jones, K; Graufelds, VK; Xu, G; Pearson, M; McCampbell, A; Gaspar, R; Shughrue, P; Danziger, A; Regan, C; Flick, R; Pascarella, D; Garson, S; Doran, S; Kreatsoulas, C; Veng, L; Lindsley, CW; Shipe, W; Kuduk, S; Sur, C; Kinney, G; Seabrook, GR; Ray, WJ. (2009). Selective activation of the M1 muscarinic acetylcholine receptor achieved by allosteric potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (37), 15950–15955.
- Mangmool, S; Kurose, H. (2011). G(i/o) protein-dependent and -independent actions of Pertussis Toxin (PTX). *Toxins (Basel)* 3 (7), 884–899.
- Marlo, JE; Niswender, CM; Days, EL; Bridges, TM; Xiang, Y; Rodriguez, AL; Shirey, JK; Brady, AE; Nalywajko, T; Luo, Q; Austin, CA; Williams, MB; Kim, K; Williams, R; Orton, D; Brown, HA; Lindsley, CW; Weaver, CD; Conn, PJ. (2009). Discovery and characterization of novel allosteric potentiators of M1 muscarinic receptors reveals multiple modes of activity. *Mol Pharmacol* 75 (3), 577–588.
- Martinez-Archundia, M; Cordomi, A; Garriga, P; Perez, JJ. (2012). Molecular modeling of the M3 acetylcholine muscarinic receptor and its binding site. *J Biomed Biotechnol* 2012, 789741.

Matera, C; Flammini, L; Quadri, M; Vivo, V; Ballabeni, V; Holzgrabe, U; Mohr, K; Amici, M de; Barocelli, E; Bertoni, S; Dallanoce, C. (2014). Bis(ammonio)alkane-type agonists of muscarinic acetylcholine receptors: synthesis, in vitro functional characterization, and in vivo evaluation of their analgesic activity. *Eur J Med Chem* 75, 222–232.

Matera, C; Tata, AM. (2014). Pharmacological approaches to targeting muscarinic acetylcholine receptors. *Recent Pat CNS Drug Discov* 9 (2), 85–100.

Matsui, H; Lazareno, S; Birdsall, NJ. (1995). Probing of the location of the allosteric site on m1 muscarinic receptors by site-directed mutagenesis. *Mol Pharmacol* 47 (1), 88–98.

May, LT; Avlani, VA; Langmead, CJ; Herdon, HJ; Wood, MD; Sexton, PM; Christopoulos, A. (2007). Structure-function studies of allosteric agonism at M2 muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* 72 (2), 463–476.

Melchiorre, C; Angeli, P; Lambrecht, G; Mutschler, E; Picchio, MT; Wess, J. (1987). Antimuscarinic action of methoctramine, a new cardioselective M-2 muscarinic receptor antagonist, alone and in combination with atropine and gallamine. *Eur J Pharmacol* 144 (2), 117–124.

Melchiorre, C; Minarini, A; Angeli, P; Giardina, D; Gulini, U; Quaglia, W. (1989). Polymethylene tetraamines as muscarinic receptor probes. *Trends Pharmacol Sci Suppl*, 55–59.

Michal, P; El-Fakahany, EE; Doležal, V. (2007). Muscarinic M2 receptors directly activate Gq/11 and Gs G-proteins. *J Pharmacol Exp Ther* 320 (2), 607–614.

Michal, P; Lysikova, M; Tuček, S. (2001). Dual effects of muscarinic M(2) acetylcholine receptors on the synthesis of cyclic AMP in CHO cells: dependence on time, receptor density and receptor agonists. *Br J Pharmacol* 132 (6), 1217–1228.

Michel, MC. (2008). Fesoterodine: a novel muscarinic receptor antagonist for the treatment of overactive bladder syndrome. *Expert Opin Pharmacother* 9 (10), 1787–1796.

Millar, RP; Newton, CL. (2010). The year in G protein-coupled receptor research. *Mol Endocrinol* 24 (1), 261–274.

Milligan, G. (2003). Principles: extending the utility of 35SGTP gamma S binding assays. *Trends Pharmacol Sci* 24 (2), 87–90.

Milligan, G; Kostenis, E. (2006). Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1, S46-55.

Mistry, R; Dowling, MR; Challiss, R A John (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. *Br J Pharmacol* 144 (4), 566–575.

Mitchelson, FJ. (1987). The interaction of nicotinic receptor antagonists at muscarinic receptors. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 14 (5), 385–391.

Mitchelson, FJ. (2012). The pharmacology of McN-A-343. *Pharmacol Ther* 135 (2), 216–245.

- Miyamae, K; Yoshida, M; Murakami, S; Iwashita, H; Ohtani, M; Masunaga, K; Ueda, S. (2003). Pharmacological effects of darifenacin on human isolated urinary bladder. *Pharmacology* 69 (4), 205–211.
- Monod, J; Wyman, J; Changeux, JP. (1965). On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J Mol Biol* 12, 88–118.
- Motulsky, H., Christopoulos, A. (2004). *Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting*. Oxford University Press, USA.
- Muth, M; Bender, W; Scharfenstein, O; Holzgrabe, U; Balatkova, E; Tränkle, C; Mohr, K. (2003). Systematic development of high affinity bis(ammonio)alkane-type allosteric enhancers of muscarinic ligand binding. *J Med Chem* 46 (6), 1031–1040.
- Nahorski, SR; Tobin, AB; Willars, GB. (1997). Muscarinic M3 receptor coupling and regulation. *Life Sci* 60 (13-14), 1039–1045.
- Nakajima, K; Jain, S; Ruiz de Azua, I; McMillin, SM; Rossi, M; Wess, J. (2013). Minireview: Novel aspects of M3 muscarinic receptor signaling in pancreatic beta-cells. *Mol Endocrinol* 27 (8), 1208–1216.
- Nesterov, A; Hong, M; Hertel, C; Jiao, P; Brownell, L; Cannon, E. (2010). Screening a plant extract library for inhibitors of cholecystokinin receptor CCK1 pathways. *J Biomol Screen* 15 (5), 518–527.
- Nishimura, A; Kitano, K; Takasaki, J; Taniguchi, M; Mizuno, N; Tago, K; Hakoshima, T; Itoh, H. (2010). Structural basis for the specific inhibition of heterotrimeric Gq protein by a small molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (31), 13666–13671.
- Noh, DY; Shin, SH; Rhee, SG. (1995). Phosphoinositide-specific phospholipase C and mitogenic signaling. *Biochim Biophys Acta* 1242 (2), 99–113.
- Odagaki, Y; Kinoshita, M; Toyoshima, R. (2013). Pharmacological characterization of M1 muscarinic acetylcholine receptor-mediated Gq activation in rat cerebral cortical and hippocampal membranes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 386 (11), 937–947.
- Offermanns, S; Wieland, T; Homann, D; Sandmann, J; Bombien, E; Spicher, K; Schultz, G; Jakobs, KH. (1994). Transfected muscarinic acetylcholine receptors selectively couple to Gi-type G proteins and Gq/11. *Mol Pharmacol* 45 (5), 890–898.
- Overington, JP; Al-Lazikani, B; Hopkins, AL. (2006). How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov* 5 (12), 993–996.
- Pan, HL; Wu, ZZ; Zhou, HY; Chen, SR; Zhang, HM; Li, DP. (2008). Modulation of pain transmission by G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* 117 (1), 141–161.
- Peters, L. (2010). Identitätsprüfung von Muskarinrezeptorpräparationen und Charakterisierung der Rezeptor-kinetischen Eigenschaften unmarkierter Tiotropium-artiger Antagonisten an humanen M3-Rezeptoren. Masterarbeit, Bonn.

- Pittman, M. (1984). The concept of pertussis as a toxin-mediated disease. *Pediatr Infect Dis* 3 (5), 467–486.
- Postlind, H; Danielson A; Lindgren, A; Andersson, SH. (1998). Tolterodine, a new muscarinic receptor antagonist, is metabolized by cytochromes P450 2D6 and 3A in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 26 (4), 289–293.
- Poulin, B; Butcher, A; McWilliams, P; Bourgognon, JM; Pawlak, R; Kong, KC; Bottrill, A; Mistry, S; Wess, J; Rosethorne, EM; Charlton, SJ; Tobin, AB. (2010). The M3-muscarinic receptor regulates learning and memory in a receptor phosphorylation/arrestin-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (20), 9440–9445.
- Prilla, S; Schrobang, J; Ellis, J; Höltje, HD; 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. *Mol Pharmacol* 70 (1), 181–193.
- Prilla, S. (2006). Muskarinische Acetylcholinrezeptoren: Identifizierung einer Kernregion für allosterisch-orthosterische Rezeptorinteraktionen. Dissertationsschrift, Bonn.
- Putney, JW Jr; Van De Walle, CM (1980). The relationship between muscarinic receptor binding and ion movements in rat parotid cells. *J Physiol* 299, 521–531.
- Rajagopal, S; Ahn, S; Rominger, DH; Gowen-MacDonald, W; Lam, CM; Dewire, SM; Violin, JD; Lefkowitz, RJ. (2011). Quantifying ligand bias at seven-transmembrane receptors. *Mol Pharmacol* 80 (3), 367–377.
- Rajagopal, S; Rajagopal, K; Lefkowitz, RJ. (2010). Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Drug Discov* 9 (5), 373–386.
- Rask-Andersen, M; Almén, MS; Schiöth, HB. (2011). Trends in the exploitation of novel drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 10 (8), 579–590.
- Rasmussen, SG; Choi, HJ; Fung, JJ; Pardon, E; Casarosa, P; Chae, PS; Devree, BT; Rosenbaum, DM; Thian, FS; Kobilka, TS; Schnapp, A; Konetzki, I; Sunahara, RK; Gellman, SH; Pautsch, A; Steyaert, J; Weis, WI; Kobilka, BK. (2011). Structure of a nanobody-stabilized active state of the beta(2) adrenoceptor. *Nature* 469 (7329), 175–180.
- Rhee, SG. (2001). Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem* 70, 281–312.
- Richards, MH; van Giersbergen, PL (1995). Human muscarinic receptors expressed in A9L and CHO cells: activation by full and partial agonists. *Br J Pharmacol* 114 (6), 1241–1249.
- Riobo, NA; Manning, DR. (2005). Receptors coupled to heterotrimeric G proteins of the G12 family. *Trends Pharmacol Sci* 26 (3), 146–154.
- Roszkowski, AP. (1961). An unusual type of sympathetic ganglionic stimulant. *J Pharmacol Exp Ther* 132, 156–170.

Rümenapp, U; Asmus, M; Schablowski, H; Woznicki, M; Han, L; Jakobs, KH; Fahimi-Vahid, M; Michalek, C; Wieland, T; Schmidt, M. (2001). The M3 muscarinic acetylcholine receptor expressed in HEK-293 cells signals to phospholipase D via G12 but not Gq-type G proteins: regulators of G proteins as tools to dissect pertussis toxin-resistant G proteins in receptor-effector coupling. *J Biol Chem* 276 (4), 2474–2479.

Salmon, M; Luttmann, MA; Foley, JJ; Buckley, PT; Schmidt, DB; Burman, M; Webb, EF; DeHaas, CJ; Kotzer, CJ; Barrett, VJ; Slack, RJ; Sarau, HM; Palovich, MR; Laine, DI; Hay, DW; Rumsey, WL. (2013). Pharmacological characterization of GSK573719 (umeclidinium): a novel, long-acting, inhaled antagonist of the muscarinic cholinergic receptors for treatment of pulmonary diseases. *J Pharmacol Exp Ther* 345 (2), 260–270.

Sanchez, J; Holmgren, J. (2011). Cholera toxin - a foe & a friend. *Indian J Med Res* 133, 153–163.

Schmidt, M; Nehls, C; Rümenapp, U; Jakobs, KH. (1996). m3 Muscarinic receptor-induced and Gi-mediated heterologous potentiation of phospholipase C stimulation: role of phosphoinositide synthesis. *Mol Pharmacol* 50 (4), 1038–1046.

Schmitz, J; van der Mey, D; Bermudez, M; Klöckner, J; Schrage, R; Kostenis, E; Tränkle, C; Wolber, G; Mohr, K; Holzgrabe, U. (2014). Dualsteric muscarinic antagonists-orthosteric binding pose controls allosteric subtype selectivity. *J Med Chem* 57 (15), 6739–6750.

Schneider, T; Hein, P; Michel, MC. (2004). Signal transduction underlying carbachol-induced contraction of rat urinary bladder. I. Phospholipases and Ca²⁺ sources. *J Pharmacol Exp Ther* 308 (1), 47–53.

Schrage, R; Holze, J; Klöckner, J; Balkow, A; Klause, AS; Schmitz, AL; Amici, M de; Kostenis, E; Tränkle, C; Holzgrabe, U; Mohr, K. (2014). New insight into active muscarinic receptors with the novel radioagonist (3)Hiperoxo. *Biochem Pharmacol* 90 (3), 307–319.

Schrage, R; Seemann, WK; Klöckner, J; Dallanoce, C; Racké, K; Kostenis, E; Amici, M de; Holzgrabe, U; Mohr, K. (2013). Agonists with supraphysiological efficacy at the muscarinic M2 ACh receptor. *Br J Pharmacol* 169 (2), 357–370.

