

**Heterogenität humaner 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren:  
Pharmakologische Charakterisierung homopentamerer  
5-HT<sub>3A</sub>-, heteromerer 5-HT<sub>3A/B(C,D,E)</sub>-Rezeptoren und  
natürlich vorkommender 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorvarianten**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)  
der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von  
Jutta Walstab  
aus Jena

Bonn, Januar 2009



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

1. Gutachter (Betreuer):	Prof. Dr. rer. nat. H. Bönisch
2. Gutachter:	Prof. Dr. med. K. Mohr
Fachnahes Mitglied:	Prof. Dr. rer. nat. G. Bendas
Fachangrenzendes Mitglied:	Prof. Dr. rer. nat. H. Häberlein

Tag der Promotion: 07.04.2009

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn  
[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr 2009



***Für meine Familie  
und Michael***



## Abkürzungen und Symbole

A	Absorption (Extinktion)
A	Adenin, Ampère
ACh	Acetylcholin
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
AS	Aminosäure
BBS	<i>BES Buffered Saline</i>
BES	N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-amino-ethansulfonsäure
BGH	<i>Bovine Growth Hormone</i>
$\alpha$ -Bgt	$\alpha$ -Bungarotoxin
B <sub>max</sub>	maximale Bindung
Bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum-Albumin
C	Cytosin
CB	Cannabinoid-(Rezeptor)
cDNA	<i>complementary DNA</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
Ci	Curie
CINV	<i>Chemotherapy-induced Nausea and Vomiting</i>
CMV	Cytomegalievirus
CRET	Chemilumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer
Da	Dalton
DHS	<i>Donor Horse Serum</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
dpm	<i>desintegrations per minute</i>
E. coli	Escherichia coli

EC <sub>50</sub>	<i>Effective Concentration 50 %</i>
ECFP	<i>Enhanced Cyan Fluorescent Protein</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>Enhanced GFP</i>
E <sub>max</sub>	Maximaleffekt
ER	endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol (absolut)
EYFP	<i>Enhanced Yellow Fluorescent Protein</i>
FIAsh	<i>Fluorescein Arsenical Hairpin Binder</i>
FLIPR	<i>Fluorescent Imaging Plate Reader</i>
g	Gramm, <i>Gravity</i>
G	Guanin
GABA	γ-Aminobuttersäure
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
GI	Gastrointestinal(trakt)
G-Protein	Guanylnukleotid-bindendes Protein
[ <sup>3</sup> H]	Tritium
h	human, <i>hour</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
IC <sub>50</sub>	<i>Inhibitory Concentration 50 %</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IZD	intrazelluläre Domäne
kb	Kilobasenpaar
K <sub>D</sub>	Gleichgewichtskonstante der Dissoziation
LacZ	Gen für die β-Galaktosidase
m/V	Masse pro Volumen
mCPBG	m-Chlorophenylbiguanid, 1-(3-Chloro-phenyl)biguanid
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
nACh	nikotinische Acetylcholin(rezeptoren)
n <sub>H</sub>	Hill-Koeffizient



PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
Pfu	Pyrococcus furiosus
PKC	Proteinkinase C
PNS	peripheres Nervensystem
P/S	Penicillin/Streptomycin
RIC	<i>Resistant to Inhibitors of Cholinesterase</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RNAse	Ribonuklease
RLU	<i>Relative Light Unit</i>
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde
SAP	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
spezif.	spezifisch
ss-DNA	<i>salmon sperm DNA</i>
SV40	<i>Simian Virus 40</i>
t <sub>0-100%</sub>	Zeitdifferenz zw. 5-HT-Autoinjektion und Peakmaximum im Aequorin-Assay
T	Thymin
Taq	Thermophilus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TM(s)	Transmembrandomäne(n)
Tris	2-Amino-2-(Hydroxymethyl)-1,3- propandiol
U	<i>Unit</i>
UV	ultraviolett
V	Volt
V/V	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D- galacto-pyranosid
XIA	X-Gal, IPTG, Ampicillin
ZNS	zentrales Nervensystem

## **Aminosäuren**

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Valin	Val	V
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y

<b>A. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1. Serotonin .....	1
1.1 Vorkommen und Physiologie .....	1
1.2 Synthese und Metabolismus.....	1
1.3 Serotoninrezeptoren .....	2
2. Der 5-HT <sub>3</sub> -Rezeptor .....	3
2.1 Pharmakologie und Physiologie .....	3
2.1.1 Vorkommen.....	3
2.1.2 5-HT <sub>3</sub> -Rezeptoragonisten .....	4
2.1.3 5-HT <sub>3</sub> -Rezeptorantagonisten .....	4
2.1.4 5-HT <sub>3</sub> -Rezeptormodulatoren .....	6
2.2 Struktur-Funktionsbeziehung.....	6
2.2.1 Aufbau.....	6
2.2.2 Ligandbindung.....	7
2.2.3 Kanal- <i>Gating</i> .....	8
2.2.4 Determinanten der Ionenleitfähigkeit .....	8
2.2.5 Regulationsmechanismen.....	9
2.3 Heterogenität der 5-HT <sub>3</sub> -Rezeptoren .....	10
2.3.1 5-HT <sub>3</sub> -Rezeptoruntereinheiten und Spleißisoformen .....	10
2.3.2 Natürlich vorkommende Varianten humaner 5-HT <sub>3</sub> -Untereinheiten.....	12
3. Das Chaperon RIC-3 .....	14
4. Der nACh $\alpha$ 7-Rezeptor und chimäre nACh $\alpha$ 7-5-HT <sub>3A</sub> -Rezeptoren .....	16
5. Zielsetzung der Arbeit.....	18
5.1 Etablierung eines Aequorin-Ca <sup>2+</sup> -Influx-Assays.....	18
5.2 Konstruktion fluoreszenzmarkierter 5-HT <sub>3A</sub> -Rezeptoruntereinheiten.....	18
5.3 Pharmakologische Charakterisierung der 5-HT <sub>3A,B,C,D,E</sub> -Rezeptor- untereinheiten und natürlich vorkommender Varianten dieser .....	18
5.4 Untersuchung des Einflusses von RIC-3 auf die Expression und Funktion von 5-HT <sub>3</sub> -Rezeptoren.....	19
5.5 Generierung chimärer 5-HT <sub>3A</sub> -nACh $\alpha$ 7-Konstrukte zur Lokalisierung der allosterischen Cannabinoidbindungsstelle am 5-HT <sub>3A</sub> -Rezeptor .....	19

<b>B. Material und Methoden</b> .....	<b>20</b>
1. Material.....	20
1.1 Geräte.....	20
1.2 Ge- und Verbrauchsmaterial .....	21
1.3 Labor-Kits.....	22
1.4 Chemikalien und Substanzen.....	22
1.5 Radiochemikalien .....	24
1.6 Strukturformeln eingesetzter Rezeptorliganden .....	25
1.6.1 5-HT <sub>3</sub> -Rezeptoragonisten .....	25
1.6.2 5-HT <sub>3</sub> -Rezeptorantagonisten .....	25
1.6.3 Allosterischer 5-HT <sub>3</sub> -Rezeptorantagonist.....	26
1.6.4 NACH-Rezeptoragonisten.....	26
1.7 Lösungen und Puffer .....	27
1.7.1 Zellkultur .....	27
1.7.2 Molekularbiologie.....	27
1.7.3 Biochemie .....	28
1.7.4 Pharmakologische Versuche .....	29
1.7.5 Stammlösungen von Rezeptorliganden.....	29
1.8 Nährmedien, Zelllinien und Bakterienstämme.....	30
1.8.1 Nährmedien für die Bakterienkultur .....	30
1.8.2 Nährmedien für die Zellkultur.....	30
1.8.3 Zelllinien.....	30
1.8.4 Bakterienstämme.....	32
1.9 Vektoren.....	32
1.10 Enzyme.....	33
1.11 Nukleinsäuren, Größenmarker .....	33
1.12 Computersoftware und Datenbanken.....	33
2. Methoden .....	33
2.1 Methoden der Zellkultur.....	33
2.1.1 Kultivierung und Passagierung von Säugerzellen .....	33
2.1.2 Kryokonservierung von Zellen .....	34
2.1.3 Bestimmung der Zellzahl .....	34
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	35

---

2.2.1 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA .....	35
2.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	36
2.2.3 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese von DNA.....	37
2.2.4 Isolierung von DNA aus Agarosegelen .....	37
2.2.5 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	37
2.2.6 Gerichtete Mutagenese.....	40
2.2.7 Klonierungstechniken.....	41
2.2.8 DNA-Sequenzierung .....	43
2.2.9 Konstruktion rekombinanter DNA-Moleküle .....	44
2.2.10 Isolierung von RNA aus Säugerzellen .....	47
2.2.11 Reverse Transkription (RT).....	48
2.2.12 Transfektion von Säugerzelllinien .....	48
2.3 Biochemische Methoden .....	50
2.3.1 Membranpräparation.....	50
2.3.2 Proteinbestimmung nach Lowry.....	50
2.4 Pharmakologische Methoden .....	51
2.4.1 Radioligandbindungsstudien .....	51
2.4.2 Aequorin-Assays .....	55
2.4.3 Patch-Clamp-Messungen.....	60
2.4.4 Statistische Auswertung.....	61
<b>C. Ergebnisse .....</b>	<b>62</b>
1. Etablierung eines Aequorin-Ca <sup>2+</sup> -Influx-Assays für die funktionelle Charakterisierung rekombinanter 5-HT <sub>3</sub> -Rezeptoren .....	62
1.1 Prinzip des Aequorin-Assays.....	62
1.2 Optimierung der Transfektion und der Inkubation mit Coelenterazin- <i>h</i> .....	65
1.3 Konzentrations-Wirkungsbeziehungen von 5-HT <sub>3</sub> -Rezeptorliganden am 5- HT <sub>3A</sub> -Rezeptor .....	67
1.4 Vergleich des Aequorin-Assays mit dem modifizierten Ca <sup>2+</sup> -Assay unter Einsatz des Aequorin-EGFP-Fusionsproteins (CRET-Assay) .....	68
1.4.1 Sensitivität und Signalstärke .....	68
1.4.2 Konzentrations-Wirkungsbeziehung von Dopamin am 5-HT <sub>3A</sub> -Rezeptor.....	69
2. Untersuchung homopentamerer 5-HT <sub>3A</sub> -Rezeptoren .....	70
2.1 Einfluss von Lachsspermien-DNA auf die Expression des 5-HT <sub>3A</sub> -Rezeptors in HEK293-Zellen .....	70

## Einleitung

---

2.2 Generierung und Testung fluoreszenzmarkierter 5-HT <sub>3A</sub> -Untereinheiten .....	71
2.2.1 Generierung der fluoreszenzmarkierten 5-HT <sub>3A</sub> -Konstrukte .....	72
2.2.2 Radioligandbindungsstudien.....	72
2.2.3 Funktionelle Charakterisierung durch Ca <sup>2+</sup> -Influxmessungen .....	74
2.3 Pharmakologische und elektrophysiologische Charakterisierung der natürlich vorkommenden R344H-Variante des 5-HT <sub>3A</sub> -Rezeptors.....	75
2.3.1 Radioligandbindungsstudien.....	75
2.3.2 Funktionelle Untersuchung durch Ca <sup>2+</sup> -Influxmessungen .....	77
2.3.3 Elektrophysiologische Analysen .....	78
2.4 Pharmakologische Charakterisierung der natürlich vorkommenden A33T-Variante des 5-HT <sub>3A</sub> -Rezeptors.....	82
3. Untersuchung heteromerer 5-HT <sub>3A/B,(C,D,E)</sub> -Rezeptoren .....	82
3.1 Pharmakologische Charakterisierung heteromerer 5-HT <sub>3A/B</sub> -Rezeptoren .....	82
3.1.1 Radioligandbindungsstudien.....	82
3.1.2 Funktionelle Charakterisierung durch Ca <sup>2+</sup> -Influxmessungen .....	83
3.2 Pharmakologische Charakterisierung natürlich vorkommender Varianten der 5-HT <sub>3B</sub> -Untereinheit .....	87
3.2.1 Radioligandbindungsstudien.....	88
3.2.2 Funktionelle Charakterisierung durch Ca <sup>2+</sup> -Influxmessungen .....	89
3.3 Analyse der Bindungseigenschaften der 5-HT <sub>3C,D,E,Ea</sub> -Untereinheiten .....	93
3.3.1 Optimierung der Bindungsversuche .....	93
3.3.2 Generierung einer bindungsdefizienten 5-HT <sub>3A</sub> -Untereinheit .....	94
3.3.3 Radioligandbindungsstudien.....	95
3.4 Pharmakologische Charakterisierung der Spleißvariante 5-HT <sub>3Ea</sub> und der beiden Varianten 5-HT <sub>3E(Ea)</sub> 86T bzw. 5-HT <sub>3E(Ea)</sub> 86A (T86A-Polymorphismus) .....	96
3.4.1 Radioligandbindungsstudien.....	96
3.4.2 Funktionelle Charakterisierung durch Ca <sup>2+</sup> -Influxmessungen .....	98
3.5 Pharmakologische Charakterisierung der beiden Varianten 163K und 163N der 5-HT <sub>3C</sub> -Untereinheit (N163K-Polymorphismus).....	105
3.5.1 Radioligandbindungsstudien.....	105
3.5.2 5-HT-induzierter Ca <sup>2+</sup> -Influx.....	106
3.5.3 Verhältnis E <sub>max</sub> / B <sub>max</sub> .....	108
3.5.4 Inhibition des 5-HT-induzierten Ca <sup>2+</sup> -Influx durch 5-HT <sub>3</sub> -Rezeptorantagonisten.....	108
4. Einfluss von RIC-3 auf die Expression und Funktion von 5-HT <sub>3</sub> -Rezeptoren .....	109

## Einleitung

---

4.1 Klonierung der humanen RIC-3-cDNA .....	110
4.2 Einfluss von RIC-3 auf den 5-HT-induzierten $Ca^{2+}$ -Influx .....	110
4.2.1 Konzentrations-Wirkungsbeziehung von 5-HT am homopentameren 5-HT <sub>3A</sub> -Rezeptor .....	110
4.2.2 Einfluss von RIC-3 auf den 5-HT-induzierten Maximaleffekt .....	111
4.3 Einfluss von RIC-3 auf die Expression von 5-HT <sub>3</sub> -Rezeptoren.....	113
5. Untersuchung heterolog exprimierter humaner nACh $\alpha$ 7-Rezeptoren und chimärer 5-HT <sub>3A</sub> -nACh $\alpha$ 7-Rezeptoren.....	116
5.1 Versuche zur funktionellen Expression humaner nACh $\alpha$ 7-Rezeptoren .....	116
5.1.1 Expression in HEK293-Zellen .....	116
5.1.2 Expression in CHO-K1-, BOSC23-, SH-EP1- und GH4-C1-Zellen .....	117
5.1.3 Konstruktion und Expression einer „Gain-of-function“-Mutante .....	119
5.1.4 Koexpression des nACh $\alpha$ 7-Rezeptors mit dem Chaperon RIC-3.....	119
5.2 Kontrolle der Expression des humanen nACh $\alpha$ 7-Rezeptors .....	119
5.2.1 Expression auf RNA-Ebene .....	119
5.2.2 Expression auf Proteinebene (Radioligandbindung).....	121
5.3 Konstruktion und Expression chimärer 5-HT <sub>3A</sub> -nACh $\alpha$ 7-Rezeptoren .....	123
<b>D. Diskussion.....</b>	<b>125</b>
1. Etablierung eines Aequorin- $Ca^{2+}$ -Influx-Assays für die funktionelle Charakterisierung von 5-HT <sub>3</sub> -Rezeptoren.....	125
2. Generierung und Testung fluoreszenzmarkierter 5-HT <sub>3A</sub> -Untereinheiten .....	129
3. Heterogenität der 5-HT <sub>3</sub> -Rezeptoren – Charakterisierung heteromerer 5-HT <sub>3</sub> -Rezeptoren und natürlich vorkommender Varianten einzelner 5-HT <sub>3</sub> -Untereinheiten.....	132
3.1 Pharmakologische Eigenschaften transient transfizierter HEK293-Zellen, welche 5-HT <sub>3A</sub> - und jeweils eine der 5-HT <sub>3C,(D,E,Ea)</sub> -Untereinheiten koexprimieren .....	132
3.2 Pharmakologische Eigenschaften transient transfizierter HEK293-Zellen, welche 5-HT <sub>3A</sub> - und 5-HT <sub>3B</sub> -Untereinheiten koexprimieren.....	135
3.3 Charakterisierung natürlich vorkommender Varianten einzelner 5-HT <sub>3</sub> -Untereinheiten und einer Spleißvariante .....	138
3.3.1 Eigenschaften der A33T- und R344H-Variante des homopentameren 5-HT <sub>3A</sub> -Rezeptors .....	138
3.3.2 Einfluss der Spleißisoform 5-HT <sub>3Ea</sub> und natürlich vorkommender Varianten der 5-HT <sub>3B,C,E(Ea)</sub> -Untereinheiten auf die Eigenschaften heteromerer 5-HT <sub>3A/X</sub> -Rezeptoren .....	142

4. Einfluss des Chaperons RIC-3 auf Expression und Funktion von 5-HT <sub>3</sub> -Rezeptoren.....	151
5. Versuche zur funktionellen Expression des humanen nACh $\alpha$ 7-Rezeptors und chimärer 5-HT <sub>3A</sub> -nACh $\alpha$ 7-Konstrukte in Säugerzelllinien.....	155
5.1 Der nACh $\alpha$ 7-Rezeptor.....	155
5.2 Chimäre 5-HT <sub>3A</sub> -nACh $\alpha$ 7-Rezeptoren.....	158
<b>E. Zusammenfassung .....</b>	<b>161</b>
<b>F. Anhang.....</b>	<b>164</b>
1. Verwendete cDNAs .....	164
2. Alignments.....	165
2.1 Vergleich der Proteinsequenzen humaner 5-HT <sub>3</sub> -Untereinheiten .....	165
2.2 Vergleich der Proteinsequenzen der humanen 5-HT <sub>3A</sub> - und nACh $\alpha$ 7-Untereinheiten.....	166
<b>G. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>167</b>
1. Referenzen.....	167
2. Eigene Veröffentlichungen während der Doktorarbeit.....	186
2.1 Originalarbeiten .....	186
2.2 Kongressbeiträge .....	187
<b>Danksagung.....</b>	<b>189</b>



### **A. Einleitung**

#### **1. Serotonin**

##### **1.1 Vorkommen und Physiologie**

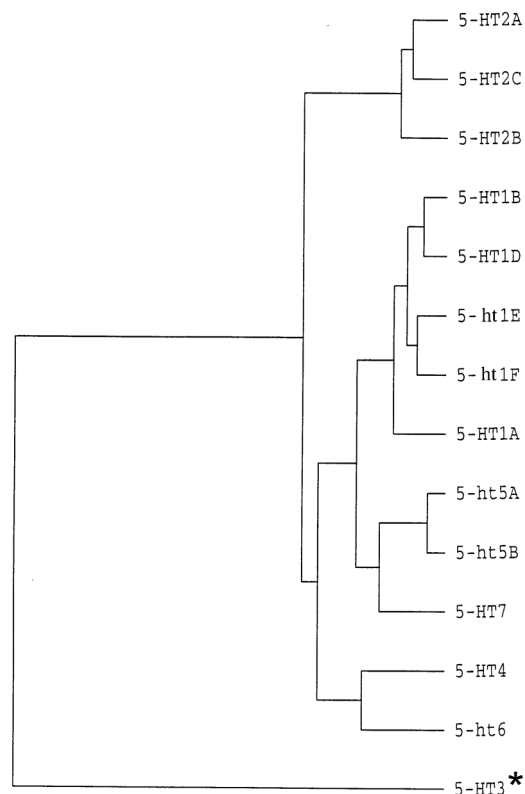
Serotonin (5-HT, 5-Hydroxytryptamin) wurde erstmals 1948 aus Rinderblutserum isoliert und nach seiner Herkunft und der vasokonstriktorischen Wirkung als solches benannt (Rapport et al., 1948). Der überwiegende Teil des im Körper vorkommenden Serotonins (ca. 90 %) wird extraneuronal in den enterochromaffinen Zellen der Darmmukosa und in Thrombozyten, welche dieses bei der Passage der intestinalen Blutgefäße aufnehmen, gespeichert. Der restliche Anteil des Serotonins dient im Gehirn und im Gastrointestinal (GI)-Trakt als Neurotransmitter serotoninerger Neurone. Die Zellkörper zentraler serotoninerger Neurone sind überwiegend in den Nuclei raphe des Hirnstammes lokalisiert und deren Axone projizieren in fast alle Bereiche des Gehirns und ins Rückenmark. Demzufolge ist Serotonin an der Steuerung verschiedenster physiologischer Vorgänge wie z.B. Blutdruckregulation, Schlaf-wach-Rhythmus, Schmerzwahrnehmung und Nahrungsaufnahme beteiligt. Serotoninerge Neurone des enterischen Nervensystems sind in die Steuerung gastrointestinaler Funktionen involviert. Die physiologischen Wirkungen von Serotonin sind sehr komplex, da sich beispielsweise seine direkt vasokonstriktorischen und die indirekt vasodilatatorischen Eigenschaften zum Teil funktionell antagonistisch auf das Herz-Kreislauf-System auswirken können.

##### **1.2 Synthese und Metabolismus**

Serotonin wird aus der Aminosäure Tryptophan synthetisiert und in intrazellulären Vesikeln von serotoninergen Neuronen gespeichert. Bei Depolarisation der Neurone erfolgt die exozytotische Freisetzung des Neurotransmitters in den synaptischen Spalt, worauf dessen Wirkung rasch durch die Wiederaufnahme über den Serotonintransporter der Plasmamembran in das Neuron terminiert wird. Darauf folgt entweder die erneute vesikuläre Speicherung, oder es wird der Abbau des Neurotransmitters durch die mitochondriale Monoaminoxidase über eine oxidative Desaminierung eingeleitet.

### 1.3 Serotoninrezeptoren

Serotonin kann als einer der ältesten Neurotransmitter angesehen werden, was die Interaktion mit diversen 5-HT-Rezeptoren zur Folge hat (Hannon und Hoyer, 2008). Die Unterteilung in Rezeptorfamilien begann in den 1950er Jahren durch Gaddum und Piccarelli (1957), welche die 5-HT-Rezeptoren basierend auf ihrer Hemmbarkeit durch Dibenzylin bzw. Morphin in D- und M-Rezeptoren einteilten. Heute sind mindestens 18 verschiedene Rezeptorproteine bekannt, die anhand ihrer Struktur und Pharmakologie in sieben Hauptklassen eingeteilt werden (5-HT<sub>1-7</sub>) (Hoyer et al., 1994) (Abbildung 1). Der damals klassifizierte D-Subtyp entspricht dem heutigen 5-HT<sub>2A</sub>- und der M-Subtyp dem 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor. Der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor bildet innerhalb der Gruppe der 5-HT-Rezeptoren eine Ausnahme, da er im Gegensatz zu den anderen, welche zur Superfamilie der G-Proteingekoppelten Rezeptoren zählen, ein ligandgesteuerter Ionenkanal ist (Derkach et al., 1989).



**Abbildung 1: Dendrogramm der evolutionären Beziehung der verschiedenen 5-HT-Rezeptorsubtypen untereinander (aus Barnes und Sharp, 1999)**

\*Es sind nun auch fünf verschiedene 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoruntereinheiten (A - E) bekannt (A.2.3.1).

## 2. Der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor

### 2.1 Pharmakologie und Physiologie

#### 2.1.1 Vorkommen

5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren werden sowohl neuronal im zentralen und peripheren Nervensystem (ZNS, PNS) als auch auf nichtneuronalen Zellen des Immunsystems exprimiert (Chameau und van Hooft, 2006; Thompson und Lummis, 2006; Fiebich et al., 2004).

Im PNS sind 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren auf prä- und postganglionären autonomen Neuronen und Neuronen des sensorischen und enterischen Nervensystems lokalisiert (Hannon und Hoyer, 2008). Sie spielen demnach eine Rolle bei der Regulation autonomer Funktionen und der sensorischen Transmission. Beispielsweise sind sie im GI-Trakt an der Regulation der Darmmotilität und -peristaltik beteiligt (Galligan, 2002) und 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren sensorischer Neurone sind in den Prozess der Nozizeption involviert (Zeitzi et al., 2002).

Im ZNS befindet sich die höchste Dichte an 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren im dorsalen-vagalen Komplex des Hirnstammes. Diese Region beinhaltet den Nucleus tractus solitarii, die Area postrema und den dorsalen-vagalen Motornucleus, welche die Initiation und Koordination des Brechreflexes steuern (Pratt et al., 1990; Doucet et al., 2000). Im Vorderhirn ist die Expression im Vergleich zum dorsalen-vagalen Komplex gering. Hohe Expressionsdichten des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors in diesem Bereich finden sich z.B. im Hippocampus, der Amygdala oder dem Striatum (Tecott et al., 1993; Spier et al., 1999; Miquel et al., 2002), wobei es interspezies-Unterschiede im Ausmaß der Rezeptorexpression in den Vorderhirnregionen gibt.

Die 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren im ZNS sind vorwiegend präsynaptisch lokalisiert und modulieren die Freisetzung von Neurotransmittern wie z.B.  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) (Turner et al., 2004), Dopamin (Liu et al., 2006), Glutamat (Funahashi et al., 2004), 5-HT (Martin et al., 1992) und dem Neuropeptid Cholezystokinin (Paudice und Raiteri, 1991). Postsynaptische 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren sind in verschiedenen Hirnregionen wie beispielsweise dem Hippocampus zu finden, wo sie hauptsächlich auf GABAergen Interneuronen lokalisiert sind und die neuronale Erregbarkeit durch eine schnelle synaptische Transmission kontrollieren können (Roerig et al., 1997; Miquel et al., 2002; Ferezou et al., 2002).

### **2.1.2 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoragonisten**

Die Bindung von Agonisten wie dem endogenen Neurotransmitter 5-HT an den 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor führt nach Öffnung des integralen Rezeptorkanals zum schnellen Kationeneinstrom, welcher eine Depolarisation auslöst (Wallis und North, 1978; Azami et al., 1985; Derkach et al., 1989). Als einer der ersten selektiven 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoragonisten wurde m-Chlorophenylbiguanid (mCPBG) entwickelt, das z.T. partialagonistische Aktivität am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor zeigt (Kilpatrick et al., 1990; Sepulveda et al., 1991). 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoragonisten spielen therapeutisch keine Rolle, sie finden lediglich Anwendung als pharmakologische Werkzeuge.

### **2.1.3 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten**

Eine große therapeutische Bedeutung besitzen demgegenüber die selektiven 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten, die als Antiemetika zur Behandlung Chemo- bzw. Strahlentherapie-induzierter Emesis (CINV) und postoperativer Emesis (PONV) eingesetzt werden. Tropi-, Ondan-, Grani-, Dola-, Palono-, Aza- und Ramosetron sind die für diese Indikation zugelassenen Substanzen, wobei die beiden letztgenannten nur im asiatischen Raum Einsatz finden. Alosetron ist in den USA zur Therapie des Reizdarmsyndroms zugelassen. Die genannten Substanzen, die als Setrone bezeichnet werden, zeigen allerdings neben der Inhibition des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors im gleichen Konzentrationsbereich eine Wirkung an anderen Rezeptoren. Beispielsweise weist Tropisetron am nikotinischen Acetylcholin (nACh) $\alpha$ 7-Rezeptor eine partialagonistische Aktivität auf und Ondansetron ist ein Antagonist am genannten Rezeptor (Macor et al., 2001; Papke et al., 2005). Des Weiteren sind z.B. für Ondan-, Aza- und Tropisetron in höheren Konzentrationen antagonistische Effekte an GABA<sub>A</sub>- und 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren nachgewiesen worden (Israili, 2001).

Die physiologische Bedeutung des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors bei Emesis und gastrointestinalen Störungen, die zum therapeutischen Einsatz der Setrone geführt hat, wird im Folgenden erläutert:

#### **2.1.3.1 Rolle des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors bei CINV und PONV**

Die durch Chemo- oder Strahlentherapie gebildeten toxischen freien Radikale in der Darmwand führen zu einer massiven 5-HT-Ausschüttung aus den enterochromaffinen Zellen (Cubeddu et al., 1990; Castejon et al., 1999; Lindley und Blower, 2000). Die 5-HT-Stimulation der peripheren 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren vagaler

Afferenzen (Minami et al., 2003) löst anschließend den Brechreflex durch eine Kommunikation mit dem Brechzentrum über den Nucleus tractus solitarii im Hirnstamm aus. Im ZNS kommt es durch lokale 5-HT-Freisetzung zur Stimulation der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren in der Chemorezeptor-Triggerzone in der Area postrema, welche in direktem Kontakt mit dem Blut steht und darin gelöste Giftstoffe erkennt. Das Signal wird an Teile des Brechzentrums in der Medulla oblongata weitergeleitet (Thompson und Lummis, 2007). Demnach wirken die selektiven 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten durch die Inhibition peripherer und zentraler 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren vor allem in der akuten Phase des CINV effektiv antiemetisch. Die Pathophysiologie des PONV ist nicht genau geklärt. Einerseits können Anästhetika oder Opioide die Chemorezeptor-Triggerzone in der Area postrema aktivieren, andererseits werden durch chirurgische Eingriffe z.B. im GI-Trakt afferente Nerven aktiviert, die ihr Signal ins Brechzentrum weiterleiten (Wurglics und Spiegl, 2007).

### **2.1.3.2 Rolle des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors beim Reizdarmsyndrom**

Durch die 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorblockade im GI-Trakt werden viszerale sensorische Afferenzen gehemmt, es kommt zu einer gesteigerten Flüssigkeits- und Elektrolyt-resorption und einer Verlangsamung der Darmpassage (Gunput, 1999). Des Weiteren werden abdominale Schmerzen reduziert, wobei hier eine Blockade zentraler 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren als Ursache diskutiert wird (Mayer et al., 2002). Alosetron ist zurzeit der einzige 5-HT<sub>3</sub>-Antagonist, der zur Therapie eines Diarrhö-dominanten Reizdarmsyndroms zugelassen ist. Aufgrund vermehrter Komplikationen in Form von schwerer Obstipation und ischämischer Kolitis, teilweise mit Todesfolge, wurde die Zulassung im Jahr 2000 ausgesetzt und 2002 aber mit größeren Anwendungseinschränkungen wieder erteilt (Tack et al., 2006). Demgegenüber wurde für Cilansetron, welches für die gleiche Indikation vorgesehen war, die Zulassung durch die Food and Drug Administration (FDA) aufgrund ähnlicher Nebenwirkungen im Jahr 2005 zunächst abgelehnt (Cilansetron 2005).

Neben den beschriebenen physiologischen Funktionen wird eine Beteiligung des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors an der Entstehung verschiedener psychiatrischer Erkrankungen diskutiert. So zeigen 5-HT<sub>3</sub>-Antagonisten anxiolytische Effekte (Barnes et al., 1992) und die Substanzen Ondansetron und Tropisetron besitzen antipsychotische Eigenschaften (Adler et al., 2005; Koike et al., 2005). Nachgewiesen wurde des

Weiteren die Involvierung des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors bei Vorgängen wie Schmerzweiterleitung und Entzündung (Fiebich et al., 2004), was die Wirksamkeit von 5-HT<sub>3</sub>-Antagonisten bei Fibromyalgie erklärt (Späth et al., 2004).

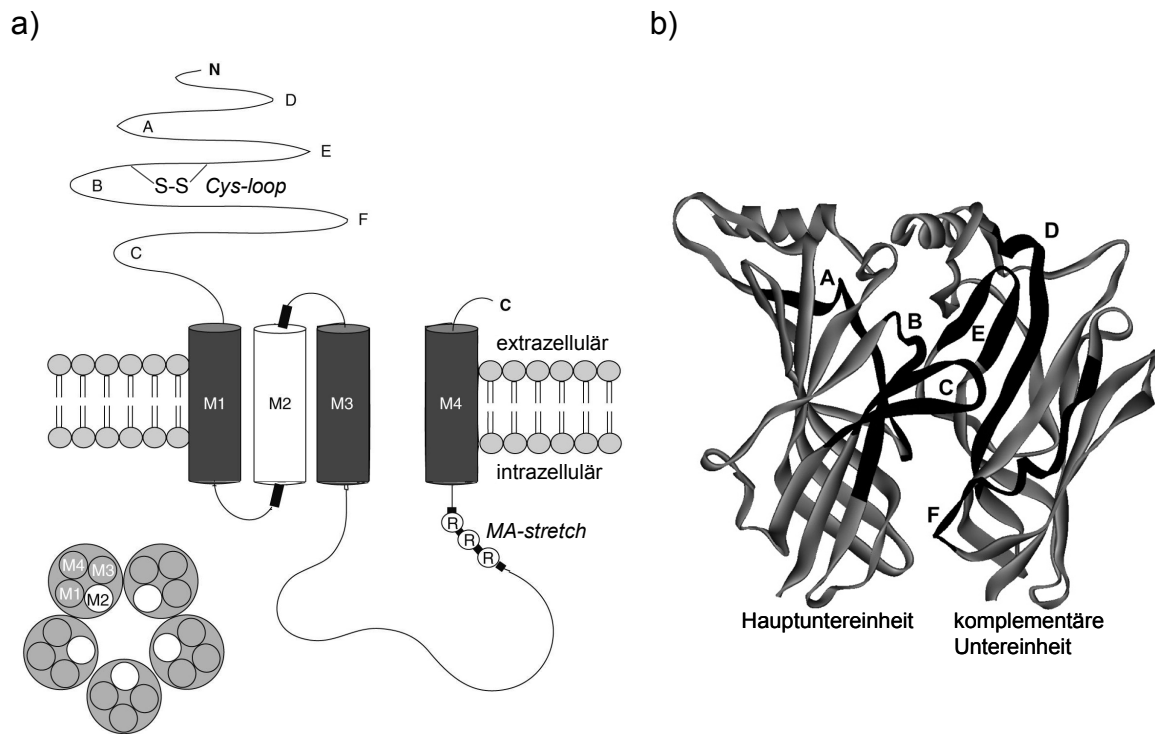
### 2.1.4 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptormodulatoren

Neben orthosterischen 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorliganden ist eine Reihe anderer Substanzen bekannt, welche modulierend auf den 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor wirken. So wurde beispielsweise für Anästhetika wie Propofol und Ketamin (Barann et al., 1993; Barann et al., 2000a), Cannabinoide (Fan, 1995; Barann et al., 2002), Steroide (Wetzel et al., 1998; Barann et al., 1999) und Antidepressiva (Eisensamer et al., 2003; Choi et al., 2003) eine nichtkompetitive Hemmung des Rezeptors nachgewiesen, währenddessen für kurzkettige Alkohole eine Verstärkung des Agonist-induzierten Effekts gezeigt werden konnte (Barann et al., 1995; Lovinger, 1999).

## 2.2 Struktur-Funktionsbeziehung

### 2.2.1 Aufbau

Der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor ist ein Mitglied der Superfamilie *Cys-loop*-ligandgesteuerter Ionenkanäle, zu welcher auch nACh-, Glycin-, GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren und ein Zn<sup>2+</sup>-aktivierter Kationenkanal gehören (Connolly und Wafford, 2004; Lester et al., 2004; Davies et al., 2003). Der Rezeptor besteht aus fünf Untereinheiten, welche konzentrisch um eine zentrale, für Kationen (Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>) permeable, wassergefüllte Pore angeordnet sind (Boess et al., 1995; Green et al., 1995; Barrera et al., 2005). Eine Rezeptoruntereinheit besteht aus einem großen extrazellulären N-terminalen Bereich, dessen Struktur vornehmlich einem  $\beta$ -Faltblatt entspricht, vier Transmembrandomänen (TMs), die vorwiegend  $\alpha$ -helikal sind (Miyazawa et al., 2003; Panicker et al., 2002) und einem kurzen extrazellulären C-Terminus. Charakteristisch sind des Weiteren die große intrazelluläre Domäne (IZD) zwischen TM3 und TM4 und eine Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinen im N-Terminus, welche der Superfamilie der *Cys-loop*-Rezeptoren ihren Namen gegeben hat (Mukerji et al., 1996; Spier et al., 1999; Unwin, 2005). Die TM2s der fünf Untereinheiten stehen in direktem Kontakt mit der zentralen Pore des Ionenkanals (Miyazawa et al., 2003). Das Modell eines pentameren Ionenkanals und einer Rezeptoruntereinheit ist in Abbildung 2a dargestellt.



**Abbildung 2: Struktur des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors**

**a)** Gezeigt ist die schematische Darstellung einer typischen *Cys-loop*-Rezeptoruntereinheit und die Anordnung der Untereinheiten im pentameren Rezeptor. Die Transmembrandomänen 2 (M2) begrenzen die Kanalpore. Im N-terminalen Bereich einer Untereinheit befinden sich sechs „Schleifen“ (A - F), welche die Ligandbindungsstelle bilden, und die für die Superfamilie charakteristische Cysteinschleife (*Cys-loop*). Dargestellt ist weiterhin die große intrazelluläre Domäne zwischen TM3 und TM4 mit dem  $\alpha$ -helikalen *Membrane associated (MA)-stretch*, welcher eine wesentliche Rolle bei der Ionenleitfähigkeit des Rezeptors spielt (nach Thompson und Lummis, 2007).

**b)** Dargestellt ist ein Homologiemodell der N-terminalen Domäne zweier benachbarter 5-HT<sub>3</sub>-Untereinheiten basierend auf der Kristallstruktur des ACh-Bindungsproteins. Die an der Ligandbindung beteiligten „Schleifen“ A - F sind schwarz hervorgehoben (aus Thompson et al., 2006).

### 2.2.2 Ligandbindung

Ein in Anlehnung an die Struktur des ACh-Bindungsproteins (Brejc et al., 2001) konstruiertes Homologiemodell des N-terminalen Bereichs des murinen 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors zeigt, dass die Bindungsstelle für orthosterische Liganden zwischen zwei benachbarten Untereinheiten liegt und durch die Annäherung dreier Schleifen (A - C) der „Hauptuntereinheit“ und dreier „Schleifen“ einer benachbarten „komplementären“ Untereinheit (D - F) gebildet wird (Reeves et al., 2003; Thompson et al., 2005), wobei allerdings die sogenannten „Schleifen“ D - F eine  $\beta$ -Faltblattstruktur ausbilden (Brejc et al., 2001) (Abbildung 2b). Im Rahmen

zahlreicher Studien wurden Schlüsselaminosäuren innerhalb dieser Schleifen identifiziert, welche wesentlich an der Ligandbindung beteiligt sind (Thompson und Lummis, 2006). Dabei zeigte sich, dass vor allem aromatischen Aminosäuren (AS) an der Ligand-Rezeptor-Interaktion beteiligt sind. Absolut essenziell ist beispielsweise das Tryptophan in Position 178 der 5-HT<sub>3A</sub>-Aminosäuresequenz, welches über eine Kationen- $\pi$ -Bindung mit dem primären Amin von 5-HT interagiert (Spier und Lummis, 2000; Beene et al., 2002).

Es wurde nachgewiesen, dass drei Agonistmoleküle für die Kanalöffnung des homopentameren 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors notwendig sind (Mott et al., 2001).

### 2.2.3 Kanal-Gating

Der Mechanismus des Kanal-Gatings ist nicht genau geklärt. Allerdings spielt ein beim nACh- und dem 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor konserviertes Prolin im extrazellulären Verbindungsstück zwischen TM2 und TM3 dabei eine zentrale Rolle. So wird postuliert, dass nach Agonistbindung eine Bewegung verschiedener Schleifen der Ligandbindungsdomäne und auch der *Cys-loop* hervorgerufen wird, was zu einer *Cis-Trans*-Isomerisierung des genannten Prolins führt. Die dadurch ausgelöste Reorientierung der TM2 resultiert schließlich in der Öffnung des Ionenkanals (Lummis et al., 2005).

### 2.2.4 Determinanten der Ionenleitfähigkeit

Der 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor besitzt die gleiche Permeabilität für mono- und divalente Kationen (Brown et al., 1998). Als wesentliche Determinanten für die Ionenselektivität und die Einzelkanalleitfähigkeit sind bestimmte vorwiegend negativ geladene AS innerhalb und angrenzend an TM2 anzusehen (Gunthorpe und Lummis, 2001; Peters et al., 2005). Einen zusätzlichen Einfluss auf die Ionenleitfähigkeit hat der sogenannte *MA (membrane associated)-stretch*, eine  $\alpha$ -helikale Struktur am Ende der IZD zwischen TM3 und TM4, was analog beim nACh-Rezeptor (Hales et al., 2006) und kürzlich beim Glycinrezeptor (Carland et al., 2008) nachgewiesen wurde. Die Erklärung dafür liefert die 4 Å-Struktur des nACh-Rezeptors (Unwin, 2005). Diese zeigt, dass das zytoplasmatische Reservoir, in welches der Ionenkanal mündet, fünf Portale zwischen angrenzenden Untereinheiten aufweist, die durch den  $\alpha$ -helikalen *MA-stretch* begrenzt werden und durch welche die Ionen ein- und austreten. Daraus ergibt sich auch die Ursache für die im Vergleich zum heteromeren 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptor geringe Einzelkanalleitfähigkeit des homopenta-



meren 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors im Subpicoiemensbereich (Brown et al., 1998; Mochizuki et al., 1999; Davies et al., 1999), da die positive Ladung dreier Arginine innerhalb des *MA-stretches* der 5-HT<sub>3A</sub>-Untereinheit die Kationenleitung behindert. Beim Austausch dieser Arginine gegen die entsprechenden AS der 5-HT<sub>3B</sub>-Untereinheit (R432Q, R436D, R440A) entsteht die 5-HT<sub>3A</sub> QDA-Mutante, welche eine ca. 30-fach größere Einzelkanalleitfähigkeit aufweist (Kelley et al., 2003).

### **2.2.5 Regulationsmechanismen**

Ein wesentlicher Inaktivierungsmechanismus ligandgesteuerter Ionenkanäle und damit auch des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors ist die Agonist-induzierte Desensibilisierung des Rezeptors. Wesentliche Determinanten, welche die Desensibilisierung beeinflussen, sind u.a. innerhalb TM1 und TM2 lokalisiert (Yakel et al., 1993; Lankiewicz et al., 1998; Gunthorpe et al., 2000).

Weiterhin wurde eine Internalisierung des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors nach Agonist-Interaktion beschrieben (Ilegems et al., 2004).

Bei den posttranslationalen Modifikationen des Rezeptorproteins spielt v.a. die N-Glykosylierung im extrazellulären N-Terminus eine wesentliche Rolle für die Rezeptorassembly und die Oberflächenexpression (Monk et al., 2004). Die Phosphorylierung durch Kinasen an Konsensussequenzen innerhalb der IZD zwischen TM3 und TM4 wurde zwar nachgewiesen, aber deren funktionelle Bedeutung ist nicht geklärt (Lankiewicz et al., 2000).

Wichtig für die Regulation der Rezeptorexpression sind Proteine mit Chaperonaktivität, die u.a. die korrekte Rezeptorfaltung und -assembly überwachen. Beispielsweise wurde nachgewiesen, dass Cyclophilin A die funktionelle Expression des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors fördert (Helekar und Patrick, 1997). Eine große Rolle in dieser Hinsicht spielt auch RIC-3, welches spezifisch die Maturation von nACh- und 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren beeinflusst (siehe A.3).

## **2.3 Heterogenität der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren**

### **2.3.1 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoruntereinheiten und Spleißisoformen**

#### **2.3.1.1 5-HT<sub>3A</sub>-Untereinheit**

Der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor wurde ursprünglich im PNS aufgrund seiner Sensitivität gegenüber Morphin als sogenannter M-Rezeptor identifiziert (Gaddum und Picarelli, 1957). Später erfolgte die Klassifizierung als 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor (Bradley et al., 1986). Die Erstklonierung der cDNA einer murinen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoruntereinheit aus einer Neuroblastom-Zelllinie gelang Maricq et al. (1991), welche die Expression funktioneller homomerer 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren nach heterologer Expression in *Xenopus*-Oozyten zeigten. Es folgten 1995 die Klonierungen der ersten humanen 5-HT<sub>3A</sub>-cDNA aus Amygdala und Hippocampus (Belelli et al., 1995; Miyake et al., 1995), welche für ein Protein mit einer Länge von 478 AS kodiert. Zwei Spleißvarianten der 5-HT<sub>3A</sub>-Untereinheit konnten aus humanem Gewebe isoliert werden. Dabei handelt es sich um eine stark verkürzte Isoform (5-HT<sub>3AT</sub>) und eine im Vergleich zur kanonischen 5-HT<sub>3A</sub>-Untereinheit verlängerte Variante (5-HT<sub>3AL</sub>), welche beide nach heterologer Expression in Säugerzellen nicht in der Lage waren, funktionelle homopentamere Rezeptoren auszubilden. Nach Koexpression dieser Spleißisoformen mit der kanonischen 5-HT<sub>3A</sub>-Untereinheit zeigte sich jedoch eine Veränderung im Ausmaß des Kationeninflux durch den 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal (Brüss et al., 2000).

#### **2.3.1.2 5-HT<sub>3B</sub>-Untereinheit**

Die Spleißvarianten allein konnten die beobachteten funktionellen Unterschiede zwischen nativen 5-HT<sub>3</sub>- und homomeren 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren jedoch nicht erklären, so dass lange über die Existenz weiterer 5-HT<sub>3</sub>-Untereinheiten spekuliert wurde (Fletcher und Barnes, 1998), bis 1999 die Klonierung der cDNA für die 5-HT<sub>3B</sub>-Untereinheit aus humanem Gewebe erfolgte, welche für ein 436 AS-umfassendes Protein kodiert (Davies et al., 1999; Dubin et al., 1999). Die Gene *HTR3A* und *HTR3B*, die für die beiden zu 41 % identischen Untereinheiten kodieren, sind wahrscheinlich durch Genduplikation entstanden, da sie in enger Nachbarschaft auf Chromosom 11q23 lokalisiert sind (Weiss et al., 1995; Davies et al., 1999). Die 5-HT<sub>3B</sub>-Untereinheit ist nach heterologer Expression nicht in der Lage, funktionelle homopentamere Rezeptoren auszubilden, da sie aufgrund eines ER-Retentionssignals nicht an die Zelloberfläche transportiert wird (siehe F.2.1)

(Boyd et al., 2003). Nach heterologer Koexpression der 5-HT<sub>3A</sub>- und 5-HT<sub>3B</sub>-Untereinheit resultiert ein funktioneller heteromerer 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptor (Davies et al., 1999; Dubin et al., 1999), in welchem die Untereinheiten wahrscheinlich in der Abfolge B-B-A-B-A um die Ionenkanalpore angeordnet sind (Barrera et al., 2005). Ob diese Stöchiometrie analog bei nativen Rezeptoren zu finden ist, muss noch geklärt werden. Ein wesentliches Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist, dass neben heteromeren 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptoren auch homopentamere 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren nach heterologer Expression in Säugerzellen exprimiert werden, was bis dato unbekannt war. Die Koexpression der 5-HT<sub>3A</sub>- und 5-HT<sub>3B</sub>-Untereinheit beeinflusst vorwiegend die biophysikalischen Eigenschaften des Rezeptorkanals. Der heteromere 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptor zeichnet sich durch eine im Vergleich zum homopentameren 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor stark erhöhte Einzelkanalleitfähigkeit von 16 pS (siehe A.2.2.4), eine verringerte Ca<sup>2+</sup>-Ionenleitfähigkeit, eine lineare Strom-Spannungsbeziehung und eine schnellere Rezeptoraktivierung bzw. -desensibilisierung aus (Davies et al., 1999; Dubin et al., 1999; Hapfelmeier et al., 2003). Hinsichtlich ihrer biophysikalischen Eigenschaften weisen heteromere 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptoren damit, im Gegensatz zum 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor, eine große Ähnlichkeit zu nativen 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren auf. Demgegenüber zeigten die Ergebnisse bisheriger Studien keine maßgeblichen Veränderungen der pharmakologischen Eigenschaften nach Koexpression beider Rezeptoruntereinheiten (Davies et al., 1999; Dubin et al., 1999; Brady et al., 2001), was allerdings in dieser Arbeit, zumindest in Bezug auf die Unterschiede in der 5-HT-Potenz, die bis jetzt stark unterschätzt wurden, relativiert wird.

Anfangs ging man davon aus, dass die 5-HT<sub>3B</sub>-Untereinheit keine Hauptdeterminante der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorfunktion im Gehirn ist (van Hooft und Yakel, 2003), doch nun gibt es zahlreiche Studien, die zumindest die Expression der humanen 5-HT<sub>3B</sub>-Untereinheit in zahlreichen Hirnregionen belegen (Monk et al., 2001; Doucet et al., 2007; Tzvetkov et al., 2007).

Die Entdeckung gehirnspezifischer Promotoren des *HTR3B*-Gens führte zur Vermutung der Existenz zweier von der Sequenz der kanonischen 5-HT<sub>3B</sub>-Untereinheit abweichender Transkripte (BT-1, BT-2), die nach Koexpression mit der 5-HT<sub>3A</sub>-Untereinheit veränderte Kanaleigenschaften des gebildeten 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptors im Vergleich zum 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptor mit der kanonischen 5-HT<sub>3B</sub>-Untereinheit hervorrufen (Lummis und Thompson, 2008). Ob die vorhergesagten

Proteine tatsächlich *in vivo* exprimiert werden, ist bisher nicht bekannt (Tzvetkov et al., 2007).

### **2.3.1.3 5-HT<sub>3C,D,E</sub>-Untereinheiten**

Mittlerweile wurden cDNAs dreier weiterer humaner, bei Nagern fehlender 5-HT<sub>3</sub>-Untereinheiten (5-HT<sub>3C,D,E</sub>) kloniert (Dubin et al., 2002; Niesler et al., 2003; Karnovsky et al., 2003), deren Gene *HTR3C*, *HTR3D* und *HTR3E* als Cluster auf Chromosom 3q27 lokalisiert sind. Die AS-Identität der kodierten Proteine untereinander beträgt 64,8 - 74,3 %, währenddessen sie nur zu 20,8 - 39,8 % identisch zur 5-HT<sub>3A</sub>- bzw. 5-HT<sub>3B</sub>-Untereinheit sind. Die 5-HT<sub>3C</sub>- und 5-HT<sub>3E</sub>-Untereinheiten besitzen eine ähnliche Architektur wie die 5-HT<sub>3A</sub>- bzw. die 5-HT<sub>3B</sub>-Untereinheit (siehe A.2.2.1), wohingegen 5-HT<sub>3D</sub> einen stark verkürzten N-Terminus ohne Signalpeptid und *Cys-loop* aufweist. Ein Vergleich der AS-Sequenzen aller 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoruntereinheiten ist im Anhang dargestellt (F.2.1). Die *HTR3C*-mRNA wird analog der *HTR3A*- und *HTR3B*-mRNA ubiquitär im PNS und ZNS exprimiert. Die Expression der *HTR3D*-mRNA ist demgegenüber vorwiegend, und die der *HTR3E*-mRNA ausschließlich auf den GI-Trakt beschränkt, was die beiden unter Umständen zu interessanten Kandidatengenen für das Reizdarmsyndrom macht (Niesler et al., 2003).

Erste funktionelle Untersuchungen mit den neuen Untereinheiten nach heterologer Expression in HEK293-Zellen zeigten, dass diese analog der 5-HT<sub>3B</sub>-Untereinheit keine funktionellen homopentameren Rezeptoren bilden können, da sie nicht an der Zelloberfläche exprimiert werden. Nach Koexpression mit der 5-HT<sub>3A</sub>-Untereinheit werden funktionelle heteromere Rezeptoren gebildet, die sich in ihren pharmakologischen Eigenschaften nicht vom homopentameren 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor unterscheiden (Niesler et al., 2007; Combrink, 2008). Im Rahmen dieser Arbeit wurden ergänzende Untersuchungen mit diesen drei neuen 5-HT<sub>3</sub>-Untereinheiten durchgeführt und zusätzlich eine von Karnovsky et al. (2003) identifizierte 5-HT<sub>3E</sub>-Spleißvariante (5-HT<sub>3Ea</sub>), die sich durch eine alternative Signalsequenz von 5-HT<sub>3E</sub> unterscheidet, charakterisiert.

### **2.3.2 Natürlich vorkommende Varianten humaner 5-HT<sub>3</sub>-Untereinheiten**

Um kausale Zusammenhänge zwischen genetischen Variationen in den 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorgenen und Erkrankungen bzw. Arzneimittel(neben)wirkungen zu finden, wurden zahlreiche Assoziationsstudien durchgeführt. Im Zentrum der Untersu-

chungen lagen bisher psychiatrische Erkrankungen und die Inzidenz von CINV. Dabei wurden Varianten sowohl in den regulatorischen als auch den kodierenden Bereichen, insbesondere der *HTR3A*- und *HTR3B*-Gene, identifiziert. Zwei Varianten im regulatorischen Bereich von *HTR3A* bzw. *HTR3B* (C178T bzw. -100-102delAAG) wurden mit bipolarer Depression assoziiert gefunden (Niesler et al., 2001a; Frank et al., 2004). Die *HTR3A* C178T-Variante, welche *in vitro* zu einer erhöhten Membranexpression des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors führt (Niesler et al., 2001a; Kapeller et al., 2008), konnte in einer weiteren Studie mit „*Harm avoidance*“ bei Frauen assoziiert werden (Melke et al., 2003). Die Deletionsvariante *HTR3B* -100-102delAAG, die die Promotoraktivität von *HTR3B* *in vitro* erhöht (Meineke et al., 2008), wurde zusätzlich mit einer erhöhten Inzidenz an CINV assoziiert gefunden (Tremblay et al., 2003).

Einige der gefundenen Varianten führen zum Austausch einer AS im Protein der entsprechenden 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoruntereinheit, bei welchen man allerdings erst ab einer Häufigkeit  $\geq 1\%$  von echten Polymorphismen sprechen kann. Beispielsweise wurden zwei *Missense*-Mutationen der 5-HT<sub>3A</sub>-Untereinheit (P391R und R344H), bei jeweils einem Schizophreniepatienten gefunden (Niesler et al., 2001b). Der Austausch von Prolin gegen Arginin in Position 391 der 5-HT<sub>3A</sub>-Untereinheit führt nicht zu funktionellen Veränderungen der 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoreigenschaften (Kurzweily et al., 2004). Die Charakterisierung der Eigenschaften des 5-HT<sub>3A</sub> R344H-Rezeptors erfolgte im Rahmen dieser Arbeit.

Die zwei häufigen 5-HT<sub>3B</sub>-Varianten Y129S und V183I wurden mit bipolarer (beide) und unipolarer (nur Y129S) Depression assoziiert gefunden (Frank et al., 2004; Yamada et al., 2006). Die 5-HT<sub>3B</sub> Y129S-Variante konnte des Weiteren mit der erhöhten Inzidenz einer Paroxetin-induzierten Nausea (Sugai et al., 2006) und eine weitere 5-HT<sub>3C</sub> N163K-Variante mit einer erhöhten Inzidenz an CINV assoziiert gefunden werden (Fasching et al., 2008).

Der Hauptteil dieser Arbeit bestand in der Untersuchung der funktionellen Konsequenzen einiger natürlich vorkommender Varianten *in vitro*, was die Ergebnisse von Assoziationsstudien unterstützen bzw. putative mechanistische Erklärungen für gefundene Krankheitsassoziationen ermöglichen soll. Die Ergebnisse der Untersuchungen können des Weiteren zur Fokussierung von Assoziationsstudien in Bezug auf die Varianten, welche zu funktionellen Veränderungen führen, dienen.

### 3. Das Chaperon RIC-3

RIC-3 ist ein Chaperon, welches spezifisch die Maturation (Faltung und Assemblierung) von nACh- und 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren beeinflusst.

Das für dieses Protein kodierende Gen *ric-3* wurde 1995 in *Caenorhabditis (C.) elegans* identifiziert. Dabei führten Mutationen in *ric-3* zu spezifischen cholinergen Defiziten, was dessen zentrale Rolle bei der cholinergen Signaltransduktion implizierte. Daraufhin konnte gezeigt werden, dass RIC-3 für die korrekte Maturation von nACh-Rezeptoren in *C. elegans* essenziell ist. Mutationen in *ric-3* verursachten eine Resistenz der Fadenwürmer gegenüber Inhibitoren der ACh-Esterase, wonach das Gen benannt wurde (resistant to inhibitors of cholinesterase) (Nguyen et al., 1995; Miller et al., 1996; Halevi et al., 2002).

In weiteren Studien stellte sich heraus, dass die Koexpression von RIC-3 mit verschiedenen nACh-Rezeptorsubtypen bzw. dem 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor zur Erhöhung der Expression funktioneller Rezeptoren an der Zelloberfläche führt (Halevi et al., 2002; Halevi et al., 2003; Cheng et al., 2005; Lansdell et al., 2005; Williams et al., 2005). Dabei scheint die RIC-3-Funktion auf die jeweilige Zellumgebung abgestimmt zu sein, da humanes RIC-3 seine Chaperonwirkung am besten in Säugerzellen entfalten kann (Lansdell et al., 2008).

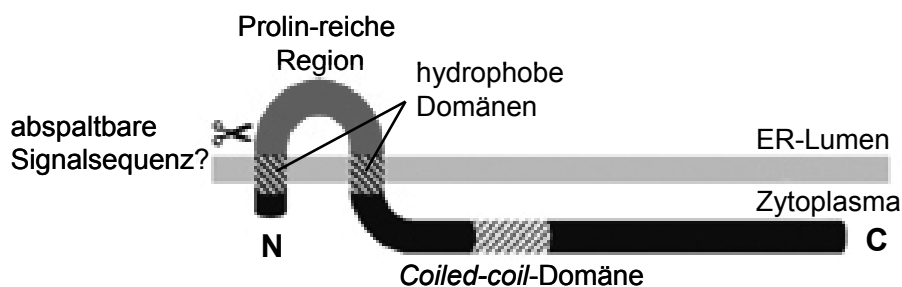
Experimentell genutzt wird RIC-3 vor allem für die Expression funktioneller nACh $\alpha$ 7-Rezeptoren in nichtneuronalen Zelllinien wie beispielsweise HEK293- oder CHO-Zellen, in welchen ohne die Expression von RIC-3 keine funktionellen Ionenkanäle gebildet werden können (Lansdell et al., 2005; Williams et al., 2005; Roncarati et al., 2008).

Dagegen scheint RIC-3 die Expression von GABA<sub>A</sub>- und Glycinrezeptoren nicht zu beeinflussen (Halevi et al., 2002; Halevi et al., 2003; Cheng et al., 2005; Lansdell et al., 2005).

Im Gegensatz zu relativ unspezifischen Chaperonmolekülen wie BiP und Calnexin, die mit nACh- und 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren (Blount und Merlie, 1991; Gelman et al., 1995; Boyd et al., 2002) aber auch mit anderen Proteinen (Kleizen und Braakman, 2004) interagieren, ist die Chaperonwirkung von RIC-3 demnach selektiver.

RIC-3 ist ein Transmembranprotein, welches zwei hydrophobe Domänen besitzt (Halevi et al., 2002). Diese zwei hydrophoben Segmente entsprechen Transmembrandomänen im *C. elegans*-Protein und dem anderer Invertebraten (Halevi et al., 2002; Lansdell et al., 2008), wohingegen es bei der Struktur des humanen Proteins inkonsistente Resultate bezüglich der N-terminalen hydrophoben Domäne gibt. Es ist bisher nicht eindeutig geklärt, ob es sich dabei um eine abspaltbare Signalsequenz oder eine TM handelt (Castillo et al., 2005; Cheng et al., 2007; Castelan et al., 2008). Im C-terminalen Bereich von RIC-3 befinden sich ein oder mehrere *Coiled-coil*-Domänen, die allerdings wahrscheinlich nicht essenziell für die Chaperonaktivität sind (Ben Ami et al., 2005; Cheng et al., 2007; Lansdell et al., 2008). Dahingegen scheint die Prolin-reiche Domäne zwischen den beiden hydrophoben Regionen wesentlich für die Chaperonwirkung von RIC-3 zu sein (Lansdell et al., 2008). Die vorhergesagte Membrantopologie des Proteins ist in Abbildung 3 dargestellt.

Der Wirkmechanismus des Chaperons RIC-3 besteht wahrscheinlich in der Interaktion mit unassemblierten Rezeptoruntereinheiten im endoplasmatischen Retikulum, wo RIC-3 hauptsächlich lokalisiert ist, und damit der Erleichterung der Untereinheitenfaltung und -koassemblierung (Halevi et al., 2002; Castillo et al., 2005; Lansdell et al., 2005; Cheng et al., 2007).



**Abbildung 3: Vorhergesagte Membrantopologie von RIC-3**

Dargestellt ist die Topologie des humanen RIC-3-Proteins, welches eine Länge von 369 AS aufweist (Halevi et al., 2003). Die charakteristischen Strukturmerkmale sind hervorgehoben. Ob es sich bei der N-terminalen hydrophoben Domäne um eine abspaltbare Signalsequenz (markiert durch das Scherensymbol) handelt, ist noch nicht eindeutig geklärt (nach Millar, 2008).

ER, endoplasmatisches Retikulum

#### 4. Der nACh $\alpha$ 7-Rezeptor und chimäre nACh $\alpha$ 7-5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren

Die nACh-Rezeptoren gehören neben den 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren zur Gruppe der kationenpermeablen *Cys-loop*-Kanäle und teilen demnach wesentliche Strukturmerkmale mit diesen (siehe A.2.2). Nach ihrem Vorkommen werden sie in muskuläre und neuronale Rezeptoren eingeteilt, wobei die neuronalen Subtypen neben ihrer weiten Verbreitung in ZNS und PNS auch auf nichtneuronalen Zellen nachgewiesen wurden (Gotti und Clementi, 2004). Bisher wurden die Gene zwölf neuronaler nACh-Rezeptoruntereinheiten kloniert, die für  $\alpha$ 2 -  $\alpha$ 10- und  $\beta$ 2 -  $\beta$ 4-Untereinheiten kodieren, wobei  $\alpha$ 8 nur bei Vögeln vorkommt. Die neuronalen nACh-Rezeptoren bilden eine heterogene Gruppe von Ionenkanälen unterschiedlicher Untereinheitenzusammensetzung, die in zwei Hauptklassen unterteilt werden. Das sind 1.) die  $\alpha$ -Bungarotoxin (Bgt)-sensitiven Rezeptoren, die bei Säugern hauptsächlich aus  $\alpha$ 7-Homopentameren aber auch aus  $\alpha$ 9 $\alpha$ 10-Heteropentameren bestehen, und 2.) die  $\alpha$ -Bgt-insensitiven Rezeptoren, welche ausschließlich Heteromere, bestehend aus  $\alpha$ ( $\alpha$ 2 -  $\alpha$ 6)- und  $\beta$ ( $\beta$ 2 -  $\beta$ 4)-Untereinheiten, sind (Millar und Gotti, 2008).

Damit ist  $\alpha$ 7 die einzige nACh-Rezeptoruntereinheit bei Säugern, die vorwiegend homopentamere Rezeptoren *in vitro* (Couturier et al., 1990; Anand et al., 1993) und *in vivo* (Keyser et al., 1993; Chen und Patrick, 1997) bildet. Sie ist aber auch in der Lage, funktionelle heteromere Rezeptoren beispielsweise mit der  $\beta$ 2-Untereinheit zu formen (Khiroug et al., 2002).

Der  $\alpha$ 7-Rezeptor ist nach dem  $\alpha$ 4 $\beta$ 2-Rezeptor der zweithäufigste nACh-Rezeptor im Gehirn. Hohe Expressionen finden sich in Kortex, Hippocampus und subkortikalen limbischen Regionen (Sher et al., 2004). Er ist hauptsächlich präsynaptisch lokalisiert (Jones und Wonnacott, 2004) und stimuliert die Neurotransmitterfreisetzung insbesondere von Glutamat (Sher et al., 2004; Gotti et al., 2006).

Da  $\alpha$ 7-Rezeptoren in die Pathogenese neurologischer Erkrankungen wie Schizophrenie (Leonard et al., 2000; Leonard et al., 2002) und Morbus Alzheimer (Dineley et al., 2002; Wang et al., 2003) involviert sind, werden selektive  $\alpha$ 7-Agonisten zur Therapie dieser Erkrankungen entwickelt (Arneric et al., 2007).

Funktionelle Charakteristika des homopentameren  $\alpha$ 7-Rezeptors sind die im Vergleich zu den  $\alpha$ -Bgt-insensitiven heteromeren Rezeptoren geringe Sensitivität



gegenüber ACh, die schnelle Aktivierung und Desensibilisierung (Couturier et al., 1990) und die hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Permeabilität (Seguela et al., 1993; Fucile et al., 2003). Letztere führt z.B. zu Langzeiteffekten auf die Genexpression vermittelt durch postsynaptisch lokalisierte  $\alpha 7$ -Rezeptoren (Gotti et al., 2007).

In Xenopus-Oozyten bilden sich nach heterologer Expression funktionelle  $\alpha 7$ -Rezeptoren (Couturier et al., 1990), wohingegen in vielen Säugerzelllinien keine effiziente Rezeptorbildung erfolgt (Eisele et al., 1993; Cooper und Millar, 1997; Kassner und Berg, 1997; Rangwala et al., 1997; Sweileh et al., 2000). Mit der Entdeckung des Chaperons RIC-3, welches nach Koexpression die Bildung funktioneller homopentamerer  $\alpha 7$ -Rezeptoren in diesen Zellen ermöglicht, wurde dieses Problem zumindest teilweise gelöst (siehe A.3 und D.5.1).

Ein anderer Ansatz, die Probleme bei der funktionellen Expression des  $\alpha 7$ -Rezeptors in Säugerzellen zu umgehen, wurde vor der Entdeckung von RIC-3 von vielen Arbeitsgruppen genutzt: Es erfolgte die Generierung eines chimären Rezeptors bestehend aus dem N-Terminus der  $\alpha 7$ -Untereinheit, welcher die Ligandbindungsstelle enthält, und den TMs und dem C-Terminus der  $5\text{-HT}_{3\text{A}}$ -Untereinheit. Der chimäre  $\alpha 7$ - $5\text{-HT}_{3\text{A}}$ -Rezeptor wird in Säugerzelllinien im Gegensatz zum  $\alpha 7$ -Rezeptor effizient funktionell exprimiert (Eisele et al., 1993; Corringer et al., 1995; Dineley und Patrick, 2000; Rayes et al., 2005). Die Grundlage dieses Ansatzes war die große Ähnlichkeit der  $\alpha 7$ -Rezeptoruntereinheit mit der  $5\text{-HT}_{3\text{A}}$ -Untereinheit, deren Proteinsequenzen zu 26 % identisch sind (siehe Alignment F.2.2).

Aufgrund dieser Untersuchungen sollten im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit chimäre Rezeptoren aus der  $5\text{-HT}_{3\text{A}}$ - und der  $\text{nACh}\alpha 7$ -Rezeptoruntereinheit generiert werden, um die Bindungsstelle für Cannabinoide am  $5\text{-HT}_{3\text{A}}$ -Rezeptor zu lokalisieren. Es ist bekannt, dass sowohl endogene als auch synthetische Cannabinoide den  $5\text{-HT}_{3\text{A}}$ -Rezeptor allosterisch inhibieren (Barann et al., 2002). Des Weiteren konnte unter Verwendung der oben beschriebenen  $\alpha 7$ - $5\text{-HT}_{3\text{A}}$ -Chimäre bereits gezeigt werden, dass die Bindungsstelle endogener Cannabinoide am homologen  $\text{nACh}\alpha 7$ -Rezeptor nicht im N-terminalen extrazellulären Bereich lokalisiert ist (Oz et al., 2004).

## **5. Zielsetzung der Arbeit**

5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren sind in pathophysiologische Vorgänge wie Schmerzvermittlung, Brechreiz, Reizdarmsyndrom und psychiatrische Erkrankungen involviert. Die Untersuchung der Heterogenität dieser Rezeptorfamilie liefert die Grundlage zur Aufklärung der Rolle der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren bei den erwähnten Erkrankungen und ermöglicht die Entwicklung selektiverer Pharmaka. Das primäre Ziel der Arbeit war demnach die Untersuchung funktioneller Konsequenzen unterschiedlicher Untereinheitenzusammensetzungen pentamerer 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkomplexe bzw. interindividueller Unterschiede einzelner Rezeptorproteine.

### **5.1 Etablierung eines Aequorin-Ca<sup>2+</sup>-Influx-Assays**

Zur schnellen funktionellen Charakterisierung heterolog exprimierter 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren unterschiedlicher Zusammensetzung sollte ein sensitiver Ca<sup>2+</sup>-Influx-Assay basierend auf der Lumineszenz des Fotoproteins Aequorin etabliert und optimiert werden.

### **5.2 Konstruktion fluoreszenzmarkierter 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoruntereinheiten**

Im Rahmen eines Kooperationsprojektes mit Prof. Dr. S. Böhm aus Wien galt es, Fusionskonstrukte aus der 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoruntereinheit und Fluoreszenzproteinen zu generieren. Mit Hilfe dieser Konstrukte soll die Untersuchung der Interaktion des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors mit anderen ligandgesteuerten Ionenkanälen mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) ermöglicht werden.

### **5.3 Pharmakologische Charakterisierung der 5-HT<sub>3A,B,C,D,E</sub>-Rezeptoruntereinheiten und natürlich vorkommender Varianten dieser**

Das Hauptziel der Arbeit bestand in der Charakterisierung heterolog in HEK293-Zellen exprimierter 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren unterschiedlicher Zusammensetzung. Dabei sollten die Auswirkungen natürlich vorkommender Varianten einzelner 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoruntereinheiten [5-HT<sub>3A</sub> A33T (R344H), 5-HT<sub>3B</sub> Y129S (S156R, V183I, A223T), 5-HT<sub>3C</sub> N163K, 5-HT<sub>3E</sub> T86A] und der Spleißisoform 5-HT<sub>3Ea</sub> auf die Funktion und Expression homopentamerer 5-HT<sub>3A</sub>- bzw. heteromerer 5-HT<sub>3A/B(C,D,E)</sub>-Rezeptoren untersucht werden. In Ergänzung zu den Untersuchungen von Sandra Combrink (2008) galt es zusätzlich, die Eigenschaften der neuen 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoruntereinheiten C, D und E (Niesler et al., 2003) näher zu charakterisieren.

#### **5.4 Untersuchung des Einflusses von RIC-3 auf die Expression und Funktion von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren**

Da bisher wenig über die Regulation der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorzusammensetzung *in vivo* bekannt ist, sollte der Einfluss von RIC-3, dessen cDNA es zunächst zu klonieren galt, auf die Expression und Funktion von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren unterschiedlicher Zusammensetzung untersucht werden. RIC-3 ist ein kürzlich identifiziertes Chaperon, welches spezifisch die Maturation von nACh- und 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren beeinflusst (Cheng et al., 2005; Lansdell et al., 2005).

#### **5.5 Generierung chimärer 5-HT<sub>3A</sub>-nACh $\alpha$ 7-Konstrukte zur Lokalisierung der allosterischen Cannabinoidbindungsstelle am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor**

Basierend auf den Untersuchungen von Oz et al. (2004), welche mit Hilfe eines chimären nACh $\alpha$ 7-5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors die Cannabinoidbindungsstelle am nACh $\alpha$ 7-Rezeptor auf den C-terminalen Bereich beginnend ab TM1 eingrenzen konnten, sollte in Analogie dazu die kürzlich identifizierte allosterische Cannabinoidbindungsstelle am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor (Barann et al., 2002) lokalisiert werden.

Hierzu sollte das synthetische Cannabinoid WIN 55,212-2 eingesetzt werden, welches am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor von Maus und Mensch, aber nicht am nACh $\alpha$ 7-Rezeptor des Huhns (Oz et al., 2004) inhibitorisch wirksam ist. Zur Überprüfung seiner Wirksamkeit am humanen nACh $\alpha$ 7-Rezeptor war es notwendig, diesen heterolog und funktionell zu exprimieren.