Schröder, R; Janssen, N; Schmidt, J; Kebig, A; Merten, N; Hennen, S; Müller, A; Blättermann, S; Mohr-Andrä, M; Zahn, S; Wenzel, J; Smith, NJ; 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. *Nat Biotechnol* 28 (9), 943–949.

Schröder, R; Schmidt, J; Blättermann, S; Peters, L; Janssen, N; Grundmann, M; Seemann, WK; Kaufel, D; Merten, N; Drewke, C; Gomeza, J; Milligan, G; Mohr, K; Kostenis, E. (2011). Applying label-free dynamic mass redistribution technology to frame signaling of G protein-coupled receptors noninvasively in living cells. *Nat Protoc* 6 (11), 1748–1760.

Seamon, K; Daly, JW. (1981). Activation of adenylate cyclase by the diterpene forskolin does not require the guanine nucleotide regulatory protein. *J Biol Chem* 256 (19), 9799–9801.

Seamon, KB; Padgett, W; Daly, JW. (1981). Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78 (6), 3363–3367.

- Seemann, WK. (2012). Kontext-abhängige Signalwegsaktivierung des muskarinischen M2-Rezeptors. Dissertationsschrift, Bonn.
- Siehler, S. (2009). Regulation of RhoGEF proteins by G12/13-coupled receptors. *Br J Pharmacol* 158 (1), 41–49.
- Simonsson, BG; Jonson, B; Strom, B. (1975). Bronchodilatory and circulatory effects of inhaling increasing doses of an anti-cholinergic drug, ipratropium bromide (SCH 1000). *Scand J Respir Dis* 56 (3), 138–149.
- Slater, S. (2012). Plerixafor. *J Adv Pract Oncol* 3 (1), 49–54.
- Smrcka, AV; Hepler, JR; Brown, KO; Sternweis, PC. (1991). Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified Gq. *Science* 251 (4995), 804–807.
- Stahl, E; Elmslie, G; Ellis, J. (2011). Allosteric modulation of the M(3) muscarinic receptor by amiodarone and N-ethylamiodarone: application of the four-ligand allosteric two-state model. *Mol Pharmacol* 80 (3), 378–388.
- Steinfeld, T; Mammen, M; Smith, JA; Wilson, RD; Jasper, JR. (2007). A novel multivalent ligand that bridges the allosteric and orthosteric binding sites of the M2 muscarinic receptor. *Mol Pharmacol* 72 (2), 291–302.
- Stockton, JM; Birdsall, NJ; Burgen, AS; Hulme, EC. (1983). Modification of the binding properties of muscarinic receptors by gallamine. *Mol Pharmacol* 23 (3), 551–557.
- Straßmann, V. (2007). Rezeptorepitop-Abhängigkeit der Bindung muskarinischer allosterischer Modulatoren unter verschiedenen ionalen Bedingungen. Dissertationsschrift, Bonn.
- Strathmann, MP; Simon, MI. (1991). G alpha 12 and G alpha 13 subunits define a fourth class of G protein alpha subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (13), 5582–5586.
- Sykes, DA; Dowling, MR; Charlton, SJ. (2009). Exploring the mechanism of agonist efficacy: a relationship between efficacy and agonist dissociation rate at the muscarinic M3 receptor. *Mol Pharmacol* 76 (3), 543–551.
- Takasaki, J; Saito, T; Taniguchi, M; Kawasaki, T; Moritani, Y; Hayashi, K; Kobori, M. (2004). A novel Galphaq/11-selective inhibitor. *J Biol Chem* 279 (46), 47438–47445.
- Tränkle, C; Dittmann, A; Schulz, U; Weyand, O; Buller, S; Jöhren, K; Heller, E; Birdsall, NJ; Holzgrabe, U; Ellis, J; Höltje, HD; Mohr, K. (2005). Atypical muscarinic allosteric modulation: cooperativity between modulators and their atypical binding topology in muscarinic M2 and M2/M5 chimeric receptors. *Mol Pharmacol* 68 (6), 1597–1610.
- 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, JP; Naval, M; Hernout, O; Chretien, F; Chapleur, 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. *Anal Biochem* 358 (1), 126–135.

- Tsuga, H; Kameyama, K; Haga, T. (1998). Desensitization of human muscarinic acetylcholine receptor m2 subtypes is caused by their sequestration/internalization. *J Biochem* 124 (4), 863–868.
- Tuček, S; Proška, J. (1995). Allosteric modulation of muscarinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol Sci* 16 (6), 205–212.
- Valant, C; Gregory, KJ; Hall, NE; Scammells, PJ; Lew, MJ; Sexton, PM; 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. *J Biol Chem* 283 (43), 29312–29321.
- Vogel, WK; Mosser, VA; Bulseco, DA; Schimerlik, MI. (1995). Porcine m2 muscarinic acetylcholine receptor-effector coupling in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 270 (26), 15485–15493.
- Voigtländer, U; Jöhren, K; Mohr, M; Raasch, A; Tränkle, C; Buller, S; Ellis, J; Höltje, HD; Mohr, K. (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. *Mol Pharmacol* 64 (1), 21–31.
- Watanabe, AM; Hathaway, DR; Besch, HR Jr (1976). Mechanism of cholinergic antagonism of the effects of isoproterenol on hearts from hyperthyroid rats. *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab* 11, 423–429.
- Wess, J; Blin, N; Mutschler, E; Blüml, K. (1995). Muscarinic acetylcholine receptors: structural basis of ligand binding and G protein coupling. *Life Sci* 56 (11-12), 915–922.
- Wess, J; Brann, MR; Bonner, TI. (1989). Identification of a small intracellular region of the muscarinic m3 receptor as a determinant of selective coupling to PI turnover. *FEBS Lett* 258 (1), 133–136.
- Wess, J. (1996). Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors. *Crit Rev Neurobiol* 10 (1), 69–99.
- Wess, J; Eglén, RM; Gautam, D. (2007). Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 6 (9), 721–733.
- Wilkie, TM; Scherle, PA; Strathmann, MP; Slepak, VZ; Simon, MI. (1991). Characterization of G-protein alpha subunits in the Gq class: expression in murine tissues and in stromal and hematopoietic cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (22), 10049–10053.

8 Anhang

8.1 Kenngrößen der in Bindungs- und [³⁵S]GTPγS-Versuchen eingesetzten Membranhomogenate

Nachfolgend sind alle im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Membranhomogenate aufgeführt. Außerdem können Tab. 91 die Affinitäten zu [³H]N-Methylscopolamin sowie die Rezeptorexpression in Femtomol pro Milligramm Protein [fmol/mg] entnommen werden.

Verwendete Zelllinie	Passage	Datum der Präparation	pK _D ± S.E.M. (n)	B _{max} (fmol/mg) ± S.E.M. (n)	Proteingehalt (mg/ml)
CHO-Flp M1	10	19.04.2011	9,69 ± 0,05 (3)	444 ± 43 (3)	2,10
CHO-Flp M1 W400A	14	15.04.2011	9,61 ± 0,20 (3)	113 ± 28 (3)	1,90
CHO-Flp M1 W400A	5	02.12.2011	9,53 ± 0,02 (3)	1260 ± 46 (3)	1,77
CHO-Flp M2	29	23.04.2010	9,26 ± 0,13 (5)	1259 ± 209 (5)	1,80
CHO-Flp M2	15	12.03.2014	9,46 ± 0,04 (4)	621 ± 52 (4)	1,11*
CHO-Flp M2 W422A	26	27.04.2010	9,17 ± 0,05 (5)	520 ± 64 (5)	1,73
CHO-Flp M3	24	29.01.2010	9,21 ± 0,03 (4)	4170 ± 510 (4)	0,84
CHO-Flp M3	23	17.11.2011	9,41 ± 0,14 (4)	5913 ± 327 (4)	1,96
CHO-Flp M3	56	11.09.2012	9,33 ± 0,06 (4)	2755 ± 260 (4)	2,77
CHO-Flp M3	15	19.02.2013	9,40 ± 0,05 (6)	2864 ± 523 (6)	1,08
CHO-Flp M3	44	14.08.2012	n.b.	n.b.	1,74
CHO-Flp M3 (PTX)	44	14.08.2012	n.b.	n.b.	1,85
CHO-Flp M3	23	12.03.2013	9,56 ± 0,10 (3)	1798 ± 143 (3)	1,47
CHO-Flp M3 (PTX)	23	12.03.2013	9,55 ± 0,08 (3)	1632 ± 166 (3)	1,57
CHO-Flp M3 (PTX/CTX)	23	12.03.2013	n.b.	n.b.	n.b.
CHO-Flp M3 W526A	12	09.02.2010	9,05 ± 0,10 (4)	981 ± 182 (4)	0,72
CHO-Flp M3 W526A	31	16.04.2010	9,09 ± 0,10 (3)	718 ± 149 (3)	1,30
CHO-Flp M3 W526A	16	18.01.2011	9,44 ± 0,08 (6)	1294 ± 193 (6)	1,76
CHO-Flp M3 W526A	25	07.11.2011	9,40 ± 0,04 (4)	2411 ± 398 (4)	1,78
CHO-Flp M3 W526A	5	25.05.2012	9,10 ± 0,04 (3)	5610 ± 501 (3)	1,68
CHO-Flp M3 W526A	5	19.02.2013	9,25 ± 0,05 (6)	944 ± 151 (6)	1,72
CHO-Flp M3 W526A	14	12.03.2013	9,37 ± 0,05 (3)	797 ± 29 (3)	1,57

CHO-Flp M3 W526A (PTX)	14	12.03.2013	9,24 ± 0,08 (3)	1027 ± 124 (3)	1,43
CHO-Flp M4	22	11.05.2010	9,67 ± 0,10 (3)	1278 ± 99 (3)	1,76
CHO-Flp M4	26	07.02.2012	9,58 ± 0,16 (3)	4352 ± 636 (3)	1,88
CHO-Flp M4 W435A	18	18.05.2010	9,50 ± 0,06 (4)	713 ± 76 (4)	1,99
CHO-Flp M4 W435A	26	07.02.2012	9,49 ± 0,10 (3)	2155 ± 265 (3)	1,83

Tab. 91: Sämtliche im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellten CHO-Zellmembranhomogenate aus Flp-inTM-CHO-Zellen, die stabil mit humaner cDNA der angegebenen muskarinischen Acetylcholinrezeptoren bzw. deren punktmutierten Varianten transfiziert wurden. Passage: Anzahl an wiederholter Vermehrung nach Ausfrieren der Zelllinie. Angegeben sind Werte ± Standardfehler (S.E.M.) von n unabhängigen Experimenten. pK_D: Negativer, dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D. B_{max}: Anzahl maximaler spezifischer Bindungsstellen pro mg Rezeptorprotein. Der Proteingehalt wurde einmalig ermittelt. n.b.: Werte wurden nicht bestimmt

8.2 Messung der Bindungsaffinität von Agonisten, Allosteren und Hybridliganden unter Berücksichtigung des Einflusses von Trp 7.35 (Versuche mit Membranhomogenaten)

8.2.1 Die Affinität von Acetylcholin zu hoch- und niedrigaffinen Populationen von M2- und M4-Rezeptoren ist Trp 7.35-abhängig

In den Kapiteln 4.1.4.1.1 und 4.1.4.1.2 wurde dargestellt, dass Trp 7.35 ein an der Bindung der muskarinischen Vollagonisten Acetylcholin und Iperoxo beteiligtes Epitop des M3-Rezeptors war. In Bezug auf Acetylcholin war dies zuvor von Jäger et al. (2007) bereits für den M2-Rezeptor gefunden worden. Die Autoren arbeiteten mit CHO-Zellmembranhomogenaten in einem 10mM HEPES-Puffer, dem 10µM GDP zugesetzt war.

Hier sollte untersucht werden, ob sich die Trp 7.35-Abhängigkeit der Bindung von Acetylcholin zum M2-Rezeptor in einer Situation bestätigen ließe, in der sich durch den Verzicht von GDP im Versuchsansatz zwei zum Agonisten unterschiedlich affine Rezeptorpopulationen bildeten (Abb. 63). Um die Annahme weiter zu untermauern, dass die Rolle des Trp 7.35 für die Bindung des endogenen Liganden Acetylcholin über die Subtypen muskarinischer Rezeptoren konserviert ist, wurde der M4-Rezeptor in die Betrachtungen mit einbezogen.

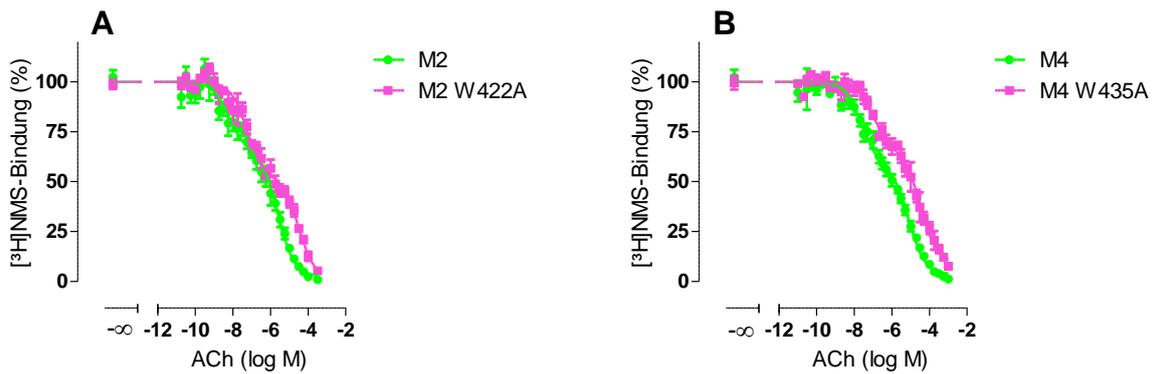


Abb. 63: [³H]NMS-Kompetitionsexperimente unter Gleichgewichtsbedingungen mit Acetylcholin (ACh) an M2- und M2 W422A- (A) sowie an M4- und M4 W435A-(B)-CHO-Zellmembranhomogenaten. Es wurde Puffer (L11) verwendet. Die Datenpunkte sind Mittelwerte ± Standardfehler aus vier bis sieben unabhängigen Experimenten in Drei-Sechsfachbestimmung. Die Datenpunkte wurden mit Gleichung 11 biphasisch analysiert. Ordinate: Spezifische Gesamtbindung des Radioliganden in Prozent. 100% entspricht dem jeweiligen oberen Plateau der Kurve. 0% entspricht der unspezifischen Bindung. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Ligandkonzentration

	Bi vs. Mono	pK _{app} HOCH	pK _{app} NIEDRIG	Hochaffine Fraktion (%)
M2	3/1	8,23 ± 0,14	5,62 ± 0,09	35 ± 3
M2 W422A	5/1	7,27 ± 0,08 ^{***}	4,51 ± 0,13 ^{***}	48 ± 2 ^{**}
M4	6/1	7,62 ± 0,09 ^{##}	5,12 ± 0,09 ^{##}	43 ± 2 [#]
M4 W435A	4/1	6,99 ± 0,10 ^{***}	4,47 ± 0,09 ^{***}	38 ± 2 ^{NS}

Tab. 92: Bindungscharakteristika von Acetylcholin an M2- und M4-Rezeptoren sowie den jeweiligen Trp 7.35→Ala-Mutanten in Membranhomogenaten. Es wurde Puffer (L11) verwendet. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler. pK_{app} HOCH und pK_{app} NIEDRIG: Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_{app} HOCH für die hochaffine Rezeptorpopulation und K_{app} NIEDRIG für die niedrigaffine Rezeptorpopulation. Die Kurven wurden nach Gleichung 11 biphasisch angepasst. ^{***}: Signifikant verschieden vom Wert des jeweiligen Wildtyprezeptors (t-Test, ^{***} p < 0,001, 0,01). ^{NS}: Nicht signifikant verschieden vom Wert des jeweiligen Wildtyprezeptors (t-Test, ^{NS} p > 0,05). ^{##}, [#]: Signifikant verschieden vom Wert des M2-Wildtyprezeptors (t-Test, ^{##} p < 0,01, 0,05)

Die Datenpunkte waren im überwiegenden Teil der Fälle besser mit einer biphasischen Kurvenanpassung (Gleichung 11) beschreibbar (Tab. 92). Lazareno und Birdsall (1995) fanden für die Acetylcholinaffinität zu M2- und M4-Rezeptoren Werte in der gleichen Größenordnung wie die hier für die niedrigaffine Fraktion ermittelten Parameter (pK = 5,95 ± 0,04 bzw. 5,59 ± 0,05). Dabei arbeiteten die Autoren mit einem ähnlich zusammengesetzten Puffer wie in der vorliegenden Arbeit, dem sie allerdings Guanylnukleotide zusetzten. Damit maßen sie die Affinität des Liganden zur niedrigaffinen, G-Protein-entkoppelten Rezeptorpopulation.

Die für Acetylcholin affinitätsgebende Rolle des Trp 7.35 konnte für beide Subtypen beobachtet werden; während sich beim M3-Rezeptor ausschließlich der pK_{app}-Wert für die niedrigaffine Fraktion signifikant zwischen Wildtyp und punktmutiertem Rezeptor unterschieden hatte (Kapitel 4.1.4.1.2: Tab. 29 (Seite 85)), wiesen hier beide Rezeptorpopulationen eine Trp 7.35-Abhängigkeit auf (Tab. 92).

Damit konnte geschlussfolgert werden, dass Trp 7.35 in M2-, M3-, und M4-Rezeptoren ein an der Bindung des endogenen Agonisten Acetylcholin beteiligtes Epitop ist.

Bezüglich der Affinitätsparameter $pK_{app\ HOCH}$ und $pK_{app\ NIEDRIG}$ von Acetylcholin der Subtypen M2, M3 und M4 ergaben sich die in Tab. 93 zusammengefassten Unterschiede.

	M2	M3	M4
$pK_{app\ HOCH}$	$8,23 \pm 0,14^{**}$	$6,43 \pm 0,50^{**}$	$7,62 \pm 0,09^{**}$
$pK_{app\ NIEDRIG}$	$5,62 \pm 0,09^{***}$	$4,26 \pm 0,13^{***}$	$5,12 \pm 0,09^{***}$
n	4	5	7

Tab. 93: Affinitätsparameter von Acetylcholin an M2-, M3- und M4-Rezeptoren sowie den jeweiligen Trp 7.35→Ala-Mutanten in Membranhomogenaten. Es wurde Puffer (L11) verwendet. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler. $pK_{app\ HOCH}$ und $pK_{app\ NIEDRIG}$: Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten $K_{app\ HOCH}$ für die hochaffine Rezeptorpopulation und $K_{app\ NIEDRIG}$ für die niedrigaffine Rezeptorpopulation. n: Anzahl unabhängiger Experimente. ^{***, **}: Signifikant verschieden von der jeweiligen Kenngröße der anderen Subtypen (One-way ANOVA, ^{***, **} $p < 0,001, 0,01$)

Beide Affinitätsparameter unterschieden sich jeweils signifikant zwischen M2-, M3- und M4-Rezeptoren. In Radioligandbindungsstudien war diese für den endogenen Liganden Acetylcholin unerwartete Subtypselektivität schon in früheren Arbeiten aufgefallen (Lazareno und Birdsall, 1995; Kaufel, Dissertationschrift, 2010).

8.2.2 Trp 7.35 ist ein affinitätsgebendes Epitop für Pilocarpin an M3-, nicht jedoch an M2- und M4- Rezeptoren

In nachfolgenden Experimenten wurde untersucht, ob der muskarinische Partialagonist Pilocarpin zu hochaffinen und niedrigaffinen (G-Protein-gekoppelten und G-Protein-entkoppelten) M2-, M3- und M4-Rezeptoren unterscheidbare Affinitäten aufwies und inwieweit diese durch Trp 7.35 beeinflusst wurde. Um zu gewährleisten, dass eine mögliche, biphasische Inhibitionskurve auch zu detektieren war, wurden engmaschige Konzentrationsstufen eingesetzt.

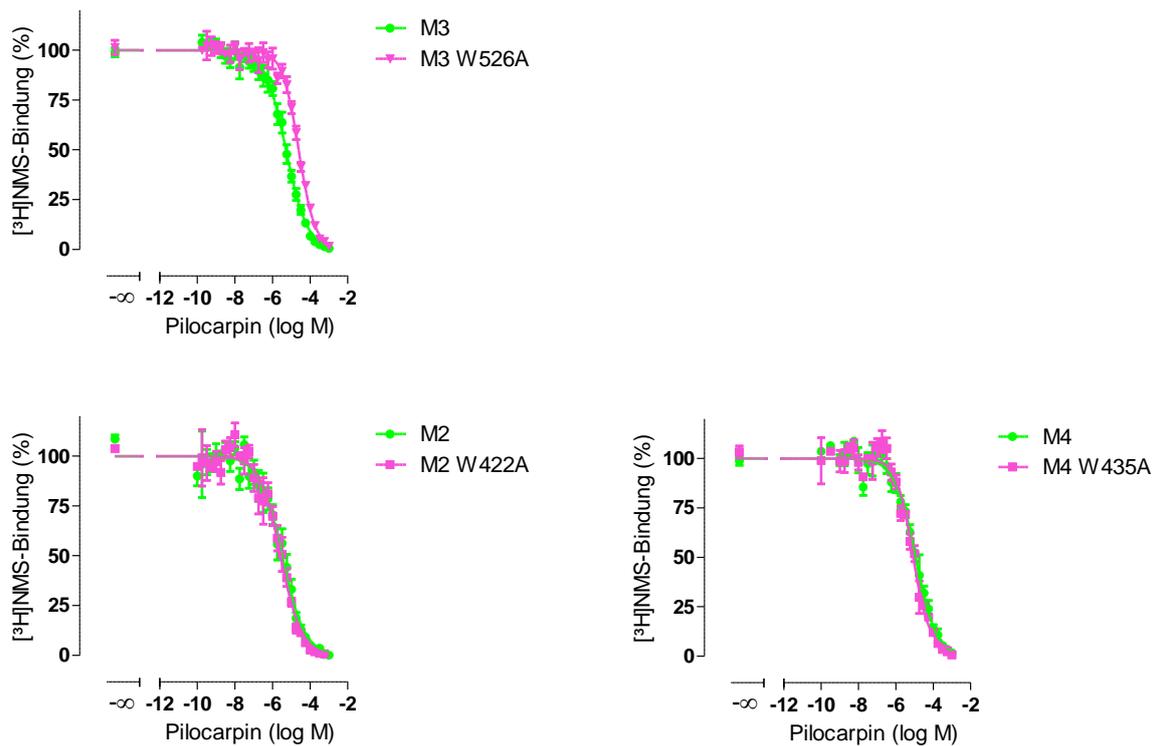


Abb. 64: [³H]NMS-Kompetitionsexperimente unter Gleichgewichtsbedingungen mit Pilocarpin an M2-, M3- und M4-Rezeptoren sowie der jeweiligen Trp 7.35→Ala-Mutanten in Membranhomogenaten. Es wurde Puffer (L11) verwendet. Die Datenpunkte sind Mittelwerte ± Standardfehler aus vier bis acht unabhängigen Experimenten in Drei-Sechsfachbestimmung. Die Datenpunkte wurden mit Gleichung 4 monophasisch analysiert Ordinate: Spezifische Gesamtbindung des Radioliganden in Prozent. 100% entspricht dem jeweiligen oberen Plateau der Kurve. 0% entspricht der unspezifischen Bindung. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Ligandkonzentration

Kein Einzelexperiment der in Abb. 64 dargestellten Versuche konnte mit einer biphasischen Kurvenanalyse (Gleichung 11) ausgewertet werden.

Während die Kurven der M3- und M4-Punktmutante einen nicht von 1 abweichenden Hill-Koeffizienten aufwiesen, verliefen die anderen Kurven mit einer flachen Steilheit (Tab. 94).

	n	n_H	$pK_{I/app}$
M2	4	$-0,73 \pm 0,07^{+++}$	$5,68 \pm 0,15^{\S}$
M2 W422A	4	$-0,79 \pm 0,08^{++}$	$5,72 \pm 0,13^{NS}$
M3	8	$-0,77 \pm 0,05^{+++}$	$5,47 \pm 0,08^{\S}$
M3 W526A	6	$-0,97 \pm 0,07^{n.s.}$	$4,76 \pm 0,04^{***}$
M4	4	$-0,79 \pm 0,07^{++}$	$5,26 \pm 0,09^{\S}$
M4 W435A	7	$-0,91 \pm 0,08^{n.s.}$	$5,33 \pm 0,07^{NS}$

Tab. 94: Bindungscharakteristika von Pilocarpin an M2-, M3- und M4-Rezeptoren sowie den jeweiligen Trp 7.35→Ala-Mutanten in Membranhomogenaten. Es wurde Puffer (L11) verwendet. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler. n: Anzahl unabhängiger Experimente. n_H : Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. $pK_{I/app}$: Negativer, dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_i bzw. K_{app} . Im Falle von M3 W526A und M4 W435A entspringt die Kenngröße pK_i Kurvenanpassungen mit einem Hill-Koeffizient von -1. ^{n.s.}: Nicht signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß $n_H = -1$ (F-Test, $p > 0,05$). ⁺⁺⁺, ⁺⁺: Signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß von -1 (F-Test, ⁺⁺⁺, ⁺⁺ $p < 0,001, 0,01$). ^{***}: Signifikant verschieden vom Wert des jeweiligen Wildtyprezeptors (t-Test, ^{***} $p < 0,001$). ^{NS}: Nicht signifikant verschieden vom Wert des jeweiligen Wildtyprezeptors (t-Test, $p > 0,05$). [§]: Nicht signifikant verschieden von den Werten der anderen Wildtyprezeptoren (One-way ANOVA, Bonferroni's post-Test, $p > 0,05$)

Die Affinitätsparameter von Pilocarpin unterschieden sich zwischen den drei getesteten Wildtyprezeptoren nicht signifikant. Die fehlende Subtypselektivität des Liganden war in der Literatur ebenfalls beschrieben worden (Richards und van Giersbergen, 1995; Jakubik et al., 1997).

Der ermittelte Wert für den M3-Wildtyprezeptor von $5,47 \pm 0,08$ liegt 0,43 Dekaden über dem, der an ganzen Zellen ermittelt wurde ($5,04 \pm 0,13$; Kapitel 4.1.4.2: Tab. 30 (Seite 87)). Dieser Unterschied wies statistische Signifikanz auf (t-Test, * $p < 0,05$). Die hier zu beobachtende flache Kurvensteilheit könnte somit ein Hinweis darauf sein, dass es sich bei der ermittelten Affinität um einen „Mischwert“ handelte, der zwischen einer möglichen Affinität zu einem G-Protein-gekoppelten und G-Protein-entkoppelten Rezeptorkollektiv lag. Dementsprechend war davon auszugehen, dass die Affinität von Pilocarpin, die an intakten CHO-Zellen ermittelt wurde, diejenige zum niedrig affinen (G-Protein-entkoppelten) Rezeptorzustand darstellte (Kapitel 4.1.4.2, Tab. 30, Seite 87).