## B. Material und Methoden

### 1. Material

#### 1.1 Geräte

Analysenwaage	A 210 P, Sartorius
Autoklav	Bioclav KSK 117, Schütt
Brutschränke	BE 500, Memmert B 5060 EK/CO <sub>2</sub> , Heraeus
Einfrierbehälter	5100 Cryo 1°C Freezing container, Nalgene
Flachbettgelkammern	Eigenbau der Institutswerkstatt
Geldokumentation:	
UV/VIS Transluminator	TFP-M/WL, MWG Biotech
Steuerungscomputer	1M400-E, Scanalytics
Kamera	KP-M1U, Hitachi
Thermoprinter	P66E, Mitsubishi
Bildschirm	IM400-E, Javelin
Hämocytometer	Neubauer, Brand
Heizrührer	Ikamag RH, Ika
Kühlzentrifugen	JS-21, Beckman Centrifuge 5402, Eppendorf
Laborwaage	SBC53, Scaltec
Luminometer	Centro LB 960, Berthold
Membranpumpe	Typ EKF45, Greiffenberger Antriebstechnik GmbH
Mikroskop	Diavert, Leitz
pH-Meter	pH 522, WTW
Photometer	DU-64, Beckman GeneQuant II, Pharmacia
Pipettierhilfen	Varipette, Eppendorf Pipetman, Gilson
Pipettenstopfautomat	Typ P500, Bachofer
Rotor	TFT 65.38, Kontron
Schüttelinkubator	VF-2, Ika

Sequenzier	LI-COR 4200, LI-COR
SpeedVac-Konzentrator	SVC 100H, Savant
Stromversorgungsgeräte	Appligene 3000, Appligene Oncor Modell 493, ISCO 2303 Multidrive XL, Pharmacia LKB EPS 3500 XL, Pharmacia LKB
Sterilarbeitsbänke	HA 2448 GS, Heraeus Gelaire, Bio-Flow
Sterilisator	S 40, Memmert
Szintillationszähler	LS 5000 TD, Beckman
Thermocycler	Triothermoblock, Biometra
Tischzentrifugen	5114 und 5402, Eppendorf 1K15 und 2K15, Sigma CPKR (Rotor: GH-3.7), Beckman JS-21 (Rotor: JA-20), Beckman
Vortexgeräte	Vibrax-VXR, Ika Vortex Genie 2, Bender & Holbein
Ultra-Turrax	T25, Janke & Kungel
Wasseraufbereitung	Easy Pure RF, Barnstedt
Wasserbäder	FK, Haake
Zellharvester	MOR-24, Brandel

### **1.2 Ge- und Verbrauchsmaterial**

Deckgläser	24 x 24 mm, Brand
Einfrierröhrchen	1,8 ml, Nunc
Filmrolle für ThermoprinterK65HM	Mitsubishi
GenElute Agarose Spin Columns	Sigma
GFB-Filter	Whatman
Kanülen	Sterican 0,45 x 25 mm, Braun
Kunststoff-Küvetten	Cuvettes 10 x 10 x 24 mm, Sarstedt
96er Multiwellplatten Teflon, weiß	Eigenbau der Institutswerkstatt
Petrischalen	Sarstedt
Pipettenzubehör	Standardtips 10 µl, Eppendorf 10 - 100 µl, 100 - 1000 µl, Sarstedt
Reaktionsgefäße	0,5 ml, 1 ml, 2 ml, Eppendorf

## Material und Methoden

---

Reaktionsgefäße ohne Deckel	2 ml, Sarstedt
Skalpelle	No.10, Feather
Spritzen	2 ml, 5 ml, 50 ml, Braun
Sterilfilter	Typ GVPP, 0,22 µm, Millipore
Sterile Plastikpipetten	5 ml, 10 ml, 25 ml, Falcon
Zählröhrchen	12 ml, PE, Packard
Zellkulturflaschen	175 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 25 cm <sup>2</sup> , Sarstedt
Zellkultur Multiwellplatten	24er-Well, Nunc
Zellkulturschalen	10 cm, Nunc
Zentrifugenröhrchen	15 ml, 50 ml, Sarstedt

### 1.3 Labor-Kits

Fast Plasmid Mini	Eppendorf
GenElute HP Plasmid Maxiprep Kit	Sigma
QuickChange Mutagenesis Kit	Stratagene
RevertAid First Strand cDNA synthesis Kit	MBI Fermentas
RNAse-Free DNAse Set	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP	Amersham

### 1.4 Chemikalien und Substanzen

Agar-Agar	Merck
Agarose (Gelelektrophorese)	Serva
Alosetronhydrochlorid	GlaxoSmithKline
Ammoniumperoxodisulfat	Sigma
Ampicillin	Roche
Ascorbinsäure	Merck
Azasetronhydrochlorid (Y25130)	Tocris
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	BioRad
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck

## Material und Methoden

---

Cilansetronhydrochlorid-Monohydrat	Solvay
Coffein	Merck
Dimethylformamid (DMF)	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Sigma
Dolasetronmesylat	Haouri
(±)Epibatidinhydrochlorid	Tocris
Ethanol absolut	Merck
Ethidiumbromid	Roche
Ethylendiamintetraacetat, Na-Salz (EDTA, Titriplex III)	Merck
Ficoll 400	Sigma
Folin-Ciocalteu-Phenol Reagenz	Merck
Fetales Kälberserum (FKS)	Sigma, Pan Systems
Geneticin (G418)	Sigma
(D)-Glukose	Merck
Glycerol (87 %)	Merck
<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazin- <i>N'</i> -2- ethansulfonsäure (HEPES)	Roth
Hygromycin B	Calbiochem
Isopropanol	Merck
Isopropylthio- $\beta$ -D-galaktosid (IPTG)	Sigma
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydroxid	Merck
Kanamycin	Gibco
Kupfersulfatpentahydrat	Merck
LB-Medium, lyophilisiert	Invitrogen
Lipofectamine 2000	Invitrogen
Magnesiumchloridhexahydrat	Merck
m-Chlorophenylbiguanid (mCPBG)	ICN
MEM (Minimum Essential Medium Eagle)	Sigma
Mercaptoethanol	Sigma
Mineralöl	Sigma

2-( <i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Sigma
Natriumacetat	Merck
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Fluka, Amersham
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid	Roth
Natriumkaliumtartrat	Merck
(-)-Nikotinhydrogentartrat	ICN
Ondansetronhydrochlorid	Sigma
Opti-MEM	Invitrogen
Palonosetronhydrochlorid	Helsinn
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Sigma
Poly-L-Ornithin	Sigma
Proteaseinhibitorcocktail	Serva
Ryanodin	Biotrend
Salzsäure (37 %)	Merck
Szintillatorcocktail 199 TM	Packard
Sequagel XR	National Diagnostics
Sequagel complete Buffer reagent	National Diagnostics
SOC-Medium	Novagen
Thapsigargin	Tocris
TransIT-293	Mirus
Tris-(hydroxymethylen)-aminomethan	Roth, Merck
Triton X-100	Bio-Rad
Trypsin/EDTA (10x)	Sigma
WIN 22,212-2-Mesylat	Tocris
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid)	Roche
Zeocin	Invitrogen

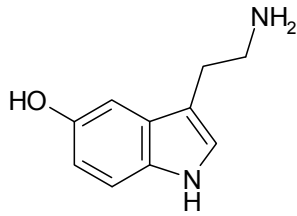
### 1.5 Radiochemikalien

N-[Propionyl- <sup>3</sup> H] $\alpha$ -Bungarotoxin	GE Healthcare
N-[Methyl- <sup>3</sup> H]GR65630	PerkinElmer

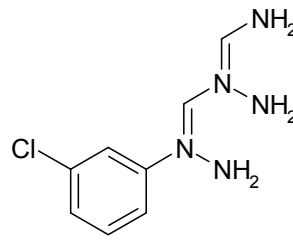


## 1.6 Strukturformeln eingesetzter Rezeptorliganden

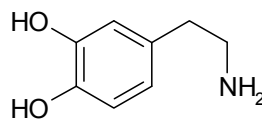
### 1.6.1 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoragonisten



**Serotonin**  
natürlicher 5-HT-Rezeptoragonist



**m-Chlorophenylbiguanid (mCPBG)**  
spezifischer 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoragonist

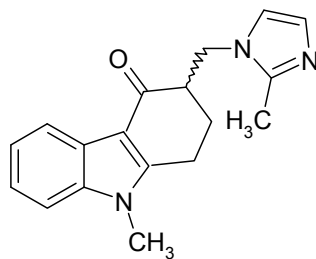


**Dopamin**  
Dopaminrezeptoragonist  
5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorpartialagonist

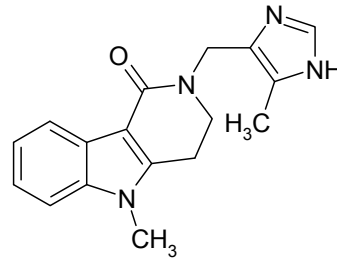
### 1.6.2 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten

Die als Setrone bezeichneten 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten werden anhand der chemischen Struktur ihres N-Seitenringes in Gruppen eingeteilt.

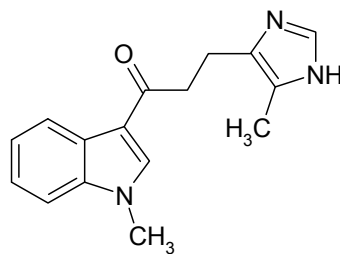
Imidazole



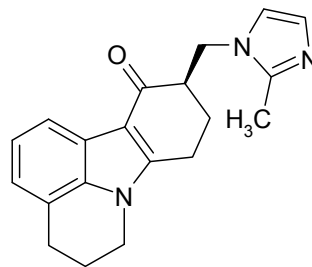
**Ondansetron**



**Alosetron**

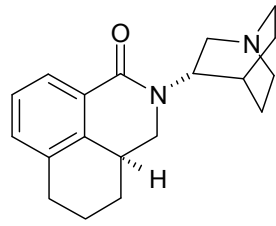


**GR65630**

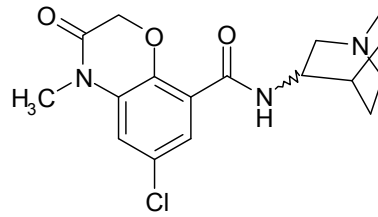


**Cilansetron**

Chinuclidine

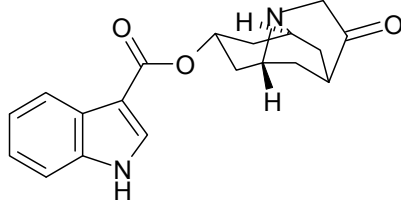


Palonosetron



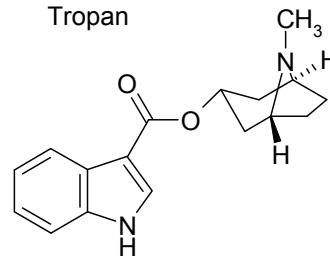
Azasetron

Granatan



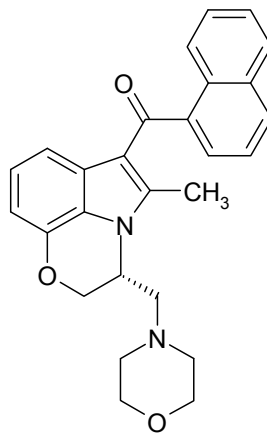
Dolasetron

Tropan



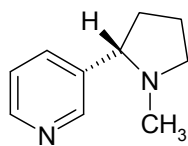
Tropisetron

### 1.6.3 Allosterischer 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonist

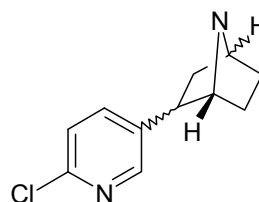


WIN 55,212-2  
Cannabinoidrezeptoragonist

### 1.6.4 NACH-Rezeptoragonisten



(-)-Nikotin



(+/-)-Epibatidin

## 1.7 Lösungen und Puffer

Mit H<sub>2</sub>O ist *Aqua destillata* gemeint. Eine von Raumtemperatur abweichende Lagertemperatur ist angegeben.

### 1.7.1 Zellkultur

G418 (Geneticin) 100 mg/ml in PBS, pH 7,4 (mit NaOH)  
sterilfiltriert, -20°C

PBS (Phosphate Buffered Saline) 137 mM NaCl  
2,7 mM KCl  
8,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
pH 7,4; autoklaviert

Polyornithin-Lösung 0,1 % (m/V) Polyornithin in H<sub>2</sub>O  
150 µM Borsäure  
67 mM NaOH  
sterilfiltriert, 4°C (haltbar: 30 d), -20°C

Penicillin/Streptomycin-Lösung 10000 U/ml Penicillin G  
10 mg/ml Streptomycin

Trypanblau-Lösung 0,4 % (m/V) in PBS

Trypsin/EDTA-Lösung Stammlösung (10x) mit PBS  
1:10 verdünnen  
0,05 % (m/V) Trypsin  
0,02 % (m/V) EDTA

### 1.7.2 Molekularbiologie

Ampicillin 10 % (m/V) in H<sub>2</sub>O, aliquotiert, -20°C

BBS 2x (*BES Buffered Saline*) 280 mM NaCl  
1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
50 mM BES  
pH 6,95; sterilfiltriert, aliquotiert, -20°C

## Material und Methoden

---

CaCl <sub>2</sub> 0,25 M	0,25 M CaCl <sub>2</sub> in H <sub>2</sub> O sterilfiltriert, aliquotiert, -20°C
DNA-Probenpuffer (5x)	15 % (m/V) Ficoll 400 in 5x TBE 0,25 % (m/V) Bromphenolblau
Ethidiumbromid-Lösung	1 % (m/V) in H <sub>2</sub> O, lichtgeschützt, 4°C
Glycerol 50 %	50 % (V/V) in H <sub>2</sub> O, autoklaviert
IPTG-Stammlösung	20 % (m/V) in H <sub>2</sub> O, aliquotiert, -20°C
Natriumacetat-Lösung	3 M Natriumacetat in H <sub>2</sub> O
TBE-Puffer (10x)	1 M Tris 1 M Borsäure 20 mM EDTA, pH 8,0
TE-Puffer pH 8	10 mM Tris HCl 1 mM EDTA, pH 8,0
X-Gal-Stammlösung	2 % (m/V) in DMF, aliquotiert, -20°C

### 1.7.3 Biochemie

#### 1.7.3.1 Proteinbestimmung nach Lowry

Lösung A	8 % (m/V) Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,2 N NaOH 1,6 % (V/V) Lösung B2 0,4 % (V/V) Lösung B1
Lösung B1	2 % CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O
Lösung B2	2,5 % Na-K-Tartrat x 4 H <sub>2</sub> O

### 1.7.3.2 DNA-Sequenziergele

Ammoniumperoxodisulfat 10 % (m/V) in H<sub>2</sub>O, frisch

### 1.7.4 Pharmakologische Versuche

Aequorin-Assaypuffer 150 mM NaCl  
1,8 mM CaCl<sub>2</sub>  
20 mM D-Glukose  
10 mM HEPES  
pH 7,4 (mit KOH)  
(1 mM Ascorbinsäure bei Versuchen  
mit Dopamin)

Aequorin-Assay-Lysispuffer 100 mM CaCl<sub>2</sub>  
0,2 % (V/V) Triton X-100

Bindungspuffer 150 mM NaCl  
1,8 mM CaCl<sub>2</sub>  
1,0 mM MgCl<sub>2</sub>  
(5,6 mM D-Glukose bei Bindung  
an intakten Zellen)  
10 mM HEPES  
pH 7,4 (mit KOH)

Polyethylenimin (PEI)-Lösung 0,5 % (m/V) in H<sub>2</sub>O

Saponin-Stammlösung 1 % (m/V) in Bindungspuffer  
aliquotiert, -20°C

### 1.7.5 Stammlösungen von Rezeptorliganden

Die angegebenen Stammlösungen wurden aliquotiert bei -20°C gelagert. Lösungen aller anderen eingesetzten Substanzen wurden jeweils am Versuchstag frisch hergestellt.

5-HT 15 mM in H<sub>2</sub>O

Setrone 3 mM in H<sub>2</sub>O

(±)Epibatidin	3 mM in H <sub>2</sub> O
mCPBG	15 mM in H <sub>2</sub> O
(-)Nikotin	100 mM in H <sub>2</sub> O
WIN 22,212-2	15 mM in DMSO

### 1.8 Nährmedien, Zelllinien und Bakterienstämme

#### 1.8.1 Nährmedien für die Bakterienkultur

Kanamycin-Agar-Platten	10 µg/ml Kanamycin 1,5 % (m/V) Agar-Agar in LB-Medium
LB-Medium, pH 7	2,5 % (m/V) lyophilisiertes Fertigmedium in H <sub>2</sub> O, autoklaviert
LB/Amp-Medium	200 µg/ml Ampicillin in LB-Medium
XIA-Agar-Platten	40 µg/ml X-Gal 50 µg/ml IPTG 200 µg/ml Ampicillin 1,5 % (m/V) Agar-Agar in LB-Medium

#### 1.8.2 Nährmedien für die Zellkultur

DMEM (bzw. Ham's F12)	13,36 g/l (bzw. 10,63 g/l) lyophilisiertes Fertigmedium in H <sub>2</sub> O 3,7 g/l NaHCO <sub>3</sub> pH 7,3; sterilfiltriert, 4°C
-----------------------	--

#### 1.8.3 Zelllinien

##### **BOSC23** (ATCC<sup>1</sup> Nr. CRL-11270)

BOSC23 ist ein ekotrope retrovirale Verpackungszelllinie, welche aus HEK293T-Zellen (HEK293-Zellen, die das große SV40 Tumor-Antigen exprimieren) durch Transfektion mit retroviralen Vektoren generiert wurde, was zur Expression retroviraler Hüllproteine in diesen Zellen führt.

Nährmedium: DMEM + 10 % FKS + 1 % P/S

**CHO-K1** (ATCC Nr. CCL-61)

CHO-K1 ist eine epitheliale Zelllinie, die als Subklon der CHO-Zelllinie aus der Biopsie eines Ovars des chinesischen Hamsters *Cricetulus griseus* (Chinese Hamster Ovary) hergestellt wurde.

Nährmedium: MEM + 10 % FKS + 1 % P/S

**GH4-C1** (DSMZ<sup>2</sup> Nr. ACC 482)

Die GH4-C1-Zelllinie stammt aus Zellen des Hypophysentumors einer weiblichen Wistar-Ratte.

Nährmedium: DMEM + 10 % FKS + 1 % P/S

**HEK293** (ATCC Nr. CRL-1573)

Die epitheliale Zelllinie HEK293 wurde durch Transformation einer menschlichen embryonalen Nierenzelle (*human embryonic kidney*) mit Genomteilen des menschlichen Adenovirus 5 geschaffen.

Nährmedium: DMEM/Ham's F12 (1/1) + 10 % FKS + 1 % P/S

**SH-EP1** (von Dr. S. Nuutinen, Finnland)

Bei SH-EP1 handelt es sich um einen epithelzellartigen Klon der humanen Neuroblastomzelllinie SK-N-SH.

Nährmedium: DMEM + 10 % DHS + 5 % FKS + 1 % P/S

**SH-EP1-h $\alpha$ 7** (von Dr. S. Nuutinen, Finnland)

SH-EP1-h $\alpha$ 7-Zellen sind stabil mit der humanen nACh $\alpha$ 7-cDNA im Expressionsvektor pCEP4 (Hygromycin B Resistenzgen) transfizierte SH-EP1-Zellen.

Nährmedium:

DMEM + 10 % DHS + 5 % FKS + 1 % P/S + 130  $\mu$ g/ml Hygromycin B

**SH-SY5Y** (DSMZ Nr. ACC 209)

Bei SH-SY5Y handelt es sich um einen neuronalen Klon der humanen Neuroblastom-Zelllinie SK-N-SH.

Nährmedium: DMEM + 10 % FKS + 1 % P/S

<sup>1</sup>ATCC: American Tissue Culture Collection

<sup>2</sup>DSMZ: Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen

#### 1.8.4 Bakterienstämme

NovaBlue Singles Competent Cells	Novagen
XL1-Blue Supercompetent Cells	Stratagene

#### 1.9 Vektoren

##### **pCR2.1** (Invitrogen)

Der Vektor ist 3,9 kb groß und besitzt ein Ampicillin- und ein Kanamycin-Resistenzgen. Die *Multiple Cloning Site* (MCS) liegt innerhalb des LacZ-Gens und ermöglicht so eine „Blau-weiß-Selektion“ rekombinanter Klone. Einklonierte Inserts können mit M13-Primern sequenziert werden. Die MCS wurde vom Hersteller mit EcoRI geöffnet und beiderseits ein Adapteroligonukleotid mit 3'-dT-Überhang anligiert. Da die Taq-DNA Polymerase meist einen 3'-dA-Überhang hinterlässt, eignet sich der Vektor sehr gut zur Klonierung von PCR-Produkten.

##### **pcDNA3** (Invitrogen)

Der pcDNA3-Vektor zählt zu den eukaryotischen Expressionsvektoren. Er ist 5,4 kb groß und besitzt ein Ampicillin- und ein Neomycin-Resistenzgen. Durch die Neomycin-Resistenz (Selektion mit G418) ist er für die Etablierung stabil transfizierter Zellen verwendbar. Der CMV-Promotor (und –Enhancer) führt zu einer starken Expression einklonierter cDNAs. Sequenzierungen erfolgen mit SP6- oder T7-Primern.

##### **pcDNA3.1(-)** (Invitrogen)

Der 5,4 kb große pcDNA3.1-Vektor ist das Nachfolgeprodukt von pcDNA3 und ist ähnlich aufgebaut. Die MCS gibt es zur Erleichterung der Klonierung in zwei Orientierungen, und zwar, vorwärts bei pcDNA3.1(+) und rückwärts bei pcDNA3.1(-). Sequenzierungen erfolgen mit T7- und BGH reverse-Primern.

##### **pcDNA3.1 Hygro(-)** (Invitrogen)

Der 5,6 kb große Vektor besitzt ein Ampicillin- und ein Hygromycin-Resistenzgen.

##### **pcDNA3.1 Zeo(+)** (Invitrogen)

Der 5,0 kb große Vektor besitzt ein Ampicillin- und ein Zeocin-Resistenzgen.



### 1.10 Enzyme

Accutase	PAA
PfuTurbo DNA Polymerase	Stratagene
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas
SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase)	MBI Fermentas
Taq DNA-Polymerase	MBI Fermentas
T4-DNA-Ligase	Roche, Invitrogen

### 1.11 Nukleinsäuren, Größenmarker

dNTPs	MBI Fermentas
GeneRuler 1kb DNA Ladder	MBI Fermentas
GeneRuler 50bp DNA Ladder	MBI Fermentas
Lachsspermien-DNA	Roche
unmarkierte Oligonukleotide	MWG

### 1.12 Computersoftware und Datenbanken

BLAST at NCBI	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/">www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/</a>
ClustalW	<a href="http://www.ch.embnet.org">www.ch.embnet.org</a>
Entrez at NCBI	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/">www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/</a>
ExpASy Proteomics Server	<a href="http://www.expasy.org">www.expasy.org</a>
GraphPad Prism 4/5	Graph Pad Software
MDL ISIS Draw 2.4	MDL
MikroWin 2000 Version 4.37	Mikrotek
Office 2003 (Word, Excel, PowerPoint)	Microsoft
OligoAnalyzer 3.0	IDT

## 2. Methoden

### 2.1 Methoden der Zellkultur

#### 2.1.1 Kultivierung und Passagierung von Säugerzellen

Die verwendeten Säugerzelllinien wurden als Monolayerkulturen in Plastikkulturflaschen bei 37°C unter 5 % CO<sub>2</sub> in wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Alle verwendeten Nährmedien sind unter B.1.8.2 aufgeführt. Alle drei bis vier Tage erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums, wobei ein Farbumschlag des im Nährmedium enthaltenen pH-Indikators Phenolrot von rot (neutral) nach gelb

(sauer) die Notwendigkeit einer Mediuerneruerung anzeigte. Bei ca. 80-90 %-iger Konfluenz wurde ihre Subkultivierung durchgeführt. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen, um Reste von Serum zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit einem dünnen Flüssigkeitsfilm von Trypsin/EDTA-Lösung überschichtet und ca. 3 - 5 min bei 37°C bis zum Ablösen inkubiert. Der Trypsinierungsprozess wurde unmittelbar nach dem Ablösen der Zellen durch Zugabe von serumhaltigem Medium, welches das Trypsin inaktiviert, gestoppt. Die Zellen wurden nun durch vierminütige Zentrifugation bei 180 g pelletiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 2 ml frischem Medium resuspendiert und in entsprechender Verdünnung in ein neues Kulturgefäß ausgesät.

### **2.1.2 Kryokonservierung von Zellen**

Die Langzeitlagerung der Zelllinien erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196°C. Die Zellen einer konfluent bewachsenen 175 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche wurden, wie unter B.2.1.1 beschrieben, vom Boden abgelöst und pelletiert. Die Resuspension erfolgte in 5 ml Einfriermedium, welches dem Kulturmedium unter Zusatz von 10 % DMSO entsprach. Die Suspension wurde in 1,5 ml Aliquoten auf Kryoröhrchen verteilt und diese in einem Einfrierbehälter langsam auf -80°C heruntergekühlt. Nach 24 h wurden die Röhrchen in flüssigen Stickstoff überführt oder für kurze Zeit bei -80°C gelagert.

Das Auftauen von kryokonservierten Zellen zum Zweck der Rekultivierung muss im Gegensatz zum Einfrieren rasch erfolgen. Dazu wurde die Zellsuspension eines Kryoröhrchens bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und der Inhalt in ca. 20 ml auf 37°C vorgewärmtes Kulturmedium überführt und abzentrifugiert (4 min, 250 g). Nach dem Absaugen des Überstands wurde das Zellpellet in 15 ml Medium (37°C) resuspendiert und die Suspension in einer 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche ausgesät. Ein erster Mediumwechsel erfolgte nach 24 h.

### **2.1.3 Bestimmung der Zellzahl**

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit einem Hämocytometer (Neubauer-Zählkammer). Hierbei wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit einem gleichen Teil 0,4 %-iger Trypanblau-Lösung vorsichtig gemischt. Trypanblau passiert ausschließlich die Plasmamembran nekrotischer Zellen, so dass diese im Gegensatz zu vitalen Zellen blau angefärbt wurden. Zur Auszählung lebender

Zellen wurden 10 µl der Mischung in die Zählkammer gefüllt und unter dem Mikroskop bei 100-facher Vergrößerung die nicht blau angefärbten Zellen in vier großen Quadraten ausgezählt. Die Zellzahl (N) pro Milliliter Suspension ergab sich nach folgender Formel:

$$N = \frac{n \cdot 10^4 \cdot VF}{4}$$

N: Zellzahl pro Milliliter Suspension

n: Zellzahl der 4 Großquadrate

VF: Verdünnungsfaktor

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA

#### 2.2.1.1 Plasmid Mini-Präparation

Zur Präparation geringer Mengen Plasmid-DNA (bis zu 20 µg) aus 1,5 ml Bakterien-Übernachtskultur wurde das „Fast Plasmid Mini Kit“ (Eppendorf) verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Bei diesem Verfahren werden die Bakterien zunächst durch eine Mischung aus Lysozym und Detergenzien lysiert. Die folgende Aufreinigung der Plasmide beruht auf der pH- und salzabhängigen Bindung von Nukleinsäuren an eine Silicagelmatrix. Die erhaltene Plasmid-DNA konnte ohne weitere Aufreinigung für Klonierungen und Sequenzierungen eingesetzt werden.

#### 2.2.1.2 Plasmid Maxi-Präparation

Zur Gewinnung einer größeren Menge Plasmid-DNA (bis 1,2 mg) erfolgte eine Maxi-Präparation unter Verwendung des „GenElute HP Plasmid Maxiprep Kits“ (Sigma) gemäß den Angaben des Herstellers. Die Isolation der Plasmid-DNA aus 150 ml Bakterien-Übernachtskultur erfolgte durch alkalische SDS-Lyse und, analog der Mini-Präparation, durch anschließende Aufreinigung über eine Silicagel-Säule. Die eluierte DNA wurde zur Aufkonzentrierung und Reinigung mit Ethanol präzipitiert (B.2.2.1.4). Nach dem Lösen in H<sub>2</sub>O wurde die Konzentration auf 1 µg/µl eingestellt (B.2.2.2).

### **2.2.1.3 Reinigung von DNA durch Phenol/Chloroform-Extraktion**

Proteinhaltige Verunreinigungen von Nukleinsäurelösungen wurden durch Ausschütteln mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25 : 24 : 1) entfernt. Nach dem gründlichen Mischen von wässriger und organischer Phase (30 s) wurde die Phasentrennung durch Zentrifugation (13 000 g, 1 min) beschleunigt und die wässrige Phase anschließend abgenommen. Darin gelöstes Phenol wurde durch erneute Extraktion mit einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24 : 1) entfernt. Die DNA konnte daraufhin durch Ethanolzugabe präzipitiert werden (B.2.2.1.4).

### **2.2.1.4 Ethanolpräzipitation von DNA**

Die gebräuchlichste Methode zur Konzentrierung und Reinigung von Nukleinsäuren ist die Präzipitation mit Ethanol. In Gegenwart monovalenter Kationen (hier:  $\text{Na}^+$ ) bildet DNA in Ethanol einen unlöslichen Niederschlag, der durch Zentrifugation isoliert wird. Zur wässrigen Nukleinsäurelösung wurde das 2,5-fache Volumen eiskalten Ethanols (96 %) und 1/10 Volumenteil Natriumacetat-Lösung (3 M, pH 5,2) gegeben. Der Fällungsansatz wurde für mind. 2 h bei  $-20^\circ\text{C}$  inkubiert und anschließend zentrifugiert (13 000 g,  $4^\circ\text{C}$ , 30 min). Zum Entfernen des mitgefällten Salzes wurde das Nukleinsäurepellet anschließend mit zwei Volumenteilen eiskaltem Ethanol (70 %) gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren (13 000 g,  $4^\circ\text{C}$ , 30 min) wurde das Pellet unter Vakuum in der SpeedVac (Savant) getrocknet (5 - 15 min) und in der erforderlichen Menge  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst.

### **2.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Konzentrationsbestimmung von DNA oder RNA basiert auf dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren bei 260 nm. In einer Quarzküvette von 1 cm Schichtdicke besitzt eine Lösung, die 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  doppelsträngige DNA bzw. 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  RNA enthält, bei dieser Wellenlänge einen Absorptionswert von  $A_{260} = 1$ . Auf der Grundlage des Lambert-Beerschen Gesetzes kann somit die Konzentration einer unbekanntes Nukleinsäurelösung bestimmt werden.

Die Messungen erfolgten mit dem Photometer GeneQuant II (Pharmacia) nach Kalibrierung mit dem Lösungsmittel der Proben. Dabei wurde die Verdünnung einer Probe so gewählt, dass der gemessene Extinktionswert im linearen Bereich des Lambert-Beerschen Gesetzes (0,1 - 1,0) lag. Das Absorptionsmaximum für Proteine liegt, basierend auf der Absorption der aromatischen Aminosäurereste,

bei 280 nm. Demzufolge ließ sich durch Bestimmung des Verhältnisses der Absorption bei 260 nm und 280 nm die Reinheit der Nukleinsäurelösung abschätzen, wobei eine reine DNA-Lösung einen  $A_{260}/A_{280}$ -Wert zwischen 1,8 - 1,9 und eine reine RNA-Lösung einen  $A_{260}/A_{280}$ -Wert zwischen 1,9 - 2,1 zeigte.

### **2.2.3 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese von DNA**

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Trennung von Nukleinsäuren unterschiedlicher Größe. Die Auftrennung der negativ geladenen Fragmente beruht auf der größenabhängigen Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld (Molekularsiebeffekt). Die zurückgelegte Wegstrecke linearer DNA ist dabei umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus der Anzahl der Basenpaare. Die Größenbestimmung erfolgte anhand eines mitaufgetragenen Längenstandards. DNA-Fragmente im Größenbereich von 0,8 - 10 kb wurden auf 0,7 %-igen (m/V) und Fragmente von 0,1 - 2 kb auf 2 %-igen (m/V) Gelen aufgetrennt. Zur Gelherstellung wurde die Agarose in TBE-Puffer aufgekocht, die Lösung mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) versetzt und zum Gelieren in eine horizontale Flachbettgelkammer gegossen. Die Proben und der Längenmarker wurden mit DNA-Probenpuffer (5x) versetzt, in die Taschen des Gels eingebracht und die Elektrophorese bei 1 - 5 V/cm mit TBE-Puffer als Laufpuffer durchgeführt. Der planare Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und macht diese im Gel unter UV-Licht (254 - 366 nm) sichtbar.

### **2.2.4 Isolierung von DNA aus Agarosegelen**

Die Bande des gewünschten, unter UV-Licht (254 nm) sichtbaren DNA-Fragments wurde mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA aus diesem Gelstück erfolgte durch Zentrifugation über eine mit TE-Puffer pH 8 equilibrierte „GenElute Agarose Spin Column“ (Sigma) nach Angaben des Herstellers. Die eluierte DNA konnte, falls notwendig, zur weiteren Aufreinigung einer Phenol/Chloroform-Extraktion (B.2.2.1.3) mit anschließender Ethanolpräzipitation (B.2.2.1.4) unterzogen werden.

### **2.2.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

#### **2.2.5.1 Prinzip und Durchführung**

Die Polymerasekettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) nach Mullis und Faloona (1987) ist eine Methode zur *in vitro*-Amplifikation beliebiger

Nukleinsäureabschnitte. Im ersten Schritt wird die doppelsträngige DNA durch Erhitzen in zwei Einzelstränge aufgeschmolzen (Denaturierung). Beim darauffolgenden Abkühlen hybridisieren als Primer bezeichnete Oligonukleotide mit den komplementären Abschnitten der Einzelstränge (*Annealing*). Im letzten Schritt verlängert die eingesetzte hitzestabile DNA-Polymerase die Primer von 5' nach 3' komplementär zum jeweiligen Einzelstrang (Elongation). Diese drei temperaturabhängigen Schritte laufen in einem „Thermocycler“ mehrfach nacheinander ab. Da auch die neu gebildeten DNA-Stränge wieder als Matrize dienen, ist der Grad der Amplifikation exponentiell.

Die Reaktionskomponenten wurden in 0,5 ml-Reaktionsgefäßen auf Eis zusammengefügt. Ein Ansatz (50 µl) enthielt Matrizen-DNA (pg - µg Bereich), je 0,1 - 1 µM Strang- und Gegenstrangprimer (*sense*- und *antisense*-Primer), 0,2 mM dNTPs, Reaktionspuffer und 1,25 U Taq DNA-Polymerase oder 2,5 U PfuTurbo-Polymerase. Für analytische PCR-Reaktionen wurde die Taq DNA-Polymerase (MBI Fermentas) verwendet. Für präparative PCR-Reaktionen, die z.B. zum Zweck der Herstellung rekombinanter DNA-Moleküle dienen, wurde die PfuTurbo-Polymerase (Stratagene) eingesetzt, welche aufgrund ihrer Korrekturaktivität (*proofreading*) eine geringere Fehlerrate beim Einbau der Nukleotide aufweist. Die Schmelztemperatur der Primer sowie die Länge und Basenzusammensetzung der Matrizen-DNA bestimmten das Temperaturprofil. Die *Annealing*-Temperatur ( $T_A$ ) lag normalerweise 5°C unter der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der Primer. Ein typisches PCR-Temperaturprogramm setzte sich folgendermaßen zusammen:

- |                            |         |           |
|----------------------------|---------|-----------|
| 1. initiale Denaturierung: | 94°C    | 90 s      |
| 2. Denaturierung:          | 94°C    | 30 - 60 s |
| 3. <i>Annealing</i> :      | 50-70°C | 30 - 60 s |
| 4. Elongation:             | 72°C    | 1 min/kb  |

Die Schritte 2 - 4 wurden 15 - 40x wiederholt.

Da die PfuTurbo-Polymerase im Gegensatz zur Taq DNA-Polymerase keinen 3'-dA-Überhang an die neu synthetisierten DNA-Fragmente anfügt, wurde der Ansatz im Anschluss an die Reaktion für 10 min bei 72°C in Gegenwart von Taq DNA-Polymerase inkubiert um die Klonierung in den pCR2.1 Vektor zu ermöglichen (B.2.2.7).

### 2.2.5.2 Auswahl der PCR-Primer

Die Auswahl von Primerpaaren für die PCR erfolgte anhand von Referenzsequenzen aus der Sequenzdatenbank (GenBank).

Das wichtigste Kriterium bei der Auswahl von Primern ist ihre ausschließliche Sequenzidentität zur Zielsequenz. Die weiteren angegebenen Kriterien wurden soweit erfüllt, wie es die Zielsequenz ermöglichte.

1) Die Primer sollten eine Länge zwischen 15 und 30 Nukleotiden aufweisen.

2) Der G/C-Gehalt sollte zwischen 40 und 60 % betragen.

3) Die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) sollte paarweise möglichst identisch sein und zwischen 55 und 80°C liegen. Aus der Literatur sind zahlreiche Methoden zur Bestimmung der Schmelztemperatur bekannt. Verwendet wurde die einfachste dieser Formeln, welche für jedes A oder T einen  $T_m$  von 2°C und für jedes G oder C einen  $T_m$  von 4°C zugrunde legt.

3) Die Primer sollten keine Sekundärstrukturen (Palindrome) aufweisen, die unter den PCR-Reaktionsbedingungen stabil sind ( $T_m > 45^\circ\text{C}$ ). Zur Überprüfung wurde das Programm OligoAnalyzer 3.0 (IDT) eingesetzt.

4) Zur Vermeidung von Primerdimeren sollten im 3'-Bereich der Primer keine selbst- und paarweise komplementären Basenfolgen auftreten. Dies wurde mit dem Programm OligoAnalyzer 3.0 (IDT) verifiziert.

5) Primer sollten terminal am 3'- und 5'-Ende ein G oder C aufweisen.

6) Innerhalb der Primersequenz sollten sich direkt wiederholende Abfolgen der Nukleotide G und C vermieden werden. Ferner sollten keine repetitiven Sequenzen vorkommen.

Die Primer wurden von der Firma MWG bezogen.

## 2.2.6 Gerichtete Mutagenese

### 2.2.6.1 Prinzip und Durchführung

Der gezielte Basenaustausch innerhalb einer cDNA-Sequenz mit dem Ziel, eine oder mehrere Aminosäuren im resultierenden Protein durch definierte andere zu ersetzen wird als gerichtete Mutagenese bezeichnet. Die in dieser Arbeit beschriebenen Mutanten wurden unter Verwendung des „QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kits“ (Stratagene) nach Herstellerangaben erzeugt. Hierzu wurde doppelsträngige Plasmid-DNA mittels zweier zueinander komplementärer Oligonukleotid-Primer, die beide die gewünschte Mutation trugen, und einer *Proofreading*-Polymerase amplifiziert. Die parentale Matrizen-DNA wurde im Anschluss durch das methylierungssensitive Restriktionsenzym *DpnI* selektiv verdaut. Da die Matrizen-DNA in *dam*-positiven *E. coli*, repliziert wurde, trägt nur sie die für eine *DpnI*-Restriktion entscheidende Methylierung an der Base Guanin. Nach der Restriktion wurde der Ansatz, der jetzt nur noch die mutierte DNA enthielt, für eine Transformation kompetenter Bakterien (B.2.2.7.4) verwendet.

### 2.2.6.2 Auswahl der Mutagenese-Primer

Die verwendeten Mutagenese-Primer wurden von der Firma MWG synthetisiert und unter Berücksichtigung der allgemeinen Kriterien der Primer-Auswahl (B.2.2.5.2) nach folgenden zusätzlichen Kriterien ausgewählt:

- 1) *Sense*- und *antisense*-Primer müssen den/die gewünschten Basenaustausch(e) in der Mitte der Sequenz enthalten.
- 2) Die Primer müssen eine Länge zwischen 25 und 45 Nukleotiden aufweisen.
- 3) Die Primer sollten eine Schmelztemperatur ( $T_m$ )  $\geq 78^\circ\text{C}$  haben, wobei sich  $T_m$  nach folgender Formel berechnet:

$$T_m = 81,5 + 0,41 \times (\% \text{ GC}) - 675 / N - \% \text{ mismatch}$$

% GC und % *mismatch* sind ganze Zahlen.

N = Primerlänge in Basen

% *mismatch* = prozentualer Anteil der ausgetauschten Basen



## 2.2.7 Klonierungstechniken

### 2.2.7.1 Restriktionsverdau von DNA

Zur Überprüfung der Identität von Plasmid-DNA-Klonen oder zur Synthese klonierbarer Fragmente kann DNA durch Inkubation mit bakteriellen Restriktionsendonukleasen geschnitten werden. Hierzu binden diese Enzyme an spezifische Erkennungssequenzen und spalten hydrolytisch die Phosphodiesterbindungen beider DNA-Stränge. Die entstandenen Fragmente können einzelsträngige (kohäsive) Überhänge („*sticky ends*“) oder überhangslose (stumpfe) Enden („*blunt ends*“) aufweisen. Ein Standardansatz für einen Restriktionsverdau enthält:

0,5-1 µg DNA

2 µl Restriktionspuffer (10x)

1 U Restriktionsenzym

ad 20 µl H<sub>2</sub>O

Der Restriktionsverdau wurde im Wasserbad bei 37°C über einen Zeitraum von 1 h durchgeführt.

### 2.2.7.2 Klonierung von PCR-Produkten und Subklonierung von DNA

PCR-Produkte, welche nach Amplifikation mit Taq DNA-Polymerase einen 3'-dA-Überhang aufweisen (B.2.2.5), wurden nach Isolierung aus einem Agarosegel (B.2.2.4) und anschließender Aufreinigung (B.2.2.1.3) in den linearisierten Vektor pCR2.1 (Invitrogen) durch Ligation (B.2.2.7.3) eingebracht. Der Vektor pCR2.1 weist einen komplementären Thymidinrest am 3'-Ende auf, so dass eine direkte Ligation des PCR-Produktes in den Vektor möglich ist. Die MCS des Vektors befindet sich innerhalb des offenen Leserahmens des LacZ-Gens, das für das α-Fragment der β-Galaktosidase kodiert, und ermöglicht somit eine „Blau-weiß-Selektion“ positiver Klone. Bakterienkolonien, in denen das LacZ-Gen durch Insertion eines DNA-Fragments unterbrochen ist, bleiben nach Inkubation mit IPTG und X-Gal weiß, während Klone ohne Insertion aufgrund eines farbigen Spaltprodukts von X-Gal blau gefärbt sind. Nach Transformation des Ligationsproduktes in kompetente E. coli Bakterien (B.2.2.7.4) werden die Zellen deshalb auf XIA-Agarplatten ausplattiert, die Ampicillin, X-Gal und IPTG enthalten.

Zur Subklonierung eines DNA-Fragments in einen anderen Vektor wurden der Spendervektor und der Empfängervektor mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten. Idealerweise wurden zwei verschiedene Enzyme, welche einzelsträngige kohäsive Überhänge erzeugen, zur Erleichterung der Ligation verwendet (B.2.2.7.1). Konnte nur ein Restriktionsenzym verwendet werden, bestand die Möglichkeit, dass die zwei kompatiblen Enden des Vektors wieder miteinander ligieren können. Um dieses Problem zu minimieren, wurde die Vektor-DNA vor der Ligation mit SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*) nach den Anweisungen des Herstellers (MBI Fermentas) dephosphoryliert. Nach Isolierung der geschnittenen DNA-Fragmente aus einem Agarosegel (B.2.2.4) und anschließender Aufreinigung (B.2.2.1.3) wurden sie ligiert. Der Ligationsansatz konnte direkt zur Transformation kompetenter Bakterien genutzt werden (B.2.2.7.4).

### **2.2.7.3 Ligation von DNA-Enden**

Die Bildung einer Phosphodiesterbrücke zwischen einer 3'-Hydroxylgruppe und einer 5'-Phosphatgruppe wird unter Spaltung von ATP durch das Enzym T4-DNA-Ligase katalysiert. Um ein DNA-Fragment als *Insert* in einen Vektor zu ligieren, wurden standardmäßig 25 ng linearisierter Empfängervektor und das Insert im molaren Verhältnis 1 : 5 bis 1 : 10 mit Ligationspuffer, welcher ATP enthielt, und 1 U T4-DNA-Ligase in einem Volumen von 10 µl über Nacht bei 14°C inkubiert.

### **2.2.7.4 Transformation kompetenter Bakterien**

Zur Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Bakterien (XL1-Blue, Stratagene und NovaBlue, Novagen) wurde ein Aliquot von 50 µl Bakteriensuspension auf Eis aufgetaut, 1 - 2 µl Ligationsansatz zugegeben und vorsichtig gemischt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen einem Hitzeschock (30 s, 42°C) ausgesetzt, welcher die Transformationseffizienz erheblich erhöht. Nach erneuter zweiminütiger Inkubation auf Eis wurden 250 µl SOC-Medium (ohne Antibiotikum) zugegeben und die Bakteriensuspension für 10 - 30 min bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Während dieser Zeit können die transformierten Bakterien die für die Selektion entscheidenden Resistenzfaktoren exprimieren. Von diesem Ansatz wurden abschließend 50 - 250 µl auf einer Agarplatte, die das entsprechende Antibiotikum enthielt, ausgestrichen und für 12 -16 h bei 37°C inkubiert. Die mit Einzelkolonien bewachsenen Platten waren unter Luftausschluß bei 4°C für vier Wochen lagerbar.

### 2.2.7.5 Bakterien-Dauerkulturen

Zur Herstellung einer Bakterien-Dauerkultur wurden 3 ml LB/Amp-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und der Ansatz bei 37°C für 12 - 16 h im Schüttelinkubator inkubiert. In einem Einfrierröhrchen wurden 700 µl Bakteriensuspension und 300 µl Glycerol 50 % vorsichtig vermischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Glycerol verhindert die Bildung von Eiskristallen, die während des Einfrierprozesses die Bakterienzelle schädigen würden. Anschließend wurde die Mischung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

### 2.2.8 DNA-Sequenzierung

Subklonierte Plasmid-DNA wurde zur Überprüfung der Integrität des DNA-*Inserts* mit Didesoxynukleotiden und Fluoreszenzfarbstoff-markierten Primern (IRD 800) mittels Kettenabbruchsequenzierung nach Sanger et al. (1977) sequenziert. Es wurde das „Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP“ (Amersham) verwendet. Zunächst wurde ein Ansatz bestehend aus 1 µg DNA, 2 pmol Primer (IRD 800) und 0,7 µl DMSO mit H<sub>2</sub>O auf 21 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Von dieser DNA/Primer-Mischung wurden jeweils 4,5 µl zu 1,5 µl des A-, G-, C- und T-Reagenzes in vier separaten 500 µl-Reaktionsgefäßen pipettiert und mit 15 µl Mineralöl überschichtet. Die nachfolgenden Schritte fanden in einem Thermocycler statt:

1. initiale Denaturierung	2 min	95°C
2. Denaturierung	15 s	95°C
3. <i>Annealing</i>	15 s	Temperatur = T <sub>m</sub> (Primer) + 3°C
4. Elongation	15 s	70°C

Die Schritte 2 - 4 wurden 30x wiederholt.

Die mit 4 µl Stopp-Puffer versetzten Proben wurden durch Pipettieren auf Parafilm vom Mineralöl befreit und auf ein nach Vorschrift von MWG hergestelltes Sequenziergel (Sequagel XR, National Diagnostics) aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung und die Detektion der markierten Fragmente erfolgte im LI-COR DNA Sequencer 4200 (MWG) nach Vorschrift von MWG.

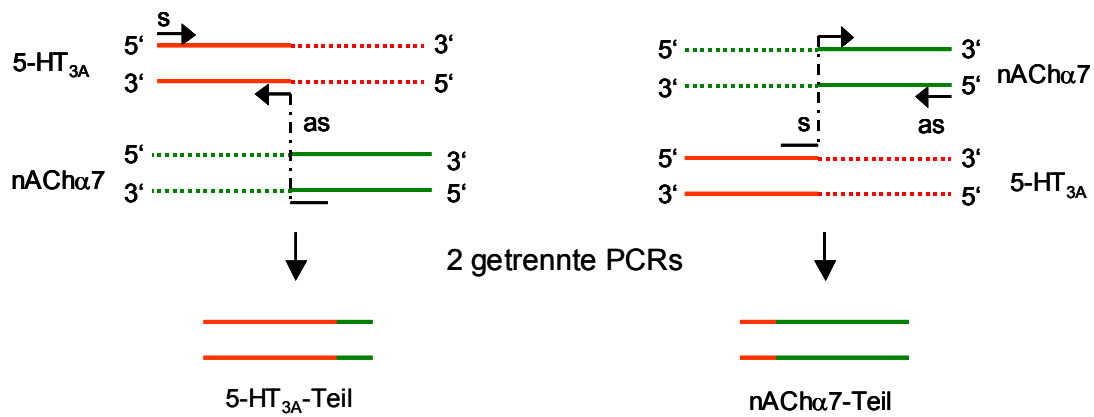
Die meisten Sequenzierungen wurden außer Haus von der Firma MWG durch Kettenabbruchsequenzierung nach Sanger et al. (1977) mit farbstoffmarkierten Didesoxynukleotiden durchgeführt.

### **2.2.9 Konstruktion rekombinanter DNA-Moleküle**

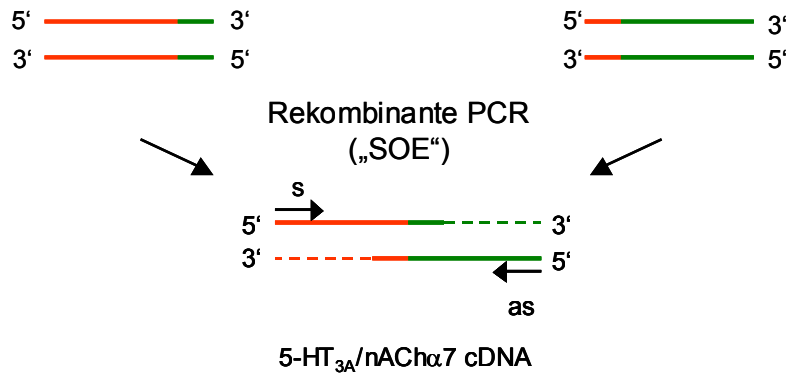
#### **2.2.9.1 Chimäre 5-HT<sub>3A</sub>-nACh $\alpha$ 7-Rezeptoren**

Die Konstruktion zweier chimärer 5-HT<sub>3A</sub>-nACh $\alpha$ 7-Rezeptor-cDNAs erfolgte durch sogenannte „*Splicing by overlap extension*“ (SOE). Dieses erstmals von Horton et al. (1990) beschriebene Verfahren ermöglicht es, DNA-Fragmente mit Hilfe der PCR-Technik an definierten Stellen sequenzunabhängig miteinander zu verknüpfen. Das Prinzip ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt. Im ersten Schritt wurden beide DNA-Fragmente zunächst in zwei separaten PCRs unter Verwendung Rezeptor-flankierender Primer und 5'-überhängender Primer, die an der Fusionsstelle zueinander komplementär sind, synthetisiert. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 1 dargestellt. Nach Aufreinigung der erhaltenen Amplikons, die zueinander komplementäre Sequenzen aufweisen, wurde in einer zweiten PCR, der sogenannten SOE, nach Hybridisierung beider Fragmente das chimäre 5-HT<sub>3A</sub>-nACh $\alpha$ 7-Konstrukt generiert und mit den Rezeptor-flankierenden Primern amplifiziert. Die PCRs wurden unter Einsatz der PfuTurbo Polymerase über 15 - 25 Zyklen durchgeführt. Nach Aufreinigung der zwei synthetisierten chimären cDNA-Konstrukte wurden diese in den Vektor pCR2.1 inkloniert und anschließend sequenziert. Die Subklonierung in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3 erfolgte mit den Restriktionsenzymen *Hind*III und *Xho*I.

1. Schritt



2. Schritt



**Abbildung 4: Schema der Konstruktion chimärer 5-HT<sub>3A</sub>-nACh<sub>α7</sub>-cDNAs nach dem Prinzip der „Splicing by overlap extension“ (SOE)**

s, sense-Primer; as, antisense-Primer

	Orientierung	Primersequenz 5' → 3'
<b>E272</b>	sense	CTGCCCCCAACAGTGGCGA/GAAGATTTCCCTGGGGATAAC
	antisense	GTTATCCCAGGGAAATCTTC/TCGCCACTGTTGGGGGCGAG
<b>A297</b>	sense	CGTTTCTGACACGCTGCCG/GCAACATCCGATTCGGTAC
	antisense	GTACCGAATCGGATGTTGC/CGGCAGCGTGTGAGAAACG
<b>Rezeptor-Primer</b>	5-HT <sub>3A</sub>	CTGAGCACTCGGAGGCACTC
	nACh <sub>α7</sub>	CATGTACAGAACCAGGCGTG

**Tabelle 1: Nukleotidsequenzen verwendeter Primer für die Konstruktion chimärer 5-HT<sub>3A</sub>/nACh<sub>α7</sub>-cDNAs**

Die Fusionsstellen zwischen der 5-HT<sub>3A</sub>- und der nACh<sub>α7</sub>-Nukleotidsequenz sind mit einem Schrägstrich gekennzeichnet. E272 und A297 sind die Bezeichnungen für die konstruierten Chimären und entsprechen der jeweiligen Aminosäure der 5-HT<sub>3A</sub>-Untereinheit, an welche sich die nACh<sub>α7</sub>-Sequenz anschließt.

### 2.2.9.2 Chimäre 5-HT<sub>3A</sub>-ECFP bzw. 5-HT<sub>3A</sub>-EYFP-Konstrukte

Die ECFP/EYFP-cDNAs wurden in die IZD zwischen TM3 und TM4 von 5-HT<sub>3A</sub> eingebracht. Hierzu wurde die Schnittstelle GC<sup>378</sup>TCAGC des Restriktionsenzym *Bpu1102I* zwischen Cystein 378 und Serin 379 in der 5-HT<sub>3A</sub>-cDNA genutzt. Die ECFP/EYFP-Inserts wurden durch PCR-Amplifikation der DNA-Matrizen pECFP-N1 und pEYFP-N1 (Invitrogen) mit PfuTurbo Polymerase unter Verwendung folgender Primern hergestellt:

*sense*: 5' ATTA GC/TCAGC C ATGGTGAGCAAGGGCGAG 3'

*antisense*: 5' ATTA GC/TGAGC C CTTGTACAGCTCGTCCATGCC 3'

Die Primer tragen vor der kodierenden Sequenz der Fluoreszenzproteine (grau hinterlegt) jeweils eine *Bpu1102I*-Schnittstelle (kursiv geschrieben) und ein zusätzliches Cytosin, um eine Leserasterverschiebung zu vermeiden.

Die mit *Bpu1102I* verdauten Konstrukte wurden in den mit *Bpu1102I* linearisierten und anschließend mit SAP dephosphorylierten 5-HT<sub>3A</sub>-pcDNA3-Vektor ligiert. Die Sequenz der entstandenen zwei chimären cDNA-Konstrukte wurde durch Sequenzierung kontrolliert. Die resultierenden Fusionsproteine haben die Form:

H<sub>2</sub>N-...C<sup>378</sup>SA-ECFP/EYFP-GSA...-COOH

Durch die Schnittstellen wurden die Aminosäuren Serin (S), Alanin (A) und Glycin (G) (grau hinterlegt) als *Linker* eingefügt.

### 2.2.9.3 Einführung des FIAsh-Tags in die 5-HT<sub>3A</sub>-cDNA

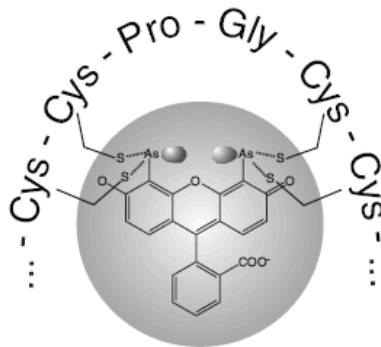
Ein Hybridsystem zur Fluoreszenzmarkierung von Proteinen stellt die erstmals von Adams et al. (2002) beschriebene FIAsh-Methode dar. Hierbei wird in das Protein eine Peptidsequenz bestehend aus einem Prolin-Glycin-Motiv, das von jeweils zwei Cysteinen flankiert wird, eingebracht. Der Fluorophor FIAsh (*Fluorescein Arsenical Hairpin Binder*), welcher durch die Zellmembran diffundiert, bindet anschließend spezifisch an die Markierungssequenz im Zielprotein (Abbildung 5). Da es bei der Insertion längerer Sequenzen wie z.B. GFP (236 AS) oftmals zu Störungen der Proteinassamblierung und der Funktion kommt, stellt die FIAsh-Methode eine Alternative zur konventionellen Fluoreszenzmarkierung mit GFP-Derivaten dar.

Das modifizierte FIAsh-Bindemotiv FLNCCPGCCMEP, welches zu stärkeren Fluoreszenzsignalen führt (Martin et al., 2005), wurde analog ECFP/EYFP in die große IZD von 5-HT<sub>3A</sub> eingefügt. Hierzu wurde ein 315 kb-Fragment der 5-HT<sub>3A</sub>-cDNA, welches von den Schnittstellen für *Bpu*1102I und *Nhe*I flankiert wurde, mittels PCR unter Verwendung von PfuTurbo Polymerase und der folgenden Primer, amplifiziert. Der *sense*-Primer enthielt die für das FIAsh-Bindemotiv-kodierende Nukleotidsequenz:

*sense*: 5' CACCAAGACTGATGACT GC/TCAGC TTCTTAAACTGCC  
CAGGATGCTGCATGGAACCAATGGGAAACCACTGCAGCCACATGGG 3'  
*antisense*: 5' CTGTAGGCCAGCACC GC/TAGC AGG 3'

Die Schnittstellen für *Bpu*1102I im *sense*-Primer und für *Nhe*I im *antisense*-Primer sind kursiv geschrieben. Die für das FIAsh-Bindemotiv kodierende Sequenz ist grau unterlegt.

Das erhaltene Amplikon wurde anschließend mit den beiden genannten Restriktionsenzymen verdaut und in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen 5-HT<sub>3A</sub>-pcDNA3-Vektor ligiert. Die Sequenz des entstandenen 5-HT<sub>3A</sub>-FIAsh-Konstrukts wurde durch Sequenzierung überprüft.



**Abbildung 5: Bindung des *Fluorescein Arsenical Hairpin Binders* (FIAsh) an das FIAsh-Bindemotiv**

Der FIAsh-Fluorophor ist in der Lage durch die Zellmembran zu diffundieren und bindet mit hoher Affinität an diese selten in endogenen Proteinen vorkommende Aminosäuresequenz, was zu einem starken Fluoreszenzsignal führt.

### 2.2.10 Isolierung von RNA aus Säugerzellen

Die Präparation von Gesamt-RNA aus Säugerzellen erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers. Hierfür dienten jeweils 0,5 -

1 x 10<sup>7</sup> Zellen als Ausgangsmaterial. Zur Entfernung von Verunreinigungen durch genomische DNA wurde mit dem RNase-Free DNase Set (Quiagen) ein DNase-Verdau direkt auf der Säule durchgeführt. Die RNA wurde mit 50 µl H<sub>2</sub>O (RNeasy Mini Kit, Qiagen) eluiert und nach der Konzentrationsbestimmung (B.2.2.2) sofort für die reverse Transkription eingesetzt.

### **2.2.11 Reverse Transkription (RT)**

Die Synthese der cDNA erfolgte mit dem „RevertAid First Strand cDNA synthesis Kit“ (MBI Fermentas) nach dem Protokoll des Herstellers. Das Kit beinhaltet die MMLV-Reverse Transkriptase aus dem *Moloney-Maus-Leukämie-Virus*. In einem Ansatz von 20 µl wurden generell 2 µg Gesamt-RNA-Mengen unter Verwendung der „*Random Hexamer*“-Primer umgeschrieben.

### **2.2.12 Transfektion von Säugerzelllinien**

#### **2.2.12.1 Transiente Transfektion**

##### **2.2.12.1.1 Transfektion mit TransIT-293**

Die transiente Transfektion von HEK293-, BOSC23- und SH-EP1-Zellen erfolgte mit dem Reagenz TransIT-293 (Mirus) per Lipofektion. Die Zellen wurden je nach Versuch in 25 cm<sup>2</sup>-, 75 cm<sup>2</sup>- oder 175 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen in Medium ohne P/S 24 h vor der Transfektion ausgesät. Die Konfluenz der Zellen musste am Tag der Transfektion ca. 50 - 80 % betragen. Pro cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche wurden 0,47 µl Transfektionsreagenz eingesetzt. Dazu wurde zunächst Medium ohne FKS und P/S mit dem Transfektionsreagenz gemischt (21,4 µl Medium pro µl) und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5 µl DNA-Lösung (1 µg/µl) pro cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche. Nach vorsichtigem Mischen wurde die Lösung für weitere 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde schließlich tropfenweise zu den Zellen pipettiert und die transfizierten Zellen nach 48 h Inkubationszeit für die weitere Analyse verwendet.

##### **2.2.12.1.2 Transfektion mit Lipofectamine 2000**

Die transiente Transfektion von CHO-K1- und GH4-C1-Zellen erfolgte mit dem Reagenz Lipofectamine 2000 (Invitrogen) per Lipofektion. Die Zellen wurden je nach Versuch in 25 cm<sup>2</sup>- oder 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen in Medium ohne P/S 24 h vor



der Transfektion ausgesät. Die Konfluenz der Zellen musste am Tag der Transfektion ca. 70 - 90 % betragen. Pro  $\text{cm}^2$  Wachstumsfläche wurde 1  $\mu\text{l}$  Transfektionsreagenz eingesetzt. Dazu wurde zunächst Medium ohne FKS und P/S mit dem Transfektionsreagenz gemischt (25  $\mu\text{l}$  Medium pro  $\mu\text{l}$ ). In einem getrennten Ansatz wurden 1  $\mu\text{l}$  DNA-Lösung (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) pro  $\text{cm}^2$  Wachstumsfläche und Medium gemischt (62,5  $\mu\text{l}$  Medium pro  $\mu\text{l}$  DNA-Lösung). Beide Ansätze wurden für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend miteinander gemischt und für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde schließlich tropfenweise zu den Zellen pipettiert und die transfizierten Zellen nach 48 h Inkubationszeit für die weitere Analyse verwendet.

### **2.2.12.1.3 Transfektion durch Calciumphosphatpräzipitation**

Die Transfektion von HEK293-Zellen für Patch-Clamp-Messungen erfolgte mittels Calciumphosphatpräzipitation nach Chen und Okayama (1987). Hierfür wurden die Zellen in 10  $\text{cm}^2$ -Zellkulturschalen in Medium ohne FKS und P/S 24 h vor der Transfektion ausgesät. Die Konfluenz der Zellen musste am Tag der Transfektion ca. 30 - 50 % betragen. Zunächst wurden 4  $\mu\text{l}$  DNA-Lösung (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) tropfenweise zu 100  $\mu\text{l}$  0,25 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung gegeben und der Ansatz gemischt. Anschließend erfolgte die tropfenweise Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  BBS 2x-Lösung. Nach dem Mischen wurde der Transfektionsansatz für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, währenddessen die DNA mit den Calciumionen bei pH 6,95 präzipitierte. Der leicht getrübe Ansatz wurde schließlich tropfenweise zu den Zellen pipettiert. Die Zellen wurden für 20 h bei 35°C und 3 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Die weitere Inkubation erfolgte nach zweimaligem Waschen mit PBS und Zugabe frischen Kulturmediums bei 37°C und 5 %  $\text{CO}_2$  für 24 h.

### **2.2.12.2 Herstellung stabil transfizierter Mischklone**

Im Verlauf der Arbeit wurden einerseits HEK293-Zellen stabil mit 5-HT<sub>3A</sub>-Mutanten in pcDNA3 (G418-Resistenzgen) und andererseits GH4-C1-Zellen stabil mit pG5A (Apoaequorin-EGFP-exprimierender Vektor, G418-Resistenzgen, freundliche Gabe von Prof. L. Hein) und nACh $\alpha$ 7 in pcDNA3.1 Hygro(-) (Hygromycin B-Resistenzgen) transfiziert. Die Zellen wurden in 25  $\text{cm}^2$ -Kulturflaschen 24 h vor der Transfektion ausgesät. Die Konfluenz der Zellen musste am Tag der Transfektion 20 - 30 % betragen. Die Transfektion wurde wie unter B.2.2.12.1 beschrieben durchgeführt. Die Selektion stabil transfizierter Zellen mit dem

entsprechenden Selektionsantibiotikum erfolgte ab 72 h bis 21 d nach der Transfektion.

Bei HEK293-Zellen, die mit 5-HT<sub>3A</sub>-Mutanten in pcDNA3 transfiziert wurden, erfolgte die Selektion stabil transfizierter Zellen mit 800 µg/ml G418.

GH4-C1-Zellen wurden zunächst mit pG5A transfiziert und stabil transfizierte Zellen mit 500 µg/ml G418 selektiert. Der entstandene GH4-C1 pG5A-Mischklon wurde anschließend mit nACh $\alpha$ 7 in pcDNA3.1 Hygro(-) transfiziert. Die Selektion stabil transfizierter Zellen erfolgte in diesem Fall mit 200 mg/ml Hygromycin B, so dass daraus der doppelt transfizierte Mischklon GH4-C1 pG5A h $\alpha$ 7 resultierte.

### **2.3 Biochemische Methoden**

#### **2.3.1 Membranpräparation**

Die Gewinnung von Zellmembranen eukaryotischer Zellen für Radioligandbindungsstudien erfolgte mittels Differentialzentrifugation. Alle Präparationsschritte erfolgten bei 4°C. Nach Entfernen des Kulturmediums wurden die adhärenen Zellen einmal mit Bindungspuffer gewaschen, nach Zugabe von etwas Bindungspuffer mit einem Zellschaber vom Kulturflaschenboden abgeschabt und durch Zentrifugieren für 4 min bei 180 g pelletiert. Die pelletierten Zellen wurden in 3 ml Bindungspuffer resuspendiert und mit dem Ultra-Turrax (Stufe 5-6, 2 x 10 s) auf Eis homogenisiert. Um Zellbestandteile höherer Dichte von den gewünschten rezeptorhaltigen Membranfragmenten zu separieren, wurde das Zellhomogenat für 4 min bei 1000 g zentrifugiert. Das resultierende Pellet, das aus Zellkernen, Mitochondrien und größeren Zellfragmenten bestand, wurde verworfen. Der Überstand wurde für 50 min bei 40 000 g zentrifugiert. Das nun erhaltene Pellet wurde in 200 - 500 µl Bindungspuffer resuspendiert und die Membransuspension mittels Spritze und Kanüle (0,4 x 20 mm) homogenisiert. Anschließend wurde der Proteingehalt, wie unter B.2.3.2 beschrieben, bestimmt und auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Die Membranen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert.

#### **2.3.2 Proteinbestimmung nach Lowry**

Die Proteinbestimmung wurde nach (Lowry et al., 1951) durchgeführt. Sie basiert auf der intensiven Blaufärbung nach Reaktion eines Kupfer-Protein-Komplexes mit Folin-Ciocalteaus-Phenol-Reagenz. Die Farbintensität der Reaktion korreliert mit der Menge des in der Probe enthaltenen Proteins und kann somit auf Grundlage

des Lambert-Beerschen Gesetzes quantitativ photometrisch erfasst werden. Zunächst wurden folgende Ansätze hergestellt:

100 µl BSA-Standard (50/100/300/500/700 mg/l) + 10 µl Bindungspuffer + 890 µl H<sub>2</sub>O

10 µl Proteinprobe + 990 µl H<sub>2</sub>O

10 µl Bindungspuffer + 990 µl H<sub>2</sub>O (Leerwert)

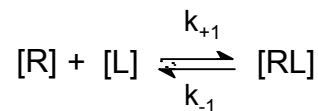
Jeder Ansatz wurde mit 2 ml frisch hergestellter Lösung A (B.1.7.3.1) versetzt, gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit bildet sich ein Komplex zwischen den Peptidbindungen der Proteine und Kupfer(II)-Ionen in alkalischer Lösung (Biuretreaktion). Anschließend wurden 200 µl Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz zugegeben, sofort gemischt und weitere 50 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die photometrische Messung erfolgte nach Nullabgleich gegen den proteinfreien Leerwert bei einer Wellenlänge von 750 nm. Mittels der Eichgeraden konnte die Probenkonzentration durch lineare Regression ermittelt werden.

## 2.4 Pharmakologische Methoden

### 2.4.1 Radioligandbindungsstudien

#### 2.4.1.1 Theoretische Grundlagen

Im Falle der reversiblen Bindung eines Liganden an einen Rezeptor laufen parallel Assoziations- und Dissoziationsvorgänge ab. Es gilt das Massenwirkungsgesetz:



[L], [R]: Konzentration des Liganden bzw. des Rezeptors

$k_{+1}$ ,  $k_{-1}$ : Geschwindigkeitskonstante der Assoziation bzw. der Dissoziation

[RL]: Konzentration des Rezeptor-Ligand-Komplexes

Befindet sich die Reaktion im Gleichgewicht, d.h., laufen Hin- und Rückreaktion mit gleicher Geschwindigkeit ab, ergibt sich für die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante  $K_D$  folgender Zusammenhang:

$$1) \quad K_D = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{[R] \cdot [L]}{[RL]}$$

$K_D$  entspricht derjenigen Konzentration des Liganden, bei der die Hälfte der vorhandenen Rezeptoren besetzt ist.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Membransuspensionen bzw. Zellen, die den zu charakterisierenden Rezeptor enthielten, mit dem [ $^3$ H]-markierten Radioliganden inkubiert, bis das Bindungsgleichgewicht erreicht war. Dabei wurden zu einer fixen Menge der Membransuspension bzw. Zellen steigende Konzentrationen des Radioliganden gegeben, d.h. sogenannte Sättigungsexperimente durchgeführt. Auf diese Weise erfolgte die Bestimmung der Gleichgewichts-Dissoziationskonstante  $K_D$  des Radioliganden und der Gesamtanzahl an vorhandenen Bindungsstellen ( $B_{\max}$ ).  $B_{\max}$  errechnet sich aus der Summe von freien und besetzten Rezeptoren:

$$2) \quad B_{\max} = [R] + [RL]$$

Zur Ermittlung der spezifischen Bindung für jede Radioligandkonzentration wurde die jeweils bestimmte unspezifische nicht rezeptorvermittelte Bindung von der gemessenen Gesamtbindung subtrahiert. Die Bindungsparameter  $B_{\max}$  und  $K_D$  wurden unter Verwendung des Computerprogramms GraphPad Prism 4.0 durch nichtlineare Regressionsanalyse auf der Grundlage folgender Beziehung, die sich aus Gleichung 1 und 2 ergibt, bestimmt:

$$[RL] = \frac{B_{\max} \cdot [L]}{[L] + K_D}$$

Aufgrund dessen, dass in vielen Experimenten trotz Erhöhung des Reaktionsvolumens mehr als 10 % der zugegebenen Radioligandkonzentration ( $[^3$ H]GR65630) in gebundener Form vorlagen, war die Konzentration im Gleichgewicht geringer als angenommen. Dieses Phänomen wird als „Ligandenverarmung“ bezeichnet.

Demzufolge wurde die wahre Konzentration an freiem Liganden durch Subtraktion der dpm der gemessenen Gesamtbindung von den dpm des zugegebenen Liganden für jeden Versuch berechnet.

#### **2.4.1.2 Durchführung der Radioligandbindungsstudien**

##### **2.4.1.2.1 Bindung an Membranen**

Für die Sättigungsexperimente wurden Membranen, die wie unter B.2.3.1 beschrieben präpariert wurden, verwendet. Die Bindung an 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren und 5-HT<sub>3A</sub>-nACh $\alpha$ 7-Chimären erfolgte unter Einsatz von 3 - 5  $\mu$ g Membranprotein pro Ansatz mit dem 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten [<sup>3</sup>H]GR65630. Die Bindung an nACh $\alpha$ 7-Rezeptoren wurde mit jeweils 15 - 30  $\mu$ g Membranprotein und dem nACh $\alpha$ 7-Antagonisten [<sup>3</sup>H] $\alpha$ -Bgt durchgeführt. Zu Beginn wurden jeweils 50  $\mu$ l der Membransuspension, die auf die gewünschte Proteinkonzentration eingestellt wurde (B.2.3.2), in 2 ml-Reaktionsgefäßen ohne Deckel vorgelegt. Anschließend erfolgte die Zugabe steigender Konzentrationen des Radioliganden. Im Falle der Bindung mit [<sup>3</sup>H]GR65630 wurden jeweils 700  $\mu$ l der Substanzverdünnung in Bindungspuffer eingesetzt, so dass ein Gesamtvolumen von 750  $\mu$ l vorlag. Die Inkubationszeit bei Raumtemperatur betrug 60 min. Die [<sup>3</sup>H] $\alpha$ -Bgt-Bindung erfolgte über 90 min bei Raumtemperatur unter Einsatz von 450  $\mu$ l Substanzverdünnung pro Ansatz in einem Gesamtvolumen von 500  $\mu$ l. Für jede Konzentration wurde eine Doppel- oder Dreifachbestimmung durchgeführt. Zur Ermittlung der unspezifischen Bindung wurden Membranen nichttransfizierter Zellen eingesetzt. Die Beendigung der Reaktion erfolgte durch Vakuumfiltration der Reaktionsansätze über GF/B-Glasfaserfilter (mit 0,5 % PEI beschichtet) in einem Zellharvester (Brandel). Die Filter mit den zurückgehaltenen Membranen wurden dreimal mit 2 ml eiskaltem Bindungspuffer gewaschen und in Zählröhrchen überführt. Nach Zugabe von 5 ml Szintillationscocktail wurden diese über Nacht geschüttelt und anschließend die enthaltene Radioaktivität durch Ermittlung der dpm-Werte in einem Flüssigszintillationszählers (Beckman) quantifiziert.

##### **2.4.1.2.2 Bindung an Zellen in Suspension**

Für Bindungsversuche an intakten Zellen wurden die bei Bedarf transfizierten Zellen am Versuchstag zunächst mit Accutase vom Kulturflaschenboden abgelöst und in Bindungspuffer resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl wie unter

B.2.1.3 beschrieben bestimmt und auf  $1,11 \times 10^6$  Zellen ( $[^3\text{H}]$ GR65630-Bindung) bzw.  $6,67 \times 10^6$  Zellen ( $[^3\text{H}]\alpha$ -Bgt-Bindung) pro ml eingestellt. Die Hälfte der Zellsuspension wurde mit Saponin (0,1 % m/V) versetzt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Zellmembranen zu permeabilisieren. Zur anderen Hälfte wurde das gleiche Volumen an Bindungspuffer gegeben. Es erfolgte die Vorlage von jeweils 50  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension in 2 ml-Reaktionsgefäßen ohne Deckel und die Reaktion wurde durch Zugabe von 450  $\mu\text{l}$  der Radioligandverdünnung in Bindungspuffer gestartet. Zur Verminderung der unspezifischen Bindung enthielt der Bindungspuffer für die  $[^3\text{H}]\alpha$ -Bgt-Bindung 0,05 % BSA. Im Falle der  $[^3\text{H}]$ GR65630-Bindung wurden Sättigungsexperimente mit steigenden Konzentrationen (0,03 - 3 nM) des Radioliganden durchgeführt, währenddessen die  $[^3\text{H}]\alpha$ -Bgt-Bindung nur bei einer Konzentration (3 nM) erfolgte. Die Inkubationszeit bei Raumtemperatur betrug 30 min ( $[^3\text{H}]$ GR65630-Bindung) bzw. 60 min ( $[^3\text{H}]\alpha$ -Bgt-Bindung). Die weiteren Schritte erfolgten wie unter B.2.4.1.2.1 beschrieben.

### **2.4.1.2.3 Bindung an adhärenen Zellen**

Für  $[^3\text{H}]$ GR65630-Bindungsversuche an adhärenen Zellen wurden HEK293-Zellen in mit Polyornithin beschichteten 24er Multiwell-Platten ausgesät und mit den entsprechenden 5-HT<sub>3</sub>-Untereinheiten-cDNAs transfiziert. Die Polyornithinbeschichtung gewährleistet ein festeres Anheften der Zellen an den Kulturgefäßboden, was Zellverluste während Wasch- und Inkubationsschritten vermindert. Vor dem Versuch wurden die Zellen mit 2 x 1 ml Bindungspuffer gewaschen und anschließend für 120 min mit 500  $\mu\text{l}$  1 nM  $[^3\text{H}]$ GR65630 in Bindungspuffer bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Bestimmung des Zeitverlaufs der Bindung wurden die Zellen über verschiedene Zeiten (15 - 150 min) mit  $[^3\text{H}]$ GR65630 bei Raumtemperatur oder 4°C inkubiert. Das Beenden der Reaktion erfolgte durch das Absaugen der Inkubationslösung und Waschen der Zellen mit 3 x 1 ml eiskaltem Bindungspuffer. Anschließend wurden die Zellen mit 500  $\mu\text{l}$  0,1 % Triton X-100 Lösung pro Vertiefung lysiert. In einem Zählröhrchen wurden 300  $\mu\text{l}$  dieses Zelllysates mit 5 ml Szintillationscocktail gemischt und die enthaltene Radioaktivität im Flüssigszintillationszähler quantifiziert. Ein Aliquot von 100  $\mu\text{l}$  wurde für die Proteinbestimmung (B.2.3.2) verwendet.

## 2.4.2 Aequorin-Assays

### 2.4.2.1 Entdeckung und Einsatz von Aequorin

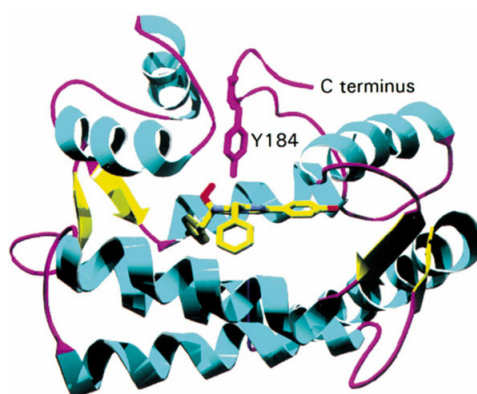
Aequorin wurde ursprünglich von dem Japaner Osamu Shimomura aus *Aequorea victoria*, einer Quallenart, die im Nordostpazifik vorkommt, isoliert und als  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiges Fotoprotein identifiziert (Shimomura et al., 1962). Fünf Jahre später wurde es erstmals genutzt, um intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  in Muskelfasern von Krebsen zu untersuchen (Ridgway und Ashley, 1967). Aufgrund der Klonierung der Aequorin-cDNA durch zwei unabhängige Gruppen wurde die heterologe Expression in verschiedensten Zellarten möglich (Inouye et al., 1985; Prasher et al., 1985). Es wird heute hauptsächlich zur Messung Rezeptor-vermittelter Änderungen des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels bzw. in Form rekombinanter Moleküle, die in spezifischen Zellorganellen exprimiert werden, zur Untersuchung von zellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwegen eingesetzt (Chiesa et al., 2001).

### 2.4.2.2 Aequorinstruktur und Mechanismus der Lumineszenz

Der Aequorinkomplex besteht aus Apoaequorin, einem globulären Protein von 22 kDa, und der prosthetischen Gruppe Coelenterazin. Aequorin besitzt drei sogenannte EF-Hand-Motive, die in der Lage sind,  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zu binden (Inouye et al., 1985). Des Weiteren befindet sich im Zentrum eine hydrophobe Bindungstasche für Coelenterazin (Abbildung 6) (Head et al., 2000), welches über eine Peroxidstruktur an das Protein gebunden vorliegt (Abbildung 7) (Shimomura und Johnson, 1978).

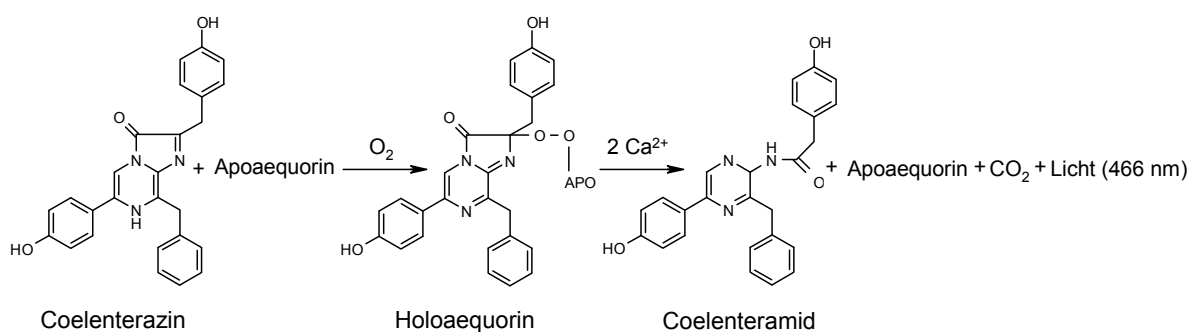
Der Mechanismus der Chemilumineszenzreaktion ist in Abbildung 7 dargestellt. Binden zwei  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (Shimomura, 1995b), welche im Falle des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors durch den geöffneten Kanal in die Zelle gelangen, an das Holoaequorin, bestehend aus Apoaequorin und Coelenterazin, kommt es durch eine Konformationsänderung des Proteins zur Destabilisierung der Peroxidgruppe und damit zum Zerfall des Coelenterazinhydroperoxids zu Coelenteramid und  $\text{CO}_2$  unter Emission von Licht (Shimomura et al., 1974; Shimomura, 1995a).

Die Benennung Apo- bzw. Holoaequorin, welche vermuten lässt, dass es sich bei Aequorin um ein Enzym handelt, ist etwas irreführend, da es ursprünglich nicht als Enzym klassifiziert wurde (Prendergast, 2000). Allerdings konnte die Enzymaktivität des Komplexes aus  $\text{Ca}^{2+}$ -Apoaequorin und Coelenteramid nachgewiesen werden (Inouye, 2004).



**Abbildung 6: Bändermodell des Aequorins**

$\alpha$ -Helizes sind in blaugrün,  $\beta$ -Faltblattstrukturen in gelb und Schleifen in magenta dargestellt. Coelenterazin und Tyrosin 184 sind im Stäbchenmodell abgebildet. Das Coelenterazinhydroperoxid wird über eine Wasserstoffbrücke mit dem phenolischen Sauerstoff des Tyrosins stabilisiert (Head et al., 2000).

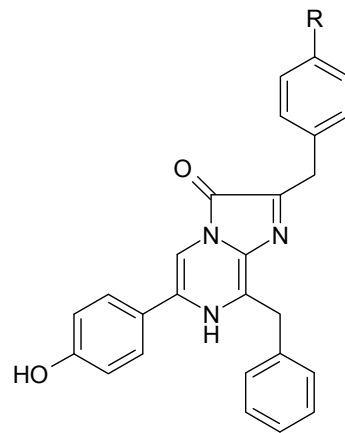


**Abbildung 7: Ca<sup>2+</sup>-abhängige Entwicklung der Lumineszenz durch den Aequorin-komplex bestehend aus Apoaequorin und Coelenterazin**

### 2.4.2.3 Coelenterazinanaloga

Durch chemische Strukturveränderung des nativen Coelenterazins wurden eine Reihe verschiedener Coelenterazinanaloga synthetisiert. Die daraus gebildeten semisynthetischen Aequorine unterscheiden sich vor allem hinsichtlich ihrer relativen Lumineszenzintensität und ihrer Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität von nativem Aequorin. In den vorliegenden Versuchen wurde Benzylcoelenterazin (Coelenterazin-*h*) (Abbildung 8) eingesetzt. Das entsprechende semisynthetische Aequorin zeichnet sich im Vergleich zu nativem Aequorin durch eine höhere Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität und eine 16-fach stärkere Lumineszenzintensität aus (Shimomura et al., 1993; Knight et al., 1993).





R = OH; natives Coelenterazin  
R = H; Benzylcoelenterazin, Coelenterazin-*h*

### Abbildung 8: Strukturformeln von Coelenterazinderivaten

Coelenterazine, welche als chromophore Gruppen des Aequorinkomplexes fungieren, weisen die chemische Struktur eines Imidazopyrazinons auf.

#### 2.4.2.4 Modifizierter $\text{Ca}^{2+}$ -Assay unter Verwendung eines Aequorin-EGFP-Fusionsproteins

In der Qualle *Aequorea victoria* liegt Aequorin mit GFP assoziiert vor (Shimomura et al., 1962). Nach der Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an Aequorin wird die freiwerdende Energie strahlungslos auf den Akzeptorfluorophor GFP übertragen, der grünes Licht ( $\lambda_{\text{max}}$  509 nm) emittiert, wenn er vom angeregten Zustand in den Grundzustand zurückfällt (Cubitt et al., 1995). Dieser intermolekulare strahlungslose Energietransfer erhöht die Ausbeute des Biolumineszenzprozesses. In Anlehnung an das Prinzip erfolgte die Konstruktion eines Fusionsproteins aus Aequorin und EGFP, welche über ein Verbindungsstück bestimmter Länge verknüpft sind, durch Baubet et al. (2000). Die Verwendung dieses Fusionskonstruktes (= pG5A) erlaubt einen effizienten intramolekularen Chemilumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer (CRET), so dass das resultierende Lichtsignal um ein Vielfaches größer ist als bei Verwendung von Aequorin alleine (Baubet et al., 2000).

Eingesetzt wurde diese Methode zur Untersuchung der Wirkung von Dopamin auf den 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor, da dieses als Partialagonist nur kleine Lumineszenzsignale hervorruft, die mit dem herkömmlichen Aequorin-Assay nicht mit ausreichender Genauigkeit detektiert werden konnten.

#### 2.4.2.5 Durchführung des Aequorin-Assays

Die Zellen wurden 48 h vor dem Versuch mit der Apoaequorin-cDNA und der Rezeptor-cDNA kotransfiziert (siehe B.2.2.12.1). Am Versuchstag wurden die

adhärenten Zellen vom Boden der Kulturflasche abgelöst, durch Zentrifugation (180 g, 4 min) pelletiert und in 1,5 ml (75 cm<sup>2</sup>-Flasche) bzw. 0,5 ml (25 cm<sup>2</sup>-Flasche) Kulturmedium unter Zusatz von 0,1 % (m/V) BSA resuspendiert. Die folgenden Schritte erfolgten unter Lichtschutz. Die Zellen wurden nun über einen Zeitraum von 2,5 h bei Raumtemperatur unter Zusatz von 5 µM Coelenterazin-*h* inkubiert. Anschließend erfolgte eine erneute Pelletierung der Zellen durch Zentrifugation (45 g, 3 min) und die Resuspension in einem entsprechenden Volumen Aequorin-Assaypuffer. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 20 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Messung des Agonist-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Einstroms erfolgte im Centro LB 960-Luminometer (Berthold), welches mit einem Autoinjektor ausgestattet ist, der eine schnelle Lösungsinjektion und simultane Messung ermöglicht. Die Lumineszenz wurde mit Hilfe der Mikrowin 2000-Software (Mikrotek) im Kinetikmodus bei einer Aufnahmezeit von 2 Hz gemessen. Die gemessenen Werte werden in sogenannten RLUs (*Relative Light Units*) angegeben.

Die Messung Agonist-konzentrationsabhängiger Lumineszenzsignale erfolgte in weißen 96er Multiwell-Platten aus Teflon, in welche 80 µl der Zellsuspension pro Vertiefung vorgelegt wurden. Zunächst wurde über 5 s die Lumineszenz im Ruhezustand (Basislumineszenz) gemessen. Nach der automatischen Injektion von 20 µl der Agonistenlösung erfolgte die Aufzeichnung der Lumineszenz über einen Zeitraum von maximal 60 s.

Zur Messung Antagonist-konzentrationsabhängiger Lumineszenzsignale wurden jeweils 60 µl der Zellsuspension mit 20 µl der Antagonistenlösung pro Vertiefung für 15 min bei Raumtemperatur vorinkubiert, um einen Gleichgewichtszustand zu erreichen. Die folgenden Schritte erfolgten analog der Messung Agonist-konzentrationsabhängiger Signale.

Im Falle der Bestimmung von 5-HT-Maximaleffekten ( $E_{max}$ ) wurden die Zellen nach Messung der 5-HT-induzierten Lumineszenz durch Autoinjektion von 100 µl Aequorin-Assay-Lysispuffer lysiert und die resultierende Lumineszenz für 15 s aufgezeichnet. Durch die Zellyse wird das verbleibende Aequorin freigesetzt und führt durch Bindung der im Puffer enthaltenen Ca<sup>2+</sup>-Ionen zur maximal möglichen Lumineszenzantwort ( $RLU_{max}$ ). Dieses Vorgehen dient dem Zweck, dass Unterschiede in der Zellzahl oder Transfektionseffizienz ausgeglichen werden.

In allen Versuchen wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

### 2.4.2.6 Datenanalyse

Die Rohdaten wurden in das Programm GraphPad Prism 4.0/5.0 exportiert, mit welchem die Auswertung erfolgte.

Der Lumineszenzpeak eines Agonist-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms wurde nach Abzug der Basislumineszenz erhalten.

Bei Experimenten zur Bestimmung des Maximaleffekts von 5-HT an 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren wurde die Agonist-induzierte Lumineszenzantwort ( $\text{RLU}_{\text{peak}}$ ) auf die Gesamtlumineszenz ( $\text{RLU}_{\text{peak}} + \text{RLU}_{\text{max}}$ ) normalisiert. Dies erfolgte durch Berechnung nach folgender Gleichung:

$$\text{normalisierte Lumineszenz} = \frac{\text{RLU}_{\text{peak}}}{\text{RLU}_{\text{peak}} + \text{RLU}_{\text{max}}}$$

Zur Erstellung von Konzentrations-Wirkungskurven wurden zunächst die Lumineszenzsignale auf die jeweilige Kontrolle normalisiert. Im Falle eines Agonisten entsprach die Kontrolle der Konzentration des Agonisten, welche die größte Lumineszenzantwort auslöste. Wurde ein Antagonist untersucht, erfolgte die Normalisierung auf das Lumineszenzsignal des Agonisten in Abwesenheit des Antagonisten. Wurden die normalisierten Werte (Y) gegen den dekadischen Logarithmus der Agonisten- bzw. Antagonistenkonzentration (X) aufgetragen, konnten nach nichtlinearer Regression aus der resultierenden sigmoidalen Konzentrations-Wirkungskurve Parameter wie  $\text{EC}_{50}$ ,  $\text{IC}_{50}$  (bzw.  $-\log(p) \text{EC}_{50}$  bzw.  $\text{pIC}_{50}$ ) und Hill-Koeffizient ( $n_H$ ) ermittelt werden. Dabei gilt nach der Hill-Gleichung:

$$Y = \text{Minimum} + \frac{\text{Maximum} - \text{Minimum}}{1 + 10^{(\log \text{EC}_{50} - X) n_H}}$$

\*Bei einer Konzentrations-Wirkungskurve eines Antagonisten steht an dieser Stelle  $\log \text{IC}_{50}$ .

Im Falle biphasischer Konzentrations-Wirkungsbeziehungen wurden die Daten anhand folgender Gleichung ausgewertet, die als Summe zweier Hill-Gleichungen beschrieben werden kann:

$$\text{Teil 1} = \frac{(\text{Maximum} - \text{Minimum}) \cdot F}{1 + 10^{(\log \text{EC}_{50} 1 - X) n_H 1}}$$

$$\text{Teil 2} = \frac{(\text{Maximum} - \text{Minimum}) \cdot (1 - F)}{1 + 10^{(\log \text{EC}_{50} 2 - X) n_H 2}}$$

$$Y = \text{Minimum} + \text{Teil 1} + \text{Teil 2}$$

$\log EC_{50} 1/2$  und  $n_H 1/2$ : Konstanten der jeweiligen Fraktion

F: Fraktion der höheren Potenz des Agonisten

Da die ermittelten  $IC_{50}$ -Werte für Antagonisten abhängig von der eingesetzten Agonist-Konzentration ( $[Ag]$ ) sind, wurden sie in Inhibitionskonstanten ( $K_I$ -Werte) anhand der Gleichung nach Cheng und Prusoff (1973) umgerechnet:

$$IC_{50} = K_I \cdot \left( 1 + \frac{[Ag]}{EC_{50}} \right)$$

### 2.4.3 Patch-Clamp-Messungen

Die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden freundlicherweise von Herrn PD Dr. Martin Barann aus der Abteilung „Experimentelle Anästhesiologie“ des Universitätsklinikums Bonn durchgeführt.

#### 2.4.3.1 Aufnahme makroskopischer Ströme

Die Aufnahme makroskopischer Ströme erfolgte im Falle des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors in der „*excised outside-out*“-Konfiguration. Hierbei wird die Pipette (Ableitungselektrode) auf die Zellmembran aufgesetzt und ein Unterdruck erzeugt, der zum Durchbruch der Membran führt. Wird die Pipette nun gleichmäßig nach oben gezogen, bleibt nur ein kleiner Teil der Membran (*Patch*) an der Pipettenspitze hängen. Die Außenseite des *Patches* ist dann der Badlösung zugewandt.

Ströme durch den nACh $\alpha$ 7-Rezeptorkanal wurden mittels Ganzzelleableitungen („*whole cell*“-Konfiguration) erfasst. Bei dieser Messkonfiguration wird durch vorsichtiges Anlegen eines Unterdrucks an die Pipette ein *Patch* angesaugt und schließlich durchbrochen.

Stromantworten auf 5-HT (30  $\mu$ M) und ACh (1 mM) im Falle des 5-HT<sub>3A</sub>- bzw. nACh $\alpha$ 7-Rezeptors wurden im Spannungsklemmen-Modus („*voltage-clamp*“) aufgezeichnet. Vor Beginn der Messungen wurde das Zellkulturmedium durch „extrazelluläre Lösung“ der folgenden Zusammensetzung (in mM) ersetzt: NaCl, 150; KCl, 5.6; CaCl<sub>2</sub>, 1.8; MgCl<sub>2</sub>, 1.0; HEPES, 10; D-Glukose, 20; pH 7.4. Die Patchpipetten, die einen Widerstand von 3 - 6 m $\Omega$  besaßen, wurden mit

„intrazellulärer Lösung“ folgender Zusammensetzung (in mM) gefüllt: KCl, 140; EGTA, 10; MgCl<sub>2</sub>, 5; HEPES, 10; pH 7.4. Die Durchführung der Experimente erfolgte bei Raumtemperatur. Die Substanzlösungen wurden mit einem Multikanal-Applikationssystem (RSC 200, Biologic) appliziert, welches einen Lösungsaustausch in weniger als 2 ms gewährleistet. Die Aufnahmen wurden mit 1 kHz gefiltert und 2 kHz digitalisiert. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit dem Clampfit-Programm der pClamp 6 Software (Axon).

### **2.4.3.2 Einzelkanalmessungen**

Die Einzelkanalmessungen am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor erfolgten analog B.2.4.3.1. Allerdings erfolgte die Applikation des Agonisten 5-HT (30 µM) zweimal kurz nacheinander. Die Stromantwort nach der zweiten Applikation war demnach aufgrund der Rezeptordesensibilisierung nur sehr klein (siehe auch C.2.3.3.1, Abbildung 24), so dass Einzelkanalereignisse besser sichtbar wurden. Die Einzelkanalamplituden und Kanalöffnungszeiten wurden von PD Dr. Martin Barann ausgewertet.

### **2.4.4 Statistische Auswertung**

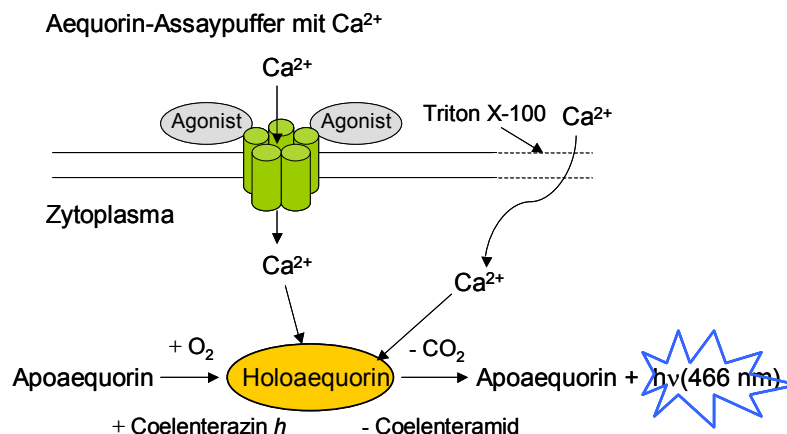
Die angegebenen Werte sind arithmetische Mittelwerte aus mindestens drei Einzelversuchen. Als Maß der Streuung ist der Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Die Mittelwerte zweier Gruppen wurden mittels eines zweiseitigen, ungepaarten bzw. gepaarten Student's t-Tests auf statistisch signifikante Unterschiede, unter der Voraussetzung, dass sich die Standardabweichungen der zu vergleichenden Mittelwerte nicht signifikant voneinander unterscheiden, geprüft. Diese Voraussetzung wurde mittels F-Test verifiziert. Um auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen mehr als zwei voneinander unabhängigen Gruppen zu testen, wurde das statistische Modell der einseitigen Varianzanalyse (*one-way ANOVA*) mit anschließendem Dunnett's post-hoc Test angewandt. Die statistischen Tests erfolgten mit Hilfe des Computerprogrammes GraphPad Prism 4.0. Lag die Irrtumswahrscheinlichkeit bei  $p \leq 0,05$  wurde der Unterschied als signifikant (\*), bei einer geringeren Irrtumswahrscheinlichkeit ( $p \leq 0,01$ ) als hoch signifikant (\*\*) und bei  $p \leq 0,001$  (\*\*\*) als extrem signifikant eingestuft.

## C. Ergebnisse

### 1. Etablierung eines Aequorin- $\text{Ca}^{2+}$ -Influx-Assays für die funktionelle Charakterisierung rekombinanter $5\text{-HT}_3$ -Rezeptoren

#### 1.1 Prinzip des Aequorin-Assays

Zur schnellen Charakterisierung rekombinanter  $5\text{-HT}_3$ -Rezeptoren unterschiedlicher Zusammensetzung bzw. natürlich vorkommender Varianten dieser, sollte ein funktioneller Assay etabliert werden. Aus diesem Grund wurde der Aequorin-Assay, welcher zuvor hauptsächlich bei der Charakterisierung G-Proteingekoppelter Rezeptoren zur Anwendung kam, für die Untersuchung heterolog in HEK293-Zellen exprimierter  $5\text{-HT}_3$ -Rezeptoren optimiert. Das Prinzip der Methode beruht auf der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Lumineszenz des Fotoproteins Aequorin. Aufgrund der Kationenleitfähigkeit ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ) des  $5\text{-HT}_3$ -Rezeptorkanals ist somit eine funktionelle Charakterisierung über die Messung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenstroms möglich. Das Messprinzip ist in Abbildung 9 dargestellt.

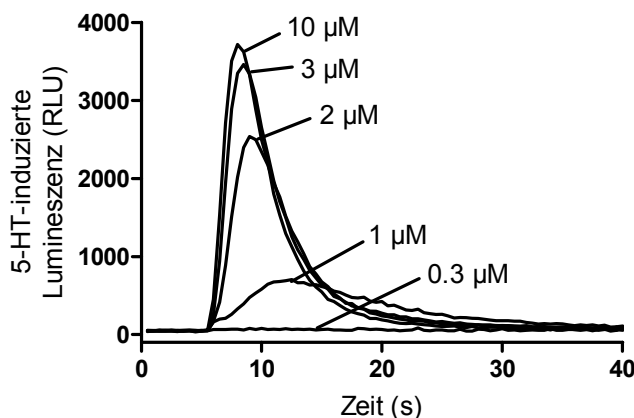


**Abbildung 9: Messprinzip des Aequorin- $\text{Ca}^{2+}$ -Influx-Assays für die funktionelle Charakterisierung von  $5\text{-HT}_3$ -Rezeptoren**

Nach Bindung der Agonistmoleküle (z.B.  $5\text{-HT}$ ) an den  $5\text{-HT}_3$ -Rezeptor (in grün dargestellt) öffnet sich die Kanalpore und neben  $\text{Na}^+$ -Ionen strömen auch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in die Zelle ein. Der Agonist-Konzentrations-abhängige Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration löst eine Lumineszenzreaktion des Holoaequorins aus. Nach Triton X-100-Lyse der Zellen wird die maximal mögliche Lumineszenz gemessen, die durch Umsetzung des gesamten Holoaequorins zustande kommt.

In initialen Experimenten an HEK293-Zellen, die transient mit der  $5\text{-HT}_{3A}$ - und Apoaequorin-cDNA transfiziert wurden (B 2.2.12.1.1), konnten konzentrationsabhängige Lumineszenzsignale nach  $5\text{-HT}$ -Applikation gemessen werden (Abbildung

10). Die 5-HT-Antworten erfolgten schnell mit einem Lumineszenzmaximum 3 - 8 s nach Applikation und einem Rückgang auf Basislumineszenz nach 30 - 50 s aufgrund der Rezeptordesensibilisierung. Daher ist die Verwendung eines Luminometers mit integriertem Injektor, welches die simultane Lumineszenzmessung und Autoinjektion ermöglicht, unerlässlich. Die Basislumineszenz betrug nur  $2,6 \pm 0,4 \%$  ( $n = 17$ ) des maximalen Lumineszenzsignals ( $10 \mu\text{M}$  5-HT), was auf ein großes Signal-Rausch-Verhältnis hinweist.



**Abbildung 10: Zeitverlauf der 5-HT-induzierten Lumineszenz an HEK293-Zellen, die transient mit 5-HT<sub>3A</sub>- und Apoaequorin-cDNA transfiziert wurden**

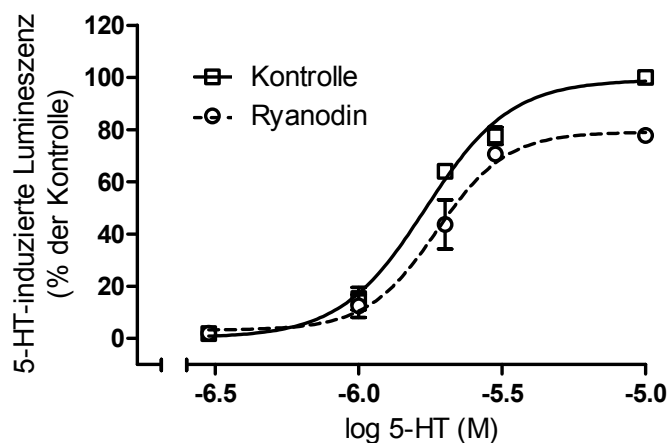
Gezeigt sind die Rohdatenspur eines repräsentativen Experiments (Mittelwerte aus Dreifachmessungen). Die 5-HT-Autoinjektion erfolgte nach 5 s. Die Zellen wurden für 2,5 h bei Raumtemperatur mit Coelenterazin-*h* vorinkubiert.

Um zu untersuchen, ob das gemessene Lichtsignal nur durch Aequorinlumineszenz, ausgehend von den heterolog exprimierten 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren, zustande kommt, wurde die Lumineszenz in Coelenterazin-*h*-beladenen Zellen, die entweder nur Apoaequorin oder nur 5-HT<sub>3A</sub> exprimierten, gemessen. In beiden Fällen war kein Anstieg der Lumineszenz nach 5-HT ( $10 \mu\text{M}$ )-Applikation zu verzeichnen (Daten nicht gezeigt), was bestätigt, dass die Lumineszenz nur durch Aequorin hervorgerufen wird und nicht durch den Kofaktor Coelenterazin allein. Des Weiteren konnte dadurch belegt werden, dass HEK293-Zellen keine nativen 5-HT-Rezeptoren exprimieren, welche die Charakterisierung der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren stören würden.

Da die Aktivierung der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren zur Zelldepolarisierung führt (Wallis und North, 1978; Round und Wallis, 1986), wurde der mögliche Einfluss spannungsgesteuerter Ca<sup>2+</sup>-Kanäle auf das Agonist-induzierte Lumineszenzsignal untersucht. Nach Depolarisierung der HEK293-Zellen mit 50 mM KCl kam es zu keinem

Anstieg des Lumineszenzsignals (Daten nicht gezeigt), was belegt, dass HEK293-Zellen keine spannungsgesteuerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle exprimieren.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass eine  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern das Agonist-induzierte Lumineszenzsignal beeinflusst. Da die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern hauptsächlich durch Ryanodinrezeptoren vermittelt wird, wurden 5-HT-induzierte Lumineszenzsignale in Anwesenheit einer hohen Ryanodinkonzentration zur Blockade genannter Rezeptoren aufgezeichnet. Zu diesem Zweck wurden die Zellen 30 min vor der Messung entweder mit Ryanodin (100  $\mu\text{M}$ ) oder mit Puffer, welcher nur das Lösungsmittel DMSO enthielt (Kontrolle), vorinkubiert. Der  $\text{pEC}_{50}$ -Wert und der Hill-Koeffizient  $n_H$  für 5-HT betrugen  $5,75 \pm 0,02$  bzw.  $3,14 \pm 0,53$  in Anwesenheit von Ryanodin. In Abwesenheit von Ryanodin lagen die Werte bei  $5,77 \pm 0,04$  bzw.  $3,15 \pm 0,08$  (jeweils  $n = 3$ ), was belegt, dass eine mögliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern keinen Einfluss auf die Konzentrations-Wirkungsbeziehung von 5-HT am  $5\text{-HT}_3$ -Rezeptor hat (Abbildung 11). Demgegenüber war in Gegenwart von Ryanodin die 5-HT (10  $\mu\text{M}$ )-Maximalantwort auf  $77,8 \pm 3,7\%$  ( $n = 6$ ) der Kontrolle reduziert (Abbildung 11). Ähnliche Ergebnisse lieferte ein Experiment, bei welchem die Zellen mit Thapsigargin (2,5  $\mu\text{M}$ ) und Koffein (10 mM) zur Entleerung intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher vorinkubiert wurden (Daten nicht gezeigt).

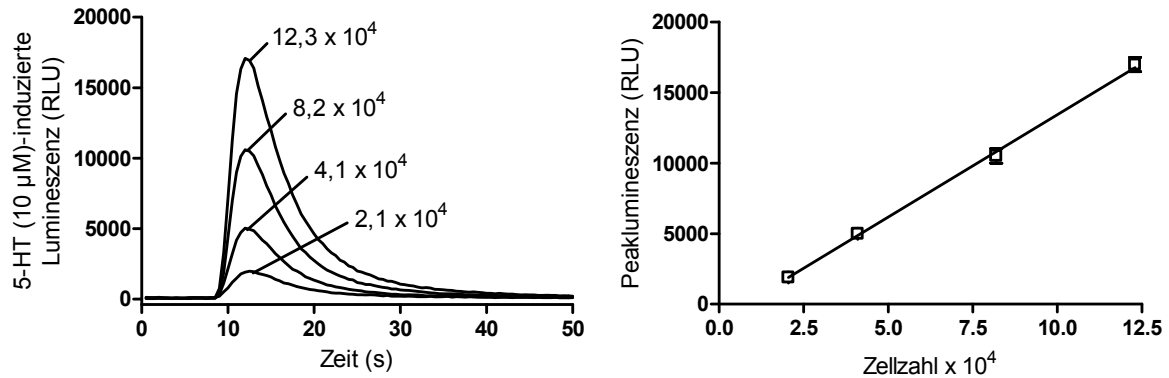


**Abbildung 11: Konzentrationsabhängigkeit des 5-HT-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms an transient in HEK293-Zellen exprimierten  $5\text{-HT}_{3A}$ -Rezeptoren in Anwesenheit und Abwesenheit (Kontrolle) von Ryanodin (100  $\mu\text{M}$ )**

Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, dargestellt als Prozentsatz des 5-HT (10  $\mu\text{M}$ )-Lumineszenzsignals der Kontrolle in Abwesenheit von Ryanodin.



Die Sensitivität des Aequorin-Assays wurde durch 5-HT (10  $\mu$ M)-Stimulation steigender Zellzahlen der mit Apoaequorin- und 5-HT<sub>3A</sub>-cDNA transfizierten Zellen untersucht. Dabei stieg die 5-HT-induzierte Peaklumineszenz bei Erhöhung der Zellzahl linear an (Abbildung 12). Damit konnte gezeigt werden, dass der Assay über einen breiten Zellzahlbereich zuverlässige Ergebnisse liefert.

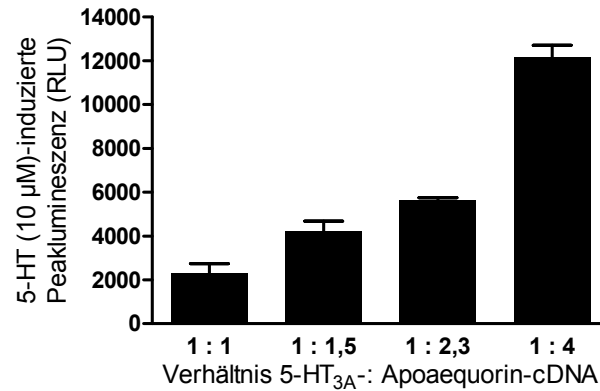


**Abbildung 12: Abhängigkeit der 5-HT (10  $\mu$ M)-induzierten Lumineszenz von der Zellzahl**

Dargestellt sind die Mittelwertkurven aus Dreifachmessungen eines repräsentativen Experiments an mit Apoaequorin- und 5-HT<sub>3A</sub>-cDNA transfizierten HEK293-Zellen. Die jeweilige Zellzahl ist angegeben. Rechts ist die lineare Abhängigkeit der 5-HT-induzierten Lumineszenz (Mittelwerte  $\pm$  SEM) von der Zellzahl dargestellt.

### 1.2 Optimierung der Transfektion und der Inkubation mit Coelenterazin-*h*

Zur Bestimmung der 5-HT<sub>3A</sub>- und Apoaequorin-cDNA-Mengen, welche zu den größten Lumineszenzsignalen im Aequorin-Assay führen, wurden die Zellen unter Verwendung verschiedener Rezeptor- : Apoaequorin-cDNA-Verhältnisse transfiziert. Dabei führte die Transfektion mit steigenden Apoaequorin und dabei sinkenden Rezeptor-cDNA-Mengen zu größer werdenden 5-HT (10  $\mu$ M)-induzierten Lumineszenzsignalen. Ein Rezeptor- : Apoaequorin-cDNA-Verhältnis von 1 : 4 löste eine 5,5-fach stärkere Lichtemission aus als ein Verhältnis von 1 : 1 bei der Transfektion (Abbildung 13).

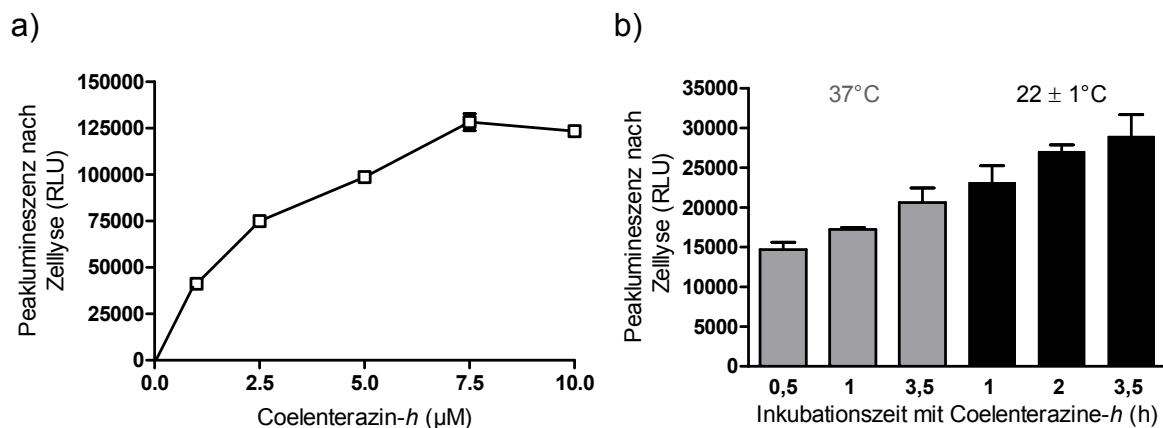


**Abbildung 13: Abhängigkeit der 5-HT (10 µM)-induzierten Lumineszenz vom Rezeptor- : Apoaequorin-cDNA-Verhältnis bei der Transfektion**

Gezeigt sind die mittleren Peaklumineszenzwerte ( $\pm$  SEM) für die entsprechenden Transfektionsansätze aus Dreifachbestimmungen eines repräsentativen Experiments.

Zur weiteren Optimierung wurden Zellen, die Apoaequorin transient exprimieren, über einen Zeitraum von 3,5 h mit verschiedenen Konzentrationen (1 - 10 µM) Coelenterazin-*h* inkubiert. Die von der Gesamtmenge an rekonstituiertem Aequorin abhängige maximale Lumineszenzantwort nach Zellyse, hervorgerufen durch Autoinjektion des Triton-haltigen Aequorin-Assay-Lysispuffers (Abbildung 9), stieg mit steigender Coelenterazin-*h*-Konzentration an. Das Maximum wurde bei einer Konzentration von 7,5 µM erreicht (Abbildung 14a). In folgenden Experimenten wurde eine Konzentration von 5 µM Coelenterazin-*h*, die 80 % der maximal möglichen Lumineszenz auslöst, zur Rekonstitution von Aequorin eingesetzt.

Im nächsten Schritt erfolgte die Inkubation Apoaequorin-exprimierender Zellen mit Coelenterazin-*h* bei unterschiedlichen Temperaturen, nämlich 37°C und Raumtemperatur ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ), über verschiedene Zeiträume. Die Inkubation mit Coelenterazin-*h* bei 37°C ergab geringere maximale Lumineszenzsignale nach Zellyse als die Inkubation bei Raumtemperatur. Des Weiteren führte eine Inkubationszeit von 3,5 h bei Raumtemperatur nur zu geringfügig größeren Lumineszenzsignalen im Vergleich zu einer zweistündigen Inkubation mit Coelenterazin-*h* (Abbildung 14b). Somit erfolgte in folgenden Experimenten die Inkubation über einen Zeitraum von 2,5 h bei Raumtemperatur.



**Abbildung 14: Maximale Peaklumineszenz in Abhängigkeit von der Coelenterazin-h-Konzentration (a) und der Coelenterazin-h-Inkubationstemperatur bzw. -zeit (b)**

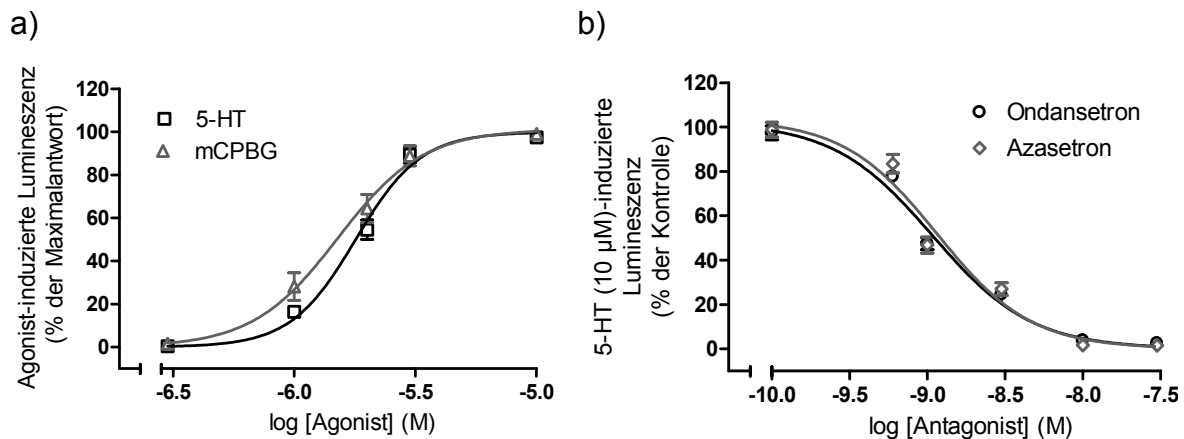
Die Lumineszenz wurde nach Lyse der Apoaequorin-exprimierenden Zellen durch Autoinjektion einer wässrigen Triton X-100-Lösung mit  $\text{CaCl}_2$  (Aequorin-Assay-Lysepuffer) gemessen. **a)** Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus Dreifachbestimmungen eines repräsentativen Experiments. **b)** Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus Vierfachbestimmungen für jede experimentelle Bedingung.

Ein weiterer Parameter, der optimiert wurde, betrifft das Zellinkubationsmedium. Aufgrund der Zellkultivierung in Medium unter Zusatz von 10 % FKS, erfolgte bis dato die Beladung der Zellen mit Coelenterazin-h in diesem Medium. Da FKS unter Umständen den Aequorin-Assay negativ beeinflusst, wurde die Coelenterazin-h-Inkubation der Apoaequorin-exprimierenden Zellen vergleichend in Medium mit 10 % FKS und in Medium unter Zusatz von 0,1 % BSA durchgeführt. Dabei ergab sich, dass die Inkubation in Medium mit 0,1 % BSA zu ca. 1,5-fach höheren maximalen Lumineszenzsignalen nach Zellyse führt als die Inkubation in Medium mit 10 % FKS ( $158,4 \pm 10,8$  %,  $n = 3$ ). Demzufolge wurden die Zellen in folgenden Experimenten in Medium unter Zusatz von 0,1 % BSA mit Coelenterazin-h inkubiert.

### 1.3 Konzentrations-Wirkungsbeziehungen von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorliganden am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor

Der physiologische Agonist 5-HT und der spezifische 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoragonist mCPBG führten zu konzentrationsabhängigen Lumineszenzsignalen im Aequorin-Assay. Die Auswertung der Agonist-induzierten Peaklumineszenzsignale resultierte in Konzentrations-Wirkungskurven (Abbildung 15a), die durch einen  $\text{pEC}_{50}$  von  $5,76 \pm 0,03$  (mittlerer  $\text{EC}_{50}$  1,77 µM,  $n = 11$ ) im Falle von 5-HT und

$5,76 \pm 0,02$  (mittlerer  $EC_{50}$   $1,75 \mu\text{M}$ ,  $n = 7$ ) im Falle von mCPBG charakterisiert sind. Die ermittelten Hill-Koeffizienten lagen bei  $3,19 \pm 0,26$  bzw.  $2,76 \pm 0,19$ . Antworten auf 5-HT ( $10 \mu\text{M}$ ) wurden durch die spezifischen 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten Ondansetron und Azasetron konzentrationsabhängig inhibiert (Abbildung 15b). Die  $pIC_{50}$ -Werte lagen bei  $9,00 \pm 0,02$  ( $n = 4$ ) bzw.  $8,96 \pm 0,03$  ( $n = 5$ ). Die Korrektur dieser Werte mittels der Gleichung nach Cheng und Prusoff (1973) (siehe B.2.4.2.6) resultierte in  $pK_i$  ( $K_i$ )-Werten von  $9,82$  ( $0,15 \text{ nM}$ ) für Ondansetron bzw.  $9,78$  ( $0,17 \text{ nM}$ ) für Azasetron.



**Abbildung 15: Konzentrationsabhängige Lumineszenzsignale zweier 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoragonisten (a) oder von 5-HT ( $10 \mu\text{M}$ ) in Anwesenheit steigender Konzentrationen zweier 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten (b) an 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren exprimiert in HEK293-Zellen**

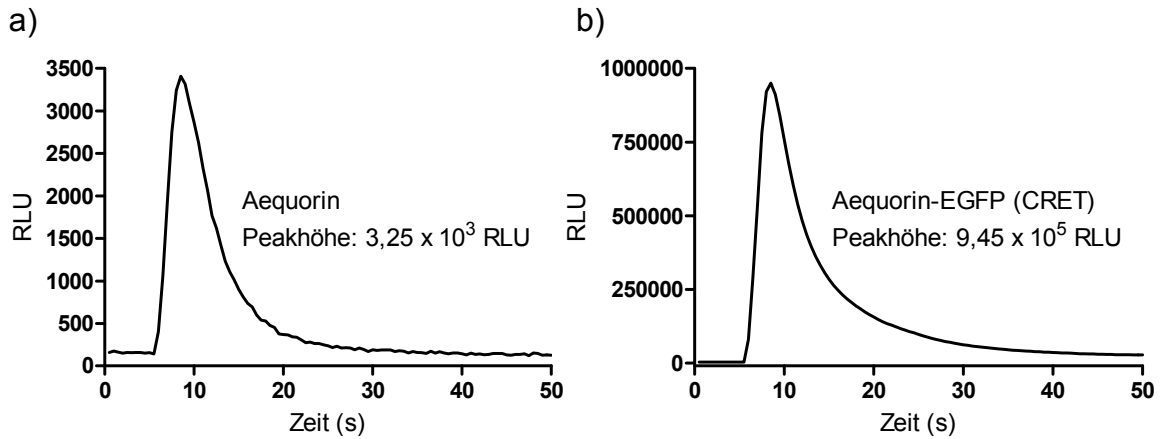
Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von 4 - 11 unabhängigen Transfektionen. Die Lumineszenzsignale sind als Prozentsatz der jeweiligen Maximalantwort (a) bzw. der 5-HT ( $10 \mu\text{M}$ )-Antwort in Abwesenheit des Antagonisten (b) dargestellt.

## 1.4 Vergleich des Aequorin-Assays mit dem modifizierten $Ca^{2+}$ -Assay unter Einsatz des Aequorin-EGFP-Fusionsproteins (CRET-Assay)

### 1.4.1 Sensitivität und Signalstärke

In Analogie zum Aequorin-Assay wurde die Sensitivität des CRET-Assays durch 5-HT ( $10 \mu\text{M}$ )-Stimulation steigender Zellzahlen der mit pG5A- und 5-HT<sub>3A</sub>-cDNA transfizierten Zellen untersucht. Dabei war auch hier die Lumineszenz über einen breiten Bereich linear von der Zellzahl abhängig (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren erfolgte der direkte Vergleich der 5-HT ( $10 \mu\text{M}$ )-induzierten Lumineszenzsignale zwischen beiden Assays. Die Form der in Abbildung 16 dargestellten

Lichtsignale unterschied sich nicht, jedoch war die Höhe der Lumineszenzpeaks im Falle des CRET ca. 300-fach größer verglichen mit der Peakhöhe der Aequorinlumineszenz.

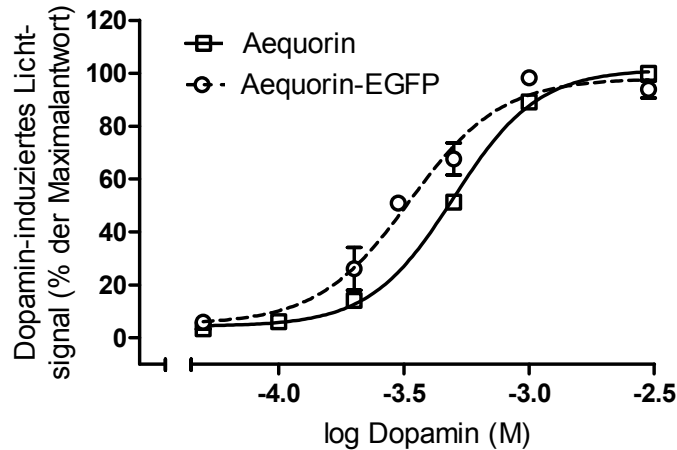


**Abbildung 16: 5-HT (10  $\mu$ M)-induzierte Lichtsignale gemessen an HEK293-Zellen, die transient mit der 5-HT<sub>3A</sub>-cDNA und entweder der Apoaequorin- (a) oder der pG5A-cDNA (b) transfiziert wurden**

Die strahlungslose Energieübertragung des Aequorins auf das EGFP (Chemilumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer, CRET) führte zu einer ca. 300-fachen Erhöhung des Lumineszenzpeaks. Gezeigt sind die Rohdatenspur eines repräsentativen Experiments (Mittelwerte aus Dreifachmessungen). Der Vektor pG5A enthält ein Apoaequorin-EGFP-Fusionskonstrukt.

#### 1.4.2 Konzentrations-Wirkungsbeziehung von Dopamin am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor

Beim Vergleich der Konzentrations-Wirkungsbeziehung des Partialagonisten Dopamin am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem Aequorin- und dem CRET-Assay. Die aus den Konzentrations-Wirkungskurven resultierenden funktionellen Parameter pEC<sub>50</sub> und Hill-Koeffizient für Dopamin betragen  $3,35 \pm 0,03$  (mittlerer EC<sub>50</sub>: 446  $\mu$ M) und  $2,50 \pm 0,10$  im Aequorin-Assay bzw.  $3,49 \pm 0,06$  (mittlerer EC<sub>50</sub>: 321  $\mu$ M) und  $2,35 \pm 0,29$  im CRET-Assay (Abbildung 17).



**Abbildung 17: Konzentrationsabhängige Dopamin-induzierte Lichtsignale von HEK293-Zellen, die transient mit der 5-HT<sub>3A</sub>-cDNA und entweder der Apoaequorin-(Aequorin) oder der pG5A-cDNA (Aequorin-EGFP) transfiziert wurden**

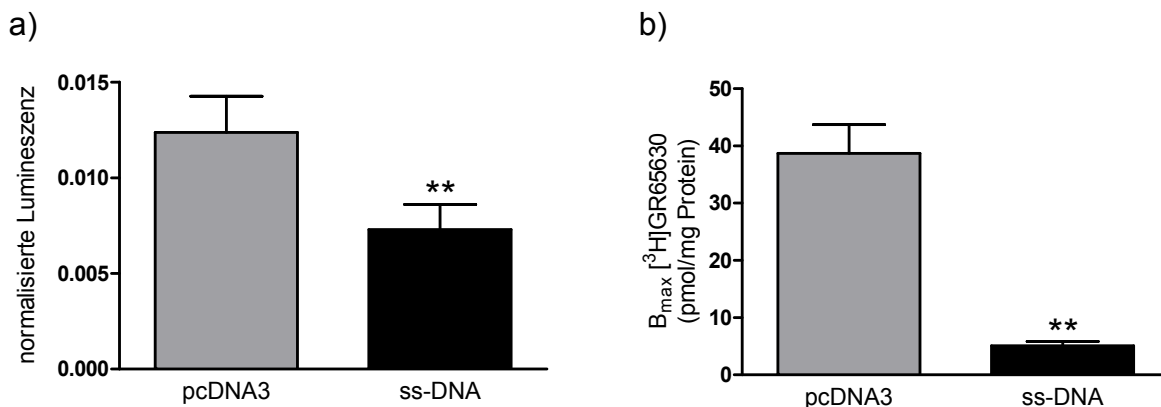
Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von vier unabhängigen Transfektionen. Die Lumineszenzsignale sind als Prozentsatz der jeweiligen Maximalantwort auf Dopamin dargestellt.

## 2. Untersuchung homopentamerer 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren

### 2.1 Einfluss von Lachsspermien-DNA auf die Expression des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors in HEK293-Zellen

Aufgrund des häufigen Einsatzes gescherter Lachsspermien-DNA (*salmon sperm* DNA, ss-DNA) bei verschiedenen molekularbiologischen Techniken (z.B. DNA-Hybridisierungen) bzw. als Vehikel bei Transfektionen wurde zu Beginn der Arbeit diese DNA zur Angleichung der DNA-Mengen bei transienten Transfektionen von Säugerzellen eingesetzt. Es stellte sich jedoch heraus, dass die verwendete ss-DNA die Expression der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren vermindert. Die 5-HT (10  $\mu$ M)-induzierte Lumineszenz im Aequorin-Assay von HEK293-Zellen, die transient mit 5-HT<sub>3A</sub>- und Apoaequorin-cDNA und ss-DNA (Verhältnis 5-HT<sub>3A</sub>-cDNA : ss-DNA = 1 : 1) kotransfiziert wurden, war auf  $58,8 \pm 5,3$  % ( $n = 5$ ,  $p < 0,01$ ) des Lumineszenzsignals von Zellen, die mit dem leeren Plasmidvektor (pcDNA3) anstelle der ss-DNA transfiziert wurden, vermindert (Abbildung 18a). Dass die verringerte Funktionalität auf eine verminderte Expression des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors zurückzuführen war, bestätigte sich in [<sup>3</sup>H]GR65630-Bindungsversuchen. HEK293-Zellen, die mit der 5-HT<sub>3A</sub>-cDNA und ss-DNA (Verhältnis 1 : 4) kotransfiziert wurden, wiesen eine  $B_{\max}$  von noch  $13,2 \pm 1,9$  % ( $n = 3$ ,  $p < 0,01$ ) der  $B_{\max}$  von Zellen auf, die anstelle dessen mit der 5-HT<sub>3A</sub>-cDNA und dem leeren

Plasmidvektor transfiziert wurden (Abbildung 18b). In folgenden Experimenten wurde somit stets der leere Plasmidvektor zur Angleichung der DNA-Mengen bei der Transfektion eingesetzt.



**Abbildung 18: Inhibierung der Expression des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors in transient transfizierten HEK293-Zellen durch den Einsatz von Lachsspermien-DNA (ss-DNA) bei der Transfektion**

Es wurde entweder der leere Plasmidvektor (pcDNA3) oder ss-DNA zur Angleichung der DNA-Mengen bei der Transfektion verwendet. Das Verhältnis von 5-HT<sub>3A</sub>-cDNA : pcDNA3 bzw. ss-DNA betrug 1 : 1 (a) bzw. 1 : 4 (b). **a)** Gezeigt ist die auf die Gesamtlumineszenz normalisierte Peakantwort nach 5-HT (10 µM)-Applikation und anschließender Zellyse im Aequorin-Assay (Mittelwerte ± SEM aus fünf unabhängigen Versuchen). **b)** Dargestellt sind die B<sub>max</sub>-Werte der [<sup>3</sup>H]GR65630-Bindung an Membranen (Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Versuchen).

Statistisch signifikante Unterschiede im gepaarten (a) bzw. ungepaarten (b) Student's t-Tests sind gekennzeichnet (\*\*p ≤ 0,01).

## 2.2 Generierung und Testung fluoreszenzmarkierter 5-HT<sub>3A</sub>-Untereinheiten

Im Rahmen eines Kooperationsprojekts mit Prof. Dr. Stefan Böhm aus der Abteilung für Pharmakologie der Medizinischen Universität Wien sollten fluoreszenzmarkierte 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoruntereinheiten generiert werden, die eine Untersuchung der Interaktion ligandgesteuerter Ionenkanäle mittels FRET ermöglichen. Zu diesem Zweck wurden Fusionskonstrukte aus der 5-HT<sub>3A</sub>-cDNA und der kodierenden Sequenz des ECFP bzw. EYFP generiert. Da aufgrund der Größe dieser Fluoreszenzproteine (27 kDa, 236 AS) unter Umständen die Expression bzw. die Funktion des so markierten 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors beeinträchtigt wird, erfolgte zusätzlich die Konstruktion einer 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoruntereinheit, welche ein sogenanntes *Fluorescein Arsenical Hairpin Binder* (FIAsH)-Bindemotiv mit einer Länge von nur zwölf Aminosäuren trägt. Nach Bindung des Fluorophors

FIAsh an dieses Motiv resultiert ein starkes Fluoreszenzsignal. Die Expression der Fusionskonstrukte wurde nach transienter Transfektion in HEK293-Zellen durch Radioligandbindung überprüft. Deren Funktionalität wurde durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Influxmessungen im Aequorin-Assay getestet.

### 2.2.1 Generierung der fluoreszenzmarkierten 5-HT<sub>3A</sub>-Konstrukte

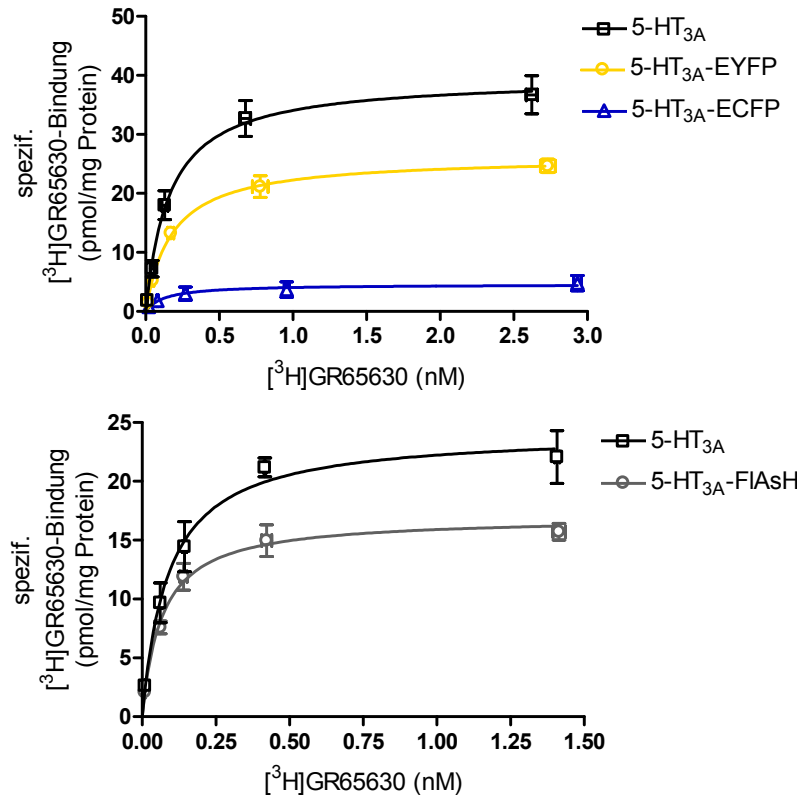
In Analogie zu Ilegems et al. (2004), welche die kodierende Sequenz des ECFP in die kurze Spleißvariante der murinen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoruntereinheit eingebracht haben, wurden die kodierenden Sequenzen für ECFP, EYFP bzw. der FIAsh-Tag in die IZD zwischen TM3 und TM4 der humanen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoruntereinheit eingefügt. Dabei wurde beachtet, dass putative Phosphorylierungsstellen (ExpASY Proteomics Server / ScanProsite) bzw. der sogenannte *MA-stretch*, der eine amphipatische  $\alpha$ -Helix bildet und eine wesentliche Rolle bei der Ionenpermeation durch 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren spielt (Kelley et al., 2003), nicht zerstört wurden. Die Herstellung der drei rekombinanten Konstrukte ist unter B.2.2.9.2 und B.2.2.9.3 ausführlich beschrieben.

### 2.2.2 Radioligandbindungsstudien

Sättigungsbindungsexperimente mit [<sup>3</sup>H]GR65630 wurden in zwei Versuchsserien an Membranen von HEK293-Zellen, die transient mit dem jeweiligen Rezeptorkonstrukt transfiziert wurden, durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die B<sub>max</sub>-Werte der drei rekombinanten Rezeptorkonstrukte im Vergleich zum 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor signifikant reduziert waren (Abbildung 19). Die Einführung von EYFP führte zu einer Reduktion auf  $66,1 \pm 3,5$  % der B<sub>max</sub> des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors ( $p < 0,01$ ) und die Einführung von ECFP zu einer drastischen Reduktion auf nur noch  $10,3 \pm 3,6$  % der Kontrolle ( $p < 0,001$ ). Demgegenüber wies der Rezeptor, welcher das nur zwölf Aminosäuren lange FIAsh-Bindemotiv trägt, eine Expression von  $74,2 \pm 6,4$  % im Vergleich zum 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor auf ( $p < 0,05$ ). Die K<sub>D</sub>-Werte für [<sup>3</sup>H]GR65630 an den untersuchten Rezeptoren unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Die Bindungsparameter sind in Tabelle 2 zusammengefasst.



## Ergebnisse



**Abbildung 19:  $[^3\text{H}]$ GR65630-Bindung an Membranen von HEK293-Zellen, die transient mit der  $5\text{-HT}_{3\text{A}}$ -cDNA bzw. mit einem fluoreszenzmarkierten  $5\text{-HT}_{3\text{A}}$ -Konstrukt transfiziert wurden**

Dargestellt sind die Sättigungshyperbeln der spezifischen  $[^3\text{H}]$ GR65630-Bindung aus zwei unabhängigen Versuchsreihen. Die unspezifische Bindung wurde an Membranen nichttransfizierter Zellen bestimmt. Punkte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3 - 4 voneinander unabhängigen Transfektionen.

Rezeptor	$B_{\text{max}}$ (pmol/mg Protein)	$K_{\text{D}}$ (nM)
$5\text{-HT}_{3\text{A}}$	$39,59 \pm 3,09$	$0,17 \pm 0,04$
$5\text{-HT}_{3\text{A}}\text{-ECFP}$	$4,07 \pm 1,43^{***}$	$0,10 \pm 0,02$
$5\text{-HT}_{3\text{A}}\text{-EYFP}$	$26,17 \pm 1,36^{**}$	$0,18 \pm 0,03$
$5\text{-HT}_{3\text{A}}$	$24,16 \pm 1,43$	$0,09 \pm 0,02$
$5\text{-HT}_{3\text{A}}\text{-FIAsh}$	$17,93 \pm 1,55^*$	$0,08 \pm 0,01$

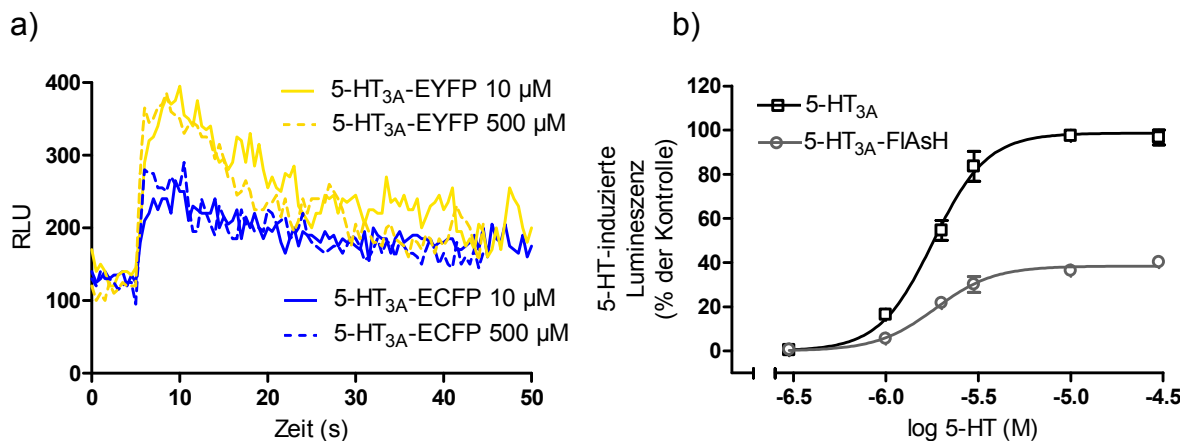
**Tabelle 2:  $B_{\text{max}}$ - und  $K_{\text{D}}$ -Werte für  $[^3\text{H}]$ GR65630 aus Sättigungsbindungsversuchen an Membranen von HEK293-Zellen, die transient mit der  $5\text{-HT}_{3\text{A}}$ -cDNA bzw. mit einem fluoreszenzmarkierten  $5\text{-HT}_{3\text{A}}$ -Konstrukt transfiziert wurden**

Gezeigt sind die Ergebnisse (Mittelwerte  $\pm$  SEM) der in Abbildung 19 grafisch dargestellten Versuche ( $n = 3 - 4$ ). Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zum  $5\text{-HT}_{3\text{A}}$ -Rezeptor (*one-way ANOVA* gefolgt von einem Dunnett's post-hoc Test bzw. Student's t-Test) sind gekennzeichnet (\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ ).

### 2.2.3 Funktionelle Charakterisierung durch $\text{Ca}^{2+}$ -Influxmessungen

Die 5-HT ( $10 \mu\text{M}$ ,  $500 \mu\text{M}$ )-Stimulation von HEK293-Zellen, die transient mit der Apoaequorin-cDNA und der  $5\text{-HT}_{3\text{A}}\text{-ECFP}$ - bzw.  $5\text{-HT}_{3\text{A}}\text{-EYFP}$ -cDNA transfiziert wurden, führte in einem von drei Versuchen zu kleinen Lumineszenzpeaks im Aequorin-Assay (Abbildung 20a). Eine Messung 5-HT-Konzentrations-abhängiger Lumineszenzsignale war demnach nicht möglich. Die Funktionalität der beiden fluoreszenzmarkierten  $5\text{-HT}_{3\text{A}}$ -Rezeptoren konnte dennoch elektrophysiologisch von Herrn Prof. Dr. S. Böhm durch Ganzzelleableitungen an transient transfizierten tsA201-Zellen verifiziert werden, wobei die Potenz von 5-HT an den Konstrukten ähnlich derer am unmarkierten  $5\text{-HT}_{3\text{A}}$ -Rezeptor war (Daten nicht gezeigt).

Im Gegensatz dazu zeigten Zellen, welche das  $5\text{-HT}_{3\text{A}}\text{-FIAsH}$ -Konstrukt exprimierten, 5-HT-Konzentrations-abhängige Lumineszenzsignale im Aequorin-Assay (Abbildung 20b). Der aus der Konzentrations-Wirkungskurve resultierende  $\text{pEC}_{50}$ -Wert für 5-HT ( $5,71 \pm 0,05$ ,  $n = 3$ ) unterschied sich nicht signifikant vom  $\text{pEC}_{50}$  am  $5\text{-HT}_{3\text{A}}$ -Rezeptor ( $5,76 \pm 0,03$ ,  $n = 11$ , siehe C.1.3). Die ermittelten Hill-Koeffizienten von  $2,69 \pm 0,55$  für  $5\text{-HT}_{3\text{A}}\text{-FIAsH}$  und  $3,19 \pm 0,26$  für  $5\text{-HT}_{3\text{A}}$  waren gleichfalls nicht signifikant verschieden. Demgegenüber war die Maximalantwort auf  $10 \mu\text{M}$  5-HT ( $E_{\text{max}}$ ) am  $5\text{-HT}_{3\text{A}}\text{-FIAsH}$ -Rezeptor auf  $40,2 \pm 3,9 \%$  der  $E_{\text{max}}$  am  $5\text{-HT}_{3\text{A}}$ -Rezeptor erniedrigt ( $p < 0,001$ ,  $n = 4$ ).



**Abbildung 20: 5-HT-induzierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx an HEK293-Zellen, die  $5\text{-HT}_{3\text{A}}$  bzw. ein fluoreszenzmarkiertes  $5\text{-HT}_{3\text{A}}$ -Konstrukt transient exprimieren**

**a)** Gezeigt sind die Rohdatenspur eines Experiments (Mittelwerte aus Dreifachmessungen) für 5-HT ( $10 \mu\text{M}$ ,  $500 \mu\text{M}$ ) an  $5\text{-HT}_{3\text{A}}\text{-ECFP}$  bzw.  $5\text{-HT}_{3\text{A}}\text{-EYFP}$ . Die 5-HT-Autoinjektion erfolgte nach 5 s. **b)** 5-HT-Konzentrations-abhängige Lumineszenzsignale (Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 3$ ) für  $5\text{-HT}_{3\text{A}}\text{-FIAsH}$ , dargestellt als Prozentsatz der  $5\text{-HT-}E_{\text{max}}$  an  $5\text{-HT}_{3\text{A}}$ . Die 5-HT-Konzentrations-Wirkungskurve an  $5\text{-HT}_{3\text{A}}$  ist zum Vergleich abgebildet.

### **2.3 Pharmakologische und elektrophysiologische Charakterisierung der natürlich vorkommenden R344H-Variante des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors**

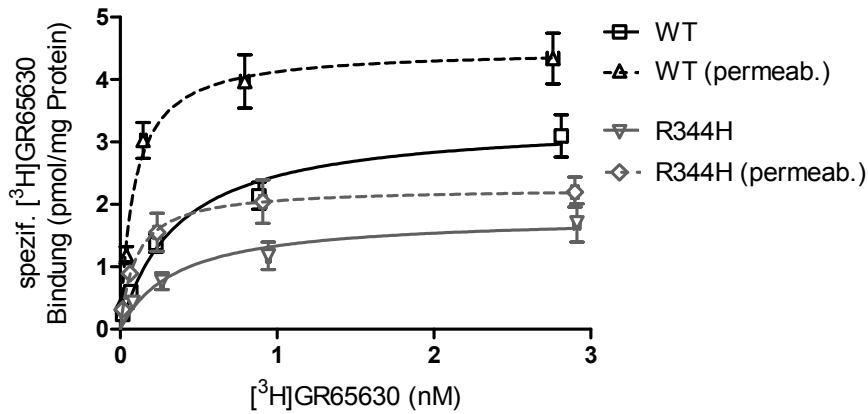
Die Charakterisierung der R344H-Variante des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors, die im Rahmen eines Mutationsscreenings bei einem Schizophreniepatienten identifiziert wurde (Niesler et al., 2001b), erfolgte zum Teil durch Arina Kostanian und Sandra Combrink. In Radioligandbindungsstudien an Membranen transient transfizierter HEK293-Zellen zeigte die R344H-Variante eine um etwa 50 % reduzierte Rezeptordichte verglichen mit dem WT-Rezeptor. In Konkurrenzexperimenten konnte kein Einfluss der Mutation auf die Affinität selektiver 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoragonisten oder -antagonisten nachgewiesen werden (Kostanian, 2005). Weiterhin konnte in funktionellen Analysen (Ca<sup>2+</sup>-Influxmessungen, Patch-Clamp-Messungen) kein Unterschied in der Potenz zweier Agonisten (5-HT, mCPBG) und dreier Antagonisten (Ondansetron, Azasetron, d-Tubocurarin) an der Rezeptorvariante und dem WT-Rezeptor festgestellt werden (Combrink, 2008). Im Rahmen dieser Arbeit wurden ergänzende pharmakologische Experimente an transient mit der 5-HT<sub>3A</sub>- bzw. der 5-HT<sub>3A</sub> R344H-cDNA transfizierten HEK293-Zellen zur Charakterisierung der 5-HT<sub>3A</sub> R344H-Variante durchgeführt. Die elektrophysiologische Analyse erfolgte durch Herrn PD Dr. Martin Barann.

#### **2.3.1 Radioligandbindungsstudien**

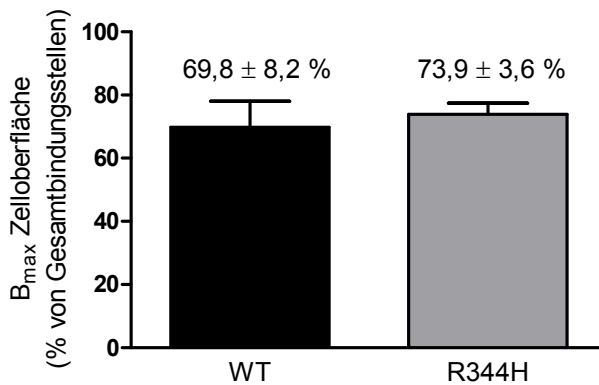
Da bekannt war, dass intrazelluläre, bereits assemblierte 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren durch Radioligandbindung erfasst werden können (Ilegems et al., 2004), wurden Sättigungsexperimente mit [<sup>3</sup>H]GR65630 an intakten bzw. mit Saponin permeabilisierten Zellen durchgeführt (Abbildung 21a). Die R344H-Variante zeigte eine auf  $51,9 \pm 9,9$  % reduzierte B<sub>max</sub>, gemessen an intakten Zellen, im Vergleich zum WT-Rezeptor ( $p < 0,05$ ). Die K<sub>D</sub>-Werte für [<sup>3</sup>H]GR65630 unterschieden sich nicht zwischen WT-Rezeptor und Variante. Diese Resultate bestätigen die Ergebnisse der Bindungsexperimente an Membranen (siehe oben; Kostanian, 2005). B<sub>max</sub>- und K<sub>D</sub>-Werte sind in Tabelle 3 aufgelistet. Der Anteil der Bindungsstellen an der Zelloberfläche (Bindung an intakten Zellen) betrug bei beiden untersuchten Rezeptoren ca. 70 % der Gesamtbindungsstellen (Bindung an permeabilisierten Zellen) (Abbildung 21b). Die K<sub>D</sub>-Werte für den Radioliganden an WT-Rezeptor und Variante waren signifikant kleiner an permeabilisierten verglichen mit intakten Zellen ( $p < 0,01$ ; Tabelle 3), was unter Umständen durch verschiedene Rezeptorkonformationen intra- und extrazellulärer Rezeptoren bedingt ist.

## Ergebnisse

a)



b)



**Abbildung 21:  $[^3\text{H}]\text{GR65630}$ -Bindung an HEK293-Zellen, die transient mit der 5-HT<sub>3A</sub>-WT- bzw. der 5-HT<sub>3A</sub> R344H-cDNA transfiziert wurden**

Gezeigt sind die Ergebnisse (Mittelwerte  $\pm$  SEM) der Sättigungsbindung an intakten bzw. mit Saponin (0,1 % m/V) permeabilisierten Zellen in Suspension aus drei voneinander unabhängigen Transfektionen. **a)** Dargestellt sind die Sättigungshyperbeln der spezifischen  $[^3\text{H}]\text{GR65630}$ -Bindung (0,03 -3 nM). Die unspezifische Bindung wurde an nichttransfizierten Zellen bestimmt. **b)** Die Säulen repräsentieren den prozentualen Anteil der Bindungsstellen an der Zelloberfläche (Bindung an intakten Zellen) bezogen auf die Gesamtbindung (Bindung an permeabilisierten Zellen).