Analog zu den Ergebnissen aus Kapitel 4.1.4.2 war Trp 7.35 an der Bindung von Pilocarpin zum muskarinischen M3-Rezeptor beteiligt (Tab. 94). Für den M2-Rezeptor konnte dies nicht beobachtet werden, wobei sich dieses Ergebnis mit zuvor erhobenen Daten deckte (Jäger et al., 2007). Für den M4-Rezeptor konnte in Bindungsuntersuchungen ebenfalls kein Beitrag des Trp 7.35 zur Affinität von Pilocarpin beobachtet werden.

8.2.3 Trp 7.35 ist nicht an der Affinität von McN-A-343 zu unbesetzten M2- und M3-Rezeptorproteinen beteiligt

Zum direkten Vergleich der Affinität von McN-A-343 in Bezug auf die Trp 7.35-Abhängigkeit zwischen M2- und M3-Rezeptoren, sollten [³H]NMS-Kompetitionsexperimente unter identischen, experimentellen Bedingungen an CHO-Zellmembranhomogenaten beider Subtypen und jeweiligen Trp 7.35→Ala-Mutanten durchgeführt werden (Abb. 65).

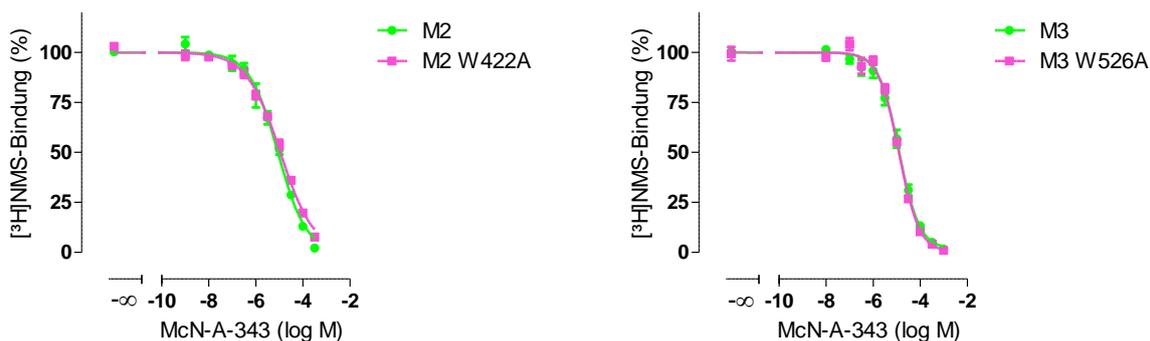


Abb. 65: $[^3\text{H}]$ NMS-Kompetitionsexperimente unter Gleichgewichtsbedingungen mit McN-A-343 an M2- und M3-Rezeptoren sowie der jeweiligen Trp 7.35→Ala-Mutanten in Membranhomogenaten. Es wurde Puffer (L11) verwendet. Die Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus sechs unabhängigen Experimenten in Zwei- bis Vierfachbestimmung. Die Datenpunkte wurden mit Gleichung 4 monophasisch analysiert. Ordinate: Spezifische Gesamtbindung des Radioliganden in Prozent. 100% entspricht dem jeweiligen oberen Plateau der Kurve. 0% entspricht der unspezifischen Bindung. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Ligandkonzentration

	n	n_H	$\text{pK}_{1/\text{app}}$
M2	6	$-0,72 \pm 0,07$ ⁺⁺⁺	$5,29 \pm 0,09$
M2 W422A	6	$-0,61 \pm 0,04$ ⁺⁺⁺	$5,09 \pm 0,07$ ^{NS}
M3	6	$-0,89 \pm 0,07$ ^{n.s.}	$5,00 \pm 0,09$ [§]
M3 W526A	6	$-1,10 \pm 0,07$ ^{n.s.}	$5,02 \pm 0,03$ ^{NS}

Tab. 95: Bindungscharakteristika von McN-A-343 an M2- und M3-Rezeptoren sowie den jeweiligen Trp 7.35→Ala-Mutanten in Membranhomogenaten. Es wurde Puffer (L11) verwendet. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler. n: Anzahl unabhängiger Experimente. n_H : Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. $\text{pK}_{1/\text{app}}$: Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_i bzw. K_{app} . Der Kennwert „ pK_i “ beruht auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von -1. Dies betrifft die Kurven des M3- sowie des M3 W526A-Rezeptors. ^{n.s.}: Nicht signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß $n_H = -1$ (F-Test, $p > 0,05$). ⁺⁺⁺: Signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß von -1 (F-Test, ⁺⁺⁺ $p < 0,001$). ^{NS}: Nicht signifikant verschieden vom Wert des jeweiligen Wildtyprezeptors (t-Test, $p > 0,05$). [§]: Nicht signifikant verschieden vom Wert des M2-Wildtyprezeptors (t-Test, $p > 0,05$)

Trotz des verminderten Angebots an Guanylnukleotiden bei der Verwendung von Membranhomogenaten und der potentiellen Möglichkeit der Unterscheidung zwischen hoch- und niedrigaffinen Rezeptorzuständen waren biphasische Auswertungen (Gleichung 11) in keinem Fall möglich. Beim M3-Rezeptor sowie der M3 W526A-Mutante konnten sogar- wie im Falle der Verwendung intakter CHO-Zellen- Kurven mit einem Hill-Koeffizienten von -1 beobachtet werden (Tab. 95). Die Kurven des M2-Rezeptors sowie der M2 W422A-Mutante wiesen flache Verläufe auf.

Aus Abb. 65 war ersichtlich, dass das Epitop 7.35 im Reaktionsgleichgewicht weder an der Bindung des Liganden McN-A-343 zum M2- noch zum M3-Rezeptor einen Einfluss hatte (Tab. 95). Dies bestätigte die in Kapitel 4.1.4.3 aufgeführten Daten bezüglich des M3-Rezeptors sowie die Beobachtungen von Antony (Dissertationsschrift, 2007) an M2-CHO-Zellmembranhomogenaten.

8.2.4 Trp 7.35 trägt zur M2-Prävalenz von W84 gegenüber dem M3-Rezeptor bei

In Kapitel 4.1.4.4 wurde beschrieben, dass Trp 7.35 zwar an der Affinität des allosterischen Modulators W84 zum M3-Rezeptor beteiligt war, der Unterschied zwischen den erhaltenen pK_A -

Werten zwischen M3- und M3 W526A-Rezeptoren aber (ähnlich wie zwischen M5 und M5 W477A; Prilla, Dissertationsschrift, 2006) deutlich geringer ausfiel als beim präferenziell Gi-koppelnden M2-Rezeptor (Prilla et al., 2006). Dies sollte geprüft werden, indem die Untersuchungen bei identischen Versuchsbedingungen durchgeführt wurden (Abb. 66). Außerdem wurde der M4-Rezeptor, der die gleiche Kopplungspräferenz wie der M2-Rezeptor aufweist, in die Betrachtungen mit einbezogen.

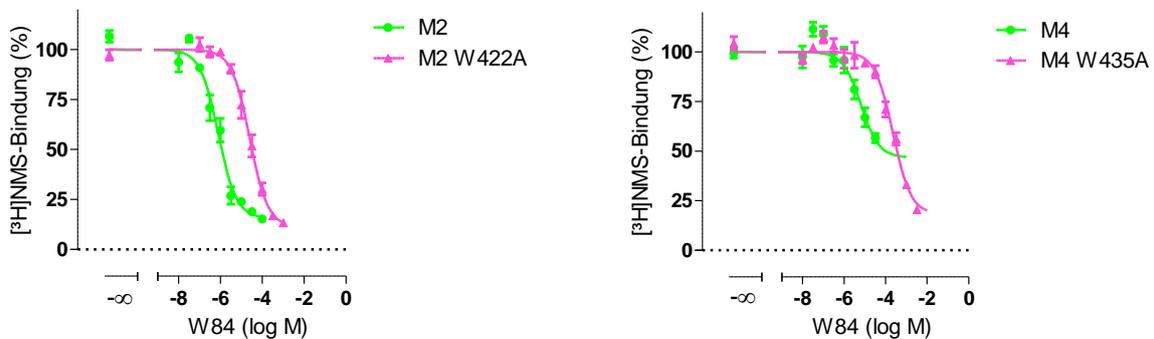


Abb. 66: $[^3\text{H}]$ NMS-Interaktionsexperimente unter Gleichgewichtsbedingungen mit W84 an M2- und M4-Rezeptoren sowie der jeweiligen Trp 7.35→Ala-Mutanten in Membranhomogenaten. Es wurde Puffer (L11) verwendet. Die Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei bis fünf unabhängigen Experimenten in Drei- bis Sechsfachbestimmung. Ordinate: Spezifische Gesamtbindung des Radioliganden in Prozent. 100% entspricht dem jeweiligen oberen Plateau der Kurve. 0% entspricht der unspezifischen Bindung. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Ligandkonzentration

	n	pK_A	$\text{p}\alpha$	$\text{p}\alpha + \text{pK}_A$	$\text{pEC}_{0,5\text{Diss}}$
M2	5	$6,22 \pm 0,13$	$-0,93 \pm 0,02$	5,29	$5,72 \pm 0,13$
M2 W422A	3	$4,70 \pm 0,13$ ***	$-1,08 \pm 0,05$ *	3,62	$4,22 \pm 0,12$
M4	5	$5,30 \pm 0,20$ ##	$-0,63 \pm 0,06$	4,67	$5,09 \pm 0,06$
M4 W435A	3	$3,87 \pm 0,02$ **	$-0,87 \pm 0,07$ *	3,00	$3,33 \pm 0,01$

Tab. 96: Bindungscharakteristika von W84 an M2- und M4-Rezeptoren sowie der jeweiligen Trp 7.35→Ala-Mutanten in Membranhomogenaten. Es wurde Puffer (L11) verwendet. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler. n: Anzahl unabhängiger Experimente. pK_A : Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_A . $\text{p}\alpha$: Negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors α . $\text{pEC}_{0,5\text{Diss}}$: Negativer dekadischer Logarithmus der Ligandkonzentration, die die $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziation um den Faktor 2 verzögert. ***, **, #: Signifikant verschieden zum Wert des jeweiligen Wildtyprezeptors (t-Test, ***, **, # $p < 0,001, 0,01, 0,05$). ##: Signifikant verschieden zum Wert des M2-Wildtyprezeptors (t-Test, # $p < 0,01$).

W84 war an beiden Wildtyp- und punktmutierten Rezeptoren negativ kooperativ mit $[^3\text{H}]$ NMS (Tab. 96). Im Falle des M2-Rezeptors schwang die Inhibitionskurve auf einem von Null verschiedenen Niveau aus (t-Test, ** $p < 0,001$), sodass das Vorhandensein ternärer Komplexe aus Rezeptor, Radioligand und W84 angenommen werden konnte. Die Kurve der M2-Mutante wies ein nicht von Null verschiedenes unteres Plateau auf (t-Test, $p > 0,05$). Die Affinitätsparameter unterscheiden sich signifikant voneinander ($\Delta\text{pK}_A \text{ WT-MUT} = 1,52$), sodass der Beitrag von Trp 7.35 für die Affinität des allosterischen Modulators bestätigt werden konnte (Prilla et al., 2006). Der hier ermittelte pK_A -Wert von W84 am M2-Wildtyprezeptor stimmte gut mit dem von Kaufel (Dissertationsschrift, 2010) ermittelten Parameter überein ($\text{pK}_A = 6,14 \pm 0,16$). Aufgrund der stark ausgeprägten negativen

Kooperativität und des im Falle des M2 W422A-Rezeptors nicht von Null verschiedenen unteren Plateaus der Kurve stimmten die Terme $[p\alpha + pK_A]$ nur näherungsweise mit den $pEC_{0,5Dis}$ -Werten aus den zweipunktkinetischen Experimenten (Tab. 21, Seite 71) überein.

Auch am M4-Rezeptor wies die Trp 7.35→Ala-Mutante eine stärkere negative Kooperativität auf als der Wildtyprezeptor (Tab. 96). Wie beim M2-Subtyp wies das untere Plateau der Wildtyp- im Gegensatz zu dem der M4 W435A-Kurve ein von Null verschiedenes unteres Plateau auf (t-Test, ** $p < 0,01$).

Ähnlich des M2-Rezeptors reduzierte sich die Bindungsaffinität von W84 zum M4-Rezeptor durch die Trp 7.35→Ala-Mutation um 1,43 Dekaden. Damit war für die Gi-koppelnden M2- und M4-Rezeptoren eine stärker ausgeprägte Trp 7.35-Abhängigkeit in Bezug auf die Bindung des allosterischen Modulators W84 belegt als für die überwiegend Gq-koppelnden M3- und M5-Rezeptoren (Prilla et al., 2006; vorliegende Arbeit: Kapitel 4.1.4.4: Tab. 32 (Seite 89)).