Parameter	5-HT <sub>3A</sub> WT		5-HT <sub>3A</sub> R344H	
	intakt	permeabilisiert	intakt	permeabilisiert
B <sub>max</sub> (pmol/mg Protein)	3,32 $\pm$ 0,40	4,61 $\pm$ 0,55	1,72 $\pm$ 0,33	2,30 $\pm$ 0,35
K <sub>D</sub> (nM)	0,37 $\pm$ 0,05	0,09 $\pm$ 0,01	0,33 $\pm$ 0,03	0,11 $\pm$ 0,01

**Tabelle 3: B<sub>max</sub>- und K<sub>D</sub>-Werte für  $[^3\text{H}]\text{GR65630}$  aus Sättigungsbindungsversuchen an HEK293-Zellen, welche den 5-HT<sub>3A</sub>- bzw. den 5-HT<sub>3A</sub> R344H-Rezeptor exprimieren**

Gezeigt sind die Ergebnisse (Mittelwerte  $\pm$  SEM) der in Abbildung 21a grafisch dargestellten Versuche (n = 3).

### **2.3.2 Funktionelle Untersuchung durch $\text{Ca}^{2+}$ -Influxmessungen**

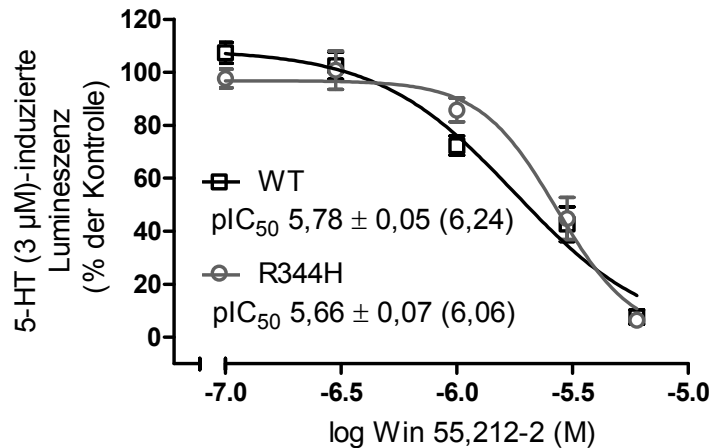
Die funktionelle Charakterisierung der 5-HT<sub>3A</sub> R344H-Variante im Vergleich zum 5-HT<sub>3A</sub>-WT-Rezeptor erfolgte durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Influxmessungen im Aequorin-Assay. Da die R344H-Mutation keinen Einfluss auf die Potenz von orthosterischen Agonisten und Antagonisten am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor hatte (siehe oben; Combrink, 2008) wurde neben der Messung des 5-HT-induzierten Maximaleffektes der Einfluss eines Cannabinoidrezeptoragonisten auf beide Rezeptoren untersucht.

#### **2.3.2.1 5-HT-induzierter Maximaleffekt**

Der 5-HT (10  $\mu\text{M}$ )-induzierte Maximaleffekt ( $E_{\text{max}}$ ) an der R344H-Variante wies einen Wert von  $98,4 \pm 5,4 \%$  ( $n = 15$ ,  $p > 0,05$ ) bezogen auf den  $E_{\text{max}}$  am WT-Rezeptor auf. Demzufolge spiegelt sich die auf ca. 50 % reduzierte Oberflächenexpression des 5-HT<sub>3A</sub> R344H-Rezeptors (siehe C.2.3.1) nicht in einem ähnlich erniedrigten  $E_{\text{max}}$ -Wert wider, was auf einen Einfluss der R344H-Mutation auf die Kanaleigenschaften des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors hindeutet. Um diese Fragestellung zu klären, wurden elektrophysiologische Analysen durchgeführt (siehe unten, C.2.3.3).

#### **2.3.2.2 Inhibition des 5-HT-induzierten $\text{Ca}^{2+}$ -Influx durch WIN 55,212-2**

Da bisher nur in elektrophysiologischen Untersuchungen gezeigt worden war, dass endogene Cannabinoide sowie auch synthetische Cannabinoid (CB)-Rezeptoragonisten wie z.B. WIN 55,212-2 als allosterische Liganden den 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor inhibieren (Barann et al., 2002), wurde dieser Effekt auch im Aequorin-Assay untersucht. Zu diesem Zweck wurde die Inhibierungspotenz des CB<sub>1</sub>/CB<sub>2</sub>-Rezeptoragonisten WIN 55,212-2 an der R344H-Variante und dem WT-Rezeptor untersucht. WIN 55,212-2 führte bei beiden untersuchten Rezeptoren zu einer konzentrationsabhängigen Inhibition des 5-HT (3  $\mu\text{M}$ )-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx. Die ermittelten  $\text{pIC}_{50}$ -Werte, welche  $\text{IC}_{50}$ -Werten im unteren mikromolaren Bereich entsprachen, unterschieden sich nicht signifikant (Abbildung 22).



**Abbildung 22: Inhibition der 5-HT (3 µM)-induzierten Lumineszenzsignale durch WIN 55,212-2 an HEK293-Zellen, die 5-HT<sub>3A</sub> oder 5-HT<sub>3A</sub> R344H transient exprimierten**

WIN 55,212-2 war 15 min vor und während der 5-HT-Applikation anwesend. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von 7 - 8 voneinander unabhängigen Transfektionen, dargestellt als Prozentsatz der 5-HT-Antwort in Abwesenheit von WIN 55,212-2. Gezeigt sind auch die mittleren  $pIC_{50}$ -Werte  $\pm$  SEM, die mittels ungepaartem Student's t-Test auf statistisch signifikante Unterschiede geprüft wurden ( $p > 0,05$ ). Die dazugehörigen  $pK_i$ -Werte stehen in Klammern.

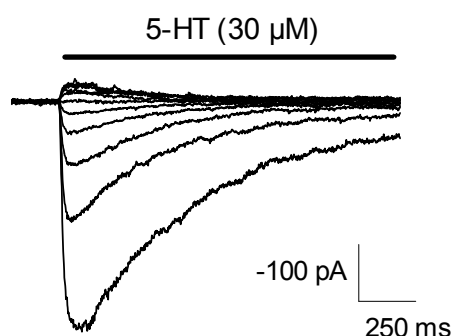
### 2.3.3 Elektrophysiologische Analysen

#### 2.3.3.1 Aufzeichnung makroskopischer Ströme

Zur Charakterisierung der Kanaleigenschaften der R344H-Variante des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors im Vergleich zum WT-Rezeptor erfolgte die Aufnahme 5-HT-induzierter Ströme an „excised outside-out“ Patches transient mit der Variante bzw. dem WT transfizierter HEK293-Zellen.

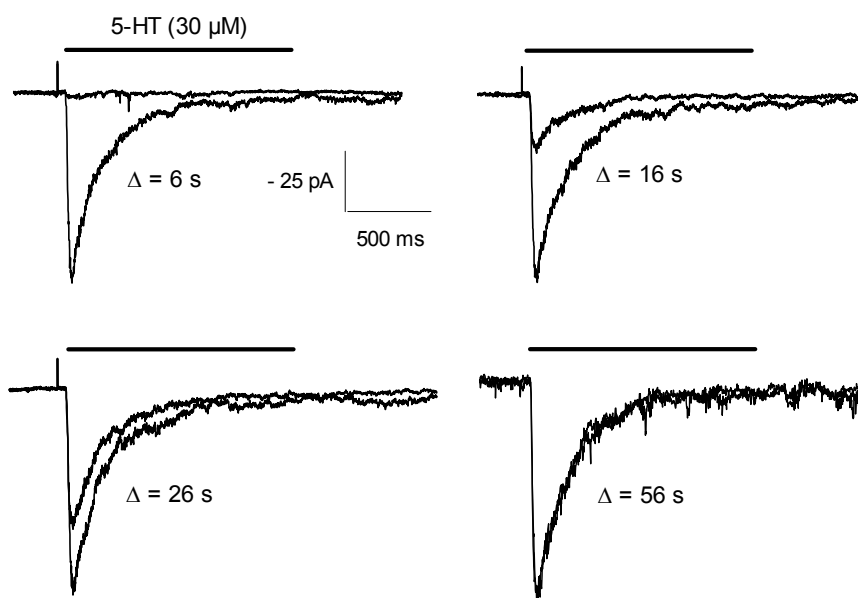
Bei einem negativen Haltepotential von -100 mV führte die schnelle Applikation von 30 µM 5-HT über einen Zeitraum von 2 s zu transienten Einwärtsströmen am WT-Rezeptor bzw. der R344H-Variante. Die Strom-Spannungsbeziehung für den 5-HT<sub>3A</sub> R344H-Rezeptor, welche ein Maß für die Abhängigkeit der Kanalleitfähigkeit vom Membranpotential ist, zeichnete sich durch eine deutliche Einwärts-Rektifikation zwischen -10 mV und -100 mV aus (Abbildung 23) und unterschied sich nicht von der des WT-Rezeptors (Barann et al., 2000b). Der 5-HT-induzierte Einstrom durch den 5-HT<sub>3A</sub> WT-Rezeptor war durch eine schnelle monophasische Aktivierung (Aktivierungskonstante  $\tau_{on}$  von  $7,0 \pm 0,8$  ms,  $n = 7$ ) und eine langsamere monophasische Desensibilisierung (Desensibilisierungskonstante  $\tau_{off}$  von  $145,0 \pm 46,0$  ms,  $n = 7$ ) charakterisiert. Die Kinetiken für Aktivierung und

Desensitisierung am 5-HT<sub>3A</sub> R344H-Rezeptor unterschieden sich zwar nicht signifikant von denen am WT-Rezeptor, waren jedoch tendentiell langsamer, charakterisiert durch größere Zeitkonstanten ( $\tau_{\text{on}} = 11,0 \pm 3,3$  ms;  $\tau_{\text{off}} = 254,0 \pm 111,0$  ms,  $n = 7$ ). Des Weiteren zeigte die R344H-Variante analog zum WT-Rezeptor (Barann et al., 2000b) eine vollständige Erholung von der 5-HT-induzierten Desensitisierung nach einer Auswaschzeit von ca. 60 s (Abbildung 24).



**Abbildung 23: Strom-Spannungsbeziehung des 5-HT<sub>3A</sub> R344H-Rezeptors**

Gezeigt sind die 5-HT (30 µM)-induzierten Ströme, aufgenommen an einem „excised outside-out“ Patch transient transfizierter HEK293-Zellen. Das Haltepotential wurde zwischen -100 mV (unterste Spur) und +100 mV (oberste Spur) variiert. Die Messung erfolgte analog derer am 5-HT<sub>3A</sub>-WT-Rezeptor, beschrieben in Barann et al. (2000b). Für weitere Details siehe Abbildung 2 dort.



**Abbildung 24: Erholung des 5-HT<sub>3A</sub> R344H-Rezeptors von der 5-HT (30 µM)-induzierten Desensitisierung**

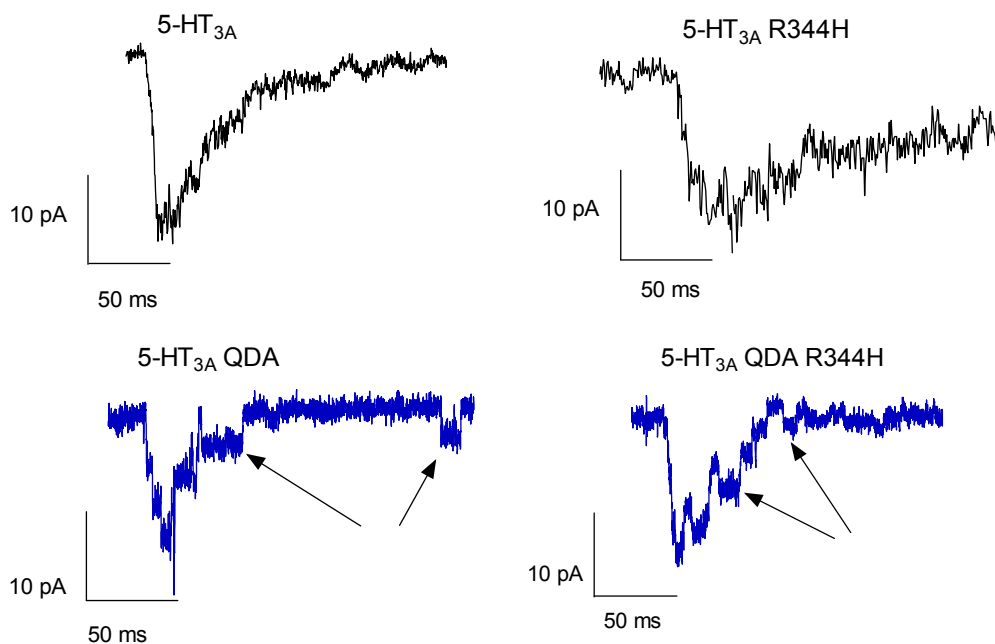
Gezeigt sind die Doppelpulssequenzen an einem Patch transient transfizierter HEK293-Zellen mit steigenden Auswaschzeiten ( $\Delta$ ) zwischen den Pulsen, aufgenommen bei einem Haltepotential von -100 mV.

### 2.3.3.2 Einzelkanalmessungen

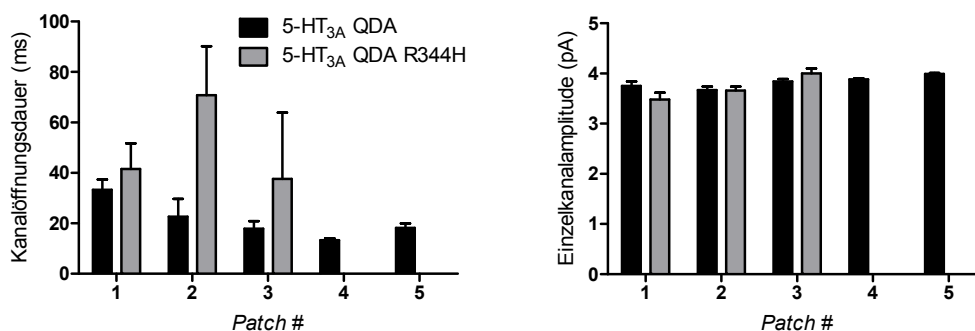
Da der homopentamere 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor eine sehr geringe und damit nicht direkt messbare Einzelkanalleitfähigkeit im Subpicoamperbereich aufweist (Brown et al., 1998; Mochizuki et al., 1999), wurde für die Analyse der Einzelkanaleigenschaften die artifizielle 5-HT<sub>3A</sub> QDA-Mutante (freundliche Gabe von Prof. J. Dilger) verwendet. Diese zeichnet sich durch eine ca. 30-fach erhöhte Einzelkanalleitfähigkeit im Vergleich zum 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor aus, da drei Arginine der IZD zwischen TM3 und TM4 gegen die entsprechenden AS der 5-HT<sub>3B</sub>-Untereinheit ausgetauscht wurden (R432Q, R436D, R440A; siehe F.2.1) (Kelley et al., 2003). Zum Vergleich der Einzelkanaleigenschaften des „WT-Rezeptors“ und der R344H-Variante erfolgte die Einführung der R344H-Mutation in den 5-HT<sub>3A</sub> QDA-Rezeptor durch gerichtete Mutagenese unter Verwendung folgender Oligonukleotidprimer: 5' CCTGCTTGGCTGCATCACCTGGTTCTGG 3' (*sense*) und 5' CCAGAACCA-GGTGATGCAGCCAAGCAGG 3' (*antisense*) (mutiertes Nukleotid unterstrichen). Anschließend wurden HEK293-Zellen stabil mit den jeweiligen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptorkonstrukten transfiziert (Herstellung stabil transfizierter Mischklone), um die elektrophysiologischen Analysen zu erleichtern. Dass makroskopisch sichtbare Einzelkanalöffnungen nach Applikation von 30 µM 5-HT nur bei den Rezeptoren auftraten, bei welchen die drei Arginine ausgetauscht wurden, ist in Abbildung 25a dargestellt. Die Einzelkanalereignisse sind dabei als treppenförmige Strukturen der Stromspuren sichtbar. Nach Auswertung der Kanalöffnungszeiten bei fünf einzelnen *Patches* ergab sich für den 5-HT<sub>3A</sub> QDA-Rezeptor eine mittlere Öffnungsdauer von  $21,1 \pm 3,4$  ms, wogegen der 5-HT<sub>3A</sub> QDA R344H-Rezeptor eine signifikant längere Öffnungsdauer von  $50,0 \pm 10,5$  ms ( $n = 3$ ) aufwies ( $p < 0,05$ ). Demgegenüber hatte der R344H-Austausch keinen Einfluss auf die Einzelkanalstromamplitude ( $3,83 \pm 0,05$  pA bzw.  $3,71 \pm 0,15$  pA), welche ein Maß für die Einzelkanalleitfähigkeit ist (Abbildung 25b).



a)



b)



**Abbildung 25: Analyse der Einzelkanaleigenschaften des 5-HT<sub>3A</sub> QDA- und 5-HT<sub>3A</sub> QDA R344H-Rezeptors nach Aufzeichnung der 5-HT (30  $\mu$ M)-induzierten Ströme an excised outside-out Patches stabil transfizierter HEK293-Zellen**

a) Dargestellt sind repräsentative Stromspuren nach Applikation von 30  $\mu$ M 5-HT bei einem Haltepotential von -100 mV. Einzelkanalereignisse sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

b) Statistische Auswertung der Kanalöffnungsdauer und Einzelkanalamplitude des 5-HT<sub>3A</sub> QDA- bzw. 5-HT<sub>3A</sub> QDA R344H-Rezeptors (n = 5 für 5-HT<sub>3A</sub> QDA, n = 3 für 5-HT<sub>3A</sub> QDA R344H mit jeweils 10 - 30 Ereignissen). Die Kanalöffnungszeiten unterschieden sich signifikant voneinander (p < 0,05), wogegen die Einzelkanalstromamplituden nicht signifikant verschieden waren (Student's t-Test).

## **2.4 Pharmakologische Charakterisierung der natürlich vorkommenden A33T-Variante des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors**

Die Charakterisierung dieser Variante erfolgte im gleichen Versuchsansatz wie die Untersuchung der Spleißvariante 5-HT<sub>3Ea</sub> und der beiden Varianten 5-HT<sub>3E(Ea)</sub> 86T und 5-HT<sub>3E(Ea)</sub> 86A und wird daher an entsprechender Stelle beschrieben (C.3.4).

## **3. Untersuchung heteromerer 5-HT<sub>3A/B,(C,D,E)</sub>-Rezeptoren**

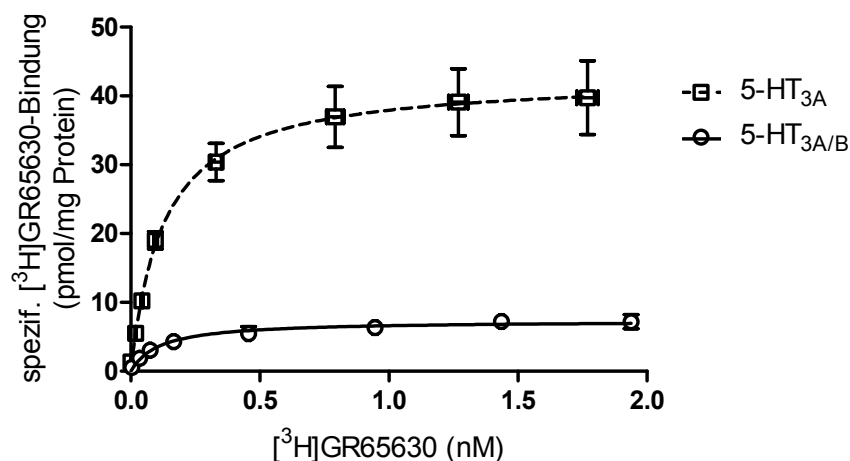
Da die 5-HT<sub>3B,C,D,E</sub>-Rezeptoruntereinheiten nicht in der Lage sind, funktionelle homopentamere Rezeptoren auszubilden (Davies et al., 1999; Niesler et al., 2007), wurden sie als Bestandteil heteromerer Rezeptoren mit der 5-HT<sub>3A</sub>-Untereinheit untersucht. Um die vorwiegende Formation heteromerer 5-HT<sub>3A/B,(C,D,E)</sub>-Rezeptoren zu gewährleisten, wurden HEK293-Zellen mit der 5-HT<sub>3A</sub>- und der jeweiligen 5-HT<sub>3B,(C,D,E)</sub>-cDNA standardmäßig im Verhältnis 1 : 4 kotransfiziert.

### **3.1 Pharmakologische Charakterisierung heteromerer 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptoren**

Obwohl die Eigenschaften heteromerer 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptoren schon in mehreren früheren Studien anderer Arbeitsgruppen untersucht wurden (Davies et al., 1999; Dubin et al., 1999; Hapfelmeier et al., 2003; Brady et al., 2001) blieben einige pharmakologische Aspekte, die nachfolgend beschrieben werden, ungeklärt. Zum Vergleich der pharmakologischen Eigenschaften homopentamerer 5-HT<sub>3A</sub>- und heteromerer 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptoren wurden Radioligandbindungsstudien und Ca<sup>2+</sup>-Influx-Assays an HEK293-Zellen, die transient mit der 5-HT<sub>3A</sub>-cDNA bzw. mit der 5-HT<sub>3A</sub>- und der 5-HT<sub>3B</sub>-cDNA kotransfiziert wurden, durchgeführt.

#### **3.1.1 Radioligandbindungsstudien**

Sättigungsexperimente mit dem 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten [<sup>3</sup>H]GR65630, durchgeführt an HEK293-Membranen, ergaben B<sub>max</sub>-Werte von 42,1 ± 6,1 pmol/mg Protein für den 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor bzw. 6,9 ± 1,0 pmol/mg Protein für den 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptor (Abbildung 26). Demzufolge führte die Koexpression der 5-HT<sub>3B</sub>-Untereinheit zu einer verminderten Expression des heteromeren 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptors, die nur 16,6 ± 1,3 % der Expression des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors beträgt. Die Affinität des Radioliganden [<sup>3</sup>H]GR65630, ausgedrückt im K<sub>D</sub>-Wert, unterschied sich nicht zwischen 5-HT<sub>3A</sub>- und 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptoren (0,09 ± 0,01 nM bzw. 0,11 ± 0,02 nM).



**Abbildung 26:** [<sup>3</sup>H]GR65630-Bindung an Membranen von HEK293-Zellen, die transient mit der 5-HT<sub>3A</sub>-cDNA bzw. mit der 5-HT<sub>3A</sub>- und der 5-HT<sub>3B</sub>-cDNA kotransfiziert wurden

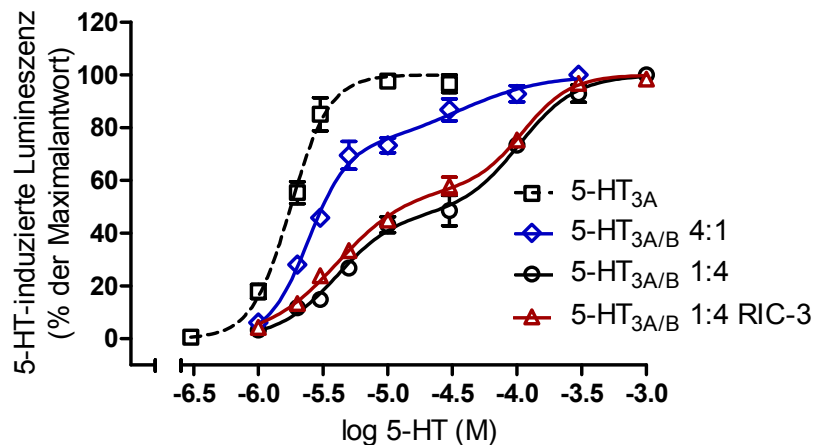
Dargestellt sind die Sättigungshyperbeln der spezifischen [<sup>3</sup>H]GR65630-Bindung (0,02 - 2 nM). Die unspezifische Bindung wurde an Membranen nichttransfizierter Zellen bestimmt. Punkte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3 - 5 voneinander unabhängigen Transfektionen.

### 3.1.2 Funktionelle Charakterisierung durch Ca<sup>2+</sup>-Influxmessungen

#### 3.1.2.1 5-HT-induzierter Ca<sup>2+</sup>-Influx

Die Konzentrations-Wirkungsbeziehung für den natürlichen Rezeptoragonisten 5-HT an Zellen, welche die 5-HT<sub>3A</sub>- und die 5-HT<sub>3B</sub>-Untereinheit exprimierten, zeigte im Gegensatz zu früheren Studien einen biphasischen Verlauf (F-Test,  $p \leq 0,001$ ) zusammengesetzt aus einer „hochpotenten“ (H) (charakterisiert durch pEC<sub>50H</sub>) und einer „niedrigpotenten“ (N) Komponente (charakterisiert durch pEC<sub>50N</sub>) (Abbildung 27). Die wahrscheinlichste Erklärung für den biphasischen Verlauf ist die Koexistenz homopentamerer 5-HT<sub>3A</sub>- neben heteromeren 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptoren in den transfizierten Zellen. Dass pEC<sub>50H</sub> im selben Größenbereich liegt wie der pEC<sub>50</sub> von 5-HT an 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren (Tabelle 4), untermauert diese Vermutung. Zur Überprüfung der genannten Hypothese erfolgte die Transfektion der Zellen mit unterschiedlichen cDNA-Mengen der zwei Rezeptoruntereinheiten. Neben der standardmäßigen Transfektion einer vierfach größeren Menge an 5-HT<sub>3B</sub>-cDNA im Vergleich zur 5-HT<sub>3A</sub>-cDNA („5-HT<sub>3A/B</sub> 1 : 4“) wurden die Zellen nun mit 5-HT<sub>3A</sub>- und 5-HT<sub>3B</sub>-cDNA im Verhältnis 4 : 1 kotransfiziert („5-HT<sub>3A/B</sub> 4 : 1“), um die bevorzugte Bildung homopentamerer 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren zu gewährleisten. Die zugehörigen Konstanten pEC<sub>50H</sub> und pEC<sub>50N</sub> änderten sich nicht im Vergleich zu

5-HT<sub>3A/B</sub> 1 : 4 (Tabelle 4). Im Gegensatz dazu war der mittlere Anteil der „hochpotenten“ Komponente (Fraktion H) von 0,44 (5-HT<sub>3A/B</sub> 1 : 4) auf 0,65 (5-HT<sub>3A/B</sub> 4 : 1) signifikant erhöht ( $p < 0,05$ , Tabelle 4). Des Weiteren wurde RIC-3, ein Chaperon, welches eine Rolle bei der Maturation neuronaler nACh-Rezeptoren und 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren spielt (siehe A.3), eingesetzt. Die Konzentrations-Wirkungsbeziehung von 5-HT an Zellen, die 5-HT<sub>3A/B</sub> 1 : 4 und RIC-3 koexprimierten, zeigte zwar gleiche pEC<sub>50</sub>-Werte aber eine signifikant auf 0,61 erhöhte mittlere Fraktion H im Vergleich zu Zellen, die kein RIC-3 exprimierten (5-HT<sub>3A/B</sub> 1 : 4) ( $p < 0,05$ , Tabelle 4). Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit den Resultaten von Cheng et al. (2007), die gezeigt haben, dass RIC-3 die Bildung homopentamerer 5-HT<sub>3A</sub>- auf Kosten heteromerer 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptoren fördert.



**Abbildung 27: Konzentrations-Wirkungsbeziehungen für 5-HT an HEK293-Zellen, die 5-HT<sub>3B</sub> und/oder 5-HT<sub>3A</sub> transient exprimieren**

Die Zellen wurden entweder nur mit der 5-HT<sub>3A</sub>-cDNA oder zusätzlich mit der 5-HT<sub>3B</sub>-cDNA in verschiedenen Verhältnissen kotransfiziert. Die Kotransfektion der RIC-3-cDNA erfolgte im Verhältnis 1 : 0,1 (Rezeptor- : RIC-3-cDNA). Gezeigt sind die Mittelwerte ( $\pm$  SEM) aus 3 - 5 voneinander unabhängigen Transfektionen dargestellt als Prozentsatz der jeweiligen 5-HT-Maximalantwort.

## Ergebnisse

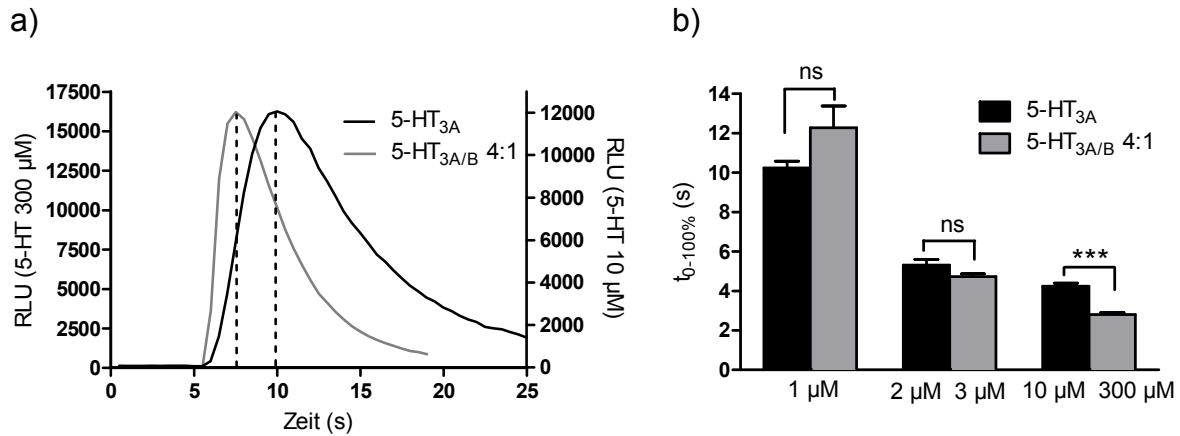
Parameter	5-HT <sub>3A</sub>	5-HT <sub>3A/B</sub> 1:4	5-HT <sub>3A/B</sub> 1:4 + RIC-3	5-HT <sub>3A/B</sub> 4:1
pEC <sub>50H</sub> (EC <sub>50</sub> , µM)	5,76 ± 0,03 (1,7)	5,47 ± 0,07 (3,4) <sup>***a</sup>	5,33 ± 0,06 (4,6) <sup>***a</sup>	5,62 ± 0,01 (2,4)
pEC <sub>50N</sub> (EC <sub>50</sub> , µM)	-	4,07 ± 0,15 (85,3)	3,94 ± 0,07 (114,3)	4,53 ± 0,27 (29,5)
Fraktion H	-	0,44 ± 0,05	0,61 ± 0,04 <sup>*b</sup>	0,65 ± 0,02 <sup>*b</sup>

**Tabelle 4: Funktionelle Parameter von 5-HT bestimmt an HEK293-Zellen, die 5-HT<sub>3B</sub> und/oder 5-HT<sub>3A</sub> transient exprimieren**

Angegeben sind Mittelwerte ± SEM von 3 - 5 unabhängigen Experimenten, deren Mittelwertkurven in Abbildung 27 dargestellt sind. Signifikante Unterschiede (*one-way ANOVA* und anschließender Dunnett's post-hoc Test) sind gekennzeichnet (\* $p \leq 0,05$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ ).

<sup>a</sup> signifikanter Unterschied zu 5-HT<sub>3A</sub>, <sup>b</sup> signifikanter Unterschied zu 5-HT<sub>3A/B</sub> 1 : 4

Die Möglichkeit der Koexistenz homopentamerer 5-HT<sub>3A</sub>- neben heteromeren 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptoren konnte durch die Analyse kinetischer Parameter der Lumineszenzsignale bekräftigt werden. Es ist bekannt, dass 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptoren eine schnellere Aktivierungs- bzw. Desensibilisierungskinetik im Vergleich zu 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren aufweisen (Dubin et al., 1999; Hapfelmeier et al., 2003). Aus diesem Grund erfolgte anhand der Rohdatenspuren der Lumineszenzsignale von Zellen, die entweder nur 5-HT<sub>3A</sub> oder 5-HT<sub>3A/B</sub> 4 : 1 exprimierten, die Bestimmung der Zeitdifferenz zwischen 5-HT-Autoinjektion und Peakmaximum ( $t_{0-100\%}$ ). Bei Auswertung der Lumineszenzpeaks, induziert durch eine kleine 5-HT-Konzentration von 1 µM bzw. durch eine Konzentration knapp oberhalb EC<sub>50H</sub> (2 µM bzw. 3 µM), welche vorwiegend 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren stimulieren, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den entsprechenden  $t_{0-100\%}$ -Werten. Demgegenüber war das Lumineszenzsignal, induziert durch die E<sub>max</sub>-auslösende 5-HT-Konzentration (10 µM bzw. 300 µM), durch einen signifikant kleineren  $t_{0-100\%}$ -Wert von  $2,3 \pm 0,2$  s für 5-HT<sub>3A/B</sub> 4 : 1-Rezeptoren im Vergleich zu  $3,7 \pm 0,1$  s an 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren charakterisiert ( $p \leq 0,001$ ) (Abbildung 28), was die schnellere Aktivierungskinetik des 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptors im Vergleich zum 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor widerspiegelt.



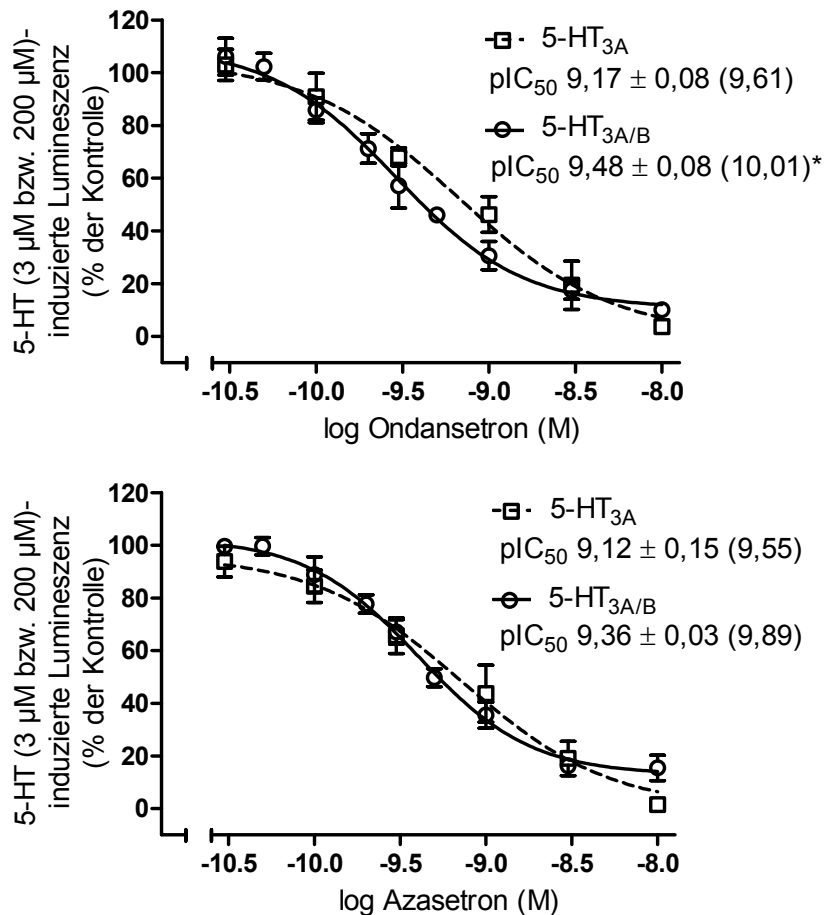
**Abbildung 28: Aktivierungskinetik der 5-HT-induzierten Lumineszenzsignale von HEK293-Zellen, die 5-HT<sub>3A</sub> oder 5-HT<sub>3A/B</sub> 4 : 1 transient exprimieren**

**a)** Dargestellt sind die übereinandergelagerten 5-HT-induzierten Lumineszenzsignale eines repräsentativen Experiments unter Verwendung der E<sub>max</sub>-auslösenden 5-HT-Konzentration. 5-HT wurde bei t = 5 s appliziert. Die t<sub>0-100%</sub>-Werte sind durch gestrichelte Linien markiert. **b)** Gezeigt sind die t<sub>0-100%</sub>-Werte (Mittelwerte ± SEM) aus vier Experimenten für jeweils drei 5-HT-Konzentrationen: (i) eine kleine Konzentration von 1 µM; (ii) eine Konzentration knapp oberhalb EC<sub>50</sub>H, 2 µM (5-HT<sub>3A</sub>) bzw. 3 µM (5-HT<sub>3A/B</sub>); (iii) die E<sub>max</sub>-auslösende Konzentration, 10 µM (5-HT<sub>3A</sub>) bzw. 300 µM (5-HT<sub>3A/B</sub>). Signifikante Unterschiede (ungepaarter Student's t-Test) sind gekennzeichnet (\*\*\*) (p ≤ 0,001).

Der maximale 5-HT-Effekt (E<sub>max</sub>) war bei Zellen, welche 5-HT<sub>3A</sub> und 5-HT<sub>3B</sub> koexprimierten, auf 15,8 ± 1,3 % des E<sub>max</sub> an homopentameren 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren erniedrigt (p ≤ 0,001, n = 8).

### 3.1.2.2 Inhibition des 5-HT-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Influx durch 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten

Lumineszenzsignale, induziert durch die ca. zweifache EC<sub>50</sub>-5-HT-Konzentration, d.h. 3 µM im Falle der 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren bzw. 200 µM bei 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptoren, wurden konzentrationsabhängig durch die 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten Ondansetron und Azasetron inhibiert. Die Konzentrations-Wirkungskurven zeigten für beide getesteten Rezeptorsubtypen einen monophasischen Verlauf. Die pIC<sub>50</sub>-Werte beider Antagonisten waren an den homopentameren 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren geringfügig kleiner, was allerdings nur im Falle von Ondansetron zu einem signifikanten Unterschied führte (Abbildung 29).



**Abbildung 29: Inhibition der 5-HT-induzierten Lumineszenzsignale durch Ondansetron und Azasetron an HEK293-Zellen, die 5-HT<sub>3B</sub> und/oder 5-HT<sub>3A</sub> transient exprimieren**

Zur Rezeptoraktivierung wurde die zweifache EC<sub>50</sub>-Konzentration von 5-HT, d.h. 3 µM (5-HT<sub>3A</sub>) bzw. 200 µM (5-HT<sub>3A/B</sub>), eingesetzt. Der Antagonist war 15 min vor und während der 5-HT-Applikation anwesend. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM von 3 - 4 voneinander unabhängigen Transfektionen, dargestellt als Prozentsatz der 5-HT-Antwort in Abwesenheit des Antagonisten. Gezeigt sind auch die mittleren pIC<sub>50</sub>-Werte ± SEM und die dazugehörigen pK<sub>i</sub>-Werte in Klammern. Signifikante Unterschiede der pIC<sub>50</sub>-Werte (ungepaarter Student's t-Test) sind gekennzeichnet (\*p ≤ 0,05).

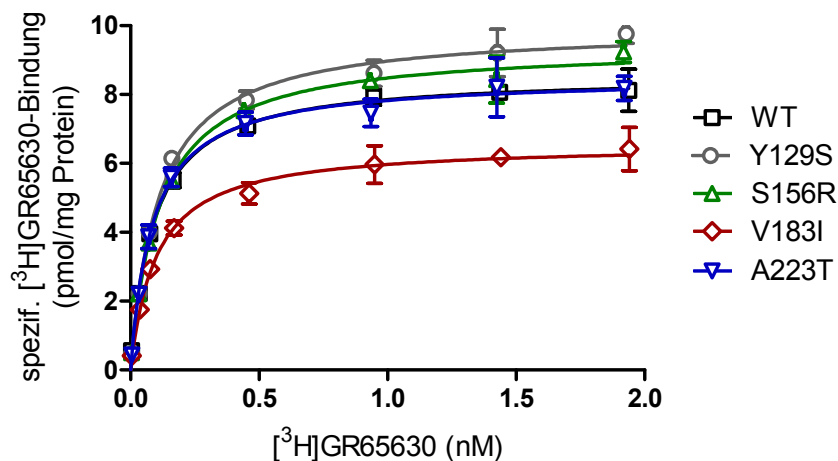
### 3.2 Pharmakologische Charakterisierung natürlich vorkommender Varianten der 5-HT<sub>3B</sub>-Untereinheit

Da die 5-HT<sub>3B</sub>-Rezeptoruntereinheit alleine keine funktionellen homopentameren Rezeptoren ausbilden kann, wurden die 5-HT<sub>3B</sub>-Varianten mit der 5-HT<sub>3A</sub>-Untereinheit in HEK293-Zellen koexprimiert. Analog Abschnitt C.3.1 erfolgte die pharmakologische Charakterisierung der gebildeten heteromeren 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptoren mittels Radioligandbindungsstudien und Ca<sup>2+</sup>-Influx-Analysen. Vier natürlich vorkommende 5-HT<sub>3B</sub>-Varianten, bei welchen jeweils eine Aminosäure im

N-terminalen Bereich gegen eine andere substituiert ist, nämlich Y129S, S156R, V183I und A223T (Frank et al., 2004), wurden als Bestandteil heteromerer 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptorkomplexe auf Expressionsunterschiede und funktionelle Unterschiede im Vergleich zum 5-HT<sub>3A/B</sub>-Wildtyp (WT)-Rezeptor untersucht.

### 3.2.1 Radioligandbindungsstudien

Sättigungsbindungsexperimente mit [<sup>3</sup>H]GR65630, durchgeführt an HEK293-Membranen, ergaben nicht signifikant erhöhte B<sub>max</sub>-Werte für 5-HT<sub>3A/B</sub> Y129S und 5-HT<sub>3A/B</sub> S156R auf 116,6 ± 6,2 % bzw. 112,8 ± 2,4 % der B<sub>max</sub> der WT-Kontrolle. Demgegenüber war die B<sub>max</sub> im Falle von 5-HT<sub>3A/B</sub> V183I signifikant auf 77,8 ± 6,3 % (p < 0,05) im Vergleich zur WT-Kontrolle reduziert, währenddessen die Rezeptorexpression von 5-HT<sub>3A/B</sub> A223T sich nicht von der des WT-Rezeptors unterschied. Die K<sub>D</sub>-Werte und damit die Affinität des Radioliganden [<sup>3</sup>H]GR65630 zeigten keine Unterschiede zwischen den untersuchten Rezeptoren (Abbildung 30). B<sub>max</sub> und K<sub>D</sub>-Werte für die Varianten und den WT sind in Tabelle 5 aufgelistet.



**Abbildung 30: [<sup>3</sup>H]GR65630-Bindung an Membranen von HEK293-Zellen, die transient mit der 5-HT<sub>3A</sub>-cDNA bzw. mit der 5-HT<sub>3A</sub>- und den 5-HT<sub>3B</sub>-Varianten-cDNAs kotransfiziert wurden**

Dargestellt sind die Sättigungshyperbeln der spezifischen [<sup>3</sup>H]GR65630-Bindung (0,02 - 2 nM). Die unspezifische Bindung wurde an Membranen nichttransfizierter Zellen bestimmt. Punkte repräsentieren Mittelwerte ± SEM aus drei voneinander unabhängigen Transfektionen. Die Bezeichnung WT bezieht sich auf den 5-HT<sub>3A/B</sub>-WT-Rezeptor. Die heteromeren Komplexe aus 5-HT<sub>3A</sub> und 5-HT<sub>3B</sub>-Varianten sind mit dem jeweiligen Aminosäureaustausch in der 5-HT<sub>3B</sub>-Untereinheit bezeichnet.



## Ergebnisse

Rezeptor	B <sub>max</sub> (pmol/mg Protein)	K <sub>D</sub> (nM)
5-HT <sub>3A/B</sub> WT	8,53 ± 0,30	0,11 ± 0,02
5-HT <sub>3A/B</sub> Y129S	9,93 ± 0,52	0,08 ± 0,02
5-HT <sub>3A/B</sub> S156R	9,61 ± 0,22	0,10 ± 0,02
5-HT <sub>3A/B</sub> V183I	6,60 ± 0,38*	0,08 ± 0,02
5-HT <sub>3A/B</sub> A223T	8,49 ± 0,53	0,07 ± 0,01

**Tabelle 5: B<sub>max</sub>- und K<sub>D</sub>-Werte für [<sup>3</sup>H]GR65630 aus Sättigungsbindungsversuchen an Membranen von HEK293-Zellen, die transient mit der 5-HT<sub>3A</sub>-cDNA bzw. mit der 5-HT<sub>3A</sub>- und den 5-HT<sub>3B</sub>-Varianten-cDNAs kotransfiziert wurden**

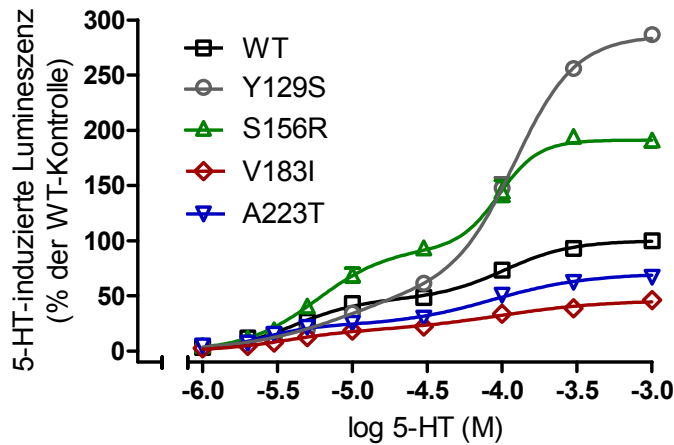
Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die in Abbildung 30 veranschaulicht sind. Signifikante Unterschiede im Vergleich zum 5-HT<sub>3A/B</sub>-WT (*one-way ANOVA* gefolgt von einem Dunnett's post-hoc Test) sind gekennzeichnet (\*p ≤ 0,05).

### 3.2.2 Funktionelle Charakterisierung durch Ca<sup>2+</sup>-Influxmessungen

#### 3.2.2.1 5-HT-induzierter Ca<sup>2+</sup>-Influx

Konzentrations-Wirkungs-Experimente mit 5-HT führten bei allen vier 5-HT<sub>3A/B</sub>-Varianten zu biphasischen Konzentrations-Wirkungskurven (F-Test, p ≤ 0,05), wie das für Zellen gezeigt wurde, welche die 5-HT<sub>3A</sub>- und die 5-HT<sub>3B</sub>-WT-Untereinheit exprimieren (C.3.1.2.1) (Abbildung 31). Die korrespondierenden pEC<sub>50</sub>H- und pEC<sub>50</sub>N-Werte zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Rezeptorvarianten und dem WT-Rezeptor (Tabelle 6).

Im Gegensatz dazu unterschieden sich die Maximaleffekte (E<sub>max</sub>), die in acht voneinander unabhängigen Experimenten bestimmt wurden, signifikant zwischen den untersuchten 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptoren. 5-HT löste einen ca. dreifach erhöhten E<sub>max</sub> an 5-HT<sub>3A/B</sub> Y129S im Vergleich zum 5-HT<sub>3A/B</sub>-WT-Rezeptor aus (286,8 ± 20,0 %, *one-way ANOVA*, p < 0,001). Analog dazu war E<sub>max</sub> an 5-HT<sub>3A/B</sub> S156R auf 197,1 ± 22,8 % verglichen mit dem WT-Rezeptor erhöht (p < 0,001). Der E<sub>max</sub> von 5-HT an 5-HT<sub>3A/B</sub> V183I war auf 46,1 ± 4,6 % des E<sub>max</sub> am WT-Rezeptor erniedrigt (p < 0,01). Einen nicht signifikant erniedrigten E<sub>max</sub> auf 69,0 ± 10,0 % des WT-Rezeptors löste 5-HT an 5-HT<sub>3A/B</sub> A223T aus.



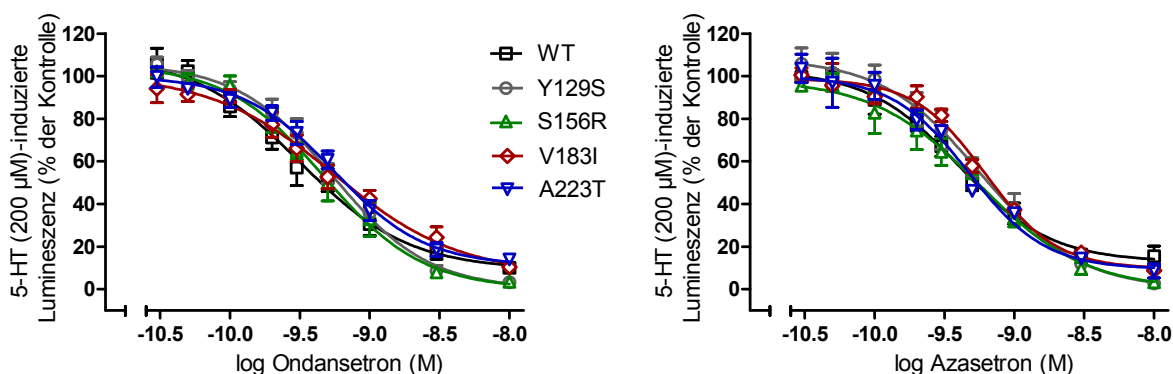
**Abbildung 31: Konzentrations-Wirkungsbeziehungen für 5-HT an HEK293-Zellen, welche die 5-HT<sub>3A</sub>-Untereinheit und 5-HT<sub>3B</sub>-Varianten transient koexprimieren**

Gezeigt sind die Mittelwerte ( $\pm$  SEM) aus 3 - 5 voneinander unabhängigen Transfektionen, dargestellt als Prozentsatz des  $E_{max}$  von 5-HT am 5-HT<sub>3A/B</sub>-WT-Rezeptor. Die 5-HT- $E_{max}$ -Werte wurden in acht separaten voneinander unabhängigen Experimenten wie unter B.2.4.2.5 beschrieben ermittelt. Die Bezeichnung WT bezieht sich auf den 5-HT<sub>3A/B</sub>-WT-Rezeptor. Die heteromeren Komplexe aus 5-HT<sub>3A</sub> und 5-HT<sub>3B</sub>-Varianten sind mit dem jeweiligen Aminosäureaustausch in der 5-HT<sub>3B</sub>-Untereinheit bezeichnet.

### 3.2.2.2 Inhibition des 5-HT-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Influx durch 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten

Lumineszenzsignale induziert durch 200  $\mu$ M 5-HT wurden konzentrationsabhängig durch die 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten Ondansetron und Azasetron inhibiert. Die aus den monophasischen Inhibitionskurven resultierenden pIC<sub>50</sub>-Werte unterschieden sich nicht signifikant zwischen den getesteten Varianten und dem WT (Abbildung 32, Tabelle 6).

## Ergebnisse



**Abbildung 32: Inhibition der 5-HT (200 µM)-induzierten Lumineszenzsignale durch Ondansetron und Azasetron an HEK293-Zellen, welche die 5-HT<sub>3A</sub>-Untereinheit und 5-HT<sub>3B</sub>-Varianten transient koexprimieren**

Der Antagonist war 15 min vor und während 5-HT-Applikation anwesend. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3 - 4 voneinander unabhängigen Transfektionen, dargestellt als Prozentsatz der 5-HT-Antwort in Abwesenheit des Antagonisten. Die Bezeichnung WT bezieht sich auf den 5-HT<sub>3A/B</sub>-WT-Rezeptor. Die heteromeren Komplexe aus 5-HT<sub>3A</sub> und 5-HT<sub>3B</sub>-Varianten sind mit dem jeweiligen Aminosäureaustausch in der 5-HT<sub>3B</sub>-Untereinheit bezeichnet.

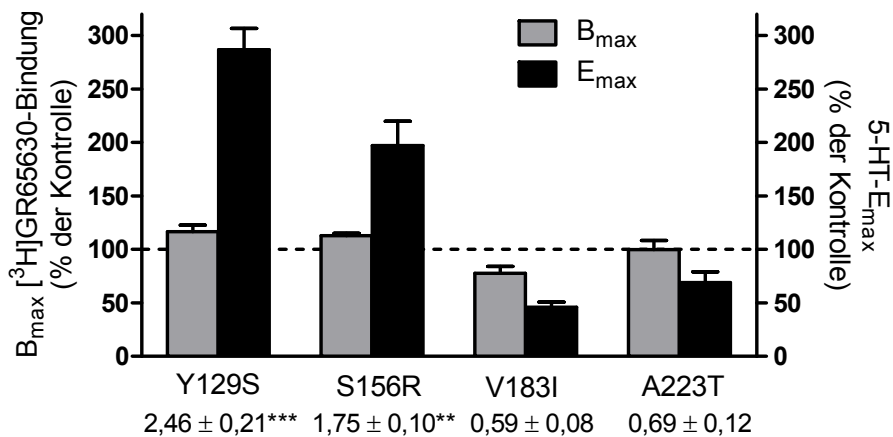
Parameter	WT	Y129S	S156R	V183I	A223T
<b>5-HT</b>					
pEC <sub>50H</sub> (EC <sub>50</sub> , µM)	5,47 $\pm$ 0,07 (3,4)	5,07 $\pm$ 0,11 (8,5)	5,39 $\pm$ 0,17 (4,1)	5,45 $\pm$ 0,10 (3,6)	5,38 $\pm$ 0,18 (4,2)
pEC <sub>50N</sub> (EC <sub>50</sub> , µM)	4,07 $\pm$ 0,15 (85,3)	3,91 $\pm$ 0,04 (123,0)	4,14 $\pm$ 0,11 (71,9)	4,23 $\pm$ 0,16 (59,2)	3,90 $\pm$ 0,11 (127,1)
<b>Ondansetron</b>					
pIC <sub>50</sub> (pK <sub>I</sub> )	9,48 $\pm$ 0,08 (10,01)	9,28 $\pm$ 0,10 (9,69)	9,30 $\pm$ 0,10 (9,88)	9,20 $\pm$ 0,09 (9,85)	9,24 $\pm$ 0,04 (9,65)
<b>Azasetron</b>					
pIC <sub>50</sub> (pK <sub>I</sub> )	9,36 $\pm$ 0,03 (9,89)	9,24 $\pm$ 0,05 (9,66)	9,28 $\pm$ 0,06 (9,86)	9,21 $\pm$ 0,01 (9,85)	9,27 $\pm$ 0,08 (9,68)

**Tabelle 6: Funktionelle Parameter, bestimmt im Aequorin-Assay an HEK293-Zellen, welche die 5-HT<sub>3A</sub>-Untereinheit und 5-HT<sub>3B</sub>-Varianten transient koexprimieren**

Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 3 - 5 voneinander unabhängigen Experimenten, die in Abbildung 31 und Abbildung 32 grafisch dargestellt sind. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich zum WT-Rezeptor ( $p > 0,05$ , *one-way ANOVA* gefolgt von einem Dunnett's post-hoc Test). Die Bezeichnung WT bezieht sich auf den 5-HT<sub>3A/B</sub>-WT-Rezeptor. Die heteromeren Komplexe aus 5-HT<sub>3A</sub> und 5-HT<sub>3B</sub>-Varianten sind mit dem jeweiligen Aminosäureaustausch in der 5-HT<sub>3B</sub>-Untereinheit bezeichnet.

### 3.2.2.3 Verhältnis $E_{max}$ / $B_{max}$

Da die Maximalantwort auf 5-HT im Aequorin-Assay ( $E_{max}$ ) mit der Anzahl der Rezeptoren auf der Zelloberfläche ( $B_{max}$ ) korreliert, erfolgte für jede untersuchte 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptorvariante die Bestimmung des Verhältnisses %  $E_{max}$  / %  $B_{max}$  in Relation zum 5-HT<sub>3A/B</sub>-WT-Rezeptor (Abbildung 33). Der 5-HT<sub>3A/B</sub> A223T-Rezeptor zeigte keine signifikanten Unterschiede in  $E_{max}$  und  $B_{max}$  zum WT-Rezeptor, währenddessen der 5-HT<sub>3A/B</sub> V183I-Rezeptor eine geringere  $B_{max}$  und gleichzeitig einen geringeren  $E_{max}$  im Unterschied zum WT-Rezeptor aufwies. Das  $E_{max}$  /  $B_{max}$ -Verhältnis war für diese beiden Rezeptorvarianten nicht signifikant unterschiedlich von eins. Im Gegensatz dazu induzierte 5-HT an den 5-HT<sub>3A/B</sub> Y129S- und 5-HT<sub>3A/B</sub> S156R-Rezeptorvarianten einen größeren Maximaleffekt als das hinsichtlich der jeweiligen Rezeptorexpression zu erwarten war. Die  $E_{max}$  /  $B_{max}$ -Verhältnisse dieser beiden Varianten sind demzufolge signifikant größer als eins ( $p < 0,001$  bzw.  $p < 0,01$ ) (Abbildung 33), so dass davon ausgegangen werden kann, dass der Austausch dieser beiden Aminosäuren zu veränderten Kanaleigenschaften des 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptors führt.



**Abbildung 33:  $B_{max}$ -Werte ( $[^3H]GR65630$ -Bindung) und 5-HT- $E_{max}$ -Werte (Aequorin-Assay) der untersuchten 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptorvarianten im Vergleich**

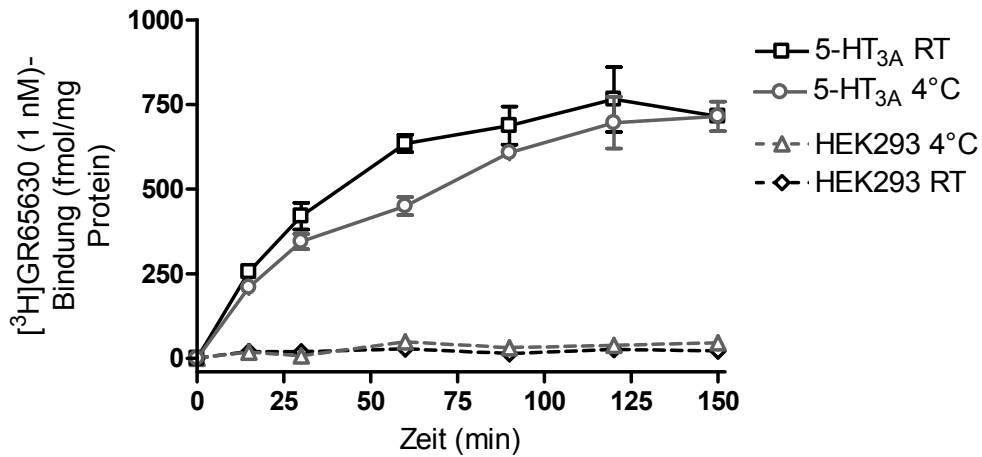
Die Werte (Mittelwerte  $\pm$  SEM), dargestellt als Prozentsatz der 5-HT<sub>3A/B</sub>-WT-Kontrolle, stammen aus den in Abbildung 30 und Abbildung 31 gezeigten Experimenten. Die jeweiligen  $E_{max}$  /  $B_{max}$ -Verhältnisse (Mittelwerte  $\pm$  SEM) sind unter den Säulen abgebildet. Signifikante Unterschiede von eins (*one-way ANOVA* gefolgt von einem Dunnett's post-hoc Test) sind gekennzeichnet (\*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ ). Die heteromeren Komplexe aus 5-HT<sub>3A</sub> und 5-HT<sub>3B</sub>-Varianten sind mit dem jeweiligen Aminosäureaustausch in der 5-HT<sub>3B</sub>-Untereinheit bezeichnet.

### 3.3 Analyse der Bindungseigenschaften der 5-HT<sub>3C,D,E,Ea</sub>-Untereinheiten

Um zu untersuchen, ob die kürzlich klonierten Untereinheiten des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors, 5-HT<sub>3C,D,E</sub> (Niesler et al., 2003) und die Spleißvariante 5-HT<sub>3Ea</sub> (Karnovsky et al., 2003), eine Bindungsstelle für orthosterische Rezeptorliganden besitzen, wurden Bindungsexperimente mit dem 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten [<sup>3</sup>H]GR65630 durchgeführt. Da nur die Bindungsstellen an der Zelloberfläche erfasst werden sollten, erfolgten die Versuche an transient transfizierten adhärenen HEK293-Zellen. Die Optimierung erfolgte allerdings unter Einsatz von HEK293-Zellen, die 5-HT<sub>3A</sub> stabil exprimieren. Da in Immunfluoreszenzexperimenten gezeigt wurde, dass die besagten 5-HT<sub>3</sub>-Untereinheiten nicht alleine an die Zellmembran gelangen sondern dafür die 5-HT<sub>3A</sub>-Untereinheit benötigen (Niesler et al., 2007), wurde diese als Vehikel eingesetzt. Zu diesem Zweck wurde eine 5-HT<sub>3A</sub>-Mutante generiert, die zwar an die Zellmembran transportiert wird aber keine Bindungsstelle für orthosterische Liganden besitzt.

#### 3.3.1 Optimierung der Bindungsversuche

Zur Optimierung der Versuchsbedingungen für die Radioligandbindung an adhärenen Zellen wurde der zeitliche Verlauf der [<sup>3</sup>H]GR65630 (1 nM)-Bindung an HEK293-Zellen, welche die 5-HT<sub>3A</sub>-Untereinheit stabil exprimieren, bei 4°C und Raumtemperatur (RT) ermittelt. Die Bestimmung der unspezifischen Bindung erfolgte unter Einsatz nichttransfizierter HEK293-Zellen (Abbildung 34). Dabei zeigte sich, dass die Inkubation bei Raumtemperatur zu einer geringfügig höheren [<sup>3</sup>H]GR65630-Bindung führt. Ab einer Inkubationszeit von 120 min zeigte sich bei beiden Temperaturen keine weitere Steigerung der Bindung. Die Bindung an nichttransfizierten HEK293-Zellen war über den gesamten Zeitraum der Inkubation mit [<sup>3</sup>H]GR65630 nahezu gleich bleibend gering. Demzufolge wurden die Zellen in nachfolgenden Experimenten über einen Zeitraum von 120 min bei Raumtemperatur mit dem Radioliganden inkubiert.



**Abbildung 34: Zeitlicher Verlauf der [<sup>3</sup>H]GR65630 (1 nM)-Bindung an adhärenen HEK293-Zellen, welche die 5-HT<sub>3A</sub>-Untereinheit stabil exprimieren**

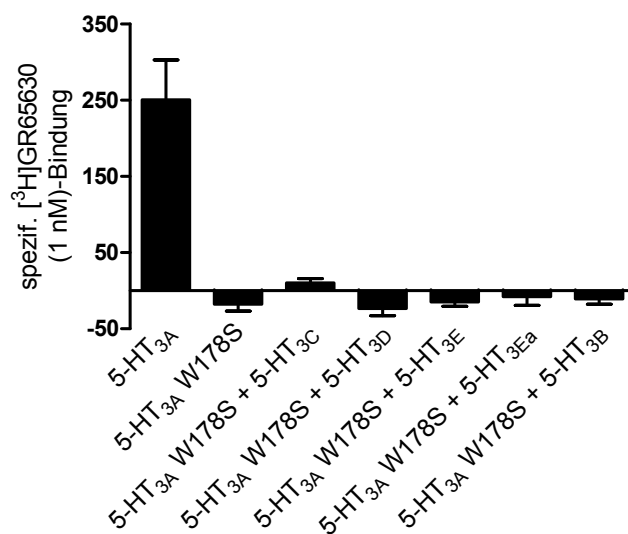
Gezeigt sind die Mittelwerte ± SEM der [<sup>3</sup>H]GR65630-Bindung für sechs Zeitpunkte bei 4°C bzw. Raumtemperatur (RT) aus drei voneinander unabhängigen Experimenten. Dargestellt ist zusätzlich die unspezifische Bindung des Radioliganden an nichttransfizierten HEK293-Zellen.

### 3.3.2 Generierung einer bindungsdefizienten 5-HT<sub>3A</sub>-Untereinheit

Um zu untersuchen, ob die Untereinheiten 5-HT<sub>3C,D,E,Ea</sub> alleine in der Lage sind, 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorliganden zu binden, wurde eine 5-HT<sub>3A</sub>-Untereinheit generiert, welche zwar an die Zellmembran gelangt aber keine Bindungsstelle aufweist, um als Vehikel den Transport der genannten Untereinheiten an die Zellmembran zu ermöglichen. Diese 5-HT<sub>3A</sub>-Mutante, die erstmals im murinen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor charakterisiert wurde (Spier und Lummis, 2000) und die, in Form der humanen Untereinheit, von Boyd et al. (2002) zur Untersuchung der 5-HT<sub>3B</sub>-Untereinheit eingesetzt wurde, zeichnet sich durch den Austausch der Aminosäure Tryptophan in Position 178 gegen Serin aus (W178S). Die Herstellung der 5-HT<sub>3A</sub> W178S-Untereinheit erfolgte durch gerichtete Mutagenese unter Verwendung der 5-HT<sub>3A</sub>-cDNA im Vektor pcDNA3 als Matrize und den Mutageneseprimern (mutiertes Nukleotid unterstrichen) 5' GACCTTCACTTCGCTGCACACCATCC 3' (*sense*) und 5' GGATGGTGTGCAGCGAACTGGTGAAGGTC 3' (*antisense*). Desgleichen wurde die Mutation in mit einem Hämagglutinin (HA)- bzw. einem Myc-tag markierte 5-HT<sub>3A</sub>-cDNAs eingeführt, um eine Immunfluoreszenzanalyse unter Verwendung entsprechender Antikörper zu ermöglichen.

### 3.3.3 Radioligandbindungsstudien

Die Radioligandbindung erfolgte durch Inkubation transient transfizierter HEK293-Zellen mit 1 nM [ $^3$ H]GR65630, einer Konzentration, die etwa dem dreifachen  $K_D$ -Wert (Tabelle 3, C.2.3.1) am 5-HT $_{3A}$ -Rezeptor entspricht. Zellen, die den 5-HT $_{3A}$ -Rezeptor exprimierten, zeigten eine spezifische [ $^3$ H]GR65630-Bindung von  $251 \pm 52$  fmol/mg Protein. Dagegen wiesen Zellen, die mit der 5-HT $_{3A}$  W178S-cDNA transfiziert wurden, keine spezifische Bindung auf, was wie erwartet zeigt, dass die mutierte Untereinheit keine orthosterische Ligandbindungsstelle besitzt. Nach Kotransfektion der Zellen mit der 5-HT $_{3A}$  W178S- und jeweils einer der zu untersuchenden Untereinheiten konnte ebenfalls keine spezifische [ $^3$ H]GR65630-Bindung gemessen werden (Abbildung 35). Gleiches konnte für die 5-HT $_{3B}$ -Untereinheit gezeigt werden, die schon zuvor in der Hinsicht charakterisiert wurde (Boyd et al., 2002). Eine eindeutige Membranexpression der 5-HT $_{3A}$  W178S- und der 5-HT $_{3C,D,E,Ea}$ -Untereinheiten wurde mittels Immunfluoreszenz unter Einsatz HA-/Myc-markierter Untereinheiten durch Frau Dr. Beate Niesler aus dem Institut für Humangenetik der Universität Heidelberg verifiziert (Niesler et al., 2007).



**Abbildung 35: Spezifische [ $^3$ H]GR65630 (1 nM)-Bindung an adhärenen HEK293-Zellen, welche die bindungsdefiziente 5-HT $_{3A}$  W178S-Untereinheit und jeweils eine der 5-HT $_{3C,D,E,Ea,B}$ -Untereinheiten exprimieren**

Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 5 - 8 voneinander unabhängigen Transfektionen. Zur Kontrolle wurden der 5-HT $_{3A}$ -WT- und der 5-HT $_{3A}$  W178S-Rezeptor mit untersucht. In diesen beiden Fällen wurde der leere Plasmidvektor zur Angleichung der DNA-Mengen bei der Transfektion eingesetzt. Die Kotransfektion der 5-HT $_{3A}$  W178S-cDNA und der cDNAs der jeweiligen 5-HT $_{3}$ -Untereinheit erfolgte im Verhältnis 1 : 1. Der 5-HT $_{3A}$  W178S- bzw. die gebildeten heteromeren Rezeptoren wiesen keine signifikant von Null verschiedene spezifische [ $^3$ H]GR65630-Bindung auf ( $p > 0,05$ , *one-way ANOVA*).

### **3.4 Pharmakologische Charakterisierung der Spleißvariante 5-HT<sub>3Ea</sub> und der beiden Varianten 5-HT<sub>3E(Ea)</sub> 86T bzw. 5-HT<sub>3E(Ea)</sub> 86A (T86A-Polymorphismus)**

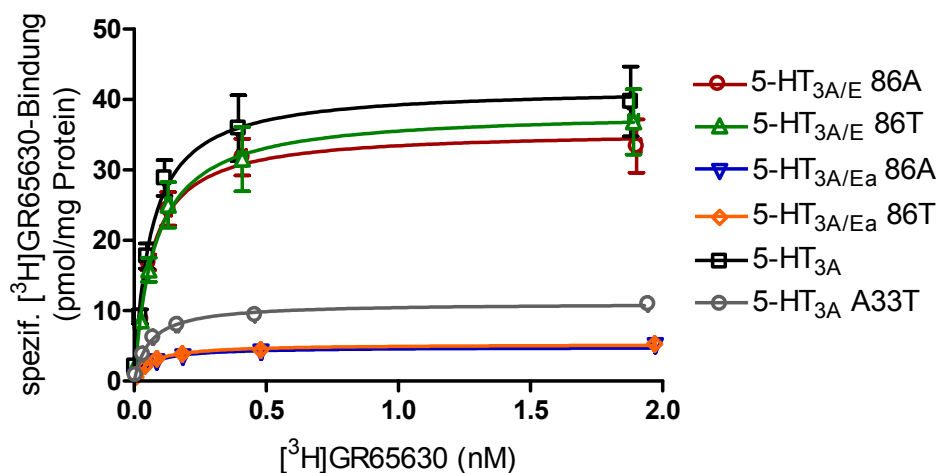
Die von Karnovsky et al. (2003) erstmals beschriebene Spleißvariante der 5-HT<sub>3E</sub>-Rezeptoruntereinheit 5-HT<sub>3Ea</sub>, welche sich durch eine alternative Signalsequenz von 5-HT<sub>3E</sub> unterscheidet (siehe F.2.1) und die beiden Varianten der humanen 5-HT<sub>3E</sub>-Rezeptoruntereinheit (5-HT<sub>3E</sub> 86T und 5-HT<sub>3E</sub> 86A) wurden hinsichtlich ihrer Expression und Funktion charakterisiert. Der T86A-Polymorphismus wurde in zwei Fall-Kontrollstudien (Reizdarm-, Essstörungsstudie), welche Individuen der kaukasischen Population umfassten, gefunden. Die Charakterisierung der seltener in der Kohorte detektierten 5-HT<sub>3E</sub> 86A-Variante (Niesler, unpublizierte Daten), deren Sequenz aber zuerst in der Gendatenbank veröffentlicht wurde (AY159813), erfolgte bereits in einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe (Niesler et al., 2007). Da die 5-HT<sub>3E</sub>-Untereinheit genau wie 5-HT<sub>3B,C,D</sub> nur zusammen mit 5-HT<sub>3A</sub> funktionell exprimiert werden kann, erfolgte die pharmakologische Charakterisierung der beiden Varianten der 5-HT<sub>E</sub>- und demzufolge auch der 5-HT<sub>3Ea</sub>-Untereinheit an HEK293-Zellen, welche die 5-HT<sub>3A</sub>- und die jeweils eine der entsprechenden 5-HT<sub>3E</sub>- bzw. 5-HT<sub>3Ea</sub>-Untereinheiten transient koexprimierten. Im Rahmen dieser Versuchsreihe erfolgte des Weiteren die pharmakologische Charakterisierung der natürlich vorkommenden 5-HT<sub>3A</sub> A33T-Variante, welche in der gleichen Kohorte detektiert wurde.

#### **3.4.1 Radioligandbindungsstudien**

Die Expression der zu charakterisierenden 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren wurde durch Sättigungsbindungsstudien mit [<sup>3</sup>H]GR65630 an Membranen transient transfizierter HEK293-Zellen untersucht. Die Koexpression der 5-HT<sub>3E</sub> 86A- mit der 5-HT<sub>3A</sub>-Untereinheit resultierte nicht in einer Veränderung der Expression des gebildeten 5-HT<sub>3A/E</sub>-Rezeptors im Vergleich zum 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor [88,4 ± 8,3 % (n = 5), Abbildung 36; siehe auch D.3.1]. Dies traf auch auf den 5-HT<sub>3A/E</sub> 86T-Rezeptor im Vergleich zu 5-HT<sub>3A</sub> zu (92,9 ± 11,8 %, n = 5). Die Spleißvariante 5-HT<sub>3Ea</sub> führte nach Koexpression mit der 5-HT<sub>3A</sub>-Untereinheit zu einer signifikanten Verringerung der B<sub>max</sub> auf nur noch 13,6 ± 1,7 % (5-HT<sub>3Ea</sub> 86A) bzw. 14,3 ± 1,6 % (5-HT<sub>3Ea</sub> 86T) verglichen mit dem entsprechenden 5-HT<sub>3A/E</sub>-Rezeptor (p < 0,001, n = 5). Der Austausch von Alanin gegen Threonin in Position 86 der 5-HT<sub>3E</sub>- bzw. 5-HT<sub>3Ea</sub>-Untereinheit führte zu keiner Veränderung des B<sub>max</sub>-Wertes der entsprechenden heteromeren Rezeptoren. Dagegen zeigte die A33T-Variante des



5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors eine auf  $26,6 \pm 2,6$  % reduzierte  $B_{max}$  im Vergleich zum 5-HT<sub>3A</sub>-WT-Rezeptor. Die  $K_D$ -Werte des Radioliganden [<sup>3</sup>H]GR65630 unterschieden sich nicht signifikant zwischen den getesteten Rezeptoren. Die  $B_{max}$ - und  $K_D$ -Werte sind in Tabelle 7 aufgelistet.



**Abbildung 36:** [<sup>3</sup>H]GR65630-Bindung an Membranen von HEK293-Zellen, die transient mit der 5-HT<sub>3A</sub>- bzw. 5-HT<sub>3A</sub> A33T-cDNA bzw. mit der 5-HT<sub>3A</sub>- und den 5-HT<sub>3E,(Ea)</sub>-Varianten-cDNAs kotransfiziert wurden

Gezeigt sind die Sättigungshyperbeln der spezifischen [<sup>3</sup>H]GR65630-Bindung (0,01 - 2 nM). Die unspezifische Bindung wurde an Membranen nichttransfizierter Zellen bestimmt. Punkte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 4 - 5 voneinander unabhängigen Transfektionen.

Rezeptor	$B_{max}$ (pmol/mg Protein)	$K_D$ (nM)
5-HT <sub>3A/E</sub> 86A	$34,19 \pm 3,22$	$0,07 \pm 0,01$
5-HT <sub>3A/E</sub> 86T	$35,92 \pm 4,56$	$0,08 \pm 0,01$
5-HT <sub>3A/Ea</sub> 86A	$4,66 \pm 0,57^{***a}$	$0,05 \pm 0,01$
5-HT <sub>3A/Ea</sub> 86T	$5,12 \pm 0,56^{***a}$	$0,06 \pm 0,01$
5-HT <sub>3A</sub>	$38,68 \pm 5,07$	$0,07 \pm 0,01$
5-HT <sub>3A</sub> A33T	$10,27 \pm 1,00^{***b}$	$0,07 \pm 0,01$

**Tabelle 7:**  $B_{max}$ - und  $K_D$ -Werte für [<sup>3</sup>H]GR65630 aus Sättigungsbindungsversuchen an Membranen von HEK293-Zellen, die transient mit der 5-HT<sub>3A</sub>- bzw. 5-HT<sub>3A</sub> A33T-cDNA bzw. der 5-HT<sub>3A</sub>- und den 5-HT<sub>3E,(Ea)</sub>-Varianten-cDNAs kotransfiziert wurden

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 4 - 5 voneinander unabhängigen Experimenten, die in Abbildung 36 veranschaulicht sind. Signifikante Unterschiede (*one-way ANOVA* gefolgt von Tukey's post-hoc Test) sind gekennzeichnet ( $***p \leq 0,001$ ).

<sup>a</sup> signifikanter Unterschied im Vergleich zum entsprechenden 5-HT<sub>3A/E</sub>-Rezeptor

<sup>b</sup> signifikanter Unterschied im Vergleich zum 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor

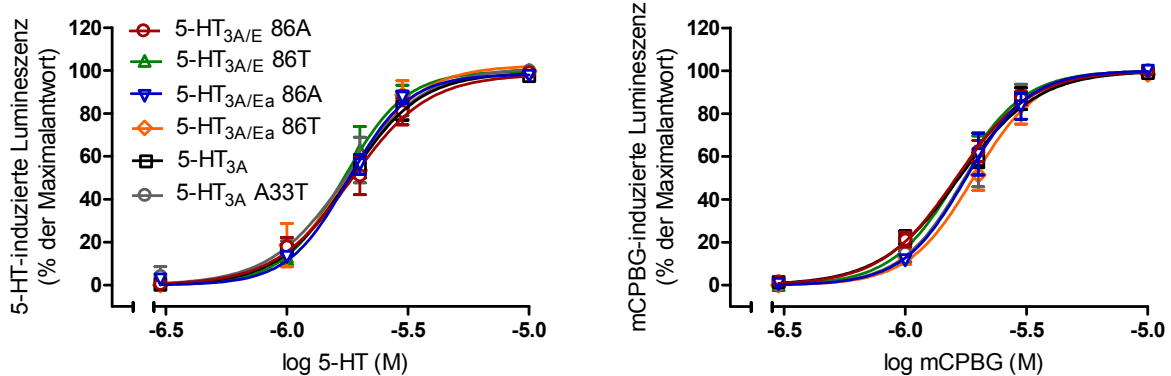
### 3.4.2 Funktionelle Charakterisierung durch $\text{Ca}^{2+}$ -Influxmessungen

Die funktionelle Analyse der zu untersuchenden 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren erfolgte durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Influxmessungen im Aequorin-Assay.

#### 3.4.2.1 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoragonist-induzierter $\text{Ca}^{2+}$ -Influx

##### 3.4.2.1.1 Konzentrations-Wirkungsbeziehungen von 5-HT und mCPBG

Die beiden Agonisten 5-HT und mCPBG führten bei allen getesteten 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren zu konzentrationsabhängigen Lumineszenzsignalen (Abbildung 37). Die aus den korrespondierenden Konzentrations-Wirkungskurven ermittelten pEC<sub>50</sub>-Werte und Hill-Koeffizienten, die in Tabelle 8 aufgelistet sind, zeigten weder für 5-HT noch für den spezifischen 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoragonisten mCPBG signifikante Unterschiede zwischen den Rezeptoren. Beide Agonisten zeichneten sich durch die gleiche Potenz an den 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren aus, charakterisiert durch einen mittleren EC<sub>50</sub>-Wert zwischen 1 - 2  $\mu\text{M}$ . Die mittleren Hill-Koeffizienten lagen ungefähr bei drei.



**Abbildung 37: Konzentrationsabhängige Lumineszenzsignale der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoragonisten 5-HT und mCPBG an HEK293-Zellen, die transient mit der Apoaequorin-cDNA und der 5-HT<sub>3A</sub>- bzw. 5-HT<sub>3A</sub> A33T-cDNA bzw. mit der 5-HT<sub>3A</sub>- und den 5-HT<sub>3E,(Ea)</sub>-Varianten-cDNAs kotransfiziert wurden**

Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von 3 - 11 unabhängigen Transfektionen. Die Lumineszenzsignale sind als Prozentsatz der jeweiligen Maximalantwort dargestellt.

## Ergebnisse

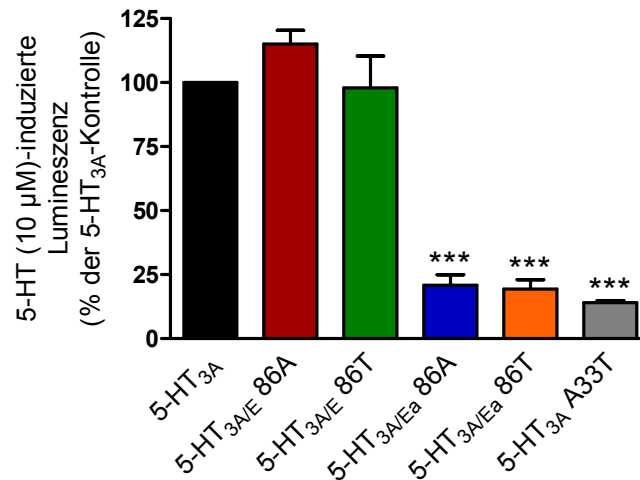
Rezeptor	5-HT		mCPBG	
	pEC <sub>50</sub> (EC <sub>50</sub> , μM)	n <sub>H</sub>	pEC <sub>50</sub> (EC <sub>50</sub> , μM)	n <sub>H</sub>
5-HT <sub>3A/E</sub> 86A	5,73 ± 0,05 (1,87)	2,93 ± 0,10	5,79 ± 0,02 (1,62)	2,89 ± 0,15
5-HT <sub>3A/E</sub> 86T	5,76 ± 0,04 (1,76)	3,18 ± 0,43	5,78 ± 0,03 (1,66)	3,32 ± 0,19
5-HT <sub>3A/Ea</sub> 86A	5,74 ± 0,02 (1,82)	3,80 ± 0,40	5,74 ± 0,04 (1,83)	3,75 ± 0,59
5-HT <sub>3A/Ea</sub> 86T	5,76 ± 0,04 (1,77)	2,48 ± 0,56	5,72 ± 0,02 (1,91)	2,61 ± 0,42
5-HT <sub>3A</sub>	5,76 ± 0,03 (1,77)	3,19 ± 0,26	5,76 ± 0,02 (1,75)	2,76 ± 0,19
5-HT <sub>3A</sub> A33T	5,75 ± 0,05 (1,79)	3,01 ± 0,16	5,75 ± 0,06 (1,80)	3,82 ± 0,19

**Tabelle 8: Funktionelle Parameter von 5-HT und mCPBG bestimmt an HEK293-Zellen, welche transient mit der Apoaequorin-cDNA und der 5-HT<sub>3A</sub>- bzw. 5-HT<sub>3A</sub> A33T-cDNA bzw. mit der 5-HT<sub>3A</sub>- und den 5-HT<sub>3E,(Ea)</sub>-Varianten-cDNAs kotransfiziert wurden**

Gezeigt sind die Mittelwerte ± SEM von 3 - 11 voneinander unabhängigen Experimenten, die in Abbildung 37 grafisch dargestellt sind. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den getesteten Rezeptoren ( $p > 0,05$ , *one-way ANOVA*).

### 3.4.2.1.2 5-HT-induzierter Maximaleffekt

Die 5-HT (10 μM)-induzierten Maximaleffekte an den beiden 5-HT<sub>3A/E</sub>-Rezeptorvarianten unterschieden sich nicht signifikant vom E<sub>max</sub> am homopentameren 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor bzw. auch nicht untereinander (5-HT<sub>3A/E</sub> 86A: 115,1 ± 5,5 %, 5-HT<sub>3A/E</sub> 86T: 97,9 ± 12,4 %, n = 6). Demgegenüber führte die Koexpression der beiden entsprechenden 5-HT<sub>3Ea</sub>-Varianten mit 5-HT<sub>3A</sub> zu einer signifikanten Reduktion des E<sub>max</sub> auf 15,4 ± 2,1 % (5-HT<sub>3A/Ea</sub> 86A) bzw. 16,8 ± 1,9 % (5-HT<sub>3A/Ea</sub> 86T) im Vergleich zum jeweiligen 5-HT<sub>3A/E</sub>-Rezeptor ( $p < 0,001$ , n = 6) (Abbildung 38). Erwartungsgemäß hatte auch hier der Aminosäureaustausch in Position 86 keinen Einfluss auf den E<sub>max</sub> der resultierenden 5-HT<sub>3A/Ea</sub>-Rezeptoren. Die A33T-Variante des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors wies im Vergleich zum WT-Rezeptor einen stark reduzierten E<sub>max</sub> auf (14,0 ± 0,9 %,  $p < 0,001$ , n = 7).

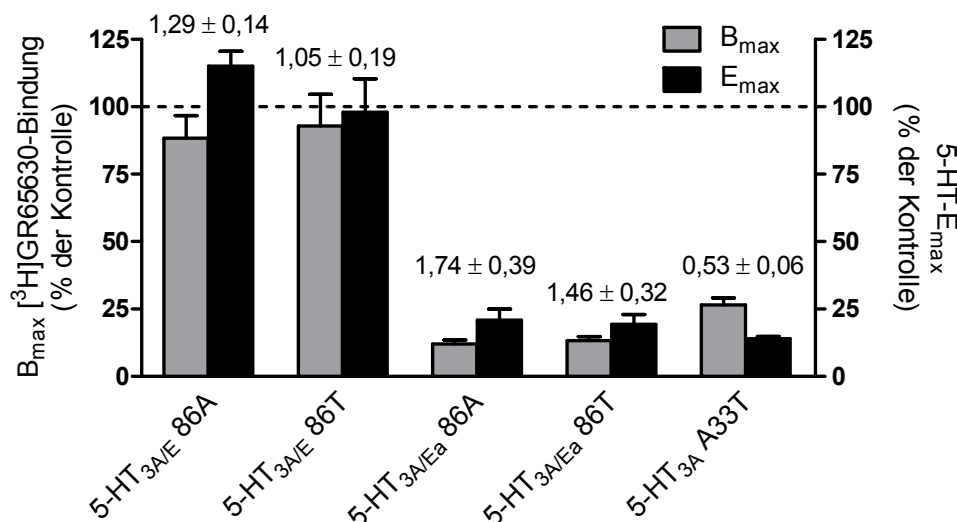


**Abbildung 38: 5-HT (10 µM)-induzierte Maximaleffekte an HEK293-Zellen, die transient mit der Apoaequorin-cDNA und der 5-HT<sub>3A</sub>- bzw. 5-HT<sub>3A</sub> A33T-cDNA bzw. mit der 5-HT<sub>3A</sub>- und den 5-HT<sub>3E,(Ea)</sub>-Varianten-cDNAs kotransfiziert wurden**

Dargestellt sind die auf den 5-HT-E<sub>max</sub> des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors prozentualisierten Maximaleffekte (Mittelwerte ± SEM) aus 6 - 7 voneinander unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (bei den 5-HT<sub>3A/Ea</sub>-Varianten der entsprechende 5-HT<sub>3A/E</sub>-Rezeptor, bei 5-HT<sub>3A</sub> A33T der 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor) sind gekennzeichnet (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ , *one-way ANOVA* gefolgt von einem Dunnett's post-hoc Test).

#### 3.4.2.1.3 Verhältnis E<sub>max</sub> / B<sub>max</sub>

Analog Abschnitt C.3.2.2.3 erfolgte für jeden untersuchten 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor die Bestimmung des Verhältnisses % E<sub>max</sub> / % B<sub>max</sub> in Relation zum 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor (Abbildung 39). Bei allen Rezeptoren unterschied sich das E<sub>max</sub> / B<sub>max</sub>-Verhältnis nicht signifikant von eins, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die für 5-HT<sub>3A/Ea</sub> 86A / 86T- bzw. 5-HT<sub>3A</sub> A33T reduzierten 5-HT-E<sub>max</sub>-Werte allein auf die gleichartig reduzierte Membranexpression zurückzuführen sind.



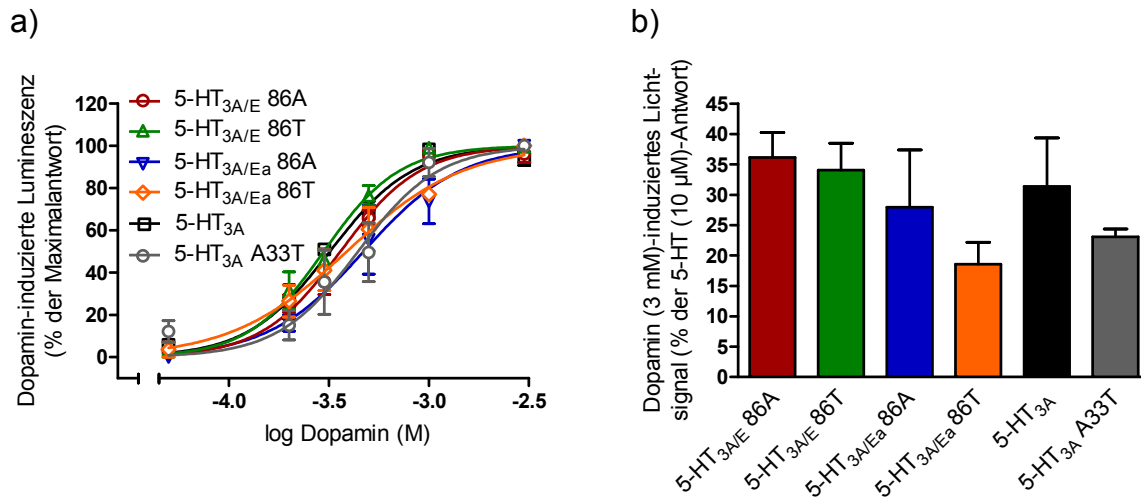
**Abbildung 39: B<sub>max</sub>-Werte ([<sup>3</sup>H]GR65630-Bindung) und 5-HT-E<sub>max</sub>-Werte (Aequorin-Assay) der untersuchten 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren im Vergleich**

Die Werte (Mittelwerte ± SEM), gezeigt als Prozentsatz der 5-HT<sub>3A</sub>-Kontrolle, stammen aus den in Abbildung 36 und Abbildung 38 dargestellten Experimenten. Die jeweiligen E<sub>max</sub> / B<sub>max</sub>-Verhältnisse (Mittelwerte ± SEM) sind über den Säulen angegeben. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der bestimmten E<sub>max</sub> / B<sub>max</sub>-Verhältnisse von eins (*one-way ANOVA* gefolgt von einem Dunnett's post-hoc Test).

#### 3.4.2.1.4 Dopamin-induzierter Ca<sup>2+</sup>-Influx

Da bereits bekannt war, dass die physiologische Substanz Dopamin eine partialagonistische Aktivität an 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren aufweist (van Hooft und Vijverberg, 1996), wurde untersucht, ob die agonistischen Dopamineffekte an allen in dieser Versuchsreihe zu testenden 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren gleich ausgeprägt sind. Die schlechte Membranexpression der 5-HT<sub>3A/Ea</sub>- und 5-HT<sub>3A</sub> A33T-Rezeptoren (siehe C.3.4.1) und die lediglich partialagonistische Aktivität des Dopamins waren der Grund, dass anstelle des herkömmlichen Aequorin-Assays der modifizierte CRET-Assay, welcher zu größeren Lumineszenzsignalen führt (siehe C.1.4.1), zum Einsatz kam. Zu diesem Zweck wurde vorab beispielhaft am homopentameren 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor gezeigt, dass beide Assaysysteme zu vergleichbaren Ergebnissen führen (siehe C.1.4.2). Dopamin führte an allen zu testenden Rezeptoren zu konzentrationsabhängigen Lichtsignalen (Abbildung 40a). Die pEC<sub>50</sub>-Werte lagen im höheren mikromolaren Bereich und unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Keinen signifikanten Unterschied gab es auch bei den Hill-Koeffizienten der Konzentrations-Wirkungskurven, die Werte zwischen ca. 2 - 3 aufwiesen, und bei den Dopamin-E<sub>max</sub>-Werten im Vergleich zu 5-HT, welche bei durchschnittlich ca. 30 % lagen (Abbildung 40b). Die funktionellen Parameter,

die den in der Literatur beschriebenen entsprechen (van Hooft und Vijverberg, 1996; Solt et al., 2007), sind in Tabelle 9 aufgeführt.



**Abbildung 40: Konzentrationsabhängige Lichtsignale des 5-HT<sub>3</sub>-Partialagonisten Dopamin an HEK293-Zellen, die transient mit der pG5A (Aequorin-EGFP)-cDNA und der 5-HT<sub>3A</sub>- bzw. 5-HT<sub>3A</sub> A33T-cDNA bzw. mit der 5-HT<sub>3A</sub>- und den 5-HT<sub>3E,(Ea)</sub>-Varianten-cDNAs kotransfiziert wurden**

a) Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von 3 - 4 unabhängigen Transfektionen. Die Lichtsignale sind als Prozentsatz der jeweiligen Maximalantwort dargestellt. b) Dargestellt sind die Dopamin-induzierten Maximalwirkungen (Mittelwerte  $\pm$  SEM von 3 - 4 unabhängigen Transfektionen) in Bezug auf den 5-HT-E<sub>max</sub>. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den getesteten Rezeptoren ( $p > 0,05$ , *one-way ANOVA*).

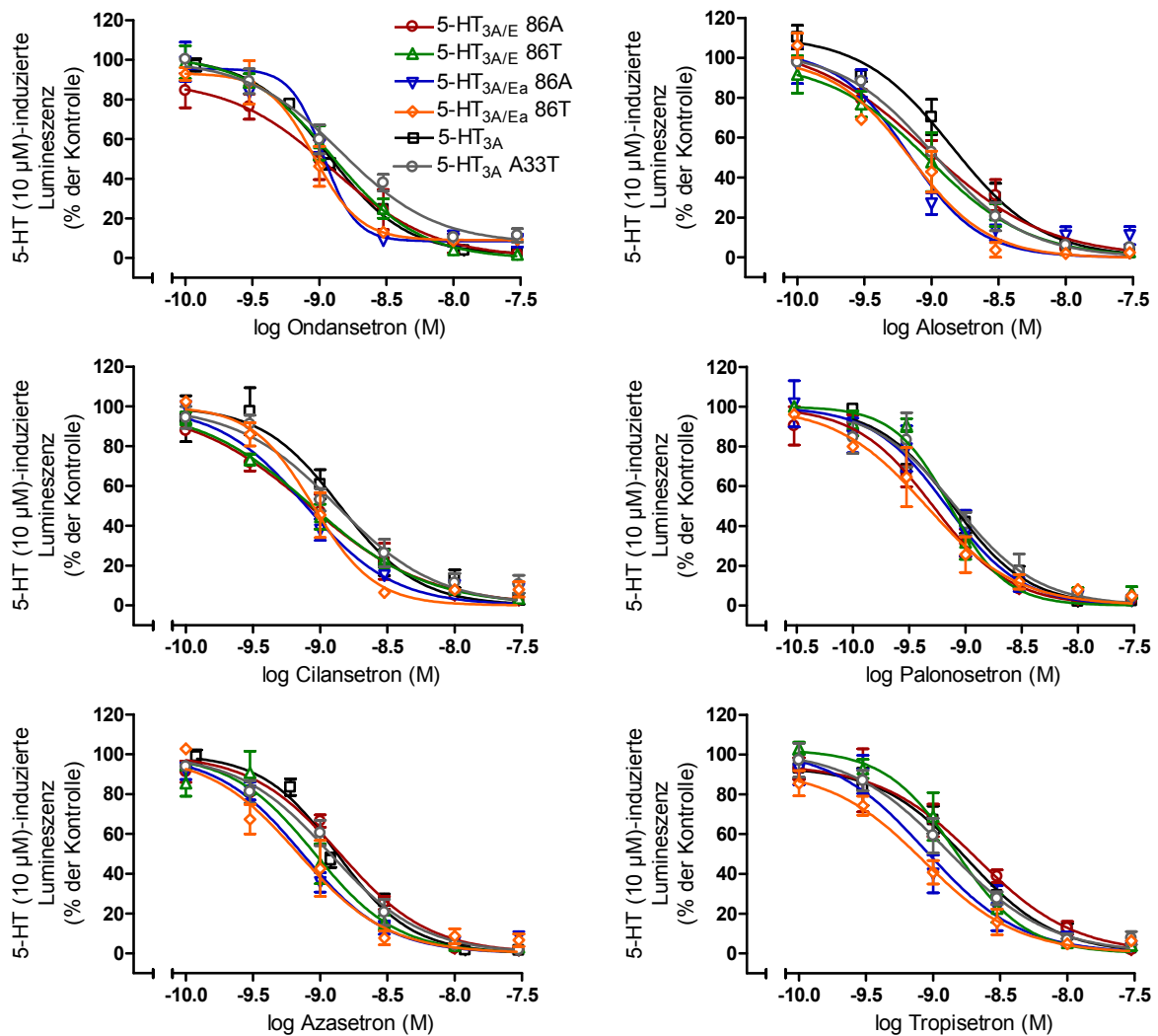
Rezeptor	pEC <sub>50</sub> (EC <sub>50</sub> , µM)	n <sub>H</sub>	E <sub>max</sub> (% von 5-HT)
5-HT <sub>3A/E</sub> 86A	3,45 $\pm$ 0,03 (353,2)	2,30 $\pm$ 0,23	36,1 $\pm$ 4,1
5-HT <sub>3A/E</sub> 86T	3,54 $\pm$ 0,03 (290,4)	2,46 $\pm$ 0,43	34,1 $\pm$ 4,4
5-HT <sub>3A/Ea</sub> 86A	3,33 $\pm$ 0,11 (472,1)	2,62 $\pm$ 0,74	28,0 $\pm$ 9,4
5-HT <sub>3A/Ea</sub> 86T	3,42 $\pm$ 0,11 (381,9)	2,14 $\pm$ 0,40	18,6 $\pm$ 3,6
5-HT <sub>3A</sub>	3,49 $\pm$ 0,06 (321,4)	2,35 $\pm$ 0,29	31,4 $\pm$ 8,0
5-HT <sub>3A</sub> A33T	3,29 $\pm$ 0,09 (514,0)	3,34 $\pm$ 0,31	23,1 $\pm$ 1,3

**Tabelle 9: Funktionelle Parameter von Dopamin bestimmt an HEK293-Zellen, welche transient mit der pG5A-cDNA und der 5-HT<sub>3A</sub>- bzw. 5-HT<sub>3A</sub> A33T-cDNA bzw. mit der 5-HT<sub>3A</sub>- und den 5-HT<sub>3E,(Ea)</sub>-Varianten-cDNAs kotransfiziert wurden**

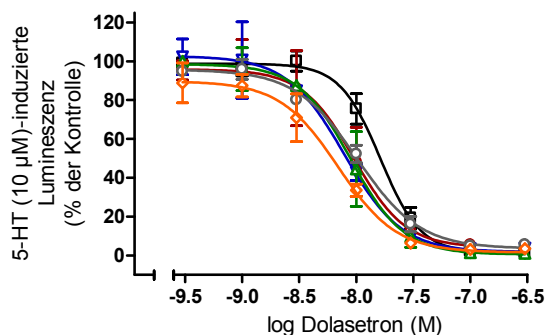
Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 3 - 4 voneinander unabhängigen Experimenten, die in Abbildung 40 grafisch dargestellt sind. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den getesteten Rezeptoren ( $p > 0,05$ , *one-way ANOVA*).

### 3.4.2.2 Inhibition des 5-HT-induzierten $\text{Ca}^{2+}$ -Influx durch 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten

Lumineszenzsignale induziert durch 10  $\mu\text{M}$  5-HT wurden konzentrationsabhängig durch die spezifischen 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten Ondansetron, Alosetron, Cilansetron (Imidazole), Palonosetron, Azasetron (Chinuclidine), Tropisetron (Tropan) und Dolasetron (Granatan) inhibiert. Die aus den Inhibitionskurven resultierenden  $\text{pIC}_{50}$ -Werte unterschieden sich nicht signifikant zwischen den getesteten Rezeptoren (Abbildung 41, Tabelle 10). Die  $\text{IC}_{50}$ -Werte der verschiedenen Antagonisten lagen an allen Rezeptoren bei ca. 1 - 2 nM. Palonosetron zeichnete sich durch eine marginal höhere Potenz mit  $\text{IC}_{50}$ -Werten knapp unterhalb 1 nM aus, wogegen Dolasetron weniger potent in der Inhibition des 5-HT-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx war. Die korrespondierenden  $\text{IC}_{50}$ -Werte lagen bei ca. 10 nM (Tabelle 10).



## Ergebnisse



**Abbildung 41: Inhibition der 5-HT (10 µM)-induzierten Lumineszenzsignale durch spezifische 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten an HEK293-Zellen, die transient mit der Apoaequorin-cDNA und der 5-HT<sub>3A</sub>- bzw. 5-HT<sub>3A</sub> A33T-cDNA bzw. mit der 5-HT<sub>3A</sub>- und den 5-HT<sub>3E,(Ea)</sub>-Varianten-cDNAs kotransfiziert wurden**

Der Antagonist war 15 min vor und während 5-HT-Applikation anwesend. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3 - 5 voneinander unabhängigen Transfektionen, dargestellt als Prozentsatz der 5-HT-Antwort in Abwesenheit des Antagonisten.

Antagonist	5-HT <sub>3A/E</sub> 86A	5-HT <sub>3A/E</sub> 86T	5-HT <sub>3A/Ea</sub> 86A	5-HT <sub>3A/Ea</sub> 86T	5-HT <sub>3A</sub>	5-HT <sub>3A</sub> A33T
Ondansetron	8,90 $\pm$ 0,10 (9,68)	8,87 $\pm$ 0,06 (9,69)	9,03 $\pm$ 0,09 (9,82)	9,06 $\pm$ 0,10 (9,86)	8,94 $\pm$ 0,02 (9,76)	8,89 $\pm$ 0,08 (9,68)
Alosetron	8,92 $\pm$ 0,09 (9,71)	8,99 $\pm$ 0,16 (9,75)	9,16 $\pm$ 0,04 (9,97)	9,18 $\pm$ 0,09 (9,98)	8,85 $\pm$ 0,03 (9,67)	8,97 $\pm$ 0,01 (9,79)
Cilansetron	8,94 $\pm$ 0,13 (9,70)	9,08 $\pm$ 0,09 (9,89)	9,05 $\pm$ 0,06 (9,85)	9,08 $\pm$ 0,10 (9,88)	8,89 $\pm$ 0,02 (9,71)	8,97 $\pm$ 0,05 (9,78)
Palonosetron	9,26 $\pm$ 0,12 (10,01)	9,10 $\pm$ 0,01 (9,92)	9,20 $\pm$ 0,20 (9,92)	9,32 $\pm$ 0,14 (10,10)	9,10 $\pm$ 0,05 (9,92)	9,03 $\pm$ 0,05 (9,85)
Azasetron	8,78 $\pm$ 0,05 (9,57)	9,00 $\pm$ 0,04 (9,82)	9,08 $\pm$ 0,02 (9,89)	9,16 $\pm$ 0,15 (9,93)	8,89 $\pm$ 0,03 (9,71)	8,89 $\pm$ 0,05 (9,71)
Tropisetron	8,77 $\pm$ 0,11 (9,54)	8,83 $\pm$ 0,05 (9,65)	8,99 $\pm$ 0,08 (9,78)	9,04 $\pm$ 0,10 (9,84)	8,86 $\pm$ 0,09 (9,66)	8,92 $\pm$ 0,06 (9,73)
Dolasetron	8,13 $\pm$ 0,19 (8,85)	8,02 $\pm$ 0,15 (8,79)	8,06 $\pm$ 0,05 (8,87)	8,15 $\pm$ 0,06 (8,96)	7,79 $\pm$ 0,08 (8,59)	7,99 $\pm$ 0,05 (8,80)

**Tabelle 10: pIC<sub>50</sub>-Werte für 5-HT<sub>3</sub>-Antagonisten, bestimmt an HEK293-Zellen, die transient mit der Apoaequorin-cDNA und der 5-HT<sub>3A</sub>- bzw. 5-HT<sub>3A</sub> A33T-cDNA bzw. mit der 5-HT<sub>3A</sub>- und den 5-HT<sub>3E,(Ea)</sub>-Varianten-cDNAs kotransfiziert wurden**

Gezeigt sind die pIC<sub>50</sub>- (Mittelwerte  $\pm$  SEM) und die mittleren pK<sub>i</sub>-Werte in Klammern von 3 - 5 voneinander unabhängigen Experimenten, die in Abbildung 41 grafisch dargestellt sind. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den pIC<sub>50</sub>-Werten der Antagonisten an den jeweiligen Rezeptoren ( $p > 0,05$ , *one-way ANOVA*).

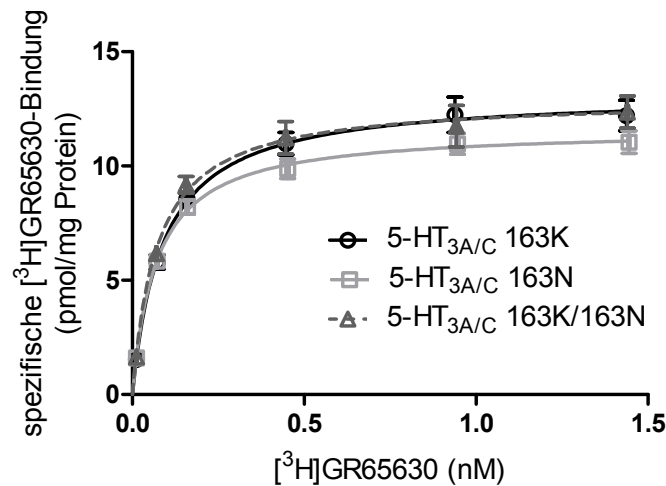


### 3.5 Pharmakologische Charakterisierung der beiden Varianten 163K und 163N der 5-HT<sub>3C</sub>-Untereinheit (N163K-Polymorphismus)

Die Charakterisierung der 5-HT<sub>3C</sub> 86K-Untereinheit, deren Sequenz zuerst in der Gendatenbank veröffentlicht wurde (AF459285), erfolgte bereits in einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe (Niesler et al., 2007). Die im Gegensatz dazu häufiger auftretende 5-HT<sub>3C</sub> 163N-Variante (Allelhäufigkeit 62 % in einem Kollektiv) wurde mit einer erhöhten Inzidenz Chemotherapie-induzierten Erbrechens (CINV) bei Prämedikation mit Ondansetron / Dexamethason assoziiert gefunden (Fasching et al., 2008). Um einen möglichen Einfluss des Austausches von Lysin (K) gegen Asparagin (N) in der Cysteinschleife der 5-HT<sub>3C</sub>-Untereinheit zu untersuchen, erfolgte der pharmakologische Vergleich heteromerer 5-HT<sub>3A/C</sub> 163K- und 5-HT<sub>3A/C</sub> 163N-Rezeptoren mittels Radioligandbindungsstudien und Ca<sup>2+</sup>-Influxanalysen. Da ausschließlich homozygote Träger der 5-HT<sub>3C</sub> 163N-Variante zu einem verstärkten CINV neigten (Fasching et al., 2008), wurde zum Teil zusätzlich der 5-HT<sub>3A/C</sub> 163K/163N-Rezeptor untersucht, welcher den heterozygoten Status *in vivo* repräsentiert.

#### 3.5.1 Radioligandbindungsstudien

Die Expression der zu charakterisierenden 5-HT<sub>3A/C</sub>-Rezeptoren wurde durch Sättigungsbindungsstudien mit [<sup>3</sup>H]GR65630 an Membranen transient transfizierter HEK293-Zellen untersucht. Die 5-HT<sub>3C</sub> 163N-Variante führte dabei zu einer Reduktion der B<sub>max</sub> des resultierenden heteromeren 5-HT<sub>3A/C</sub> 163N-Rezeptors auf  $86,2 \pm 3,7$  % im Vergleich zum 5-HT<sub>3A/C</sub> 163K-Rezeptor (Kontrolle). Ein Signifikanzniveau ( $p < 0,05$ ) im *one-way* ANOVA wurde allerdings erst nach vorheriger Prozentualisierung der B<sub>max</sub>-Werte auf die Kontrolle erreicht. Demgegenüber zeigte der 5-HT<sub>3A/C</sub> 163K/163N-Rezeptor, welcher den heterozygoten Status repräsentiert, keine Veränderung der B<sub>max</sub> verglichen mit der Kontrolle ( $96,0 \pm 5,0$  %) (Abbildung 42). Die K<sub>D</sub>-Werte des Radioliganden [<sup>3</sup>H]GR65630 wiesen keine Unterschiede zwischen den untersuchten Rezeptoren auf. Die bestimmten B<sub>max</sub>- und K<sub>D</sub>-Werte sind in Tabelle 11 aufgelistet.



**Abbildung 42: [<sup>3</sup>H]GR65630-Bindung an Membranen von HEK293-Zellen, die transient mit der 5-HT<sub>3A</sub>- und den 5-HT<sub>3C</sub>-Varianten-cDNAs kotransfiziert wurden**

Dargestellt sind die Sättigungshyperbeln der spezifischen [<sup>3</sup>H]GR65630-Bindung (0,02 - 1,5 nM). Die unspezifische Bindung wurde an Membranen nichttransfizierter Zellen bestimmt. Punkte repräsentieren Mittelwerte ± SEM aus sechs voneinander unabhängigen Transfektionen. Zur Simulation des heterozygoten Status *in vivo* wurden die cDNAs beider Varianten zu gleichen Teilen für die Transfektion eingesetzt (5-HT<sub>3A/C</sub> 163K/163N).

Rezeptor	B <sub>max</sub> (pmol/mg Protein)	K <sub>D</sub> (nM)
5-HT <sub>3A/C</sub> 163K	13,59 ± 0,85	0,08 ± 0,01
5-HT <sub>3A/C</sub> 163N	11,58 ± 0,41*	0,07 ± 0,01
5-HT <sub>3A/C</sub> 163K/163N	12,95 ± 0,82	0,07 ± 0,01

**Tabelle 11: B<sub>max</sub>- und K<sub>D</sub>-Werte für [<sup>3</sup>H]GR65630 aus Sättigungsbindungsversuchen an Membranen von HEK293-Zellen, die transient mit der 5-HT<sub>3A</sub>- und den 5-HT<sub>3C</sub>-Varianten-cDNAs kotransfiziert wurden**

Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM aus sechs voneinander unabhängigen Experimenten, die in Abbildung 42 veranschaulicht sind. Signifikante Unterschiede im Vergleich zum 5-HT<sub>3A/C</sub> 163K-Rezeptor (Kontrolle) nach vorheriger Prozentualisierung (*one-way ANOVA* gefolgt von einem Dunnett's post-hoc Test) sind gekennzeichnet (\*p ≤ 0,05).

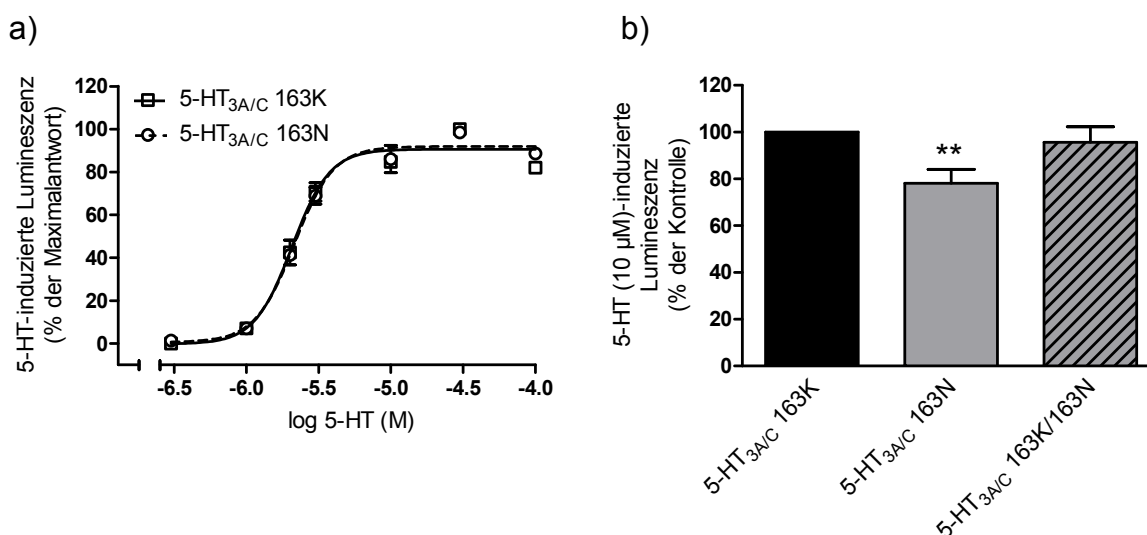
### 3.5.2 5-HT-induzierter Ca<sup>2+</sup>-Influx

Die funktionelle Analyse der 5-HT<sub>3A/C</sub>-Rezeptoren erfolgte durch Ca<sup>2+</sup>-Influxmessungen im Aequorin-Assay.

Der Austausch von Lysin gegen Asparagin in Position 163 der 5-HT<sub>3C</sub>-Untereinheit hatte keinen Einfluss auf die Konzentrations-Wirkungsbeziehung von 5-HT am entsprechenden heteromeren 5-HT<sub>3A/C</sub>-Rezeptor (Abbildung 43a). Die aus den

Konzentrations-Wirkungskurven erhaltenen  $pEC_{50}$ -Werte für 5-HT an 5-HT<sub>3A/C</sub> 163N ( $5,68 \pm 0,03$ , mittlerer  $EC_{50}$   $2,07 \mu\text{M}$ ) und 5-HT<sub>3A/C</sub> 163K ( $5,66 \pm 0,02$ , mittlerer  $EC_{50}$   $2,17 \mu\text{M}$ ) unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Das Gleiche galt auch für die Hill-Koeffizienten ( $3,75 \pm 0,48$  bzw.  $3,36 \pm 0,49$ ).

Demgegenüber führte die 163N-Variante zu einer signifikanten Reduktion des 5-HT-induzierten Maximaleffektes an 5-HT<sub>3A/C</sub> 163N auf  $78,1 \pm 5,9 \%$  im Vergleich zu 5-HT<sub>3A/C</sub> 163K ( $p < 0,01$ ,  $n = 14$ ). Der heteromere 5-HT<sub>3A/C</sub>-Rezeptor, welcher durch Koexpression der 5-HT<sub>3A</sub>-Untereinheit mit beiden 5-HT<sub>3C</sub>-Varianten gebildet wurde und damit dem heterozygoten Status *in vivo* entspricht, zeigte den gleichen 5-HT- $E_{\text{max}}$  ( $95,7 \pm 6,7 \%$ ) wie der 5-HT<sub>3A/C</sub> 163K-Rezeptor (Abbildung 43b).



**Abbildung 43: Konzentrationsabhängige Lumineszenzsignale des Agonisten 5-HT an HEK293-Zellen, welche transient mit der Apoaequorin-cDNA, der 5-HT<sub>3A</sub>- und den 5-HT<sub>3C</sub>-Varianten-cDNAs kotransfiziert wurden**

**a)** Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von vier unabhängigen Transfektionen. Die Lumineszenzsignale sind als Prozentsatz der jeweiligen Maximalantwort dargestellt. **b)** Dargestellt sind die 5-HT ( $10 \mu\text{M}$ )-induzierten Maximaleffekte (Mittelwerte  $\pm$  SEM von 6 - 14 unabhängigen Transfektionen) in Bezug auf den 5-HT- $E_{\text{max}}$  an 5-HT<sub>3A/C</sub> 163K. Zur Simulation des heterozygoten Status *in vivo* wurden die cDNAs beider Varianten zu gleichen Teilen für die Transfektion eingesetzt (5-HT<sub>3A/C</sub> 163K/163N). Signifikante Unterschiede zum 5-HT<sub>3A/C</sub> 163K-Rezeptor (*one-way ANOVA* gefolgt von einem Dunnett's post-hoc Test) sind gekennzeichnet (\*\* $p \leq 0,01$ ).

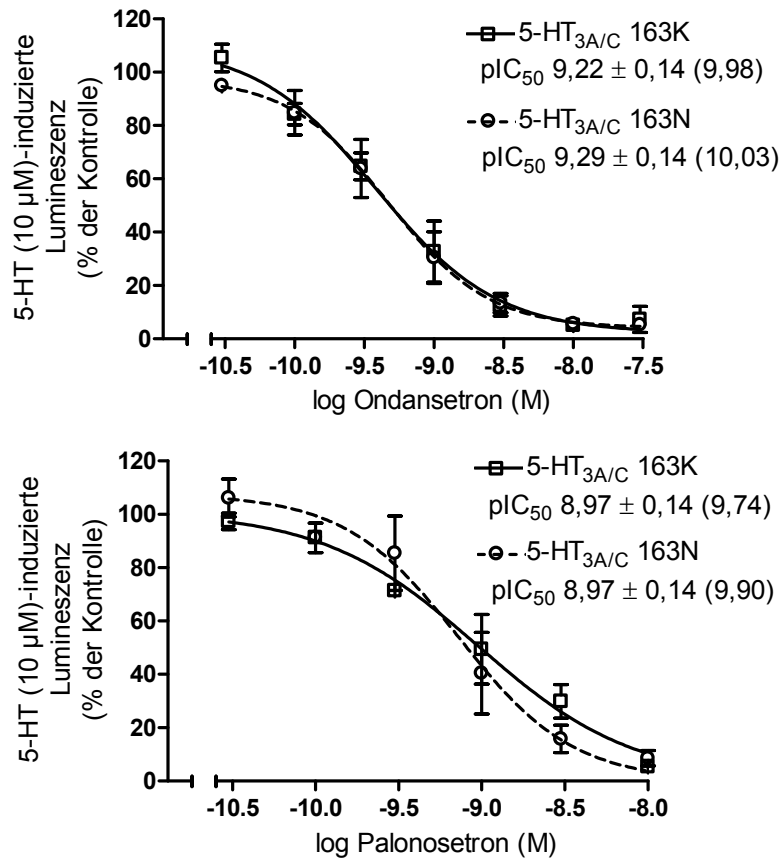
### 3.5.3 Verhältnis $E_{\max}$ / $B_{\max}$

Analog Abschnitt C.3.2.2.3 erfolgte für den 5-HT<sub>3A/C</sub> 163N- und den 5-HT<sub>3A/C</sub> 163K/163N-Rezeptor die Bestimmung des Verhältnisses %  $E_{\max}$  / %  $B_{\max}$  in Relation zum 5-HT<sub>3A/C</sub> 163K-Rezeptor (Kontrolle). Bei beiden Rezeptoren unterschied sich das  $E_{\max}$  /  $B_{\max}$ -Verhältnis nicht signifikant von eins ( $0,91 \pm 0,08$  und  $1,00 \pm 0,09$ ), so dass davon ausgegangen werden kann, dass der für 5-HT<sub>3A/C</sub> 163N verringerte 5-HT- $E_{\max}$ -Wert allein auf die gleichartig reduzierte Membranexpression zurückzuführen ist.

### 3.5.4 Inhibition des 5-HT-induzierten $Ca^{2+}$ -Influx durch 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten

Die 5-HT (10  $\mu$ M)-induzierten Lumineszenzsignale wurden bei beiden untersuchten 5-HT<sub>3A/C</sub>-Varianten konzentrationsabhängig durch die zwei in der Behandlung des CINV standardmäßig eingesetzten 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten Ondansetron und Palonosetron inhibiert. Die aus den Konzentrations-Wirkungskurven resultierenden  $pIC_{50}$ -Werte unterschieden sich nicht signifikant zwischen 5-HT<sub>3A/C</sub> 163K und 5-HT<sub>3A/C</sub> 163N (Abbildung 44). Die  $IC_{50}$ -Werte lagen für beide Substanzen bei ca. 0,5 - 1 nM.

## Ergebnisse



**Abbildung 44: Inhibition der 5-HT (10 µM)-induzierten Lumineszenzsignale durch Ondansetron und Palonosetron an HEK293-Zellen, welche transient mit der Apoaequorin-cDNA, der 5-HT<sub>3A</sub>- und den 5-HT<sub>3C</sub>-Varianten-cDNAs kotransfiziert wurden**

Der Antagonist war 15 min vor und während der 5-HT-Applikation anwesend. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM von vier voneinander unabhängigen Transfektionen, dargestellt als Prozentsatz der 5-HT-Antwort in Abwesenheit des Antagonisten. Gezeigt sind auch die mittleren pIC<sub>50</sub>-Werte ± SEM und die dazugehörigen pK<sub>i</sub>-Werte in Klammern. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der pIC<sub>50</sub>-Werte (ungepaarter Student's t-Test).

#### 4. Einfluss von RIC-3 auf die Expression und Funktion von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren

Da zum Zeitpunkt der Arbeit nur wenige Informationen über den Einfluss des Chaperons RIC-3 auf 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren (insbesondere heteromere 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren) vorlagen, sollte dessen Rolle bei der Expression und Funktion homopentamerer 5-HT<sub>3A</sub>- sowie heteromerer 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren bestehend aus 5-HT<sub>3A</sub> und jeweils einer der 5-HT<sub>3B,C,D,E,Ea</sub>-Untereinheiten näher untersucht werden. Nach der Klonierung der humanen RIC-3-cDNA erfolgte die transiente Kotransfektion von HEK293-Zellen mit der RIC-3-cDNA und den cDNAs der entsprechenden 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoruntereinheiten. Für die Koexpression von 5-HT<sub>3A</sub> mit 5-HT<sub>3E,(Ea)</sub>

wurden die 5-HT<sub>3E,(Ea)</sub> 86A-Varianten verwendet. Die anschließende funktionelle Analyse der gebildeten 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren erfolgte durch Ca<sup>2+</sup>-Influxmessungen im Aequorin-Assay, währenddessen die Expression der Rezeptoren mittels Radioligandbindung untersucht wurde.

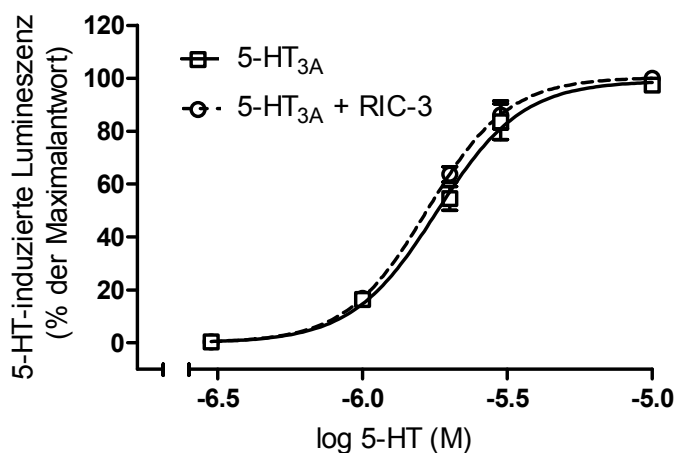
### **4.1 Klonierung der humanen RIC-3-cDNA**

Die kodierende Sequenz von RIC-3 wurde unter Verwendung der Oligonukleotidprimer 5' GACCACCGTGAGCAGTCATG 3' (*sense*) und 5' GAGGAGAGAGAG-GTCACCTTG 3' (*antisense*), basierend auf der humanen RIC-3-Sequenz (GenBank-Nr. NM\_024557), aus cDNAs verschiedener humaner Gewebe (Leber, Gehirn, Herz, Lunge, Dünndarm) mit der Taq DNA-Polymerase amplifiziert (siehe B.2.2.5.1). Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (0,7 % Agarose) (siehe B.2.2.3). Bei allen eingesetzten cDNAs trat eine Bande von ca. 1,1 kb auf (Gel nicht gezeigt). Die Bande (Amplikon der Leber-cDNA) wurde ausgeschnitten und die enthaltene DNA extrahiert und aufgereinigt (siehe B.2.2.4 / 2.2.1.3 / 2.2.1.4). Die DNA wurde in den Vektor pCR2.1 inkloniert und nach Sequenzierung in die *HindIII* / *EcoRI*-Schnittstellen des eukaryotischen Expressionsvektors pcDNA3.1(-) subkloniert (siehe B.2.2.7.2).

### **4.2 Einfluss von RIC-3 auf den 5-HT-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Influx**

#### **4.2.1 Konzentrations-Wirkungsbeziehung von 5-HT am homopentameren 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor**

5-HT führte an HEK293-Zellen, welche RIC-3 und 5-HT<sub>3A</sub> koexprimierten, zu konzentrationsabhängigen Lumineszenzsignalen im Aequorin-Assay (Abbildung 45). Die daraus resultierende Konzentrations-Wirkungskurve war durch einen pEC<sub>50</sub>-Wert von  $5,77 \pm 0,02$  und einen Hill-Koeffizienten von  $3,12 \pm 0,22$  charakterisiert. Diese funktionellen Parameter unterschieden sich nicht signifikant von denen, bestimmt an Zellen, die nur den 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor exprimierten (siehe C.1.3, S. 67) (Abbildung 45). Im Gegensatz dazu beeinflusste RIC-3 die Größe der Lumineszenzsignale und damit den 5-HT-induzierten Maximaleffekt (siehe unten, C.4.2.2).



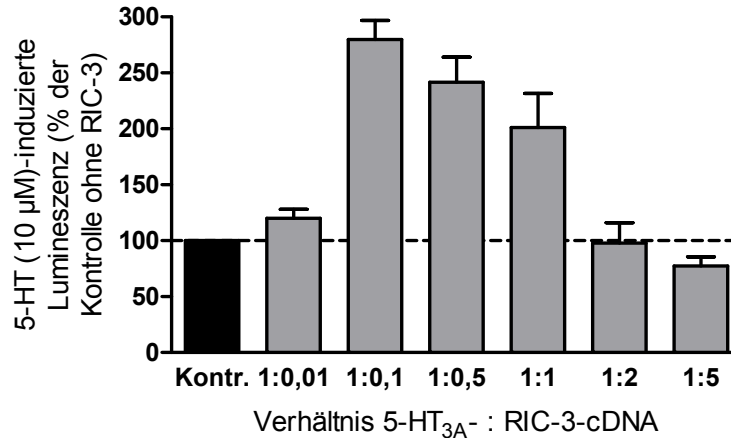
**Abbildung 45: Konzentrationsabhängigkeit des 5-HT-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms an HEK293-Zellen, die 5-HT<sub>3A</sub> und RIC-3 bzw. nur 5-HT<sub>3A</sub> transient exprimieren**

Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von vier voneinander unabhängigen Transfektionen (5-HT<sub>3A</sub> + RIC-3) dargestellt als Prozentsatz der jeweiligen 5-HT-Maximalantwort. Das Verhältnis von 5-HT<sub>3A</sub> : RIC-3-cDNA bei der Transfektion betrug 1 : 1. Die Konzentrations-Wirkungskurve von 5-HT an 5-HT<sub>3A</sub> ist zum Vergleich mit dargestellt.

#### 4.2.2 Einfluss von RIC-3 auf den 5-HT-induzierten Maximaleffekt

##### 4.2.2.1 5-HT-induzierter Maximaleffekt am homopentameren 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor in Abhängigkeit der RIC-3-cDNA-Menge bei der Transfektion

Um zu überprüfen, ob der Einfluss von RIC-3 auf den 5-HT-induzierten Maximaleffekt an 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren eine Abhängigkeit von der eingesetzten RIC-3-cDNA-Menge bei der Transfektion aufweist, wurden HEK293-Zellen mit der 5-HT<sub>3A</sub>- und RIC-3-cDNA in unterschiedlichen Verhältnissen transfiziert. Die 5-HT<sub>3A</sub>-cDNA-Menge blieb bei allen Ansätzen konstant. Dabei zeigte sich, dass der 5-HT-induzierte Maximaleffekt ( $E_{\text{max}}$ ) durch RIC-3 in Abhängigkeit von der eingesetzten cDNA-Menge im Vergleich zur Kontrolle ohne RIC-3 erhöht wurde (Abbildung 46). Diese  $E_{\text{max}}$ -Erhöhung trat nur in einem engen Bereich bei 5-HT<sub>3A</sub> : RIC-3-cDNA-Verhältnissen von 1 : 0,01 bis 1 : 1 auf, wobei der Effekt bei einem Verhältnis von 1 : 0,1 am stärksten ausgeprägt war. Setzte man also nur ein Zehntel der RIC-3 im Vergleich zur 5-HT<sub>3A</sub>-cDNA bei der Transfektion ein, stieg der  $E_{\text{max}}$  auf  $279,9 \pm 16,9$  % ( $n = 14$ ) des  $E_{\text{max}}$  an 5-HT<sub>3A</sub> ohne RIC-3 an. Dagegen führte RIC-3 bei Einsatz größerer RIC-3-cDNA-Mengen (ab einem 5-HT<sub>3A</sub> : RIC-3-cDNA-Verhältnis von 1 : 2) zu keiner Erhöhung des  $E_{\text{max}}$  im Vergleich zur Kontrolle ohne RIC-3. Aus diesem Grund wurden die Zellen für die darauffolgenden Versuche mit der Rezeptor- und RIC-3-cDNA im Verhältnis 1 : 0,1 transfiziert.



**Abbildung 46: 5-HT-induzierter Maximaleffekt ( $E_{max}$ ) an homopentameren 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren in Abhängigkeit von der RIC-3-cDNA-Menge bei der Transfektion der HEK293-Zellen**

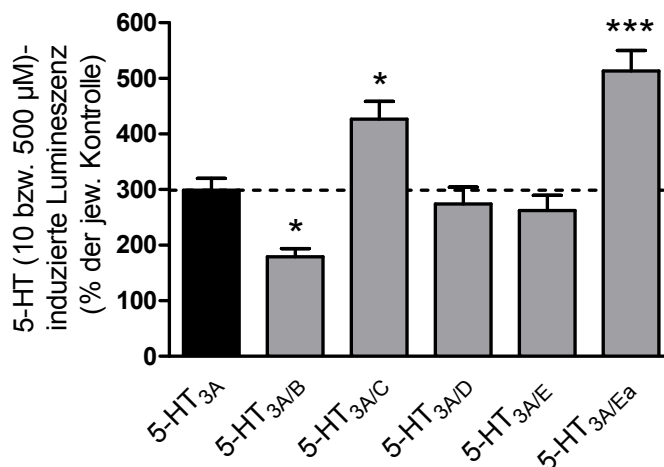
Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 3 - 14 voneinander unabhängigen Experimenten dargestellt als Prozentsatz des  $E_{max}$  an 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren in Abwesenheit von RIC-3 (Kontrolle.). Die 5-HT<sub>3A</sub>-cDNA-Menge blieb in allen Ansätzen konstant.

#### 4.2.2.2 Einfluss von RIC-3 auf den 5-HT-induzierter Maximaleffekt an heteromeren 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren

Um den möglicherweise differentiellen Einfluss von RIC-3 auf homopentamere 5-HT<sub>3A</sub>- und heteromere 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren, bestehend aus 5-HT<sub>3A</sub> und jeweils einer der 5-HT<sub>3B,C,D,E,Ea</sub>-Untereinheiten, zu untersuchen, wurden HEK293-Zellen mit den entsprechenden cDNAs für die 5-HT<sub>3</sub>-Untereinheiten und der RIC-3-cDNA bzw. dem leeren Plasmidvektor im Verhältnis 1 : 0,1 kotransfiziert. Verglichen wurden anschließend die entsprechenden 5-HT- $E_{max}$ -Erhöhungen durch RIC-3 für die getesteten heteromeren Rezeptoren bezogen auf die jeweiligen  $E_{max}$ -Werte in Abwesenheit von RIC-3. Analog der Ergebnisse aus der Versuchsreihe in C.4.2.2.1 induzierte 5-HT am homopentameren 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor einen Maximaleffekt von  $298,5 \pm 21,9$  % bezogen auf  $E_{max}$  an 5-HT<sub>3A</sub> ohne RIC-3 (Student's t-Test,  $p < 0,001$ ,  $n = 8$ ). Die  $E_{max}$ -Erhöhungen an 5-HT<sub>3A/D</sub> bzw. 5-HT<sub>3A/E</sub> in Anwesenheit von RIC-3 ( $274,1 \pm 30,2$  % bzw.  $262,4 \pm 27,4$  %) unterschieden sich nicht signifikant von der  $E_{max}$ -Erhöhung durch RIC-3 an 5-HT<sub>3A</sub>. Demgegenüber führte RIC-3 am 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptor zu einer signifikant kleineren Erhöhung des  $E_{max}$  von  $179,0 \pm 14,6$  % im Vergleich zur 5-HT<sub>3A</sub>-Kontrolle ( $p < 0,05$ ). Den größten Einfluss hatte RIC-3 auf den 5-HT-induzierten Maximaleffekt an Zellen, welche entweder 5-HT<sub>3A/C</sub> oder 5-HT<sub>3A/Ea</sub> exprimierten. Dabei war  $E_{max}$  in Anwesenheit von RIC-3 auf  $426,5 \pm 32,1$  % bzw.  $513,4 \pm 37,0$  % der jeweiligen Kontrolle erhöht, was einem



signifikanten ( $p < 0,05$ ) bzw. einem extrem signifikanten ( $p < 0,001$ ) Unterschied gegenüber der 5-HT<sub>3A</sub>-Kontrolle entspricht. Zur Veranschaulichung sind die Ergebnisse in Abbildung 47 grafisch dargestellt.



**Abbildung 47: Erhöhung des 5-HT-induzierten Maximaleffekts homopentamerer 5-HT<sub>3A</sub>- bzw. heteromerer 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren, transient exprimiert in HEK293-Zellen, durch RIC-3**

Zur Erfassung des Maximaleffekts wurde für den 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptor eine 5-HT-Konzentration von 500  $\mu$ M eingesetzt. Die anderen Rezeptoren wurden mit 10  $\mu$ M 5-HT stimuliert. Gezeigt sind die mittleren  $E_{max}$ -Werte  $\pm$  SEM in Anwesenheit von RIC-3 von 8 - 10 voneinander unabhängigen Experimenten dargestellt als Prozentsatz der jeweiligen Kontrolle ohne RIC-3. Signifikante Unterschiede zur entsprechenden  $E_{max}$ -Erhöhung an 5-HT<sub>3A</sub> (dunkelgraue Säule) (*one-way ANOVA* gefolgt von einem Dunnett's post-hoc Test) sind gekennzeichnet (\* $p \leq 0,05$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ ).

#### 4.3 Einfluss von RIC-3 auf die Expression von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren

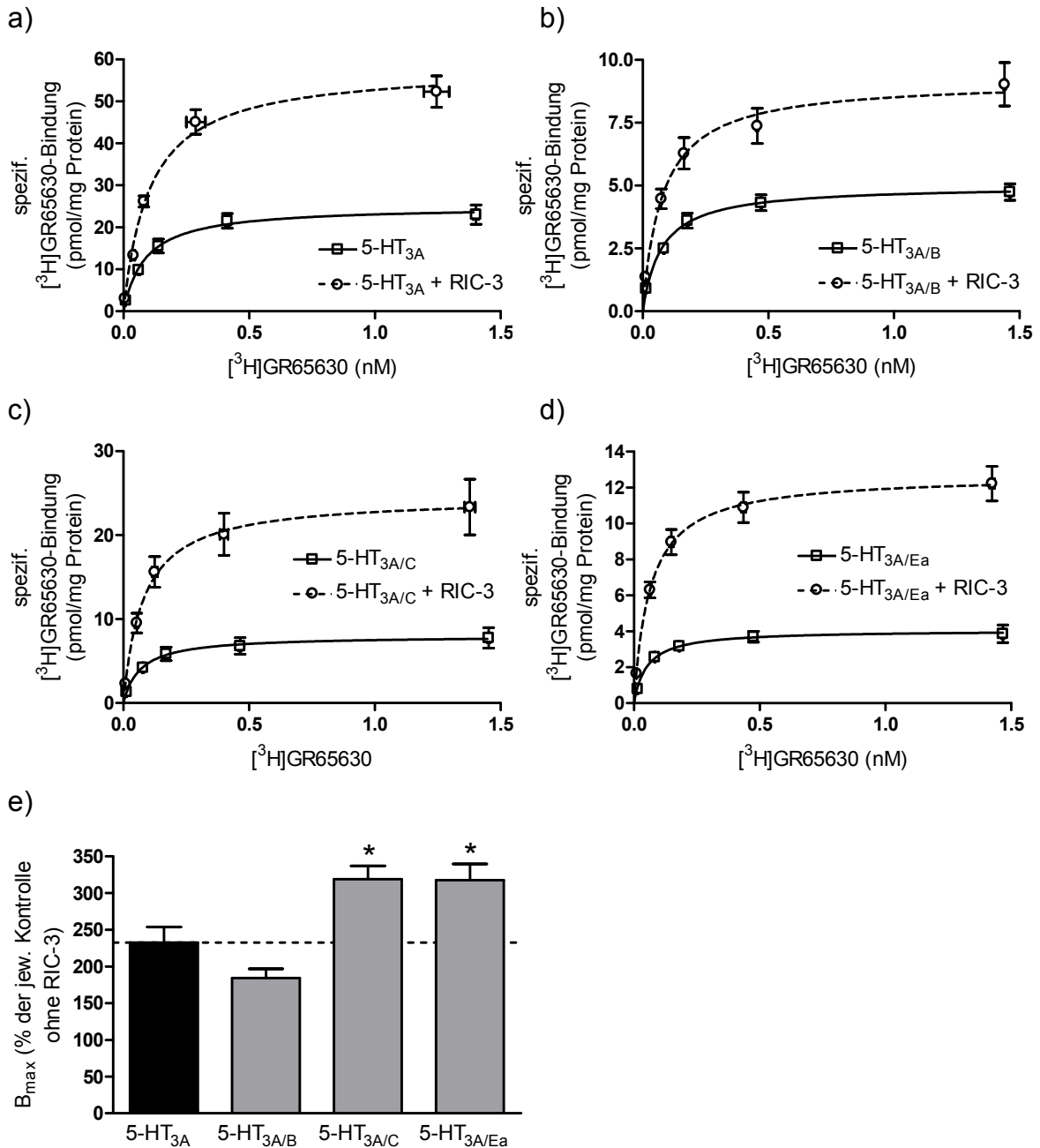
Da bereits von Cheng et al. (2005) gezeigt wurde, dass RIC-3 zu einer Erhöhung der Oberflächenexpression des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors führt, lag die Vermutung nahe, dass die erhöhten im Aequorin-Assay gemessenen 5-HT- $E_{max}$ -Werte auf die verstärkte Oberflächenexpression der entsprechenden Rezeptoren in Anwesenheit von RIC-3 zurückzuführen sind. Zu diesem Zweck erfolgten Sättigungsbindungsexperimente mit [<sup>3</sup>H]GR65630 an Membranen der mit den 5-HT<sub>3</sub>-Untereinheiten- und der RIC-3-cDNA bzw. dem leeren Plasmidvektor kotransfizierten HEK293-Zellen (Transfektionsverhältnis 1 : 0,1). Es wurde allerdings nur die Expression des homopentameren 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors und der heteromeren 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren bestimmt, bei welchen RIC-3 zu einer signifikant unterschiedlichen  $E_{max}$ -Erhöhung verglichen mit der am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor geführt

hat, und zwar 5-HT<sub>3A/B</sub>, 5-HT<sub>3A/C</sub> und 5-HT<sub>3A/Ea</sub> (siehe oben, Abbildung 47). Die entsprechenden Sättigungshyperbeln der [<sup>3</sup>H]GR65630-Bindung sind in Abbildung 48a-d dargestellt. Die Koexpression des homopentameren 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors und RIC-3 führte im Vergleich zur alleinigen Expression von 5-HT<sub>3A</sub> in HEK293-Zellen zu einer signifikanten Erhöhung des B<sub>max</sub>-Wertes auf 232,7 ± 21,0 % (Student's t-Test, p < 0,001, n = 6). RIC-3 führte auch bei Koexpression mit den heteromeren 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren zu einer signifikanten Erhöhung der Rezeptorexpression (Tabelle 12). Das Ausmaß der B<sub>max</sub>-Erhöhung durch RIC-3 unterschied sich jedoch analog der differentiellen E<sub>max</sub>-Erhöhung (siehe oben, Abbildung 47) bei den getesteten 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren (Abbildung 48). Die Koexpression von RIC-3 mit 5-HT<sub>3A/C</sub> bzw. 5-HT<sub>3A/Ea</sub> resultierte in B<sub>max</sub>-Erhöhungen von 319,0 ± 17,9 % bzw. 317,5 ± 22,2 %, was jeweils einem signifikanten (p < 0,05) Unterschied zur B<sub>max</sub>-Erhöhung am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor entspricht. Im Gegensatz dazu war die Erhöhung des B<sub>max</sub>-Wertes durch RIC-3-Expression am 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptor (184,1 ± 12,6 %) weniger stark ausgeprägt als am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor, wobei das Signifikanzniveau in diesem Fall nicht erreicht wurde. Zur Veranschaulichung sind die differentiellen B<sub>max</sub>-Erhöhungen in Abbildung 48e grafisch dargestellt. Die K<sub>D</sub>-Werte des Radioliganden [<sup>3</sup>H]GR65630 unterschieden sich nicht signifikant an den getesteten Rezeptoren in An- bzw. Abwesenheit von RIC-3 (Tabelle 12).

Rezeptor	B <sub>max</sub> (pmol/mg Protein)		K <sub>D</sub> (nM)	
	-	+ RIC-3	-	+ RIC-3
5-HT <sub>3A</sub>	25,01 ± 2,26	57,80 ± 4,55***	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,01
5-HT <sub>3A/B</sub>	5,01 ± 0,35	9,22 ± 0,90**	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01
5-HT <sub>3A/C</sub>	7,89 ± 1,28	24,47 ± 3,43**	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,01
5-HT <sub>3A/Ea</sub>	4,11 ± 0,42	12,73 ± 1,01***	0,05 ± 0,01	0,07 ± 0,01

**Tabelle 12: B<sub>max</sub>- und K<sub>D</sub>-Werte für [<sup>3</sup>H]GR65630 aus Sättigungsbindungsversuchen an Membranen von HEK293-Zellen, die transient mit den entsprechenden 5-HT<sub>3</sub>-Untereinheiten- und der RIC-3-cDNA bzw. dem leeren Plasmidvektor kotransfiziert wurden**

Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von sechs voneinander unabhängigen Experimenten, die in Abbildung 48 veranschaulicht sind. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle ohne RIC-3 (Student's t-Test) sind gekennzeichnet (\*\*p ≤ 0,01, \*\*\*p ≤ 0,001).



**Abbildung 48:**  $[^3\text{H}]$ GR65630-Bindung an Membranen von HEK293-Zellen, die transient mit den entsprechenden 5-HT<sub>3</sub>-Untereinheiten- und der RIC-3-cDNA bzw. dem leeren Plasmidvektor kotransfiziert wurden

**a-d)** Dargestellt sind die Sättigungshyperbeln der spezifischen  $[^3\text{H}]$ GR65630-Bindung (0,02 -1,5 nM). Die unspezifische Bindung wurde an Membranen nichttransfizierter Zellen bestimmt. Punkte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM von sechs voneinander unabhängigen Transfektionen. **e)** Gezeigt sind die mittleren  $B_{\text{max}}$ -Werte  $\pm$  SEM in Anwesenheit von RIC-3 aus den in a-d veranschaulichten Experimenten dargestellt als Prozentsatz der jeweiligen Kontrolle ohne RIC-3. Signifikante Unterschiede zur entsprechenden  $B_{\text{max}}$ -Erhöhung an 5-HT<sub>3A</sub> (dunkelgraue Säule) (*one-way ANOVA* gefolgt von einem Dunnett's post-hoc Test) sind gekennzeichnet (\* $p \leq 0,05$ ).

## **5. Untersuchung heterolog exprimierter humaner nACh $\alpha$ 7-Rezeptoren und chimärer 5-HT $_3A$ -nACh $\alpha$ 7-Rezeptoren**

In diesem Projektteil sollte die Bindungsstelle für Cannabinoide am humanen 5-HT $_3A$ -Rezeptor identifiziert bzw. auf einen bestimmten Bereich eingengt werden. Basis dieser Untersuchung war die differentielle inhibitorische Potenz des synthetischen Cannabinoids WIN 55,212-2 am Maus-5-HT $_3A$ - und Huhn-nACh $\alpha$ 7-Rezeptor (Oz et al., 2004), welche allerdings zunächst in unserem System an den humanen Rezeptoren verifiziert werden sollte. Durch Konstruktion chimärer Rezeptoren bestehend aus Teilen des 5-HT $_3A$ - und des nACh $\alpha$ 7-Rezeptors und Bestimmung der Inhibierungspotenz von WIN 55,212-2 im Ca $^{2+}$ -Influx-Assay an diesen Rezeptorkonstrukten sollte die Bindungsstelle am 5-HT $_3A$ -Rezeptor lokalisiert werden. Als großes Problem erwies sich allerdings die fehlende funktionelle Expression des nACh $\alpha$ 7-Rezeptors und der konstruierten Chimären, was letztendlich dazu führte, dass das Projektziel nicht erreicht werden konnte.

### **5.1 Versuche zur funktionellen Expression humaner nACh $\alpha$ 7-Rezeptoren**

Eine Voraussetzung für das Chimärenkonzept ist eine differentielle Inhibierungspotenz des gewählten Cannabinoids am humanen nACh $\alpha$ 7- und 5-HT $_3A$ -Rezeptor. Um dies zu überprüfen, sollte zunächst der nACh $\alpha$ 7-Rezeptor funktionell heterolog exprimiert und danach die Inhibierungspotenz von WIN 55,212-2 an diesem bestimmt werden.

Die Funktionalität des in Säugerzellen heterolog exprimierten nACh $\alpha$ 7-Rezeptors wurde durch Ca $^{2+}$ -Influxmessungen im Aequorin- bzw. CRET-Assay geprüft. In einigen Fällen erfolgten zusätzlich elektrophysiologische Messungen durch Herrn PD Dr. Martin Barann.

#### **5.1.1 Expression in HEK293-Zellen**

Nach transienter Transfektion von HEK293-Zellen mit der Apoaequorin- und nACh $\alpha$ 7-Rezeptor-cDNA zeigte sich keine Erhöhung der Lumineszenz im Aequorin-Assay nach Applikation der nACh-Rezeptoragonisten (-)Nikotin (0,1 - 5 mM) und ( $\pm$ )Epibatidin (2 - 10  $\mu$ M) (Daten nicht gezeigt).

Elektrophysiologische Ganzzelleableitungen transient bzw. stabil mit der nACh $\alpha$ 7-Rezeptor-cDNA transfizierter HEK293-Zellen lieferten keine Acetylcholin (0,1 oder 1 mM)-induzierten Ionenströme (Daten nicht gezeigt).

### 5.1.2 Expression in CHO-K1-, BOSC23-, SH-EP1- und GH4-C1-Zellen

Da die heterologe Expression des nACh $\alpha$ 7-Rezeptors in HEK293-Zellen nicht zu funktionellen (bzw. funktionell messbaren) Rezeptoren führte, wurden zusätzlich andere Säugerzelllinien getestet.

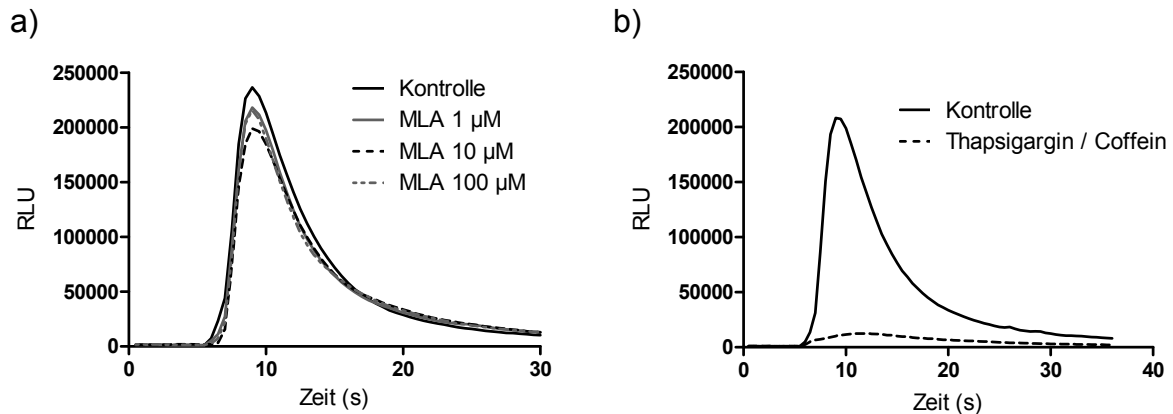
Auch die häufig für die heterologe Expression humaner Rezeptoren eingesetzte CHO-K1-Zelllinie lieferte in Analogie zu den HEK293-Zellen keine (-)Nikotin (1 mM, 5 mM)-induzierten Lumineszenzsignale im Aequorin-Assay nach transienter Transfektion mit der Apoaequorin- und nACh $\alpha$ 7-Rezeptor-cDNA (Daten nicht gezeigt).