Nach Betrachtung der Bindungsparameter für W84 an allen untersuchten Subtypen (Kapitel 4.1.4.4 und 8.2.4) ließ sich eine abfallende Affinitätsreihenfolge des allosterischen Modulators von $M2 > M4 > M3$ angeben.

8.2.5 Trp 7.35 ist an der Bindung von Iper-6-phthal an orthosterisch besetzten und unbesetzten M3- und M4-Rezeptoren beteiligt

Antony et al. (2009) beschrieben eine M2/M5-Subtypselektivität der Hybridliganden Iper-6-phthal und Iper-6-naph sowohl zu orthosterisch besetzten als auch zu freien Rezeptoren. In Organbadexperimenten (M1-Modell: Vas deferens des Kaninchens; M2-Modell: Meerschweinchenvorhof; M3-Modell: Meerschweinchenileum) beobachteten die Autoren, dass auch im Vergleich zu M1- und M3- die Liganden im M2-Modell überlegen waren (Antony et al., 2009).

Zur näheren Charakterisierung dieser Eigenschaft sollten Bindungsuntersuchungen an M3- und M4-Rezeptoren durchgeführt werden. Aufgrund der besseren Verfügbarkeit beschränkten sich nachfolgende Versuche auf Iper-6-phthal. Um den Einfluss des Epitops Trp 7.35 auf die Affinität von Iper-6-phthal auf orthosterisch besetzte M3- und M4-Rezeptoren zu untersuchen, wurden deren punktmutierte Varianten (M3 W526A und M4 W435A) in die Experimente mit eingeschlossen.

Die $pEC_{0,5Dis}$ -Werte aus zweipunktkinetischen Experimenten stellten die Affinitäten zum $[^3H]$ NMS-besetzten Rezeptor dar und dienten überdies zur Ermittlung einer ausreichend langen Inkubationszeit, um ein Reaktionsgleichgewicht zu erreichen.

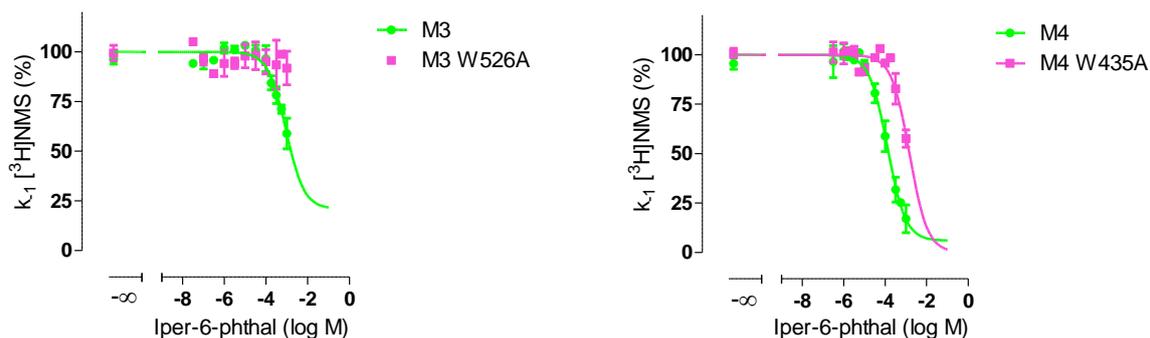


Abb. 67: Ermittlung der Affinität von Iper-6-phthal zum [^3H]NMS-besetzten M3- und M4-Rezeptor sowie der jeweiligen Trp 7.35→Ala-Mutanten auf Membranhomogenaten. Es wurde Puffer (L11) verwendet. Die Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Experimenten in Zwei- bis Sechsfachbestimmung. Ordinate: Geschwindigkeitskonstante der [^3H]NMS-Dissoziation. 100% entspricht dem oberen Kurvenplateau. 0% entspricht einer vollständigen Hemmung der [^3H]NMS-Dissoziation. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Ligandkonzentration

Iper-6-phthal erwies sich am M3- (analog zu Versuchen aus Kapitel 4.1.3.2) sowie am M4-Rezeptor auf CHO-Zellmembranhomogenaten als Verzögerer der [^3H]NMS-Dissoziation (Abb. 67). Wie in den Versuchen, die im Na K P_i- Puffer durchgeführt wurden (Kapitel 4.1.3.3, Tab. 23 (77)), verzögerte Iper-6-phthal an M3- Rezeptoren die Radioliganddissoziation vollständig; gleiches galt für den M4-Rezeptor (Tab. 97).

Der hier für den M3-Rezeptor ermittelte $pEC_{0,5Diss}$ -Wert (Tab. 97) wich nicht signifikant von dem Wert ab, der an intakten CHO-Zellen ermittelt worden war ($pEC_{0,5Diss} = 2,84 \pm 0,05$ (Kapitel 4.1.3.2, Tab. 22 (Seite 74)); $p > 0,05$). Genau wie an Messungen mit intakten CHO-Zellen erwies sich der Ligand an der M3-W526A-Mutante als nicht in der Lage, die Radioliganddissoziation zu verzögern (Abb. 67). Im Gegensatz dazu konnte beobachtet werden, dass Iper-6-phthal dazu an der M4 W435A-Mutante fähig war, allerdings erst bei im Vergleich zum M4-Wildtyprezeptor höheren Konzentrationen. Die Affinität der Hybrids substanz zum orthosterisch besetzten M4-Rezeptor erwies sich als Trp 7.35-abhängig (Tab. 97).

	n	n _H	Unteres Plateau (%)	pEC _{0,5Dis}
M3	4	-1,12 ± 0,15 ^{n.s.}	21 ± 26 ^{NS}	3,22 ± 0,12
M3 W526A	4	-	92 ± 8 [§]	-
M4	3	-1,13 ± 0,21 ^{n.s.}	6 ± 6 ^{NS}	3,88 ± 0,14 [#]
M4 W435A	3	-1	0	2,89 ± 0,03 ^{**}

Tab. 97: Bindungscharakteristika von Iper-6-phthal zu [³H]NMS-besetzten M3 und M4-Rezeptoren sowie den jeweiligen Trp7.35→Ala-Mutanten in Membranhomogenaten. Es wurde Puffer (L11) verwendet. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler. n: Anzahl unabhängiger Experimente. n_H: Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. Unteres Plateau: Unteres Plateau der Kurvenverläufe. Der hier aufgeführte Wert für die M3 W526A-Mutante entspricht der normierten Geschwindigkeitskonstante der als höchstes eingesetzten Ligandkonzentration von 1mM. Für das untere Plateau der Kurve an der M4 W435A-Mutante wurde auf den Wert 0 festgesetzt. pEC_{0,5Dis}: Negativer dekadischer Logarithmus der Ligandkonzentration, die die [³H]NMS-Dissoziation um den Faktor 2 verzögert. Die Kennwerte „Unteres Plateau“ und „pEC_{0,5Dis}“ des M3-, des M4- und des M4 W435A-Rezeptors beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von -1. ^{n.s.}: Nicht signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß n_H = -1 (F-Test, p > 0,05). ^{NS}: Nicht signifikant verschieden von einer vollständigen Dissoziationsverzögerung (t-Test, p > 0,05). [§]: Nicht signifikant verschieden von einer unbeeinflussten [³H]NMS-Dissoziation (t-Test, p > 0,05). ^{**}: Signifikant verschieden vom Wert des M4- Wildtyprezeptors (t-Test, ** p < 0,01). [#]: Signifikant verschieden vom Wert des M3-Wildtyprezeptors (t-Test, # p < 0,05)

Während sich bei Kaufel (Dissertationsschrift, 2010) die pEC_{0,5Dis}-Werte von Iper-6-phthal zwischen M3- und M4-Rezeptoren nicht unterschieden, war auf der Basis der vorliegenden Daten von einer M4/M3-Selektivität der Hybridsubstanz auszugehen. War schon bei Versuchen an ganzen Zellen (Kapitel 4.1.3.2) und an CHO-Zellmembranhomogenaten im Na K P_i- Puffer (Kapitel 4.1.3.3) der Beitrag von Trp 7.35 an der Iper-6-phthal-M3-Rezeptor-Interaktion aufgefallen, konnte in den hier vorgestellten Versuchen gezeigt werden, dass dieses Epitop auch im [³H]NMS-besetzten M4-Rezeptor affinitätsgebend für Iper-6-phthal war.

Wie in den Kapiteln 4.1.4.5 und 4.1.4.6 beschrieben, können Inhibitionskurven von Hybridsubstanzen (als dynamische Liganden) und Rezeptoren im Reaktionsgleichgewicht nur mit dem „Bindungsmodell für dynamische Liganden“ (Bock et al., 2012 und 2014) korrekt ausgewertet werden. Da zum Zeitpunkt der nun vorgestellten Experimente das allosterische Fragment 6-Phthal nicht zur Verfügung stand, diente bei der Analyse der Iper-6-phthal-Interaktionsversuche mit [³H]NMS die vierparameter-logistische Gleichung (Gleichung 4) zur deskriptiven Kurvenanpassung.

Um potentiell biphasische Inhibitionskurven detektieren zu können, wurden engmaschige Konzentrationsstufen von Iper-6-phthal eingesetzt.

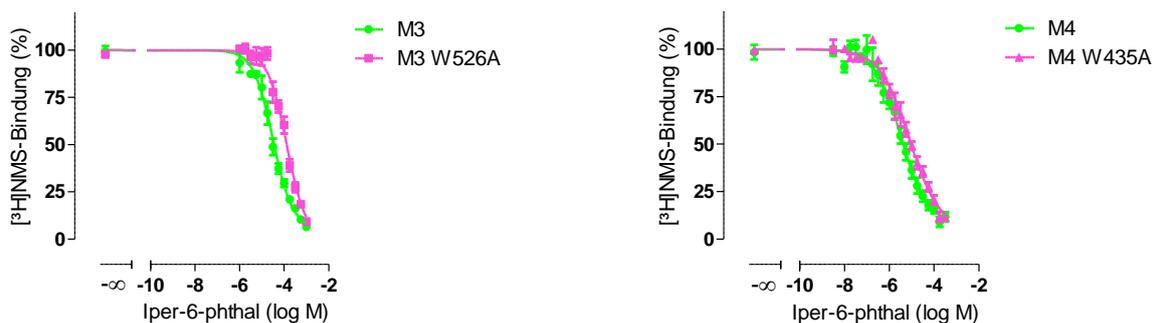


Abb. 68: [³H]NMS-Interaktionsexperimente unter Gleichgewichtsbedingungen mit Iper-6-phthal an M3- und M4-Rezeptoren sowie den jeweiligen Trp 7.35→Ala-Mutanten in Membranhomogenaten. Es wurde Puffer (L11) verwendet. Die Datenpunkte sind Mittelwerte ± Standardfehler aus vier bis fünf unabhängigen Experimenten in Drei- bis Sechsfachbestimmung. Ordinate: Spezifische Gesamtbindung des Radioliganden in Prozent. 100% entspricht dem jeweiligen oberen Plateau der Kurve. 0% entspricht der unspezifischen Bindung. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Ligandkonzentration

Die Kurvenverläufe des M3-Rezeptors sowie der M3 W526A-Mutante zeichneten sich durch eine nicht von -1 abweichende Steilheit aus, die des M4- und M4 W435A-Rezeptors erwiesen sich als deutlich flacher (Tab. 98). In keinem der Fälle war eine biphasische Auswertung der Inhibitionskurven angebracht.

	n	n _H	pK _{1/app}
M3	4	-1,03 ± 0,09 ^{n.s.}	4,68 ± 0,10
M3 W526A	4	-1,15 ± 0,15 ^{n.s.}	4,12 ± 0,04 ^{**}
M4	5	-0,75 ± 0,07 ⁺⁺	5,73 ± 0,08 ^{###}
M4 W435A	5	-0,66 ± 0,06 ⁺⁺⁺	5,41 ± 0,10 [*]

Tab. 98: Bindungscharakteristika von Iper-6-phthal an M3- und M4-Rezeptoren sowie den jeweiligen Trp 7.35→Ala-Mutanten in Membranhomogenaten. Es wurde Puffer (L11) verwendet. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler. n: Anzahl unabhängiger Experimente. n_H: Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. pK_{1/app}: Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_i bzw. K_{app}. Im Falle der Interaktionskurven an M3- und M3 W526A-Rezeptoren entspringen die Affinitätsparameter (pK_i) Kurvenanpassungen mit einem Hill-Koeffizienten von -1. ^{n.s.}: Nicht signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß n_H = -1 (F-Test, p > 0,05). ⁺⁺⁺, ⁺⁺: Signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß von -1 (F-Test, ⁺⁺⁺ p < 0,001, ⁺⁺ p < 0,01). ^{**}, ^{*}: Signifikant verschieden vom Wert des jeweiligen Wildtyprezeptors (t-Test, ^{**} p < 0,01, ^{*} p < 0,05). ^{###}: Signifikant verschieden vom Wert des M3-Wildtyprezeptors (t-Test, ^{###} p < 0,001)

An M3- und M4-Rezeptoren reduzierte sich der deskriptive Wert für die Affinität von Iper-6-phthal, wenn Trp 7.35 durch Alanin ausgetauscht worden war (Tab. 98). Damit bestätigte sich in Bezug auf den M3-Rezeptor, was in Kapitel 4.1.4.6 bereits gezeigt werden konnte: Im dualsterischen Bindungsmodus hatte der M3-Wildtyprezeptor eine höhere Affinität für Iper-6-phthal als die M3 W526A-Mutante (Tab. 35, Seite 96). Der Austausch von Trp 7.35 zu Alanin führte im M4-Rezeptor ebenfalls zu einer verminderten Affinität von Iper-6-phthal im Vergleich zum Wildtyprezeptor (Tab. 98). Damit konnte wie für den M2-Rezeptor (Antony et al., 2009; Bock et al., 2012; vorliegende Arbeit: Kapitel 4.1.4.5) in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass dieses Epitop an der Bindung

der Hybridspezies Iper-6-phthal zu orthosterisch unbesetzten M3- und M4-Rezeptoren beteiligt war.