Des Weiteren wurden BOSC23-Zellen, die bereits erfolgreich zur funktionellen Expression einer nACh $\alpha$ 7-Rezeptormutante zum Einsatz kamen (Fucile et al., 2000), getestet. Auch in diesem Fall zeigte sich keine (-)Nikotin-induzierte Lumineszenz im Aequorin-Assay an transient transfizierten Zellen (Daten nicht gezeigt).

Von Dr. Saara Nuutinen aus Finnland erhielten wir freundlicherweise die stabil mit dem humanen nACh $\alpha$ 7-Rezeptor transfizierte Zelllinie SH-EP1 h $\alpha$ 7, welche erfolgreich für die funktionelle Analyse des nACh $\alpha$ 7-Rezeptor mittels elektrophysiologischer Methoden eingesetzt wurde (Zhao et al., 2003). Diese Zelllinie zeigte wie die zuvor getesteten Zellen keine (-)Nikotin (1 mM)-induzierten Lumineszenzsignale im Aequorin-Assay nach transienter Transfektion mit der Apoaequorin-cDNA. Auch nach Vorinkubation der transfizierten Zellen mit 10  $\mu$ M (-)Nikotin über 24 h, was zu einer Erhöhung der Membranexpression des nACh $\alpha$ 7-Rezeptors führen soll (Ke et al., 1998), zeigte sich keine Antwort auf Nikotin im Aequorin-Assay (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu zeigten die SH-EP1 h $\alpha$ 7-Zellen nach Transfektion mit dem pG5A-Vektor konzentrationsabhängige (-)Nikotin (0,3 - 10 mM)-induzierte Lichtsignale im CRET-Assay, welche allerdings nicht durch den nACh $\alpha$ 7-Rezeptorantagonisten Methyllycaconitin (1, 10, 100  $\mu$ M) inhibiert werden konnten (Abbildung 49a) und welche auch bei SH-EP1-Zellen, die den nACh $\alpha$ 7-Rezeptor nicht exprimieren (Daten nicht gezeigt), auftraten. Diese bei hohen (-)Nikotinkonzentrationen auftretenden Lichtsignale wurden höchstwahrscheinlich nACh $\alpha$ 7-unabhängig durch die Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus intrazellulären Speichern verursacht, da die Entleerung intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Speicher durch Vorinkubation der pG5A-transfizierten SH-EP1 h $\alpha$ 7-Zellen mit Thapsigargin

(2,5  $\mu\text{M}$ ) und Coffein (10 mM) zu einer fast vollständigen Unterdrückung der durch 3 mM (-)Nikotin ausgelösten Antworten führte (Abbildung 49b).

Bei elektrophysiologischen Ganzzelleableitungen der SH-EP1  $\alpha 7$ -Zellen konnten in Einzelfällen Acetylcholin (1 mM)-induzierte Ströme aufgezeichnet werden (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 49: Nicht durch nACh $\alpha 7$ -vermittelte (-)Nikotin (3 mM)-induzierte Lichtsignale im CRET-Assay an SH-EP1  $\alpha 7$ -Zellen, welche mit der pG5A-cDNA transfiziert wurden**

Gezeigt sind die Rohdatenspur eines repräsentativen Experiments (Mittelwerte aus Dreifachmessungen). **a)** Der nACh $\alpha 7$ -Rezeptorantagonist Methylycaconitin (MLA) war 15 min vor und während der Messung anwesend. **b)** Zur Entleerung intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher wurden die Zellen 30 min mit Thapsigargin (2,5  $\mu\text{M}$ ) und Coffein (10 mM) vorinkubiert.

Schließlich wurden GH4-C1-Zellen, welche in mehreren Studien für die funktionelle Analyse heterolog exprimierter nACh $\alpha 7$ -Rezeptor mittels fluoreszenzbasierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Assays eingesetzt wurden (Feuerbach et al., 2005; Dunlop et al., 2007), getestet. Allerdings zeigte sich nach mehreren Versuchen, dass die Transfektionseffizienz bei transients Transfektion dieser Zellen zu gering war, um  $\text{Ca}^{2+}$ -Influxmessungen durchzuführen. Daher wurden (wie unter B.2.2.12.2 beschrieben) Mischklone stabil mit dem pG5A-Vektor und der nACh $\alpha 7$ -cDNA transfizierter GH4-C1-Zellen hergestellt. Allerdings konnte auch bei diesen GH4-C1 pG5A  $\alpha 7$ -Zellen, trotz ausreichender Aequorin-EGFP-Menge (erfasst nach der Zelllyse; siehe B.2.4.2.5 letzter Absatz), kein (-)Nikotin-induziertes Lichtsignal im CRET-Assay gemessen werden (Daten nicht gezeigt).

### 5.1.3 Konstruktion und Expression einer „Gain-of-function“-Mutante

Die fehlende Erfassbarkeit Agonist-induzierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Einströme könnte auf der schnellen Desensibilisierungskinetik des nACh $\alpha$ 7-Rezeptors beruhen. Um dieser entgegenzuwirken, erfolgte die Konstruktion der „Gain-of-function“-Mutante nACh $\alpha$ 7 T267S, welche sich durch eine längere Kanalöffnungsdauer verglichen mit dem WT-Rezeptor auszeichnet (Placzek et al., 2005). Zu diesem Zweck wurde die gerichtete Mutagenese der WT-Rezeptor-cDNA unter Verwendung der Mutageneseprimer (mutiertes Nukleotid unterstrichen) 5' GATTC-CCTGGGGATACAGTCTTACTCTCTCTTAC 3' (*sense*) und 5' AGAGAGAGTA-AGACTGATATCCCCAGGGAAATC 3' (*antisense*) durchgeführt. Der resultierende nACh $\alpha$ 7 T267S-Rezeptor führte aber weder nach Expression in HEK293- noch in SH-EP1-Zellen zu einem (-)Nikotin-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx im CRET-Assay (Daten nicht gezeigt).

### 5.1.4 Koexpression des nACh $\alpha$ 7-Rezeptors mit dem Chaperon RIC-3

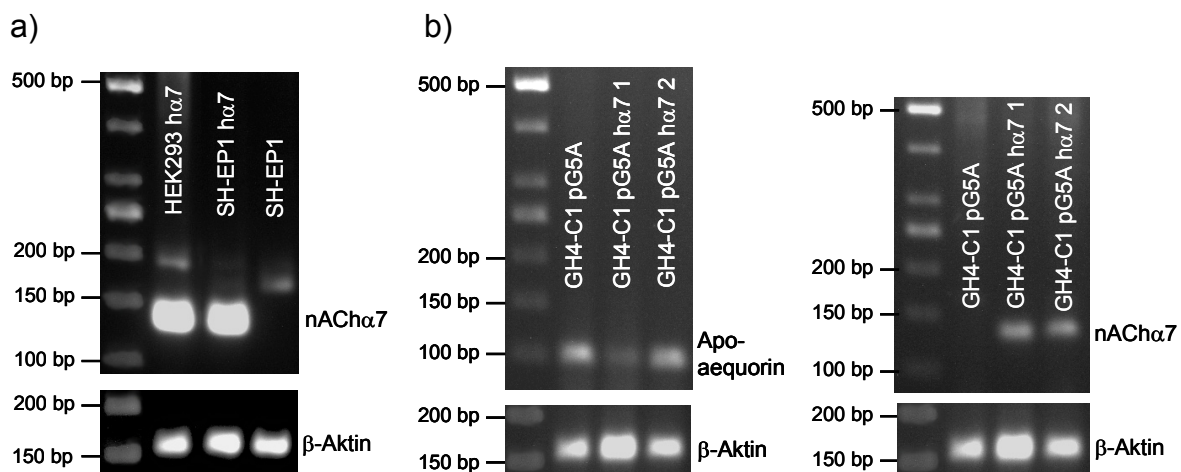
Auch die Koexpression des Chaperons RIC-3, welche nach Williams et al. (2005) in HEK293-Zellen zu einer Expression funktioneller nACh $\alpha$ 7-Rezeptoren an der Zelloberfläche dieser Zellen führen soll, bewirkte weder bei HEK293- noch bei SH-EP1-Zellen ein (-)Nikotin-induziertes Lichtsignal im Aequorin- bzw. CRET-Assay (Daten nicht gezeigt). In elektrophysiologischen Experimenten mit HEK293-Zellen, die den nACh $\alpha$ 7-Rezeptor und RIC-3 transient koexprimierten, konnte allerdings in einer von elf Ganzzelleableitungen ein Acetylcholin (1 mM)-induziertes Stromsignal detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

## 5.2 Kontrolle der Expression des humanen nACh $\alpha$ 7-Rezeptors

### 5.2.1 Expression auf RNA-Ebene

Zur Kontrolle der Expression des nACh $\alpha$ 7-Rezeptors auf mRNA-Ebene wurde aus der stabilen SH-EP1 h $\alpha$ 7-Zelllinie und den mit dem pG5A-Vektor und der nACh $\alpha$ 7-Rezeptor-cDNA erfolgreich stabil transfizierten GH4-C1-Zellen RNA isoliert und hiermit eine RT-PCR durchgeführt. Als interner Standard wurde bei jeder Probe  $\beta$ -Aktin mitamplifiziert. Die PCR erfolgte unter Einsatz von 100 ng (nACh $\alpha$ 7, Apoaequorin) bzw. 50 ng ( $\beta$ -Aktin) revers in cDNA transkribierter RNA und der in Tabelle 13 aufgeführten Oligonukleotidprimer.

SH-EP1  $\alpha 7$ -Zellen, nicht jedoch native SH-EP1-Zellen, zeigten eine deutliche Expression der nACh $\alpha 7$ -Rezeptor-RNA (Abbildung 50a), was die Identität der Zellen belegt. HEK293-Zellen, die transient mit der nACh $\alpha 7$ -Rezeptor-cDNA transfiziert wurden, wiesen eine vergleichbare Expression der nACh $\alpha 7$ -Rezeptor-RNA auf (Abbildung 50a). Damit konnte gezeigt werden, dass die fehlende Funktionalität nicht aufgrund einer fehlenden Transkription der Rezeptor-cDNA hervorgerufen wurde. Des Weiteren konnte auch die erfolgreiche stabile Transfektion der GH4-C1-Zellen mit dem pG5A-Vektor und der nACh $\alpha 7$ -Rezeptor-cDNA gezeigt werden, da bei den GH4-C1 pG5A-Zellen nur das Apoaequorin-Fragment und bei den zwei Zellklonen der GH4-C1 pG5A  $\alpha 7$ -Zellen das nACh $\alpha 7$ - und das Apoaequorin-Fragment amplifiziert werden konnte (Abbildung 50b). Die erwarteten Fragmentgrößen sind in Tabelle 13 aufgelistet.



**Abbildung 50: RT-PCR von HEK293-, SH-EP1- (a) bzw. GH4-C1-Zellen (b), die entweder transient oder stabil mit der humanen nACh $\alpha 7$ -cDNA transfiziert wurden**

Gezeigt sind Agarosegele (2 % m/V) mit den in der PCR amplifizierten Fragmenten und dem Marker „GeneRuler 50 bp DNA Ladder“. Als interner Standard wurde  $\beta$ -Aktin verwendet. **a)** HEK293-Zellen wurden transient mit der nACh $\alpha 7$ -cDNA transfiziert (HEK293  $\alpha 7$ ), wogegen die SH-EP1  $\alpha 7$ -Zellen den nACh $\alpha 7$ -Rezeptor stabil exprimierten. **b)** GH4-C1-Zellen wurden zunächst mit dem pG5A-Vektor (Bande links) und anschließend mit der nACh $\alpha 7$ -cDNA (Bande Mitte + rechts, zwei Zellklone) stabil transfiziert.



## Ergebnisse

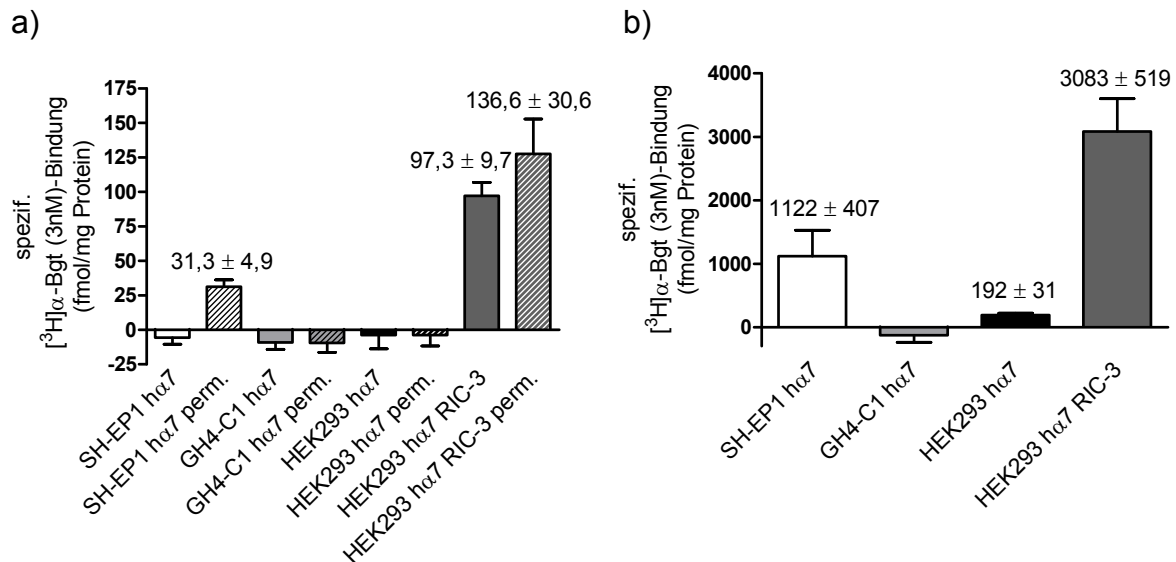
Zielgen	Fragment	Orientierung	Sequenz 5' → 3'
nACh $\alpha$ 7	135 bp	<i>sense</i>	ACTCACCGTCTACTTCTCC
		<i>antisense</i>	GGATATTCTGACACATTCCAC
Apoaequorin	100 bp	<i>sense</i>	TTGACGAGATGGTCTACAAGG
		<i>antisense</i>	GAAGGCTTCTACAGCATCTTTGTG
$\beta$ -Aktin	154 bp	<i>sense</i>	TCCATCATGAAGTGTGACGT
		<i>antisense</i>	GAGCAATGATCTTGATCTTCAT

**Tabelle 13: Oligonukleotidprimer und Größen der amplifizierten Fragmente für die RT-PCR**

### 5.2.2 Expression auf Proteinebene (Radioligandbindung)

Um zu untersuchen ob die fehlende Funktionalität des nACh $\alpha$ 7-Rezeptors auf die fehlende Membranexpression des Rezeptorproteins zurückzuführen ist, erfolgten Radioligandbindungsstudien mit dem nACh $\alpha$ 7-Rezeptorantagonisten [ $^3$ H] $\alpha$ -Bungarotoxin ([ $^3$ H] $\alpha$ -Bgt). Die Bindungsversuche wurden mit einer Radioligandkonzentration von 3 nM [ $^3$ H] $\alpha$ -Bgt an HEK293-, SH-EP1 h $\alpha$ 7- bzw. GH4-C1 pG5A h $\alpha$ 7-Zellen in Suspension und an aus den Zellen präparierten Membranen durchgeführt (Abbildung 51). Die HEK293-Zellen wurden dazu zunächst transient mit der nACh $\alpha$ 7-cDNA bzw. zusätzlich mit der RIC-3-cDNA kotransfiziert. Intakte Zellen der SH-EP1 h $\alpha$ 7-Zelllinie wiesen keine spezifische [ $^3$ H] $\alpha$ -Bgt-Bindung auf, währenddessen nach Zellpermeabilisierung eine geringe [ $^3$ H] $\alpha$ -Bgt-Bindung auftrat. Membranen dieser Zellen zeigten dagegen eine vergleichsweise hohe [ $^3$ H] $\alpha$ -Bgt-Bindung. Die spezifische [ $^3$ H] $\alpha$ -Bgt-Bindung an den stabil transfizierten GH4-C1 pG5A h $\alpha$ 7-Zellen war in beiden Versuchsansätzen nicht signifikant unterschiedlich von Null, was darauf hindeutet, dass unter Umständen der auf RNA-Ebene nachgewiesene nACh $\alpha$ 7-Rezeptor (siehe Abbildung 50b) nicht in genügendem Maße exprimiert wird und die stabile Transfektion damit nicht ausreichend effizient war. HEK293-Zellen, welche transient mit der nACh $\alpha$ 7-Rezeptor-cDNA transfiziert wurden, wiesen keine spezifische [ $^3$ H] $\alpha$ -Bgt-Bindung auf. Erst nach der Isolation von Membranen aus diesen Zellen konnte eine spezifische, wenngleich auch geringe [ $^3$ H] $\alpha$ -Bgt-Bindung detektiert werden. Transfizierte man die HEK293-Zellen zusätzlich mit der RIC-3-cDNA, konnte eine spezifische Bindung sowohl an permeabilisierten als auch an intakten Zellen

gemessen werden, welche bei den permeabilisierten Zellen geringfügig aber nicht signifikant größer war. Membranen dieser Zellen zeigten dementsprechend im Vergleich zu den HEK293  $\alpha 7$ -Membranen ca. 16-fach höhere [ $^3\text{H}$ ] $\alpha$ -Bgt-Bindungswerte. Die jeweiligen spezifischen [ $^3\text{H}$ ] $\alpha$ -Bgt-Bindungen werden in Abbildung 51 gezeigt.



**Abbildung 51: Spezifische [ $^3\text{H}$ ] $\alpha$ -Bgt (3 nM)-Bindung an mit der nACh $\alpha 7$ -cDNA transfizierten SH-EP1-, GH4-C1- bzw. HEK293-Zellen in Suspension (a) und an Membranen dieser Zellen (b)**

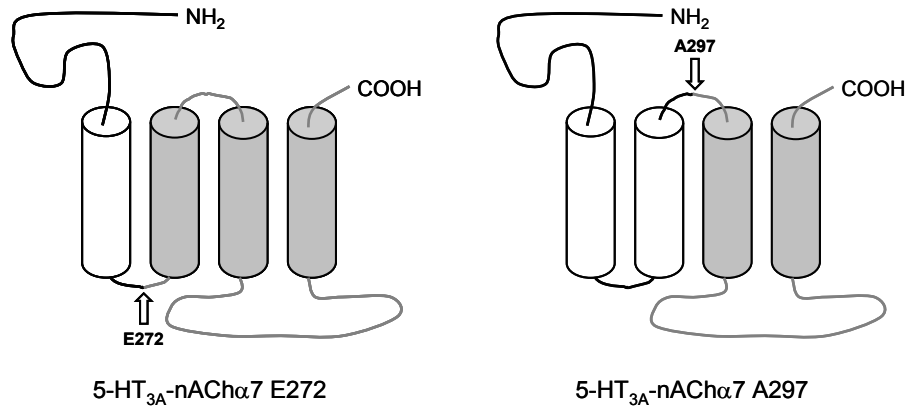
Die SH-EP1  $\alpha 7$ - bzw. GH4-C1 pG5A  $\alpha 7$  (kurz: GH4-C1  $\alpha 7$ )-Zellen wurden stabil mit der nACh $\alpha 7$ -cDNA transfiziert. HEK293-Zellen wurden transient mit der nACh $\alpha 7$ -cDNA (HEK293  $\alpha 7$ ) bzw. zusätzlich mit der RIC-3-cDNA kotransfiziert (HEK293  $\alpha 7$  + RIC-3). Die unspezifische Bindung wurde an nichttransfizierten Zellen bestimmt. Die spezifischen [ $^3\text{H}$ ] $\alpha$ -Bgt-Bindungen, die Werte signifikant größer als Null aufwiesen, sind über den entsprechenden Säulen dargestellt (Mittelwerte  $\pm$  SEM, in fmol/mg Protein). **a)** Die Bindung wurde an intakten bzw. mit Saponin (0,1 % m/V) permeabilisierten Zellen (perm.) in Suspension durchgeführt. **b)** Gezeigt ist die spezifische [ $^3\text{H}$ ] $\alpha$ -Bgt-Bindung an Membranen dieser Zellen.

### 5.3 Konstruktion und Expression chimärer 5-HT<sub>3A</sub>-nACh $\alpha$ 7-Rezeptoren

Um die Bindungsstelle von Cannabinoiden am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor zu identifizieren, wurden chimäre Rezeptorkonstrukte bestehend aus 5-HT<sub>3A</sub> und nACh $\alpha$ 7 generiert (siehe oben, C.5). Die Inhibierungspotenz des endogenen Cannabinoids Anandamid (300 nM) an einer nACh $\alpha$ 7-5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptorchimäre, zusammengesetzt aus dem N-terminalen Bereich des Huhn-nACh $\alpha$ 7-Rezeptors und den transmembranären Domänen (TMs) sowie dem C-Terminus des Maus-5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors, war im Gegensatz zu der am nACh $\alpha$ 7-Rezeptor kaum ausgeprägt (Oz et al., 2004). Aufgrund der Tatsache, dass Anandamid in der erwähnten Studie am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor eine geringere Potenz zeigte als am nACh $\alpha$ 7-Rezeptor, lag die Vermutung nahe, dass nicht die N-terminale Domäne des nACh $\alpha$ 7-Rezeptors, sondern eine TM, die große IZD zw. TM3 und TM4 oder das Carboxylende die kritische Zielstruktur für die Bindung von Anandamid zu sein scheint. In Analogie dazu konstruierten wir mittels rekombinanter PCR-Techniken zwei Rezeptorkonstrukte bestehend aus dem N-Terminus und einer bzw. zweier TMs der humanen 5-HT<sub>3A</sub>-cDNA und dem restlichen C-terminalen Bereich der humanen nACh $\alpha$ 7-cDNA (siehe B.2.2.9.1). Die daraus resultierenden chimären Rezeptoren sind in Abbildung 52 dargestellt.

Nachdem gezeigt worden war, dass das synthetische Cannabinoid WIN 55,212-2 selbst in hohen Konzentrationen von 10  $\mu$ M keinen inhibierenden Effekt auf die Agonist-induzierten Antworten des Huhn-nACh $\alpha$ 7-Rezeptors aufweist (Oz et al., 2004), sollte diese Substanz zur Auffindung der Cannabinoidbindungsstelle am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor dienen. Im Gegensatz zum fehlenden Effekt am Huhn-nACh $\alpha$ 7-Rezeptor inhibierte WIN 55,212-2 die 5-HT-induzierten Antworten am humanen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor (siehe C.2.3.2.2; Barann et al., 2002).

Allerdings ergaben sich nach transients Transfektion von HEK293-Zellen mit den generierten chimären Konstrukten keine funktionellen Ionenkanäle, denn nach 5-HT-Applikation resultierte kein Anstieg der Lumineszenz im Aequorin-Assay (Daten nicht gezeigt). Auch in Radioligandbindungsexperimenten mit [<sup>3</sup>H]GR65630 konnte praktisch keine auswertbare spezifische Bindung detektiert werden (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 52: Topologie der chimären humanen 5-HT<sub>3A</sub>-nAChα7-Rezeptoruntereinheiten**

E272 und A297 sind die Bezeichnungen für die jeweilige Aminosäure der 5-HT<sub>3A</sub>-Untereinheit, an welche sich die nAChα7-Sequenz anschließt. Der 5-HT<sub>3A</sub>-Anteil ist in schwarz (TMs weiß) und der nAChα7-Teil in grau dargestellt.

## D. Diskussion

### 1. Etablierung eines Aequorin-Ca<sup>2+</sup>-Influx-Assays für die funktionelle Charakterisierung von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren

Das Ziel dieser Arbeit war zunächst die Optimierung eines Assays für die funktionelle Charakterisierung von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren, welche aus verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzt sind bzw. natürlich vorkommender Varianten dieser Rezeptoren. Mit dem Aequorin-Lumineszenz-basierten Ca<sup>2+</sup>-Assay fanden wir eine sensitive Methode, die geeignet ist, den Agonist-induzierten Influx von Ca<sup>2+</sup>-Ionen durch den 5-HT<sub>3</sub>-Kanal in hohem Durchsatz zu messen. Die Standardtechnik für die funktionelle Charakterisierung der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren und anderer ligandgesteuerter Ionenkanäle ist die Patch-Clamp-Analyse, welche die einzige Methode zur Bestimmung biophysikalischer Eigenschaften (z.B. Kinetik, Einzelkanalcharakteristiken) ist. Allerdings ist diese Technik sehr zeitaufwendig und damit nicht für die schnelle Charakterisierung verschiedener 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren geeignet. Andere Methoden, die für die Analyse der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren eingesetzt werden, sind die Messung des [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx (Bönisch et al., 1993) und die Verwendung Ca<sup>2+</sup>-sensitiver Fluoreszenzfarbstoffe (Hargreaves et al., 1994; Dubin et al., 1999). Der [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx hat wesentliche Nachteile gegenüber dem Aequorin-Assay. So ist beispielsweise der Einsatz von radioaktiv markierten Substanzen notwendig und ein relativ kleines Signal-Rausch-Verhältnis ist zu verzeichnen. Weiterhin führen bei der genannten Methode die verwendeten Puffer, in welchen Na<sup>+</sup>-Ionen durch größere organische Kationen wie Cholin oder N-Methyl-D-Glucamin, die die Rezeptorpore nicht passieren können (Barann et al., 2004), ersetzt sind, zu artifiziellen Bedingungen, die die Resultate negativ beeinflussen können. Die Messung des Ca<sup>2+</sup>-Influx unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen, welche bereits erfolgreich für die Charakterisierung stabil mit der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-cDNA transfizierter Zellen angewandt wurde, besitzt speziell im Falle transient transfizierter Zellen einen wesentlichen Nachteil. Es ist nicht möglich, nur selektiv die transfizierten Zellen mit dem Farbstoff zu beladen, was zu einer hohen Hintergrundfluoreszenz führt, da das Signal von der gesamten Zellpopulation ausgelöst wird. Dieser Effekt wurde beispielsweise an heterolog exprimierten α<sub>1</sub>-adrenergen Rezeptoren demonstriert (Brini et al., 1995). Aus diesen Gründen wählten wir den Aequorin-Assay, dessen Verwendung als Detektor von Ca<sup>2+</sup>-Ionen-Fluktuationen in

lebenden Zellen etabliert ist (Sheu et al., 1993). Der Vorteil dieser Messmethode ist, dass nach Kotransfektion der Zellen mit der Apoaequorin- und Rezeptor-cDNA die gebildeten Proteine in den selben Zellen exprimiert werden, was zu einem hohen Signal-Rausch-Verhältnis führt, da das gemessene Lumineszenzsignal nur von den transfizierten Zellen ausgelöst wird. Des Weiteren kann die Bestimmung der Gesamtmenge des zellulär lokalisierten Aequorins am Ende der Messung nach Zellyse als Kontrolle der Transfektionseffizienz genutzt werden.

Für die heterologe Expression des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors wurden HEK293-Zellen verwendet, welche keine 5-HT-Rezeptoren nativ exprimieren. Das konnte durch Stimulation von HEK293-Zellen, die nur mit der Apoaequorin-cDNA transfiziert wurden, mit einer hohen 5-HT-Konzentration (10 µM) gezeigt werden, da keine Erhöhung der Lumineszenz resultierte. Es wurde zusätzlich untersucht, ob HEK293-Zellen spannungsgesteuerte Ca<sup>2+</sup>-Kanäle exprimieren, die nach Depolarisation der Zelle mit KCl geöffnet werden würden. Keine K<sup>+</sup>-induzierte Lumineszenzerhöhung konnte gemessen werden, was zeigt, dass HEK293-Zellen solche Kanäle nicht exprimieren. Damit wurden die Resultate früherer Studien bestätigt (Williams et al., 1992; Hargreaves et al., 1994). Des Weiteren wurde gezeigt, dass eine Ca<sup>2+</sup>-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus intrazellulären Speichern nur zu ca. 20 % der 5-HT-induzierten Maximalantwort beiträgt. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass das Agonist-induzierte Lumineszenzsignal vorwiegend durch den Einstrom von Ca<sup>2+</sup>-Ionen durch die 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorpore zustande kommt und die Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus intrazellulären Speichern eine untergeordnete Rolle spielt.

In initialen Experimenten mit dem Agonisten 5-HT zeigte sich, dass steigende Konzentrationen zu steiler ansteigenden und abfallenden Lumineszenzpeaks führten. Die gleiche Abhängigkeit der Aktivierungs- und Desensibilisierungskinetik von der verwendeten 5-HT-Konzentration konnte in Patch-Clamp-Analysen beobachtet werden, obwohl die Kinetiken bei dieser Methodik entsprechend schneller waren (Barann et al., 2000b).

Um die Reproduzierbarkeit bzw. die Sensitivität des Aequorin-Assays zu verbessern, erfolgte zunächst die Optimierung der Zellbeladung mit dem Kofaktor Coelenterazin. Zufriedenstellende Lumineszenzsignale konnten nach einer Beladung der Zellen mit 5 µM Coelenterazin-*h* über 2,5 h bei Raumtemperatur erzielt werden. Die Sensitivität der Messung wurde durch Verwendung des synthetischen Kofaktors Coelenterazin-*h* erhöht, da das daraus mit Apoaequorin

gebildete semisynthetische Aequorin eine höhere  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität und eine 16-fach größere Lumineszenzintensität als natives Aequorin aufweist (Knight et al., 1993, Shimomura et al., 1993).

Zusätzlich wurde die Abhängigkeit der Agonist-induzierten Peaklumineszenz von den eingesetzten Apoaequorin- und Rezeptor-cDNA-Mengen bei der Transfektion untersucht. Je größer das Verhältnis Apoaequorin- : Rezeptor-cDNA war, desto höher waren auch die Lumineszenzsignale. Die Beobachtung ist in Übereinstimmung mit Resultaten beschrieben von Sheu et al. (1993), die entdeckten, dass das Lumineszenzsignal proportional zur Aequorin-Menge in der Zelle ist. Diese Optimierung ist vor allem sinnvoll für die Charakterisierung solcher  $5\text{-HT}_3$ -Rezeptoren, die nur in geringer Dichte auf der Zelloberfläche exprimiert werden.

Die  $\text{EC}_{50}$ -Werte für die beiden Agonisten 5-HT und mCPBG am  $5\text{-HT}_{3A}$ -Rezeptor lagen im Bereich mittels anderer Methoden bestimmter Werte an heterolog exprimierten  $5\text{-HT}_{3A}$ -Rezeptoren in HEK293-Zellen (Tabelle 14). Die Hill-Koeffizienten ( $n_H$ -Werte) der korrespondierenden Konzentrations-Wirkungskurven lagen bei ca. drei und somit in dem Bereich mittels ähnlicher Methoden wie fluoreszenzbasierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen (Hargreaves et al., 1994; Dubin et al., 1999) oder [ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium-Influx (Brüss et al., 2000) bestimmter  $n_H$ -Werte. Die  $n_H$ -Werte der mittels elektrophysiologischer Methoden bestimmten Konzentrations-Wirkungskurven beider Agonisten liegen dagegen zwischen 1,5 - 2 (Brown et al., 1998; Barann et al., 2000b; Spier und Lummis, 2000; Hapfelmeier et al., 2003). Die größeren Hill-Koeffizienten der Kurven aus den nicht-elektrophysiologischen Messungen resultieren möglicherweise aus der dauerhaften Anwesenheit des Agonisten nach der Applikation und der geringeren zeitlichen Auflösung des Signals im Vergleich zum Patch-Clamp-Experiment, was zur Folge hat, dass das Messsignal bei hohen Agonistkonzentrationen aufgrund der starken Desensitisierung kleiner ausfällt als bei elektrophysiologischen Messungen. Ein Indiz für den geschilderten Sachverhalt sind die geringfügig größeren  $\text{EC}_{50}$ -Werte für 5-HT am  $5\text{-HT}_{3A}$ -Rezeptor, die mittels Patch-Clamp-Untersuchungen bestimmt wurden (siehe Tabelle 14). Die  $K_I$ -Werte für die selektiven  $5\text{-HT}_3$ -Rezeptorantagonisten Azasetron und Ondansetron waren den mittels anderer Methoden erhaltenen Werten sehr ähnlich (Tabelle 14).

Zusammenfassend kann man sagen, dass der optimierte Aequorin-Assay eine sensitive Methode für die Charakterisierung  $\text{Ca}^{2+}$ -permeabler ligandgesteuerter Ionenkanäle liefert, welche für die Hochdurchsatzanalyse geeignet ist.

Literatur	Methode	Agonisten		Antagonisten	
		5-HT	mCPBG	Azasetron	Ondansetron
aktuelle Studie	Aequorin-Assay	1,8	1,8	0,2	0,2
Davies et al., 1999	Patch-Clamp: Ganzzelleableitung	2,9	2,5	n.b.	n.b.
Brown et al., 1998	Patch-Clamp: Ganzzelleableitung	3,4	n.b.	n.b.	0,1
Spier und Lummis, 2000 <sup>a</sup>	Patch-Clamp: Ganzzelleableitung	2,1	0,8	n.b.	n.b.
Hapfelmeier et al., 2003	Patch-Clamp: Ganzzelleableitung	3,0	n.b.	n.b.	n.b.
Barann et al., 2000; 2006	Patch-Clamp: excised outside-out	8,6	n.b.	n.b.	0,1
Kurzwelly et al., 2004	Patch-Clamp: excised outside-out	8,5	5,9	0,8	n.b.
Dubin et al., 1999	FLIPR-Assay	0,3	0,5	9,3	n.b.
Hargreaves et al., 1994 <sup>a</sup>	Fura-2-Fluoreszenz (Einzelzellen)	n.b.	0,2	n.b.	n.b.
Price et al., 2005 <sup>a</sup>	Fura-2-Fluoreszenz (FLEXStation)	1,1	0,2	n.b.	n.b.
Kurzwelly et al., 2004	[ <sup>3</sup> H]GR65630-Bindung	0,4 <sup>b</sup>	0,3 <sup>b</sup>	4,3	5,7

**Tabelle 14: EC<sub>50</sub>-Werte (µM) für Agonisten und K<sub>I</sub>-Werte für Antagonisten (nM) an heterolog exprimierten humanen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren in HEK293-Zellen, bestimmt mittels unterschiedlicher Methoden**

Die K<sub>I</sub>-Werte wurden mit Hilfe der Gleichung nach Cheng und Prusoff (1973) bestimmt.

<sup>a</sup> In diesen Studien wurden mit der murinen 5-HT<sub>3A</sub>-cDNA transfizierte Zellen verwendet.

<sup>b</sup> Angegeben sind K<sub>I</sub>-Werte (µM).

FLIPR, *Fluorescent Imaging Plate Reader*; n.b., nicht bestimmt

Eine sensitivere Weiterentwicklung des beschriebenen Aequorin-Assay stellt der modifizierte Assay unter Verwendung eines Apoaequorin-EGFP-Fusionskonstruktes (pG5A) (Baubet et al., 2000) dar, welcher bereits für die funktionelle Charakterisierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren eingesetzt wurde (Tunaru et al., 2003). Durch die strahlungslose intramolekulare Energie-



übertragung des Aequorins auf das EGFP (CRET) wird das resultierende Lichtsignal um ein Vielfaches verstärkt. Diese Signalverstärkung im Vergleich zum Aequorin-Assay konnte durch Messung des 5-HT (10  $\mu$ M)-induzierten Lichtsignals an HEK293-Zellen, welche den 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor exprimierten, demonstriert werden und betrug ca. 300 %. Damit ist diese Messmethode für die Charakterisierung von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren, die eine geringe Membranexpression aufweisen, bzw. für die Analyse von Partialagonisten, die nur eine geringe intrinsische Aktivität am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor haben, eine Alternative gegenüber dem konventionellen Aequorin-Assay, der in diesen Fällen keine auswertbaren Signale mehr liefert. Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse des Aequorin- und CRET-Assays wurde am Beispiel des Dopamins verdeutlicht, da sich die bestimmten funktionellen Parameter  $pEC_{50}$  und  $n_H$  am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor nicht signifikant zwischen beiden Methoden unterschieden.

## 2. Generierung und Testung fluoreszenzmarkierter 5-HT<sub>3A</sub>-Untereinheiten

Um Proteinmaturation und *-trafficking in vivo* zu untersuchen, ist es notwendig, das entsprechende Protein zu visualisieren. Das kann durch die Generierung eines Fusionskonstrukts aus dem zu untersuchenden Protein und einem Fluoreszenzprotein wie beispielsweise einem GFP-Derivat realisiert werden. In unserem Fall sollte im Rahmen eines Kooperationsprojektes die humane 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoruntereinheit mit einem solchen Fluoreszenzprotein (ECFP und EYFP) markiert werden, um eine mögliche Interaktion zwischen dem 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor und anderen ligandgesteuerten Ionenkanälen der *Cys-loop*-Superfamilie (nACh-, Glycin- und GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren) nach heterologer Expression in Säugerzellen zu untersuchen. Aufgrund der beträchtlichen Größe des GFP von 27 kDa, welche bereits der halben Größe der 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoruntereinheit von ca. 50 kDa entspricht, bestand die Gefahr, dass z.B. die Faltung, Assemblierung oder Funktion des Rezeptors beeinträchtigt wird. Um dies zu vermeiden, erfolgte der Einbau der ECFP- bzw. EYFP-Sequenz in die große intrazelluläre Domäne (IZD) zwischen TM3 und TM4 unter Berücksichtigung putativer Phosphorylierungsstellen. Diese Position schien am geeignetsten zu sein, da bereits verschiedene Untereinheiten des nACh-Rezeptors zwischen TM3 und TM4 mit Fluoreszenzproteinen markiert wurden und die resultierenden chimären Rezeptoren eine ähnliche Funktion wie der unmarkierte Rezeptor aufwiesen (Gensler et al., 2001; Nashmi et al., 2003; Drenan et al., 2008). Des Weiteren wurde bereits erfolgreich solch ein

fluoreszenzmarkiertes Konstrukt mit der kurzen Spleißvariante des murinen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors hergestellt (Ilegems et al., 2004). Demgegenüber führte die Einführung der Sequenz des Fluoreszenzproteins in den N-terminalen (Gensler et al., 2001; Nashmi et al., 2003) bzw. C-terminalen Bereich (Kittler et al., 2000; Gensler et al., 2001; Nashmi et al., 2003) verschiedener nACh-Untereinheiten bzw. der  $\gamma$ 2-Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors zum partiellen oder vollständigen Funktionsverlust der gebildeten ligandgesteuerten Ionenkanäle. Die von uns mittels rekombinanter PCR-Technik generierten 5-HT<sub>3A</sub>-ECFP- und 5-HT<sub>3A</sub>-EYFP-Rezeptorkonstrukte wurden nach transienter Expression in HEK293-Zellen mittels [<sup>3</sup>H]GR65630-Sättigungsbindungsstudien auf ihre Expression untersucht. Dabei zeigte sich, dass zwar die Affinität des Radioliganden im Vergleich zum unmarkierten 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor nicht verändert aber die Expression beider Rezeptorkonstrukte reduziert war, wobei die Einführung von ECFP zu einer drastischen Reduktion auf nur 10 % Membranexpression führte, währenddessen die Membranexpression von 5-HT<sub>3A</sub>-EYFP nur um ca. ein Drittel reduziert war. Dieser differentielle Effekt von ECFP und EYFP war insofern unerwartet, da sich die beiden Fluoreszenzproteine in nur neun AS unterscheiden. Ob die Einführung der Sequenz der Fluoreszenzproteine in andere Untereinheiten ligandgesteuerter Kanäle auch zu einer Verringerung der Membranexpression führt, wurde in den oben genannten Studien nicht untersucht, ist aber angesichts der Größe der Fluoreszenzproteine wahrscheinlich. Die Funktionalität der beiden generierten Rezeptorkonstrukte wurde durch Ca<sup>2+</sup>-Influxmessungen im Aequorin-Assay untersucht. Dabei zeigte sich, dass es trotz Membranexpression nur zu einem sehr geringen, kaum messbaren 5-HT-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Influx kam, was zeigt, dass die Eigenschaften der Rezeptorkanäle im Vergleich zum unmarkierten 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor verändert sind. Die Möglichkeit, dass die Funktionalität durch die Fluoreszenzmarkierung vollständig verlorengegangen ist, wurde durch elektrophysiologische Analysen ausgeschlossen, die gezeigt haben, dass 5-HT robuste Einwärtsströme mit einer ähnlichen Potenz wie am unmarkierten Rezeptor auslöst. Demzufolge könnte das fehlende Signal im Aequorin-Assay auf eine stark reduzierte Ca<sup>2+</sup>-Leitfähigkeit der fluoreszenzmarkierten Rezeptoren zurückzuführen sein. Da die Veränderungen in Expression und Funktion möglicherweise die Ergebnisse folgender Analysen negativ beeinträchtigen können, erfolgte zusätzlich die Konstruktion eines 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors, welcher an gleicher Position in der IZD ein nur zwölf AS-langes FIAsh-Bindemotiv trägt. Durch die Bindung des

Fluorophors FIAsh kommt es nach Anregung zu einem starken Fluoreszenzsignal mit den gleichen Emissionsmaxima wie bei EYFP (Adams et al., 2002; Martin et al., 2005). An zwei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wurde bereits die Kombination von FIAsh mit CFP für FRET-Analysen erfolgreich verwendet (Hoffmann et al., 2005). Das konstruierte 5-HT<sub>3A</sub>-FIAsh-Konstrukt wies zwar auch eine um 25 % reduzierte Membranexpression auf, führte aber im Gegensatz zu den ECFP/EYFP-markierten Rezeptoren im Aequorin-Assay zu einem konzentrationsabhängigen 5-HT-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Influx mit der gleichen Potenz von 5-HT wie am unmarkierten 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor. Demzufolge hatte die Einführung des kleinen FIAsh-Bindemotivs im Vergleich zu den großen GFP-Derivaten erwartungsgemäß einen geringeren Einfluss auf die Eigenschaften des gebildeten 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors, wie das ähnlich für den A<sub>2A</sub>-Adenosinrezeptor beschrieben wurde (Adams et al., 2002).

Mit diesen fluoreszenzmarkierten 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoruntereinheiten ist es nun möglich, beispielsweise die intrazelluläre Biogenese sowie das Membrantargeting des Rezeptors in lebenden Zellen in Echtzeit zu analysieren, wie das von Ilegems et al. (2004) beschrieben wurde. Darüberhinaus lässt sich mittels FRET-Messungen unter Verwendung von ECFP als Donor und EYFP bzw. FIAsh als Akzeptor die Rezeptorassemblierung *in vivo* untersuchen (Nashmi et al., 2003). Ein sehr interessanter Ansatz wäre die Analyse der Stöchiometrie der Untereinheiten in heteromeren 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren, die bisher nur für den 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptor bestimmt wurde (Barrera et al., 2005). Diese auch auf FRET-Messungen basierende Methode wurde bereits zur Aufklärung der Stöchiometrie verschiedener neuronaler nACh-Rezeptoren eingesetzt (Drenan et al., 2008). Allerdings wäre es in dem Fall notwendig, die anderen 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoruntereinheiten analog der 5-HT<sub>3A</sub>-Untereinheit mit einer Fluoreszenzmarkierung zu versehen. Des Weiteren können die fluoreszenzmarkierten Rezeptoren, wie oben erwähnt, zur Analyse der Interaktion zwischen dem 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor mit anderen *Cys-loop*-Kanälen mittels FRET-Messungen herangezogen werden, was z.B. kürzlich zum Nachweis der Interaktion zweier G-Protein-gekoppelter Rezeptoren führte (Gonzalez-Maeso et al., 2008).

### **3. Heterogenität der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren – Charakterisierung heteromerer 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren und natürlich vorkommender Varianten einzelner 5-HT<sub>3</sub>-Untereinheiten**

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war die Charakterisierung heteromerer 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren und natürlich vorkommender Varianten einzelner 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoruntereinheiten. Das Ziel dieser Untersuchungen bestand in der Aufklärung der Rolle der verschiedenen Untereinheiten bzw. Varianten in der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorfunktion und sollte demnach einen Beitrag zur Aufklärung der Rolle des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorsystems beispielsweise bei der Entstehung von Erkrankungen bzw. individuell unterschiedlich ausgeprägter Arzneimittel(neben)wirkungen liefern.

#### **3.1 Pharmakologische Eigenschaften transient transfizierter HEK293-Zellen, welche 5-HT<sub>3A</sub>- und jeweils eine der 5-HT<sub>3C,(D,E,Ea)</sub>-Untereinheiten koexprimieren**

Die grundlegende Charakterisierung heteromerer 5-HT<sub>3A/C,(D,E)</sub>-Rezeptoren erfolgte durch Sandra Combrink (Combrink, 2008) und wurde bereits publiziert (Niesler et al., 2007). Allerdings war im Hinblick auf die Verwendung von ss-DNA zur Angleichung der DNA-Mengen bei der Transfektion der Zellen mit der 5-HT<sub>3A</sub>-cDNA (= homopentamerer 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor als Kontrolle) eine Reevaluierung einzelner gewonnener Daten notwendig. In der vorliegenden Arbeit konnte nämlich sowohl in [<sup>3</sup>H]GR65630-Bindungsversuchen als auch Ca<sup>2+</sup>-Influx-Messungen gezeigt werden, dass ss-DNA, im Vergleich zur DNA des leeren Plasmidvektors, die Expression des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors stark inhibiert. Diese Ergebnisse widersprechen den Resultaten einer Studie, in welcher gezeigt werden konnte, dass ss-DNA die Transfektionseffizienz bestimmter Plasmide bei Elektroporation von CHO-Zellen erhöht (Chu et al., 1987). Demgegenüber zeigten Rizzo et al. (1983), dass die Transfektionseffizienz bei liposomal vermittelter Transfektion von CV-1-Zellen (Affenleberzelllinie) mit SV40-DNA durch ss-DNA konzentrationsabhängig vermindert wurde. Dies entspricht unseren Ergebnissen und liefert einen Hinweis darauf, dass die ss- und die Plasmid-DNA möglicherweise um die Adsorption an bzw. den Einschluss in die von uns für die Transfektion verwendeten kationischen Lipide konkurrieren und somit weniger Plasmid-DNA in die Zellen gelangt, ein Mechanismus, welcher bei der Elektroporation keine Rolle spielt.

Die Konsequenz daraus war, dass die zur Gewinnung der Ergebnisse verwendete 5-HT<sub>3A</sub>-Kontrolle zu geringe B<sub>max</sub>-Werte für die [<sup>3</sup>H]GR65630-Bindung und 5-HT-E<sub>max</sub>-Werte für den Ca<sup>2+</sup>-Influx lieferte, da die Zellen mit ss-DNA kotransfiziert wurden. Demzufolge wurden die entsprechenden B<sub>max</sub>- und E<sub>max</sub>-Werte für die heteromeren 5-HT<sub>3A/C,(D,E,Ea)</sub>-Rezeptoren zu hoch berechnet. Des Weiteren erfolgte die Kotransfektion der Zellen mit der 5-HT<sub>3A</sub>- und der 5-HT<sub>3C,(D,E,Ea)</sub>-cDNA im Verhältnis 1 : 1, wogegen für die Versuche dieser Arbeit standardmäßig ein Verhältnis von 1 : 4 eingesetzt wurde, um die vorwiegende Formation heteromerer Rezeptoren zu gewährleisten. Die Grundlage dafür lieferten Untersuchungen an anderen *Cys-loop*-Rezeptoren, welche zeigten, dass die Stöchiometrie des Rezeptorpentamers durch die Variation des Verhältnisses der Untereinheiten bei der Transfektion beeinflusst wird (Zwart und Vijverberg, 1998; Nelson et al., 2003).

Die von Niesler et al. (2007) beschriebenen Werte sind in Tabelle 15 den teilweise neu bestimmten Werten gegenübergestellt. Dabei wird deutlich, dass die 5-HT<sub>3C</sub>- und die 5-HT<sub>3Ea</sub>-Untereinheit die Expression der resultierenden heteromeren Rezeptorkomplexe stark reduzieren, währenddessen die 5-HT<sub>3E</sub>-Untereinheit keine Veränderung der Expression des heteromeren Rezeptors im Vergleich zum homopentameren 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor bewirkt. Auch die Koexpression der 5-HT<sub>3D</sub>-Untereinheit scheint keine Veränderung der Expression des heteromeren Rezeptors im Vergleich zum 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor zu bewirken (B<sub>max</sub> für 5-HT<sub>3A/D</sub> anhand der anderen Werte extrapoliert). Die 5-HT-E<sub>max</sub>-Werte entsprechen weitestgehend den B<sub>max</sub>-Werten (E<sub>max</sub> für 5-HT<sub>3A/C</sub> und 5-HT<sub>3A/D</sub> anhand der anderen Werte extrapoliert), so dass eine Veränderung der Kanaleigenschaften durch den Einbau der 5-HT<sub>3C,(D,E,Ea)</sub>-Untereinheiten unwahrscheinlich ist. Den eindeutigen Beweis können allerdings nur elektrophysiologische Experimente liefern, die momentan in der Abteilung „Experimentelle Anästhesiologie“ des Universitätsklinikums Bonn durchgeführt werden. Die Reduktion des 5-HT-induzierten Maximizeffektes am 5-HT<sub>3A/C</sub>-Rezeptor konnte bereits in einer früheren Studie mittels Ganzzelleableitungen an *Xenopus*-Oozyten gezeigt werden (Dubin et al., 2002).

	<b>B<sub>max</sub> (% der 5-HT<sub>3A</sub>-Kontrolle)</b>		<b>E<sub>max</sub> (% der 5-HT<sub>3A</sub>-Kontrolle)</b>	
	ss-DNA (1 : 1)	pcDNA3 (1 : 4)	ss-DNA (1 : 1)	pcDNA3 (1 : 4)
5-HT <sub>3A/C</sub>	96,6 ± 6,6	31,5 ± 5,1***	70,7 ± 10,6*	n.b.
5-HT <sub>3A/D</sub>	143,6 ± 10,1*	n.b.	145,8 ± 10,2**	n.b.
5-HT <sub>3A/E</sub>	147,4 ± 11,3*	88,4 ± 8,3	144,3 ± 22,8**	115,1 ± 5,5
5-HT <sub>3A/Ea</sub>	81 ± 4,2**	12,0 ± 1,5***	43,9 ± 5,6**	20,9 ± 4,0***

**Tabelle 15: B<sub>max</sub>-Werte für die [<sup>3</sup>H]GR65630-Bindung bzw. 5-HT-E<sub>max</sub>-Werte für den Ca<sup>2+</sup>-Influx bei heterolog in HEK293-Zellen exprimierten 5-HT<sub>3A/C,(D,E,Ea)</sub>-Rezeptoren**

Die Daten der jeweils linken Spalte (ss-DNA 1 : 1) stammen aus Niesler et al. (2007) und wurden auf die zu niedrig bestimmten Werte des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors (aufgrund Kotransfektion mit ss-DNA) prozentualisiert. Die 5-HT<sub>3A</sub>- und 5-HT<sub>3C,(D,E,Ea)</sub>-cDNAs wurden im Verhältnis 1 : 1 transfiziert. Die Daten der jeweils rechten Spalte (pcDNA3 1 : 4) stammen aus Versuchen dieser Arbeit und wurden auf die 5-HT<sub>3A</sub>-Kontrolle (Kotransfektion mit leerem Vektor, pcDNA3) prozentualisiert. Die 5-HT<sub>3A</sub>- und 5-HT<sub>3C,(D,E,Ea)</sub>-cDNAs wurden im Verhältnis 1 : 4 für die Transfektion verwendet. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur 5-HT<sub>3A</sub>-Kontrolle (*one-way ANOVA* gefolgt von Dunnett's post-hoc Test) sind gekennzeichnet ( $p \leq 0,05^*$ ,  $p \leq 0,01^{**}$ ,  $p \leq 0,001^{***}$ ).

Um den Beitrag der 5-HT<sub>3C,D,E,Ea</sub>-Untereinheiten bzw. auch der 5-HT<sub>3B</sub>-Untereinheit zur Bindung von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorliganden aufzuklären, erfolgten Bindungsversuche mit dem Radioliganden [<sup>3</sup>H]GR65630 an HEK293-Zellen, welche die 5-HT<sub>3A</sub>- und jeweils eine der 5-HT<sub>3B,(C,D,E,Ea)</sub>-Untereinheiten koexprimierten. Bekannt ist, dass die Ligandbindungsstelle des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors im N-Terminus zwischen zwei benachbarten Untereinheiten liegt und durch die Annäherung dreier Schleifen (A - C) der „Hauptuntereinheit“ und dreier Schleifen einer benachbarten „komplementären“ Untereinheit (D - F) gebildet wird (Reeves et al., 2003; Thompson et al., 2005) (siehe Abbildung 2, A.2.2.2). Da der Austausch von Tryptophan in Position 183 der murinen 5-HT<sub>3A</sub>-Untereinheit, lokalisiert in Schleife B, gegen Serin zum vollständigen Verlust der Ligandbindung bei erhaltener Oberflächenexpression führte (Spier und Lummis, 2000), wurde die entsprechende W178S-Mutante der humanen 5-HT<sub>3A</sub>-Untereinheit genutzt, um die 5-HT<sub>3B,C,D,E,Ea</sub>-Untereinheiten an die Zelloberfläche zu transportieren, wie das bereits von Boyd et al. (2002) für die 5-HT<sub>3B</sub>-Untereinheit gezeigt wurde. Die Oberflächenexpression der 5-HT<sub>3A</sub> W178S- und der koexprimierten 5-HT<sub>3B,(C,D,E,Ea)</sub>-Untereinheiten konnte erwartungsgemäß mittels Immunfluoreszenzexperimenten bestätigt werden. Die fehlende spezifische [<sup>3</sup>H]GR65630-Bindung

der mit der 5-HT<sub>3A</sub> W178S- und jeweils einer der anderen Untereinheiten-cDNAs transfizierten Zellen ist ein Beleg dafür, dass die 5-HT<sub>3B,C,D,E,Ea</sub>-Rezeptoruntereinheiten nicht als „Hauptuntereinheit“ an der Ligandbindung beteiligt sind. Dieses Resultat entspricht der Tatsache, dass diese Untereinheiten, im Gegensatz zur 5-HT<sub>3A</sub>-Untereinheit, kein Tryptophan in Position 178 (bezogen auf die 5-HT<sub>3A</sub>-Sequenz) der Schleife B aufweisen, welches absolut essenziell für die Ligandbindung ist, da es über eine Kationen- $\pi$ -Bindung mit dem primären Amin von 5-HT interagiert (Spier und Lummis, 2000; Beene et al., 2002). Somit spielen die 5-HT<sub>3B,C,D,E,Ea</sub>-Untereinheiten möglicherweise als „komplementäre“ Untereinheiten eine Rolle bei der Ligandbindung, da beispielsweise bestimmte für die Bindung essenzielle AS der Schleifen D und E bei allen 5-HT<sub>3</sub>-Untereinheiten außer der 5-HT<sub>3D</sub>-Untereinheit konserviert sind [W85 (Spier und Lummis, 2000), G143 (Venkataraman et al., 2002)]. Ein Anteil der 5-HT<sub>3D</sub>-Untereinheit an der Bindung ist insofern auszuschließen, da ihr fast der komplette N-terminale Bereich fehlt (siehe F.2.1). Demgegenüber sind andere AS der Schleifen D - F wie z.B. R87, V145, Y153, die eine wesentliche Rolle bei der Ligandbindung spielen (Yan et al., 1999; Venkataraman et al., 2002; Price und Lummis, 2004), nicht bei allen Untereinheiten konserviert, so dass eigentlich eine Veränderung der pharmakologischen Eigenschaften heteromerer 5-HT<sub>3A/B(C,D,E,Ea)</sub>-Rezeptoren im Vergleich zum 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor zu erwarten wäre. Da dies nur auf den 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptor bedingt (siehe unten), nicht aber auf 5-HT<sub>3A/C(D,E,Ea)</sub>-Rezeptoren (Niesler et al., 2007) zutrifft, wäre auch eine ausschließliche Bindung von Liganden an der Grenzfläche zweier benachbarter 5-HT<sub>3A</sub>-Untereinheiten denkbar. Nach dieser Hypothese wäre allerdings die für den 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptor bestimmte Stöchiometrie der Untereinheiten (B-B-A-B-A) (Barrera et al., 2005) nicht möglich, da es in der Anordnung keine A-A-Bindungsstelle gibt.

### **3.2 Pharmakologische Eigenschaften transient transfizierter HEK293-Zellen, welche 5-HT<sub>3A</sub>- und 5-HT<sub>3B</sub>-Untereinheiten koexprimieren**

Zur Untersuchung der Eigenschaften heteromerer 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptoren wurden HEK293-Zellen mit den cDNAs beider Untereinheiten transient kotransfiziert (HEK293 5-HT<sub>3A/B</sub>). Parallel dazu erfolgte die Durchführung aller Experimente mit Zellen, welche nur den 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor exprimieren (HEK293 5-HT<sub>3A</sub>). Diese Versuche lieferten bis dato unbekannte Aspekte der pharmakologischen

Charakteristika von HEK293-Zellen, die 5-HT<sub>3A</sub>- und 5-HT<sub>3B</sub>-Untereinheiten koexprimieren.

Wie auch in einer früheren Studie von Brady et al. (2001), lieferten Sättigungsbindungsstudien die gleichen  $K_D$ -Werte für den Radioliganden an HEK293 5-HT<sub>3A</sub>- und HEK293 5-HT<sub>3A/B</sub>-Zellen. Allerdings führte die Koexpression der 5-HT<sub>3B</sub>-Untereinheit zu einer Reduktion der  $B_{max}$  auf 17 % der  $B_{max}$  am homopentameren 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor, was bisher nicht bekannt war, da in früheren Studien nur stabil transfizierte Zellen verwendet wurden (Brady et al., 2001). Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, dass der heteromere 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptor nicht so effizient in die Plasmamembran von HEK293-Zellen eingebaut wird bzw. die Assemblierung der Untereinheiten weniger effizient ist als beim homopentameren 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor. Die Maximalantwort auf 5-HT ( $E_{max}$ ) an HEK293 5-HT<sub>3A/B</sub>-Zellen im Aequorin-Assay war in gleichem Maße wie die  $B_{max}$  reduziert, so dass die unterschiedlichen Kanaleigenschaften der heteromeren 5-HT<sub>3A/B</sub>- und homopentameren 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren maskiert wurden. Die Ursache dafür liegt höchstwahrscheinlich in der größeren Einzelkanalleitfähigkeit aber geringeren  $Ca^{2+}$ -Permeabilität des heteromeren 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptors im Vergleich zum 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor (Davies et al., 1999), welche sich im  $Ca^{2+}$ -Influx-Assay ausglich.

Die Konzentrations-Wirkungskurve für den Agonisten 5-HT an HEK293 5-HT<sub>3A/B</sub>-Zellen zeigte einen biphasischen Verlauf und konnte am besten an ein Modell mit zwei Bindungsstellen angepasst werden. Dieses Ergebnis war neu, da in früheren Studien (u.a. Ergebnisse von uns) die Konzentrations-Wirkungskurven einen monophasischen Verlauf zeigten. Diese Diskrepanz kann dadurch bedingt sein, dass in diesen Studien die Kurven durch eine zu geringe Zahl an Messpunkten beschrieben wurden. Bei kritischer Betrachtung einiger der Kurven ist nämlich durchaus eine Kompatibilität mit einem biphasischen Verlauf erkennbar [z.B. in Abb. 4a von Dubin et al. (1999), Abb. 4b von Hapfelmeier et al. (2003) sowie Abb. 3 von Walstab et al. (2007)]. Die Erklärung für den biphasischen Kurvenverlauf ist eine Koexistenz zweier Rezeptorpopulationen, an welchen 5-HT mit unterschiedlichen Potenzen wirksam ist. Das bedeutet, dass entweder homopentamere 5-HT<sub>3A</sub>- neben heteromeren 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptoren in den HEK293-Zellen exprimiert werden oder dass es zwei verschiedene 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptorstöchiometrien gibt, die nebeneinander vorkommen. Da der 5-HT- $EC_{50}$ -Wert der „hochpotenten“ Fraktion in der Nähe des  $EC_{50}$ -Wertes von 5-HT am homopentameren 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor lag, war die erstgenannte Möglichkeit am



wahrscheinlichsten. Somit würde die „hochpotente“ Fraktion der Population homopentamerer 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren entsprechen, währenddessen die „niedrigpotente“ Fraktion den Anteil heteromerer 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptoren repräsentieren würde. An nACh  $\alpha$ 4 $\beta$ 2-Rezeptoren zeigen Konzentrations-Wirkungskurven für ACh ebenfalls einen biphasischen Verlauf; in diesem Fall ist jedoch die Koexistenz zweier verschiedener Rezeptor-Stöchiometrien die einzig mögliche Ursache, da keine der beiden Untereinheiten homopentamere Rezeptoren ausbilden kann (Buisson und Bertrand, 2001; Moroni et al., 2006). Beim 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor ist die Situation komplizierter, da die 5-HT<sub>3A</sub>-Untereinheit homopentamere Rezeptoren bilden kann und dementsprechend auch wird, wenn eine Koexpression mit der 5-HT<sub>3B</sub>-Untereinheit erfolgt. Mit dem Ziel, diese Hypothese zu belegen, wurden verschiedene Experimente durchgeführt. Zum ersten lieferten Zellen, die mit den 5-HT<sub>3A</sub>- und 5-HT<sub>3B</sub>-cDNAs im Verhältnis 4 : 1 kotransfiziert wurden, um die bevorzugte Bildung homopentamerer 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren zu forcieren, 5-HT-Konzentrations-Wirkungskurven mit einer signifikant erhöhten Fraktion H, wohingegen die 5-HT-Potenzen keine Unterschiede an HEK293 5-HT<sub>3A/B</sub> 1 : 4- und HEK293 5-HT<sub>3A/B</sub> 4 : 1-Zellen zeigten. Dies unterstützt die Theorie der Koexistenz heteromerer 5-HT<sub>3A/B</sub>- und homopentamerer 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren in HEK293-Zellen. Einen weiteren Beleg lieferten Experimente mit humanem RIC-3, einem Chaperon, welches die Expression neuronaler nACh- und 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren beeinflusst (siehe A.3). RIC-3 führte nach Koexpression mit 5-HT<sub>3A/B</sub> (1 : 4) in HEK293-Zellen zu einer signifikanten Erhöhung der Fraktion H, was einer Erhöhung des Anteils homopentamerer 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren gleichkäme. Dieses Resultat ist in Einklang mit den Ergebnissen von Cheng et al. (2007), die gezeigt haben, dass RIC-3 die Bildung homopentamerer 5-HT<sub>3A</sub>- auf Kosten der heteromeren 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptoren fördert. Ein weiterer Beleg für unsere Theorie ergab sich aus der Auswertung der unterschiedlichen Kanalkinetiken der 5-HT<sub>3A</sub>- und 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptoren. Aus früheren Studien ist bekannt, dass 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptoren sich durch schnellere Aktivierungs- und Desensibilisierungskinetiken im Vergleich zu 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren auszeichnen (Dubin et al., 1999; Hapfelmeier et al., 2003). Die schnellere Kinetik der 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptoren war auch in unseren Ca<sup>2+</sup>-Influx-Experimenten sichtbar. Bei HEK293 5-HT<sub>3A/B</sub> 4 : 1-Zellen waren die t<sub>0-100%</sub>-Werte für kleine 5-HT-Konzentrationen, welche vorwiegend zur Aktivierung des „hochpotenten“ Anteils führen, nicht signifikant verschieden von den t<sub>0-100%</sub>-Werten am homopentameren 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor. Demgegenüber war die t<sub>0-100%</sub> bei

Verwendung der  $E_{\max}$ -auslösenden 5-HT-Konzentration signifikant kürzer verglichen mit der am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor, was dementsprechend die schnelle Aktivierungskinetik des 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptors widerspiegelt.

Zusammenfassend kann daher gesagt werden, dass die Koexistenz homopentamerer 5-HT<sub>3A</sub>- und heteromerer 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptoren in transfizierten HEK293-Zellen sehr wahrscheinlich ist. Die sich daraus ergebende Konsequenz ist eine erschwerte Charakterisierung heteromerer 5-HT<sub>3A/B</sub>- und dementsprechend auch anderer heteromerer 5-HT<sub>3A/X</sub>-Rezeptoren, da sie nicht eindeutig von den homopentameren 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren separiert werden können. Eine Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen, besteht in der Generierung konkatamerer Konstrukte, in welchen die entsprechende Anordnung der Untereinheiten B-B-A-B-A, die für den 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptor bestimmt wurde (Barrera et al., 2005), festgelegt ist.

Ob in nativen Geweben auch 5-HT<sub>3A</sub>- neben 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptoren exprimiert werden, muss in zukünftigen Studien geklärt werden. Des Weiteren wurden Unterschiede in der Potenz des Agonisten 5-HT an 5-HT<sub>3A</sub>- und 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptoren bis jetzt unterschätzt. Würde man die Konzentrations-Wirkungskurve an ein Modell mit einer Bindungsstelle anpassen, hätte 5-HT eine zwölfmal geringere Potenz an 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptoren im Vergleich zu 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren, wie das schon in anderen Studien gezeigt wurde (Hapfelmeier et al., 2003; Stevens et al., 2005). Demgegenüber ergab das den Messpunkten besser angepasste biphasische Modell eine 50-fach geringere 5-HT-Potenz an 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptoren.

Im Gegensatz zum Agonisten 5-HT war die Inhibierungspotenz der beiden 5-HT<sub>3</sub>-Antagonisten Azasetron und Ondansetron ähnlich an 5-HT<sub>3A/B</sub>- und 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren, was schon von Brady et al. (2001) gezeigt wurde und was für die  $K_D$ -Werte des Radioliganden [<sup>3</sup>H]GR65630, welcher analog der beiden genannten Verbindungen der Substanzklasse der Setrone angehört, bereits ermittelt wurde.

### **3.3 Charakterisierung natürlich vorkommender Varianten einzelner 5-HT<sub>3</sub>-Untereinheiten und einer Spleißvariante**

#### **3.3.1 Eigenschaften der A33T- und R344H-Variante des homopentameren 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei seltene 5-HT<sub>3A</sub>-Varianten untersucht (siehe Tabelle 16). Die R344H-Variante wurde bis dato sogar nur bei einem Schizophreniepatienten detektiert (Niesler et al., 2001b). Ein Teil der erzielten Ergebnisse

wurde am Ende der Durchführung der Versuche bereits von einer anderen Arbeitsgruppe veröffentlicht (Krzywkowski et al., 2007).

Da die A33T-Mutation im extrazellulären N-terminalen Bereich lokalisiert ist (siehe Abbildung 53 und F.2.1), welcher die Bindungsstelle für orthosterische Rezeptorliganden beinhaltet, schien eine im Vergleich zum WT-Rezeptor veränderte Affinität / Potenz der Liganden nicht unwahrscheinlich. Allerdings zeigte sich im  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx-Assay an transient transfizierten HEK293-Zellen kein Unterschied in der Potenz der beiden Agonisten 5-HT und mCPBG, des Partialagonisten Dopamin bzw. selektiver 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptorantagonisten (Alo-, Aza-, Cilan-, Dola, Ondan-, Palono- und Tropicsetron) zwischen WT und A33T-Variante, was Krzywkowski et al. (2007) für 5-HT, Ondansetron und Tropicsetron bzw. Clozapin auch fanden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die AS in Position 33 der 5-HT<sub>3A</sub>-Untereinheit nicht bei der Ligandbindung involviert ist. Demgegenüber ist die R344H-Mutation in der IZD zwischen TM3 und TM4 lokalisiert (siehe Abbildung 53 und F.2.1), welche bei der Bindung orthosterischer Liganden keine Rolle spielt. Das bestätigte sich in früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, die gezeigt hatten, dass die Affinität und die Potenz verschiedener Agonisten und Antagonisten sich nicht zwischen WT und R344H-Variante unterscheiden (Kostanian, 2005; Combrink, 2008). Im Hinblick auf die Tatsache, dass Cannabinoide den 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor allosterisch inhibieren (Barann et al., 2002) und die Bindungsstelle nicht am extrazellulären N-Terminus lokalisiert ist (Oz et al., 2004) sondern höchstwahrscheinlich im Bereich der TM oder der großen IZD (postuliert von Barann et al., 2002) wurde die Inhibierungspotenz des synthetischen CB<sub>1</sub>/CB<sub>2</sub>-Rezeptoragonisten WIN 55,212-2 auf WT und R344H-Variante untersucht. Da sich kein signifikanter Unterschied ergab, ist davon auszugehen, dass die AS in Position 344 der IZD keine Rolle bei der Bindung von Cannabinoiden am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor spielt. Eine Rolle der IZD als Teil der allosterischen Bindungsstelle für Cannabinoide erscheint aber weiterhin nicht unwahrscheinlich, da diese aufgrund ihrer Lipophilie die Zellmembran gut permeieren können.

Im Gegensatz zu den unveränderten Affinitäten / Potenzen der getesteten Rezeptorliganden an den Varianten im Vergleich zum WT-Rezeptor, ergab sich aus [<sup>3</sup>H]GR65630-Sättigungsbindungsexperimenten an Membranen transient transfizierter HEK293-Zellen eine signifikant reduzierte Membranexpression beider Rezeptorvarianten verglichen mit dem WT-Rezeptor. Die auf ca. 27 % reduzierte Membranexpression des 5-HT<sub>3A</sub> A33T-Rezeptors spiegelte sich auch in einer

ungefähr entsprechenden Erniedrigung des 5-HT-induzierten  $E_{\max}$  im  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx auf ca. 15 % des  $E_{\max}$  an 5-HT<sub>3A</sub> wider. Demnach ist davon auszugehen, dass sich die Kanaleigenschaften der A33T-Variante nicht von denen des WT-Rezeptors unterscheiden, was allerdings nur mittels elektrophysiologischer Messungen eindeutig geklärt werden kann. Im Gegensatz dazu war der 5-HT-induzierte  $E_{\max}$  am 5-HT<sub>3A</sub> R344H-Rezeptor im  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx, trotz verringerter Membranexpression um ca. 50 % (Kostanian, 2005), im Vergleich zum WT-Rezeptor nicht reduziert. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch von Krzywkowski et al. (2007) publiziert. Die Diskrepanz bezüglich  $B_{\max}$  und  $E_{\max}$  an 5-HT<sub>3A</sub> R344H kann verschiedene Ursachen haben.

Es ist beispielsweise eine unterschiedliche Verteilung der intrazellulären assemblierten und der an der Zellmembran lokalisierten Rezeptoren zwischen Variante und WT denkbar. So fanden u.a. Keller et al. (2001) eine Region in der IZD der  $\alpha$ -Untereinheit des nACh-Rezeptors, welche eine wesentliche Rolle beim *Trafficking* des Rezeptors spielt. Ilegems et al. (2004) konnten zeigen, dass nach Permeabilisierung 5-HT<sub>3A</sub>-exprimierender Zellen der Anteil des spezifisch gebundenen Radioliganden höher lag als nach Bindung an intakten Zellen. Daraus ist abzuleiten, dass intrazellulär bereits assemblierte Rezeptoren in der Lage sind, Rezeptorliganden zu binden. Aufgrund dieser Tatsache führten wir analoge Experimente mit der R344H-Variante im Vergleich zum WT durch, in dem wir die spezifische [<sup>3</sup>H]GR65630-Bindung an intakten und permeabilisierten Zellen bestimmten. Dabei ergab sich für beide Rezeptoren ein Anteil von ca. 70 % der Bindungsstellen an der Zellmembran transient transfizierter HEK293-Zellen, was dem von Ilegems et al. (2004) bestimmten Anteil von 60 % ungefähr entspricht. Demzufolge ist ein Einfluss der R344H-Mutation auf den Transport / Einbau des Rezeptors zur / in die Zellmembran auszuschließen, was analog auch von Krzywkowski et al. (2007) für die R344H- sowie auch die A33T-Variante gefunden wurde.

Die geringere Membranexpression der beiden Varianten ist nicht auf eine reduzierte Proteinexpression der Rezeptoruntereinheiten zurückzuführen, was mittels immunchemischer Analysen von Krzywkowski et al. (2007) nachgewiesen wurde. Demnach haben die beiden Austausch unter Umständen einen Einfluss auf die Koassemblierung der Untereinheiten bzw. die Effizienz der Rezeptorfaltung, was für bestimmte Bereiche des N-Terminus von GABA<sub>A</sub>-Untereinheiten (Hales et

al., 2005) bzw. der IZD nACh-Rezeptoruntereinheiten (Yu und Hall, 1994; Quiram et al., 1999) bereits gezeigt wurde.

Kürzlich identifizierten Sun et al. (2008) eine Region in der IZD der murinen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoruntereinheit, welche essenziell für die indirekte Modulation des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors durch die Proteinkinase C (PKC) ist. Dabei führt eine Stimulation der PKC über die Beeinflussung des Aktinzytoskelettes zur Erhöhung der Oberflächenexpression des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors (Sun et al., 2003). Da die Aminosäure 344 in direkter Nachbarschaft zu dieser Region liegt, wäre es vorstellbar, dass das Ausmaß der PKC-Modulation durch die R344H-Mutation verändert ist und damit der Rezeptor eine verringerte Oberflächenexpression im Vergleich zum WT-Rezeptor aufweist.