Wie am orthosterisch besetzten Rezeptor war die Affinität der Substanz für den M4-Rezeptor höher als für den M3-Rezeptor (Tab. 98). Kaufel ermittelte bei identischen experimentellen Bedingungen einen pK_{app} -Wert von Iper-6-phthal zum M2-Rezeptor von $7,04 \pm 0,04$ (Dissertationsschrift, 2010). Dieser unterschied sich sowohl vom hier ermittelten Wert für den M3- als auch von dem des M4-Rezeptors (One-way ANOVA, Bonferroni's post-Test, *** $p < 0,001$). Somit kann für die untersuchte Substanz eine abfallende Affinitätsreihenfolge von $M2 > M4 > M3$ angegeben werden. In Bezug auf die M2/M3-Selektivität bestätigen die hier dargestellten Versuche die Befunde von Antony et al. (2009) und die Erkenntnisse aus den Kapiteln 4.1.4.5 und 4.1.4.6.

Die für die dualsterische Substanz festgestellte Affinitätsreihenfolge zu den untersuchten Subtypen fand sich sowohl bei W84 als Muttersubstanz des allosterischen Fragments (Kapitel 4.1.4.4 und 8.2.4) als auch bei Iperoxo als orthosterischem Anteil des Liganden (Schrage et al., 2014).

8.3 Ergebnisse aus [³⁵S]GTPγS-Bindungsuntersuchungen

8.3.1 Pilocarpin induziert einen partialagonistischen Effekt an M3-Rezeptoren in [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimenten

Zur Bestimmung einer supramaximalen Konzentration des muskarinischen Partialagonisten Pilocarpin an M3-CHO-Zellmembranhomogenaten in [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimenten wurde eine Konzentrations-Effekt-Kurve dieses Liganden aufgenommen (Abb. 69).

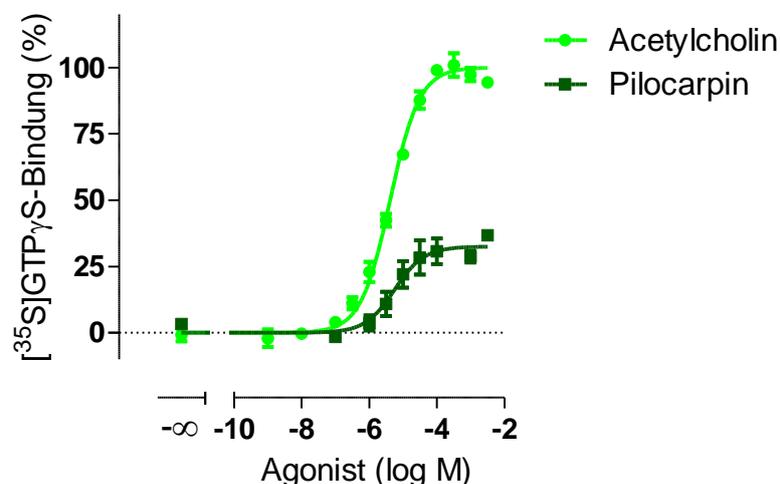


Abb. 69: Acetylcholin- und Pilocarpin-vermittelte [³⁵S]GTPγS-Bindung an M3-CHO-Zellmembranhomogenaten. Die Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei bis dreizehn unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Ordinate: Prozentuale [³⁵S]GTPγS-Bindung. 0 % entspricht den jeweiligen unteren Plateaus der Konzentrations-Effekt-Kurven, 100 % ist das obere Plateau der Acetylcholin-Kurve. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration

M3		
Acetylcholin	Emax (%)	100
	pEC ₅₀	5,38 ± 0,03
	n _H	0,91 ± 0,05 ^{n.s.}
	n	13
Pilocarpin	Emax (%)	32 ± 3 ⁺⁺
	pEC ₅₀	5,25 ± 0,16 [§]
	n _H	1,27 ± 0,47 ^{n.s.}
	n	3

Tab. 99: Kenngrößen der Acetylcholin- und Pilocarpin-vermittelten [³⁵S]GTPγS-Bindungskurven an M3-CHO-Zellmembranhomogenaten. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler. n: Anzahl unabhängiger Experimente. n_H: Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus derjenigen Agonistkonzentration, die zu einer halbmaximalen Zellantwort führt. E_{max}: Maximale, agonistinduzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung, entsprechend dem oberen Niveau der Konzentrations-Effekt-Kurve. 100 % entspricht der maximalen, durch Acetylcholin ausgelösten Aktivierung. Die Kenngrößen pEC₅₀- und Emax-Wert entspringen Kurvenanpassungen mit einem Hill-Koeffizienten von 1. ^{n.s.}: Nicht signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß n_H = 1 (F-Test, p > 0,05). ⁺⁺: Signifikant verschieden vom jeweiligen Wert nach Acetylcholinstimulation (t-Test, ⁺⁺ p < 0,01). [§]: Nicht signifikant verschieden vom jeweiligen Wert nach Acetylcholinstimulation (t-Test, p > 0,05)

Pilocarpin erwies sich im [³⁵S]GTPγS-Experiment als Partialagonist am M3-Rezeptor; der Emax-Wert war im Vergleich zu dem von Acetylcholin reduziert (Tab. 99). Es wurden normalsteile Kurven aufgenommen. Interessanterweise unterschieden sich die Wirksamkeiten von Acetylcholin und Pilocarpin nicht voneinander. Dies stand in gutem Einklang zu den Daten von Sykes et al. (2009). In diesem Zusammenhang war interessant, dass Akam et al. (2001) durch selektive Immunopräzipitation von [³⁵S]GTPγS-Gα-Komplexen fanden, dass die Pilocarpin-vermittelte M3-Antwort in diesem Messsystem mehr durch Gi- als durch Gq-Kopplung zustande gekommen war.

Eine Konzentration von 1mM Pilocarpin lag im oberen Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve und konnte somit in Versuchen zur GDP-Konzentrationsoptimierung eingesetzt werden (Kapitel 4.2.1, Abb. 19).

8.3.2 Die durch Pilocarpin induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung an M2- Rezeptoren ist nicht von Trp 7.35 abhängig

Die Aktivierung von M2- und M2 W422A-Rezeptoren durch Acetylcholin und Pilocarpin wurde mittels [³⁵S]GTPS-Bindungsexperimenten bestimmt (Abb. 70). Ziel war es, durch Analyse der Konzentrationseffektkurven durch das *operational model of agonism* (Black und Leff, 1983) zu Werten der Kopplungseffizienz zu gelangen, die eine Aussage zum Einfluss der Punktmutation Trp7.35→Ala auf die Pilocarpin-vermittelte Rezeptoraktivierung zuließen.

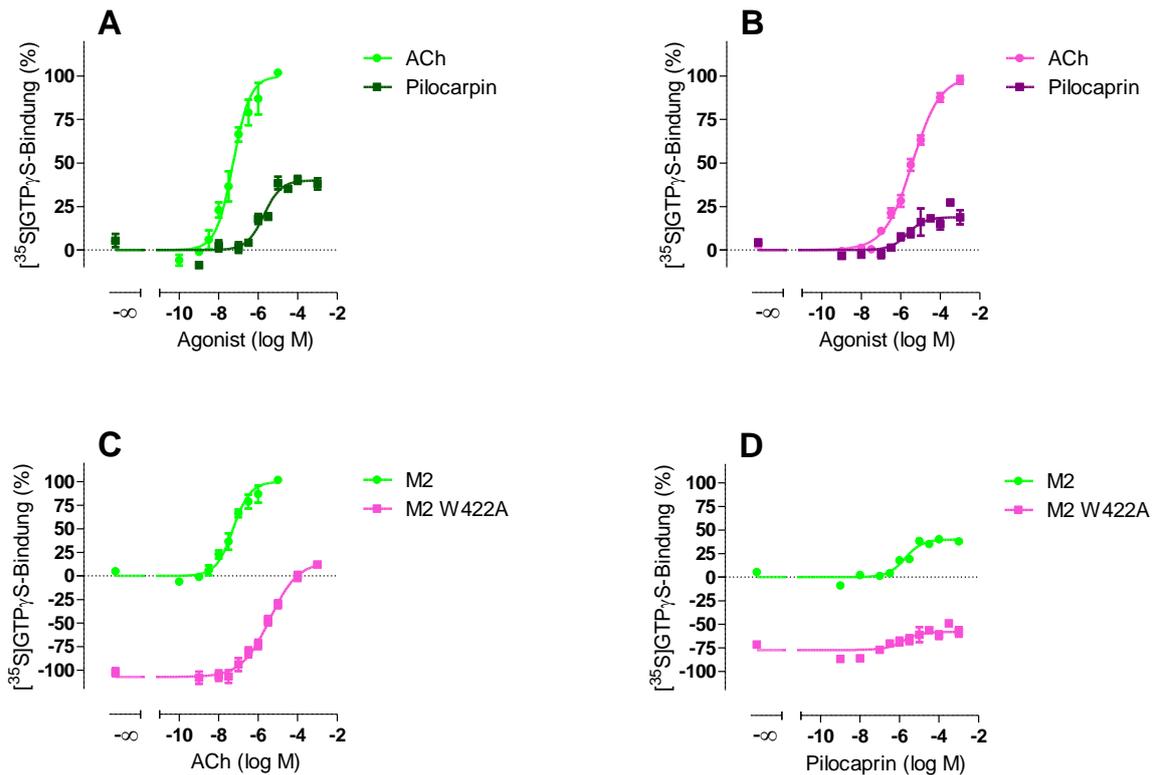


Abb. 70: Acetylcholin- und Pilocarpin-vermittelte $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ - Bindung an M2- (A)- und M2 W422A-CHO-Zellmembranhomogenaten (B). Die Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Ordinate: Prozentuale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung. A, B: 0 % entspricht den jeweiligen unteren Plateaus der Konzentrations-Effekt-Kurven, 100 % ist das obere Plateau der jeweiligen Acetylcholincurve. C, D: 0% entspricht dem jeweiligen unteren Plateau der Kurve des M2-Wildtyprezeptors. 100% entspricht dem oberen Plateau der Acetylcholincurve des M2-Wildtyprezeptors. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration

Während die Acetylcholincurve, die mit M2 W422A-Rezeptoren aufgenommen wurde, eine flache Steilheit aufwies, konnten alle anderen Konzentrationseffektbeziehungen mit einem Hill-Koeffizienten von 1 angepasst werden (Tab. 100). Pilocarpin zeigte dem Acetylcholin unterlegene Wirksamkeiten und Emax -Werte an M2- und M2 W422A-Rezeptoren (Abb. 70 A und B; Tab. 100). Der Partialagonismus dieser Substanz am M2-Rezeptor wird in der Literatur häufig beschrieben (Figuroa et al., 2009). Die Untersuchung der beiden Zelllinien in diesem Messsystem ergab, dass das basale Niveau der $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung an der M2 W422A-Mutante im Vergleich zu dem des M2-Wildtyprezeptors signifikant herabgesetzt war (Abb. 70). Auf diese Weise verliefen die Konzentrations-Effekt-Kurven der beiden Rezeptoren in einem völlig verschiedenen Messfenster, was einen Vergleich erschwerte (Abb. 70 C und D, Tab. 101). Kebig beobachtete und diskutierte dieses Phänomen in ihrer Dissertationsschrift (2010). Die in vorliegender Arbeit ermittelten Wirksamkeiten beider Agonisten an beiden Rezeptoren standen in deutlichem Einklang mit zuvor von Kebig erhobenen Daten (Dissertationsschrift, 2010). Es konnte ebenfalls reproduziert werden, dass die spontane Rezeptoraktivität des M2-Wildtyprezeptors durch die Punktmutation aufgehoben wurde (Tab. 101).

		M2	M2 W422A
Acetylcholin	E _{max} (%)	100	100
	pEC ₅₀	7,27 ± 0,06	5,42 ± 0,04 ^{***}
	n _H	0,83 ± 0,09 ^{n.s.}	0,61 ± 0,03 ^{###}
	n	3	3
Pilocarpin	E _{max} (%)	40 ± 2 ⁺⁺	19 ± 2 ^{**,+++}
	pEC ₅₀	5,72 ± 0,12 ⁺⁺⁺	5,66 ± 0,26 ^{NS,§}
	n _H	1,02 ± 0,25 ^{n.s.}	1,03 ± 0,62 ^{n.s.}
	n	3	3

Tab. 100: Kenngrößen der Acetylcholin- und Pilocarpin-vermittelten [³⁵S]GTPγS- Bindungskurven an M2- und M2 W422A-CHO-Zellmembranhomogenate, entsprechend den Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abb. 70 A und B. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler. n: Anzahl unabhängiger Experimente. n_H: Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus derjenigen Agonistkonzentration, die zu einem halbmaximalen Effekt führt. E_{max}: Maximale, agonistinduzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung, entsprechend dem oberen Niveau der Konzentrations-Effekt-Kurve. 100 % entspricht der jeweiligen durch Acetylcholin ausgelösten Aktivierung. Im Falle der Acetylcholinkurve an M2-CHO-Zellmembranhomogenaten und beiden Pilocarpinkurven entspringen die Kenngrößen pEC₅₀- und E_{max}-Wert Kurvenanpassungen mit einem Hill-Koeffizienten von 1. ^{n.s.}: Nicht signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß n_H = 1 (F-Test, p > 0,05). ^{###}: Signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß n_H=1 (F-Test, ^{###} p < 0,001). ^{***, **}: Signifikant verschieden vom Wert des M2- Wildtyprezeptors (t-Test, ^{***, **} p < 0,001, 0,01). ^{NS}: Nicht signifikant verschieden vom Wert des M2-Wildtyprezeptors (t-Test, p > 0,05). ⁺⁺⁺: Signifikant verschieden von jeweiliger Acetylcholin-Kenngröße (t-Test, ⁺⁺⁺ p < 0,001, 0,01). [§]: Nicht signifikant verschieden von jeweiliger Acetylcholin-Kenngröße (t-Test, p > 0,05)

		M2	M2 W422A
Acetylcholin	E _{min} (%)	0	-107 ± 3 ^{***}
	E _{max} (%)	100	15 ± 3 ^{**}
Pilocarpin	E _{min} (%)	0	-77 ± 3 ^{**}
	E _{max} (%)	40 ± 2	-58 ± 3 ^{***}
Atropin 100μM		-103 ± 4 ⁺⁺	-109 ± 3 ^{NS,§}

Tab. 101: Obere (E_{max}) und untere (E_{min}) Plateaus der in Abb. 70 C und D dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven sowie Auswirkung von 100μM Atropin auf die basale [³⁵S]GTPγS-Bindung in M2- und M2 W422A-CHO-Zellmembranhomogenaten. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler. ^{***, **}: Signifikant verschieden vom Wert des M2-Wildtyprezeptors (t-Test, ^{***, **} p < 0,001, 0,01). ^{NS}: Nicht signifikant verschieden vom Wert des M2-Wildtyprezeptors (t-Test, p > 0,05). ⁺⁺: Signifikant verschieden vom E_{min}-Wert von Acetylcholin am M2-Wildtyprezeptor (t-Test, ⁺⁺ p < 0,01). [§]: Nicht signifikant verschieden vom E_{min}-Wert von Acetylcholin am M2 W422A-Rezeptor (t-Test, p > 0,05)

Während sich die Wirksamkeit von Acetylcholin durch die Punktmutation um 1,85 Dekaden reduzierte, war der pEC₅₀-Wert von Pilocarpin unabhängig von Trp 7.35 (Tab. 100). Jäger et al. (2007) kamen zu dem Ergebnis, dass die Wirksamkeit von Acetylcholin und die intrinsische Aktivität von Pilocarpin von Trp 7.35 im M2-Rezeptor abhängen. Diese Aussage konnte in Bezug auf die pEC₅₀-

Werte bestätigt werden, während die Interpretation der Emax-Werte durch das sich unterscheidende Messfenster erschwert war. Es wurde daher auf die Ermittlung von Kopplungseffizienzen zurückgegriffen. Das in diesen Versuchen verwendete M2-CHO-Zellmembranhomogenat wies eine Expression von 1259 ± 209 Femtomol Rezeptoren pro Milligramm Protein auf, während für das M2 W422A-CHO-Zellmembranhomogenat ein Wert von 520 ± 64 fmol/mg ermittelt wurde (Tab. 91, Seite 204). Das Verhältnis der Rezeptorexpression zwischen dem M2-Wildtyp und der M2 Trp 7.35-Mutante floss durch die Korrektur der $\log \tau$ -Werte von M2 W422A durch folgende Gleichung in die Betrachtungen ein:

$$\log \tau_{\text{korr}} = \log \tau + \log 2,42$$

	$\log \tau [^3\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S} \pm \text{S.E.M. (n)}$	
	M2	M2 W422A _{korr}
Pilocarpin	$-0,18 \pm 0,05 (3)$	$-0,20 \pm 0,05 (3)^{\text{NS}}$

Tab. 102: Kopplungsparameter $\log \tau$ von Pilocarpin auf Grundlage des [^3S]GTP γ S-Assays mit M2- und M2 W422A-CHO-Zellmembranhomogenaten. Die Normierung der zugrunde gelegten Konzentrations-Effekt-Kurven erfolgte jeweils auf die Aktivierung durch Acetylcholin. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Der Zusatz „korr“ bezeichnet die Transformation des Kopplungsparameters $\log \tau$ durch den Expressionskorrekturfaktor $\log 2,42$ zu $\log \tau_{\text{korr}}$. ^{NS}: Nicht signifikant verschieden vom Wert des M2-Wildtyprezeptors (t-Test, ^{NS} $p > 0,05$)

Die $\log \tau$ -Werte von Pilocarpin unterschieden sich nicht zwischen den beiden Zelllinien (Tab. 102). Damit ergaben die hier erhobenen Untersuchungen, dass die Pilocarpin-induzierte M2-Aktivierung nicht von Trp 7.35 abhängt.

8.4 DMR-Messungen

8.4.1 Ein Zweistichproben-t-Test bestätigt ein Iperoxo-induziertes DMR-Signal in CHO-M3- und CHO-M3 W526A-Zellen nach Ausschaltung / Maskierung von Gq-, Gs- und Gi-Proteinen

In DMR-Untersuchungen wurden nach Vorbehandlung von CHO-M3- und CHO-M3 W526A-Zellen mit QIC, CTX und PTX durch $10\mu\text{M}$ bzw. $100\mu\text{M}$ Iperoxo Signale von $8 \pm 3 (8) \%$ bzw. $7 \pm 1 (6) \%$ im Vergleich zu Kontrollbedingungen beobachtet (Kapitel 4.3.2 und 4.3.3).

In allen in dieser Arbeit aufgeführten DMR-Experimenten wurde zur Ermittlung eines agonistvermittelten Effektes die AUC (*area under the curve*) der Signaturen berechnet, nachdem sie um den Puffereffekt korrigiert wurde. Daher konnte als basales DMR-Signal eine Nulllinie, also 0% gelten. Um zu testen, ob sich die iperoxoinduzierten Signale nach Vorinkubation von CHO-M3 und CHO-M3-W526A-Zellen mit allen drei G-Protein-Modulatoren signifikant vom Basalwert unterschieden, wurde ein Einstichproben-t-Test (Gleichung 29), bei dem der Mittelwert einer Stichprobe mit einem hypothetischen Wert (ohne Standardfehler) verglichen wird, durchgeführt und ein statistisch relevanter Unterschied zwischen den Messwerten und 0% detektiert.

Es kann jedoch auch die AUC der unkorrigierten, durch die Agonist-Stimulation entstandenen Signatur mit der des Puffersignals verglichen werden. Auf diese Weise erhält man zwei Mittelwerte mit einer Streuung in Form eines Standardfehlers, die man nun einem Zweistichproben-t-Test unterziehen kann (Gleichung 28, Abb. 71).

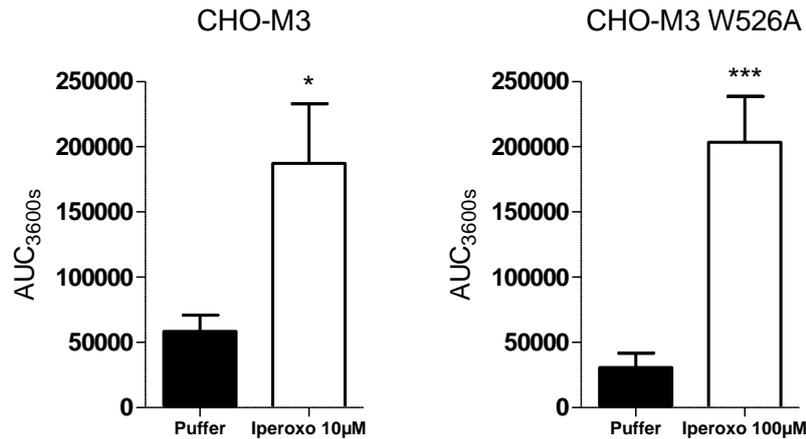


Abb. 71: AUC-Werte der Puffer- und Iperoxo-induzierten dynamischen Massenumverteilung in CHO-M3- und CHO-M3-W526A-Zellen nach Vorbehandlung mit QIC, CTX und PTX. Aufgeführt sind Mittelwerte \pm Standardfehler von sechs bis acht unabhängigen Experimenten in Doppel- oder Dreifachbestimmung. Zur Stimulation von CHO-M3-Zellen wurden 10µM Iperoxo eingesetzt, zur Stimulation von CHO-M3 W526A-Zellen 100µM. Ordinate: Werte für die *area under the curve* (AUC). Abszisse: Eingesetzte Stimulatoren. ***: Signifikant verschieden vom Pufferwert (t-Test, *** p < 0,001, 0,05)

Auch nach Durchführung eines Zweistichproben-t-Testes (Gleichung 28) erwies sich das Iperoxo-induzierte Signal nach Ausschaltung bzw. Maskierung des Gq-, Gs- und Gi-Weges in CHO-M3- und CHO-M3 W526A-Zellen als signifikant verschieden vom Basalwert. Welchen Ursprung dieses Signal gehabt haben könnte, wurde in Kapitel 4.3.2 und 4.3.3 näher untersucht und in Kapitel 5.6 diskutiert.

8.5 IP1-Assay

8.5.1 CHO-M3- und CHO-M2-Zellen weisen keine spontante IP1-Generierung auf und das Acetylcholin-induzierte Signal ist Muskarinrezeptor-vermittelt

In den folgenden Experimenten sollte getestet werden, ob M3- und M2-Rezeptoren eine Spontanaktivität im IP1-Assay aufwiesen. Dazu wurden die Zellen mit dem muskarinischen, inversen Agonisten Atropin inkubiert und die IP1-Bildung gemessen. Ferner sollte überprüft werden, ob das durch Acetylcholin induzierte Signal muskarinischen Ursprungs war. Dafür wurden die Zellen mit Atropin vorbehandelt und getestet, ob danach eine Agonist-induzierte IP1-Bildung detektierbar war.

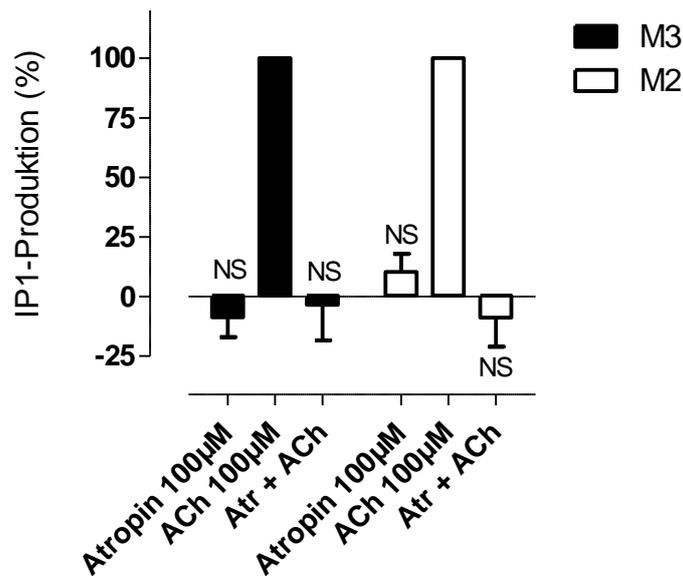


Abb. 72: Auswirkung von Atropin auf den basalen und Acetylcholin-induzierten IP1-Gehalt von CHO-M3- und CHO-M2-Zellen. Aufgeführt sind Mittelwerte \pm Standardfehler von drei bis sechs unabhängigen Experimenten in Doppel- oder Dreifachbestimmung. Ordinate: Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht dem jeweiligen Basalwert und 100 % entspricht dem durch Acetylcholin am jeweiligen Subtyp ermittelten Wert. Abszisse: Eingesetzte Liganden (Atropin 100µM, Acetylcholin 100µM, jeweils alleine und in Kombination). NS: Nicht signifikant verschieden vom Basalwert (t-Test, $p > 0,05$)

Atropin vermochte in beiden Zelllinien nicht, den basalen IP1-Gehalt zu reduzieren, da kein inverses Messfenster detektierbar war (Abb. 72). Ferner hob eine Vorbehandlung mit Atropin die Fähigkeit beider Rezeptoren auf, durch Acetylcholin stimuliert zu werden.

Somit lag die Schlussfolgerung nahe, dass die beiden untersuchten Subtypen in diesem Messsystem keine Spontanaktivität aufwiesen und dass das erhaltene Messsignal durch die Aktivierung des jeweilig transfizierten Subtypen muskarinischer Rezeptoren zustande kam. Dies bestätigte die Ergebnisse von Peters (Masterarbeit, 2010), der mittels real-time RT-PCR die Identität der verwendeten Zelllinien verifiziert hatte.