Die Ursache der Diskrepanz zwischen  $B_{max}$  und  $E_{max}$  des 5-HT<sub>3A</sub> R344H-Rezeptors könnte auch in veränderten Eigenschaften des Rezeptorkanals im Vergleich zum WT-Rezeptor begründet liegen. So wurde in früheren Studien bereits der Einfluss der großen IZD auf Einzelkanalleitfähigkeit, Ca<sup>2+</sup>-Permeabilität und Desensitisierung des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors bzw. teilweise auch des nACh-Rezeptors gezeigt (Kelley et al., 2003; Hales et al., 2006; Hu et al., 2006; Livesey et al., 2008; Kracun et al., 2008). Mit dem Ziel, diese Frage zu klären, erfolgten elektrophysiologische Untersuchungen an „excised outside-out“ Patches transfizierter HEK293-Zellen, welche eine Tendenz zu einer langsameren Desensitisierung des 5-HT<sub>3A</sub> R344H-Rezeptors nach 5-HT (30 µM)-Applikation im Vergleich zum WT-Rezeptor ergaben. Da der 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor eine nicht direkt messbare Einzelkanalleitfähigkeit im Subpico Siemensbereich aufweist (Brown et al., 1998; Mochizuki et al., 1999), erfolgten Einzelkanalmessungen an der artifiziellen 5-HT<sub>3A</sub> QDA-Mutante, welche aufgrund des Austausches dreier Arginine im sogenannten *MA-stretch* der IZD gegen die entsprechenden AS der 5-HT<sub>3B</sub>-Untereinheit (R432Q, R436D, R440A) eine ca. 30-fach größere Einzelkanalleitfähigkeit verglichen mit 5-HT<sub>3A</sub> aufweist (Kelley et al., 2003). Dabei zeigte sich für den 5-HT<sub>3A</sub> QDA R344H-Rezeptor eine signifikant erhöhte mittlere Kanalöffnungsdauer bei unveränderter Einzelkanalstromamplitude im Vergleich zum 5-HT<sub>3A</sub> QDA-Rezeptor. Demzufolge kann die tendenziell langsamere Desensitisierung der R344H-Variante durch die längere Kanalöffnungsdauer erklärt werden. Dies könnte wiederum auch eine Erklärung für den im Vergleich zum WT-Rezeptor unveränderten maximalen 5-HT-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Influx trotz erniedrigter

Membranexpression sein. Allerdings ist die veränderte Kanalöffnungsdauer womöglich nicht allein auf den R344H-Austausch zurückzuführen, da die drei zusätzlich ausgetauschten Arginine unter Umständen einen Einfluss auf die Ergebnisse haben. Trotzdem ist nachgewiesen worden, dass verschiedene Arginine des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors eine wesentliche Rolle für die Funktion des Rezeptors spielen (Hu et al., 2003 und 2006; Hu und Peoples, 2007), so dass ein Einfluss von Arginin 344 auf die Kanaleigenschaften nicht unwahrscheinlich ist. Mittels Austausch des Arginins in Position 440 innerhalb des *MA-stretches* gegen andere AS konnten Hu et al. (2006) zeigen, dass die Desensitisierungsgeschwindigkeit mit sinkender Polarität der AS an dieser Position abnimmt, währenddessen sich die Einzelkanalleitfähigkeit nur in Abhängigkeit des molekularen Volumens der AS verändert. Unsere Resultate können direkt auf diese Erkenntnisse übertragen werden, da Histidin im Vergleich zu Arginin das gleiche molekulare Volumen aufweist aber viel hydrophober ist. Allerdings kann eine erhöhte Ca<sup>2+</sup>-Permeabilität des 5-HT<sub>3A</sub> R344H-Rezeptors im Vergleich zum WT-Rezeptors als Ursache der Diskrepanz zwischen B<sub>max</sub> und E<sub>max</sub> nicht ausgeschlossen werden, da beispielsweise der 5-HT<sub>3A</sub> QDA-Rezeptor auch eine erhöhte Ca<sup>2+</sup>-Permeabilität im Vergleich zum 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor aufweist (Peters et al., 2005; Livesey et al., 2008). Bisher konnte für die A33T-Variante keine Assoziation zu einer Erkrankung gefunden werden. Dies könnte allerdings auch durch die Seltenheit dieser Variante bedingt sein, was zur Folge hat, dass die statistische Power der durchgeführten Assoziationsstudien nicht ausreichend groß war, um eine mögliche Assoziation zu detektieren (siehe Tabelle 16).

### **3.3.2 Einfluss der Spleißisoform 5-HT<sub>3Ea</sub> und natürlich vorkommender Varianten der 5-HT<sub>3B,C,E(Ea)</sub>-Untereinheiten auf die Eigenschaften heteromerer 5-HT<sub>3A/X</sub>-Rezeptoren**

Neben der Untersuchung der beiden Varianten der 5-HT<sub>3A</sub>-Untereinheit erfolgte die Charakterisierung weiterer Varianten anderer 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoruntereinheiten, die einen Austausch einer einzelnen AS des entsprechenden Proteins beinhalten. Das sind zum einen die 5-HT<sub>3B</sub>-Varianten Y129S, S156R, V183I und A223T, die 5-HT<sub>3C</sub>-Varianten 5-HT<sub>3C</sub> 163K und 5-HT<sub>3C</sub> 163N und die 5-HT<sub>3E</sub>-Varianten 5-HT<sub>3E</sub> 86A und 5-HT<sub>3E</sub> 86T. Des Weiteren wurde zusätzlich die Spleißisoform 5-HT<sub>3Ea</sub> untersucht (86A- und 86T-Variante, Nummerierung bezogen auf 5-HT<sub>3E</sub>), welche analog der 5-HT<sub>3E</sub>-Untereinheit exklusiv im GI-Trakt vorkommt (Niesler et

al., 2003; Niesler et al., 2007) und die sich durch eine alternative Signalsequenz von 5-HT<sub>3E</sub> unterscheidet (siehe F.2.1). Die genannten Varianten unterscheiden sich stark hinsichtlich ihrer Häufigkeit. Die 5-HT<sub>3B</sub>-Varianten Y129S und V183I, die 5-HT<sub>3C</sub> N163K- und die 5-HT<sub>3E/Ea</sub> T86A-Variante kann man als echte Polymorphismen bezeichnen, da sie eine Häufigkeit von > 1 % in der Population aufweisen (siehe Tabelle 16). Die Sequenzen der zuerst klonierten und damit auch zuerst charakterisierten Untereinheiten entsprechen dabei den jeweils selteneren Varianten 5-HT<sub>3C</sub> 163K und 5-HT<sub>3E</sub> 86A (Fasching et al., 2008; Niesler, unpublizierte Daten); aus diesem Grund wurde die Bezeichnung 163K/N bzw. 86A/T gewählt. Die S156R- und die A223T-Variante der 5-HT<sub>3B</sub>-Untereinheit kommen dagegen nur mit einer Häufigkeit von < 1 % vor.

Die pharmakologische Untersuchung der Eigenschaften dieser Varianten bzw. der 5-HT<sub>3Ea</sub>-Isoform erfolgte nach transienter Koexpression der entsprechenden Untereinheiten mit der 5-HT<sub>3A</sub>-Untereinheit in HEK293-Zellen. Die Tatsache, dass homopentamere 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren neben den jeweiligen heteromeren Rezeptoren koexprimiert werden, was für 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptoren gezeigt wurde, erschwert allerdings die Bestimmung der Eigenschaften heteromerer 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren (siehe D.3.2).

Die untersuchten AS-Austausche sind im N-terminalen Bereich der entsprechenden 5-HT<sub>3</sub>-Untereinheiten lokalisiert, der Region, welche die Ligandbindungsstelle beinhaltet (siehe Abbildung 53 und F.2.1). Falls die 5-HT<sub>3B,C,E,Ea</sub>-Untereinheiten als „komplementäre“ Untereinheiten an der Bindung orthosterischer Liganden beteiligt sind (siehe D.3.1), wäre eine Veränderung der Affinitäten und Potenzen von Rezeptorliganden durch die AS-Austausche denkbar. Dies bestätigte sich allerdings nicht. So wiesen der Radioligand [<sup>3</sup>H]GR65630 die gleiche Affinität und der Agonist 5-HT bzw. der Antagonist Ondansetron die gleiche Potenz an allen getesteten heteromeren Rezeptoren auf. In Ergänzung dazu wurden an heteromeren 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptoren der Antagonist Azasetron, an 5-HT<sub>3A/C</sub>-Rezeptoren der Antagonist Palonosetron und an 5-HT<sub>3A/E,(Ea)</sub> 86A/T-Rezeptoren der selektive 5-HT<sub>3</sub>-Agonist mCPBG bzw. sechs weitere selektive 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten (Alo-, Aza-, Cilan-, Dola-, Palono- und Tropisetron), welche therapeutisch bedeutsam sind, getestet. Neben den zur Therapie des CINV eingesetzten Setronen, wurden an heteromeren Rezeptoren mit den exklusiv im

GI-Trakt exprimierten 5-HT<sub>3E/Ea</sub>-Untereinheiten zusätzlich die zur Therapie des Reizdarmsyndroms entwickelten Substanzen Cilansetron und Alosetron getestet. Es stellte sich allerdings keine bevorzugte Wirkung dieser Substanzen an 5-HT<sub>3A/E,(Ea)</sub>-Rezeptoren heraus. Alle Substanzen zeigten an den untersuchten Rezeptoren die gleiche Potenz im funktionellen Ca<sup>2+</sup>-Influx-Assay. Auch im Vergleich zum homopentameren 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in den Potenzen der Substanzen an den heteromeren 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren, was für vier der Liganden bereits in einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe an heteromeren 5-HT<sub>3A/C,(D,E)</sub>-Rezeptoren gezeigt wurde (Combrink, 2008; Niesler et al., 2007).

Damit wurden erstmals nahezu alle verfügbaren Setrone in einem Versuchsansatz funktionell an 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren untersucht, was einen direkten Vergleich ihrer Inhibierungspotenzen erlaubt. Es zeigte sich, dass Alo-, Aza-, Cilan-, Ondan-, Palono- und Tropisetron vergleichbare Potenzen aufwiesen, währenddessen die Inhibierungspotenz von Dolasetron ca. zehnfach niedriger war. Demnach sind die vermeintlichen Unterschiede der Potenzen dieser Substanzen (Thompson und Lummis, 2007) wohl auf unterschiedliche Untersuchungsmethoden und -materialien (z.B. Zellen, Gewebe) zurückzuführen. Es konnte auch nicht die von Wong et al. (1995) beschriebene, höhere Affinität des neueren Antagonisten Palonosetron im Vergleich zu den anderen Substanzen am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor bestätigt werden. Anhand des von uns durchgeführten Ca<sup>2+</sup>-Influx-Assays ist allerdings keine Aussage über die Art der antagonistischen Wirkung der verwendeten Setrone am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor möglich. Daher besteht trotz der nahezu gleichen Inhibierungspotenzen aller Setrone an den untersuchten Rezeptoren die Möglichkeit unterschiedlicher Wirkmechanismen einzelner Substanzen an verschiedenen 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren, welche u.a. die Dauer des Effekts *in vivo* mitbestimmen. So ist beispielsweise nachgewiesen worden, dass Ondansetron und Dolasetron als kompetitive Antagonisten agieren, währenddessen Tropisetron und Palonosetron als sogenannte „unüberwindbare“ Antagonisten anzusehen sind (Upward et al., 1990; Elliott et al., 1990; Boeijinga et al., 1992; Newberry et al., 1993; Wong et al., 1995), so dass auch eine unterschiedliche Wirkung dieser Substanzen an den verschiedenen 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren vorstellbar wäre.

Der fehlende Unterschied der Potenz der getesteten Liganden an den untersuchten 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren scheint die Theorie zu bekräftigen, dass die Bindung



orthosterischer Liganden nur zwischen zwei benachbarten 5-HT<sub>3A</sub>-Untereinheiten erfolgen kann (siehe D.3.1). Allerdings ist der mögliche Einfluss der AS-Austausche bzw. der Spleißisoform auf die modulierende Wirkung allosterischer Liganden (z.B. Cannabinoide, Anästhetika, n-Alkohole) an den untersuchten 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren nicht ausgeschlossen. Für den heteromeren 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptor hat sich beispielsweise auch gezeigt, dass die Verstärkung des Kanal-Gatings durch einige Anästhetika (Halothan, Chloroform) und kurzkettige n-Alkohole im Vergleich zu der Wirkung an homopentameren 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren stark abgeschwächt ist (Solt et al., 2005; Rüscher et al., 2007).

Da kürzlich der Nachweis erfolgte, dass es im enterischen Nervensystem neben intrinsischen serotoninergen Neuronen (Gershon, 2000) auch intrinsische dopaminerge Neurone gibt und demnach Dopamin auch als enterischer Neurotransmitter angesehen werden kann (Li et al., 2004), wurde der Effekt dieser Substanz auf heteromere 5-HT<sub>3A/E,(Ea)</sub> 86A/T-Rezeptoren im Vergleich zu dem am homopentameren 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor untersucht. Da die 5-HT<sub>3E,Ea</sub>-Untereinheiten exklusiv im GI-Trakt exprimiert werden und somit vielleicht bedeutsam in der Pathogenese gastrointestinaler Erkrankungen wie dem Reizdarmsyndrom sind, sollten bevorzugt endogene Substanzen, welche im GI-Trakt vorkommen, getestet werden. Doch auch der Partialagonist Dopamin zeigte an allen getesteten Rezeptoren die gleiche Potenz und den gleichen  $E_{max}$ , welcher ein Maß für die intrinsische Aktivität am Rezeptor ist. Allerdings ist fraglich, ob Dopamin bezüglich der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren eine große Rolle spielt, da die mittlere  $EC_{50}$  bei ca. 360  $\mu$ M an den getesteten Rezeptoren lag, eine Konzentration, die *in vivo* nicht erreicht wird (Venton et al., 2003).

Die Konzentrations-Wirkungskurven für 5-HT an den 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptorvarianten zeigten analog dem 5-HT<sub>3A/B</sub>-WT-Rezeptor einen biphasischen Verlauf, was auf die Koexpression homopentamerer 5-HT<sub>3A</sub>- neben heteromeren 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptoren zurückzuführen ist (siehe D.3.2).

Im Gegensatz zu den unveränderten Affinitäten bzw. Potenzen der beschriebenen 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorliganden, führten einige der untersuchten Varianten und die 5-HT<sub>3Ea</sub>-Isoform im Ca<sup>2+</sup>-Influx-Assay zu veränderten 5-HT-induzierten Maximalantworten an den jeweiligen heteromeren Rezeptoren bzw. zu veränderten Rezeptordichten an der Zellmembran verglichen mit dem „WT“-Rezeptor. Da der 5-HT-induzierte  $E_{max}$  abhängig von der Anzahl der Rezeptoren an der Zelloberflä-

che ist, erfolgte eine Korrelation der 5-HT- $E_{max}$ -Werte mit den in der [ $^3$ H]GR65630-Bindung bestimmten  $B_{max}$ -Werten (Bestimmung  $E_{max}/B_{max}$ -Verhältnis).

Im Falle der 5-HT<sub>3B</sub> A223T-Variante zeigte sich weder ein Unterschied bezüglich des 5-HT- $E_{max}$  noch der  $B_{max}$  im Vergleich zum 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptor, so dass dieser seltenen Variante in Anbetracht der bis dato untersuchten Eigenschaften *in vivo* wahrscheinlich keine Bedeutung zukommt. Das Gleiche trifft auf die beiden 5-HT<sub>3E,(Ea)</sub>-Varianten 86A und 86T zu, welche weder zu unterschiedlichen pharmakologischen Eigenschaften noch zu unterschiedlichen Membranexpressionen der resultierenden heteromeren Rezeptoren führten. Demnach handelt es sich hier wahrscheinlich um einen nicht krankheitsrelevanten Polymorphismus, was die Ergebnisse zweier Assoziationsstudien (Reizdarm- und Essstörungsstudie), in welchen keine der beiden Varianten mit einer Krankheit assoziiert gefunden wurde, bestätigen (Niesler, unpublizierte Daten).

Die 5-HT<sub>3B</sub> V183I- und 5-HT<sub>3C</sub> 163N-Variante führten zu signifikant erniedrigten 5-HT- $E_{max}$ -Werten auf ca. 50 % bzw. 80 %, welche auf entsprechend reduzierte Oberflächenexpressionen der heteromeren Rezeptoren im Vergleich zu den jeweiligen „WT“-Rezeptoren zurückzuführen waren. Demnach haben diese Varianten wahrscheinlich einen negativen Einfluss auf die Rezeptorsynthese, -assemblierung oder *-trafficking* (siehe auch 5-HT<sub>3A</sub> A33T-Variante, D.3.3.1). So ist die AS 163 in der Cysteinschleife der 5-HT<sub>3C</sub>-Untereinheit lokalisiert, welche ein Strukturmerkmal aller *Cys-loop*-Rezeptoren ist und eine wesentliche Rolle bei der Koassemblierung der fünf Untereinheiten zu einem pentameren Komplex und die anschließende Faltung des Rezeptors spielt (Green und Wanamaker, 1997). Da in zwei Assoziationsstudien ausschließlich homozygote Träger des Gens für die 5-HT<sub>3C</sub> 163N-Variante signifikant häufiger an CINV litten (Fasching et al., 2008) bzw. am Reizdarmsyndrom (Niesler, unpublizierte Daten) erkrankt waren, wurde neben dem homozygoten Status zusätzlich der heterozygote Status *in vitro* durch Transfektion der Zellen mit einer equimolaren Mischung beider 5-HT<sub>3C</sub> (163K und 163N)-cDNAs simuliert. Dabei zeigte sich, dass der simulierte heterozygote Status (163K/163N) *in vitro* nicht zu einer reduzierten Oberflächenexpression des heteromeren 5-HT<sub>3A/C</sub>-Rezeptors im Vergleich zur 5-HT<sub>3C</sub> 163K-Variante führt, was die Ergebnisse der beiden Assoziationsstudien bestätigt. Demnach scheint das assoziierte Allel, das für die 5-HT<sub>3C</sub> 163N-Untereinheit kodiert, in Bezug auf eine Krankheitsentwicklung rezessiv zu sein. Da die erwähnten Erkrankungen nicht monogenetisch sind, sondern komplexe Ursachen haben, ist es durchaus

vorstellbar, dass die zwar signifikante aber nur geringfügige Reduktion der Oberflächenexpression des 5-HT<sub>3A/C</sub> 163N-Rezeptors zur Pathogenese von CINV und Reizdarmsyndrom beiträgt.

Die Isoform 5-HT<sub>3Ea</sub> verursachte eine starke Reduktion der Oberflächenexpression des resultierenden heteromeren Rezeptors auf ca. 15 % der Expression des 5-HT<sub>3A/E</sub>-Rezeptors, was sich in einer analogen Erniedrigung des 5-HT-E<sub>max</sub> widerspiegelte. Somit führt die alternative Signalsequenz dieser Isoform im Vergleich zur 5-HT<sub>3E</sub>-Untereinheit höchstwahrscheinlich zu einem schlechteren Einbau des Rezeptorproteins in die Plasmamembran.

Entgegen den erniedrigten 5-HT-induzierten Maximaleffekten und der damit beeinträchtigten Signaltransduktion der eben beschriebenen heteromeren 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren führten die beiden 5-HT<sub>3B</sub>-Varianten Y129S und S156R zu stark erhöhten 5-HT-E<sub>max</sub>-Werten auf ca. 300 % bzw. 200 % im Vergleich zum 5-HT<sub>3A/B</sub>-WT-Rezeptor. Da die erhöhten E<sub>max</sub>-Werte nicht durch die geringen B<sub>max</sub>-Erhöhungen von ca. 15 % erklärbar sind, liegt der Grund höchstwahrscheinlich in veränderten Kanaleigenschaften der entsprechenden 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptoren.

Modelling-Daten, basierend auf der Homologie des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors mit dem muskulären nACh-Rezeptor, zeigten die Lokalisation von Serin 129 in der Zone zwischen zwei angrenzenden Untereinheiten und von Arginin 156 in der Nähe der Ligandbindungsstelle (Krzywkowski, 2006), was einen Einfluss dieser beiden AS auf die Kanaleigenschaften vorstellbar macht. Im Falle der Y129S-Variante erfolgte der Nachweis veränderter 5-HT<sub>3A/B</sub>-Kanaleigenschaften im Rahmen einer während der Durchführung der Versuche veröffentlichten elektrophysiologischen Studie (Krzywkowski et al., 2008). Es zeigte sich, dass die Desensibilisierung des 5-HT<sub>3A/B</sub> Y129S-Rezeptors aufgrund einer verlängerten mittleren Kanalöffnungs-dauer im Vergleich zum 5-HT<sub>3A/B</sub>-WT-Rezeptor verlangsamt war, was den stark erhöhten 5-HT-E<sub>max</sub> im Ca<sup>2+</sup>-Influx erklärt. Ob der 5-HT<sub>3A/B</sub> S156R-Rezeptor ähnliche Eigenschaften aufweist, bedarf es noch zu klären. Bemerkenswerterweise hat sich in früheren Studien ein Einfluss verschiedener Arginine der 5-HT<sub>3A</sub>-Untereinheit auf Kanaleigenschaften des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors wie Einzelkanalleitfähigkeit (Kelley et al., 2003) und Aktivierungs- bzw. Desensibilisierungskinetik (Hu et al., 2003 und 2006; Hu und Peoples, 2007) gezeigt (siehe auch D.3.3.1), so dass ein Arginin in Position 156 der 5-HT<sub>3B</sub>-Untereinheit unter Umständen auch einen Einfluss auf die erwähnten Kanaleigenschaften haben kann. Des Weiteren

beweisen die Ergebnisse verschiedener Studien an nACh- und Glycinrezeptoren, dass die Cysteinschleife, in welcher Serin 156 lokalisiert ist, durch die Interaktion mit den Bindungsdomänen und dem TM2 - TM3-Verbindungsstück einen wesentlichen Einfluss auf das Kanal-*Gating* der *Cys-loop*-Rezeptoren hat (Schofield et al., 2003; Bouzat et al., 2004; Grutter et al., 2005; Sala et al., 2005).

Die veränderten Eigenschaften heteromerer 5-HT<sub>3A/B</sub> Y129S-Rezeptoren und die verringerte Membranexpression heteromerer 5-HT<sub>3A/B</sub> V183I und 5-HT<sub>3A/C</sub> 163N-Rezeptoren sind in Übereinstimmung mit gefundenen Assoziationen einzelner Studien (siehe Tabelle 16).

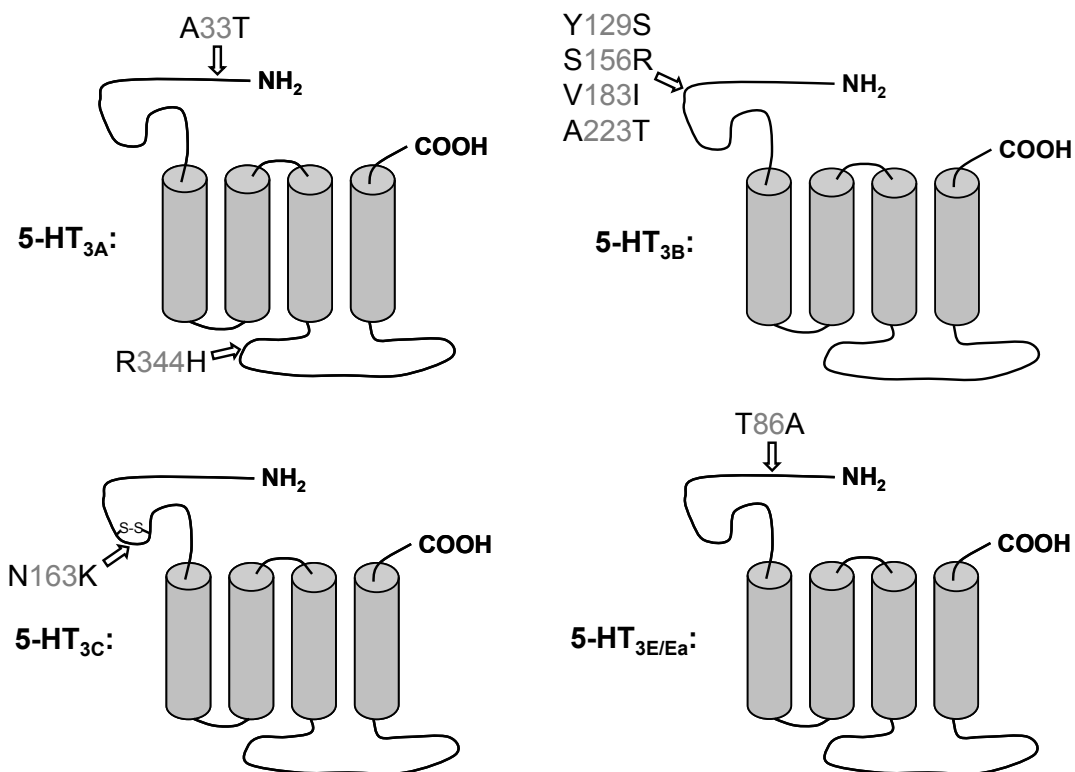
Das Y129-Allel (5-HT<sub>3B</sub>) trat signifikant häufiger bei Frauen mit unipolarer Depression in der asiatischen Population auf (Yamada et al., 2006). Somit impliziert das S129-Allel, welches eine Häufigkeit von bis zu 44 % in einigen ethnischen Gruppen aufweist, eine protektive Wirkung gegen die Entwicklung dieser Erkrankung, was demnach unter Umständen auf die verstärkte 5-HT<sub>3</sub>-Signaltransduktion und damit eine veränderte neuronale Aktivität zurückzuführen ist. Assoziationsstudien bezüglich gastrointestinaler Nebenwirkungen selektiver Serotonin-Wiederaufnahme-Inhibitoren (SSRI) lieferten inkonsistente Resultate für die 5-HT<sub>3B</sub> Y129S-Variante (Sugai et al., 2006; Suzuki et al., 2006). Des Weiteren ist der Einfluss dieser Variante auf die Entwicklung eines CINV weitestgehend ungeklärt, da für das Y129-Allel nur ein Trend zu einem höheren Risiko gezeigt werden konnte (Tremblay et al., 2003).

Das I183-Allel (5-HT<sub>3B</sub>) trat bisher in einer kleinen Studie signifikant häufiger bei Patienten mit bipolarer Depression auf (Frank et al., 2004), was möglicherweise auf die verminderte 5-HT<sub>3</sub>-Signaltransduktion zurückzuführen ist.

Die geringe Häufigkeit des R156-Allels (5-HT<sub>3B</sub>) (siehe Tabelle 16) kann ein Grund dafür sein, dass bisher keine Krankheitsassoziation gefunden wurde (Frank et al., 2004; Gutierrez et al., 2002). Hinsichtlich der verstärkten Signaltransduktion des 5-HT<sub>3A/B</sub> S156R-Rezeptors ist es wahrscheinlich, dass die S156R-Variante in Analogie zur Y129S-Variante mit entsprechenden Krankheiten assoziiert ist. Demnach ist es notwendig, eine größere Anzahl an Individuen zu genotypisieren, um die statistische Power der Studien zu erhöhen. Es ist daher bereits eine Replikationsstudie bezüglich bipolarer Depression, die knapp 5000 Individuen einschließt, in Arbeit.

Eine Studie zeigte, wie oben erwähnt, dass homozygote Träger des N163-Allels (5-HT<sub>3C</sub>) signifikant häufiger ein CINV unter Ondansetron / Dexamethason-Komedikation entwickelten (Fasching et al., 2008). In einer weiteren Studie wurde eine Assoziation des N163-Allels mit verstärktem Auftreten des Reizdarmsyndroms bei homozygoten Trägern gefunden (Niesler, unpublizierte Daten).

Weiterhin wäre es wünschenswert, kausale Zusammenhänge zwischen den Varianten und pathologischen Zuständen, die bisher nicht untersucht wurden (z.B. Anorexia / Bulimia nervosa) zu ermitteln, da der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor auch eine Rolle bei der Regulation der Nahrungsaufnahme spielt (Hayes und Covasa, 2005) und der 5-HT<sub>3</sub>-Antagonist Ondansetron erfolgreich in der Therapie der Bulimie eingesetzt wurde (Faris et al., 2000).



**Abbildung 53: Topologische Positionen der untersuchten Varianten in der Proteinsequenz der einzelnen 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoruntereinheiten**

## Diskussion

Variante	NCBI dbSNP	MAF	Assoziation	Literatur
<b>5-HT<sub>3A</sub></b>				
A33T		0,01	nicht gefunden	Kaiser et al., 2004 Frank et al., 2004
R344H		H344 bei einem Schizophreniepatienten detektiert	-	Niesler et al., 2001
<b>5-HT<sub>3B</sub></b>				
Y129S	rs1176744	0,17 – 0,32	Y129: -häufiger bei weiblichen unipolar Depressiven -höhere Inzidenz Paroxetin-induzierten Erbrechens -Trend zu erhöhter Inzidenz des Erbrechens nach Chemotherapie und antiemet. Behandlung mit 5-HT <sub>3</sub> -Antagonisten -S129 weniger häufig bei bipolar depressiven (BPAD) Patienten	Yamada et al., 2006 Sugai et al., 2006 Tremblay et al., 2003 Frank et al., 2004
S156R		0,008	nicht gefunden	Frank et al., 2004 Gutierrez et al., 2002
V183I	rs17116138	0,01 (Kontr.) 0,06 (BPAD)	1183 häufiger bei BPAD-Patienten	Frank et al., 2004
A223T		0,002	nicht gefunden	Tremblay et al., 2003
<b>5-HT<sub>3C</sub></b>				
N163K	rs6766410	0,38 - 0,48	N163/N163: -erhöhte Inzidenz des Erbrechens nach Chemotherapie und antiemet. Behandlung -häufiger bei Frauen mit IBS-d	Fasching et al., 2008 Niesler, unpublizierte Daten
<b>5-HT<sub>3E/Ea</sub></b>				
T86A		0,37	nicht gefunden	Niesler, unpublizierte Daten

**Tabelle 16: Häufigkeiten und gefundene Assoziationen der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten natürlich vorkommenden Varianten der verschiedenen 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoruntereinheiten**

Informationen über bisher gefundene *HTR3*-Genvarianten sind in der *HTR3*-Datenbank (<http://www.klinikum.uni-heidelberg.de/HTR3-Database.6646.0.html>) zugänglich.

BPAD, *Bipolar Affective Disorder*; IBS-d, Diarrhö-dominantes Reizdarmsyndrom; MAF, *Minor Allele Frequency*

#### 4. Einfluss des Chaperons RIC-3 auf Expression und Funktion von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren

Das Chaperon RIC-3 erhöhte nach Koexpression mit homopentameren 5-HT<sub>3A</sub>- und heteroameren 5-HT<sub>3A/B,(C,D,E,Ea)</sub> in HEK293-Zellen den im Aequorin-Ca<sup>2+</sup>-Influx-Assay bestimmten 5-HT-induzierten Maximaleffekt an diesen Rezeptoren. Der erhöhte E<sub>max</sub> konnte auf eine gleichsam erhöhte Membranexpression, bestimmt in [<sup>3</sup>H]GR65630-Bindungsstudien für 5-HT<sub>3A</sub><sup>-</sup>, 5-HT<sub>3A/B</sub><sup>-</sup>, 5-HT<sub>3A/C</sub><sup>-</sup> und 5-HT<sub>3A/Ea</sub>-Rezeptoren, zurückgeführt werden. Die verstärkte Oberflächenexpression des humanen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors nach Koexpression mit humanem RIC-3 in HEK293-Zellen wurde bereits in einer früheren Studie gezeigt (Cheng et al., 2005). Demgegenüber steht, dass humanes RIC-3 nach Koexpression mit dem murinen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor in Xenopus-Oozyten zu einer vollständigen Inhibition des 5-HT-induzierten Kationeninflux geführt hat (Halevi et al., 2003; Castillo et al., 2005; Jansen et al., 2008). Diese widersprüchlichen Resultate sind unter Umständen auf Speziesunterschiede des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors zwischen Mensch und Maus bzw. die Verwendung verschiedener Expressionssysteme (Xenopus-Oozyten versus Säugerzellen) zurückzuführen. Letzteres ist insofern vorstellbar, da RIC-3 möglicherweise mit anderen zellspezifischen Proteinen interagiert, um seine Wirkung als Chaperon zu entfalten. So wurde in einer kürzlich publizierten Studie von Lansdell et al. (2008) gezeigt, dass Drosophila-RIC-3 die Maturation von nACh-Rezeptoren am effizientesten in einer Drosophila-Zelllinie verstärkt, währenddessen humanes RIC-3 dies vor allem in humanen Zelllinien vermag. Im Gegensatz zur Erhöhung der Membranexpression der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren hatte RIC-3 keinen Einfluss auf die Potenz des Agonisten 5-HT am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor, was die Ergebnisse einer früheren Studie bestätigt (Cheng et al., 2005). Dementsprechend blieb auch die Affinität des Radioliganden [<sup>3</sup>H]GR65630 an den untersuchten 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren nach Koexpression von RIC-3 unverändert. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Konformation der assemblierten 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoruntereinheiten durch RIC-3 nicht beeinflusst wird.

Der RIC-3-Effekt auf den 5-HT-induzierten Maximaleffekt an 5-HT<sub>3A</sub> zeigte eine starke Abhängigkeit von der für die Transfektion eingesetzten RIC-3-cDNA-Menge. Nur bei 5-HT<sub>3A</sub><sup>-</sup> : RIC-3-cDNA-Verhältnissen von 1 : 0,01 - 1 : 1 führte RIC-3 zu einer E<sub>max</sub>-Erhöhung, wobei der Effekt bei einem Verhältnis von 1 : 0,1 mit einer Erhöhung um ca. 300 % am stärksten ausgeprägt war. Wurden größere Mengen RIC-3-cDNA eingesetzt, blieb der 5-HT-induzierte E<sub>max</sub> im Vergleich zum E<sub>max</sub>

ohne RIC-3 unverändert. Die Abhängigkeit der Chaperonaktivität von der RIC-3-Menge kann unter Umständen eine Rolle bei der Regulation des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorsystems *in vivo* spielen, da es möglicherweise quantitative Unterschiede der RIC-3-Proteinexpression zwischen verschiedenen Zelltypen oder zu verschiedenen Zeiten gibt. Cheng et al. (2005) zeigten auch eine Abhängigkeit der erhöhten Oberflächenexpression von 5-HT<sub>3A</sub> bzw. der Größe der 5-HT-Antwort im funktionellen Assay von der eingesetzten RIC-3-cDNA-Menge für die Transfektion von HEK293-Zellen. Allerdings stieg in dieser Studie die Oberflächenexpression des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors bei Verwendung steigender Mengen RIC-3-cDNA für die Transfektion bis zu einem 5-HT<sub>3A</sub> : RIC-3-cDNA-Verhältnis von 1 : 4 kontinuierlich an. Die Gründe für die voneinander abweichenden Resultate könnten in möglicherweise unterschiedlichen Inkubationszeiten der Zellen nach der Transfektion liegen, da die Interaktion des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors mit RIC-3 nur transient ist (Cheng et al., 2005) und demzufolge die Rezeptorexpression über die Zeit variabel ist. Des Weiteren wurde von Cheng et al. (2005) die cDNA der  $\alpha$ 1-Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors zur Angleichung der DNA-Mengen bei der Transfektion eingesetzt, währenddessen in unseren Versuchen der leere Plasmidvektor zu diesem Zweck verwendet wurde. Da es sich beim GABA<sub>A</sub>-Rezeptor auch um ein Familienmitglied der *Cys-loop*-Rezeptoren handelt, interagiert RIC-3 möglicherweise mit Untereinheiten dieses Rezeptors, was die Resultate bezüglich des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors beeinflussen würde, obwohl bis dato keine Interaktion identifiziert wurde (Halevi et al., 2002; Cheng et al., 2005; Lansdell et al., 2005). Die Ergebnisse dieser Studien stammen allerdings nicht aus funktionellen Experimenten, so dass ein RIC-3-Effekt auf den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor nicht vollständig ausgeschlossen werden kann. In einer anderen Studie, in welcher der Einfluss von RIC-3 auf die Expression des nACh $\alpha$ 7-Rezeptors in tsA201-Zellen untersucht wurde, führten ausschließlich kleine Mengen RIC-3-cDNA bei der Transfektion zu einer erhöhten und damit messbaren Oberflächenexpression des nACh $\alpha$ 7-Rezeptors (Alexander et al., 2007), was mit unseren Resultaten übereinstimmt.

Da bisher nur die Untersuchung des Einflusses von RIC-3 auf homopentamere 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren (Halevi et al., 2003; Castillo et al., 2005; Cheng et al., 2005 und 2007) und heteromere 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptoren (Cheng et al., 2007) erfolgte, wurde in dieser Versuchsreihe zusätzlich der Effekt von RIC-3 auf heteromere 5-HT<sub>3A/C,(D,E,Ea)</sub>-Rezeptoren bestimmt. Dabei zeigten sich bezüglich der 5-HT-



induzierten  $E_{\max}$ -Werte differentielle RIC-3-Effekte auf die untersuchten Rezeptoren. Im Falle des heteromeren 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptors war der 5-HT-induzierte  $E_{\max}$  bzw. auch  $B_{\max}$  der [<sup>3</sup>H]GR65630-Bindung nach Kotransfektion mit der RIC-3-cDNA in HEK293-Zellen weniger stark erhöht als bei Koexpression von RIC-3 mit dem homopentameren 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor. In Anbetracht der Tatsache, dass RIC-3 zu einer verstärkten Expression homopentamerer 5-HT<sub>3A</sub>- auf Kosten heteromerer 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptoren führt (Cheng et al., 2007) (siehe auch D.3.2), ist möglicherweise der teilweise Verlust der 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptoren bei einer analogen Erhöhung der 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptorexpression der Grund für die weniger starke Erhöhung des  $E_{\max}$ - bzw.  $B_{\max}$ -Wertes durch RIC-3 im Vergleich zum homopentameren 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor. Dieser differentielle Effekt von RIC-3 auf die beiden Rezeptorsubtypen war in der Studie von Cheng et al. (2007) nur geringfügig ausgeprägt, was unter Umständen an der Verwendung von COS7- anstelle von HEK293-Zellen als Expressionssystem bzw. der bereits oben erwähnten unterschiedlichen Inkubationszeit der Zellen nach der Transfektion liegt.

Der 5-HT-induzierte  $E_{\max}$  an heteromeren 5-HT<sub>3A/D</sub>- und 5-HT<sub>3A/E</sub>-Rezeptoren war nach Koexpression von RIC-3 in gleichem Maße erhöht wie beim homopentameren 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor. Da davon auszugehen ist, dass die  $E_{\max}$ -Erhöhung durch RIC-3 auf eine erhöhte Oberflächenexpression des Rezeptors zurückzuführen ist, was für 5-HT<sub>3A</sub>, 5-HT<sub>3A/B</sub>, 5-HT<sub>3A/C</sub> und 5-HT<sub>3A/Ea</sub> gezeigt werden konnte, wurde in diesen beiden Fällen auf eine zusätzliche  $B_{\max}$ -Bestimmung verzichtet. Ob auch bei diesen beiden heteromeren Rezeptoren RIC-3 zu einer bevorzugten Bildung homopentamerer 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren führt, kann aus den Ergebnissen der Experimente nicht geschlossen werden. Im Gegensatz dazu führte RIC-3 bei den heteromeren 5-HT<sub>3A/C</sub>- und 5-HT<sub>3A/Ea</sub>-Rezeptoren zu einer signifikant stärkeren Erhöhung des 5-HT-induzierten  $E_{\max}$ -Wertes im Vergleich zum 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor, was sich auch in der stärker erhöhten  $B_{\max}$  der [<sup>3</sup>H]GR65630-Bindung widerspiegelte. Falls die Theorie der verstärkten Expression homopentamerer 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren durch RIC-3 auch auf die anderen untersuchten heteromeren 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren außer 5-HT<sub>3A/B</sub> zutrifft, könnte unter Umständen die zusätzliche Verstärkung der Expression heteromerer 5-HT<sub>3A/C</sub>- bzw. 5-HT<sub>3A/Ea</sub>-Rezeptoren die Ursache für die im Vergleich zum 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor stärkere Erhöhung der Oberflächenexpression durch RIC-3 sein. Eindeutige Aussagen bezüglich der Veränderung der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorzusammensetzung nach Koexpression mit RIC-3 lassen die Experimente allerdings nicht zu.

Das Chaperon RIC-3 könnte möglicherweise eine Rolle bei der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorzusammensetzung spielen, da es erste Untersuchungen gibt, die belegen, dass RIC-3 zur Bevorzugung einer bestimmten Rezeptorzusammensetzung führt. Zum einen wird, wie oben mehrfach erwähnt, die Bildung homopentamerer 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren auf Kosten heteromerer 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptoren in Säugerzellen begünstigt (Cheng et al., 2007). Des Weiteren konnte ähnliches bei nACh-Rezeptoren der Spezies *C. elegans* festgestellt werden. RIC-3 führte hier zu einer verstärkten Expression der nACh-Rezeptoren, welche einen hohen Anteil der DEG-3-Untereinheit aufweisen (Ben Ami et al., 2005). Die festgestellte differentielle Regulation der unterschiedlichen 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren in unseren Versuchen ist ein weiterer Hinweis darauf, dass RIC-3 die korrekte Faltung bestimmter Untereinheiten begünstigt, so dass eine präferentielle Koassemblierung bestimmter Untereinheiten (z.B. 5-HT<sub>3A</sub>) erfolgt. Da die hier durchgeführten pharmakologischen Versuche nicht geeignet sind, die differentielle Expression der verschiedenen Rezeptoruntereinheiten zu analysieren, erfolgen zur Zeit in Zusammenarbeit mit dem Institut für Humangenetik in Heidelberg zusätzlich immunochemische Untersuchungen, die zur genaueren Aufklärung des Effekts von RIC-3 auf 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren unterschiedlicher Zusammensetzung beitragen sollen.

## 5. Versuche zur funktionellen Expression des humanen nACh $\alpha$ 7-Rezeptors und chimärer 5-HT<sub>3A</sub>-nACh $\alpha$ 7-Konstrukte in Säugerzelllinien

### 5.1 Der nACh $\alpha$ 7-Rezeptor

Mit dem Ziel, die Bindungsstelle für Cannabinoide am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor durch Konstruktion chimärer 5-HT<sub>3A</sub>-nACh $\alpha$ 7-Rezeptoren zu finden, sollte der humane nACh $\alpha$ 7-Rezeptor zunächst funktionell in HEK293-Zellen exprimiert werden. Die fehlende Expression des nACh $\alpha$ 7-Rezeptors in HEK293- und weiteren Säugerzelllinien, welche mittels Ca<sup>2+</sup>-Influxmessungen im Aequorin-Assay funktionell analysiert werden sollten, erwies sich als limitierender Faktor und führte letztendlich zur Aufgabe dieses Projektteils.

Trotz der hohen Ca<sup>2+</sup>-Permeabilität des nACh $\alpha$ 7-Rezeptors (Seguela et al., 1993; Fucile et al., 2003) konnte weder in HEK293-Zellen noch in CHO-K1-, SH-EP1- und BOSC23-Zellen, welche den nACh $\alpha$ 7-Rezeptor heterolog exprimierten, eine Nikotin-induzierte Lumineszenz im Ca<sup>2+</sup>-Influx-Assay detektiert werden. Des Weiteren zeigten HEK293-Zellen, welche transient mit der nACh $\alpha$ 7-cDNA transfiziert wurden, im elektrophysiologischen Experiment keine ACh-induzierten Ströme bei Ganzzelleableitungen. Obwohl eine funktionelle Expression des nACh $\alpha$ 7-Rezeptors in Xenopus-Oozyten ohne Probleme möglich ist (Couturier et al., 1990; Anand et al., 1993), existieren zahlreiche Berichte über dessen fehlende Funktionalität in verschiedenen Säugerzelllinien (Eisele et al., 1993; Cooper und Millar, 1997; Kassner und Berg, 1997; Rangwala et al., 1997; Sweileh et al., 2000). Dies scheint auf die fehlende Expression des Rezeptors an der Zelloberfläche zurückzuführen sein, da in unserem Fall keine spezifische Bindung des Radioliganden [<sup>3</sup>H] $\alpha$ -Bgt an intakten HEK293- sowie SH-EP1-Zellen, welchen den nACh $\alpha$ 7-Rezeptor heterolog exprimierten, detektiert werden konnte.

Es gibt allerdings mehrere Studien, welche zeigen, dass die funktionelle Expression des nACh $\alpha$ 7-Rezeptors in der Zelllinie SH-EP1 möglich ist. Die erfolgreiche Radioligandbindung an intakten Zellen und an Membranen (Peng et al., 1999 und 2005; Schroeder et al., 2003) als auch die Funktionalität im elektrophysiologischen Experiment (Ganzzelleableitungen) an diesen Zellen (Zhao et al., 2003) wurden demonstriert. Im Gegensatz zu den erwähnten Studien konnten wir nur an Membranen nicht aber an intakten Zellen der Zelllinie SH-EP1-h $\alpha$ 7, welche den humanen nACh $\alpha$ 7-Rezeptors stabil exprimiert, eine spezifische

[<sup>3</sup>H]α-Bgt-Bindung messen. Dieses Phänomen wurde kürzlich auch von einer anderen Arbeitsgruppe beschrieben (Loring et al., 2008). Unter Umständen ist die Verwendung verschiedener Zellklone die Ursache für die differentiellen Resultate. Allerdings ist die im Vergleich zur sehr geringen, kaum messbaren spezifischen Bindung an Membranen transient transfizierter HEK293-Zellen, hohe [<sup>3</sup>H]α-Bgt-Bindung an SH-EP1-hα7-Membranen ein Hinweis darauf, dass die Bildung funktioneller nAChα7-Rezeptoren in SH-EP1-Zellen aufgrund bestimmter zellspezifischer Faktoren eher möglich ist als in HEK293-Zellen. Trotzdem konnte auch in diesen Zellen, wie zu Beginn erwähnt, keine nAChα7-vermittelte Nikotin-induzierte Antwort sowohl im Aequorin-Assay als auch im sensitiveren CRET-Assay (siehe C.1.4.1) detektiert werden. Auch eine 24-stündige Vorinkubation der Zellen mit Nikotin, welches zur Stabilisierung der nAChα7-Rezeptoren an der Zelloberfläche beiträgt (Quik et al., 1996; Olale et al., 1997; Ke et al., 1998), führte nicht zu einem messbaren Ca<sup>2+</sup>-Influx. Im Gegensatz dazu konnten, wenn auch mit geringer Ausbeute, ACh-induzierte Ströme an SH-EP1-hα7-Zellen in Ganzzelleableitungen gemessen werden. Anhand dieser Ergebnisse kann geschlussfolgert werden, dass die fehlende Messbarkeit des Agonist-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Influx möglicherweise auf die sehr schnelle Desensibilisierung des nAChα7-Rezeptors (Couturier et al., 1990; Puchacz et al., 1994; Zhao et al., 2003) zurückzuführen ist. Um dieses Problem zu umgehen, erfolgte die Konstruktion der „Gain-of-Function“-Mutante T267S, welche bei nahezu unveränderten pharmakologischen Eigenschaften im Vergleich zum WT-Rezeptor eine längere Kanalöffnungsdauer aufweist (Placzek et al., 2005), was demzufolge den Agonist-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Influx erhöhen müsste. Doch auch die transiente Expression des nAChα7 T267S-Rezeptors in HEK293- bzw. SH-EP1-Zellen führte nicht zu einem messbaren Ca<sup>2+</sup>-Influx, was demnach die genannte Hypothese in Frage stellt.

Eine weitere Option für die funktionelle Expression des nAChα7-Rezeptors lieferte die Säugerzelllinie GH4-C1. An stabil mit der nAChα7-cDNA transfizierten GH4-C1-Zellen wurden bereits erfolgreich Ca<sup>2+</sup>-Influxmessungen mit einem FLIPR durchgeführt (Feuerbach et al., 2005; Dunlop et al., 2007). Ein Grund für die Funktionalität dieser Zellen im Ca<sup>2+</sup>-Assay liegt in der Expression spannungsgesteuerter L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanäle begründet, welche den Agonist-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Influx um ein Vielfaches verstärken (Feuerbach et al., 2005). Allerdings schlug die

Konstruktion stabil mit dem pG5A-Vektor und der nACh $\alpha$ 7-cDNA transfizierter GH4-C1-Zellen fehl, da trotz vorhandener mRNA der beiden Proteine an diesen Zellen keine spezifische [ $^3$ H] $\alpha$ -Bgt-Bindung und kein Nikotin-induzierter Ca $^{2+}$ -Influx im CRET-Assay detektierbar war.

Das unterschiedliche Verhalten des nACh $\alpha$ 7-Rezeptors in den verschiedenen Zelltypen lässt darauf schließen, dass dieser Rezeptor zellspezifische Faktoren für eine funktionelle Expression an der Zelloberfläche benötigt, was bereits von Cooper und Millar (1997) und Sweileh et al. (2000) ausführlich diskutiert wurde.

Als einer dieser Faktoren stellte sich RIC-3 heraus, ein Chaperon, welches spezifisch die Maturation von nACh-Rezeptoren und 5-HT $_3$ -Rezeptoren beeinflusst (siehe A.3). RIC-3 wurde erstmals im Jahr 2005 mit dem nACh $\alpha$ 7-Rezeptor in HEK293-Zellen koexprimiert, was zu messbaren Agonist-induzierten Einstömen bei Ganzzelleitungen führte (Williams et al., 2005; Lansdell et al., 2005). RIC-3 mRNA wird in SH-EP1-, GH4-C1-, SH-SY5Y- und manchen PC12-Zellen exprimiert (Williams et al., 2005; Lansdell et al., 2005), bei welchen die funktionelle Expression des nACh $\alpha$ 7-Rezeptors gezeigt werden konnte (Puchacz et al., 1994; Cooper und Millar, 1997; Zwart et al., 2002; Virginio et al., 2002; Zhao et al., 2003). Demgegenüber wurde keine Expression der mRNA dieses Chaperons in HEK293- (Williams et al., 2005; Lansdell et al., 2005) und CHO-K1-Zellen (Roncarati et al., 2008) detektiert, so dass mit RIC-3 ein Chaperon identifiziert wurde, welches die funktionelle Expression des nACh $\alpha$ 7-Rezeptors in bestimmten Zelltypen ermöglicht. Nach Koexpression von RIC-3 und dem nACh $\alpha$ 7-Rezeptor in HEK293-Zellen konnten wir eine spezifische [ $^3$ H] $\alpha$ -Bgt-Bindung an intakten Zellen und eine 16-fach höhere Bindung an Membranen im Vergleich zur alleinigen Expression des nACh $\alpha$ 7-Rezeptors detektieren. Trotzdem war in Anwesenheit von RIC-3 kein Nikotin-induzierter Ca $^{2+}$ -Influx an transient mit dem nACh $\alpha$ 7- bzw. dem nACh $\alpha$ 7 T267S-Rezeptor transfizierten HEK293-Zellen messbar. Bei Ganzzelleitungen konnte in nur einer von elf getesteten transient mit der nACh $\alpha$ 7- und RIC-3-cDNA kotransfizierten HEK293-Zellen ein ACh-induzierter Einstrom gemessen werden.

Diese Ergebnisse implizieren das Vorhandensein zusätzlicher Faktoren neben RIC-3, welche eine Rolle bei der funktionellen Expression des nACh $\alpha$ 7-Rezeptors spielen. So konnten beispielsweise Drisdell et al. (2004) zeigen, dass der

Palmitoylierung des nACh $\alpha$ 7-Rezeptors eine wesentliche Bedeutung zukommt. In Zellen mit funktionellen nACh $\alpha$ 7-Rezeptoren ist das Rezeptorprotein stark palmitoyliert, währenddessen dies in HEK293-Zellen kaum der Fall ist.

Dass die Messung des Ca<sup>2+</sup>-Influx möglicherweise nicht als funktioneller Test für nACh $\alpha$ 7-Rezeptoren in bestimmten Zelllinien geeignet ist, zeigt eine weitere Studie an CHO-K1-Zellen (Roncarati et al., 2008). Stabil mit der RIC-3- und der nACh $\alpha$ 7-cDNA transfizierte Zellen zeigten messbare Agonist-induzierte Ströme bei Ganzzelleableitungen im elektrophysiologischen Experiment, währenddessen ein Agonist-induzierter Ca<sup>2+</sup>-Influx im FLIPR-Assay nicht detektierbar war. Nur nach Koapplikation des positiven allosterischen Modulators PNU-120596, welcher den Peakstrom erhöht und die Desensibilisierung des nACh $\alpha$ 7-Rezeptors verlangsamt (Hurst et al., 2005; Gronlien et al., 2007), war ein Agonist-induzierter Anstieg der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration messbar. Dieses Phänomen wurde bereits für PC12-Zellen beschrieben (Dickinson et al., 2007). Die Ergebnisse der beiden Studien untermauern wiederum die erwähnte Theorie der fehlenden Messbarkeit eines Ca<sup>2+</sup>-Einstroms aufgrund der sehr schnellen Desensibilisierung des nACh $\alpha$ 7-Rezeptors.

Somit ist in Anbetracht der geschilderten Ergebnisse die heterologe Expression des nACh $\alpha$ 7-Rezeptors in der GH4-C1-Zelllinie aufgrund ihrer Expression endogener spannungsgesteuerter L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanäle momentan die einzige Option für eine Charakterisierung dieses Rezeptors mittels Ca<sup>2+</sup>-Influxmessungen, was im Hochdurchsatzmaßstab bereits durchgeführt wird (Dunlop et al., 2007).

### **5.2 Chimäre 5-HT<sub>3A</sub>-nACh $\alpha$ 7-Rezeptoren**

In Analogie zur Studie von Oz et al. (2004), in welcher unter Verwendung einer nACh $\alpha$ 7-5-HT<sub>3A</sub>-Chimäre die Bindungsstelle des endogenen Cannabinoids Anandamid auf einen bestimmten Bereich des nACh $\alpha$ 7-Rezeptor eingegrenzt werden konnte, wollten wir die Cannabinoidbindungsstelle am humanen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor lokalisieren. Hierzu sollte das synthetische Cannabinoid WIN 55,212-2 verwendet werden, welches den 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor dosisabhängig inhibiert (siehe C.2.3.2.2; Barann et al., 2002) im Gegensatz dazu aber selbst bei hohen Konzentrationen keinen inhibierenden Effekt auf den Huhn-nACh $\alpha$ 7-Rezeptor gezeigt hat (Oz et al., 2004). Auf Grundlage der hohen Sequenzhomologie der 5-

HT<sub>3A</sub>- und der nACh $\alpha$ 7-Rezeptoruntereinheit (26 % Sequenzidentität der humanen Proteine, siehe Abbildung 55) ist es möglich, funktionelle chimäre Konstrukte aus diesen Proteinen zu generieren. So ist es beispielsweise gelungen, funktionelle Chimären zu konstruieren, welche aus dem N-Terminus des nACh $\alpha$ 7-Rezeptors und den TMs sowie dem C-Terminus des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors zusammengesetzt sind. Allerdings wurden dabei stets Rezeptoruntereinheiten verschiedener Spezies wie Huhn, Ratte oder Maus kombiniert. Diese Chimären dienen vielfach als Ersatz für den in den meisten Säugerzellen nicht funktionellen nACh $\alpha$ 7-Rezeptor (siehe oben), da die Ligandbindungsstelle im N-Terminus durch den nACh $\alpha$ 7-Rezeptor gebildet wird (Eisele et al., 1993; Corringer et al., 1995; Blumenthal et al., 1997; Rangwala et al., 1997). Oz et al. (2004) kamen unter Verwendung dieser Chimäre zu der Erkenntnis, dass die Bindungsstelle für Anandamid am nACh $\alpha$ 7-Rezeptor im C-terminalen Bereich beginnend ab TM1 lokalisiert ist. Bereits von Barann et al. (2002) wurde aufgrund der langen, für eine Inhibition des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors notwendigen Equilibrierungszeit von WIN 55,212-2 postuliert, dass die Bindungsstelle entweder im Bereich der TMs oder intrazellulär liegt. Des Weiteren wurden kürzlich zwei Studien veröffentlicht, in welchen die Bindungsstellen für das Anästhetikum Etomidat und für endogene Neurosteroiden im Bereich der TMs bestimmter GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheiten identifiziert wurden (Li et al., 2006; Hosie et al., 2006), so dass die Bindungsstelle für die auch recht lipophilen Cannabinoide am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor unter Umständen analog in diesem Bereich zu suchen ist. Daher erfolgte zunächst die Generierung zweier chimärer Konstrukte, bestehend aus dem N-Terminus und einer bzw. zwei TMs der humanen 5-HT<sub>3A</sub>-cDNA und dem restlichen C-terminalen Bereich der humanen nACh $\alpha$ 7-cDNA (siehe Abbildung 52). Diese Rezeptorkonstrukte wurden allerdings nach transienter Transfektion von HEK293-Zellen nicht an der Zellmembran exprimiert und waren demzufolge auch nicht funktionell. Dies widerspricht den Resultaten von Dineley und Patrick (2000), welche zeigten, dass hauptsächlich bestimmte AS aus der TM1 des murinen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors für die Oberflächenexpression der Chimären und damit auch des nACh $\alpha$ 7-Rezeptors (der Ratte) essenziell sind. Doch kürzlich wurde in einer weiteren Studie der Nachweis erbracht, dass chimäre Rezeptoren bestehend aus dem nACh $\alpha$ 7 (Ratte)- und dem 5-HT<sub>3A</sub> (Maus)-Rezeptor nur an der Zellmembran von tsA201-Zellen exprimiert werden und damit funktionell sind, wenn alle TMs vom 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor stammen (Gee et al., 2007).

Da in unserem Fall nicht alle TMs von 5-HT<sub>3A</sub> gebildet werden, werden die von uns generierten Chimären demzufolge nicht an der Zelloberfläche exprimiert. In einer aktuellen Studie wurde erstmals eine Chimäre konstruiert, welche, ähnlich unseren Konstrukten, aus dem N-Terminus der humanen 5-HT<sub>3A</sub>-cDNA und den TMs sowie dem C-Term der humanen nACh $\alpha$ 7-cDNA zusammengesetzt ist (Bertrand et al., 2008). Dieses Konstrukt zeigte im Vergleich zu den anderen im Rahmen der Studie konstruierten Chimären, deren TMs alle durch 5-HT<sub>3A</sub> gebildet werden, eine sehr schlechte Oberflächenexpression trotz Verwendung von Xenopus-Oozyten als Expressionssystem, in welchen normalerweise sogar die funktionelle Expression des nACh $\alpha$ 7-Rezeptors unproblematisch ist (siehe oben). Das bestätigt die Aussage von Gee et al. (2007), dass alle TMs des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors essenziell für die Oberflächenexpression der Chimären sind.

Diese Studie, in der analog zu unserem Ansatz die Generierung verschiedener chimärer humaner nACh $\alpha$ 7-5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren erfolgte, welche anschließend erfolgreich zur Eingrenzung der Bindungsstelle positiver allosterischer Modulatoren am nACh $\alpha$ 7-Rezeptor eingesetzt wurden, zeigt, dass das „Chimärenkonzept“ prinzipiell erfolgversprechend im Hinblick auf die Lokalisierung der Bindungsstelle bestimmter Liganden am Rezeptor ist.



## E. Zusammenfassung

Der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor ist innerhalb der Familie der Serotonin (5-HT)-Rezeptoren der einzige ligandgesteuerte Ionenkanal. Er zählt zur Superfamilie der *Cys-loop*-Rezeptoren und setzt sich aus fünf konzentrisch um eine kationenpermeable (Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>) Pore angeordnete Untereinheiten zusammen. Er ist in die Pathogenese psychiatrischer Erkrankungen involviert. Weiterhin spielt er eine wichtige Rolle bei der Steuerung gastrointestinaler Funktionen und 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten werden erfolgreich in der Therapie der Chemo-/Radiotherapie-induzierten bzw. postoperativen Emesis eingesetzt. Das Hauptziel der Arbeit war die Untersuchung der Heterogenität des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorsystems, was für die Aufklärung der pathophysiologischen Rolle dieser Rezeptoren essenziell ist.

Zunächst galt es, eine Methode zu optimieren, die es im Gegensatz zur Patch-Clamp-Technik ermöglicht, 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren unterschiedlicher Zusammensetzung schnell funktionell zu charakterisieren. Die Methode basiert auf dem Agonist-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Influx durch den 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorkanal und der daraufhin ausgelösten Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Lumineszenz des Fotoproteins Aequorin. Die Optimierung erfolgte an heterolog exprimierten 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren in HEK293-Zellen, welche nachweislich keine Expression nativer 5-HT-Rezeptoren bzw. spannungsgesteuerter Ca<sup>2+</sup>-Kanäle aufwiesen. Anhand ermittelter pharmakologischer Kenngrößen von Rezeptorliganden, welche denen mittels anderer Methoden bestimmten entsprachen, wurde demonstriert, dass der Aequorin-Assay eine sensitive, für die Hochdurchsatzanalyse geeignete Methode zur Charakterisierung Ca<sup>2+</sup>-permeabler ligandgesteuerter Ionenkanäle ist.

Mittels rekombinanter PCR-Technik wurden fluoreszenzmarkierte 5-HT<sub>3A</sub>-Untereinheiten für die Untersuchung der Interaktion ligandgesteuerter Ionenkanäle mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET), generiert. Die Membranexpression der zwei 5-HT<sub>3A</sub>-ECFP/EYFP-Fusionskonstrukte in HEK293-Zellen war im Vergleich zum unmarkierten Rezeptor reduziert. Deren Funktionalität konnte zwar elektrophysiologisch aber nicht im Ca<sup>2+</sup>-Influx-Assay gezeigt werden, was eine stark reduzierte Ca<sup>2+</sup>-Permeabilität aufgrund der beträchtlichen Größe der Fluoreszenzproteine impliziert. Demgegenüber zeigte der mit dem *Fluorescein Arsenical Hairpin Binder* (FIAsH)-Motiv von nur zwölf Aminosäuren (AS) markierte

5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor neben einer geringfügig reduzierten Membranexpression keine veränderte Funktion im Vergleich zum unmarkierten 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor.

Bisher sind fünf 5-HT<sub>3</sub>-Untereinheiten bekannt (A - E), wobei nur die A-Untereinheit in der Lage ist, funktionelle homopentamere Rezeptoren auszubilden. Die anderen Untereinheiten gelangen nur zusammen mit der A-Untereinheit an die Zelloberfläche, um funktionelle heteromere Rezeptoren mit dieser zu formen.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass homopentamere 5-HT<sub>3A</sub>- neben heteromeren 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptoren in transient transfizierten HEK293-Zellen exprimiert werden. Daraus ergibt sich das grundsätzliche Problem der funktionellen Charakterisierung heteromerer 5-HT<sub>3A/X</sub>-Rezeptoren, die nicht von den 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren separiert werden können.

Bekannt ist, dass die Ligandbindungsstelle des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors im N-Terminus durch eine „Hauptuntereinheit“ und eine benachbarte „komplementäre“ Untereinheit gebildet wird. Mit Hilfe der mutierten 5-HT<sub>3A</sub> W178S-Untereinheit, die bei erhaltener Oberflächenexpression keine Ligandbindung mehr ermöglicht, konnte in Radioligandbindungsversuchen demonstriert werden, dass die neuen 5-HT<sub>3</sub>-Untereinheiten C, D und E nicht als „Hauptuntereinheit“ an der Ligandbindung beteiligt sein können.

Der Hauptteil dieser Arbeit bestand in der Untersuchung der Auswirkungen natürlich vorkommender Varianten einzelner 5-HT<sub>3</sub>-Untereinheiten und einer Spleißisoform auf die Funktion und Expression homopentamerer 5-HT<sub>3A</sub>- bzw. heteromerer 5-HT<sub>3A/B(C,D,E)</sub>-Rezeptoren. Deren pharmakologische Charakterisierung erfolgte durch [<sup>3</sup>H]GR65630-Bindung und Ca<sup>2+</sup>-Influx-Analysen.

Keine der untersuchten Varianten führte zu veränderten Affinitäten / Potenzen getesteter Liganden an den jeweiligen Rezeptoren im Vergleich zum Wildtyp (WT). Dagegen verursachten die A-Varianten A33T und R344H, die B-Variante V183I, die C-Variante 163N und die Spleißisoform Ea eine reduzierte Membranexpression des entsprechenden 5-HT<sub>3A</sub>- bzw. 5-HT<sub>3A/X</sub>-Rezeptors. Das deutet auf einen negativen Einfluss auf Rezeptorsynthese, -assemblierung oder *-trafficking* hin und resultiert womöglich in einer verminderten 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorsignaltransduktion *in vivo*. Die verminderte Oberflächenexpression der 5-HT<sub>3A</sub> R344H-Variante wurde nicht von einer entsprechenden Verringerung des 5-HT-induzierten Maximaleffektes im Ca<sup>2+</sup>-Influx begleitet, was unter Umständen auf die in

elektrophysiologischen Messungen bestimmte längere mittlere Kanalöffnungsdauer im Vergleich zum WT zurückgeführt werden kann.

Demgegenüber führten die B-Varianten Y129S und S156R bei fehlendem Einfluss auf die Membranexpression zu stark erhöhten 5-HT-induzierten Maximaleffekten an den jeweiligen 5-HT<sub>3A/B</sub>-Rezeptoren, was einen Einfluss der Aminosäureaustausche auf die Kanaleigenschaften impliziert und unter Umständen *in vivo* zu einer verstärkten 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorsignaltransduktion führt.

Die Untersuchung des Einflusses der Varianten auf Expression oder Funktion des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors liefert die Grundlage zur Erklärung gefundener Assoziationen mit psychiatrischen Erkrankungen. So sind möglicherweise die Assoziationen der häufigen B-Varianten Y129S und V183I mit unipolarer (Y129S) und bipolarer (beide) Depression auf die veränderte 5-HT<sub>3</sub>-Signaltransduktion zurückzuführen.

In einem weiteren Teil der Arbeit wurde der Einfluss von RIC-3 auf die Expression und Funktion verschiedener 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren untersucht. RIC-3 ist ein ursprünglich in *C. elegans* identifiziertes Chaperon, welches spezifisch die Maturation nikotinischer Acetylcholin (nACh)- und 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren beeinflusst.

RIC-3 hatte keinen Einfluss auf die Konzentrations-Wirkungsbeziehung von 5-HT am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor. Demgegenüber führte das Chaperon nach Koexpression mit 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren unterschiedlicher Zusammensetzung zu einer differentiellen Erhöhung der Membranexpression dieser Rezeptoren, wobei das Ausmaß der Erhöhung von der eingesetzten RIC-3-cDNA-Menge bei der Transfektion abhängig war. Dies ist ein Hinweis darauf, dass RIC-3 bei der Regulierung der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorzusammensetzung *in vivo* eine Rolle spielt.

## F. Anhang

### 1. Verwendete cDNAs

Im Folgenden sind die verwendeten cDNAs, deren Genbank-Nummern und die entsprechenden Expressionsvektoren aufgelistet.