8.5.2 An der Acetylcholin- und Pilocarpin-induzierten Generierung von IP1 in CHO-M3- und CHO-M3 W526A-Zellen ist der Einfluss von Giβγ-Untereinheiten nicht beteiligt

Ob sich neben einem Acetylcholin-induzierten (Kapitel 4.4.2) auch ein partialagonistisches Messsignal von CHO-M3-Zellen als PTX-unempfindlich in IP1-Versuchen erwies und somit die Beteiligung von Giβγ-Effekten auszuschließen war, sollte in den folgenden Experimenten anhand einer Rezeptorsättigenden Konzentration von Pilocarpin (Kapitel 4.4.4.3, Abb. 51) getestet werden (Abb. 73). Ebenso wurde die M3 W526A-Mutante in die Betrachtungen mit einbezogen.

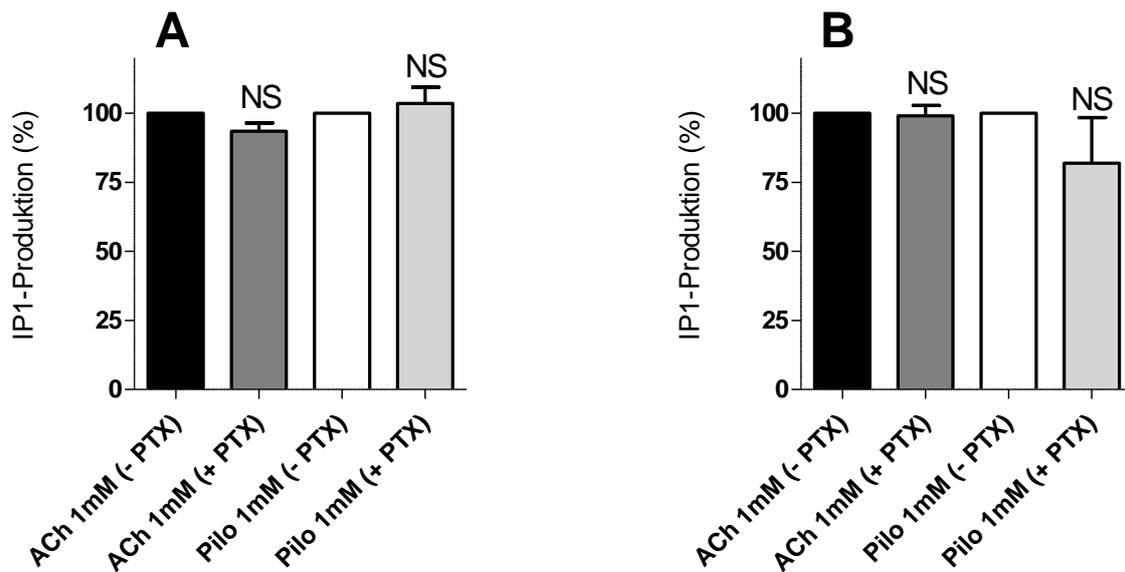


Abb. 73: Maximale Acetylcholin- und Pilocarpinvermittelte Generierung von IP1 in CHO-M3- (A) und CHO-M3 W526A-Zellen (B) unter Kontrollbedingungen und nach PTX-Vorbehandlung. Aufgeführt sind Mittelwerte \pm Standardfehler von drei bis vier unabhängigen Experimenten in Doppel- oder Dreifachbestimmung. Ordinate: Prozentuale Zellantwort; normiert auf den durch den jeweiligen Agonisten ermittelten Wert unter Kontrollbedingungen. Abszisse: Eingesetzte Agonisten ohne und mit PTX-Vorbehandlung (jeweils 1mM). NS: Nicht signifikant verschieden vom Wert unter Kontrollbedingungen (t-Test, $p > 0,05$)

Der partialagonistische Charakter von Pilocarpin an diesen Rezeptoren wurde in Kapitel 4.4.4.3 näher erläutert. Anhand der Daten aus Abb. 73 war ersichtlich, dass das Acetylcholin- und Pilocarpinvermittelte Signal in CHO M3- und CHO M3- W526A-Zellen PTX-unempfindlich war. Damit wurde angenommen, dass keiner der beiden Agonisten in den untersuchten Zelllinien $G_i\beta\gamma$ -vermittelte Effekte in Gang setzte, sondern die erhaltenen Signale die reine $G_q\alpha$ -Aktivierung widerspiegeln.

8.6 cAMP-Assay

8.6.1 Trp 7.35 ist an der Acetylcholin-vermittelten Generierung von intrazellulärem cAMP in CHO-M3-Zellen beteiligt

Teil der methodischen Vorversuche zu den in dieser Arbeit durchgeführten cAMP-Messungen (Kapitel 4.5.2) war die Untersuchung des Einflusses einer rezeptorsättigenden Konzentration des endogenen Agonisten Acetylcholin in diesem Messsystem. Daher wurden CHO-M3 und CHO-M3 W526A-Zellen mit PTX vorbehandelt und mit steigenden Konzentrationen Acetylcholin stimuliert. Abb. 74 zeigt das Ergebnis aus zwei unabhängigen Experimenten.

Die Normierung der erhaltenen Konzentrations-Effekt-Kurven erfolgte auf das Basalniveau und die Iperoxo-induzierte Zellantwort in CHO-M3-Zellen.

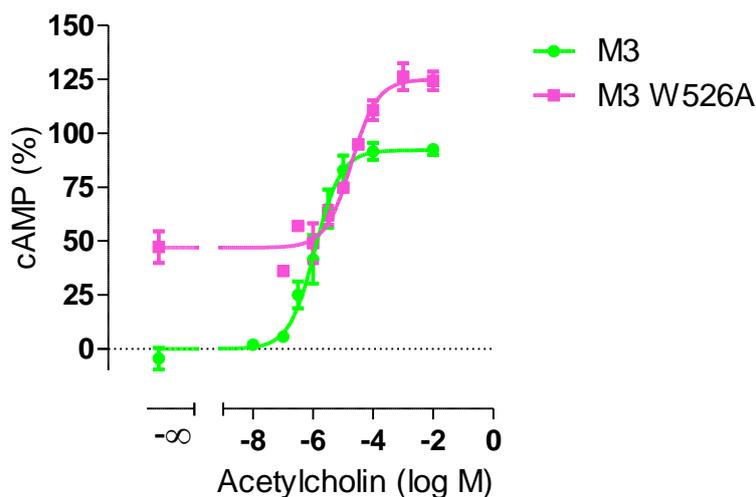


Abb. 74: Generierung von intrazellulärem cAMP durch Acetylcholin in CHO- M3- und CHO-M3 W526A-Zellen. Die Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus zwei unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Ordinate: Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht dem unteren Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve in CHO-M3-Zellen, 100 % entspricht der durch Iperoxo induzierten Zellantwort in CHO-M3-Zellen. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration

Das basale Niveau intrazellulären cAMPs war in CHO-M3 W526A-Zellen im Vergleich zu CHO-M3-Zellen signifikant erhöht (Abb. 74, Tab. 103). Diese Beobachtung war nicht auf eine Spontanaktivität des punktmutierten Rezeptors zurückzuführen, da der inverse Agonist Atropin keine Absenkung des unteren Plateaus verursacht hatte (Abb. 55, Seite 162).

	M3	M3 W526A
Emax (%)	92 \pm 3	125 \pm 3 *
Emin (%)	0	47 \pm 3 *
pEC ₅₀	5,94 \pm 0,07	4,73 \pm 0,12 *
η_H	0,91 \pm 0,13 ^{n.s.}	0,86 \pm 0,19 ^{n.s.}
n	2	2

Tab. 103: Kenngrößen des Acetylcholin-induzierten Anstiegs von intrazellulärem cAMP in CHO-M3- und CHO-M3 W526A - Zellen. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler. Emax: Maximale Zellantwort, normiert auf die durch Iperoxo am M3-Wildtyprezeptor induzierten Anstieg von cAMP. Emin: Basaler cAMP-Gehalt, normiert auf den Basalwert in CHO-M3-Zellen. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus derjenigen Agonistkonzentration, die zu einer halbmaximalen Zellantwort führt. η_H : Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Die Kenngrößen pEC₅₀, Emin- und Emax-Wert entspringen Kurvenanpassungen mit einem Hill-Koeffizienten von 1. ^{n.s.}: Nicht signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß $\eta_H = 1$ (F-Test, $p > 0,05$). *: Signifikant verschieden vom jeweiligen Wert des M3-Wildtypes (t-Test, * $p < 0,05$)

In diesem Messsystem wies Acetylcholin am M3- sowie am M3 W526A-Rezeptor eine schwächere Potenz auf als Iperoxo (t-Test, ^{***}, ^{**} $p < 0,001, 0,01$; Vergleich mit Werten aus Tab. 84, Seite 164). Die Wirksamkeit des endogenen Liganden wurde durch die Mutation Trp 7.35 \rightarrow Ala reduziert (Tab. 103). Da sich in den hier vorgestellten Versuchen das Expressionsniveau von M3- und M3 W526A-Rezeptoren auf den CHO-Zellen nicht unterschied (Kapitel 4.5.1, Abb. 54 A), konnte geschlussfolgert

werden, dass Trp 7.35 ein an der Acetylcholin-induzierten Generierung von cAMP in CHO-M3-Zellen beteiligtes Epitop war.

Eine Konzentration von 10mM Acetylcholin, wie sie in den Versuchen aus Abb. 55 (Seite 162) verwendet wurde, lag im oberen Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven an M3- und M3-W526A-Rezeptoren.

8.7 Buchstabencodes der Aminosäuren

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Glycin	Gly	G
Alanin	Ala	A
Valin	Val	V
Leucin	Leu	L
Isoleucin	Ile	I
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Prolin	Pro	P
Histidin	His	H
Phenylalanin	Phe	F
Tyrosin	Tyr	Y
Tryptophan	Trp	W
Cystein	Cys	C
Methionin	Met	M
Asparaginsäure	Asp	D
Asparagin	Asn	N
Glutaminsäure	Glu	E
Glutamin	Gln	Q
Lysin	Lys	K
Arginin	Arg	R

9 Posterpräsentationen

Jahrestagung der Österreichischen und Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft 2011 (ÖPhG und DPhG), Innsbruck (Österreich): Vogel L, Kaufel D, Janßen N, Mohr-Andrä M, Mohr K (2011) Evidence for a differential role of the conserved tryptophan 7.35 in different subtypes of the muscarinic acetylcholine receptor.

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie 2012 (DGPT), Dresden (Deutschland): Vogel L, Kebig A, Janßen N, Mohr K (2012) Evidence for a differential role in muscarinic receptor activation of the conserved epitope tryptophan 7.35. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 385 (Supp 1): 100

Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft 2013 (DPhG), Freiburg (Deutschland): Vogel L, Schrage R, Mohr K (2013) Iperoxo displays superagonism on muscarinic M3 receptors.

10 Danksagung

Für die Chance, meine Promotionsarbeit in der pharmazeutischen Pharmakologie und Toxikologie der Universität Bonn anzufertigen, möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Klaus Mohr ganz herzlich bedanken.

Alle Mitarbeiter schufen eine hervorragende Arbeitsatmosphäre und ermöglichten mir faszinierende Einblicke in das Feld der muskarinischen Acetylcholinrezeptoren.

Herrn Prof. Dr. Kurt Racké, Frau Prof. Dr. Evi Kostenis und Herrn Prof. Dr. Dieter Fürst danke ich besonders herzlich für die Mitwirkung in der Prüfungskommission.

Herrn PD Dr. rer. nat. Christian Tränkle danke ich für jegliche Hilfe mit verzwickten Datenanalysen, Mechthild Kepe und Iris Jusen für alle Unterstützung im Labor. Im Besonderen möchte ich mich bei Barbara Mazurkewitz bedanken, nicht nur für Ihre Hilfe in Verwaltungsdingen, sondern auch für Ihr offenes Ohr und das Mitfiebern während der gesamten Zeit.

Allen aktuellen und ehemaligen Post-Docs und Doktoranden sei auf diesem Wege für Ihre großartige Unterstützung und Hilfe in allen Belangen, Ihre guten Ratschläge und Ihre Freundschaft gedankt: Marion, Jasmin, Dorina, Nicole, Wiebke, Ramona, Andreas, Justine, Brian, Anna, Janine, Fabian, Theresa und Paul.

Das gesamte Team der Syring-Apotheke Im Markt in Köln hat mich mit liebevollem Interesse durch meine Promotionszeit begleitet und mir ermöglicht, den Bezug zur pharmazeutischen Praxis aufrechtzuerhalten, wofür ich mich bei Frau Gisela Syring und allen Kolleginnen und Kollegen ganz herzlich bedanken möchte.

Carina und Gisela haben mich durch Dick und mehr noch durch Dünn begleitet. Ihre Begeisterung und Ihre Freundschaft haben mich zu jeder Zeit ermutigt weiterzumachen.

Für Rat und Tat, Halt und Hilfe danke ich Ralf, der mich bestärkt hat, mein Bestes zu geben.

Ich danke meinem Vater Kurt und meiner Mutter Lisa für Ihre uneingeschränkte Liebe und Ihr selbstverständliches Vertrauen. Ihr habt mich auf den richtigen Weg gebracht.

Meine Familie hat mich durch diese Zeit getragen. Meinen klugen Tanten Ollo und Hilde danke ich für jeden Rat, Ihre Anteilnahme und die Ermutigung, meinen Weg zu gehen.

Meine beste Freundin, meine wichtigste Ratgeberin und mein größtes Vorbild ist meine Schwester Anna. Für Ihre bedingungslose Liebe und all Ihre Hilfe gilt Ihr mein größter Dank.