<b>Protein</b>	<b>Genbank-Nr.</b>	<b>Expressionsvektor</b>
Apoaequorin	AB103337	pcDNA3.1 Zeo(+)
ECFP	AB041904	-
EYFP	AY818378	-
h5-HT <sub>3A</sub>	AJ003079	pcDNA3
h5-HT <sub>3B</sub>	AF080582	pcDNA3
h5-HT <sub>3C</sub>	AF459285	pcDNA3
h5-HT <sub>3D</sub>	AY159812	pcDNA3
h5-HT <sub>3E</sub>	AY159813	pcDNA3
h5-HT <sub>3Ea</sub>	DQ644022	pcDNA3
hnACh $\alpha$ 7	AAB40114	pcDNA3.1(-) pcDNA3.1 Hygro(-)
hRIC-3	NM_024557	pcDNA3.1(-)

## 2. Alignments

### 2.1 Vergleich der Proteinsequenzen humaner 5-HT<sub>3</sub>-Untereinheiten

		<b>Signalsequenz</b>	<b>A33T</b>
5-HT3A	-----	MLLWVQOALLALLLPTLLAQGEA	RRSRNTRPALLRLSDYLL
5-HT3B	-----	MLSSVMAPLWACIL--VAA	GILATDTHHPQDSALYHLSKQLL
5-HT3C	-----	MEGGWPARQSALLCLTVSLLQGR	GDAFTINCSGFDQHGVDPAVF
5-HT3D	-----	-----	-----
5-HT3E	MLAFILSRATPRPALG	PLSYREHRVALLHLTHSMSTTGRGV	TFTINCSGFGQHGDAPTAL
5-HT3Ea	-----	MEGSWFHRKRF SFYLLLGFLQGR	GVTFITINCSGFGQHGDAPTAL
		<b>T86A</b>	<b>85 „Schleife D“</b>
5-HT3A	TNY--RKGVRPVRDWRKPTTVS	IDVIVYAILNVDEKNQVLT	TYIWYRQYWTDEFLQWNPE
5-HT3B	QKY--HKEVRPVYNWTKATT	VYLDLVHAILDVAENQILK	TSVWVYQEVWVNDSEFLSWNSS
5-HT3C	QAVFDRKAFRPFNTYSIP	TRVNISFTLSAILGVDAQ	LQLLTSFLWMDLVWDNPFINWPK
5-HT3D	-----	-----	-----
5-HT3E	NSVFNRKPFPRVTNISVPT	QVNI SFA SAILDVNEQLHLL	SSFLWLEMVWDNPFISWNPE
5-HT3Ea	NSVFNRKPFPRVTNISVPT	QVNI SFA SAILDVNEQLHLL	SSFLWLEMVWDNPFISWNPE
		<b>Schleife A</b>	<b>Y129S</b>
5-HT3A	DFDNITKLSIPTDSIWPDI	LINEFVDVVGKSPNIPYVY	IRHQEVQNYKPLQVVTACSLD
5-HT3B	MFDEIREISLPLSAIWAPD	IINEFVDIERPDL	PYVYVNSSGTIENYKPIQVVSACLE
5-HT3C	ECVGINKLTVLAENLWLPD	IFIVESMDVDQTPSGLT	YAYISSEGRIKYDKPMRVTSICLD
5-HT3D	-----	-----	-----
5-HT3E	ECEGITKMSMAAKNLWLPD	IFIEELMDVDKTPKGLT	YAVSNEGRIRYKPKMKVDSICNLD
5-HT3Ea	ECEGITKMSMAAKNLWLPD	IFIEELMDVDKTPKGLT	YAVSNEGRIRYKPKMKVDSICNLD
			<b>„Schleife E“</b>
			<b>S156R</b>
			<b>N163K</b>
	<b>loop</b>	<b>Schleife B</b>	<b>V183I</b>
5-HT3A	IYFPPFDVQNC	SLTFTSWLHTIQD	INISLWRLPEKVKS-DRS
5-HT3B	TYAFPPFDVQNC	SLTFKSI LHTVED	DLAFLRSPEDIQH-DKKA
5-HT3C	IFYFPPDQQNC	TFTFSFLYTVDS	MMLGMDKEVWEITDTSR
5-HT3D	-----	-----	-----
5-HT3E	IFYFPPDQQNC	TLTFSFLYTVDS	MMLDMEKEVWEITDASR
5-HT3Ea	IFYFPPDQQNC	TLTFSFLYTVDS	MMLDMEKEVWEITDASR
		<b>A223T</b>	<b>TM1</b>
5-HT3A	EFSMESSNYAEMKFYV	VIRRRPLFYVVSLLLPS	IFLMVMDIVGFYLP
5-HT3B	SILQSSGGFAQIQFN	VVMRRHPLVYVVSLL	IPSIFLMVLVDSGFYLP
5-HT3C	KMSMGNNL-YDQIM	FYVAIRRRPSLYI	INLLVPS SFLVAIDALS
5-HT3D	RAERSPSA-LSPTQ	VAIRHRCRPSPYV	VNFLVPSGILIAIDALS
5-HT3E	KL SRGGNL-YDQIV	FYVAIRRRPSLY	VINLLVPSGFLVAIDALS
5-HT3Ea	KL SRGGNL-YDQIV	FYVAIR RPSLY	VINLLVPSGFLVAIDALS
		<b>Schleife C</b>	
	<b>TM2</b>		<b>TM3</b>
5-HT3A	LLLGYSVFLIIVSD	DTLPATAIGTPLI	-----GVYFVVC
5-HT3B	VLVGYTVFRVNMS	NQVPRSVGSTPLI	-----GHFFTIC
5-HT3C	LLLGYNVFLLMND	LLP--ASGTPLI	-----SVYFALC
5-HT3D	VLLGYSVFLLMND	LLP--ATSTSS	HASLV RPHPSRDQKR
5-HT3E	LLLGYNVFLLMND	LLP--TSGTPLI	-----GVYFALC
5-HT3Ea	LLLGYNVFLLMND	LLP--TSGTPLI	-----GVYFALC
		<b>R344H</b>	
5-HT3A	IVRLVH-KQDLQ	QVPVPAWLHLVLERIA	WLLCLREQSTSQRPPATSQA
5-HT3B	LVKFLHDEQRGGQEQP	-----	FL-CLRGDTADRP
5-HT3C	ITYLLHVATTQPP	MPRWLHSL-----	LLHCTSPGRCC--PTAPQ
5-HT3D	ITHLLHVATTQPL	PLPRWLHSL-----	LLHCTGQGRCC--PTAPQ
5-HT3E	ITHLLHVATTQPP	PLPRWLHSL-----	LLHCNSPGRCC--PTAPQ
5-HT3Ea	ITHLLHVATTQPP	PLPRWLHSL-----	LLHCNSPGRCC--PTAPQ
			<b>MA-stretch</b>
5-HT3A	NHCSHMGGPQDFEKS	PRDRCSPPPPPREASL	AVCGLLQELSSIRQFLEK
5-HT3B	EHLAQPG-----	T--LKE-----	-----VWSQLQ
5-HT3C	THLPGPK-----	EPGELAGKLGPRE	-----TEPDGGS
5-HT3D	THLPGVK-----	EPEVSAGQMPGPE	-----AELTGGSEW
5-HT3E	THLPGVK-----	EPEVSAGQMPGPAE	-----AELTGGSEW
5-HT3Ea	THLPGVK-----	EPEVSAGQMPGPAE	-----AELTGGSEW
		<b>TM4</b>	
5-HT3A	ARDWLRVGSVLDK	LLFHIYLLAVLAYSIT	LVMLWSIWQYA
5-HT3B	EAEWLVLSRFRD	RLLFQSYLFMLGIY	TITLCSLWALWGGV
5-HT3C	MELWVQF SHAMD	TLFRLYLLEFMAS	ILTIVVLWNT----
5-HT3D	VELWVQF SHAMD	ALLFRLYLLEFMAS	IITVICLWNT----
5-HT3E	VELWLQF SHAMD	AMLFRLYLLFMAS	IITVICLWNT----
5-HT3Ea	VELWLQF SHAMD	AMLFRLYLLFMAS	IITVICLWNT----



## G. Literaturverzeichnis

### 1. Referenzen

- Adams SR, Campbell RE, Gross LA, Martin BR, Walkup GK, Yao Y, Llopis J, Tsien RY (2002) New biarsenical ligands and tetracysteine motifs for protein labeling in vitro and in vivo: synthesis and biological applications. *J Am Chem Soc* 124:6063-6076
- Adler LE, Cawthra EM, Donovan KA, Harris JG, Nagamoto HT, Olincy A, Waldo MC (2005) Improved p50 auditory gating with ondansetron in medicated schizophrenia patients. *Am J Psychiatry* 162:386-388
- Alexander JK, Jefford G, Criado M, Sagher D, Green WN (2007) Ric-3 levels in the ER determine whether alpha-7 nicotinic receptors are expressed at the surface or retained in the ER. Abstract zum jährlichen SfN-Meeting, San Diego (CA, USA)
- Anand R, Peng X, Lindstrom J (1993) Homomeric and native alpha 7 acetylcholine receptors exhibit remarkably similar but non-identical pharmacological properties, suggesting that the native receptor is a heteromeric protein complex. *FEBS Lett* 327:241-246
- Arneric SP, Holladay M, Williams M (2007) Neuronal nicotinic receptors: a perspective on two decades of drug discovery research. *Biochem Pharmacol* 74:1092-1101
- Azami J, Fozard JR, Round AA, Wallis DI (1985) The depolarizing action of 5-hydroxytryptamine on rabbit vagal primary afferent and sympathetic neurones and its selective blockade by MDL 72222. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 328:423-429
- Barann M, Göthert M, Fink K, Bönisch H (1993) Inhibition by anaesthetics of <sup>14</sup>C-guanidinium flux through the voltage-gated sodium channel and the cation channel of the 5-HT<sub>3</sub> receptor of N1E-115 neuroblastoma cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 347:125-132
- Barann M, Ruppert K, Göthert M, Bönisch H (1995) Increasing effect of ethanol on 5-HT<sub>3</sub> receptor-mediated <sup>14</sup>C-guanidinium influx in N1E-115 neuroblastoma cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 352:149-156
- Barann M, Göthert M, Brüss M, Bönisch H (1999) Inhibition by steroids of [<sup>14</sup>C]-guanidinium flux through the voltage-gated sodium channel and the cation channel of the 5-HT<sub>3</sub> receptor of N1E-115 neuroblastoma cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 360:234-241
- Barann M, Dilger JP, Bönisch H, Göthert M, Dybek A, Urban BW (2000a) Inhibition of 5-HT<sub>3</sub> receptors by propofol: equilibrium and kinetic measurements. *Neuropharmacology* 39:1064-1074
- Barann M, Meder W, Dorner Z, Brüss M, Bönisch H, Göthert M, Urban BW (2000b) Recombinant human 5-HT<sub>3A</sub> receptors in outside-out patches of HEK 293 cells: basic properties and barbiturate effects. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362:255-265
- Barann M, Molderings G, Brüss M, Bönisch H, Urban BW, Göthert M (2002) Direct inhibition by cannabinoids of human 5-HT<sub>3A</sub> receptors: probable involvement of an allosteric modulatory site. *Br J Pharmacol* 137:589-596

- Barann M, Schmidt K, Göthert M, Urban BW, Bönisch H (2004) Influence of sodium substitutes on 5-HT-mediated effects at mouse 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Br J Pharmacol* 142:501-508
- Barnes NM, Cheng CH, Costall B, Ge J, Kelly ME, Naylor RJ (1992) Profiles of interaction of R(+)/S(-)-zacopride and anxiolytic agents in a mouse model. *Eur J Pharmacol* 218:91-100
- Barnes NM, Sharp T (1999) A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38:1083-1152
- Barrera NP, Herbert P, Henderson RM, Martin IL, Edwardson JM (2005) Atomic force microscopy reveals the stoichiometry and subunit arrangement of 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:12595-12600
- Baubet V, Le Mouellic H, Campbell AK, Lucas-Meunier E, Fossier P, Brulet P (2000) Chimeric green fluorescent protein-aequorin as bioluminescent Ca<sup>2+</sup> reporters at the single-cell level. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:7260-7265
- Beene DL, Brandt GS, Zhong W, Zacharias NM, Lester HA, Dougherty DA (2002) Cation- $\pi$  interactions in ligand recognition by serotonergic (5-HT<sub>3A</sub>) and nicotinic acetylcholine receptors: the anomalous binding properties of nicotine. *Biochemistry* 41:10262-10269
- Belelli D, Balcarek JM, Hope AG, Peters JA, Lambert JJ, Blackburn TP (1995) Cloning and functional expression of a human 5-hydroxytryptamine type 3A receptor subunit. *Mol Pharmacol* 48:1054-1062
- Ben Ami HC, Yassin L, Farah H, Michaeli A, Eshel M, Treinin M (2005) RIC-3 affects properties and quantity of nicotinic acetylcholine receptors via a mechanism that does not require the coiled-coil domains. *J Biol Chem* 280:28053-28060
- Bertrand D, Bertrand S, Cassar S, Gubbins E, Li J, Gopalakrishnan M (2008) Positive Allosteric Modulation of the  $\alpha$ 7 nAChR: Ligand Interactions with Distinct Binding Sites and Evidence for a Prominent Role of the M2-M3 Segment. *Mol Pharmacol* 74:1407-1416
- Blount P, Merlie JP (1991) BIP associates with newly synthesized subunits of the mouse muscle nicotinic receptor. *J Cell Biol* 113:1125-1132
- Blumenthal EM, Conroy WG, Romano SJ, Kassner PD, Berg DK (1997) Detection of functional nicotinic receptors blocked by alpha-bungarotoxin on PC12 cells and dependence of their expression on post-translational events. *J Neurosci* 17:6094-6104
- Boeijinga PH, Galvan M, Baron BM, Dudley MW, Siegel BW, Slone AL (1992) Characterization of the novel 5-HT<sub>3</sub> antagonists MDL 73147EF (dolasetron mesilate) and MDL 74156 in NG108-15 neuroblastoma x glioma cells. *Eur J Pharmacol* 219:9-13
- Boess FG, Beroukhim R, Martin IL (1995) Ultrastructure of the 5-hydroxytryptamine<sub>3</sub> receptor. *J Neurochem* 64:1401-1405
- Bönisch H, Barann M, Graupner J, Göthert M (1993) Characterization of 5-HT<sub>3</sub> receptors of N1E-115 neuroblastoma cells by use of the influx of the organic cation [14C]-guanidinium. *Br J Pharmacol* 108:436-442



- Bouzat C, Gumilar F, Spitzmaul G, Wang HL, Rayes D, Hansen SB, Taylor P, Sine SM (2004) Coupling of agonist binding to channel gating in an ACh-binding protein linked to an ion channel. *Nature* 430:896-900
- Boyd GW, Low P, Dunlop JI, Robertson LA, Vardy A, Lambert JJ, Peters JA, Connolly CN (2002) Assembly and cell surface expression of homomeric and heteromeric 5-HT<sub>3</sub> receptors: the role of oligomerization and chaperone proteins. *Mol Cell Neurosci* 21:38-50
- Boyd GW, Doward AI, Kirkness EF, Millar NS, Connolly CN (2003) Cell surface expression of 5-hydroxytryptamine type 3 receptors is controlled by an endoplasmic reticulum retention signal. *J Biol Chem* 278:27681-27687
- Bradley PB, Engel G, Feniuk W, Fozard JR, Humphrey PP, Middlemiss DN, Mylecharane EJ, Richardson BP, Saxena PR (1986) Proposals for the classification and nomenclature of functional receptors for 5-hydroxytryptamine. *Neuropharmacology* 25:563-576
- Brady CA, Stanford IM, Ali I, Lin L, Williams JM, Dubin AE, Hope AG, Barnes NM (2001) Pharmacological comparison of human homomeric 5-HT<sub>3A</sub> receptors versus heteromeric 5-HT<sub>3A/3B</sub> receptors. *Neuropharmacology* 41:282-284
- Brejc K, van Dijk WJ, Klaassen RV, Schuurmans M, van Der OJ, Smit AB, Sixma TK (2001) Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature* 411:269-276
- Brini M, Marsault R, Bastianutto C, Alvarez J, Pozzan T, Rizzuto R (1995) Transfected aequorin in the measurement of cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub>). A critical evaluation. *J Biol Chem* 270:9896-9903
- Brown AM, Hope AG, Lambert JJ, Peters JA (1998) Ion permeation and conduction in a human recombinant 5-HT<sub>3</sub> receptor subunit (h5-HT<sub>3A</sub>). *J Physiol* 507 ( Pt 3):653-665
- Brüss M, Barann M, Hayer-Zillgen M, Eucker T, Göthert M, Bönisch H (2000) Modified 5-HT<sub>3A</sub> receptor function by co-expression of alternatively spliced human 5-HT<sub>3A</sub> receptor isoforms. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 362:392-401
- Buisson B, Bertrand D (2001) Chronic exposure to nicotine upregulates the human (alpha)4((beta)2 nicotinic acetylcholine receptor function. *J Neurosci* 21:1819-1829
- Carland JE, Cooper MA, Sugiharto S, Jeong HJ, Lewis TM, Barry PH (2008) Charged residues in the intracellular loop affect the conductance of glycine alpha1 receptors. Abstract zur 18th Neuropharmacology Conference on Ligand-gated ion channels, Washington D C , USA
- Castejon AM, Paez X, Hernandez L, Cubeddu LX (1999) Use of intravenous microdialysis to monitor changes in serotonin release and metabolism induced by cisplatin in cancer patients: comparative effects of granisetron and ondansetron. *J Pharmacol Exp Ther* 291:960-966
- Castelan F, Castillo M, Mulet J, Sala S, Sala F, Dominguez DT, Criado M (2008) Molecular characterization and localization of the RIC-3 protein, an effector of nicotinic acetylcholine receptor expression. *J Neurochem* 105:617-627

- Castillo M, Mulet J, Gutierrez LM, Ortiz JA, Castelan F, Gerber S, Sala S, Sala F, Criado M (2005) Dual role of the RIC-3 protein in trafficking of serotonin and nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem* 280:27062-27068
- Chameau P, van Hooft JA (2006) Serotonin 5-HT(3) receptors in the central nervous system. *Cell Tissue Res* 326:573-581
- Chen C, Okayama H (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 7:2745-2752
- Chen D, Patrick JW (1997) The alpha-bungarotoxin-binding nicotinic acetylcholine receptor from rat brain contains only the alpha7 subunit. *J Biol Chem* 272:24024-24029
- Cheng A, McDonald NA, Connolly CN (2005) Cell surface expression of 5-hydroxytryptamine type 3 receptors is promoted by RIC-3. *J Biol Chem* 280:22502-22507
- Cheng A, Bollan KA, Greenwood SM, Irving AJ, Connolly CN (2007) Differential subcellular localization of RIC-3 isoforms and their role in determining 5-HT3 receptor composition. *J Biol Chem* 282:26158-26166
- 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* 22:3099-3108
- Chiesa A, Rapizzi E, Tosello V, Pinton P, de Virgilio M, Fogarty KE, Rizzuto R (2001) Recombinant aequorin and green fluorescent protein as valuable tools in the study of cell signalling. *Biochem J* 355:1-12
- Choi JS, Choi BH, Ahn HS, Kim MJ, Rhie DJ, Yoon SH, Min DS, Jo YH, Kim MS, Sung KW, Hahn SJ (2003) Mechanism of block by fluoxetine of 5-hydroxytryptamine3 (5-HT3)-mediated currents in NCB-20 neuroblastoma cells. *Biochem Pharmacol* 66:2125-2132
- Chu G, Hayakawa H, Berg P (1987) Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA. *Nucleic Acids Res* 15:1311-1326
- Cilansetron: KC9946 (2005). *Drugs R D* 6:169-173
- Combrink S (2008) Etablierung eines Aequorin-basierten Calcium-Influx-Assays und pharmakologische Charakterisierung natürlich vorkommender 5-HT3A-Rezeptorvarianten und neuer 5-HT3-Rezeptoruntereinheiten. *Dissertationsschrift; Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität Bonn*
- Connolly CN, Wafford KA (2004) The Cys-loop superfamily of ligand-gated ion channels: the impact of receptor structure on function. *Biochem Soc Trans* 32:529-534
- Cooper ST, Millar NS (1997) Host cell-specific folding and assembly of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit. *J Neurochem* 68:2140-2151
- Corringer PJ, Galzi JL, Eisele JL, Bertrand S, Changeux JP, Bertrand D (1995) Identification of a new component of the agonist binding site of the nicotinic alpha 7 homooligomeric receptor. *J Biol Chem* 270:11749-11752

- Couturier S, Bertrand D, Matter JM, Hernandez MC, Bertrand S, Millar N, Valera S, Barkas T, Ballivet M (1990) A neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit ( $\alpha$  7) is developmentally regulated and forms a homo-oligomeric channel blocked by  $\alpha$ -BTX. *Neuron* 5:847-856
- Cubeddu LX, Hoffmann IS, Fuenmayor NT, Finn AL (1990) Efficacy of ondansetron (GR 38032F) and the role of serotonin in cisplatin-induced nausea and vomiting. *N Engl J Med* 322:810-816
- Cubitt AB, Heim R, Adams SR, Boyd AE, Gross LA, Tsien RY (1995) Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci* 20:448-455
- Davies PA, Pistis M, Hanna MC, Peters JA, Lambert JJ, Hales TG, Kirkness EF (1999) The 5-HT<sub>3B</sub> subunit is a major determinant of serotonin-receptor function. *Nature* 397:359-363
- Davies PA, Wang W, Hales TG, Kirkness EF (2003) A novel class of ligand-gated ion channel is activated by Zn<sup>2+</sup>. *J Biol Chem* 278:712-717
- Derkach V, Surprenant A, North RA (1989) 5-HT<sub>3</sub> receptors are membrane ion channels. *Nature* 339:706-709
- Dickinson JA, Hanrott KE, Mok MH, Kew JN, Wonnacott S (2007) Differential coupling of  $\alpha$ 7 and non- $\alpha$ 7 nicotinic acetylcholine receptors to calcium-induced calcium release and voltage-operated calcium channels in PC12 cells. *J Neurochem* 100:1089-1096
- Dineley KT, Patrick JW (2000) Amino acid determinants of  $\alpha$  7 nicotinic acetylcholine receptor surface expression. *J Biol Chem* 275:13974-13985
- Dineley KT, Xia X, Bui D, Sweatt JD, Zheng H (2002) Accelerated plaque accumulation, associative learning deficits, and up-regulation of  $\alpha$  7 nicotinic receptor protein in transgenic mice co-expressing mutant human presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *J Biol Chem* 277:22768-22780
- Doucet E, Miquel MC, Nosjean A, Verge D, Hamon M, Emerit MB (2000) Immunolabeling of the rat central nervous system with antibodies partially selective of the short form of the 5-HT<sub>3</sub> receptor. *Neuroscience* 95:881-892
- Doucet E, Latremoliere A, Darmon M, Hamon M, Emerit MB (2007) Immunolabelling of the 5-HT<sub>3B</sub> receptor subunit in the central and peripheral nervous systems in rodents. *Eur J Neurosci* 26:355-366
- Drenan RM, Nashmi R, Imoukhuede P, Just H, McKinney S, Lester HA (2008) Subcellular trafficking, pentameric assembly, and subunit stoichiometry of neuronal nicotinic acetylcholine receptors containing fluorescently labeled  $\alpha$ 6 and  $\beta$ 3 subunits. *Mol Pharmacol* 73:27-41
- Drisdel RC, Manzana E, Green WN (2004) The role of palmitoylation in functional expression of nicotinic  $\alpha$ 7 receptors. *J Neurosci* 24:10502-10510
- Dubin AE, Huvar R, D'Andrea MR, Pyati J, Zhu JY, Joy KC, Wilson SJ, Galindo JE, Glass CA, Luo L, Jackson MR, Lovenberg TW, Erlander MG (1999) The pharmacological and functional characteristics of the serotonin 5-HT<sub>3A</sub> receptor are specifically modified by a 5-HT<sub>3B</sub> receptor subunit. *J Biol Chem* 274:30799-30810

- Dubin AE, Erlander MG, Huvar A, Huvar R, Buehler LK (2002) DNA encoding a human subunit 5-HT3C of the 5-HT3 serotonin receptor. US-Patent 6365370
- Dunlop J, Roncarati R, Jow B, Bothmann H, Lock T, Kowal D, Bowlby M, Terstappen GC (2007) In vitro screening strategies for nicotinic receptor ligands. *Biochem Pharmacol* 74:1172-1181
- Eisele JL, Bertrand S, Galzi JL, Devillers-Thierry A, Changeux JP, Bertrand D (1993) Chimaeric nicotinic-serotonergic receptor combines distinct ligand binding and channel specificities. *Nature* 366:479-483
- Eisensamer B, Rammes G, Gimpl G, Shapa M, Ferrari U, Hapfelmeier G, Bondy B, Parsons C, Gilling K, Zieglgansberger W, Holsboer F, Rupprecht R (2003) Antidepressants are functional antagonists at the serotonin type 3 (5-HT3) receptor. *Mol Psychiatry* 8:994-1007
- Elliott P, Seemungal BM, Wallis DI (1990) Antagonism of the effects of 5-hydroxytryptamine on the rabbit isolated vagus nerve by BRL 43694 and metoclopramide. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 341:503-509
- Fan P (1995) Cannabinoid agonists inhibit the activation of 5-HT3 receptors in rat nodose ganglion neurons. *J Neurophysiol* 73:907-910
- Faris PL, Kim SW, Meller WH, Goodale RL, Oakman SA, Hofbauer RD, Marshall AM, Daughters RS, Banerjee-Stevens D, Eckert ED, Hartman BK (2000) Effect of decreasing afferent vagal activity with ondansetron on symptoms of bulimia nervosa: a randomised, double-blind trial. *Lancet* 355:792-797
- Fasching PA, Kollmannsberger B, Strissel PL, Niesler B, Engel J, Kreis H, Lux MP, Weihbrecht S, Lausen B, Bani MR, Beckmann MW, Strick R (2008) Polymorphisms in the novel serotonin receptor subunit gene HTR3C show different risks for acute chemotherapy-induced vomiting after anthracycline chemotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol*
- Ferezou I, Cauli B, Hill EL, Rossier J, Hamel E, Lambolez B (2002) 5-HT3 receptors mediate serotonergic fast synaptic excitation of neocortical vasoactive intestinal peptide/cholecystokinin interneurons. *J Neurosci* 22:7389-7397
- Feuerbach D, Lingenhohl K, Dobbins P, Mosbacher J, Corbett N, Nozulak J, Hoyer D (2005) Coupling of human nicotinic acetylcholine receptors alpha 7 to calcium channels in GH3 cells. *Neuropharmacology* 48:215-227
- Fiebich BL, Akundi RS, Seidel M, Geyer V, Haus U, Muller W, Stratz T, Candelario-Jalil E (2004) Expression of 5-HT3A receptors in cells of the immune system. *Scand J Rheumatol Suppl* 9-11
- Fletcher S, Barnes NM (1998) Desperately seeking subunits: are native 5-HT3 receptors really homomeric complexes? *Trends Pharmacol Sci* 19:212-215
- Frank B, Niesler B, Nöthen MM, Neidt H, Propping P, Bondy B, Rietschel M, Maier W, Albus M, Rappold G (2004) Investigation of the human serotonin receptor gene HTR3B in bipolar affective and schizophrenic patients. *Am J Med Genet B Neuro-psychiatr Genet* 131:1-5

- Fucile S, Palma E, Mileo AM, Miledi R, Eusebi F (2000) Human neuronal threonine-for-leucine-248 alpha 7 mutant nicotinic acetylcholine receptors are highly Ca<sup>2+</sup> permeable. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3643-3648
- Fucile S, Renzi M, Lax P, Eusebi F (2003) Fractional Ca<sup>2+</sup> current through human neuronal alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium* 34:205-209
- Funahashi M, Mitoh Y, Matsuo R (2004) Activation of presynaptic 5-HT<sub>3</sub> receptors facilitates glutamatergic synaptic inputs to area postrema neurons in rat brain slices. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 26:615-622
- Gaddum JH, Picarelli ZP (1957) Two kinds of tryptamine receptor. *Br J Pharmacol Chemother* 12:323-328
- Galligan JJ (2002) Ligand-gated ion channels in the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 14:611-623
- Gee VJ, Kracun S, Cooper ST, Gibb AJ, Millar NS (2007) Identification of domains influencing assembly and ion channel properties in alpha 7 nicotinic receptor and 5-HT<sub>3</sub> receptor subunit chimaeras. *Br J Pharmacol* 152:501-512
- Gelman MS, Chang W, Thomas DY, Bergeron JJ, Prives JM (1995) Role of the endoplasmic reticulum chaperone calnexin in subunit folding and assembly of nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem* 270:15085-15092
- Gensler S, Sander A, Korngreen A, Traina G, Giese G, Witzemann V (2001) Assembly and clustering of acetylcholine receptors containing GFP-tagged epsilon or gamma subunits: selective targeting to the neuromuscular junction in vivo. *Eur J Biochem* 268:2209-2217
- Gershon MD (2000) 5-HT (serotonin) physiology and related drugs. *Curr Opin Gastroenterol* 16:113-120
- Gonzalez-Maeso J, Ang RL, Yuen T, Chan P, Weisstaub NV, Lopez-Gimenez JF, Zhou M, Okawa Y, Callado LF, Milligan G, Gingrich JA, Filizola M, Meana JJ, Sealfon SC (2008) Identification of a serotonin/glutamate receptor complex implicated in psychosis. *Nature* 452:93-97
- Gotti C, Clementi F (2004) Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol* 74:363-396
- Gotti C, Zoli M, Clementi F (2006) Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends Pharmacol Sci* 27:482-491
- Gotti C, Moretti M, Gaimarri A, Zanardi A, Clementi F, Zoli M (2007) Heterogeneity and complexity of native brain nicotinic receptors. *Biochem Pharmacol* 74:1102-1111
- Green T, Stauffer KA, Lummis SC (1995) Expression of recombinant homo-oligomeric 5-hydroxytryptamine<sub>3</sub> receptors provides new insights into their maturation and structure. *J Biol Chem* 270:6056-6061
- Green WN, Wanamaker CP (1997) The role of the cystine loop in acetylcholine receptor assembly. *J Biol Chem* 272:20945-20953

- Gronlien JH, Hakerud M, Ween H, Thorin-Hagene K, Briggs CA, Gopalakrishnan M, Malysz J (2007) Distinct profiles of alpha7 nAChR positive allosteric modulation revealed by structurally diverse chemotypes. *Mol Pharmacol* 72:715-724
- Grutter T, de Carvalho LP, Dufresne V, Taly A, Edelstein SJ, Changeux JP (2005) Molecular tuning of fast gating in pentameric ligand-gated ion channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:18207-18212
- Gunput MD (1999) Review article: clinical pharmacology of alosetron. *Aliment Pharmacol Ther* 13 Suppl 2:70-76
- Gunthorpe MJ, Peters JA, Gill CH, Lambert JJ, Lummis SC (2000) The 4'lysine in the putative channel lining domain affects desensitization but not the single-channel conductance of recombinant homomeric 5-HT3A receptors. *J Physiol* 522 Pt 2:187-198
- Gunthorpe MJ, Lummis SC (2001) Conversion of the ion selectivity of the 5-HT(3a) receptor from cationic to anionic reveals a conserved feature of the ligand-gated ion channel superfamily. *J Biol Chem* 276:10977-10983
- Gutierrez B, Arranz MJ, Huezio-Diaz P, Dempster D, Matthiasson P, Travis M, Munro J, Osborne S, Kerwin RW (2002) Novel mutations in 5-HT3A and 5-HT3B receptor genes not associated with clozapine response. *Schizophr Res* 58:93-97
- Hales TG, Tang H, Bollan KA, Johnson SJ, King DP, McDonald NA, Cheng A, Connolly CN (2005) The epilepsy mutation, gamma2(R43Q) disrupts a highly conserved inter-subunit contact site, perturbing the biogenesis of GABAA receptors. *Mol Cell Neurosci* 29:120-127
- Hales TG, Dunlop JI, Deeb TZ, Carland JE, Kelley SP, Lambert JJ, Peters JA (2006) Common determinants of single channel conductance within the large cytoplasmic loop of 5-hydroxytryptamine type 3 and alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem* 281:8062-8071
- Halevi S, McKay J, Palfreyman M, Yassin L, Eshel M, Jorgensen E, Treinin M (2002) The *C. elegans* ric-3 gene is required for maturation of nicotinic acetylcholine receptors. *EMBO J* 21:1012-1020
- Halevi S, Yassin L, Eshel M, Sala F, Sala S, Criado M, Treinin M (2003) Conservation within the RIC-3 gene family. Effectors of mammalian nicotinic acetylcholine receptor expression. *J Biol Chem* 278:34411-34417
- Hannon J, Hoyer D (2008) Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav Brain Res* 195:198-213
- Hapfelmeier G, Tredt C, Haseneder R, Zieglgansberger W, Eisensamer B, Rupprecht R, Rammes G (2003) Co-expression of the 5-HT3B serotonin receptor subunit alters the biophysics of the 5-HT3 receptor. *Biophys J* 84:1720-1733
- Hargreaves AC, Lummis SC, Taylor CW (1994) Ca<sup>2+</sup> permeability of cloned and native 5-hydroxytryptamine type 3 receptors. *Mol Pharmacol* 46:1120-1128
- Hayes MR, Covasa M (2005) CCK and 5-HT act synergistically to suppress food intake through simultaneous activation of CCK-1 and 5-HT3 receptors. *Peptides* 26:2322-2330

- Head JF, Inouye S, Teranishi K, Shimomura O (2000) The crystal structure of the photoprotein aequorin at 2.3 Å resolution. *Nature* 405:372-376
- Helekar SA, Patrick J (1997) Peptidyl prolyl cis-trans isomerase activity of cyclophilin A in functional homo-oligomeric receptor expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:5432-5437
- Hoffmann C, Gaietta G, Bunemann M, Adams SR, Oberdorff-Maass S, Behr B, Vilaradaga JP, Tsien RY, Ellisman MH, Lohse MJ (2005) A FIAsh-based FRET approach to determine G protein-coupled receptor activation in living cells. *Nat Methods* 2:171-176
- Horton RM, Cai ZL, Ho SN, Pease LR (1990) Gene splicing by overlap extension: tailor-made genes using the polymerase chain reaction. *Biotechniques* 8:528-535
- Hosie AM, Wilkins ME, da Silva HM, Smart TG (2006) Endogenous neurosteroids regulate GABA<sub>A</sub> receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature* 444:486-489
- Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP (1994) International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev* 46:157-203
- Hu XQ, Zhang L, Stewart RR, Weight FF (2003) Arginine 222 in the pre-transmembrane domain 1 of 5-HT<sub>3A</sub> receptors links agonist binding to channel gating. *J Biol Chem* 278:46583-46589
- Hu XQ, Sun H, Peoples RW, Hong R, Zhang L (2006) An interaction involving an arginine residue in the cytoplasmic domain of the 5-HT<sub>3A</sub> receptor contributes to receptor desensitization mechanism. *J Biol Chem* 281:21781-21788
- Hu XQ, Peoples RW (2007) Arginine 245 of the Pre-transmembrane Domain 1 Region Alters 2, 2, 2-Trichloroethanol Action in the 5-HT<sub>3A</sub> Receptor. *J Pharmacol Exp Ther*
- Hurst RS, Hajos M, Raggenbass M, Wall TM, Higdon NR, Lawson JA, Rutherford-Root KL, Berkenpas MB, Hoffmann WE, Piotrowski DW, Groppi VE, Allaman G, Ogier R, Bertrand S, Bertrand D, Arneric SP (2005) A novel positive allosteric modulator of the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor: in vitro and in vivo characterization. *J Neurosci* 25:4396-4405
- Ilegems E, Pick HM, Deluz C, Kellenberger S, Vogel H (2004) Noninvasive imaging of 5-HT<sub>3</sub> receptor trafficking in live cells: from biosynthesis to endocytosis. *J Biol Chem* 279:53346-53352
- Inouye S, Noguchi M, Sakaki Y, Takagi Y, Miyata T, Iwanaga S, Miyata T, Tsuji FI (1985) Cloning and sequence analysis of cDNA for the luminescent protein aequorin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:3154-3158
- Inouye S (2004) Blue fluorescent protein from the calcium-sensitive photoprotein aequorin is a heat resistant enzyme, catalyzing the oxidation of coelenterazine. *FEBS Lett* 577:105-110
- Israili ZH (2001) Clinical pharmacology of serotonin type 3 (5-HT<sub>3</sub>) antagonists. *Curr Med Chem -Central Nervous System Agents* 1:171-199

- Jansen M, Bali M, Akabas MH (2008) Modular design of Cys-loop ligand-gated ion channels: functional 5-HT<sub>3</sub> and GABA<sub>A</sub> receptors lacking the large cytoplasmic M3M4 loop. *J Gen Physiol* 131:137-146
- Jones IW, Wonnacott S (2004) Precise localization of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors on glutamatergic axon terminals in the rat ventral tegmental area. *J Neurosci* 24:11244-11252
- Kapeller J, Houghton LA, Monnikes H, Walstab J, Möller D, Bönisch H, Burwinkel B, Autschbach F, Funke B, Lasitschka F, Gassler N, Fischer C, Whorwell PJ, Atkinson W, Fell C, Buchner KJ, Schmidtman M, van dV, I, Wisser AS, Berg T, Rappold G, Niesler B (2008) First evidence for an association of a functional variant in the microRNA-510 target site of the serotonin receptor-type 3E gene with diarrhea predominant irritable bowel syndrome. *Hum Mol Genet* 17:2967-2977
- Karnovsky AM, Gotow LF, McKinley DD, Piechan JL, Ruble CL, Mills CJ, Schellin KA, Slightom JL, Fitzgerald LR, Benjamin CW, Roberds SL (2003) A cluster of novel serotonin receptor 3-like genes on human chromosome 3. *Gene* 319:137-148
- Kassner PD, Berg DK (1997) Differences in the fate of neuronal acetylcholine receptor protein expressed in neurons and stably transfected cells. *J Neurobiol* 33:968-982
- Ke L, Eisenhour CM, Bencherif M, Lukas RJ (1998) Effects of chronic nicotine treatment on expression of diverse nicotinic acetylcholine receptor subtypes. I. Dose- and time-dependent effects of nicotine treatment. *J Pharmacol Exp Ther* 286:825-840
- Keller SH, Lindstrom J, Ellisman M, Taylor P (2001) Adjacent basic amino acid residues recognized by the COP I complex and ubiquitination govern endoplasmic reticulum to cell surface trafficking of the nicotinic acetylcholine receptor alpha-Subunit. *J Biol Chem* 276:18384-18391
- Kelley SP, Dunlop JI, Kirkness EF, Lambert JJ, Peters JA (2003) A cytoplasmic region determines single-channel conductance in 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Nature* 424:321-324
- Keyser KT, Britto LR, Schoepfer R, Whiting P, Cooper J, Conroy W, Brozowska-Prechtl A, Karten HJ, Lindstrom J (1993) Three subtypes of alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors are expressed in chick retina. *J Neurosci* 13:442-454
- Khiroug SS, Harkness PC, Lamb PW, Sudweeks SN, Khiroug L, Millar NS, Yakel JL (2002) Rat nicotinic ACh receptor alpha7 and beta2 subunits co-assemble to form functional heteromeric nicotinic receptor channels. *J Physiol* 540:425-434
- Kilpatrick GJ, Butler A, Burridge J, Oxford AW (1990) 1-(m-chlorophenyl)-biguanide, a potent high affinity 5-HT<sub>3</sub> receptor agonist. *Eur J Pharmacol* 182:193-197
- Kittler JT, Wang J, Connolly CN, Vicini S, Smart TG, Moss SJ (2000) Analysis of GABA<sub>A</sub> receptor assembly in mammalian cell lines and hippocampal neurons using gamma 2 subunit green fluorescent protein chimeras. *Mol Cell Neurosci* 16:440-452
- Kleizen B, Braakman I (2004) Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol* 16:343-349
- Knight MR, Read ND, Campbell AK, Trewavas AJ (1993) Imaging calcium dynamics in living plants using semi-synthetic recombinant aequorins. *J Cell Biol* 121:83-90



- Koike K, Hashimoto K, Takai N, Shimizu E, Komatsu N, Watanabe H, Nakazato M, Okamura N, Stevens KE, Freedman R, Iyo M (2005) Tropicsetron improves deficits in auditory P50 suppression in schizophrenia. *Schizophr Res* 76:67-72
- Kostanian A (2005) Pharmakologische Eigenschaften natürlich vorkommender Varianten von h5-HT1A- und h5-HT3A-Rezeptoren. Dissertationsschrift; Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität Bonn
- Kracun S, Harkness PC, Gibb AJ, Millar NS (2008) Influence of the M3-M4 intracellular domain upon nicotinic acetylcholine receptor assembly, targeting and function. *Br J Pharmacol* 153:1474-1484
- Krzywkowski K (2006) Do polymorphisms in the human 5-HT3 genes contribute to pathological phenotypes? *Biochem Soc Trans* 34:872-876
- Krzywkowski K, Jensen AA, Connolly CN, Bräuner-Osborne H (2007) Naturally occurring variations in the human 5-HT3A gene profoundly impact 5-HT3 receptor function and expression. *Pharmacogenet Genomics* 17:255-266
- Krzywkowski K, Davies PA, Feinberg-Zadek PL, Bräuner-Osborne H, Jensen AA (2008) High-frequency HTR3B variant associated with major depression dramatically augments the signaling of the human 5-HT3AB receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:722-727
- Kurzweily D, Barann M, Kostanian A, Combrink S, Bönisch H, Göthert M, Brüss M (2004) Pharmacological and electrophysiological properties of the naturally occurring Pro391Arg variant of the human 5-HT3A receptor. *Pharmacogenetics* 14:165-172
- Lankiewicz S, Lobitz N, Wetzel CH, Rupprecht R, Gisselmann G, Hatt H (1998) Molecular cloning, functional expression, and pharmacological characterization of 5-hydroxytryptamine3 receptor cDNA and its splice variants from guinea pig. *Mol Pharmacol* 53:202-212
- Lankiewicz S, Huser MB, Heumann R, Hatt H, Gisselmann G (2000) Phosphorylation of the 5-hydroxytryptamine3 (5-HT3) receptor expressed in HEK293 cells. *Receptors Channels* 7:9-15
- Lansdell SJ, Gee VJ, Harkness PC, Doward AI, Baker ER, Gibb AJ, Millar NS (2005) RIC-3 enhances functional expression of multiple nicotinic acetylcholine receptor subtypes in mammalian cells. *Mol Pharmacol* 68:1431-1438
- Lansdell SJ, Collins T, Yabe A, Gee VJ, Gibb AJ, Millar NS (2008) Host-cell specific effects of the nicotinic acetylcholine receptor chaperone RIC-3 revealed by a comparison of human and Drosophila RIC-3 homologues. *J Neurochem* 105:1573-1581
- Leonard S, Breese C, Adams C, Benhammou K, Gault J, Stevens K, Lee M, Adler L, Olincy A, Ross R, Freedman R (2000) Smoking and schizophrenia: abnormal nicotinic receptor expression. *Eur J Pharmacol* 393:237-242
- Leonard S, Gault J, Hopkins J, Logel J, Vianzon R, Short M, Drebing C, Berger R, Venn D, Sirota P, Zerbe G, Olincy A, Ross RG, Adler LE, Freedman R (2002) Association of promoter variants in the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor subunit gene with an inhibitory deficit found in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 59:1085-1096
- Lester HA, Dibas MI, Dahan DS, Leite JF, Dougherty DA (2004) Cys-loop receptors: new twists and turns. *Trends Neurosci* 27:329-336

- Li GD, Chiara DC, Sawyer GW, Husain SS, Olsen RW, Cohen JB (2006) Identification of a GABAA receptor anesthetic binding site at subunit interfaces by photolabeling with an etomidate analog. *J Neurosci* 26:11599-11605
- Li ZS, Pham TD, Tamir H, Chen JJ, Gershon MD (2004) Enteric dopaminergic neurons: definition, developmental lineage, and effects of extrinsic denervation. *J Neurosci* 24:1330-1339
- Lindley C, Blower P (2000) Oral serotonin type 3-receptor antagonists for prevention of chemotherapy-induced emesis. *Am J Health Syst Pharm* 57:1685-1697
- Liu W, Thielen RJ, Rodd ZA, McBride WJ (2006) Activation of serotonin-3 receptors increases dopamine release within the ventral tegmental area of Wistar and alcohol-preferring (P) rats. *Alcohol* 40:167-176
- Livesey MR, Cooper MA, Deeb TZ, Carland JE, Kozuska J, Hales TG, Lambert JJ, Peters JA (2008) Structural determinants of Ca<sup>2+</sup> permeability and conduction in the human 5-hydroxytryptamine type 3A receptor. *J Biol Chem* 283:19301-19313
- Loring RH, Anandjiwala P, Gwalani L, Lee HK, O'Malley D (2008) Monitoring alpha7 nicotinic receptor protein folding, assembly and expression using GFP-tagged chimeric proteins. Abstract Society for Neuroscience-Meeting, Washington (DC, USA)
- Lovinger DM (1999) 5-HT<sub>3</sub> receptors and the neural actions of alcohols: an increasingly exciting topic. *Neurochem Int* 35:125-130
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
- Lummis SC, Beene DL, Lee LW, Lester HA, Broadhurst RW, Dougherty DA (2005) Cis-trans isomerization at a proline opens the pore of a neurotransmitter-gated ion channel. *Nature* 438:248-252
- Lummis SC, Thompson AJ (2008) The novel 5-HT<sub>3B</sub> receptor subunits brain 1 and brain 2 differentially alter 5-HT<sub>3</sub> receptor function. Abstract Society for Neuroscience-Meeting, Washington (DC, USA)
- Macor JE, Gurley D, Lanthorn T, Loch J, Mack RA, Mullen G, Tran O, Wright N, Gordon JC (2001) The 5-HT<sub>3</sub> antagonist tropisetron (ICS 205-930) is a potent and selective alpha7 nicotinic receptor partial agonist. *Bioorg Med Chem Lett* 11:319-321
- Maricq AV, Peterson AS, Brake AJ, Myers RM, Julius D (1991) Primary structure and functional expression of the 5HT<sub>3</sub> receptor, a serotonin-gated ion channel. *Science* 254:432-437
- Martin BR, Giepmans BN, Adams SR, Tsien RY (2005) Mammalian cell-based optimization of the biarsenical-binding tetracysteine motif for improved fluorescence and affinity. *Nat Biotechnol* 23:1308-1314
- Martin KF, Hannon S, Phillips I, Heal DJ (1992) Opposing roles for 5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>3</sub> receptors in the control of 5-HT release in rat hippocampus in vivo. *Br J Pharmacol* 106:139-142

- Mayer EA, Berman S, Derbyshire SW, Suyenobu B, Chang L, Fitzgerald L, Mandelkern M, Hamm L, Vogt B, Naliboff BD (2002) The effect of the 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist, alosetron, on brain responses to visceral stimulation in irritable bowel syndrome patients. *Aliment Pharmacol Ther* 16:1357-1366
- Meineke C, Tzvetkov MV, Bokelmann K, Oetjen E, Hirsch-Ernst K, Kaiser R, Brockmüller J (2008) Functional characterization of a -100\_-102delAAG deletion-insertion polymorphism in the promoter region of the HTR<sub>3B</sub> gene. *Pharmacogenet Genomics* 18:219-230
- Melke J, Westberg L, Nilsson S, Landen M, Soderstrom H, Baghaei F, Rosmond R, Holm G, Bjornorp P, Nilsson LG, Adolfsson R, Eriksson E (2003) A polymorphism in the serotonin receptor 3A (HTR<sub>3A</sub>) gene and its association with harm avoidance in women. *Arch Gen Psychiatry* 60:1017-1023
- Millar NS (2008) RIC-3: a nicotinic acetylcholine receptor chaperone. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1:S177-S183
- Millar NS, Gotti C (2008) Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology*
- Miller KG, Alfonso A, Nguyen M, Crowell JA, Johnson CD, Rand JB (1996) A genetic selection for *Caenorhabditis elegans* synaptic transmission mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:12593-12598
- Minami M, Endo T, Hirafuji M, Hamaue N, Liu Y, Hiroshige T, Nemoto M, Saito H, Yoshioka M (2003) Pharmacological aspects of anticancer drug-induced emesis with emphasis on serotonin release and vagal nerve activity. *Pharmacol Ther* 99:149-165
- Miquel MC, Emerit MB, Nosjean A, Simon A, Rumajogee P, Brisorgueil MJ, Doucet E, Hamon M, Verge D (2002) Differential subcellular localization of the 5-HT<sub>3A</sub> receptor subunit in the rat central nervous system. *Eur J Neurosci* 15:449-457
- Miyake A, Mochizuki S, Takemoto Y, Akuzawa S (1995) Molecular cloning of human 5-hydroxytryptamine<sub>3</sub> receptor: heterogeneity in distribution and function among species. *Mol Pharmacol* 48:407-416
- Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Unwin N (2003) Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* 423:949-955
- Mochizuki S, Miyake A, Furuichi K (1999) Ion permeation properties of a cloned human 5-HT<sub>3</sub> receptor transiently expressed in HEK 293 cells. *Amino Acids* 17:243-255
- Monk SA, Desai K, Brady CA, Williams JM, Lin L, Princivale A, Hope AG, Barnes NM (2001) Generation of a selective 5-HT<sub>3B</sub> subunit-recognising polyclonal antibody; identification of immunoreactive cells in rat hippocampus. *Neuropharmacology* 41:1013-1016
- Monk SA, Williams JM, Hope AG, Barnes NM (2004) Identification and importance of N-glycosylation of the human 5-hydroxytryptamine<sub>3A</sub> receptor subunit. *Biochem Pharmacol* 68:1787-1796
- Moroni M, Zwart R, Sher E, Cassels BK, Bermudez I (2006)  $\alpha$ 4 $\beta$ 2 nicotinic receptors with high and low acetylcholine sensitivity: pharmacology, stoichiometry, and sensitivity to long-term exposure to nicotine. *Mol Pharmacol* 70:755-768

- Mott DD, Erreger K, Banke TG, Traynelis SF (2001) Open probability of homomeric murine 5-HT<sub>3A</sub> serotonin receptors depends on subunit occupancy. *J Physiol* 535:427-443
- Mukerji J, Haghighi A, Seguela P (1996) Immunological characterization and transmembrane topology of 5-hydroxytryptamine<sub>3</sub> receptors by functional epitope tagging. *J Neurochem* 66:1027-1032
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-350
- Nashmi R, Dickinson ME, McKinney S, Jareb M, Labarca C, Fraser SE, Lester HA (2003) Assembly of alpha<sub>4</sub>beta<sub>2</sub> nicotinic acetylcholine receptors assessed with functional fluorescently labeled subunits: effects of localization, trafficking, and nicotine-induced upregulation in clonal mammalian cells and in cultured midbrain neurons. *J Neurosci* 23:11554-11567
- Nelson ME, Kuryatov A, Choi CH, Zhou Y, Lindstrom J (2003) Alternate stoichiometries of alpha<sub>4</sub>beta<sub>2</sub> nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* 63:332-341
- Newberry NR, Watkins CJ, Sprosen TS, Blackburn TP, Grahame-Smith DG, Leslie RA (1993) BRL 46470 potently antagonizes neural responses activated by 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Neuropharmacology* 32:729-735
- Nguyen M, Alfonso A, Johnson CD, Rand JB (1995) *Caenorhabditis elegans* mutants resistant to inhibitors of acetylcholinesterase. *Genetics* 140:527-535
- Niesler B, Flohr T, Nöthen MM, Fischer C, Rietschel M, Franzek E, Albus M, Propping P, Rappold GA (2001a) Association between the 5' UTR variant C178T of the serotonin receptor gene HTR3A and bipolar affective disorder. *Pharmacogenetics* 11:471-475
- Niesler B, Weiss B, Fischer C, Nöthen MM, Propping P, Bondy B, Rietschel M, Maier W, Albus M, Franzek E, Rappold GA (2001b) Serotonin receptor gene HTR3A variants in schizophrenic and bipolar affective patients. *Pharmacogenetics* 11:21-27
- Niesler B, Frank B, Kapeller J, Rappold GA (2003) Cloning, physical mapping and expression analysis of the human 5-HT<sub>3</sub> serotonin receptor-like genes HTR3C, HTR3D and HTR3E. *Gene* 310:101-111
- Niesler B, Walstab J, Combrink S, Möller D, Kapeller J, Rietdorf J, Bönisch H, Göthert M, Rappold G, Brüss M (2007) Characterization of the novel human serotonin receptor subunits 5-HT<sub>3C</sub>, 5-HT<sub>3D</sub>, and 5-HT<sub>3E</sub>. *Mol Pharmacol* 72:8-17
- Olale F, Gerzanich V, Kuryatov A, Wang F, Lindstrom J (1997) Chronic nicotine exposure differentially affects the function of human alpha<sub>3</sub>, alpha<sub>4</sub>, and alpha<sub>7</sub> neuronal nicotinic receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* 283:675-683
- Oz M, Zhang L, Ravindran A, Morales M, Lupica CR (2004) Differential effects of endogenous and synthetic cannabinoids on alpha<sub>7</sub>-nicotinic acetylcholine receptor-mediated responses in *Xenopus* Oocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 310:1152-1160
- Panicker S, Cruz H, Arrabit C, Slesinger PA (2002) Evidence for a centrally located gate in the pore of a serotonin-gated ion channel. *J Neurosci* 22:1629-1639

- Papke RL, Schiff HC, Jack BA, Horenstein NA (2005) Molecular dissection of tropisetron, an alpha7 nicotinic acetylcholine receptor-selective partial agonist. *Neurosci Lett* 378:140-144
- Paudice P, Raiteri M (1991) Cholecystokinin release mediated by 5-HT3 receptors in rat cerebral cortex and nucleus accumbens. *Br J Pharmacol* 103:1790-1794
- Peng JH, Lucero L, Fryer J, Herl J, Leonard SS, Lukas RJ (1999) Inducible, heterologous expression of human alpha7-nicotinic acetylcholine receptors in a native nicotinic receptor-null human clonal line. *Brain Res* 825:172-179
- Peng JH, Fryer JD, Hurst RS, Schroeder KM, George AA, Morrissy S, Groppi VE, Leonard SS, Lukas RJ (2005) High-affinity epibatidine binding of functional, human alpha7-nicotinic acetylcholine receptors stably and heterologously expressed de novo in human SH-EP1 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 313:24-35
- Peters JA, Hales TG, Lambert JJ (2005) Molecular determinants of single-channel conductance and ion selectivity in the Cys-loop family: insights from the 5-HT3 receptor. *Trends Pharmacol Sci* 26:587-594
- Placzek AN, Grassi F, Meyer EM, Papke RL (2005) An alpha7 nicotinic acetylcholine receptor gain-of-function mutant that retains pharmacological fidelity. *Mol Pharmacol* 68:1863-1876
- Prasher D, McCann RO, Cormier MJ (1985) Cloning and expression of the cDNA coding for aequorin, a bioluminescent calcium-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 126:1259-1268
- Pratt GD, Bowery NG, Kilpatrick GJ, Leslie RA, Barnes NM, Naylor RJ, Jones BJ, Nelson DR, Palacios JM, Slater P, . (1990) Consensus meeting agrees distribution of 5-HT3 receptors in mammalian hindbrain. *Trends Pharmacol Sci* 11:135-137
- Prendergast FG (2000) Bioluminescence illuminated. *Nature* 405:291-293
- Price KL, Lummis SC (2004) The role of tyrosine residues in the extracellular domain of the 5-hydroxytryptamine3 receptor. *J Biol Chem* 279:23294-23301
- Puchacz E, Buisson B, Bertrand D, Lukas RJ (1994) Functional expression of nicotinic acetylcholine receptors containing rat alpha 7 subunits in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *FEBS Lett* 354:155-159
- Quik M, Choremis J, Komourian J, Lukas RJ, Puchacz E (1996) Similarity between rat brain nicotinic alpha-bungarotoxin receptors and stably expressed alpha-bungarotoxin binding sites. *J Neurochem* 67:145-154
- Quiram PA, Ohno K, Milone M, Patterson MC, Pruitt NJ, Brengman JM, Sine SM, Engel AG (1999) Mutation causing congenital myasthenia reveals acetylcholine receptor beta/delta subunit interaction essential for assembly. *J Clin Invest* 104:1403-1410
- Rangwala F, Drisdell RC, Rakhilin S, Ko E, Atluri P, Harkins AB, Fox AP, Salman SS, Green WN (1997) Neuronal alpha-bungarotoxin receptors differ structurally from other nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci* 17:8201-8212
- Rapport MM, Green AA, Page IH (1948) Crystalline Serotonin. *Science* 108:329-330

- Rayes D, Spitzmaul G, Sine SM, Bouzat C (2005) Single-channel kinetic analysis of chimeric alpha7-5HT3A receptors. *Mol Pharmacol* 68:1475-1483
- Reeves DC, Sayed MF, Chau PL, Price KL, Lummis SC (2003) Prediction of 5-HT3 receptor agonist-binding residues using homology modeling. *Biophys J* 84:2338-2344
- Ridgway EB, Ashley CC (1967) Calcium transients in single muscle fibers. *Biochem Biophys Res Commun* 29:229-234
- Rizzo WB, Schulman JD, Mukherjee AB (1983) Liposome-mediated transfer of simian virus 40 DNA and minichromosome into mammalian cells. *J Gen Virol* 64 (Pt 4):911-919
- Roerig B, Nelson DA, Katz LC (1997) Fast synaptic signaling by nicotinic acetylcholine and serotonin 5-HT3 receptors in developing visual cortex. *J Neurosci* 17:8353-8362
- Roncarati R, Seredenina T, Jow B, Jow F, Papini S, Kramer A, Bothmann H, Dunlop J, Terstappen GC (2008) Functional properties of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors co-expressed with RIC-3 in a stable recombinant CHO-K1 cell line. *Assay Drug Dev Technol* 6:181-193
- Round A, Wallis DI (1986) The depolarizing action of 5-hydroxytryptamine on rabbit vagal afferent and sympathetic neurones in vitro and its selective blockade by ICS 205-930. *Br J Pharmacol* 88:485-494
- Rüsch D, Musset B, Wulf H, Schuster A, Raines DE (2007) Subunit-dependent modulation of the 5-hydroxytryptamine type 3 receptor open-close equilibrium by n-alcohols. *J Pharmacol Exp Ther* 321:1069-1074
- Sala F, Mulet J, Sala S, Gerber S, Criado M (2005) Charged amino acids of the N-terminal domain are involved in coupling binding and gating in alpha7 nicotinic receptors. *J Biol Chem* 280:6642-6647
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-5467
- Schofield CM, Jenkins A, Harrison NL (2003) A highly conserved aspartic acid residue in the signature disulfide loop of the alpha 1 subunit is a determinant of gating in the glycine receptor. *J Biol Chem* 278:34079-34083
- Schroeder KM, Wu J, Zhao L, Lukas RJ (2003) Regulation by cycloheximide and lowered temperature of cell-surface alpha7-nicotinic acetylcholine receptor expression on transfected SH-EP1 cells. *J Neurochem* 85:581-591
- Seguela P, Wadiche J, Dineley-Miller K, Dani JA, Patrick JW (1993) Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J Neurosci* 13:596-604
- Sepulveda MI, Lummis SC, Martin IL (1991) The agonist properties of m-chlorophenylbiguanide and 2-methyl-5-hydroxytryptamine on 5-HT3 receptors in N1E-115 neuroblastoma cells. *Br J Pharmacol* 104:536-540

- Sher E, Chen Y, Sharples TJ, Broad LM, Benedetti G, Zwart R, McPhie GI, Pearson KH, Baldwinson T, De Filippi G (2004) Physiological roles of neuronal nicotinic receptor subtypes: new insights on the nicotinic modulation of neurotransmitter release, synaptic transmission and plasticity. *Curr Top Med Chem* 4:283-297
- Sheu YA, Kricka LJ, Pritchett DB (1993) Measurement of intracellular calcium using bioluminescent aequorin expressed in human cells. *Anal Biochem* 209:343-347
- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 59:223-239
- Shimomura O, Johnson FH, Morise H (1974) Mechanism of the luminescent intramolecular reaction of aequorin. *Biochemistry* 13:3278-3286
- Shimomura O, Johnson FH (1978) Peroxidized coelenterazine, the active group in the photoprotein aequorin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:2611-2615
- Shimomura O, Kishi Y, Inouye S (1993) The relative rate of aequorin regeneration from apoaequorin and coelenterazine analogues. *Biochem J* 296 ( Pt 3):549-551
- Shimomura O (1995a) Cause of spectral variation in the luminescence of semisynthetic aequorins. *Biochem J* 306 ( Pt 2):537-543
- Shimomura O (1995b) Luminescence of aequorin is triggered by the binding of two calcium ions. *Biochem Biophys Res Commun* 211:359-363
- Solt K, Stevens RJ, Davies PA, Raines DE (2005) General anesthetic-induced channel gating enhancement of 5-hydroxytryptamine type 3 receptors depends on receptor subunit composition. *J Pharmacol Exp Ther* 315:771-776
- Solt K, Ruesch D, Forman SA, Davies PA, Raines DE (2007) Differential effects of serotonin and dopamine on human 5-HT<sub>3A</sub> receptor kinetics: interpretation within an allosteric kinetic model. *J Neurosci* 27:13151-13160
- Späth M, Stratz T, Färber L, Haus U, Pongratz D (2004) Treatment of fibromyalgia with tropisetron--dose and efficacy correlations. *Scand J Rheumatol Suppl* 63-66
- Spier AD, Wotherspoon G, Nayak SV, Nichols RA, Priestley JV, Lummis SC (1999) Antibodies against the extracellular domain of the 5-HT<sub>3</sub> receptor label both native and recombinant receptors. *Brain Res Mol Brain Res* 67:221-230
- Spier AD, Lummis SC (2000) The role of tryptophan residues in the 5-Hydroxytryptamine(3) receptor ligand binding domain. *J Biol Chem* 275:5620-5625
- Stevens R, Rüsck D, Solt K, Raines DE, Davies PA (2005) Modulation of human 5-hydroxytryptamine type 3AB receptors by volatile anesthetics and n-alcohols. *J Pharmacol Exp Ther* 314:338-345
- Sugai T, Suzuki Y, Sawamura K, Fukui N, Inoue Y, Someya T (2006) The effect of 5-hydroxytryptamine 3A and 3B receptor genes on nausea induced by paroxetine. *Pharmacogenomics J* 6:351-356
- Sun H, Hu XQ, Moradel EM, Weight FF, Zhang L (2003) Modulation of 5-HT<sub>3</sub> receptor-mediated response and trafficking by activation of protein kinase C. *J Biol Chem* 278:34150-34157

- Sun H, Xiong W, Lovinger DM, Zhang L (2008) Molecular determinants of PKC modulation of 5-HT<sub>3A</sub> receptor function and trafficking. Abstract Society for Neuroscience-Meeting, Washington (DC, USA)
- Suzuki Y, Sawamura K, Someya T (2006) Polymorphisms in the 5-hydroxytryptamine 2A receptor and CytochromeP4502D6 genes synergistically predict fluvoxamine-induced side effects in japanese depressed patients. *Neuropsychopharmacology* 31:825-831
- Sweileh W, Wenberg K, Xu J, Forsayeth J, Hardy S, Loring RH (2000) Multistep expression and assembly of neuronal nicotinic receptors is both host-cell- and receptor-subtype-dependent. *Brain Res Mol Brain Res* 75:293-302
- Tack J, Fried M, Houghton LA, Spicak J, Fisher G (2006) Systematic review: the efficacy of treatments for irritable bowel syndrome--a European perspective. *Aliment Pharmacol Ther* 24:183-205
- Tecott LH, Maricq AV, Julius D (1993) Nervous system distribution of the serotonin 5-HT<sub>3</sub> receptor mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:1430-1434
- Thompson AJ, Price KL, Reeves DC, Chan SL, Chau PL, Lummis SC (2005) Locating an antagonist in the 5-HT<sub>3</sub> receptor binding site using modeling and radioligand binding. *J Biol Chem* 280:20476-20482
- Thompson AJ, Lummis SC (2006) 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Curr Pharm Des* 12:3615-3630
- Thompson AJ, Padgett CL, Lummis SC (2006) Mutagenesis and molecular modeling reveal the importance of the 5-HT<sub>3</sub> receptor F-loop. *J Biol Chem* 281:16576-16582
- Thompson AJ, Lummis SC (2007) The 5-HT<sub>3</sub> receptor as a therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets* 11:527-540
- Tremblay PB, Kaiser R, Sezer O, Rosler N, Schelenz C, Possinger K, Roots I, Brockmüller J (2003) Variations in the 5-hydroxytryptamine type 3B receptor gene as predictors of the efficacy of antiemetic treatment in cancer patients. *J Clin Oncol* 21:2147-2155
- Tunaru S, Kero J, Schaub A, Wufka C, Blaukat A, Pfeffer K, Offermanns S (2003) PUMA-G and HM74 are receptors for nicotinic acid and mediate its anti-lipolytic effect. *Nat Med* 9:352-355
- Turner TJ, Mokler DJ, Luebke JI (2004) Calcium influx through presynaptic 5-HT<sub>3</sub> receptors facilitates GABA release in the hippocampus: in vitro slice and synaptosome studies. *Neuroscience* 129:703-718
- Tzvetkov MV, Meineke C, Oetjen E, Hirsch-Ernst K, Brockmüller J (2007) Tissue-specific alternative promoters of the serotonin receptor gene HTR3B in human brain and intestine. *Gene* 386:52-62
- Unwin N (2005) Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *J Mol Biol* 346:967-989
- Upward JW, Arnold BD, Link C, Pierce DM, Allen A, Tasker TC (1990) The clinical pharmacology of granisetron (BRL 43694), a novel specific 5-HT<sub>3</sub> antagonist. *Eur J Cancer* 26 Suppl 1:S12-S15



- van Hooft JA, Vijverberg HP (1996) Selection of distinct conformational states of the 5-HT<sub>3</sub> receptor by full and partial agonists. *Br J Pharmacol* 117:839-846
- van Hooft JA, Yakel JL (2003) 5-HT<sub>3</sub> receptors in the CNS: 3B or not 3B? *Trends Pharmacol Sci* 24:157-160
- Venkataraman P, Venkatachalan SP, Joshi PR, Muthalagi M, Schulte MK (2002) Identification of critical residues in loop E in the 5-HT<sub>3</sub>ASR binding site. *BMC Biochem* 3:15
- Venton BJ, Zhang H, Garris PA, Phillips PE, Sulzer D, Wightman RM (2003) Real-time decoding of dopamine concentration changes in the caudate-putamen during tonic and phasic firing. *J Neurochem* 87:1284-1295
- Virginio C, Giacometti A, Aldegheri L, Rimland JM, Terstappen GC (2002) Pharmacological properties of rat alpha 7 nicotinic receptors expressed in native and recombinant cell systems. *Eur J Pharmacol* 445:153-161
- Wallis DI, North RA (1978) The action of 5-hydroxytryptamine on single neurones of the rabbit superior cervical ganglion. *Neuropharmacology* 17:1023-1028
- Walstab J, Combrink S, Brüss M, Göthert M, Niesler B, Bönisch H (2007) Aequorin luminescence-based assay for 5-hydroxytryptamine (serotonin) type 3 receptor characterization. *Anal Biochem* 368:185-192
- Wang HY, Li W, Benedetti NJ, Lee DH (2003) Alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors mediate beta-amyloid peptide-induced tau protein phosphorylation. *J Biol Chem* 278:31547-31553
- Weiss B, Mertz A, Schrock E, Koenen M, Rappold G (1995) Assignment of a human homolog of the mouse Htr3 receptor gene to chromosome 11q23.1-q23.2. *Genomics* 29:304-305
- Wetzel CH, Hermann B, Behl C, Pestel E, Rammes G, Zieglgänsberger W, Holsboer F, Rupprecht R (1998) Functional antagonism of gonadal steroids at the 5-hydroxytryptamine type 3 receptor. *Mol Endocrinol* 12:1441-1451
- Williams ME, Brust PF, Feldman DH, Patthi S, Simerson S, Maroufi A, McCue AF, Velicelebi G, Ellis SB, Harpold MM (1992) Structure and functional expression of an omega-conotoxin-sensitive human N-type calcium channel. *Science* 257:389-395
- Williams ME, Burton B, Urrutia A, Shcherbatko A, Chavez-Noriega LE, Cohen CJ, Aiyar J (2005) Ric-3 promotes functional expression of the nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit in mammalian cells. *J Biol Chem* 280:1257-1263
- Wong EH, Clark R, Leung E, Loury D, Bonhaus DW, Jakeman L, Parnes H, Whiting RL, Eglen RM (1995) The interaction of RS 25259-197, a potent and selective antagonist, with 5-HT<sub>3</sub> receptors, in vitro. *Br J Pharmacol* 114:851-859
- Wurglics M, Spiegl F (2007) Postoperative Nausea und Emesis (PONV). Pathophysiologie, Risikofaktoren und Therapie. *Pharm Unserer Zeit* 36:368-372
- Yakel JL, Lagrutta A, Adelman JP, North RA (1993) Single amino acid substitution affects desensitization of the 5-hydroxytryptamine type 3 receptor expressed in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:5030-5033

- Yamada K, Hattori E, Iwayama Y, Ohnishi T, Ohba H, Toyota T, Takao H, Minabe Y, Nakatani N, Higuchi T, Detera-Wadleigh SD, Yoshikawa T (2006) Distinguishable haplotype blocks in the HTR3A and HTR3B region in the Japanese reveal evidence of association of HTR3B with female major depression. *Biol Psychiatry* 60:192-201
- Yan D, Schulte MK, Bloom KE, White MM (1999) Structural features of the ligand-binding domain of the serotonin 5HT<sub>3</sub> receptor. *J Biol Chem* 274:5537-5541
- Yu XM, Hall ZW (1994) A sequence in the main cytoplasmic loop of the alpha subunit is required for assembly of mouse muscle nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron* 13:247-255
- Zeitl KP, Guy N, Malmberg AB, Dirajlal S, Martin WJ, Sun L, Bonhaus DW, Stucky CL, Julius D, Basbaum AI (2002) The 5-HT<sub>3</sub> subtype of serotonin receptor contributes to nociceptive processing via a novel subset of myelinated and unmyelinated nociceptors. *J Neurosci* 22:1010-1019
- Zhao L, Kuo YP, George AA, Peng JH, Purandare MS, Schroeder KM, Lukas RJ, Wu J (2003) Functional properties of homomeric, human alpha 7-nicotinic acetylcholine receptors heterologously expressed in the SH-EP1 human epithelial cell line. *J Pharmacol Exp Ther* 305:1132-1141
- Zwart R, Vijverberg HP (1998) Four pharmacologically distinct subtypes of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol Pharmacol* 54:1124-1131
- Zwart R, De Filippi G, Broad LM, McPhie GI, Pearson KH, Baldwinson T, Sher E (2002) 5-Hydroxyindole potentiates human alpha 7 nicotinic receptor-mediated responses and enhances acetylcholine-induced glutamate release in cerebellar slices. *Neuropharmacology* 43:374-384

## 2. Eigene Veröffentlichungen während der Doktorarbeit

### 2.1 Originalarbeiten

- Niesler B, Walstab J, Combrink S, Möller D, Kapeller J, Rietdorf J, Bönisch H, Göthert M, Rappold G, Brüss M (2007) Characterization of the novel human serotonin receptor subunits 5-HT<sub>3C</sub>, 5-HT<sub>3D</sub>, and 5-HT<sub>3E</sub>. *Mol Pharmacol* 72:8-17
- Walstab J, Combrink S, Brüss M, Göthert M, Niesler B, Bönisch H (2007) Aequorin luminescence-based assay for 5-hydroxytryptamine (serotonin) type 3 receptor characterization. *Anal Biochem* 368:185-192
- Bert B, Fink H, Rothe J, Walstab J, Bönisch H (2008) Learning and memory in 5-HT(1A)-receptor mutant mice. *Behav Brain Res* 195:78-85
- Walstab J, Hammer C, Bönisch H, Rappold G, Niesler B (2008) Naturally occurring variants in the *HTR3B* gene significantly alter properties of human heteromeric 5-hydroxytryptamine-3A/B receptors. *Pharmacogenet Genomics* 18:793-802

Kapeller J, Houghton LA, Mönnikes H, Walstab J, Möller D, Bönisch H, Burwinkel B, Autschbach F, Funke B, Lasitschka F, Gassler N, Fischer C, Whorwell PJ, Atkinson W, Fell C, Buchner KJ, Schmidtmann M, van der Voort I, Wisser AS, Berg T, Rappold G, Niesler B (2008) First evidence for an association of a functional variant in the microRNA-510 target site of the serotonin receptor-type 3E gene with diarrhea predominant irritable bowel syndrome. *Hum Mol Genet* 17:2967-2977

## 2.2 Kongressbeiträge

### Vortrag

Walstab J, Hammer C, Niesler B, Rappold G, Bönisch H (2008) Impact of naturally occurring variations in the HTR3B gene on heteromeric 5-HT<sub>3A/B</sub> receptors. *Progr No 314.7 Abstract Viewer Itinerary Planner, Washington D.C.: Society for Neuroscience [38<sup>th</sup> Annual Meeting of the SfN, Washington DC, USA]*

### Weitere Beiträge

Brüss M, Walstab J, Combrink S, Kurzwelly D, Bönisch H, Niesler B (2006) Molecular pharmacology of 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Pharmacological Reports* 58:257-258 [Vortrag B. Niesler; Symposium anlässlich der Emeritierung von Prof. Dr. M. Göthert, Bonn]

Niesler B, Combrink S, Walstab J, Möller D, Kapeller J, Bönisch H, Rietdorf J, Göthert M, Rappold G, Brüss M (2006) Functional characterization of the novel human serotonin receptor subunits 5-HT<sub>3C</sub>, 5-HT<sub>3D</sub> and 5-HT<sub>3E</sub> in HEK293 cells. [Poster; 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the SfN Atlanta, GA, USA]

Niesler B, Combrink S, Walstab J, Möller D, Kapeller J, Bönisch H, Rietdorf J, Göthert M, Rappold G, Brüss M (2006) Functional characterization of the novel human serotonin receptor subunits 5-HT<sub>3C</sub>, 5-HT<sub>3D</sub> and 5-HT<sub>3E</sub> in HEK293 cells. [Poster; NGFN Meeting, Heidelberg]

Walstab J, Combrink S, Brüss M, Göthert M, Niesler B, Bönisch H (2007) Establishment of an aequorin luminescence-based Calcium assay in a 96-well format for the characterization of 5-HT<sub>3</sub> receptors *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 375:4 [Poster; Frühjahrstagung der DGPT, Mainz]

Kapeller J, Houghton LA, Walstab J, Moeller D, Boenisch H, Autschbach F, Gassler N, Fischer C, Whorwell PJ, Atkinson W, Fell C, Rappold G, Niesler B (2007) Evidence for an increased expression of serotonin receptor type 3 genes in irritable bowel syndrome with diarrhea. [Poster; NGFN Meeting, Heidelberg]

Niesler B, Combrink S, Walstab J, Möller D, Kapeller J, Rietdorf J, Bönisch H, Rappold G, Brüss M, Göthert M (2007) Novel human serotonin 3 receptor subunits 5-HT<sub>3C</sub>, 5-HT<sub>3D</sub> and 5-HT<sub>3E</sub>: pharmacological and functional characterization. *Pharmacological Reports* 59:55 [Poster; XV<sup>th</sup> International Congress of the Polish Pharmacological Society, Breslau, Polen]

Walstab J, Hammer C, Niesler B, Rappold G, Bönisch H (2008) Functional characterization of naturally occurring variants of the human 5-HT<sub>3B</sub> receptor subunit. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 377:19 (Suppl 1) [Poster; Frühjahrstagung der DGPT, Mainz]

- Göthert M, Walstab J, Combrink S, Kostanian A, Barann M, Bruess M, Bönisch H (2008) Pharmacological and electrophysiological characterization of the naturally occurring Arg(344)His variant of the human 5-HT<sub>3A</sub> receptor. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 22:124 (Suppl 2) [Poster; Serotonin Club - EPHAR 2008 Satellite Meeting, Oxford, G.B.]
- Kapeller J, Houghton L, Walstab J, Möller D, Bönisch H, Autschbach F, Gassler N, Fischer C, Whorwell P, Atkinson W, Fell C, Rappold G, Niesler B (2008) Elevated expression of serotonin receptor type 3 genes contribute to irritable bowel syndrome with diarrhea [Vortrag J. Kapeller; Annual Meeting of the German Society of Human Genetics, Hannover]
- Kapeller J, Houghton LA, Walstab J, Moeller D, Boenisch H, Autschbach F, Gassler N, Fischer C, Whorwell PJ, Atkinson W, Fell C, Rappold G, Niesler B (2008) Evidence for an increased expression of serotonin receptor type 3 genes in irritable bowel syndrome with diarrhea. *Gastroenterology* 134:A682 [Poster; Digestive Disease Week, Washington DC, USA]
- Kapeller J, Houghton LA, Walstab J, Moeller D, Boenisch H, Autschbach F, Gassler N, Fischer C, Whorwell PJ, Atkinson W, Fell C, Rappold G, Niesler B (2008) (2008) Elevated expression of serotonin receptor type 3 genes contribute to irritable bowel syndrome with diarrhea [Vortrag J. Kapeller; Annual Meeting of the European Society of Human Genetics, Barcelona, Spanien]
- Kapeller J, Houghton L, Mönnikes H, Walstab J, Moeller D, Bönisch H, Burwinkel B, Autschbach F, Gassler N, Fischer C, Whorwell P, Atkinson W, Fell C, Buchner K, Schmidtmann M, van der Voort I, Wisser AS, Berg T, Rappold G, Niesler B (2008) A functional variant in the miR-510 target site of the serotonin receptor type 3E gene is associated with diarrhea predominant irritable bowel syndrome in females. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 22:110 (Suppl 2) [Vortrag B. Niesler; Serotonin Club - EPHAR Satellite Meeting, Oxford, G.B.]
- Kapeller J, Houghton L, Mönnikes H, Walstab J, Moeller D, Bönisch H, Burwinkel B, Autschbach F, Gassler N, Fischer C, Whorwell P, Atkinson W, Fell C, Buchner K, Schmidtmann M, van der Voort I, Wisser AS, Berg T, Rappold G, Niesler B (2008) First evidence for an association of a functional variant in the microRNA-510 target site of the serotonin receptor-type 3E gene with diarrhea predominant irritable bowel syndrome. [Vortrag J. Kapeller; Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Philadelphia, PA, USA]
- Walstab J, Hammer C, Niesler B, Rappold G, Bönisch H (2008) Characterization of naturally occurring variants of the 5-HT<sub>3B</sub> receptor subunit. P1.01 [Poster; 18<sup>th</sup> Neuropharmacology Conference: Ligand-gated ion channels – Satellite to the 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the SfN Washington DC, USA]

## **Danksagung**

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Heinz Bönisch für die hervorragende Betreuung meiner Doktorarbeit danken. Insbesondere wusste ich seine stete Diskussionsbereitschaft und das von ihm ermöglichte selbständige wissenschaftliche Arbeiten sehr zu schätzen.

Herrn PD Dr. Michael Brüss danke ich für das Überlassen dieses interessanten Themas und die Einführung in molekularbiologische Techniken, wesentliche praktische Ratschläge und seine stete Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Manfred Göthert danke ich für die Möglichkeit, eine Dissertation am Institut für Pharmakologie und Toxikologie anzufertigen und für seine Unterstützung meiner wissenschaftlichen Tätigkeit.

Herrn Prof. Dr. Klaus Mohr danke ich herzlich für die Übernahme der Betreuung dieser externen Doktorarbeit.

Herrn Prof. Dr. Gerd Bendas und Herrn Prof. Dr. Hanns Häberlein danke ich für ihre Mitwirkung in der Prüfungskommission.

Ganz besonderer Dank gilt an dieser Stelle Frau Dr. Beate Niesler, durch deren Kooperation mit unserer Arbeitsgruppe diese Doktorarbeit in der Form erst ermöglicht wurde und die mir bei Fragen aller Art mit Rat und Tat zur Seite stand. Danken möchte ich ihr auch für die Durchsicht des Manuskripts.

Herrn PD Dr. Martin Barann möchte ich für die Durchführung der zeitaufwendigen elektrophysiologischen Analysen und seine Diskussionsbereitschaft danken.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, insbesondere Natalie Lobes, Birger Wenge, Gundula Hesse, Christian Haberlandt und Britta Hänisch danke ich für die Unterstützung bei der Arbeit, das ausgezeichnete Arbeitsklima und für alle fachlichen und freundschaftlichen Gespräche.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Deutschen Krebshilfe danke ich für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit.