

Signalwegsaktivierung an muskarinischen
M₂-Rezeptoren:
Einfluss der allosterischen Bindungsstelle

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Anna Elisabeth Kebig

aus Worms

Bonn 2010

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

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

2. Referent: Prof. Dr. rer. nat. Heinz Bönisch

Tag der mündlichen Prüfung: 15.07.2010

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr: 2010

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 2006 bis November 2009 in der Abteilung Pharmakologie und Toxikologie des Pharmazeutischen Instituts der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Klaus Mohr angefertigt.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Muskarinische Acetylcholinrezeptoren	1
1.2	Allosterische Interaktionen (allgemein und am M ₂ -Rezeptor).....	5
1.3	Dualsterische (allosterisch/orthosterische) Hybridliganden des muskarinischen Acetylcholinrezeptors.....	9
1.4	Differenzierung intrazellulärer Signalwegsaktivierung mittels Biosensormessung der zellulären dynamischen Massenumverteilung	10
1.5	Fragestellung	13
2	Material und Methoden	16
2.1	Material	16
2.1.1	Lösungen	16
2.1.2	Geräte	22
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	24
2.1.4	Reagenzien.....	26
2.1.5	Kits.....	30
2.1.6	Firmen.....	30
2.1.7	Primer	32
2.1.8	Plasmide	34
2.2	Strukturformeln der Testsubstanzen.....	35
2.2.1	Orthosterische Agonisten	35
2.2.2	Orthosterische Antagonisten	37
2.2.3	Allosterische Liganden	37
2.2.4	Orthosterisch-orthosterische Hybride	39
2.2.5	Allosterisch-orthosterische Hybride	40
2.2.6	Nukleotide	41
2.2.7	Radioliganden	42
2.3	Computerprogramme	42
2.4	Molekularbiologische Methoden	43
2.4.1	Zielgerichtete Mutagenese	43
2.4.2	Transformation.....	45
2.4.3	Plasmid-DNA-Gewinnung.....	46
2.4.4	Sequenzierung der Plasmid-DNA.....	47

Inhaltsverzeichnis

2.4.5	Subklonierung	48
2.4.5.1	Restriktionsverdau	48
2.4.5.2	Isolierung und Aufreinigung der DNA-Fragmente	48
2.4.5.3	Ligation	50
2.4.5.4	Überprüfung der Subklonierung	50
2.5	Zellbiologische Arbeiten	51
2.5.1	Charakterisierung der verwendeten Zelllinien.....	51
2.5.2	Zellkultur	52
2.5.3	Membranpräparation der CHO-Zellen	54
2.5.4	Bestimmung des Proteingehalts von Membransuspensionen.....	55
2.5.5	Transfektion	56
2.5.5.1	Transiente Transfektion.....	56
2.5.5.2	Stabile Transfektion (Flp-In TM -System).....	57
2.5.5.3	Einführung eines induzierbaren Expressionssystems.....	59
2.6	Radioligandbindungsuntersuchungen	61
2.6.1	Homologe Konkurrenzexperimente.....	62
2.6.1.1	Theoretische Grundlagen.....	62
2.6.1.2	Versuchsdurchführung	64
2.7	Funktionelle Experimente.....	65
2.7.1	[³⁵ S]GTP γ S-Bindungsexperimente an Membransuspensionen aus CHO-Zellen.....	66
2.7.1.1	Theoretische Grundlagen.....	66
2.7.1.2	Versuchsdurchführung	67
2.7.1.3	Auswertung	69
2.7.1.3.1	Einfluss des orthosterischen Antagonisten Atropin auf die Agonist-induzierte [³⁵ S]GTP γ S-Bindung (Schild-Analyse)	69
2.7.1.3.2	Test nach Lew und Angus auf Parallelverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurven.....	71
2.7.2	Messungen der zellulären dynamischen Massenumverteilung (DMR-Messungen).....	72
2.7.2.1	Theoretische Grundlagen, Prinzip der Messung.....	72
2.7.2.2	Versuchsdurchführung	73
2.7.2.3	Auswertung	74
2.8	Statistik	75
3	Ergebnisse.....	78
3.1	Ergebnisse methodischer Vorversuche	78
3.1.1	Vergleich der stabilen CHO-hM ₂ -Expressionszelllinien (CHO-M ₂ / Flp-CHO-M ₂)	78
3.1.2	Einfluss von Na ⁺ -Butyrat auf die [³⁵ S]GTP γ S-Bindung an Membranhomogenaten aus CHO-M ₂ -Zellen.....	80

Inhaltsverzeichnis

3.2	Funktionelle Untersuchungen: [³⁵ S]GTPγS-Bindungsexperimente CHO-M ₂ -Zellen (Wildtyp).....	82
3.2.1	Beeinflussung der [³⁵ S]GTPγS-Bindung an CHO-M ₂ -Zellen durch rezeptorsättigende Konzentrationen muskarinischer Liganden.....	82
3.2.2	Orthosterische Agonisten	85
3.2.2.1	Acetylcholin-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	85
3.2.2.2	Oxotremorin M-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	86
3.2.2.3	Iperoxo-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	88
3.2.2.4	JSW 236-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	89
3.2.2.5	Methylperoxo (MIO)-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	91
3.2.2.6	Pilocarpin-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung.....	92
3.2.2.7	McN-A-343-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	93
3.2.3	Von Agonisten abgeleitete dualsterische Testsubstanzen.....	95
3.2.3.1	Hybride aus Iperoxo und allosterischen Modulatoren	95
3.2.3.1.1	Hybrid 1-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	95
3.2.3.1.2	Hybrid 2-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	96
3.2.3.2	Hybride aus Methylperoxo und allosterischen Modulatoren.....	98
3.2.3.2.1	MF-1-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	98
3.2.3.2.2	MF-2-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	99
3.2.3.3	Hybride aus McN-A-343 und allosterischen Modulatoren.....	99
3.2.3.3.1	MG-1-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	99
3.2.3.3.2	MG-2-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	100
3.3	Einfluss verschiedener Epitope des M ₂ -Rezeptors auf die G-Protein-Aktivierung	101
3.3.1	Untersuchungen zum Einfluss des Epitops M ₂ ⁴²² Trp auf die G-Protein-Aktivierung am M ₂ -Rezeptor	102
3.3.1.1	[³⁵ S]GTPγS-Bindungsexperimente mit transient transfizierten M ₂ ⁴²² Trp→Ala-Rezeptoren im Vergleich zum M ₂ -Wildtyp.....	102
3.3.1.1.1	Einfluss sättigender Konzentrationen verschiedener Liganden.....	102
3.3.1.1.2	Acetylcholin	104
3.3.1.1.3	Pilocarpin	105
3.3.1.2	[³⁵ S]GTPγS-Bindungsexperimente mit stabil transfizierten M ₂ ⁴²² Trp→Ala-Rezeptoren	107
3.3.1.2.1	Einfluss sättigender Konzentrationen verschiedener Liganden.....	107
3.3.1.2.2	Acetylcholin	109
3.3.1.2.2.1	Erste Versuchsreihe	109
3.3.1.2.2.2	Zweite Versuchsreihe.....	110
3.3.1.2.3	Pilocarpin	111
3.3.1.2.4	Oxotremorin M	113

Inhaltsverzeichnis

3.3.1.2.5	Iperoxo	114
3.3.1.2.6	McN-A-343.....	115
3.3.1.2.7	Hybrid 1	117
3.3.1.2.8	Hybrid 2	118
3.3.2	Untersuchungen zum Einfluss des Epitops M ₂ ¹⁰⁴ Tyr auf die G-Protein-Aktivierung am M ₂ -Rezeptor	119
3.3.2.1	[³⁵ S]GTPγS-Bindungsexperimente mit stabil transfizierten M ₂ ¹⁰⁴ Tyr→Ala-Rezeptoren.....	120
3.3.2.1.1	Acetylcholin.....	120
3.3.2.1.2	Oxotremorin M	121
3.3.2.1.3	Iperoxo	122
3.3.2.1.4	McN-A-343.....	123
3.3.3	Untersuchungen zum Einfluss des Epitope M ₂ ¹⁷⁷ Tyr und M ₂ ⁴²³ Thr auf die G-Protein-Aktivierung am M ₂ -Rezeptor	125
3.3.3.1	[³⁵ S]GTPγS-Bindungsexperimente mit stabil transfizierten M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Ala-Rezeptoren.....	125
3.3.3.1.1	Acetylcholin.....	126
3.3.3.1.2	Iperoxo	127
3.3.3.1.3	Pilocarpin	128
3.3.3.1.4	McN-A-343.....	129
3.3.3.2	[³⁵ S]GTPγS-Bindungsexperimente mit stabil transfizierten M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln-Rezeptoren	131
3.3.3.2.1	Acetylcholin.....	131
3.3.3.2.2	Pilocarpin	133
3.3.3.3	[³⁵ S]GTPγS-Bindungsexperimente mit stabil transfizierten M ₂ ⁴²³ Thr→Ala-Rezeptoren	134
3.3.3.3.1	Iperoxo	134
3.3.3.3.2	McN-A-343.....	135
3.3.4	Beeinflussung der [³⁵ S]GTPγS-Bindung durch Veränderung der Konzentration an Na ⁺ Ionen	136
3.3.5	Inverser Agonismus.....	140
3.3.5.1	Allosterische Modulatoren	141
3.3.5.1.1	W84	141
3.3.5.1.2	Naphmethonium.....	143
3.3.5.1.3	Seminaph.....	145
3.3.5.1.4	Duo3	146
3.3.5.1.5	Alcuronium.....	147
3.3.5.2	Hybride aus Methyliperoxo und allosterischen Modulatoren	148
3.3.5.2.1	MF-1	148
3.3.5.2.2	MF-2	149

3.4	Einfluss des orthosterischen Antagonisten Atropin auf die Iperoxo- bzw. JSW 236-induzierte [³⁵ S]GTP γ S-Bindung	150
3.4.1	Interaktion von Atropin mit Iperoxo	151
3.4.2	Interaktion von Atropin mit JSW 236	153
3.5	Funktionelle Untersuchungen: Messungen der zellulären dynamischen Massenumverteilung (DMR-Messungen)	156
3.5.1	Orthosterische Agonisten	156
3.5.1.1	Acetylcholin	157
3.5.1.2	Iperoxo	159
3.5.1.3	JSW 236	160
3.5.2	Von Agonisten abgeleitete dualsterische Testsubstanzen	161
3.5.2.1	Hybrid 1	161
3.5.2.2	Hybrid 2	162
3.5.3	Einfluss von Forskolin auf die Acetylcholin-induzierte Zellantwort in Flp-CHO-M ₂ -Zellen	163
3.5.4	Signalwegsaktivierung durch muskarinische Liganden an M ₂ -Rezeptoren	164
3.5.4.1	Ligand-induzierte zelluläre dynamische Massenumverteilung (DMR)	165
3.5.4.1.1	Vollagonist-induzierte DMR	165
3.5.4.1.2	Partialagonist-induzierte DMR	166
3.5.4.1.3	Durch Iperoxo- und CZA 1-induzierte DMR	167
3.5.4.1.4	Durch Oxotremorin M- und CZA 2-induzierte DMR	168
3.5.4.1.5	JSW 236-induzierte DMR	169
3.5.4.2	Durch dualsterische Agonisten induzierte zelluläre dynamische Massenumverteilung	170
3.5.4.3	Einfluss von hohen cAMP-Spiegeln (Forskolin-Vorstimulation) auf die Agonist-induzierte DMR	173
3.5.4.4	Einfluss der allosterischen Bindungsstelle des M ₂ -Rezeptors auf die Ligand-induzierte dynamische Massenumverteilung	176
3.5.4.5	Einfluss der Punktmutation M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Ala auf die McN-A-343-induzierte dynamische Massenumverteilung	177
3.5.4.6	Einfluss des Epitops M ₂ ⁴²² Trp auf die Ligand-induzierte dynamische Massenumverteilung	178
4	Diskussion	180
4.1	Verknüpfung allosterischer und orthosterischer Liganden des muskarinischen Acetylcholinrezeptors zu dualsterischen Hybridverbindungen	181
4.2	Erörterung der intrazellulären Signalwegsaktivierung durch orthosterische und dualsterische Testsubstanzen	187
4.3	Erörterungen zur Interaktion des verkürzten Hybrids JSW 236 mit dem M ₂ -Rezeptor	189

Inhaltsverzeichnis

4.4	Erörterungen zum Einfluss des Epitops $M_2^{104}\text{Tyr}$ auf die G-Protein-Aktivierung durch orthosterische Agonisten.....	191
4.5	Abhängigkeit der orthosterischen Aktivierung des muskarinischen M_2 -Rezeptors von allosterischen Epitopen	194
4.6	Funktionelle Bedeutung der Aminosäure $M_2^{422}\text{Tryptophan}$ für die M_2 -Rezeptor vermittelte G-Protein-Aktivierung	195
4.6.1	Erörterungen zum Einfluss des Epitops $M_2^{422}\text{Trp}$ auf die G-Protein-Aktivierung durch orthosterische und dualsterische Agonisten.....	195
4.6.2	Erörterung zum Einfluss des Epitops $M_2^{422}\text{Trp}$ auf die konstitutive Rezeptor-G-Protein-Kopplung	200
4.7	Erörterungen zum Bindungsmodus und zur M_2 -Rezeptoraktivierung durch McN-A-343	201
4.7.1	Epitopabhängigkeit Aktivierung des muskarinischen M_2 -Rezeptors durch McN-A-343	202
4.7.2	Einfluss des Epitops $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ auf die Signalwegsaktivierung durch McN-A-343	204
5	Zusammenfassung.....	207
6	Abkürzungsverzeichnis	211
7	Literaturverzeichnis	215
8	Anhang.....	227
8.1	Methodische Vorversuche zur Etablierung eines Standard-Versuchsprotokolls für DMR-Messungen mit CHO-Zellen.....	227
8.1.1	Einfluss der eingesetzten Zellzahl	227
8.1.2	Einfluss der Position auf der Messplatte.....	229
8.1.3	Effekt von Adenosintriphosphat auf CHO- M_2 -Zellen	230
8.1.4	Effekt von Forskolin auf CHO-Zellen	231
8.1.5	Basislinien Korrektur durch Lösungsmittel-Kontrolle.....	234
8.1.6	Einfluss des Lösungsmittels DMSO auf die DMR-Messung an CHO- M_2 -Zellen.....	235
8.1.7	Rezeptorspezifität der Zellantworten	237
8.1.8	Effekt des Antagonisten Atropin auf CHO- M_2 -Zellen	238
8.1.9	Pertussistoxin (PTX).....	239
8.1.10	Choleratoxin (CTX)	240
8.2	Signalwegsaktivierung durch muskarinische Liganden an M_4 -Rezeptoren	243
8.3	Normierte Darstellung der Adenylylzyklaseaktivität	243
8.4	Signalwegsaktivierung durch Acetylcholin an M_5 -Rezeptoren.....	245

9	Veröffentlichungen.....	247
9.1	Wissenschaftliche Originalarbeiten.....	247
9.2	Übersichtsarbeiten	247
9.3	Abstrakta/Kongressmitteilungen.....	248

1 Einleitung

1.1 Muskarinische Acetylcholinrezeptoren

Die muskarinischen Acetylcholinrezeptoren gehören zur Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Auf Grund ihrer Struktur werden diese auch als heptahelikale Rezeptoren bezeichnet. Gemeinsam haben sie die sieben transmembranen α -Helices, einen extrazellulären N-Terminus und einen intrazellulären C-Terminus des Polypeptids sowie drei interhelikale Schleifen auf jeder Seite der Membran. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren stellen die größte und zugleich die von stärkster Diversität geprägte Gruppe an Proteinen des Genoms dar. Fast 800 verschiedene humane Gene codieren Rezeptoren für verschiedenste extrazelluläre Liganden, darunter Neurotransmitter (wie das im Focus dieser Arbeit stehende Acetylcholin), Hormone und sensorische Stimuli. 30 % der sich auf dem Markt befindlichen Pharmaka erkennen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren als Zielstruktur. Basierend auf phylogenetischen Analysen werden fünf Klassen unterschieden (Fredriksson et al., 2003; Jacoby et al., 2006; Oldham und Hamm, 2008):

Klasse	Bezeichnung	Besonderheiten	Beispiel
A	mit Rhodopsin verwandte Rezeptoren	v.a. niedermolekulare Liganden mit Bindungsstellen im transmembranären Bereich	muskrainische Acetylcholinrezeptoren, Dopamin-Rezeptoren
B	mit Sekretin verwandte Rezeptoren (Glykoproteinrezeptoren)	Peptid- und Glykoprotein-Hormone binden am N-Terminus, extrazellulären Schleifen und dem äußeren Bereich der TM Helices	Parathormon-Rezeptoren
C	metabotrope Glutamat- und verwandte Rezeptoren	Lange N- und C-terminale Enden, Ligandbindungsstelle am N-Terminus (Venus-Fliegenfalle)	Ca ²⁺ -Rezeptor, GABA _B -Rezeptor
	Adhäsions-Rezeptoren	Langer N-Terminus, wahrscheinlich an Zelladhäsion beteiligt	Lectomedin-Rezeptoren
	Frizzled-Taste-2-Rezeptoren		Geschmacksrezeptoren (bitter)

Tabelle 1: Klassifizierung humaner G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

Muskarinrezeptorsubtypen: Klonierungsstudien von Kubo et al. (1986a, 1986b), Peralta et al. (1987) und Bonner et al. (1987, 1988) führten zur Einteilung in fünf Muskarinrezeptorsubtypen M₁-M₅. Diese unterscheiden sich bezüglich ihrer gewebespezifischen Verteilung in der Körperperipherie sowie im zentralen Nervensystem (ZNS) und bezüglich ihrer Funktion (Tabelle 2). Ein komplexes Verteilungsmuster fällt auf, viele Gewebe enthalten mehrere Subtypen, im humanen Musculus detrusor vesicae kommen z. B. alle fünf Subtypen vor. In der Peripherie vermitteln Muskarinrezeptoren die Wirkungen des parasympathischen Nervensystems und sind so an den Erfolgsorganen des Parasympathikus zu finden. Alle fünf Subtypen sind im ZNS an sensorischen, kognitiven und motorischen Funktionen beteiligt.

Subtyp	Verteilung	Physiologische Funktion
M ₁	<ul style="list-style-type: none"> – ZNS (Kortex, Hippocampus, Striatum) – Peripherie (Drüsen, sympathische Ganglien) 	Hemmung der striatalen Dopaminfreisetzung, Förderung der Ganglienerregung
M ₂	<ul style="list-style-type: none"> – ZNS (Hippocampus, Kortex, Thalamus) – Peripherie (Herz, glatte Muskulatur) 	parasympathisch vermittelte Herzwirkungen, Antinozizeption, Förderung der Kontraktion glatter Muskulatur, inhibitorischer Auto-/Heterorezeptor
M ₃	<ul style="list-style-type: none"> – ZNS – Peripherie (glatte Muskulatur, Drüsen) 	parasympathisch vermittelte Kontraktion glatter Muskulatur, Speichelproduktion
M ₄	<ul style="list-style-type: none"> – ZNS (Striatum, Kortex, Hippocampus) 	Antinozizeption, motorische Kontrolle, Inhibitorischer Auto-/Heterorezeptor
M ₅	<ul style="list-style-type: none"> – ZNS (Substantia nigra, Striatum) 	motorische Kontrolle, Teil des Belohnungssystems, Förderung der striatalen Dopaminfreisetzung, Vasodilatation

Tabelle 2: Gewebeverteilung und physiologische Bedeutung der Muskarinrezeptorsubtypen M₁-M₅; vereinfachte Übersicht (Wess, 2003; Wess, 2004; Eglén, 2005)

Ligandbindungsstellen: Die Bindungsstelle für den endogenen Agonisten Acetylcholin befindet sich im oberen Drittel der transmembranären Domänen. Sie wird als orthosterische Bindungsstelle (griechisch: richtige Stelle) bezeichnet (Neubig et al., 2003). Die Aminosäuresequenz in diesem Bereich ist zwischen den verschiedenen Rezeptorsubtypen hoch konserviert, sodass sich orthosterische Liganden durch eine ähnliche Affinität zu allen Subtypen auszeichnen. Neben dieser Bindungsdomäne ist eine zweite, räumlich getrennte Bindungsstelle an allen fünf Muskarinrezeptorsubtypen nachgewiesen, bezeichnet als allosterische Bindungsstelle (griechisch: andere Stelle) (Kords et al., 1968; Clark und

Mitchelson, 1976; Stockton et al., 1983). Die Bezeichnung Allosterie wurde erstmals auf dem Gebiet der Enzymologie verwendet und beschreibt die gleichzeitige Bindung zweier Liganden an unterschiedliche Bindungsstellen der gemeinsamen Zielstruktur. Durch konformative Veränderung der beiden Bindungsstellen kann eine gegenseitige Beeinflussung beider Liganden stattfinden (Monod et al., 1963). Neben den Muskarinrezeptoren sind eine oder mehrere allosterische Bindungsstellen unter anderem für folgende G-Protein-gekoppelte Rezeptoren identifiziert worden: Dopamin D₂-Rezeptoren (Hoare und Strange, 1996), Adenosin A₁-Rezeptoren (Kollias-Baker et al., 1997; Gao und Ijzerman, 2000), Adrenorezeptor-Subtypen α_{1A} und α_{2A} (Leppik und Birdsall, 2000; Leppik et al., 2000), Chemokinrezeptoren (Sabroe et al., 2000), und Ca²⁺ Rezeptoren (Miedlich et al., 2004; Petrel et al., 2004; Nagano und Nemeth, 2005). Ca²⁺ Rezeptoren sind die Zielstruktur von Cinacalcet (Mimpara[®]), dem ersten therapeutisch genutzten, allosterischen Modulator an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Die niedermolekulare Substanz erhöht am Ca²⁺ Rezeptor der Nebenschilddrüsen die Wirkung des endogenen Liganden Ca²⁺ und hemmt so die Parathormon-Inkretion. Zugelassen ist Cinacalcet innerhalb der Europäischen Union seit 2004 zur Therapie des sekundären Hyperparathyreoidismus sowie zur Behandlung der Hypercalcämie bei primärem Hyperparathyreoidismus und bei Nebenschilddrüsenkarzinom (Block et al., 2004; Kebig und Mohr, 2008).

Signaltransduktion: G-Protein-gekoppelte Rezeptoren koppeln auf der Innenseite der Plasmamembran an heterotrimere Guaninnukleotid-bindende Proteine, kurz G-Proteine genannt. G-Proteine bestehen aus drei Untereinheiten, einer α -Untereinheit, die GTP bindet und durch ihre GTPase-Aktivität zu GDP hydrolysiert, der β -Untereinheit und der γ -Untereinheit. Im inaktiven Zustand bindet der trimere Komplex GDP. Nach Aktivierung des Rezeptors durch Agonistbindung beschleunigt der Rezeptor den Austausch von GDP durch GTP an der α -Untereinheit. Dies führt zur Dissoziation des $G\alpha\beta\gamma$ -GTP-Komplexes in die $G\alpha$ -GTP und die nicht dissoziierbare $G\beta\gamma$ -Untereinheit, die unabhängig voneinander verschiedene Effektoren aktivieren und so eine regulatorische Funktion auf die Signaltransduktion ausüben. Durch die intrinsische GTPase-Aktivität der α -Untereinheit wird das gebundene GTP zu GDP hydrolysiert und der Übertragungsvorgang inaktiviert. Es findet eine Reassoziierung von $G\alpha$ und $G\beta\gamma$ unter Wiederherstellung des inaktiven Zustandes statt. Die zelluläre Ausstattung besteht neben den angesprochenen verschiedenen Rezeptoren auch aus verschiedenen Klassen von G-Proteinen, eingeteilt nach ihren α -Untereinheiten. Die Diversität ist hier jedoch von wesentlich geringerem Ausmaß: es sind 21 humane $G\alpha$ - sowie sechs $G\beta$ - und 12 $G\gamma$ -

Untereinheiten bekannt. Die vier Hauptgruppen von $G\alpha$ sind $G_s\alpha$, $G_i\alpha$, $G_q\alpha$ und $G_{12}\alpha$ (Milligan und Kostenis, 2006).

Unterschiede der Funktion der verschiedenen Muskarinrezeptorsubtypen ergeben sich aus der Interaktion mit verschiedenen Klassen der $G\alpha$ -Untereinheiten. M_1 -, M_3 - und M_5 -Rezeptoren koppeln vor allem über $G_{q/11}$ -Proteine. Hieraus resultiert eine Stimulation der Isoenzyme β_1 und β_4 der Phospholipase C, wodurch die Bildung von Diacylglycerol und Inositoltriphosphat mit nachgeschalteter Ca^{2+} -Freisetzung gesteigert wird. Darüber hinaus werden die Bildung von Stickstoffmonoxid und eine Aktivierung der Phospholipase A_2 vermittelt. Die im Fokus dieser Arbeit stehenden M_2 -Rezeptoren, sowie die M_4 -Rezeptoren koppeln bevorzugt an $G_{i/o}$ -Proteine und vermitteln so, über eine Hemmung der Adenylylzyklase, eine Inhibition der Bildung von zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP). Zusätzlich kommt es zu einer verlängerten Öffnung von K^+ -Kanälen und anderer, unselektiver Kationenkanäle. Eine Beeinflussung von Effektorsystemen erfolgt auch über die $G\beta\gamma$ -Untereinheit, die mehrere Partner hat, wie Acetylcholin-regulierte K^+ -Kanäle, neuronale spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle, die Phosphatidylinositol-3-Kinase und die Phospholipase C (Caulfield und Birdsall, 1998; Eglén, 2005).

Nicht-selektive Signalwegsaktivierung: Wie auch andere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, können Muskarinrezeptoren Einfluss auf Signaltransduktionswege mehrerer G-Protein-Klassen nehmen. Eine alternative Kopplung der M_2 -Rezeptoren über Adenylylzyklase stimulierende G_s -Proteine und über G_q -Proteine ist beschrieben (Mistry et al., 2005; Griffin et al., 2007; Michal et al., 2007). Das Vermögen mehrere Signalwege anzustoßen wird als *promiscuous signaling* bezeichnet. Neben G-Protein-abhängigen können auch G-Protein-unabhängige Signalwege miteinbezogen sein (Violin et al., 2007).

Arrestin-vermittelte Signalwege: Neue Studien zu Signaltransduktionsmechanismen identifizierten die Proteinfamilie der Arrestine, neben der G-Protein-Familie, als zentralen Signalvermittler. Eine Rekrutierung von β -Arrestin kann neben einer Entkopplung des Liganden-aktivierten und phosphorylierten Rezeptors vom G-Protein auch als Vermittler einer weiteren Ebene der Rezeptordesensibilisierung fungieren. Über die Verknüpfung des Rezeptors mit Clathrin wird die Endozytose des Rezeptors gefördert. Eine Rekrutierung von β -Arrestinen kann von einer Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen) gefolgt sein und eine Regulatorfunktion auf eine Vielzahl verschiedener Prozesse ausüben. (Lefkowitz und Shenoy, 2005; DeWire et al., 2007).

Vielfalt der Rezeptorkonformationen: Verschiedene Befunde belegen die Existenz unterschiedlicher aktiver Rezeptorkonformationen (Kenakin, 2003). Abhängig vom Liganden kann nur ein Teil des möglichen Spektrums an Konformationen stabilisiert werden. Es ist wahrscheinlich, dass das Muster der Aktivierung intrazellulärer Signalwege durch die Auswahl der möglichen Konformationen, die der Ligand-Rezeptor-Komplex annehmen kann, bestimmt wird. Liganden, die eine spezifische Rezeptorkonformation stabilisieren, führen folglich zu einer selektiven Signalwegsaktivierung, bezeichnet als *biased signaling* (Michel und Alewijnse, 2007; Kenakin 2007).

1.2 Allosterische Interaktionen (allgemein und am M₂-Rezeptor)

Allosterische Wirkstoffe als Therapeutika weisen gegenüber klassischen, orthosterischen Liganden verschiedene Vorteile auf. Der Effekt eines allosterischen Antagonisten ist selbstlimitierend, wenn er in hohen Konzentrationen die Bindung des Agonisten stabilisiert (Lüllmann et al., 1969; Stockton et al., 1983). So ist die Gefahr einer Intoxikation durch eine Überdosierung mit allosterischen Wirkstoffen reduziert (Holzgrave und Mohr, 1998). Desweiteren ist die Wirkung eines allosterischen Modulators an die Anwesenheit des endogenen Liganden gebunden, wenn das Alloster selbst keinen direkten Einfluss auf die Rezeptoraktivierung nimmt. Hieraus ergibt sich eine ausgeprägte räumliche und zeitliche Spezifität der Alloster-Wirkung, die dem physiologischen Muster der Stimulation entspricht. Eine Dauerstimulation, wie sie in Gegenwart eines orthosterischen Agonisten auftritt, unterbleibt.

Die als Kooperativität bezeichnete gegenseitige Beeinflussung von allosterischen und orthosterischen Liganden hinsichtlich Affinität und intrinsischer Aktivität wird nicht nur von den beiden Liganden, sondern auch vom Rezeptorsubtyp bestimmt. Dabei können sich die beiden Liganden in ihren Effekten gegenseitig fördern, hemmen oder gar nicht beeinflussen (positive, negative oder neutrale Kooperativität). Aufgrund ihrer Fähigkeit, Rezeptorkonformationen in Gegenwart eines orthosterischen Liganden zu modulieren, können allosterische Liganden eine Feinabstimmung pharmakologischer Effekte hervorrufen.

Die Aminosäuresequenz der orthosterischen Bindungsstelle innerhalb einer Klasse von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zeigt einen hohen Grad an Konservierung. Dies erschwert eine Entwicklung subtypselektiver Arzneistoffe mit spezifischen Wirkbildern. Allosterische Liganden können potenziell selektiver sein als orthosterische Liganden, da sie mit weniger

stark konservierten Arealen des Rezeptorproteins interagieren (Buller et al., 2002; Christopoulos und Kenakin, 2002; Voigtländer et al., 2003). Zusätzlich kann eine erhöhte Selektivität dadurch erreicht werden, dass sich unterschiedliche Kooperativitäten zwischen einem allosterischen Modulator und dem endogenen Orthoster an den verschiedenen Subtypen zeigen (Lazareno et al., 1998).

Das bekannteste Beispiel für allosterisch wirksame Arzneistoffe sind die Benzodiazepine. Sie fördern allosterisch die Bindung des inhibitorischen Neurotransmitters γ -Aminobuttersäure (GABA) an den GABA_A-Rezeptor, einen Ligand-gesteuerten Ionenkanal, der für Chloridionen durchlässig ist. Eingesetzt werden sie zur Anxiolyse, aber auch zur Therapie der Epilepsie und zur Anästhesie.

Der muskarinische M₂-Rezeptor ist ein geeignetes Modellsystem, um allosterische Modulationen sowie allosterisch-orthosterische Interaktionen zu untersuchen. Beide Bindungsstellen des Rezeptors sind gut charakterisiert. Typischerweise ist die Wirksamkeit allosterischer Modulatoren am M₂-Rezeptor am höchsten und nimmt in der nachstehenden Reihenfolge ab: M₂ > M₄ > M₁ > M₃ > M₅ (Ellis et al., 1993; Jakubik et al., 1995; Ellis und Seidenberg, 2000).

Das orthosterische Haftareal befindet sich im oberen Drittel des M₂-Rezeptorproteins zwischen Epitopen der transmembranären Domänen 3, 5, 6 und 7. Sowohl für den endogenen Liganden Acetylcholin als auch für niedermolekulare orthosterische Agonisten und Antagonisten wird angenommen, dass sie innerhalb eines so genannten „aromatischen Käfigs“ binden (Lu et al., 2002). Eine Schlüsselfunktion bei der Ligand-Bindung übernimmt das konservierte Epitop M₂¹⁰³ Aspartat. Über Kation- π -Wechselwirkungen dieser Aminosäure mit dem quartären Stickstoff des Acetylcholins wird der Ligand-Rezeptor-Komplex stabilisiert (Hulme et al., 1989; Wess, 1993).

Die allosterische Bindungsstelle für viele geladene Moleküle liegt extrazellulär gerichtet in der Nähe der orthosterischen Bindungsstelle (Ellis et al., 1991; Voigtländer et al., 2003; Prilla et al., 2006). Da diese Bindungsstelle von mehreren strukturell sehr verschiedenen allosterischen Modulatoren wie beispielsweise Gallamin, Alcuronium und W84 benutzt wird, wird sie auch als gemeinsame Bindungsstelle („common allosteric site“) bezeichnet (Ellis und Seidenberg, 1992; Lanzafame et al., 1997; Tränkle und Mohr, 1997). Für einige strukturabweichende Modulatoren wurde das Vorliegen einer zweiten allosterischen Bindungsstelle postuliert (Tuček und Proška, 1995; Tränkle und Mohr, 1997; Lazareno et al.,

2000; Lazareno et al., 2002). Abbildung 1 gibt einen Überblick über die Struktur allosterischer Modulatoren muskarinischer Acetylcholinrezeptoren.

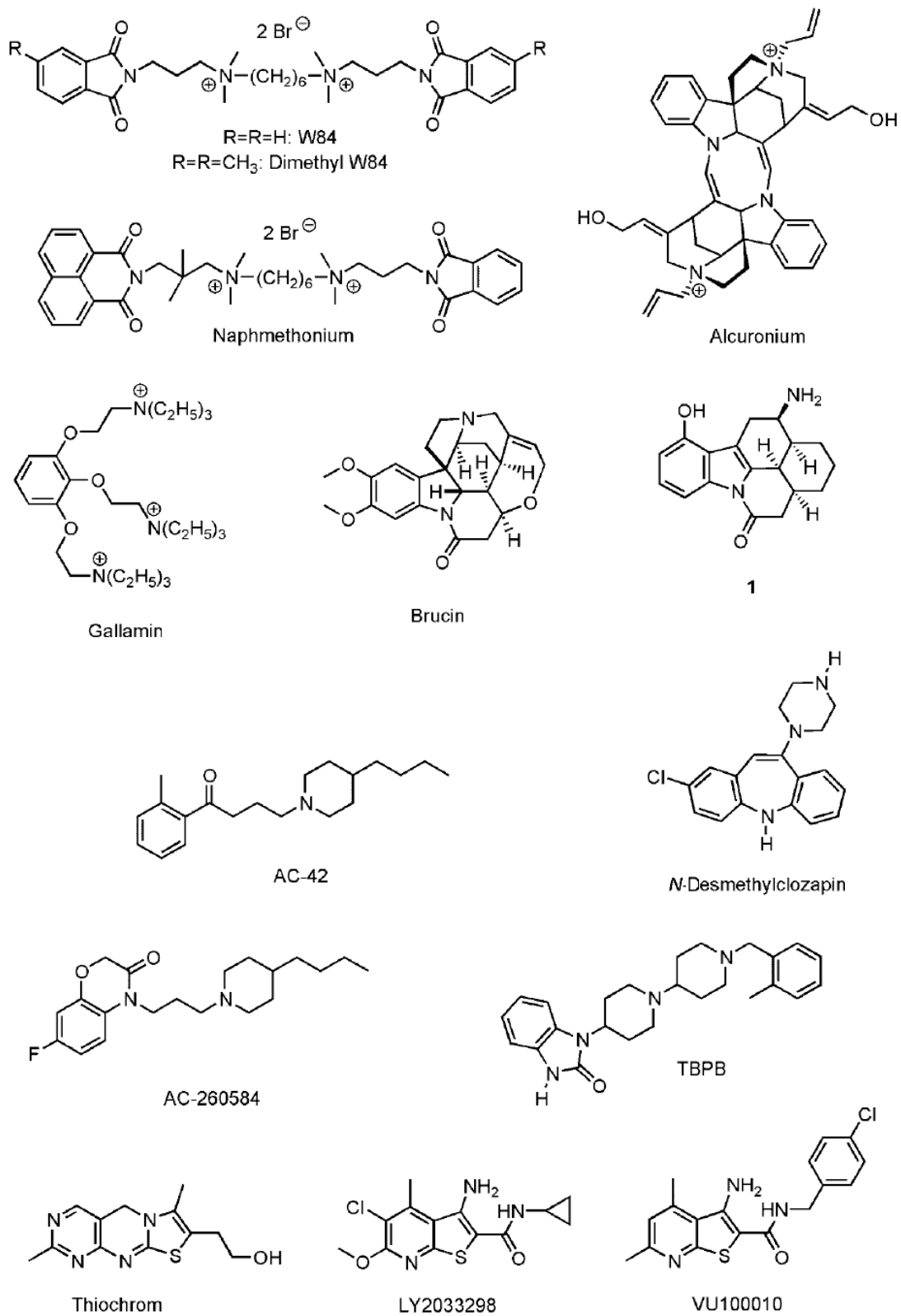


Abbildung 1: Strukturen allosterischer Modulatoren muskarinischer Acetylcholinrezeptoren (modifiziert nach De Amici et al., 2009).

Die Affinität allosterischer Modulatoren zum muskarinischen M_2 -Rezeptor ist abhängig von mehreren Epitopen im äußeren Randbereich der transmembranären Domänen und im Bereich der extrazellulären Schleifen e2 und e3. Ein Schlüsselepitop ist M_2^{422} Tryptophan in Position 7.35 (Nomenklatur nach Ballesteros und Weinstein, 1992), lokalisiert an der Spitze der Transmembranhelix 7 (siehe Abbildung 2). Dieses Tryptophan in Position 7.35 ist in allen Subtypen konserviert und verleiht den allosterischen Modulatoren eine Basisaffinität. In der inaktiven Rezeptorkonformation liegt diese Aminosäure in direkter Nachbarschaft zum Epitop M_2^{177} Tyrosin, sodass es zur Ausbildung einer „Sandwich-artigen“ Orientierung der aromatischen Reste kommen kann, die es allosterischen Modulatoren mit planaren Ringsystemen erlaubt, zu interkalieren und über π - π -Wechselwirkungen mit dem Rezeptor zu interagieren (Prilla et al., 2006). Die nach dem Einbuchstabencode als „EDGE-Sequenz“ bezeichnete Abfolge dreier saurer und einer neutralen Aminosäure (M_2^{172} Glutamat, M_2^{173} Aspartat, M_2^{174} Glycin, M_2^{175} Glutamat) innerhalb der 2. extrazellulären Schleife ist hinsichtlich der M_2 -selektiven Bindung des allosterischen Modulators Gallamin von Bedeutung (Leppik et al., 1994; Gnagey und Ellis, 1996; Gnagey et al., 1999). Daran anschließend wurden die Epitope M_2^{177} Tyrosin (ebenfalls in e2) und M_2^{423} Threonin (in TM7) als essentiell für die M_2/M_5 -Subtypselektivität von Allosteren vom Alkan-Bisammonium- und Caracurin-V-Typ ermittelt (Buller et al., 2002; Voigtländer et al., 2003; Huang et al., 2005).

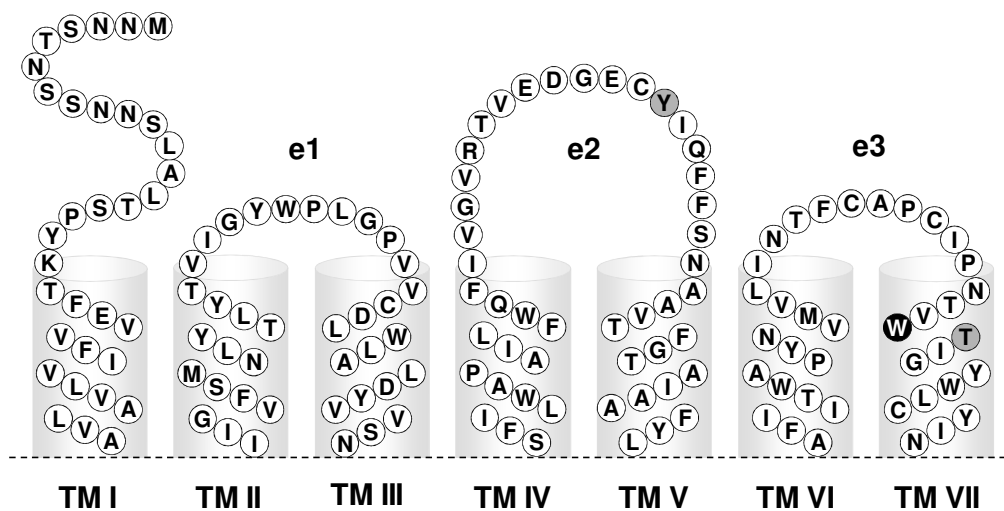


Abbildung 2: Schematische Darstellung der extrazellulären Schleifen (e1, e2, e3) des M_2 -Rezeptors mit den angrenzenden α -helikalen Domänen (TM I – VII, graue Zylinder). Die beiden Subtyp-spezifischen allosterischen Epitope ^{177}Tyr (Y) und ^{423}Thr (T) sind in grau, das konservierte Tryptophan ^{422}Trp (W) ist in schwarz hervorgehoben (modifiziert nach Prilla et al., 2006).

1.3 Dualsterische (allosterisch/orthosterische) Hybridliganden des muskarinischen Acetylcholinrezeptors

Es konnte bisher kein orthosterischer Ligand muskarinischer Acetylcholinrezeptoren mit Selektivität auf Rezeptorebene entwickelt werden, sondern nur Liganden, die eine *in vivo* Prävalenz für die verschiedenen Subtypen (Eglen, 2005) zeigen. Die zwischen den fünf Muskarinrezeptorsubtypen stark konservierte Aminosäuresequenz der orthosterischen Bindungsstelle bedingt ähnliche Affinitäten. Um subtypselektive Liganden für G-Proteingekoppelte Rezeptoren zu erhalten, wurde neben der Entwicklung von allosterischen Modulatoren, das Konzept der dualsterischen Hybridliganden entwickelt (Disingrini et al., 2006; Antony et al., 2009). Dieser rationale Ansatz beschreibt die Synthese von Hybridmolekülen aus einem allosterischen Teil für die Subtypselektivität und einem orthosterischen Teil für die intrinsische Aktivität. Die Analyse von Struktur-Wirkungs-Beziehungen hatte zuvor die für die M₂-Subtypselektivität essentiellen Strukturelemente von Alkan-Bisammonium-Verbindungen (ABA-Verbindungen) identifiziert, sodass der verzichtbare Teil durch Strukturelemente von Agonisten ersetzt werden konnte. Durch die kovalente Verknüpfung allosterischer Molekülbausteine mit orthosterischen Liganden entstanden die im Folgenden als dualsterische Testsubstanzen bezeichneten Liganden. Mit dem Ziel M₂-selektive Agonisten zu erhalten, wurden im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Marco De Amici an der Universität Mailand und im Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe an der Universität Würzburg Hybride synthetisiert. Sie bestehen aus Oxotremorin M-artigen Agonisten und Strukturelementen der allosterischen Modulatoren vom ABA-Typ. Abbildung 3 zeigt schematisiert das Bauprinzip. Besonders W84 und sein Derivat Naphmethonium sind zur Hybridbildung geeignete Allosterie: Neben der hohen Spezifität für Muskarinrezeptoren (Franken et al., 2000; Pfaffendorf et al., 2000) und der Präferenz für den Subtyp M₂ (Tränkle et al., 1998) waren allosterisch wirksame Konzentrationen in Tierversuchen gut verträglich. Eine potente Rezeptoraktivierung, die Bindung an beide Haftareale (als dualsterischer Bindungsmodus bezeichnet) und die Subtypselektivität konnten nachgewiesen werden (Antony et al., 2009).

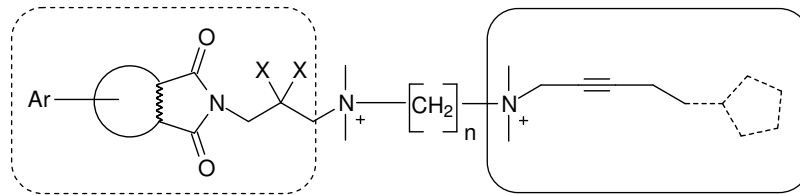


Abbildung 3: Allgemeines Bauprinzip eines dualsterischen Hybridmoleküls bestehend aus einem W84- bzw. Naphmethonium-Anteil (gestrichelter Rahmen) und einem Oxotremorin M-Derivat als Agonist (durchgezogener Rahmen). Die Länge der Zwischenkette (Mitte), die beide Molekülteile verknüpft, betrug bei den ersten Testsubstanzen $n = 6$; eine Verlängerung der Zwischenkette ($n = 7$ bzw. $n = 8$) wurde untersucht.

Vor allem im Hinblick auf die intrinsische Aktivität der Substanzen sind die Eigenschaften der Hybride von besonderem Interesse, da hier ein agonistisches Orthoster mit einem antagonistischen Molekülbaustein, dem allosterischen Modulator, verknüpft wird.

1.4 Differenzierung intrazellulärer Signalwegsaktivierung mittels Biosensormessung der zellulären dynamischen Massenumverteilung

Signaltransduktionswege, die durch zelluläre Zielstrukturen vermittelt werden, lösen räumliche und zeitliche Veränderungen im Intrazellulärraum aus. Die rezeptorvermittelte Signalwegsaktivierung kann mit Hilfe des Epic[®] Biosensorsystems untersucht werden. Bei dieser Methode werden spezifische, optische Signaturen erzeugt, deren Ausprägung die involvierten Signalwege in charakteristischer Weise abbildet. Es eröffnet sich somit die Möglichkeit eines nichtinvasiven, Sonden-freien Messsystems zur Beobachtung von Reaktionen auf pharmakologische Stimuli in Echtzeit und an lebenden Zellen (Fang et al., 2006; Fang et al., 2007).

Abbildung 4 veranschaulicht das Prinzip des Epic[®]-Biosensors zur Messung der zellulären dynamischen Massenumverteilung. Der Glasboden jeder Kavität der Mikrotiterplatte ist mit einem optischen Biosensor ausgestattet. Eine konfluente Zellschicht adhärenter Zellen wird mittels eines Breitbandlasers angestrahlt. Eine spezifische Wellenlänge wird im Biosensor weitergeleitet. Ihr elektromagnetisches Feld erstreckt sich in die dem Biosensor aufliegende Zellschicht mit einer Eindringtiefe von ca. 150 nm. Abhängig von der optischen Dichte und folglich vom Brechungsindex des angrenzenden Zellbereichs verändert sich die Energie des Lichtstrahls. Eine charakteristische Wellenlänge wird reflektiert und von einem Detektor sehr sensitiv bestimmt (Fang, 2007). Vor Stimulation der Zellen wird ein Ausgangswert bestimmt. Durch verschiedene Einflüsse auf die zellulären Funktionen, z. B. als Folge von

Rezeptoraktivierung, verändert sich die optische Dichte im Messbereich. Hierfür sind vor allem Massenverschiebungen durch den Ablauf intrazellulärer Protein-Signalkaskaden verantwortlich (Fang, 2007). Eine Erhöhung der optischen Dichte durch die Anreicherung von Partikeln im Messbereich führt zu einer langsameren Ausbreitungsgeschwindigkeit und somit zu einem Verlust an Energie, d. h. einer Vergrößerung der Wellenlänge. Relativ zum Ausgangswert, der als Nullpunkt der Messung festgesetzt wird, werden Massenumverteilungen im positiven Bereich detektiert. Die Verringerung der optischen Dichte hat einen gegenteiligen Effekt und führt zu einer Wellenlängenverschiebung in den negativen Bereich (Lee et al., 2008). Mittels des Epic[®] Biosensors können Wellenlängenverschiebungen über einen Zeitverlauf aufgenommen werden. Bei den durchgeführten Studien wurde ca. alle 30 Sekunden ein Messwert aufgenommen.

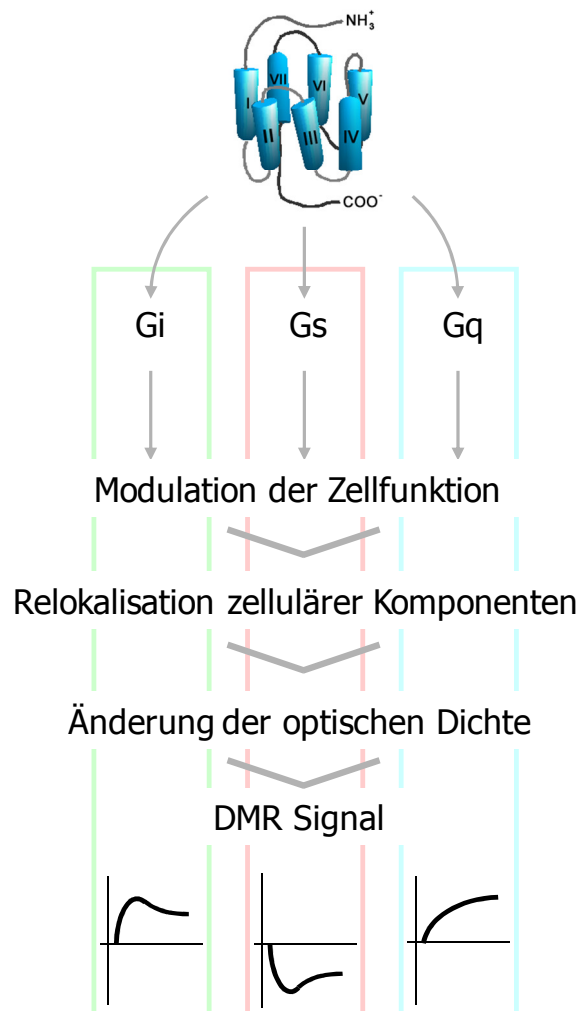


Abbildung 4: Prinzip des Epic[®]-Biosensors zur Messung der zellulären dynamischen Massenumverteilung (DMR). Zur Erläuterung der Abbildung wird auf den vorangehenden Text verwiesen.

Der untere Teil von Abbildung 4 zeigt schematisch die charakteristischen Verläufe der Signaturen, wie sie in den für die Studien dieser Arbeit verwendeten CHO-Zellen gefunden wurden. Der linke Graph stellt die aus einer Aktivierung von G_i -Proteinen resultierende Massenverschiebung, die mit einer Zunahme der optischen Dichte im Messbereich einhergeht, dar. Eine G_s -Signatur (mittlerer Graph) ist als abwärtsgerichtetes Signal zu erkennen. Die Aktivierung des Signalwegs über G_q -Proteine führt zu einer aufwärts gerichteten Signatur. Allerdings fehlt im Vergleich zur G_i -Aktivierung der initiale, steile Anstieg. Die durch G_q -Aktivierung induzierte Massenverschiebung verläuft hyperbelförmig.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Methode zu funktionellen Untersuchungen an lebenden CHO-M₂-Zellen genutzt. Das nach Rezeptoraktivierung erhaltene Signal repräsentiert die Summe der gesamten Zellantworten auf den pharmakologischen Stimulus und ergänzt so die funktionellen Ergebnisse, die durch [³⁵S]GTP γ S-Bindungsexperimente auf Ebene der G-Protein-Aktivierung in Zellmembranhomogenaten erhoben wurden.

1.5 Fragestellung

Folgende Zielsetzungen und Fragestellungen sollten im Rahmen dieser Arbeit behandelt werden:

- Es sollten stabile Expressionszelllinien für den muskarinischen M_2 -Rezeptor und verschiedene punktmutierte M_2 -Rezeptoren generiert werden. Diese Zelllinien waren die Voraussetzung für die spätere Durchführung funktioneller Untersuchungen. Dazu sollten die entsprechenden Expressionsplasmide kloniert werden. Für die anschließende stabile Transfektion stand das Flp-InTM-System zur Verfügung. Als Wirtszelllinie sollten Flp-InTM-CHO-Zellen dienen, die eine ortsspezifische Rekombination der Expressionsplasmide ermöglichen.
- In funktionellen Experimenten sollten verschiedene orthosterische und dualsterische Testsubstanzen im Hinblick auf ihre intrinsische Aktivität (E_{max}) und Wirksamkeit (pEC_{50}) untersucht werden. Die Rezeptor-vermittelte G-Protein-Aktivierung wurde durch Messung der [³⁵S]GTP γ S-Bindung erfasst. Die Experimente erfolgten an humanen M_2 -Rezeptoren sowie an ausgewählten, punktmutierten Rezeptoren, die aus den zuvor klonierten, stabil transfizierten CHO-Zellen gewonnen wurden. Darüber hinaus sollte für einige Testsubstanzen ein Vergleich mit pharmakologischen Parametern aus Ganzzellmessungen erhoben werden.
- Untersuchungen von Prilla (Dissertationsschrift, 2007) hatten ergeben, dass $M_2^{422}Trp$ eine zentrale Rolle innerhalb der allosterischen Bindungsstelle einnimmt und subtypübergreifend zur Basisaffinität allosterischer Modulatoren beiträgt. Es sollte eine stabile Expressionszelllinie der Punktmutante $M_2^{422}Trp \rightarrow Ala$ etabliert werden, um die bis dahin auf Bindungsstudien basierenden Befunde durch funktionelle Untersuchungen zu ergänzen. Außerdem sollte überprüft werden, ob das Epitop Einfluss auf die Rezeptoraktivierung nehmen kann. Hierbei sollten sowohl die Agonist-abhängige als auch die Agonist-unabhängige Rezeptoraktivierung mit in die Untersuchungen einbezogen werden.
- Es sollte untersucht werden, ob eine starke Verkürzung des allosterischen Molekülbausteins der dualsterischen Testsubstanzen (Hybrid 1 und Hybrid 2) möglich ist. Dies wäre beim „Design“ von potenziellen Arzneistoffen von Vorteil. Zur Verfügung stand die Testsubstanz JSW 236, deren allosterischer Baustein auf einen quartären Stickstoff reduziert ist. JSW 236 sollte bezüglich der Rezeptor-vermittelten G-Protein-

Aktivierung und der intrazellulären Signalwegsaktivierung charakterisiert werden. Um festzustellen, ob JSW 236 den M₂-Rezeptor über die orthosterische Bindungsstelle aktiviert und ob die Substanz im orthosterischen oder dualsterischen Bindungsmodus mit dem Rezeptor interagiert, sollte der Einfluss des orthosterischen Antagonisten Atropin auf die JSW 236-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung bestimmt werden. Für Iperoxo, die orthosterische Muttersubstanz sollte die postulierte, orthosterische Rezeptorinteraktion durch den Nachweis des kompetitiven Antagonismus mit Atropin bestätigt werden.

- Basierend auf dem in der Literatur bereits beschriebenen starken Effekt monovalenter Kationen auf die [³⁵S]GTPγS-Bindung (Hilf und Jakobs, 1992) sollte ein Versuchsansatz entwickelt werden zur Messung der konstitutiven Rezeptoraktivität. Davon ausgehend sollten Untersuchungen zur Erfassung der negativen intrinsischen Aktivität von orthosterischen Antagonisten und von allosterischen Modulatoren durchgeführt werden. Es sollte der Einfluss steigender Konzentrationen von Natriumionen auf die M₂-Rezeptor-unabhängige, die konstitutive und die Agonist-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung als Maß für die Rezeptoraktivierung untersucht werden. Neben dem Wildtyp sollte auch der punktmutierte Rezeptor M₂⁴²²Trp→Ala diesbezüglich charakterisiert werden.
- Um zu überprüfen, ob die allosterischen Modulatoren, die als Baustein der dualsterischen Hybride fungieren, einen inversagonistischen Effekt besitzen, sollte ihr Einfluss auf konstitutiv aktive M₂-Rezeptoren untersucht werden. Für W84 als Prototyp war eine Stabilisierung der inaktiven Rezeptorkonformation bereits bekannt (Hilf und Jakobs, 1992). Vor diesem Hintergrund sollte ferner festgestellt werden, wie sich eine Kombination verschiedener orthosterischer und allosterischer Bausteine auf die Fähigkeit der Rezeptoraktivierung durch Hybridliganden ausübt.
- McN-A-343 wurde in der Literatur als Ligand des M₂-Rezeptors gegensätzlich charakterisiert: Sowohl ein partieller orthosterischer Agonismus (Mutschler et al., 1995), als auch ein allosterischer Agonismus (Langmead und Christopoulos, 2006; May et al., 2007) und eine „bitopische“ Rezeptorinteraktion (Valant et al., 2008) sind beschrieben. In funktionellen Experimenten sollte die Art der Rezeptoraktivierung genauer untersucht werden. Hierzu wurden [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimente und Messungen der zellulären dynamischen Massenumverteilung am M₂-Wildtyp-Rezeptor, an der Punktmutante des allosterischen Epitops M₂¹⁷⁷Tyr→Ala und an der Punktmutante des orthosterischen Epitops M₂¹⁰⁴Trp→Ala durchgeführt. Auch die entsprechenden Bindungsstudien zu

McN-A-343 (Antony Dissertationsschrift, 2007) sollten ergänzend miteinbezogen werden in die Beurteilung der Rezeptorinteraktion.

- Im Verlauf dieser Arbeit stand mit dem optischen Biosensor Epic[®] eine neuartige Technologie zur funktionellen Untersuchung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zur Verfügung. Diese sollte genutzt werden um die M₂-vermittelte Signalwegsaktivierung durch orthosterische und dualsterische Testsubstanzen auf Ganzzellebene zu untersuchen. Zur Durchführung der Messungen der zellulären dynamischen Massenumverteilung in CHO-Zellen sollte in einem ersten Schritt ein Standard-Versuchsprotokoll etabliert werden.
- Darauf aufbauend sollte die Signalwegsaktivierung durch muskarinische Liganden untersucht werden. Hierbei sollte geklärt werden, ob die Aktivierung des M₂-Rezeptors, abhängig von der Struktur des Agonisten, zu unterschiedlichen Konsequenzen führt. Es wurden orthosterische Agonisten und dualsterische Agonisten mit unterschiedlich langen Zwischenketten mittels Messungen der zellulären dynamischen Massenumverteilung untersucht. Zur differenzierten Betrachtung der Aktivierung von G_i- und G_s-Proteinen wurden Petussistoxin, Cholera toxin und der direkte Adenylylzyklaseaktivator Forskolin verwendet.

2 Material und Methoden

In diesem Kapitel sind zunächst die benutzten Materialien (2.1) aufgeführt und darauf folgend die Strukturformeln der Testsubstanzen (2.2). Des Weiteren sind die verwendeten Computerprogramme (2.3) aufgelistet und die verwendeten Methoden (2.4 – 2.7) beschrieben. Abschließend werden kurz die statistischen Auswertungen erläutert.

2.1 Material

Zu Beginn dieses Kapitels wird die Zusammensetzung und Herstellung der verwendeten Lösungen, Puffer und Nährmedien beschrieben (2.1.1). Die Reagenzien, die benutzt wurden, sind im Unterkapitel (2.1.4) aufgelistet. Außerdem wird in diesem Abschnitt eine Übersicht über die eingesetzten Geräte (2.1.2) und Verbrauchsmaterialien (2.1.3) gegeben. Die für die molekularbiologischen Arbeiten verwendeten Primer (2.1.7) und Plasmide (2.1.8) sind ebenfalls dokumentiert. Die Vergabe von Kürzeln dient dem besseren Auffinden von Verweisen im Text.

2.1.1 Lösungen

In der nachfolgend aufgeführten Liste ist die Zusammensetzung aller verwendeten Lösungen, Nährmedien und Puffer angegeben:

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

242 g Tris Base (R59) wurden in 57,1 ml Eisessig und 100 ml 0,5 M EDTA-Lösung (L5) gelöst und mit Aqua destillata (R6) auf 1000 ml aufgefüllt. Die TAE-Stammlösung wurde bei 2-8 °C gelagert.

L2 Ampicillin-Lösung (50 mg/ml)

750 mg Ampicillin-Natrium (R5) wurden in 15 ml Aqua destillata (R6) gelöst, steril filtriert und aliquotiert (zu je 550 µl in zuvor autoklavierte Eppendorf-Caps (M20)). Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

L3 Dulbeccos phosphatgepufferte Kochsalzlösung (D-PBS)

Ein Originalgebinde (9,6 g) des fertigen Konzentrats (R15) wurde in einem Liter Aqua destillata gelöst (R6). Dabei ergaben sich folgende Ionenkonzentrationen: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na₂HPO₄ sowie 1,4 mM KH₂PO₄. Die Lösung wurde anschließend mit Hilfe eines Bottle Top-Filters (M26) steril filtriert und bei 2-8 °C gelagert.

L4 Epic[®]-Puffer (HBSS + 20 mM HEPES)

Aus einer Originalflasche Hanks' balanced salt solution (500 ml, R24) wurden 10 ml verworfen und durch 10 ml 1 M HEPES-Lösung (R26) ersetzt. Der pH Wert des Epic[®]-Puffers lag bei 7,0. Die Lagerung erfolgte bei 2-8 °C.

L5 EDTA-Lösung (0,5 mM EDTA, pH 8,0)

14,61 mg HEPES als Na-Salz (R27) wurden in 100 ml Aqua destillata (R6) gelöst. Mit 1 M Natronlauge wurde ein pH von 8,0 eingestellt.

L6 Folin-Ciocalteu's Phenolreagenz-Verdünnung

Ein Teil Folin-Ciocalteu's Phenolreagenz (R19) wurde mit drei Teilen Aqua destillata (R6) versetzt und bei Raumtemperatur gelagert.

L7 Forskolin-Stammlösung

Forskolin (R20) wurde in DMSO (R12) in einer Konzentration von 40 mM gelöst. Aliquota der Stammlösung wurden bei -30 °C gelagert.

L8 GDP-Stammlösung 10 mM

GDP-Mononatriumsalz (R23) wurde eingewogen, in Aqua pro analysi (R7) gelöst, zu je 50 µl aliquotiert und bei -30 °C eingefroren.

L9 Glucose-Lösung 20 %

4 g Glucose (R10) wurden in 20 ml Aqua destillata (R6) gelöst. Die Lösung wurde anschließend mit Hilfe eines Bottle Top-Filters (M26) steril filtriert und bei -30 °C gelagert.

L10 Glycerol-Lösung 60 %

30,3 ml Glycerol (R22) und 19,7 ml Aqua destillata (R6) wurden gemischt, steril filtriert (siehe L9) und à 10 ml aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -30 °C.

L11 HEPES-Stammlösung 200 mM

Ein Drittel HEPES-Natriumsalz (R27) und zwei Drittel der freien HEPES-Säure (R25) wurden eingewogen, in Aqua destillata gelöst (R6) und mit 1 M Natronlauge (R46) auf pH 7,4 eingestellt. Die Lösung wurde bei 2-8 °C gelagert.

L12 Homogenisationspuffer (20 mM HEPES, 10 mM Na₂-EDTA)

50 ml HEPES-Stammlösung (L11) und 50 ml Natrium-EDTA-Lösung (R16) wurden mit 400 ml Aqua destillata (R6) versetzt. Die Lagerung erfolgte bei 2-8 °C.

L13 Humanes Serumalbumin-Kalibrierlösung (2 mg/ml)

Humanes Serumalbumin (R29) wurde zur Erstellung einer Kalibriergeraden bei der Proteinbestimmung (siehe 2.5.4) eingewogen. Als Lösungsmittel wurde der Puffer verwendet, in dem auch das zu untersuchende Homogenat gelöst war.

L14 Inkubationspuffer A

(12,5 mM HEPES, 12,5 mM MgCl₂, 125 mM NaCl) für GTPγS-Assay

HEPES (zu einem Drittel als Na⁺-Salz (R27) und zu zwei Dritteln als Säure (R25)), MgCl₂ x 6 H₂O (R39) und NaCl (R44) wurden eingewogen, in Aqua destillata (R6) gelöst und mit 1 M Natronlauge (R46) auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Im Reaktionsansatz ergaben sich daraus folgende Konzentrationen: 10 mM HEPES, 10 mM MgCl₂ und 100 mM NaCl. Der Puffer wurde bei 2-8 °C gelagert.

L15 Inkubationspuffer B

(12,5 mM HEPES, 12,5 mM MgCl₂, 62,5 mM NaCl) für GTPγS-Assay

HEPES, zu einem Drittel als Na⁺-Salz (R27), zu zwei Dritteln als Säure (R25), MgCl₂ x 6 H₂O (R39) und NaCl (R44) wurden eingewogen, in Aqua destillata (R6) gelöst und mit 1 M Natronlauge (R46) auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Im Reaktionsansatz ergaben sich daraus folgende Konzentrationen: 10 mM HEPES, 10 mM MgCl₂ und 50 mM NaCl. Der Puffer wurde bei 2-8 °C gelagert.

L16 Inkubationspuffer C

(12,5 mM HEPES, 12,5 mM MgCl₂) für GTPγS-Assay

HEPES, zu einem Drittel als Na⁺-Salz (R27), zu zwei Dritteln als Säure (R25) und MgCl₂ x 6 H₂O (R39) wurden eingewogen und in Aqua destillata (R6) gelöst und mit 1 M Natronlauge (R46) auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Im Reaktionsansatz ergaben sich daraus folgende Konzentrationen: 10 mM HEPES und 10 mM MgCl₂. Der Puffer wurde bei 2-8 °C gelagert. Zu beachten war, dass durch das Na⁺-Salz der Puffersubstanz HEPES ein Restgehalt von 4 mM Na⁺ im Inkubationspuffer C enthalten war.

L17 IPTG-Lösung 10 mM

24 mg IPTG (R31) wurden in 10 ml Aqua destillata (R6) gelöst. Die Lagerung erfolgte bei 2-8 °C.

L18 Kaliumnatriumtartrat-Lösung 2 % (m/m)

Kaliumnatriumtartrat (R33) wurde eingewogen, in Aqua destillata (R6) gelöst und bei Raumtemperatur gelagert.

L19 Kupfer(II)sulfat-Lösung 1 % (m/m)

Kupfersulfat (R34) wurde eingewogen, in Aqua destillata (R6) gelöst und bei Raumtemperatur gelagert.

L20 Lagerungspuffer [³⁵S]GTPγS (10 mM Tricine, 10 mM DTT)

Tricine (R58) und DTT (R13) wurden eingewogen und in Aqua pro analysi (R7) gelöst. Der pH-Wert dieser Lösung betrug 7,6. Die Lagerung erfolgte bei -30 °C.

L21 Luria-Bertani Agarplatten, Ampicillin-haltig

18,5 g Luria-Bertani Agar (R37) wurden mit 500 ml Aqua destillata (R6) in der Mikrowelle erwärmt, bis eine klare Lösung entstand. Die Lösung wurde autoklaviert (121 °C, 20 min). Nach langsamem Abkühlen auf ca. 55 °C wurden 200 µl Ampicillin-Lösung (L1) zugesetzt. Der Agar wurde anschließend mit Hilfe einer 25 ml Einmalpipette (M4) in sterile Petrischalen (Durchmesser: 10 cm) ausgegossen (ca. 25 ml pro Platte). Der Agar erstarrte bei Raumtemperatur, danach erfolgte die Lagerung bei 2-8 °C.

L22 Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)

12,5 g LB-Medium (R38) wurden in 500 ml Aqua destillata (R6) gelöst und bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Die Lagerung erfolgte über maximal vier Wochen bei 2-8 °C.

L23 Nährmedien

Alle Nährmedien zur Kultivierung von Zellen wurden unter aseptischen Bedingungen an einer Sterilwerkbank (G26) hergestellt und bei 2-8 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Kurz vor Gebrauch wurde das Nährmedium in einem Wasserbad (G38) auf 37 °C vorgewärmt.

L23.1 Nährmedium für stabil transfizierte CHO-M₂-Zellen

Komponente	Volumen (ml)	Konzentration in der fertigen Lösung
Nutrient Mixture F-12 Ham (R47)	500	
Fetales Kälberserum (R18)	50	ca. 10 %
Penicillin-Streptomycin-Lösung (R49)	5	ca. 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin
L-Glutamin-Lösung 200 mM (R35)	3	ca. 1 mM
G418 (R21)	1	0,2 mg/ml

L23.2 Nährmedium für stabil transfizierte Flp-CHO-M₂-Zellen

Komponente	Volumen (ml)	Konzentration in der fertigen Lösung
Nutrient Mixture F-12 Ham (R47)	500	
Fetales Kälberserum (R18)	50	ca. 10 %
Penicillin-Streptomycin-Lösung (R49)	5	ca. 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin
L-Glutamin-Lösung 200 mM (R35)	6	ca. 2 mM

L23.3 Nährmedium zur Selektion stabil transfizierter CHO-M₂-Zellen

Komponente	Volumen (ml)	Konzentration in der fertigen Lösung
Nutrient Mixture F-12 Ham (R47)	500	
Fetales Kälberserum (R18)	50	ca. 10 %
Penicillin-Streptomycin-Lösung (R49)	5	ca. 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin
L-Glutamin-Lösung 200 mM (R35)	6	ca. 2 mM
Hygromycin B (R30)	6,67	0,6 mg/ml

L23.4 Nährmedium für CHO-K1-Zellen

Komponente	Volumen (ml)	Konzentration in der fertigen Lösung
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (R14)	500	
Fetales Kälberserum (R18)	50	ca. 10 %
Penicillin-Streptomycin-Lösung (R49)	5	ca. 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin

L23.5 Nährmedium für Escherichia coli Bakterien

Komponente	Volumen (ml)	Konzentration in der fertigen Lösung
Luria-Bertani-Medium (R38)	500	
Ampicillin-Lösung (L1)	0,5	1 mg/ml

L24 Natriumbutyrat-Stammlösung 100 mM

Natriumbutyrat (R42) wurde eingewogen und mit Aqua destillata (R6) zu 100 ml ergänzt. Die Lösung wurde bei 2-8 °C gelagert und kurz vor dem Gebrauch mit einem Mikrofilter (M24) steril filtriert.

L25 Natriumcarbonat-Lösung 2 % (m/m)

Vor jeder Proteinbestimmung wurde Natriumcarbonat (R43) frisch eingewogen und in 0,1 M Natronlauge (R45) gelöst.

L26 NZY-Lösung pH 7,5

4,2 g NZY-Broth (R48) wurden in 200 ml Aqua destillata (R6) gelöst. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit 1 M NaOH (R46). Die Lösung wurde autoklaviert, die Lagerung erfolgte bei 2-8 °C.

L27 NZY⁺-Lösung

Zu 10 ml NZY-Lösung (L26) wurden 200 µl 20-prozentige Glucoselösung (L9) zugegeben. Die Lagerung erfolgte bei 2-8 °C.

L28 Polyethylenimin (PEI)-Lösung 0,1 %

1,0 g PEI-Lösung 50 % (R50) wurden mit Aqua destillata (R6) ad 500 ml aufgefüllt. Die Lagerung erfolgte bei 2-8 °C.

L29 Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA)

40 ml der 50x-Stammlösung (L1) wurden zu 2000 ml Aqua destillata (R6) verdünnt. Die Lagerung erfolgte bei 2-8 °C.

L30 Tris-EDTA-Puffer (TE) 10 mM

Ethylendiamintetraessigsäure (R16) wurde unter Zugabe von 1 M NaOH (R46) in 70 ml Aqua destillata (R6) gelöst. Es wurde Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (R59) hinzugefügt und der pH-Wert mit 1 M HCl (R56) auf 8,0 eingestellt. Nach dem Ergänzen des fehlenden Volumens ad 100 ml wurde die Lösung mit einem Mikrofilter (M24) steril filtriert und bei 2-8 °C gelagert.

L31 X-Gal-Lösung 10 %

20 mg X-Gal (R61) wurden in 1 ml Dimethylformamid (R11) gelöst und bei 2-8 °C gelagert.

L32 Zentrifugationspuffer (20 mM HEPES, 0,1 mM Na₂-EDTA)

50 ml HEPES-Stammlösung (L11) wurden mit 0,5 ml Natrium-EDTA-Lösung (R16) versetzt und mit Aqua destillata (R6) zu 500 ml ergänzt. Der Puffer wurde bei 2-8 °C gelagert.

2.1.2 Geräte

In der nachfolgend aufgeführten Liste sind die verwendeten Gerätschaften aufgelistet.

Kürzel	Gerät	Firma
G1	φ 390 pH/Temp/mV/ISE Meter 511213	Beckman
G2	1450 Microbeta [®] Trilux Liquid Scintillation & Luminescence Counter	Perkin
G3	AccuJet [®]	Brand
G4	Analysenwaage AG204	Mettler
G5	AlphaDigiDoc [™] Gel Dokumentation & Image Analysis System	Alpha

G6	Avanti® J-20 XP Zentrifuge, Rotortypen: JS 4.3, JS 5.3, JA 25.50	Beckman
G7	Axiovert 25 Mikroskop	Zeiss
G8	Beckman Counter LS-6000 SC (Flüssigkeits-Szintillationszähler)	Beckman
G9	Biorad Power Pac 300	Biorad
G10	Biorad Sub Cell Model 192	Biorad
G11	Brutschrank B6060	Heraeus
G12	Dri-Block® DB-2A (Heizblock)	Techne
G13	Duran® Erlenmeyer-Kolben weithalsig (50 ml)	Duran
G14	Eismaschine AF-100, AS-E 230/50/1	Scotsman
G15	EH3 basic (temperiertes Rührwasserbad)	IKA
G16	Elix®-Wasseraufbereitungssystem	Millipore
G17	Epic®-Biosensor	Corning
G18	Eppendorf Thermomixer compact	Eppendorf
G19	Eppendorf Zentrifuge 5417C	Eppendorf
G20	Finnpipette Digital (unterschiedliche Volumina)	Thermo
G21	Finnpipette Digital, Multikanal (5-50µl)	Thermo
G22	Finnpipette Stepper	Thermo Forma
G23	GeneAmp PCR-System	Perkin
G24	Harvester 96® (Mach III M, Tomtec, Produktnr.: 963-589)	Perkin
G25	Harvester 96® (Mach III M, Tomtec, Produktnr.: 990607010)	Perkin
G26	Herasafe Werkbank HS 15, Klasse II	Heraeus
G27	Mikrowelle R-611	Sharp
G28	Milli-Q® Reinstwassersystem	Millipore
G29	MS 1 Minishaker (Kleinschüttler)	IKA

G30	„Mr. Frosty“ 5100 Cryo 1 °C Freezing Container	Nalgene
G31	Neubauer Zählkammer	VWR
G32	Optima® LE-80K Ultrazentrifuge (Rotorty: 35)	Beckman
G33	Orbital Shaker 420	Thermo Forma
G34	PowerPac Basic Power Supply	Biorad
G35	Polytron-Homogenisator PT 10-35	Kinematica
G36	Präzisionsküvetten 100-QS	Hellma
G37	Präzisionswaage PB403-S	Mettler
G38	Schüttelwasserbad GFL 1083	GFL
G39	Stickstofftank LS 750	Taylor
G40	Sub-Cell GT System (Elektrophoresekammer)	Biorad
G41	Thermo Forma Series II Water Jacketed CO ₂ Incubator	Thermo Forma
G42	Ultrospec 3300 pro (UV-VIS-Spektrometer)	Biochrom
G43	Varioklav Dampfsterilisator Typ 135 S	H+P
G44	Variomag Elektronikrührer (Magnetrührer)	H+P

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Alle Verbrauchsmaterialien, die im Rahmen dieser Dissertation verwendet wurden, sind in der folgenden Liste aufgeführt.

Kürzel	Material	Artikel- nummer	Firma
M1	1,2 ml Standardplatte PP, 96 Kavitäten, unsteril	AB-0564	Abgene
M2	95 µl Standardplatte PP, 384 Kavitäten, unsteril	3657	Corning
M3	Cellstar® Einmalpipette 10 ml, steril	607160	Greiner
M4	Cellstar® Einmalpipette 25 ml, steril	760160	Greiner

Material und Methoden

M5	Cellstar [®] Filter Top Zellkulturflasche 25 cm ²	690175	Greiner
M6	Cellstar [®] Filter Top Zellkulturflasche 75 cm ²	658175	Greiner
M7	Cellstar [®] Standard Zellkulturflasche 175 cm ²	660160	Greiner
M8	Cellstar [®] Zellkulturschale mit Nocken, 145 x 20 mm, steril	639160	Greiner
M9	Cellstar [®] Zellkulturschale mit Nocken, 100 x 20 mm, steril	664160	Greiner
M10	Cryogenic Vials, 1 ml (Einfrierröhrchen)	50001012	Nalgene
M11	Epic [®] 384 Well Cell Assay, Mikrotiterplatte	5040	Corning
M12	Epic [®] 384 Well Cell Assay, Mikrotiterplatte, mit Fibronectin beschichtet	5042	Corning
M13	Glasfaserfilter (Durchmesser 25 mm)	10370018	Whatman
M14	MicroAmp [®] Reaktionsgefäße 0,2 ml	N8010540	App Bio
M15	Parafilm [®] M laboratory film	PM-996	Pechiney
M16	Pasteurpipetten aus Glas, ca. 150 mm	747715	Brand
M17	Pipettenspitzen 0,5-5 ml		Brand
M18	Pipettenspitzen Tip-One [®] 1-200 µl, 10-1000 µl		Starlab
M19	Plate Cassette	1450-105	Perkin
M20	Polypropylen-Reaktionsgefäß 1,5 ml, mit angehängtem Deckel	616201	Greiner
M21	PP-Röhrchen 15 ml, mit konischem Boden (Falcon)	188271	Greiner
M22	PP-Röhrchen 50 ml, mit konischem Boden (Falcon)	227261	Greiner
M23	Printed Filtermat A (Glasfaser-Filtermatten)	1450-421	Perkin
M24	Qualilab [®] Spitzenvorsatzfilter, 0,22 µm CM-Membran, steril	5122110	Merck Lab
M25	Sample Bag	1450-432	Perkin
M26	SFCA Bottle-Top-Filter 150 ml, steril	290-4520	Nalgene
M27	Szintillationsflasche, HD-Polyethylen, 17,0 / 60,0 mm	619301	Greiner
M28	Zellschaber, 25 cm	83.1830	Sarstedt

Material und Methoden

M29	Zentrifugenbehältnis, PP, 500 ml	361691	Beckman
M30	Zentrifugenröhrchen, Polycarbonat, 50 ml	3138-0050	Nalgene

2.1.4 Reagenzien

Die verwendeten Reagenzien sind in dieser Tabelle aufgelistet.

Kürzel	Reagenz	Artikelnummer	Firma
R1	1 kb DNA Ladder	15615016	Invitrogen
R2	2-Propanol 99,5 % (HPLC)	34863	Qiagene
R3	10X BlueJuice™ (Gelladepuffer)	10816015	Invitrogen
R4	Agarose	A9539	Sigma
R5	Ampicillin-Natrium (M = 371,4 g/mol)	A9518	Sigma
R6	<i>Aqua destillata</i> (hergestellt mittels einer Elix®- Wasseraufbereitungsanlage)		Millipore
R7	<i>Aqua pro analysi</i> (hergestellt mittels eines Milli Q®-Reinstwassersystems)		Millipore
R8	Blasticidin S Hydrochlorid	R21001	Invitrogen
R9	Bovines Serumalbumin (BSA)	B9001S	NE
R10	D(+)-Glucose-Monohydrat	8346	Merck
R11	Dimethylformamid	40248	Fluka
R12	Dimethylsulfoxid (DMSO; M = 78,1 g/mol)	D5879	Sigma
R13	DL-Dithiothreitol (DTT, (R*,R*)-(±)-1,4-Dimercaptobutan-2,3-diol; M = 154,3 g/mol)	D0632	Sigma
R14	Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)	D5796	Sigma

Material und Methoden

R15	Dulbecco's phosphatgepufferte Kochsalzlösung (D-PBS)	D5652	Sigma
R16	EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz; Na ₂ EDTA; Maßlösung; 100 mM)	20271	Grüssing
R17	Ethidiumbromid, wässrige Lösung (10 mg/ml)	15585	Invitrogen
R18	Fetales Kälberserum	F7524	Sigma
R19	Folin-Ciocalteu's Phenolreagenz	109001	Merck
R20	Forskolin (M = 410,5 g/mol)	A2156	AppChem
R21	G418-Disulfat (M = 692,7 g/mol)	ant-gn	Invivogen
R22	Glycerol 99 % (M = 92,1 g/mol)	G5516	Sigma
R23	Guanosin-5'-diphosphat-Natriumsalz (GDP; M = 443,2 g/mol)	G7127	Sigma
R24	Hank's balanced salt solution (HBSS)	14025050	Invitrogen
R25	HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ylethansulfonsäure, M = 238,3 g/mol)	A10690	AppChem
		H3375	Sigma
R26	HEPES wässrige Puffer Lösung 1M	15630056	Invitrogen
R27	HEPES-Natriumsalz (M = 260,3 g/mol)	H7006	Sigma
		A10700	AppChem
R28	Hind III (Restriktionsenzym)	15207012	Invitrogen
R29	Humanes Serumalbumin (HSA; Fraktion V; 96-99 % Albumin)	A1653	Sigma
R30	Hygromycin B (M = 527,5 g/mol)	10687010	Invitrogen
R31	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	I6758	Sigma

Material und Methoden

R32	Kaliumdihydrogenorthophosphat (KH_2PO_4 ; M = 136,09 g/mol)	P5379	Sigma
R33	Kaliumnatriumtartrat-Tetrahydrat ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$; M = 282,22 g/mol)	379832	Sigma
R34	Kupfer(II)sulfat-Pentahydrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; M = 249,7 g/mol)	102790	Merck
R35	L-Glutamin-Lösung 200 mM ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$; M = 146,15 g/mol)	G7513	Sigma
R36	Lipofectamine™ 2000 (Transfektionsreagenz)	11668027	Invitrogen
R37	Luria-Bertani-Agar	L3072	Sigma
R38	Luria-Bertani-Medium	L3522	Sigma
R39	Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$; M = 302,3 g/mol)	M2670	Sigma
R40	Magnesiumhydrogenphosphat-Trihydrat ($\text{MgHPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$; M = 174,33 g/mol)	63080	Fluka
R41	Meltilex™ A (Szintillationswachs)	1450441	Perkin
R42	Natriumbutyrat ($\text{C}_4\text{H}_7\text{NaO}_2$; M = 110,1 g/mol)	A11079	Alfa
R43	Natriumcarbonat (Na_2CO_3 ; M = 106,0 g/mol)	106392	Merck
R44	Natriumchlorid (NaCl ; M = 58,4 g/mol)	0278	Baker
		1064041	Merck
R45	Natronlauge 0,1 M (NaOH 0,1 M)	35263	Riedel
R46	Natronlauge 1 M (NaOH 1 M)	35256	Riedel
R47	Nutrient Mixture F-12 Ham	N4888	Sigma
R48	NZY-Broth	13635024	Gibco
R49	Penicillin-Streptomycin-Lösung (Penicillin 10.000-12.000 U/ml; Streptomycin 10-12 mg/ml)	P0781	Sigma

Material und Methoden

R50	Polyethylenimin-Lösung 50 % in Wasser (m/v) (PEI)	P3143	Sigma
R51	PolyFect® (Transfektionsreagenz)	301107	Qiagene
R52	REact® 2 (Reaktionspuffer, Restriktionsverdau)	-	Invitrogen
R53	Ready Protein+™ (Szintillations-Cocktail)	586604	Beckman
R54	Saccharose (M = 342,3 g/mol)	107687	Merck
R55	Salzsäure 0,1 M (HCl 0,1 M)	35335	Riedel
R56	Salzsäure 1 M (HCl 1 M)	35328	Riedel
R57	T4 DNA Ligase (mit Reaktionspuffer)	15224017	Invitrogen
R58	Tricine ((N-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin; M = 179,2 g/mol)	T0377	Sigma
R59	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS; M = 121,14 g/mol)	108382	Merck
R60	Trypsin-EDTA-Lösung (0,5 g/l Trypsin vom Schwein und 0,2 g/l Natrium-EDTA)	T3924	Sigma
R61	X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galakto-pyranosid)	B4252	Sigma
R62	Xho I (Restriktionsenzym)	15231012	Invitrogen
R63	XL1-Blue Supercompetente Zellen	200236	Stratagene
R64	Zeocin™	R25001	Invitrogen

2.1.5 Kits

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten, kommerziell angebotenen, experimentellen Bausätze (Kits) sind in der nachfolgenden Liste aufgeführt.

Kit	Artikel- nummer	Firma
K1 FAST CAT [®] Chloramphenicol Acetyltransferase Assay Kit	F2900	Invitrogen
K2 Flp-In [™] Complete System	K601001	Invitrogen
K3 Flp-In [™] T-REx [™] Core Kit	K650001	Invitrogen
K4 Plasmid Maxi Kit	12162	Qiagen
K5 QIAquick Gel Extraction Kit	78704	Qiagen
K6 QuickChange [™] site-directed mutagenesis Kit	200519	Stratagene

2.1.6 Firmen

Die in den Tabellen „Geräte“, „Verbrauchsmaterialien“ und „Reagenzien“ verwendeten Firmen-Kürzel stehen jeweils in Klammern hinter dem Firmensitz.

Abgene, Hamburg, Deutschland (Abgene)

Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland (Alfa)

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

AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland (App Chem)

Applied Biosystems, Applera GmbH, Darmstadt, Deutschland (App Bio)

Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland (Beckman)

Beckman Instruments, Palo Alto, USA (Beckman)

Biochrom, Ltd., Cambridge, UK (Biochrom)

BIO-RAD Laboratories, Hercules, USA (Biorad)

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

Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland (Zeiss)

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

Corning Incorporated, New York, USA (Corning)

Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland (Eppendorf)

Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz (Fluka)

Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland (GFL)

Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland (Gibco)

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

Grüssing GmbH, Filsum, Deutschland (Grüssing)

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

Heraeus, Hilden, Deutschland (Heraeus)

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

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

Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA (Invitrogen)

InvivoGen, San Diego, USA (Invivogen)

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

Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland (Kendro)

Kinematica AG, Littau, Schweiz (Kinematika)

Mallinckrodt Baker, Griesheim, Deutschland (Baker)

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

Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland (Merck)

Mettler-Toledo AG, Gießen, Deutschland (Mettler)

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

Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland (Millipore)

Nalgene[®] Nunc International, Rochester, USA (Nalgene)

New England BioLabs[®], Ipswich, USA (NE)

Pechiney Plastic Packaging, Menasha, USA (Pechiney)
Perkin Elmer Life Sciences GmbH, Rodgau-Jügesheim, Deutschland (Perkin)
Qiagene GmbH, Hilden, Deutschland (Qiagene)
Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland (Riedel)
Sarstedt AG Co., Nümbrecht, Deutschland (Sarstedt)
Scotsman Ice Systems, Bettolino di Pogliano, Mailand, Italien (Scotsman)
Sharp Electronics GmbH, Hamburg, Deutschland (Sharp)
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland (Sigma)
Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland (Starlab)
Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande (Stratagene)
Taylor Wharton Harsco GmbH, Husum, Deutschland (Taylor)
Techne AG, Jahnsdorf, Deutschland (Techne)
Thermo Labsystems Oy, Helsinki, Finnland (Thermo)
Thermo Forma Scientific, Marietta, USA (Thermo Forma)
VWR International, Langenfeld, Deutschland (VWR)
Whatman GmbH, Dassel, Deutschland (Whatman)

2.1.7 Primer

Die folgende Tabelle listet die Oligonukleotid-Primer auf, die für die molekularbiologischen Arbeiten entworfen wurden (siehe 2.4.1). Neben der Nukleotidsequenz gibt die letzte Spalte den Verwendungszweck an. Die Abkürzung „Sequenz.“ bezeichnet Primer, die zur Sequenzierung benutzt wurden. Die weiteren Primer wurden zur zielgerichteten Mutagenese verwendet (siehe 2.4.1). Bei Sequenzierung und Mutagenese wurden beide Stränge der Doppelstrang-Nukleinsäure angesprochen. Die Abkürzung „Fw“ steht für *forward* und beschreibt die 5' → 3' Richtung, „Rv“ steht für *reverse* und meint die 3' → 5' Richtung.

Kürzel	Nucleotidsequenz	Funktion bzw. Mutation
P1	GCGCAAATGGGCGGTAGGCGTG	CMV Fw (Sequenz.)
P2	TAGAAGGCACAGTCGAGG	BGH Rv (Sequenz.)
P3	CTTGGCCTGTGCTGACC	M ₂ ¹⁰⁴ Fw (Sequenz.)
P4	CAGCTGCAATCATCATAC	M ₂ ¹⁰⁴ Rv (Sequenz.)
P5	GTATGATGATTGCAGCTGCC	M ₂ ¹⁷⁷ Fw (Sequenz.)
P6	TGGCTCGGGATATGTGC	M ₂ ¹⁷⁷ Rv (Sequenz.)
P7	AATCTTGGCTATTCTGTTGGC	M ₂ ⁴²² Fw (Sequenz.)
P8	CATCATGATTGGCTTGGC	M ₅ ¹⁸⁴ Fw (Sequenz.)
P9	CTGTTTCCCGGTAGATTCCG	M ₅ ¹⁸⁴ Rv (Sequenz.)
P10	AGAGAGGAAAGCAGCC	M ₅ ⁴⁷⁸ Fw (Sequenz.)
P11	CTAGCCCTGGACGCTGTGGTCAGCAATGC	M ₂ ¹⁰⁴ Tyr →Ala Fw
P12	CATTGCTGACCACAGCGTCCAGGGCTAGC	M ₂ ¹⁰⁴ Tyr →Ala Rv
P13	TGTGGAGGATGGGGAGTGCGCCATTCAGTTTTTTTTCC	M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Ala Fw
P14	GGAAAAAACTGAATGGCGCACTCCCCATCCTCCAC	M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Ala Rv
P15	TGTGGAGGATGGGGAGTGCCAGATTCAGTTTTTTTTCC	M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln Fw
P16	GGAAAAAACTGAATCTGGCACTCCCCATCCTCCAC	M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln Rv
P17	CCCCAACACTGTGGCGACAATTGGTTACTGGC	M ₂ ⁴²² Trp→Ala Fw
P18	GCCAGTAACCAATTGTCGCCACAGTGTTGGGG	M ₂ ⁴²² Trp→Ala Rv
P19	GCATCCCCAACACTGTGTGGGCCATTGGTTACTGG	M ₂ ⁴²³ Thr→Ala Fw
P20	CCAGTAACCAATGGCCCACACAGTGTTGGGGATGC	M ₂ ⁴²³ Thr→Ala Rv
P21	GCATCCCCAACACTGTGTGGCATATTGGTTACTGG	M ₂ ⁴²³ Thr→His Fw
P22	CCAGTAACCAATATGCCACACAGTGTTGGGGATGC	M ₂ ⁴²³ Thr→His Rv
P23	CCACTGGATGAGTGATATATCCAGTTTCTCTC	M ₅ ¹⁸⁴ Gln→Tyr Fw

P24	GAGAGAAACTGGATATAGCACTCATCCAGTGG	M ₅ ¹⁸⁴ Gln→Tyr Rv
P25	CAGTCACCCTGGCGCACTTGG	M ₅ ⁴⁷⁷ Trp→Ala Fw
P26	CCAAGTGCGCCAGGGTGACTG	M ₅ ⁴⁷⁷ Trp→Ala Rv
P27	CAGTCACCCTGTGGACCTTGGGCTATTGG	M ₅ ⁴⁷⁸ His→Thr Fw
P28	CCAATAGCCCAAGGTCCACAGGGTGACTGG	M ₅ ⁴⁷⁸ His→Thr Rv

2.1.8 Plasmide

Die hier aufgelisteten Plasmide wurden zur transienten und stabilen Transfektion im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

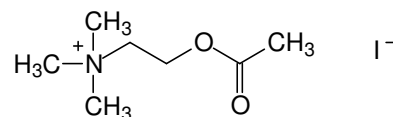
Kürzel	Bezeichnung	Firma/ Ursprung
D1	Hm2pcD	Prof. Dr. J.Ellis Penn State University, Hershey PA, USA
D2	Hm2 ⁴²² Trp→Ala	Mutagenese (Prilla, 2007)
D3	pcDNA3.1hm2	S&T
D4	pcDNA3.1hm5	S&T
D5	pOG 44	Invitrogen
D6	pcDNA5/FRT/TO	Invitrogen

2.2 Strukturformeln der Testsubstanzen

2.2.1 Orthosterische Agonisten

Acetylcholin

M = 273,1 g/mol

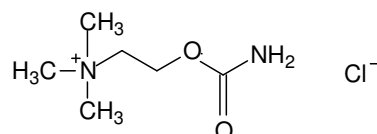


Physiologie: Neurotransmitter im ZNS; Überträgerstoff an der motorischen Endplatte, an allen präganglionären Synapsen des vegetativen Nervensystems, an allen postganglionären Synapsen des Parasympathikus sowie an den sympathischen Endigungen der Schweißdrüsen.

Lieferant (Artikelnummer): Sigma (A 7000)

Carbachol

M = 182,7 g/mol



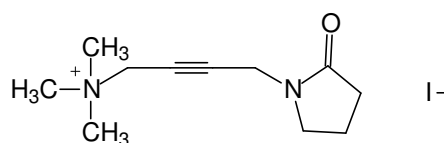
Eigenschaften: Carbachol ist ein Strukturanalogon von Acetylcholin. Die Carbamoylgruppe verleiht dem Pharmakon eine erhöhte chemische Stabilität. Somit wird es nur sehr schlecht von der Acetylcholinesterase gespalten und besitzt eine längere Halbwertszeit als das therapeutisch unbedeutende Acetylcholin.

Indikation: Parasympathomimetikum, Anwendung in der Ophthalmologie als Antiglaukommittel in Form von Augentropfen.

Lieferant (Artikelnummer): Merck (212385)

Oxotremorin M

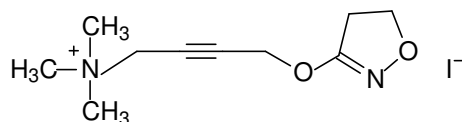
M = 322,2 g/mol



Lieferant (Artikelnummer): Sigma (O 100)

Iperoxo

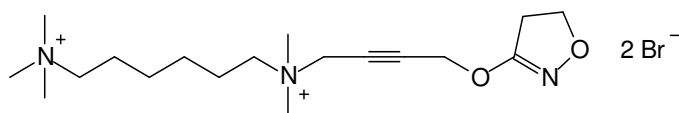
M = 324,2 g/mol



Synthese: Arbeitskreis Prof. Dr. M. De Amici (Istituto di Chimica Farmaceutica e Tossicologica, Università degli Studi di Milano, Italien).

JSW 236

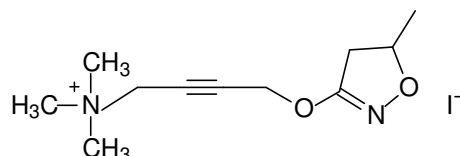
M = 485,3 g/mol



Synthese: Arbeitskreis Prof. Dr. U. Holzgrabe (Pharmazeutische Chemie, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Universität Würzburg).

Methylperoxo (MIO)

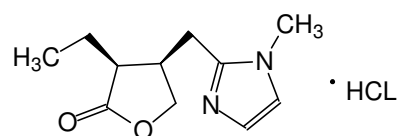
M = 338,2 g/mol



Synthese: Arbeitskreis Professor Dr. M. De Amici (Istituto di Chimica Farmaceutica e Tossicologica, Università degli Studi di Milano, Italien).

Pilocarpin

M = 244,7 g/mol



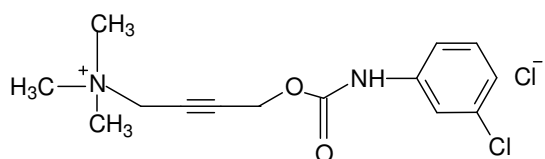
Vorkommen: Die freie Base ist das Hauptalkaloid aus den Blättern von Pilocarpus-Arten aus der Familie der Rutaceae.

Indikation: In der Ophthalmologie lokal als Antiglaukommittel; systemisch zur Behandlung der Mund- und Augentrockenheit bei Sjögren-Syndrom (Rote Liste® 2009).

Lieferant (Artikelnummer): Fluka (80475)

McN-A-343

M = 317,2 g/mol

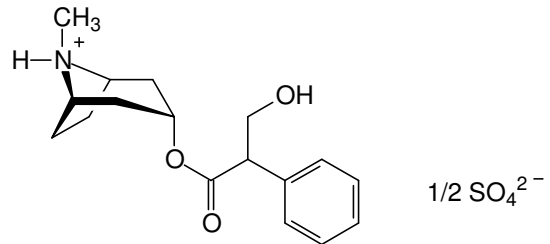


Lieferant (Artikelnummer):
Sigma (C 7041)

2.2.2 Orthosterische Antagonisten

Atropin (DL-Hyoscyamin)

M = 676,8 g/mol



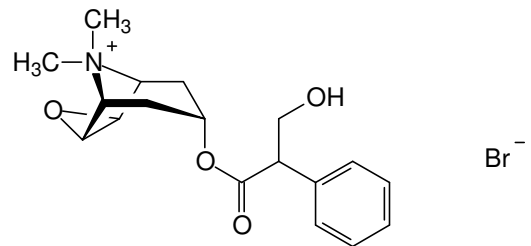
Vorkommen: Die freie Base ist das Racemat des nativ in Solanaceen (Atropa belladonna, Datura stramonium u.a.) vorkommenden L-Hyoscyamins.

Indikation: Parasympatholytikum in der Ophthalmologie, bei Koliken des GI-Trakts, zur Operationsvorbereitung, bei Bradyarrhythmien sowie als Antidot bei Organophosphat-Vergiftungen (Rote Liste® 2009).

Lieferant (Artikelnummer): Sigma (A 0257)

N-Methylscopolamin

M = 398,3 g/mol

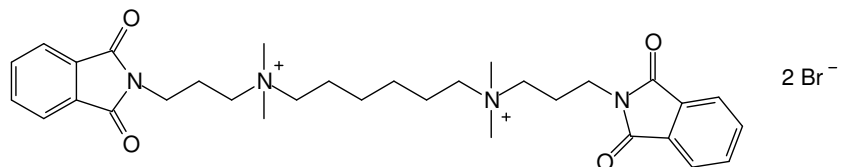


Lieferant (Artikelnummer): Fluka (80475)

2.2.3 Allosterische Liganden

W84

M = 708,5 g/mol

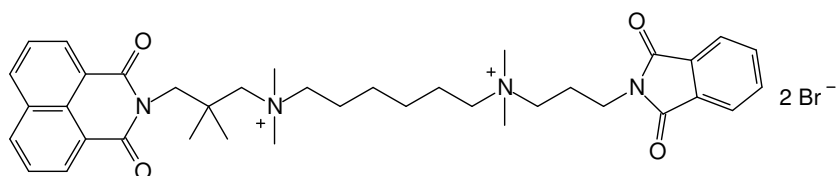


Synthese: Dr. J. Pfeffer (Pharmakologisches Institut, Universität Kiel, Deutschland). Die Synthesevorschrift wurde von Wassermann (1972) etabliert.

Naphmethonium

(MM3A)

M = 786,6 g/mol

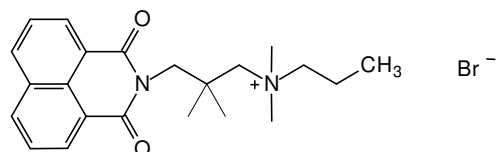


Synthese: Arbeitskreis Prof. Dr. U. Holzgrabe (Pharmazeutische Chemie, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Universität Würzburg).

Seminaph

(MM7A)

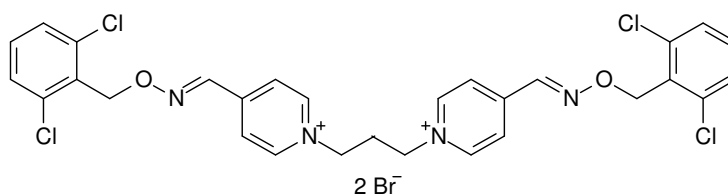
M = 737,8 g/mol



Synthese: Arbeitskreis Prof. Dr. U. Holzgrabe (Pharmazeutische Chemie, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Universität Würzburg).

Duo3

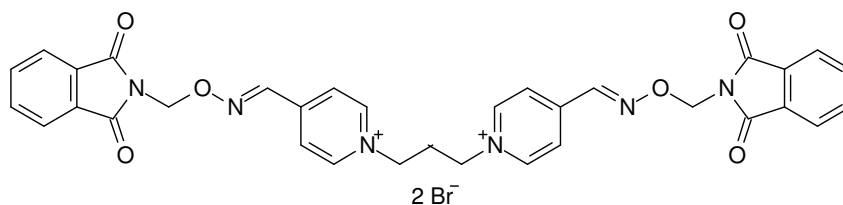
(M = 764,2 g/mol)



Synthese: Arbeitskreis Prof. Dr. U. Holzgrabe (Pharmazeutische Chemie, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Universität Würzburg).

WDuo3

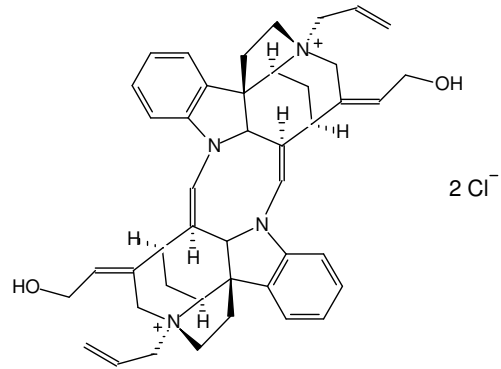
(M = 764,4 g/mol)



Synthese: Arbeitskreis Prof. Dr. U. Holzgrabe (Pharmazeutische Chemie, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Universität Würzburg).

Alcuronium

M = 737,8 g/mol



Indikation: stabilisierendes Muskelrelaxanz

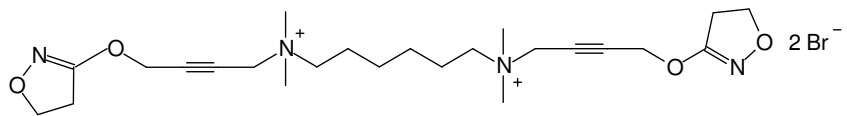
Herkunft: Die Substanz wurde unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise von der Hoffmann-La Roche AG (Grenzach-Wyhlen) überlassen.

2.2.4 Orthosterisch-orthosterische Hybride

Die Hybridverbindungen wurden im Arbeitskreis von Prof. Dr. M. De Amici (Istituto di Chimica Farmaceutica e Tossicologica, Università degli Studi di Milano, Italien) synthetisiert.

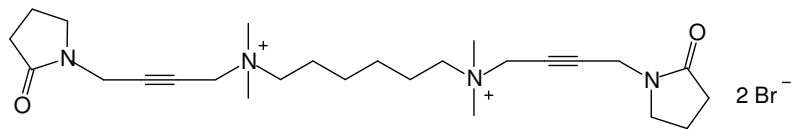
CZA 1

M = 608,4 g/mol



CZA 2

M = 604,5 g/mol

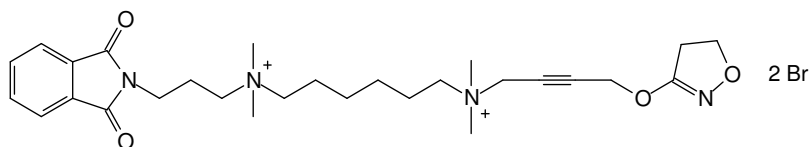


2.2.5 Allosterisch-orthosterische Hybride

Wenn nicht gesondert gekennzeichnet, wurden die Hybridverbindungen im Arbeitskreis von Prof. Dr. M. De Amici (Istituto di Chimica Farmaceutica e Tossicologica, Università degli Studi di Milano, Italien) synthetisiert.

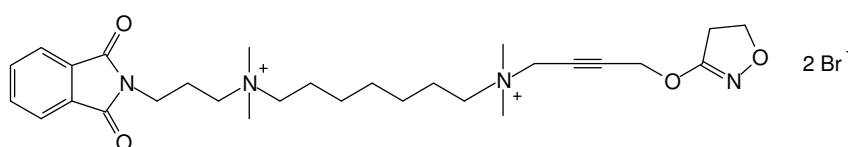
Hybrid 1

M = 658,5 g/mol



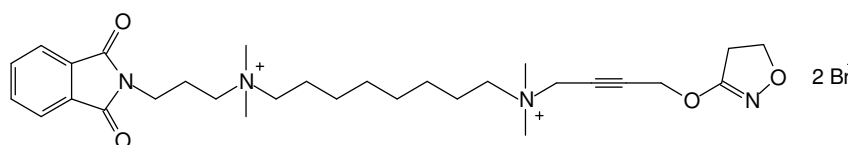
CZA 7

M = 672,5 g/mol



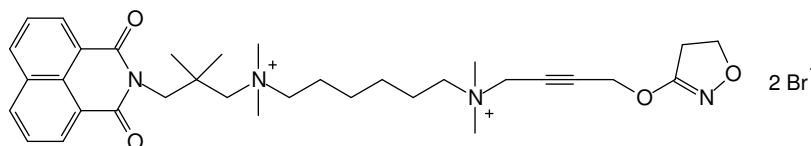
CZA 8

M = 686,5 g/mol



Hybrid 2

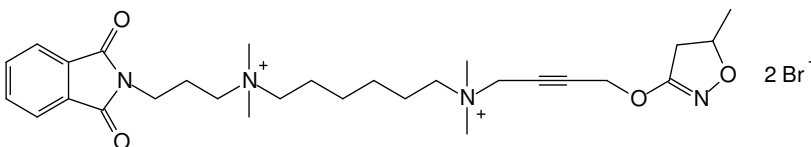
M = 736,6 g/mol



Synthese: Arbeitskreis Prof. Dr. U. Holzgrabe (Pharmazeutische Chemie, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Universität Würzburg).

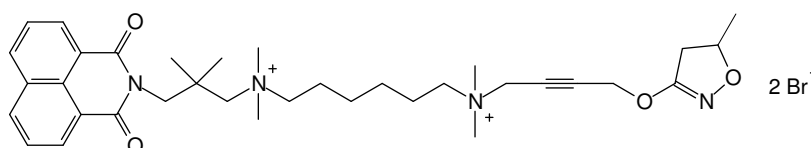
MF-1

M = 672,5 g/mol



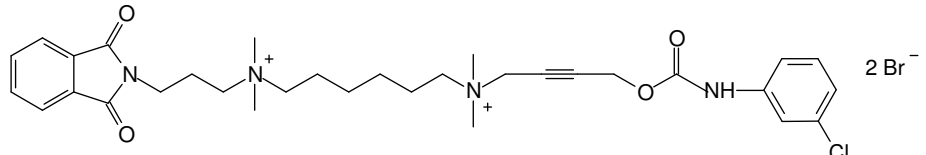
MF-2

M = 750,6 g/mol



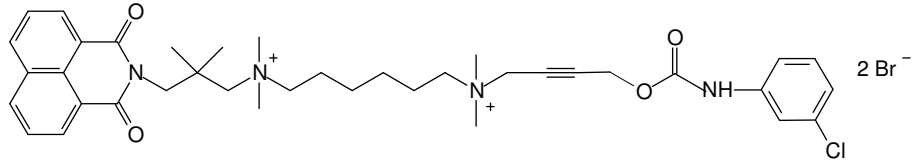
MG-1

M = 743,0 g/mol



MG-2

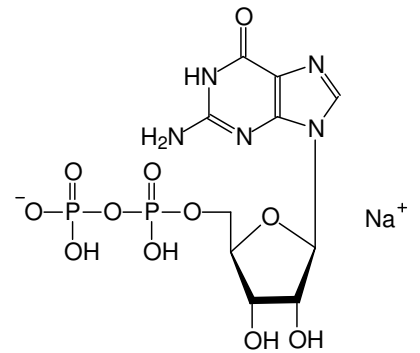
M = 821,1 g/mol



2.2.6 Nukleotide

GDP

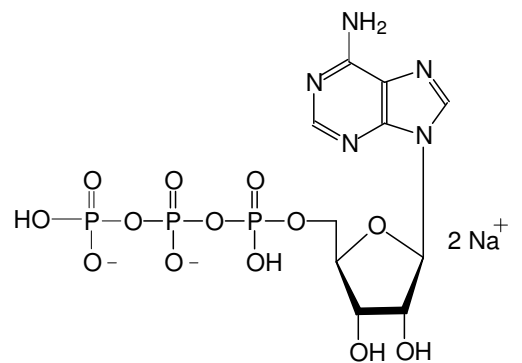
M = 465,2 g/mol



Lieferant (Artikelnummer): Sigma (G 7127)

ATP

M = 551,1 g/mol



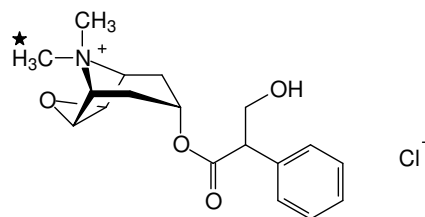
Lieferant (Artikelnummer): Sigma (A 6559)

2.2.7 Radioliganden

[³H]N-Methylscopolamin

M = 353,8 g/mol

Spezifische Aktivität:
70-82 Ci/mmol, je nach Charge

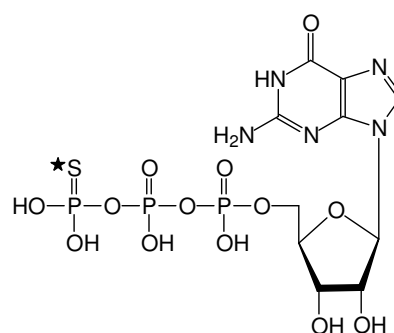


Lieferant (Artikelnummer): Perkin Elmer (NET636001MC)

[³⁵S]GTPγS

M = 539,2 g/mol

Spezifische Aktivität: 1250 Ci/mmol



Lieferant (Artikelnummer): Perkin Elmer (NEG030H250UC)

2.3 Computerprogramme

Zur Erstellung dieser Arbeit wurden die folgenden Computerprogramme verwendet:

AlphaDigiDoc™ AD1000 (AlphaInnotech, San Leandro, Kalifornien, USA)

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

ChromasPro 2.31 (Technelysium, Tewantin, QLD, Australien)

GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA)

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

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

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

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

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

2.4 Molekularbiologische Methoden

In diesem Kapitel sind verschiedene molekularbiologischen Vorarbeiten beschrieben, die zur Herstellung der stabilen Expressionszelllinien (siehe 1.5) erforderlich waren.

2.4.1 Zielgerichtete Mutagenese

Zur Erzeugung der gewünschten Rezeptormutanten (siehe Tabelle 3) wurden in die DNA des M₂-Rezeptor Wildtyps zielgerichtete Punktmutationen eingefügt. Als Mutationsmethode wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit modifizierten Primern verwendet.

Die PCR stellt zurzeit das wichtigste Verfahren zur enzymatischen Vervielfältigung von DNA dar. Ausgehend von einer DNA-Matrize wird die neue DNA synthetisiert. Eingesetzt werden spezifische Oligonukleotidprimer, DNA-Bausteine in Form von Nukleotiden und eine geeignete DNA-Polymerase. Der Ablauf einer klassischen PCR kann in drei Abschnitte gegliedert werden: Denaturierung, Annealing und Elongation. In dieser Arbeit wurde bei der experimentellen Durchführung nach dem Handbuch des verwendeten Kits (Quick-Change[®] Site-Directed Mutagenesis Kit, K6) vorgegangen.

Die verwendeten Primer sind in 2.1.7 aufgelistet. Dabei wurde die gewünschte Punktmutation durch Austausch der entsprechenden Basen mittig in die Sequenz eingebaut. Außerdem wurden bei der Primerauswahl folgende Punkte berücksichtigt: Die Primer sollten eine Länge von 15-30 Basenpaaren und einen Guanin/Cytosin-Anteil von 40-60 % aufweisen, was zu einem Schmelzbereich von 55-80 °C führt.

Neben den eigentlichen Reaktionsansätzen zur PCR wurde ein Kontrollansatz mit pWhitescript-Kontrollplasmid zur Überprüfung des korrekten Ablaufs mitgeführt (gemäß Handbuch K6). Die Ansätze wurden in dünnwandige Reaktionsgefäße (M14), die eine optimale Temperaturübertragung im Thermocycler (G23) gewährleisten, pipettiert. Folgender Reaktionsansatz wurde gewählt: 5 µl Reaktionspuffer, 2 µl Plasmid-DNA-Matrize (10 ng), je 2 µl der Oligonukleotid-Primer (je 125 ng), 1 µl dNTP-Mix, 38 µl Aqua pro analysi (R7).

Erst kurz vor Start der Reaktion wurde den Ansätzen die DNA-Polymerase zugesetzt, wobei den Herstellerangaben entsprechend eine Pfu-Turbo[®]-Polymerase (in K6) verwendet wurde. Diese stammt aus dem Bakterium *Pyrococcus furiosus* und weist zusätzlich zu ihrer Polymerasetätigkeit eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität auf, die zusätzlich eine Korrektur

fehlerhaft eingebauter Nukleotide ermöglicht. Weiterhin ist die Pfu-Turbo[®]-Polymerase thermostabiler als die klassischerweise verwendete Taq-Polymerase.

Nach Polymerase-Zusatz wurden die Proben im Thermocycler (G23) platziert, welcher ein vorgegebenes Inkubationsprotokoll durchläuft. Zunächst wurde auf eine Temperatur von 95 °C erhitzt, um die doppelsträngige DNA-Matrize zu denaturieren. Wasserstoffbrückenbindungen, die beide Stränge zusammenhalten, wurden aufgebrochen, sodass Einzelstränge vorlagen. Nach 30 s wurde die Temperatur auf 55 °C vermindert, wodurch eine Hybridisierung der Oligonukleotidprimer an die DNA-Matrize stattfinden konnte (Annealing). Darauf folgend wurde auf 68 °C erhitzt; diese Temperatur stellt das Optimum für die Aktivität der Pfu-Turbo[®]-Polymerase dar und gewährleistete eine Elongation der Primer: am 3'-Ende wurden Nukleotide angelagert, bis wieder eine vollständig doppelsträngige DNA vorlag. Die PCR läuft typischerweise in mehreren Zyklen ab, wobei die Anzahl der Zyklen abhängig von der Anzahl ausgetauschter Basen angepasst wurde. Auch die Elongationszeit innerhalb eines Zyklus ist variabel und hängt von der Syntheserate der verwendeten Polymerase ab. Die Reaktionsgeschwindigkeit der hier verwendeten Pfu-Turbo[®]-Polymerase betrug 2 min/kb. Bei einem Plasmid von 6 kb war daher eine Elongationszeit von 12 min pro Zyklus ausreichend. Nach 18-20 durchlaufenen Zyklen wurde das erhaltene Produkt auf 4 °C gekühlt.

Um die DNA-Matrize aus dem PCR-Produkt zu entfernen, war ein nachträglicher Verdau mit der Endonuklease DpnI geeignet. DpnI stammt aus einem E. coli-Stamm mit dem Methylierungssystem (DNA-Adenin-Methyltransferase) und kann sowohl methylierte als auch hemimethylierte DNA-Stränge wie die Ursprungs-DNA erkennen und abbauen. Die Struktur der durch PCR neu synthetisierten und unmethylierten DNA wurde dabei nicht angegriffen. Nach Abschluss der PCR erfolgte der DpnI-Verdau der Ursprungs-DNA: Dazu wurde den Proben 1 µl DpnI Restriktions-Enzym (10 U/µl, in K6 enthalten) zugesetzt. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde bei 37 °C. Anschließend konnte mittels Agarose-Gelelektrophorese (wie unter 2.4.5.2 beschrieben) überprüft werden, ob die Mutation erfolgreich war: War eine Bande sichtbar, so war Plasmid-DNA vorhanden. Die PCR-Produkte wurden bei 4 °C gelagert.

2.4.2 Transformation

Als Transformation wird in der Molekularbiologie die nicht-virale Aufnahme von freier DNA in kompetente Bakterienzellen bezeichnet. In dieser Arbeit wurden superkompetente XL-1-Blue Escherichia coli vom Stamm K12 (in K6 enthalten) verwendet.

Zunächst wurden Ampicillin-haltige Agarplatten hergestellt: Dazu wurden 18,5 g LB-Agar (R37) in 500 ml Aqua destillata (R6) gegeben und das Gemisch in der Mikrowelle bis zum Vorliegen einer klaren Lösung erhitzt. Die Lösung wurde autoklaviert und abgekühlt. Nach Erreichen einer Temperatur von 60 °C wurden dem noch flüssigen Agar 200 µl Ampicillin Lösung (L2) zugesetzt. Hiernach wurden pro Platte 25 ml Agar möglichst blasenfrei ausgegossen. Die abgekühlten Platten wurden mit Parafilm[®] verschlossen und bei 2-8°C bis zu vier Wochen gelagert.

Als Transformationsmethode wurde die Hitzeschock-Transformation gewählt. Hierzu wurden zunächst die superkompetenten XL-1-Blue-Zellen langsam auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 50 µl der Zellen in ein 50 ml Rundboden-Reaktionsgefäß gegeben und auf Eis gelagert. Zu diesem Ansatz wurde je 1 µl der DpnI-verdauten Plasmid-DNA zugefügt. In zwei weiteren Rundboden-Reaktionsgefäßen erfolgte der Ansatz von zwei Kontrollreaktionen. Im ersten Kontrollansatz wurde zu 50 µl Bakterien-Zellen 1 µl DNA zugesetzt, die aus der PCR-Kontrollreaktion erhalten wurde. In einem zweiten zusätzlichen Ansatz wurde 1 µl des pUC18-Plasmids eingesetzt. Der erste Ansatz diente der Kontrolle einer korrekt abgelaufenen PCR, der zweite Ansatz wurde entsprechend zur Überprüfung einer fehlerfreien Transformation genutzt. Das Starten der Transformationsreaktion erfolgte durch den Hitzeschock, bei dem die vorbereiteten Falcongefäße für eine Zeitspanne von exakt 45 s in ein auf 42 °C temperiertes Wasserbad eingetaucht wurden. Nach dem Hitzeschock wurden die verschiedenen Ansätze für 2 min auf Eis gekühlt und je 500 µl 42 °C warme NZY⁺-Lösung (L27) zugesetzt. Nach einstündiger Inkubation der verschiedenen Ansätze bei 37 °C und 225-250 rpm im Schüttelinkubator (G33) wurden je 150 µl der transformierten Ansätze auf die vorbereiteten Agarplatten gegeben. Die Lösungen wurden mit Hilfe eines sterilen Glasstabs ausgestrichen und anschließend im Brutschrank (G11) bei 37 °C für 16-18 Stunden inkubiert.

Der Erfolg der PCR und der anschließenden Transformation wurde mit Hilfe der im Handbuch (zu K6) beschriebenen Kontrollen überprüft: (1) Test auf Reparatur des pWhitescript[™] 4,5 kb Kontrollplasmids, das eine Mutation im β-Galactosidase-Gen enthält (PCR-Kontrolle) und (2) Test auf Expressionformation der β-Galactosidase in E. coli (Transformationskontrolle).

Am nächsten Tag wurde ein isolierter Bakterienklon ausgewählt und in ein 50 ml PP-Reaktionsgefäß (M22) mit 10 ml sterilem, Ampicillin-haltigen LB-Medium (L23.5) überführt. Bei 37 °C und 200 rpm wurde ca. 8 Stunden im Schüttelinkubator (G33) inkubiert, bevor eine Übernachtskultur mit den gleichen Inkubationsbedingungen (500 ml Ampicillin-haltiges LB-Medium, L23.5) angesetzt wurde. Am nächsten Tag wurde die Bakteriensuspension abzentrifugiert und die Plasmid-DNA aus den Zellen isoliert.

2.4.3 Plasmid-DNA-Gewinnung

Die Gewinnung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des Qiagen Plasmid Maxi Kits (K4) und wurde entsprechend des vom Hersteller optimierten Protokolls (siehe Handbuch) mit den im Kit enthaltenen Lösungen durchgeführt. Besonderheiten im Ablauf sind nachfolgend erklärt.

Ein kleiner Teil der Bakterienkultur wurde entnommen, um „Glycerolstocks“ für die Langzeitlagerung und spätere Vermehrungszyklen herzustellen. Hierzu wurden in einem Einfrierröhrchen (M10) 300 µl steriles Glycerol 60 % (L10) vorgelegt und mit 900 µl Bakterienkultur vermischt. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Neben der gelösten, aufgereinigten DNA eigneten sich „Glycerolstocks“ zur alternativen Langzeitlagerung von Plasmid-DNA. Zur erneuten Amplifikation von Bakterienklonen konnte eine kleine Menge aus dem „Glycerolstocks“ entnommen werden und mit Hilfe einer Übernachtskultur vermehrt werden.

Der Rest der Bakteriensuspension wurde in Zentrifugenbehälter (M29) überführt und abzentrifugiert (G6; Rotor: JLA 10.5; 7000 rpm, 30 min, 4°C). Die Zellpellets wurden mit 10 ml RNAase A-haltigem Tris/EDTA-Puffer (in K4 enthalten) resuspendiert. Anschließend erfolgte die alkalische Lyse der Bakterienzellen mittels NaOH-Natriumdodecylsulfat-Puffer (in K4 enthalten). Die bei diesem Prozess freigesetzte RNA wurde durch die anfänglich zugesetzte RNAase A abgebaut, um eine Störung der Aufreinigung der Plasmid-DNA zu vermeiden. Bei der alkalischen Lyse werden die Zellen zerstört und es kommt zur Denaturierung von Proteinen, chromosomaler DNA und Plasmid-DNA. Ein Abbruch der Reaktion erfolgte nach genau fünf Minuten, indem zur Neutralisation 10 ml gekühlter Kaliumacetatpuffer (pH 5,5; in K4 enthalten) zugesetzt wurde. Bei Überschreitung der Lysezeit von 5 min wäre eine irreversible Denaturierung der Plasmid-DNA zu erwarten. Durch die Neutralisationsreaktion kommt es zur Ausfällung von denaturierten Protein- und Zellresten in Salz-Detergens-Komplexen. Dagegen bleibt die kleinere, ringförmig geschlossene Plasmid-DNA in Lösung und renaturiert. Das Präzipitat wurde 30 min

zentrifugiert (G6; Rotor JA 25,5; 12000 rpm; 4°C) und der Überstand anschließend vorsichtig dekantiert. Es wurde erneut für 15 min unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nachfolgend wurde der die intakte Plasmid-DNA enthaltende klare Überstand möglichst rückstandsfrei auf eine bereits äquilibrierte Anionenaustauschersäule gegeben. Das Harz verfügt über positive Ladungen und ist daher in der Lage, negativ geladene Plasmid-DNA zu binden. Ionenstärke und pH-Wert des Lysats gewährleisten, dass ausschließlich Plasmid-DNA durch die Anionenaustauschersäule zurückgehalten wurde. Weitere Bestandteile des Lysats wie abgebaute RNA oder Proteine können die Säule ungehindert passieren. Um diese Verunreinigungen möglichst vollständig zu entfernen, wurde mehrmals mit einem Puffer mittlerer Salzkonzentration gewaschen. Durch Zusatz eines Puffers mit hoher Salzkonzentration wurde die an das Anionenaustauscherharz gebundene Plasmid-DNA vollständig eluiert. Das Eluat wurde in einem Falcon-Gefäß (M22) aufgefangen und die Plasmid-DNA im Anschluss durch Zugabe von 100-prozentigem, hochreinen Isopropanol (R2) ausgefällt. Auf diese Weise wurden die Salze des Elutionspuffers entfernt und die gewonnene Plasmid-DNA aufkonzentriert. Das nach Zentrifugation (G 1; Rotor JS 4,3; 4300 rpm; Temperatur: 4 °C) erhaltene Pellet wurde durch Zusatz von 70-prozentigem Ethanol gewaschen, um letzte Salzreste zu entfernen und an der Luft kurz getrocknet. Die DNA wurde in 600 µl sterilem TE-Puffer (L30) resuspendiert und bei -20 °C aufbewahrt.

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch (G42) bestimmt. Hierbei wurde die Extinktion einer DNA-Lösung bei 260 nm und bei 280 nm gemessen. Der Quotient von 260/280 gibt die Reinheit der DNA-Präparation an und sollte bei ca. 1,8 liegen. Niedrigere Werte weisen auf eine Kontamination, beispielsweise mit Proteinen, hin. Es wurden 8 µl in TE-Puffer (L30) gelöste Plasmid-DNA mit 392 µl Aqua destillata (R6) verdünnt (Verhältnis 1:50). Der Gehalt der Plasmid-DNA wurde mittels folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Plasmid-DNA-Gehalt } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = A_{260} \times 0,05 \times 50$$

2.4.4 Sequenzierung der Plasmid-DNA

Die DNA-Sequenzierung diente der genauen Bestimmung der DNA-Sequenz, d. h. der Nukleotid-Abfolge. Die klonierten Plasmide wurden so auf ihren korrekten Zusammenbau überprüft. Angewendet wurde die Methode nach Sanger (Sanger et al., 1977). Die Sequenzierungen wurden durch die Firma Sequence Laboratories Göttingen GmbH oder am Forschungszentrum Life & Brain der Universität Bonn durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse wurden computergestützt mit Hilfe der Software ChromasPro ausgewertet.

2.4.5 Subklonierung

Ziel der durchgeführten Subklonierung war die DNA der humanen Muskarinrezeptoren hm2 und hm5 aus den käuflich erwerblichen Ursprungsplasmiden (D3, D4) in ein, zur stabilen Transfektion mit dem Flp-InTM-System geeignetes, Expressionsplasmid zu überführen. Hierzu waren folgende Schritte notwendig: Durch Verdau mit spezifischen Restriktionsenzymen wurde die Rezeptor-DNA ausgeschnitten. Die enthaltenen Fragmente wurden aufgetrennt, isoliert und gereinigt, um anschließend mit dem Expressionsvektor (D6) ligiert zu werden. Dieser war zuvor ebenfalls mit denselben Restriktionsenzymen linearisiert worden.

2.4.5.1 Restriktionsverdau

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden so ausgewählt, dass sie unter den gleichen Pufferbedingungen volle Aktivität besitzen, hitzeinaktivierbar sind und kohäsive Enden mit einem 5' Überhang bilden. Die Sequenz des Ursprungsvektors (pcDNA3.1) und des Zielvektors (pcDNA5/FRT/TO) (D6) wurden auf gemeinsame Schnittstellen untersucht. Bedingung war, dass die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym in jedem Vektor nur einmal enthalten sein durfte. Hind III (R28) und Xho I (R62) waren für die Subklonierung der DNA der Rezeptoren hm2 und hm5 sowie des Zielvektors pcDNA5/FRT/TO geeignet. Die Restriktionsverdau-Ansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 10 µg der jeweiligen Plasmid-DNA wurden mit je 1 µl der beiden Restriktionsenzyme (10 Units) versetzt und nach Zugabe von 5 µl Reaktionspuffer (REact[®] 2, R52) mit Aqua destillata zu 50 µl ergänzt. Der Doppelverdau wurde eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgten 20 min Hitzeinaktivierung bei 65 °C. Dem Reaktionspuffer wurden 0,1 µg/µl bovines Serumalbumin (BSA, R9) zugesetzt, um die Endonucleaseaktivität zu erhöhen.

2.4.5.2 Isolierung und Aufreinigung der DNA-Fragmente

Nach erfolgreichem Verdau wurden die Ansätze mittels Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Hierzu wurde ein Agarosegel (0,8 %) eingesetzt, das mit Ethidiumbromid (R17) in einer Konzentration von 0,5 µg/ml versetzt war, um die DNA-Fragmente sichtbar zu machen. Als Lösungsmittel für die Agarose (R4) wurde der Elektrophoresepuffer TAE (L29) verwendet. Unter vorsichtigem Erhitzen (mit zwischenzeitigem Umrühren) in einer Mikrowelle wurde eine klare Agarose-Lösung in TAE-Puffer hergestellt und anschließend in die Gelkammer (G40) gegossen. Durch das Einstecken eines Kamms wurden Taschen geformt, in die nach dem Abkühlen und Erstarren die aufbereiteten DNA-Proben eingefüllt wurden. 10 µl DNA

wurden dazu mit 30 µl TAE-Puffer (L29) versetzt und mit 10 µl 10-fach Gelladepuffer (BlueJuice™, R3) vermischt. Bei kleineren, nicht-quantitativen Gelen z. B. zur PCR-Kontrolle konnte der Ansatz auf ein Zehntel verringert werden. Es wurde ebenfalls ein Größenmarker (1 kb DNA Ladder, R1) aufgetragen: 6 µl DNA-Standard (1 µg/µl, R1) wurden mit 14 µl TAE-Puffer verdünnt und mit 5 µl 10-fach Gelladepuffer (R3) versetzt. Anhand des Vergleiches der Laufstrecken der DNA-Fragmente mit den charakteristischen Banden des DNA-Standards konnte die Größe bestimmt und die Identität der Fragmente charakterisiert werden. Der verwendete Standard konnte auch zur DNA-Gehaltsbestimmung benutzt werden. Die 1636 bp Bande enthielt 10 % der eingesetzten DNA-Menge, sodass über den Vergleich der Fluoreszenzintensitäten die Konzentration der Fragmente abgeschätzt werden konnte. Bei einer Spannung von 75 V erfolgte in ca. 60 min eine Auftrennung der Fragmente. Die Lauffront konnte durch den Farbstoff Bromphenol-Blau, der im Gelladepuffer enthalten war, überprüft werden. Unter diesen Bedingungen lief Bromphenol-Blau mit ähnlicher Geschwindigkeit wie ein 500 bp-Fragment.

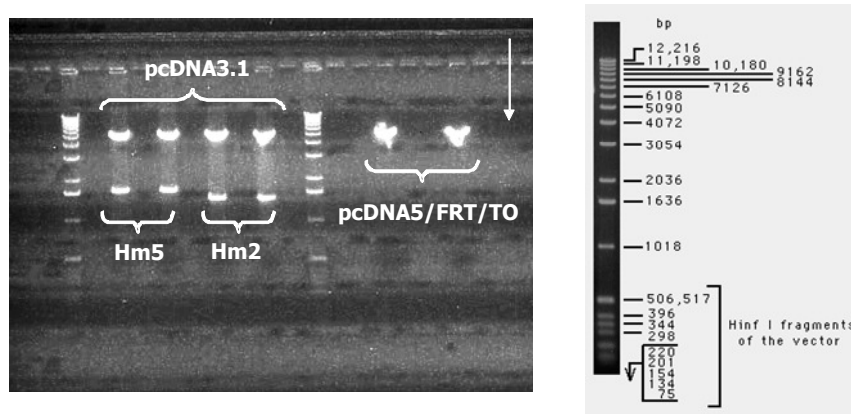


Abbildung 5: Auftrennung der DNA-Fragmente nach Restriktionsverdau mittels Gel-Elektrophorese (Erläuterungen zur Durchführung können dem vorangehenden Text entnommen werden). Banden des 1 kb DNA Standards entnommen aus der Produktinformation zu R1.

Zu erkennen sind die erwarteten Längen der Fragmente nach erfolgreichem Restriktionsverdau mit HindIII und XhoI:

- pcDNA3.1+/hm5 (6982 bp) → pcDNA3.1 (5356 bp) + hm5 (1626 bp)
- pcDNA3.1+/hm2 (6805 bp) → pcDNA (5356 bp) + hm2 (1451 bp)
- pcDNA5/FRT/TO (5137 bp) → linear (5063 bp + 74 bp)

Die Auswertung erfolgte unter UV-Licht (254 nm) auf einem Gelscanner (G5) mit Hilfe der zugehörigen Software AlphaDigiDoc™ AD1000 (siehe 2.3). Nachdem die gewünschten Nukleinsäurefragmente identifiziert waren (siehe Abbildung 5), wurden die entsprechenden Stellen mit Hilfe eines Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in PP-Reaktionsgefäße überführt (M20). Die Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits™ (K5) analog des im Handbuch beschriebenen Protokolls. Über die von pH-Wert und

Ionenstärke abhängige Bindung der DNA an Silicagel-Membranen und durch Zentrifugationsgradienten wurde die DNA von den Gelbestandteilen getrennt. Schließlich wurde die DNA in Tris-Puffer (L30) eluiert und eine photometrische Gehaltsbestimmung durchgeführt (siehe 2.4.3).

2.4.5.3 Ligation

Die Ligation der Fragmente wurde durch das Enzym T4-DNA-Ligase (R57) katalysiert, das die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen benachbarten 5'-Phosphat und 3'-Hydroxyl Termini von doppelsträngiger DNA katalysiert und so die Verknüpfung der Plasmide bewirkt. Der verwendete Ligationsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen: 30 fmol der Vektor-DNA (pcDNA5/FRT/TO) und 90 fmol DNA-Insert wurden mit 4 µl ATP-haltigem 5-fach T4-DNA-Ligase-Reaktionspuffer (siehe R57) versetzt und zu 19 µl mit Aqua pro analysi (R7) ergänzt, bevor 1 µl der Ligase zugegeben wurden. Der Ansatz wurde kurz zentrifugiert und bei Raumtemperatur für mindestens eine Stunde inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch Hitze (10 min, 65 °C). Die Lagerung erfolgte bei 4 °C. Anschließend erfolgte eine Transformation des Ligationsansatzes (2 µl) in superkompetente XL-1-Blue Escherichia coli (siehe 2.4.2) und eine Plasmid-DNA-Gewinnung mit Hilfe des Qiagen Plasmid Maxi Kits (K4, siehe 2.4.3).

2.4.5.4 Überprüfung der Subklonierung

Eine Überprüfung der beabsichtigten Subklonierung erfolgte durch erneuten Doppelverdau, sowie durch Linearisierung mittels Einzelverdau des neuen Expressionsplasmids. Auf dem Agarosegel waren nun wieder die erwartenden Fragmente zu erkennen (Abbildung 6).

Zur genauen Überprüfung der Nukleotidsequenz wurde eine Sequenzierung durchgeführt (siehe 2.4.4). Die gewählten Sequenzierprimer (2.1.7) hatten hierbei ihren Angriffspunkt am Expressionsvektor vor bzw. nach dem Insert, sodass die Anwesenheit und Orientierung des Inserts sowie die Anwesenheit und korrekte Lokalisation von Start- und Stoppcodon der Rezeptor-cDNA überprüft werden konnten.

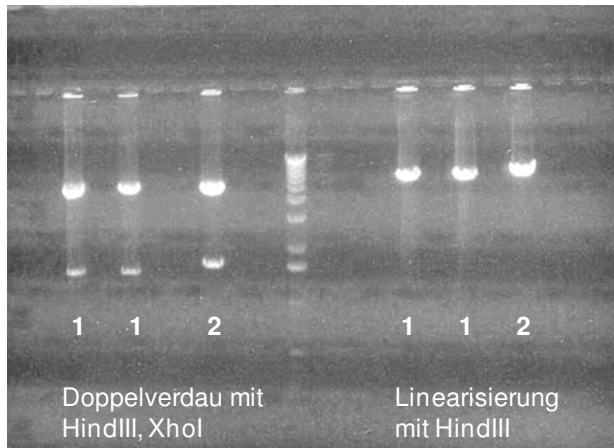


Abbildung 6: Auftrennung der DNA-Fragmente zur Überprüfung der Subklonierung mittels Gel-Elektrophorese (Erläuterungen zur Durchführung können dem vorangehenden Text entnommen werden).
 1: hm2 + pcDNA5/FRT/TO; 2: hm5 + pcDNA5/FRT/TO. Links: Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen HindIII und XhoI; Mitte: Banden des 1 kb DNA Standards R1; Rechts: Linearisierung mit HindIII.

2.5 Zellbiologische Arbeiten

2.5.1 Charakterisierung der verwendeten Zelllinien

In Verlauf dieser Arbeit wurde vor allem mit Ovarialzellen des chinesischen Seidenhamsters (*Cricetulus griseus*), CHO-Zellen, gearbeitet. Diese Säugetierzelllinie ist sehr gut geeignet für die Expression humaner M-Rezeptorproteine, da endogen keiner der fünf M-Rezeptorsubtypen exprimiert wird und vergleichbare posttranslationale Modifikationen sowie Protein-Tertiärstrukturen zu erwarten sind. Außerdem besitzen CHO-Zellen endogen keine Acetylcholinesterasen, sodass auch Versuche mit Acetylcholin als Agonist an den transfizierten Muskarinrezeptoren durchgeführt werden können (Lazareno und Birdsall, 1993). Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die verwendeten Wirtszelllinien bzw. über die bereits vor Beginn dieser Arbeit bestehenden, stabilen Expressionszelllinien:

Bezeichnung der Zelllinie	Charakterisierung
CHO-K1	Subklon einer parentalen CHO-Zelllinie
Flp-In TM -CHO	CHO-K1-Zellen, stabil mit einer FRT-Bindungsstelle transfiziert
CHO-M ₂	CHO-K1-Zellen, stabil mit der hm2-cDNA transfiziert
CHO-M ₅	CHO-K1-Zellen, stabil mit der hm5-cDNA transfiziert

Tabelle 3: Verwendete Zelllinien.

Die CHO-K1-Zellen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. M. Eckardt (Institut für Physiologische Chemie, Universität Bonn) zur Verfügung gestellt. Die CHO-M₂- und CHO-M₅-Zellen wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. G. Lambrecht (Abteilung Pharmakologie, Biozentrum Niederursel, Universität Frankfurt/Main) zur Verfügung gestellt. Die Flp-InTM-CHO-Zelllinie wurde freundlicherweise von Frau Prof. Dr. E. Kostenis (Pharmazeutische Biologie, Universität Bonn) zur Verfügung gestellt.

2.5.2 Zellkultur

Die Kultivierung der adhärent wachsenden CHO-Zellen erfolgte auf für Zellkultur geeigneten Oberflächen als Monolayer. Auf Grund von Kontaktinhibition wird ein Übereinanderwachsen verhindert. Mitotische Zellen runden sich ab, haften nur locker an der Unterlage und waren gut von den spindelförmigen Interphasezellen zu unterscheiden. Die optimalen Kulturbedingungen im Brutschrank (G11) lagen bei 37 °C in einer Atmosphäre mit 5 % CO₂ und 96 % relativer Luftfeuchte. Alle Arbeiten erfolgten unter aseptischen Bedingungen an einer Sterilwerkbank mit laminarem Luftstrom (G26).

Auftauen der Zellen

Die Langzeitlagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff (G39). Zur erneuten Kultivierung nach Kryokonservierung der Zellen wurde ein Einfrierröhrchen zügig auf 37 °C erwärmt. Zur Revitalisierung der CHO-Zellen wurden zwei unterschiedliche Methoden herangezogen: Bei der schonenderen Methode wurde die aufgetaute Zellsuspension auf eine Zellkulturschale (M8) oder Flasche (M6) mit 20 ml vorgelegtem, 37 °C warmen Medium überführt. Nach erfolgter Adhäsion an der Kunststoffoberfläche (nach ca. zwei bis drei Stunden) wurde vorsichtig das Nährmedium ausgetauscht. Bei der Zentrifugationsmethode wurde die aufgetaute Zellsuspension möglichst zügig in ein PP-Röhrchen (M22), in das zuvor 10 ml Nährmedium gegeben worden waren, überführt und 4 min bei 4 °C und 185 g zentrifugiert (G6, Rotor JS 4.3). Im Anschluss daran wurde der Überstand abgesaugt und das „Pellet“ in Nährmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine Zellkulturschale (M8), in die 20 ml Nährmedium vorgelegt worden waren, gegeben. Die weitere Kultivierung der Zellen erfolgte wie im nächsten Abschnitt beschrieben. Beide Methoden ermöglichten ein Entfernen des DMSO-haltigen Einfriermediums (s.u. Kryokonservierung). Die Arbeiten im Verlauf dieser Dissertation zeigten, dass vor allem die Flp-InTM-CHO-Zellen besser anhaften

und sich schneller im normalen Zellzyklus vermehren, wenn nach dem Auftauen nicht zentrifugiert wird.

Kultivierung der Zellen

Unter den oben beschriebenen Kulturbedingungen dauerte der Zellzyklus der CHO-Zellen ca. 14 Stunden. Nach 2-3 Tagen hatten sich die Zellen zu einer Konfluenz von 80-100 % vermehrt. Nach mikroskopischer Betrachtung erfolgte eine Aufteilung. Das Verhältnis wurde zwischen 1:3 und 1:10 gewählt, je nachdem welche weiteren Versuche geplant waren. Dazu wurde das alte Nährmedium einer Schale abgesaugt und die Zellen mit 10 ml D-PBS (L3) gespült. Durch anschließendes Einwirken (ca. 2-3 min) von 3 ml Trypsin-EDTA-Lösung (R60) im Brutschrank (G11) bei 37 °C erfolgte die Ablösung der adhären Zellen. Hatten sich nicht alle Zellen vom Boden der Schale gelöst, wurde vorsichtig an den Rand der Schale geklopft, um die restlichen Zellen abzulösen. Anschließend wurden die Zellen mit 10 ml Nährmedium abgespült, die erhaltene Zellsuspension in ein PP-Röhrchen (M22) gegeben und 4 min bei 4 °C und 185 g zentrifugiert (G6, Rotor JS 4.3). Danach wurde der Trypsin-EDTA-haltige Überstand abgesaugt und das „Zell-Pellet“ mit Nährmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf die gewünschte Anzahl von Platten, in die 15-20 ml Nährmedium vorgelegt worden waren, aufgeteilt.

Kryokonservierung von CHO-Zellen

Analog zu den oben erläuterten Arbeitsschritten wurde das Nährmedium einer Zellkulturschale abgesaugt, die Zellen wurden mit D-PBS (L3) gewaschen und anschließend mit Trypsin-EDTA-Lösung (R60) behandelt. Nachdem sich die Zellen von der Schale abgelöst hatten, wurden diese mit Nährmedium abgespült, und die erhaltene Zellsuspension wurde zentrifugiert (4 min, 4 °C, 185 g, Zentrifuge G6, Rotor JS 4.3). Währenddessen wurde das Einfriermedium, bestehend aus dem für die entsprechende Zelllinie verwendeten Medium mit 10 % (V/V) DMSO (R12), in einem PP-Röhrchen (M22) auf Eis vorgekühlt. Die Zugabe von Dimethylsulfoxid diente den Zellen als Gefrierschutz. Das „Pellet“ wurde in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und in ein Einfrierröhrchen (M10) gegeben. Dieses wurde nun sofort in den mit 100-prozentigem Isopropanol gefüllten Einfrierkontainer („Mr. Frosty“ G30) überführt und für ca. 24 h bei -80 °C gelagert. So wurde ein langsames Abkühlen der

Zellsuspension von ca. 1 °C pro Minute ermöglicht. Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen am folgenden Tag in den Stickstofftank (G39) überführt.

2.5.3 Membranpräparation der CHO-Zellen

Die homologen Konkurrenzexperimente und [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimente dieser Dissertation wurden mit Zellhomogenaten durchgeführt. Hierzu mussten Membranpräparationen der entsprechenden Zelllinien angefertigt werden. Vor der Präparation der Membranen wurden die Zellen (wenn in der Versuchsbeschreibung nicht abweichend angegeben) für 18-24 Stunden mit 5 mM Natriumbutyrat-haltigem Nährmedium kultiviert. Dazu wurde am Tag vor der Membranpräparation das alte Nährmedium von 10 bzw. 40 Schalen abgesaugt und durch frisches Nährmedium, dem 5 mM Natriumbutyrat zugesetzt wurden, ausgetauscht. Durch die Zugabe des Natriumbutyrats sollte die Expression der muskarinischen Acetylcholinrezeptoren gesteigert werden (Kruh, 1982). Der Effekt von Natriumbutyrat wurde auch innerhalb dieser Arbeit untersucht (siehe 3.1.2).

Für die Membranpräparation wurde das Nährmedium von fünf Schalen abgesaugt und jeweils 2,4 ml eisgekühlter Homogenisationspuffer (L12) auf die Zellkulturschalen gegeben. Mit einem Zellschaber (M28) wurden die Zellen vom Boden der Schalen abgelöst. Die Zellsuspensionen wurden in einem Zentrifugenröhrchen (M30) vereinigt. Danach wurden die fünf Schalen mit weiteren 6 ml Homogenisationspuffer abgespült, um Zellreste mit der Spüllösung ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen zu überführen. Mit den übrigen Zellkulturschalen wurde, immer in Fünferschritten, auf gleiche Weise verfahren. Die erhaltenen Zellsuspensionen wurden mit Hilfe eines Homogenisators (G35; Stufe 6) zweimal im Abstand von etwa 2 min 20 s lang homogenisiert und anschließend 10 min bei 2 °C und 40000 g zentrifugiert (G6; Rotor JA 25.5). Die Überstände wurden abgossen, die Rückstände in jeweils 15 ml eisgekühltem Zentrifugationspuffer (L32) resuspendiert und erneut 10 min bei 2 °C und 40000 g zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde noch ein weiteres Mal wiederholt. Im Anschluss an die letzte Zentrifugation wurden die Überstände abgesaugt und die „Pellets“ in 9 ml (20 Platten) bzw. 18 ml (40 Platten) Inkubationspuffer A (L14) aufgenommen. Die Membransuspension wurde zu je 500-1500 µl auf PP-Reaktionsgefäße (M20) verteilt und bei -80 °C eingefroren.

2.5.4 Bestimmung des Proteingehalts von Membransuspensionen

Der Proteingehalt der hergestellten Membransuspensionen wurde nach der Methode von Lowry et al. (1951) bestimmt. Das Reaktionsprinzip basiert auf zwei aufeinanderfolgenden Reaktionen: Zunächst kommt es zur Bildung eines blavioletten, quadratisch-planaren Komplexes zwischen Peptidbindungen und Kupfer-II-Ionen in alkalischer Lösung (Biuret-Reaktion). Im zweiten Schritt reduziert dieser Komplex das gelb gefärbte Folin-Ciocalteu's-Reagenz, das aus Molybdän(VI)- und Wolfram(VI)-Heteropolysäuren besteht. Es resultiert eine intensive Blaufärbung, die sich proportional zum Proteingehalt vertieft. Die Gehaltsbestimmung erfolgte photometrisch (G42) bei einer Wellenlänge von 500 nm.

Für die Generierung einer Kalibriergeraden wurde eine Kalibrierlösung aus humanem Serumalbumin (R29) angefertigt. Aus dieser Stammlösung wurden unterschiedliche Verdünnungen in Inkubationspuffer A (L14) hergestellt. Hierbei wurden sieben Verdünnungsstufen gewählt, deren Konzentrationen zwischen 0 und 2 mg Protein/ml lagen. Die zu untersuchende Membransuspension wurde mit Inkubationspuffer A verdünnt, in den Verhältnissen 1:8, 1:4 und 1:2. 200 µl der so vorbereiteten Probe wurden in ein Reagenzglas gegeben, und es wurden 2,0 ml Arbeitslösung, bestehend aus 100 Teilen 2-prozentiger Natriumcarbonat-Lösung (L25) einem Teil 2-prozentiger Kaliumnatriumtartrat-Lösung (L18) und einem Teil 1-prozentiger Kupfer(II)sulfat-Lösung (L19), zugegeben. Nach einer 10-minütigen Inkubationsphase wurden die Versuchsansätze unter Schütteln mit 200 µl Folin-Ciocalteu's Phenolreagenz-Verdünnung (L6) versetzt und für weitere 30 min unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurde mit Hilfe eines UV-Vis-Spektrometers (G42) die Absorption bei einer Wellenlänge von 500 nm bestimmt. Mit Hilfe des Programms Microsoft Excel[®] wurde eine Kalibriergerade erstellt, anhand derer die Proteinkonzentrationen der Proben bestimmt wurden. Alle Werte wurden in einer Doppelbestimmung erhoben. Die durchschnittlichen, in dieser Arbeit erhaltenen Proteinkonzentrationen sind Tabelle 4 zu entnehmen.

Es zeigte sich, dass der Gesamtproteingehalt in jedem der untersuchten Membranhomogenate konstant 2 mg/ml betrug. Schon in früheren Untersuchungen der [³⁵S]GTPγS-Bindung an Membranhomogenaten (Dissertationen von Klemt, 2005; Schmalenbach, 2005; Kellershohn, 2007) war deshalb die bei Versuchen eingesetzte Menge an Membransuspension nach dem Proteingehalt berechnet worden. Auch für den Vergleich der Membranhomogenate der verschiedenen Rezeptormutanten mit dem M₂-Wildtyp (Unterkapitel zu 3.3) wurde die eingesetzte Menge nach Proteingehalt bestimmt. Diese Bezugsgröße wurde gewählt, da die

gemessene [³⁵S]GTPγS-Akkumulation als Maß für die Rezeptoraktivierung nicht nur von der Anzahl der Rezeptoren sondern auch von der Menge der vorhandenen G-Proteine abhängt. Auch in der Literatur (Valant et al., 2008) ist die Verwendung dieser Bezugsgröße bei Vergleich von Homogenaten aus verschiedenen Zelllinien gewählt. Wie unter 2.7.1.2 beschrieben wurde eine Proteinkonzentration von 40 µg/ml verwendet.

	M ₂	Flp-M ₂		
Proteingehalt (mg/ml)	2,3 ± 0,1	2,1 ± 0,1		
n =	9	7		
	Flp-M ₂ ¹⁰⁴ Tyr→Ala	Flp-M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Ala	Flp-M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	
Proteingehalt (mg/ml)	2,2 ± 0,1	1,8	2,1	
n =	2	1	1	
	Flp-M ₂ ⁴²² Trp→Ala	Flp-M ₂ ⁴²³ Thr→Ala	Flp-M ₂ ⁴²³ Thr→His	
Proteingehalt (mg/ml)	2,0 ± 0,1	2,1	1,9	
n =	3	1	1	

Tabelle 4: Proteingehalt (Mittelwerte ± Standardfehler) in mg/ml der Membransuspensionen, die aus den verschiedenen CHO-Zelllinien erhalten wurden. **n:** Anzahl untersuchter Membransuspensionen.

2.5.5 Transfektion

2.5.5.1 Transiente Transfektion

Um eine heterologe Expression des humanen muskarinischen M₂-Rezeptors und der Rezeptormutante hM₂⁴²²Trp→Ala zu erreichen, wurde eine transiente Transfektion der CHO-K1-Zelllinie (Tabelle 3) durchgeführt, die das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische zelluläre Systeme ermöglicht. Die biologische Halbwertszeit der transient aufgenommenen Plasmid-DNA ist jedoch nur kurz, da es bereits nach einigen Vermehrungszyklen zum vollständigen Abbau des Fremdgens in den Zellen kommt. Im Gegensatz zu einer stabilen Transfektion wird das Gen bzw. die cDNA in diesem Fall nicht in das Genom der Zelle integriert, sondern liegt frei als ringförmiges Plasmid vor.

In dieser Arbeit wurde das Transfektionsreagenz PolyFect (R51) verwendet. Es besteht aus Dendrimeren (d. h. verzweigten Polymeren), die über endständige, positiv geladene Aminosäuren verfügen, durch die eine Komplexbildung mit negativ geladenen

Phosphatgruppen der Plasmid-DNA ermöglicht wird. Im Komplex überwiegt eine positive Ladung; er kann so in die Zelle aufgenommen werden. Als zusätzliche Funktion besitzen die Dendrimere eine Pufferwirkung. Es wird postuliert, dass nach der endosomalen Aufnahme der DNA-Komplexe eine Inaktivierung pH-abhängiger lysosomaler Nukleasen erfolgt, um einen frühzeitigen Abbau der DNA zu verhindern (Tang et al., 1996). Im Zytoplasma erfolgt eine Freisetzung der Plasmid-DNA aus den Komplexen.

24 Stunden vor Transfektion wurden die zuvor über einige Passagen kultivierten Zellen mit einer Zellzahl von $1,6 \times 10^6$ Zellen auf Gewebekulturschalen (M9) ausgesät. Hierzu wurden die Zellen, wie in Kapitel 2.5.2 beschrieben, abgelöst und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das erhaltene Pellet je nach Größe mit 10-20 ml Nährmedium resuspendiert. Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer (G31) wurde die in einem Milliliter enthaltene Zellzahl bestimmt und $1,6 \times 10^6$ Zellen je Platte (in 7 ml des der Zelllinie entsprechenden Mediums) ausgesät. Die so vorbereiteten Schalen wurden im Brutschrank (G11) inkubiert.

Nach 24 Stunden hatten die Zellen eine Konfluenz von 60-90 % erreicht und wurden mit Hilfe des Transfektionsreagenzes PolyFect (R51) transfiziert. Die an dieser Stelle verwendete DNA des humanen muskarinischen M_2 -Rezeptors und der Rezeptormutante $hM_2^{422}Trp \rightarrow Ala$ wurde aus Plasmid-DNA-Gewinnungen (2.4.3) erhalten. Zu Beginn wurden jeweils 6 µg DNA mit Basis-Nährmedium (ohne Serum- und Antibiotikazusatz) in einem PP-Reaktionsgefäß (M20) zu 300 µl ergänzt. Die Lösung wurde intensiv gemischt, zentrifugiert und nach Zusatz von 30 µl Transfektionsreagenz (R51) für 10-15 min inkubiert (Bildung von Dendrimer-DNA-Komplexen). Während dieser Zeit wurde das Nährmedium der am Vortag ausplattierten Zellen gewechselt. Anschließend wurde zum DNA-Transfektionsreagenz-Ansatz 1 ml Nährmedium (mit Serum- und Antibiotikazusatz) gegeben. Die Lösung wurde durch mehrfaches Pipettieren gemischt und auf eine vorbereitete Schale mit Zellen gegeben. Nach ca. 48 Stunden war die heterologe Expression der gewünschten Rezeptorproteine am höchsten und die Zellen wurden analog der im Kapitel 2.5.3 beschriebenen Vorschrift zu einem Membranhomogenat präpariert.

2.5.5.2 Stabile Transfektion (Flp-In™-System)

In diesem Abschnitt wird die Durchführung einer stabilen Transfektion mit Hilfe des Flp-In™-Systems (K2) beschrieben. Das Ziel war die Etablierung stabiler Expressionszelllinien für den muskarinischen M_2 -Rezeptor und die verschiedenen punktmutierten M_2 -Rezeptormutanten.

Ausgangspunkt für die stabile Transfektion mit dem Flp-InTM-System war die Flp-InTM-CHO-Wirtszelllinie, die freundlicherweise von Prof. Dr. Evi Kostenis (Pharmazeutische Biologie, Universität Bonn) zur Verfügung gestellt wurde. Hierbei handelt es sich um CHO-K1-Zellen, die nach stabiler Transfektion und anschließenden Selektionen über ein Zeocin-Resistenzgen eine einzelne FRT-Bindungsstelle (FRT = *Flp recombination target*) in ihr Genom integriert haben. Die FRT-Bindungsstelle ermöglicht dem System die erwünschte DNA enzymatisch an einer vorbestimmten Stelle im Genom der Zellen zu integrieren. Hierzu wird ein Rekombinationssystem, das aus *Saccharomyces cerevisiae* stammt, genutzt. Es basiert auf einer Rekombinase, die durch Erkennung der spezifischen FRT-Bindungsstellen die erwünschte DNA an der entsprechenden Stelle platziert. Die cDNA der Rezeptoren wurden jeweils in einen Expressionsvektor (pcDNA5/FRT/TO) eingebaut (siehe 2.4.5). Die fertigen Expressionsplasmide beinhalten das entsprechende cDNA unter der Kontrolle eines SV40-Promotors (Simian vacuolating Virus 40). Daran schließt sich die Erkennungssequenz für die Rekombinase an (FRT). Das pOG44-Plasmid (D5) exprimiert konstitutiv die Flp-Rekombinase unter der Kontrolle eines CMV-Promotors (Cytomegalie-Virus). Beide Plasmide müssen zeitgleich in die Flp-InTM-CHO-Wirtszelllinie transfiziert werden. Durch die Expression der Flp-Rekombinase aus pOG44 wird eine Rekombination zwischen den FRT-Bindungsstellen im Zellgenom und im Expressionsvektor initiiert. Nur durch den Einbau des Konstrukts an der vorgesehenen Stelle im Genom erlangt das Gen für die Hygromycinresistenz einen Promotor und wird aktiv, sodass hierüber die Zellen selektiert werden können. Die Generierung der Expressionsplasmide wurde anhand der vorgeschriebenen Protokolle des Flp-InTM-Systems durchgeführt (Handbuch zu K2) und unter 2.4.5 näher erläutert.

Die stabile Transfektion in die Flp-InTM-CHO-Wirtszelllinie erfolgte mittels Lipofektion nach folgendem Protokoll: Nach dem Auftauen der Zellen wurden die Wirtszellen, die resistent gegenüber Zeocin (R64) sind, in Flp-Nährmedium (L23.2) mit 100 µg/ml des selektiven Agens kultiviert. Das Expressionsplasmid (zur Herstellung siehe 2.4.5) wurde zusammen mit dem pOG44-Plasmid (D5), das konstitutiv das Enzym Flp-Rekombinase exprimiert, in die Flp-InTM-CHO-Wirtszelllinie transfiziert. Methodisch wurde hierbei analog zur transienten Transfektion mit Hilfe der Lipofektion gearbeitet (siehe Kapitel 2.5.5.1). Die Gesamt-DNA Menge von 6 µg wurde im Verhältnis 1:9 (Expressionsplasmid:pOG44-Plasmid) aufgeteilt. Nach dieser Kotransfektion vermittelt die aus pOG44 stammende Flp-Rekombinase einen Austausch der beiden FRT-Regionen. Hierdurch wird das Expressionsplasmid (pcDNA5/FRT/TO-Plasmid mit der cDNA bzw. dem Gen von Interesse als Insert) an den Ort

der FRT-Sequenz integriert. Die für eine Hygromycin-Resistenz codierende Sequenz liegt nun stromabwärts des SV40-Promotors und kann abgelesen werden. Gleichzeitig findet eine Inaktivierung des lacZ-Zeocin-Fusionsgens statt, sodass die Expressionszelllinie zwar resistent gegenüber Hygromycin B (R30), aber nunmehr sensibel auf Zeocin (R64), reagiert. Die erfolgreich transfizierten Zellen konnten daher mit Hilfe von Hygromycin-haltigem (800 µg/ml) Flp-Medium (L23.3) von den Zellen, die das Plasmid nicht ins Genom integriert hatten, selektiert werden. Außerdem wurde bei jedem Ansatz zur stabilen Transfektion eine Kontrolle, die keine Plasmid-DNA enthält mitgeführt, sodass die Zell-Toxizität des Selektions-Agens gegenüber der Wirtszelllinie überprüft werden konnte.

Über die ortsspezifische Rekombination wurde die Integration der Rezeptor-cDNA ermöglicht, und folgende neue Zelllinien zur stabilen Rezeptorexpression wurden generiert:

Abkürzung	Erläuterung
Flp-CHO-M ₂	Expression des humanen M ₂ -Rezeptor Wildtyps
Flp-CHO-M ₂ ¹⁰⁴ Tyr→Ala	Expression des punktmutierten M ₂ -Rezeptors
Flp-CHO-M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Ala	Expression des punktmutierten M ₂ -Rezeptors
Flp-CHO-M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	Expression des punktmutierten M ₂ -Rezeptors
Flp-CHO-M ₂ ⁴²² Trp→Ala	Expression des punktmutierten M ₂ -Rezeptors
Flp-CHO-M ₂ ⁴²³ Thr→Ala	Expression des punktmutierten M ₂ -Rezeptors
Flp-CHO-M ₂ ⁴²³ Thr→His	Expression des punktmutierten M ₂ -Rezeptors
* Flp-CHO-M ₃	Expression des humanen M ₃ -Rezeptor Wildtyps

Tabelle 5: Im Rahmen dieser Arbeit generierte, stabile Expressionszelllinien.

* Das Expressionsplasmid des M₃-Rezeptors wurde von Nicole Janßen hergestellt, analog des in dieser Arbeit beschriebenen Protokolls. Die stabile Expression der ungeraden Muskarinrezeptor-Subtypen wurde gemeinsam mit Frau Janßen nach einem modifizierten Protokoll durchgeführt. Als Transfektionsreagenz wurde Lipofectamine 2000 (R36) verwendet. Die verschiedenen notwendigen Optimierungsschritte werden in der Dissertationsschrift von Frau Janßen ausführlich beschrieben.

2.5.5.3 Einführung eines induzierbaren Expressionssystems

Zur funktionellen induzierbaren Expression von Wildtyp-M-Rezeptoren sowie M-Rezeptormutanten in CHO-Zellen sollte das T-RexTM System (K3) eingesetzt werden. Es sollte eine Möglichkeit zur stabilen regulierbaren Expression der Rezeptoren bieten und die

Steuerung der Expression über ein Tet-Repressor bzw. Tet-Operator Zusammenspiel mit dem Antibiotikum Tetracyclin ermöglichen. Tetracyclin selbst ist ein aus verschiedenen Streptomyces-Arten isoliertes Breitspektrum-Antibiotikum. Zur Induktion der Expression ist auch das partialsynthetische Derivat Doxycyclin geeignet. Das T-RexTM System wurde dankenswerterweise von Frau Prof. Kostenis zu Verfügung gestellt. Flp-InTM-T-RexTM-CHO-Zellen sind nicht käuflich zu erwerben, sodass ausgehend von der Flp-InTM-CHO-Zelllinie eine induzierbare Flp-InTM-T-RexTM-CHO-Wirtszelllinie generiert werden sollte, die in weiteren Schritten stabil die gewünschten Rezeptoren aufnehmen sollte (siehe 2.5.5.2).

Die Steuerung der Expression im T-RexTM-System basiert auf Regulationselementen der Tetracyclin Resistenz aus Escherichia coli. In der Flp-InTM-T-RexTM-CHO-Wirtszelllinie wird der so genannte Tet-Repressor stabil exprimiert. Er formt Homodimere, die an die Tet-Operatoren, die vor der Rezeptor-cDNA liegen, binden und somit eine Transkription verhindern. Tetracyclin, das dem Nährmedium zugesetzt wird, bildet hochaffine Komplexe mit den Tet-Repressoren und durch eine Konformationsänderung können diese dann nicht mehr an die Tet-Operatoren binden. Die Tet-Operatoren werden frei und die Expression der Rezeptor-cDNA wird ermöglicht. Der Erfolg der Transfektion, d.h. die Integration des induzierbaren Tet-Repressors in das Genom der Flp-InTM-CHO-Zelllinie, wurde mit Hilfe des Chloramphenicol-Acetyltransferase-Assays (CAT, K1) überprüft. Da das Enzym nicht in eukaryotischen Zellen vorkommt, dort aber leicht zu exprimieren und nachzuweisen ist, wird das CAT-Gen als Reportergen zur Quantifizierung eukaryotischer Promotor-Funktion in diesem Versuch verwendet. Dazu wird das bakterielle CAT-Reportergen, dem die interessierende eukaryotische Promotor-Region vorgeschaltet wurde, in eukaryotische Zellen transferiert. Die CAT-Aktivität ist somit ein Maß für die Promotoraktivität.

Die experimentellen Arbeiten zu diesem Teil wurden nach den in den Handbüchern enthaltenen Protokollen durchgeführt (Flp-InTM T-RExTM Core Kit, K3 und FAST CAT[®] Chloramphenicol Acetyltransferase Assay Kit, K1). Die Testung von 14 verschiedenen Klonen ergab eine maximale Promotoraktivität im CAT-Assay bei allen Klonen. Auch verschiedene Optimierungsversuche (z. B. der Inkubationszeiten) führten nicht zur Etablierung eines induzierbaren Expressionssystems. Unter anderem konnte eine Verunreinigung mit Tetracyclin im Nährmedium z. B. durch Antibiotika-Rückstände im fötalen Kälberserum (R18) mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Untersuchungen, die freundlicherweise im Arbeitskreis von Frau Prof. Christa Müller (Pharmazeutische Chemie) durchgeführt wurden, ausgeschlossen werden.

Da für die Arbeiten vor allem die stabile Expression der Rezeptorproteine im Fokus stand und eine Induktion und Regulierung der Expression zwar eine erwünschte nicht aber essentielle Eigenschaft darstellte, wurden diese Bestrebungen bisher nicht weiter verfolgt.

2.6 Radioligandbindungsuntersuchungen

Mit Hilfe von Bindungsstudien können Interaktion von Liganden mit ihren Bindungsstellen erfasst werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen zur Wechselwirkung zwischen Liganden und muskarinischen Acetylcholinrezeptoren durchgeführt. Durch den Einsatz radioaktiv markierter Liganden lässt sich der Rezeptor-gebundene Anteil quantitativ erfassen. Die Trennung von freien und gebundenen Liganden erfolgte durch Filtration über Glasfaserfilter an denen die Rezeptorproteine mit den gebundenen Liganden haften. Über Szintillationsmessung konnte eine quantitative Bestimmung erfolgen.

Die im Folgenden beschriebenen homologen Kompetitionsexperimente wurden unter Gleichgewichtsbedingungen durchgeführt. Die eingesetzten Liganden gingen reversible Bindungen mit dem Rezeptorprotein ein, sodass nach dem Massenwirkungsgesetz (Bennett und Yamamura, 1985) gleichzeitig Assoziation und Dissoziation ablaufen:



[R]: Rezeptor-Konzentration

[L]: Ligand-Konzentration

[RL] Konzentration der Rezeptor-Ligand-Komplexe

k_{+1} : Geschwindigkeitskonstante der Assoziation

k_{-1} : Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation

Die Geschwindigkeiten der Assoziation v_{hin} bzw. der Dissoziation $v_{\text{rück}}$ berechnen sich folgendermaßen:

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

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

Wenn Assoziation und Dissoziation mit der gleichen Geschwindigkeit ablaufen, ändern sich die Konzentrationen der gebildeten Rezeptor-Ligand-Komplexe, des freien Liganden und des Rezeptors nicht mehr. Die Reaktion befindet sich im Gleichgewicht:



Der Quotient aus der Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation k_{-1} und der Geschwindigkeitskonstante der Assoziation k_{+1} bildet die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_D . K_D entspricht der Ligand-Konzentration, bei der die Hälfte aller Rezeptoren in Rezeptor-Ligand-Komplexen vorliegt. Je kleiner der K_D -Wert (Einheit: mol/l) eines Liganden, desto höher ist seine Affinität zum Rezeptor.

2.6.1 Homologe Konkurrenzexperimente

Mittels homologer Konkurrenzexperimente wurden im Rahmen dieser Arbeit die Bindungseigenschaften der rezeptorhaltigen Membransuspension charakterisiert. Hierzu wurde die Affinität des eingesetzten Liganden, dem tritiierten Radioantagonisten [^3H]N-Methylscopolamin ([^3H]NMS) in Form des K_D -Wertes bestimmt sowie die Konzentration der spezifischen Bindungsstellen in Form des B_{\max} -Wertes.

2.6.1.1 Theoretische Grundlagen

In homologen Konkurrenzexperimenten, die mit einem radioaktiv markierten Liganden ([^3H]N-Methylscopolamin, [^3H]NMS) durchgeführt werden, konkurriert dieser mit dem strukturidentischen, nicht markierten Liganden um die gleiche Bindungsstelle am Rezeptor. Die Konzentration des Radioliganden wird konstant gehalten, während die Konzentration des nicht markierten Inhibitors stufenweise erhöht und dadurch der Radioligand zunehmend aus seiner spezifischen Bindung verdrängt wird. Die Gesamtbindung des Radioliganden wird in Abwesenheit des nicht markierten Liganden bestimmt. Zur Bestimmung der unspezifischen Radioligandbindung wird ein Überschuss eines strukturverschiedenen, nicht markierten Kompetitors eingesetzt, in einer Konzentration, bei der alle spezifischen Bindungsstellen besetzt werden. Zur Auswertung dieser Experimente wird die gemessene Radioaktivität gegen den dekadischen Logarithmus der molaren Konzentration des nicht markierten Liganden aufgetragen. Die Datenpunkte beschreiben einen sigmoidalen Kurvenverlauf. Computergestützt erfolgt eine nichtlineare Regressionsanalyse der Daten, unter Anwendung der „Vier-Parameter-logistischen Gleichung“ (Barlow und Blake, 1989):

$$B_{\text{ges}} = \text{MIN} + \frac{\text{MAX} - \text{MIN}}{1 + \left(\frac{\text{IC}_{50}}{10^{[\text{X}]}} \right)^{n_H}} \quad (\text{Gleichung 5})$$

B_{ges} : Gesamtbindung des Radioliganden

MIN: unteres Plateau der Kurve

MAX: oberes Plateau der Kurve

IC_{50} : Konzentration des Kompetitors im Wendepunkt der Kurve (d.h. die hemmbare Bindung des Radioliganden ist auf die Hälfte reduziert)

[X]: Konzentration des Kompetitors

n_H : Hill-Koeffizient; Maß für die Kurvensteigung

Mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen Gleichung“ lassen sich neben den homologen Konkurrenzexperimenten auch die Konzentrations-Effekt-Kurven der funktionellen Experimente (2.7) beschreiben und auswerten.

Ist das Steilheitsmaß n_H (Hill-Koeffizient) nicht signifikant verschieden von -1, deutet dies auf eine homogene Rezeptorpopulation und auf molekularer Ebene auf eine 1:1-Interaktion eines Liganden mit einem Rezeptorprotein hin.

Aus dem Wendepunkt der sigmoiden Inhibitionskurve, dem IC_{50} -Wert, kann die Affinität des Inhibitors zu dem durch den Radioliganden markierten Rezeptor berechnet werden. Wenn die Wettbewerbsreaktion zwischen Radioligand und Inhibitor im Gleichgewicht ist, kann die Affinität (K_I -Wert) nach der Gleichung von Cheng und Prusoff (1973) berechnet werden:

$$K_I = \frac{\text{IC}_{50}}{1 + \frac{[\text{L}]}{K_D}} \quad (\text{Gleichung 6})$$

K_I : Gleichgewichts-Dissoziationskonstante der Kompetitor-Bindung

IC_{50} : Wendepunkt der Inhibitionskurve bei halblogarithmischer Auftragung

[L]: Konzentration des Radioliganden

K_D : Gleichgewichts-Dissoziationskonstante der Radioligand-Bindung

Da bei homologen Wettbewerbs-Experimenten Radioligand und Kompetitor strukturgleich sind und folglich auch die gleichen Bindungseigenschaften am Rezeptor besitzen, gilt $K_I = K_D$. Damit vereinfacht sich die Gleichung von Cheng und Prusoff zu:

$$K_D = K_I = \text{IC}_{50} - [\text{L}] \quad (\text{Gleichung 7})$$

Unter Anwendung dieser Gleichung und durch Einbeziehung der spezifischen Radioligandbindung B_0 kann aus dem Wendepunkt der Kurve (IC_{50}) die maximale Bindung bzw. die Anzahl der Bindungsstellen B_{max} berechnet werden (DeBlasi et al., 1989).

$$B_{max} = \frac{B_0 \cdot IC_{50}}{[L]} \quad (\text{Gleichung 8})$$

B_{max} : Maximale Bindung bzw. Anzahl der Bindungsstellen für den Radioliganden in der Membransuspension

B_0 Spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit des Kompetitors

2.6.1.2 Versuchsdurchführung

Bei den durchgeführten Untersuchungen wurde [^3H]NMS als Radioligand verwendet und in Konkurrenz mit dem nicht markierten, strukturidentischen NMS untersucht. Die unspezifische Bindung wurde durch Zusatz eines Überschusses von Atropin bestimmt. Alle Versuchsbedingungen sollten so weit möglich den [^{35}S]GTP γ S-Bindungsexperimenten entsprechen, da die homologen Konkurrenzexperimente durchgeführt wurden, um eine Aussage über die in den [^{35}S]GTP γ S-Versuchen vorliegenden Bindungsstellen zu treffen. Aus diesem Grund erfolgte ebenfalls eine Zugabe von GDP (10 μM). Das genaue Schema der Zusammensetzung der Komponenten des Versuchs ist in Tabelle 6 aufgelistet. Das experimentelle Vorgehen beim Ansetzen der Versuche und der Vakuumfiltration ist unter 2.7.1.2 beschrieben. Abweichend wurden die Glasfaser-Filtermatten (M23) in Polyethylenimin-Lösung (0,1 %, L28) zur Verminderung der unspezifischen Bindung eingelegt. Die Messung erfolgte hier, anders als im [^{35}S]GTP γ S-Bindungsexperiment, unter Gleichgewichtsbedingungen. Es war davon auszugehen, dass nach fünf Dissoziationshalbwertszeiten Gleichgewichtsbedingungen vorlagen. Basierend auf den von Straßmann (Dissertationsschrift, 2007) erhobenen Halbwertszeiten war eine Inkubationszeit von einer Stunde ausreichend.

Komponente	Volumen	Versuchsansatz	finale Konzentration
Aqua destillata (R6)	50 µl / 100 µl	Testsubstanz / basale Bindung	-
NMS (in Aqua destillata)	50 µl	Testsubstanz	steigende Konzentrationen
GDP (L8) (in Inkubationspuffer)	50 µl	alle	10 µM
Membranhomogenat (in Inkubationspuffer)	50 µl	alle	40 µg/ml Protein
Inkubationspuffer (L14)	250 µl	alle	10 mM HEPES, 10 mM MgCl ₂ , 4-100 mM NaCl
[³ H]NMS (in Inkubationspuffer)	50 µl	alle	0,2 nM

Tabelle 6: Versuchsansatz zur Durchführung eines homologen Wettbewerbsversuchs.

2.7 Funktionelle Experimente

Die Fragestellungen dieser Arbeit (siehe 1.5) beschäftigen sich hauptsächlich mit der Aktivierung des M₂-Rezeptors. Neben dem Einfluss verschiedener Testsubstanzen (von orthosterischer, allosterischer und dualsterischer Struktur) wurde auch der Einfluss gezielter Punktmutationen im Bereich der orthosterischen und allosterischen Bindungsstelle des M₂-Rezeptors untersucht. Zur Klärung der Fragestellung wurden zwei Methoden genutzt. Zunächst (2.7.1) werden hier die theoretischen Grundlagen und das experimentelle Vorgehen bei den [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimente beschrieben. Dieses Versuchssystem wurde genutzt, um den ersten Schritt nach der Rezeptoraktivierung, nämlich die Aktivierung der G-Proteine, zu untersuchen. Des Weiteren ist das Prinzip und die Durchführung der Messungen der dynamischen Massenumverteilung erläutert, die mit Hilfe des Epic[®] Biosensors an Ganzzellen durchgeführt wurden.

2.7.1 [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimente an Membransuspensionen aus CHO-Zellen

2.7.1.1 Theoretische Grundlagen

[³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimente sind ein geeignetes Versuchssystem, um Untersuchungen zur Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren durchzuführen. Die Bindung eines Agonisten sowie die spontane, agonistunabhängige Rezeptoraktivierung führen zu einem Nukleotidaustausch von GDP gegen GTP an der α-Untereinheit (Milligan und Kostenis, 2006). Hierdurch wird eine Konformationsänderung des heterotrimeren G-Proteins ausgelöst, die zur Abspaltung der α-Untereinheit von der nicht-dissoziierbaren βγ-Untereinheit führt. Nachfolgend wird ein komplexes System von Signaltransduktionswegen angeschaltet. Hierbei kann sowohl die α-Untereinheit als auch der βγ-Komplex Einfluss auf verschiedene nachgeschaltete Effektoren nehmen. Die α-Untereinheit besitzt eine intrinsische GTPase-Aktivität, die durch Hydrolyse des terminalen Phosphatrests GTP zu GDP umwandelt und so eine Reassoziierung von G-Protein und Rezeptor bewirkt. Der Vorgang der Aktivierung ist so mit der Wiederherstellung des inaktiven Ausgangszustandes abgeschlossen.

Zur Untersuchung der Konsequenzen der Rezeptoraktivierung auf Ebene der G-Proteine wird die Bindung von [³⁵S]GTPγS, einem radioaktiv markierten, hydrolyseresistenten Analogon von GTP, erfasst (Lazareno, 1999). Durch den Austausch des Sauerstoffatoms im γ-ständigen Phosphat-Rest der Ribose gegen das radioaktive Isotop 35 des Schwefels entsteht ein stabiles Nukleotid-Analogon, das irreversibel an die α-Untereinheit bindet. Abhängig von der Aktivierung der im Versuchssystem vorliegenden Rezeptoren kumuliert G-Protein gebundenes [³⁵S]GTPγS. Die [³⁵S]GTPγS-Inkorporation kann folglich nicht zu einer Gleichgewichtseinstellung kommen, der Zeitpunkt der Messung ist von entscheidender Bedeutung. Bei den Versuchen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurde eine Inkubationszeit von 60 min gewählt, die zuvor von Klemt (Dissertationsschrift 2005) validiert worden war. Unter den gewählten Bedingungen war nach dieser Zeit das Verhältnis von basaler und Agonist-induzierter [³⁵S]GTPγS-Bindung („Messfenster“) optimal. Der Zusatz von GDP sorgt durch Absättigung freier Nukleotid-Bindungsstellen der α-Untereinheit für eine Verringerung der basalen [³⁵S]GTPγS-Bindung zu Gunsten des Agonist-vermittelten Effekts. In früheren Arbeiten unseres Arbeitskreises (Dissertationsschriften von Eckstein, 2004; Kellershohn, 2007) hatte sich eine GDP-Konzentration von 10 μM für Untersuchungen an G_i-koppelnden Rezeptoren als günstig erwiesen. Diese wurde auch in der vorliegenden Arbeit verwendet. Im Inkubationspuffer (L14) enthaltene Mg²⁺- und Na⁺-Ionen tragen

ebenfalls zur Optimierung des Messfensters bei, indem sie die Agonist-vermittelte [³⁵S]GTPγS-Bindung erhöhen (Harrison und Traynor, 2003; Milligan, 2003). (Zur Optimierung von Parametern zu Fragestellungen zum inversen Agonismus siehe auch Kapitel 3.3.5.)

Abbildung 4 zeigt eine schematische Übersicht der Rezeptor-vermittelten G-Protein-Aktivierung im linken Abbildungsteil, sowie das Prinzip des [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperiments im rechten Abbildungsteil.

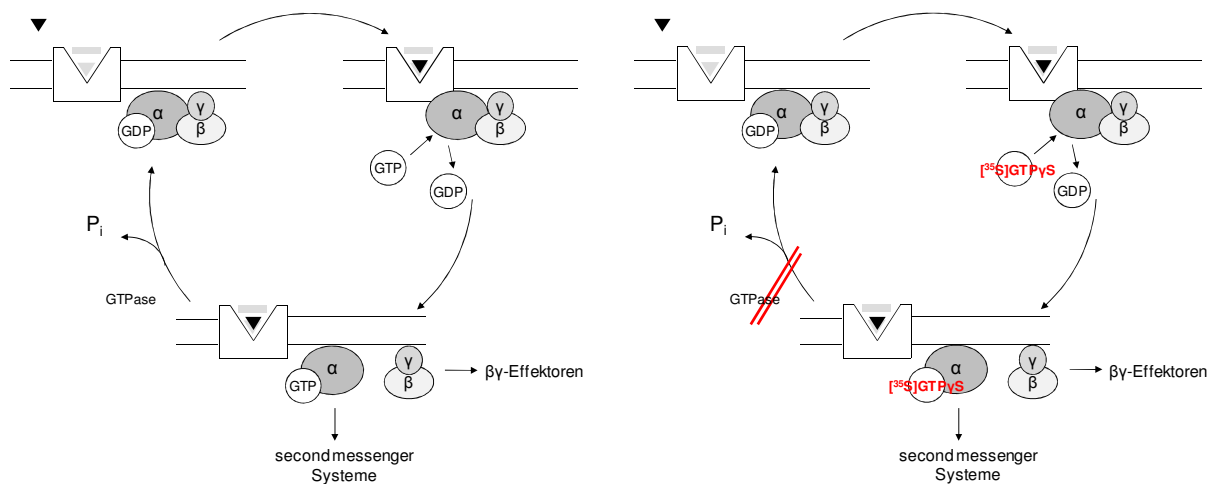


Abbildung 7: Rezeptor-vermittelte G-Protein-Aktivierung und Prinzip des [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperiments. Zur Erläuterung der Abbildung wird auf den vorangehenden Text verwiesen.

2.7.1.2 Versuchsdurchführung

Für die [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimente wurden überwiegend Membranhomogenate aus stabil transfizierten CHO- und Flp-CHO-Zellen verwendet, die zuvor nach der in Kapitel 2.5.3 beschriebenen Vorschrift hergestellt worden waren. Um die Anzahl der eingesetzten Rezeptoren vergleichbar zu halten, wurde die Verdünnung auf eine Proteinkonzentration von 40 µg/ml eingestellt.

Zu Beginn der Arbeiten standen noch keine stabilen Expressionszelllinien zur Verfügung, sodass einige Versuche mit Membranhomogenaten aus transienten Transfektanten durchgeführt wurden. Die in 3.3.1.1 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die niedrigere Rezeptorexpression zu einer starken Variabilität der Messungen führt. Zusätzlich ist das Verhältnis zwischen unspezifischer und Rezeptor-vermittelter [³⁵S]GTPγS-Bindung ungünstig.

Die Versuche wurden bei pH 7,4 und 30 °C in einem HEPES-Puffersystem der folgenden Konzentrationen durchgeführt: 10 mM HEPES, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl. Außerdem

wurden Untersuchungen zum Einfluss des Na⁺-Gehalt auf die [³⁵S]GTPγS-Bindung durchgeführt (3.3.4). Wie gesondert bei den Ergebnissen vermerkt, wurden Konzentrationen von 4-104 mM NaCl untersucht.

Alle Komponenten des Versuchsansatzes wurden in eine 96 Kavitäten enthaltende Standardplatte pipettiert. Das Volumen eines Ansatzes betrug 500 µl und setzte sich nach dem in Tabelle 7 aufgelisteten Schema zusammen. An jedem Versuchstag wurde eine Vierfachbestimmung jedes Messwertes durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug wie eingangs erläutert 60 min, beginnend nach Zugabe von [³⁵S]GTPγS. Zur Durchmischung der Versuchsansätze wurde ein Schüttelwasserbad (G38) bei 30 °C genutzt. Die Reaktion wurde durch Vakuumfiltration mittels des „Harvesters“ (G24) beendet: Eine Trennung von freiem und Protein-gebundenem [³⁵S]GTPγS erfolgte hierbei durch Glasfaser-Filtermatten (M23), die zuvor für wenige Minuten mit Aqua destillata (R6) befeuchtet worden waren. Anschließend wurden zwei Waschschrte durchgeführt, um die unspezifische Bindung zu verringern. Die Filtermatte wurde in einer Mikrowelle (G27) getrocknet und mit Hilfe eines Heizblocks (G12) wurde eine szintillatorhaltige Wachsplatte (R41) aufgeschmolzen. Nach vollständiger Erstarrung des Wachses wurde die Filtermatte in eine Hülle (M25) verpackt und in eine Zählkassette (M19) des Szintillationsmessgeräts (G2) überführt. Die Messung der gebundenen Radioaktivität erfolgte für drei Minuten je Probe.

Komponente	Volumen	Versuchsansatz	finale Konzentration
Aqua destillata (R6)	50 µl / 100 µl	Testsubstanz/ basale Bindung	-
Testsubstanz (in Aqua destillata)	50 µl	Testsubstanz	je nach Fragestellung
GDP (L8) (in Inkubationspuffer)	50 µl	alle	10 µM
Membranhomogenat (in Inkubationspuffer)	50 µl	alle	40 µg/ml Protein
Inkubationspuffer (L14)	250 µl	alle	10 mM HEPES, 10 mM MgCl ₂ , 4-100 mM NaCl
[³⁵ S]GTPγS (in Inkubationspuffer)	50 µl	alle	0,07 nM

Tabelle 7: Versuchsansatz zur Durchführung des [³⁵S]GTPγS-Bindungsversuchs.

Mit den durchgeführten Experimenten sollte der Einfluss verschiedener Testsubstanzen auf die basale [³⁵S]GTPγS-Bindung an M₂-Rezeptoren (Wildtyp und verschiedene Punktmutanten) untersucht werden. Zusätzlich wurde eine Fragestellung zum Einfluss von Testsubstanzen auf die durch eine andere Testsubstanz stimulierte [³⁵S]GTPγS-Bindung bearbeitet (Interaktion von Iperoxo bzw JSW236 und Atropin, siehe Kapitel 3.4).

2.7.1.3 Auswertung

Aus Einzelexperimenten unabhängiger Versuchstage wurden Mittelwertskurven gebildet. Vor der Zusammenfassung der Werte war eine Normierung notwendig. Wenn möglich wurden die Ergebnisse auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Acetylcholin am M₂-Wildtyp-Rezeptor als Standard bezogen. 0 % entsprachen dem unteren Plateau und 100 % entsprachen dem oberen Plateau der Konzentrationseffektcurve. Im Ergebnissteil geben die abbildungsbegleitenden Legenden Auskunft über die der Normierung zu Grunde liegenden Werte.

Die nichtlineare Regressionsanalyse der Messwerte erfolgte mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (siehe Gleichung 5). Zur Auswertung wurde das Programm GraphPad Prism genutzt. Bei der Kurvenanpassung wurde mittels eines F-Tests überprüft, ob die Kurve mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$ ausreichend beschrieben werden konnte oder ob ein nicht-festgelegter Hill-Koeffizient die Kurve signifikant besser beschrieb. Als weitere pharmakologische Kenngrößen konnten der sigmoidalen Konzentrations-Effekt-Kurve entnommen werden: der Wendepunkt (EC_{50}), der die Konzentration der Testsubstanz angibt, die einen halbmaximalen Effekt auslöst, das obere Plateau (E_{max}) als Maß für die intrinsische Aktivität einer Testsubstanz bzw. das untere Plateau (E_{min}) im Falle von inversem Agonismus.

2.7.1.3.1 Einfluss des orthosterischen Antagonisten Atropin auf die Agonist-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung (Schild-Analyse)

Im Ansatz der Versuche zu Kapitel 3.4 wurde der Effekt von Atropin auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Iperoxo und von JSW236 untersucht. Dazu wurden Konzentrations-Effekt-Kurven der Agonisten in Anwesenheit steigender Konzentrationen Atropin und unter Kontrollbedingungen (Abwesenheit von Atropin) erhoben. Durch die Interaktion der Testsubstanzen kam es zur Rechtsverschiebung der Agonist Konzentrations-Effekt-Kurven. Es wurden Verschiebefaktoren berechnet (dose ratios, DR), die als Quotient der EC_{50} -Werte in An- und Abwesenheit des Antagonisten (hier: Atropin) definiert sind.

$$DR = \frac{EC_{50Antagonist}}{EC_{50Kontrolle}} \quad (\text{Gleichung 9})$$

Der dekadische Logarithmus aus der Differenz DR-1 wurde gegen den dekadischen Logarithmus der Testsubstanz aufgetragen. Die Datenauswertung erfolgte nach Arunlakshana und Schild (1959) im Falle eines kompetitiven Antagonismus in Form einer Geraden. Im Falle einer allosterischen Interaktion erfolgte eine Auswertung nach Lanzafame et al. (1996) in Form einer Kurve.

Datenanalyse für eine kompetitive Interaktion

Nimmt das Ausmaß der Rechtsverschiebung mit logarithmisch steigender Konzentration des Antagonisten linear zu, liegt ein kompetitives Verhalten vor. Voraussetzung ist eine parallele Rechtsverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurve des Agonisten unter dem Einfluss der Testsubstanz. Gegenüber der Kontrollkurve sollte weder die Steigung (Hill-Koeffizient) noch der Maximaleffekt verändert sein. Die Anpassung erfolgte in diesem Fall mittels der Geradengleichung nach Arunlakshana und Schild (1959):

$$\log(DR - 1) = pK_A + s \cdot \log[A] \quad (\text{Gleichung 10})$$

- DR: dose ratio, Quotient aus den EC_{50} -Werten der Konzentrations-Effekt-Kurven des Partial- oder Vollagonisten in An- und Abwesenheit des Antagonisten
- pK_A : negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten der Bindung des Antagonisten
- [A]: Konzentration des Antagonisten
- s: Steigung der Regressionsgeraden

Der Schnittpunkt mit der Abszisse (pA_2) bezeichnet den negativen dekadischen Logarithmus der Konzentration der Testsubstanz, die zu einer Verschiebung des Wendepunkts der Agonist Konzentrations-Effekt-Kurve um den Faktor 2 ($DR = 2$) führt. Bei einem kompetitiven Antagonismus hat die Schild-Gerade eine Steigung von $s = 1$ und es gilt:

$$pA_2 = pK_A \quad (\text{Gleichung 11})$$

Der pK_A -Wert ist der negative dekadische Logarithmus der Antagonist-Konzentration, bei der 50 % der Rezeptoren besetzt sind. Er ist ein Maß für die Affinität der Testsubstanz zum freien Rezeptor.

Datenanalyse für eine allosterische Interaktion

Beim Vorliegen einer allosterischen Interaktion strebt die Rechtsverschiebung einem Maximalwert entgegen. Der antagonistische Effekt der Testsubstanz ist sättigbar, sodass die Datenpunkte der Auftragung nach Arunlakshana und Schild bei hohen Konzentrationen zu einem Plateau streben. Lanzafame et al. (1996) entwickelten eine Gleichung zur nichtlinearen Regressionsanalyse, basierend auf dem Kooperativitätsmodell nach Ehlert (1988). Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_A der Bindung des Allostere zum freien Rezeptor kann als Maß für die Affinität der Testsubstanz bestimmt werden. Der Kooperativitätsfaktor α beschreibt die gegenseitige Beeinflussung der Bindungsaffinitäten von allosterischer und orthosterischer Testsubstanz. Bei $\alpha > 1$ (negative Kooperativität, $p\alpha < 0$) verringert der allosterische Modulator die Bindung des Liganden. Bei $0 < \alpha < 1$ (positive Kooperativität, $p\alpha > 0$) erhöht der allosterische Modulator die Gleichgewichtsbindung des Liganden. $p\alpha = 0$ beschreibt eine neutrale Kooperativität.

$$\log(DR - 1) = \log \left(\frac{(\alpha - 1)}{1 + \frac{\alpha \cdot K_A}{[A]}} \right) \quad (\text{Gleichung 12})$$

- DR: dose ratio, Quotient aus den EC_{50} -Werten der Konzentrations-Effekt-Kurven des Partial- oder Vollagonisten in An- und Abwesenheit des Antagonisten
- K_A : negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten der Bindung des Allostere
- [A]: Konzentration des Allostere
- α : Kooperativitätsfaktor

Auf Basis des Kooperativitätsmodells lässt sich über den Ausdruck $p(\alpha \cdot K_A) = p\alpha - pK_A$ die Affinität des Allostere zum Orthoster-besetzten Rezeptor berechnen (Ellis, 1997).

2.7.1.3.2 Test nach Lew und Angus auf Parallelverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurven

Eine Datenanalyse nach den in Punkt 2.7.1.3.1 beschriebenen kompetitiven (Arunlakshana und Schild, 1959) und allosterischen (Lanzafame, 1996) Modellen kann nur bei Vorliegen einer Parallelverschiebung durchgeführt werden. Vor allem das Steigungsmaß der sigmoidalen Konzentrations-Effekt-Kurven darf durch die Rechtsverschiebung nicht beeinflusst sein. Diese Voraussetzung war erfüllt, wenn alle Konzentrations-Effekt-Kurven ausreichend mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$ beschrieben wurden. Im Fall der

Interaktion von Atropin und Iperoxo (Kapitel 3.4.1) wurde eine Kurve signifikant besser durch einen freilaufenden Hill-Koeffizienten beschrieben. Nach Lew und Angus (1997) wurde mittels eines gemeinsamen F-Tests (siehe 2.8) überprüft, ob die Gesamtheit der Kurven ausreichend mit einem konstanten Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$ beschrieben werden konnte. Dies war der Fall; es lag somit eine Parallelverschiebung vor.

2.7.2 Messungen der zellulären dynamischen Massenumverteilung (DMR-Messungen)

Diese Untersuchungen wurden am Epic[®] Biosensor im Arbeitskreis von Frau Prof. Kostenis, Institut für Pharmazeutische Biologie, durchgeführt. Für die Messungen wurde die beta Version des Corning Epic[®] Systems (G17) benutzt. Das Messsystem besteht aus einer Temperiereinheit, einer Detektionseinheit (dem optischen Biosensor) und einem integrierten Pipettier-Roboter.

2.7.2.1 Theoretische Grundlagen, Prinzip der Messung

Jede Kavität einer Messplatte (M11) ist mit einem optischen Biosensor ausgestattet (RWG-Sensor, *resonant waveguide grating sensor*). Der Biosensor wird mit Breitband-Laserlicht angestrahlt; Licht einer definierten Wellenlänge wird ausgewählt und im Sensor weitergeleitet. Dabei ist die Wellenlänge von der optischen Dichte des sich an den Biosensor anschließenden Messbereichs (150 nm) abhängig (siehe Abbildung 8).

Das elektromagnetische Feld des Lichtstrahls hat einen Ausbreitungsbereich von 150 nm, der somit den unteren Teil der Zellschicht einschließt. Abhängig von der optischen Dichte der Zellschicht in diesem Bereich verliert der Lichtstrahl bei seiner Passage an Energie, Licht einer charakteristischen Wellenlänge wird reflektiert. Als Folge von veränderten Zellfunktionen kommt es zur Umverteilung intrazellulärer Zellkomponenten v.a. zur Relokalisation verschiedenster Proteine als Folge von ablaufenden Signaltransduktions-Kaskaden. Dies ist als zelluläre dynamische Massenumverteilung (*dynamic mass redistribution*, DMR) messbar und führt zu einer Veränderung der optischen Dichte. Relativ zum Ausgangswert kann eine Verschiebung der charakteristischen reflektierten Wellenlänge sehr sensitiv bestimmt werden. Die zelluläre Antwort auf verschiedene Stimuli kann in Echtzeit gemessen werden (Fang et al., 2006; Fang et al., 2007).

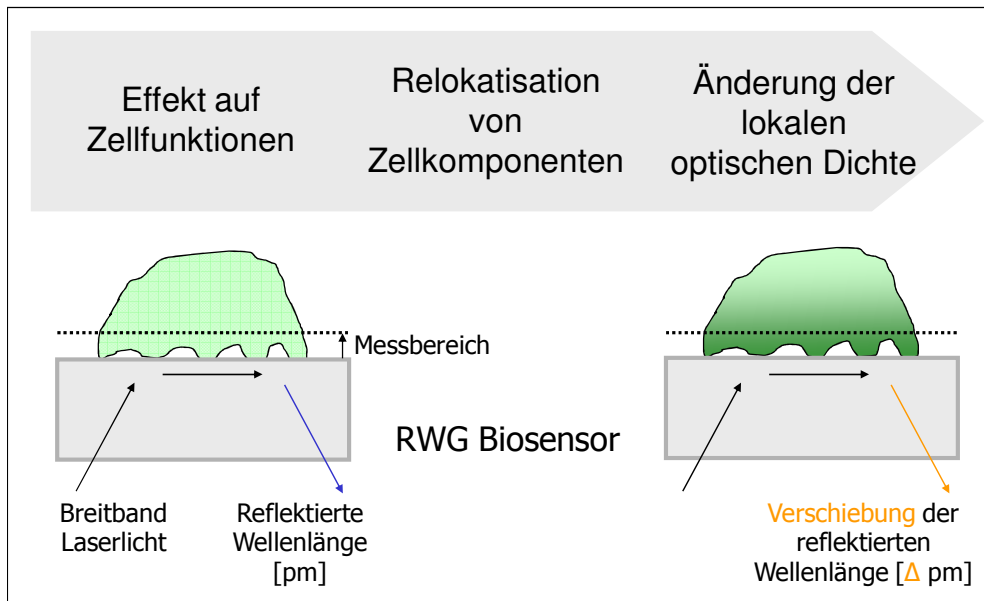


Abbildung 8: Prinzip der Messungen der zellulären dynamischen Massenumverteilung mittels des optischen Biosensors Epic[®] (modifiziert nach Kebig et al., 2009). Zur Erläuterung der Abbildung wird auf den vorangehenden Text verwiesen.

2.7.2.2 Versuchsdurchführung

Für die DMR-Messungen wurden CHO-Zellen benutzt, die stabil mit dem entsprechenden M-Rezeptor (oder der entsprechenden M-Rezeptor-Mutante) transfiziert waren, sowie nicht transfizierte Zellen zur Kontrolle auf Spezifität der Signale. Am Vortag der Messung wurden die adhärennten Zellen in den speziellen Mikrotiterplatten (M11) ausgesät (12500 Zellen in 40 μ l des entsprechenden Zellkulturmediums pro Kavität). Bei normalen Zellkulturbedingungen (37 °C, 5 % CO₂, 95 % relative Luftfeuchte) waren die Zellen nach Übernachtinkubation für ca. 20 h zu einem konfluenten Monolayer angewachsen.

Zur Klärung von Fragestellungen bezüglich der Signalwegsaktivierung wurden Pertussistoxin (Ui, 1984; Kaslow, 1987) und Choleratoxin (Gill und Meren, 1978) eingesetzt (siehe 8.1.9 und 8.1.10). Die Zellen wurden direkt nach dem Aussäen mit den Toxinen (in einer Konzentration von 100 μ g/ml) behandelt. Die Inkubation erfolgte für ca. 20 h.

Vor der Messung wurde das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen wurden zweimal mit 50 μ l Epic[®] Messpuffer (L4, HBSS + 20 mM HEPES, pH 7,0) gewaschen. Der adhärierende Pufferüberstand wurde zu 30 μ l ergänzt. Bei Versuchen mit Forskolin (R20)-Vorstimulation (siehe 8.1.4 und 3.5.4.3) wurde dem Puffer zu diesem Zeitpunkt die entsprechende Konzentration zugefügt.

Anschließend wurden die Zellen im Messgerät für zwei Stunden bei einer konstanten Temperatur von 28,0 °C äquilibriert, um Störeinflüsse z.B. durch mechanische

Beanspruchung zu minimieren. Nach Durchführung einer initialen Messung von durchschnittlich 300 s (die Zeitspanne setzte sich aus zehn Einzelmessungen der Messplatte zusammen) wurden je 10 μ l der zuvor in einer weiteren Mikrotiterplatte (M2) vorbereiteten Substanzen (in Vierfachkonzentration der entsprechenden Endkonzentration) zugegeben. Die DMR wurde für mindestens eine Stunde beobachtet. Dabei wurde jede Kavität der Messplatte spaltenweise ca. alle 30 Sekunden vermessen. An jedem Versuchstag wurde der Effekt von Puffer ebenfalls überprüft, er variierte von 0-50 pm. Gegebenenfalls konnte so eine Korrektur der erhaltenen optischen Signatur um den Pufferwert durchgeführt werden (siehe 8.1.5).

2.7.2.3 Auswertung

Zur computergestützten Auswertung der Daten wurden die Messwerte mit Hilfe des Excel-Makros „Microplate Analyzer v2.0“ (siehe 2.3) in tabellarischer Form geöffnet und konnten dann in das zur Datenanalyse verwendete Programm GraphPad Prism überführt werden. Die Darstellung der optischen Signaturen erfolgte in repräsentativen Abbildungen in Form von Originalregistrierungen eines Einzelexperiments in Dreifach- bis Achtfachbestimmung. Jedes solcher Experimente wurde mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt, die Anzahl der Wiederholungen ist in den abbildungsbegleitenden Legenden im Ergebnissteil angegeben. Auf Grund der Schwankungen der absoluten Signaturstärke und des stark variablen Verlaufs zu späten Zeitpunkten der Messungen erscheint eine zusammenfassende Abbildung der Originalregistrierungen mehrerer Versuchstage wenig sinnvoll. In dieser Arbeit wurden Konzentrations-Effekt-Kurven ausschließlich an G_i -koppelnden Rezeptoren erhoben. Da die G_i -Kopplung an den eingesetzten Rezeptor/Zell-Systemen (meist CHO-hM₂) mit einer positiven Massenverschiebung in Form eines „Peaks“ einhergeht, wurde zur Auswertung der Konzentrations-Effekt-Kurven die maximale Zellantwort verwendet. Die nichtlineare Regressionsanalyse erfolgte analog der Analyse von Daten aus [³⁵S]GTP γ S-Bindungsexperimente (2.7.1.3).

2.8 Statistik

In vorliegender Arbeit wurden die Daten durch deskriptive Statistik aufbereitet und zusammengefasst. Hierzu wurden die Werte durch statistische Kennwerte und graphische Darstellungen beschrieben. Als Lagemaß wurde der **arithmetische Mittelwert** (\bar{x}) verwendet. Zu seiner Ermittlung werden die Einzelwerte addiert und die erhaltene Summe durch die Anzahl der Werte dividiert. Da alle Werte in die Berechnung eingehen, wird der arithmetische Mittelwert auch von Extremwerten beeinflusst, sodass dieser Lageparameter vor allem unter der Voraussetzung einer Normalverteilung der einzelnen Messwerte sinnvoll ist.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (\text{Gleichung 13})$$

Als Streuungsmaß wurde die **Varianz** (s^2) verwendet; sie beschreibt die Streuung der Einzelwerte um den Mittelwert. Die Varianz stellt die Summe der Quadrate der Abweichungen der Einzelwerte vom Mittelwert, dividiert durch die Zahl der Freiheitsgrade, dar.

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \sum (x_i - \bar{x})^2 \quad (\text{Gleichung 14})$$

Die Quadratwurzel der Varianz, die **Standardabweichung** (s), gibt die mittlere Abweichung der Einzelwerte vom Mittelwert an. Die Standardabweichung ist somit ein wichtiges Maß für die Präzision. Bei größeren Werten ergeben sich in der Regel auch größere Standardabweichungen. Ein direkter Vergleich von Standardabweichungen zur Beurteilung der Präzision ist also schwierig.

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum (x_i - \bar{x})^2} \quad (\text{Gleichung 15})$$

In dieser Arbeit wurde als Streuungsmaß der **Standardfehler des Mittelwerts** (SEM / standard error of the mean) angegeben. Dieser ist ein Maß für die Genauigkeit des Mittelwerts und gibt an, wie weit der Mittelwert vom wahren Mittelwert der Gesamtheit entfernt ist. Er errechnet sich gemäß Gleichung 16 aus der Standardabweichung.

$$\text{SEM} = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (\text{Gleichung 16})$$

Vergleich unterschiedlicher Modelle zur Kurvenanpassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden nichtlineare Regressionsanalysen durchgeführt. Zur Kurvenanpassung wurde das Programm GraphPad Prism verwendet. Die Berechnungen basieren auf der Minimierung der **Summe der Fehlerquadrate** (SS / sum of squares). Dabei werden die Variablen des gewählten Modells so lange variiert bis die Summe der Fehlerquadrate das Minimum erreicht hat.

$$SS = \sum (y_M - y_R)^2 \quad \text{(Gleichung 17)}$$

y_M : gemessener Wert

y_R : durch Regressionsanalyse ermittelter Wert

Um unterschiedliche Kurvenanpassungen, nach einfacheren und komplexeren Modellen, miteinander vergleichen zu können, wurde ein **F-Test** durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ festgesetzt.

Ein Maß für die Komplexität des Modells stellt die Anzahl der **Freiheitsgrade** (DF / degrees of freedom) dar, die sich aus der Anzahl der Messpunkte (n) sowie der Anzahl der Variablen (v) in der Kurvengleichung ergibt (Motulsky, 2003).

$$DF = n - v \quad \text{(Gleichung 18)}$$

Beim **F-Test** wird die relative Differenz der Fehlerquadrate durch die relative Differenz der Freiheitsgrade dividiert.

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

SS_1 : Summe der Fehlerquadrate des einfacheren Modells

SS_2 : Summe der Fehlerquadrate des komplexeren Modells

DF_1 : Anzahl der Freiheitsgrade des einfacheren Modells

DF_2 : Anzahl der Freiheitsgrade des komplexeren Modells

Aus dem F-Wert sowie der Differenz der Freiheitsgrade ($DF_1 - DF_2$) und der Anzahl der Freiheitsgrade des komplexeren Modells (DF_2) kann anhand der F-Verteilung ein p-Wert ermittelt werden. Ist dieser größer oder gleich als $p = 0,05$, ist davon auszugehen, dass das einfachere Modell ausreicht, die Datenpunkte korrekt zu beschreiben.

Vergleich von experimentell ermittelten Kenngrößen

Um die aus Regressionsanalysen erhaltenen Kenngrößen unterschiedlicher Datensätze miteinander vergleichen zu können, wurde mit Hilfe des Programms GraphPad InStat ein unabhängiger zweiseitiger **t-Test** durchgeführt. Dazu wird zunächst ein t-Wert berechnet, indem die Differenz der Mittelwerte durch den Standardfehler der Mittelwertsdifferenz (SE / standard error) geteilt wird (Motulsky, 1995).

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

Aus dem t-Wert wird weiterhin ein **p-Wert** berechnet (Grenze der Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$). Ist $p \geq 0,05$, so kann angenommen werden, dass die zu vergleichenden Werte derselben Grundgesamtheit entstammen. Ein p-Wert $< 0,05$ zeigt dagegen einen statistisch signifikanten Unterschied der beiden Werte an. Voraussetzung für eine Anwendung des t-Tests sind nicht signifikant voneinander abweichende Standardabweichungen der zu vergleichenden Mittelwerte. Außerdem müssen die Daten einer Gauß'schen Normalverteilung unterliegen.

3 Ergebnisse

Ein Großteil der im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Befunde waren Ergebnisse funktioneller Experimente zur Aktivierung der muskarinischen M_2 -Rezeptoren sowie definierter Rezeptor-Mutanten. Neben [^{35}S]GTP γ S-Bindungsversuchen (siehe Kapitel 3.2-3.4), mit denen die Aktivierung des Rezeptors anhand der Bindung des radioaktiv markierten Guanylnukleotides [^{35}S]GTP γ S erfasst wird und somit die erste Stufe der Rezeptoraktivierung untersucht werden kann, wurden Ganzzell-Messungen zur dynamischen Massenumverteilung durchgeführt (siehe Kapitel 3.5). Durch Einbeziehung dieser beiden funktionellen Untersuchungsmethoden für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren konnten Ergebnisse über die direkte Auswirkung der Rezeptoraktivierung auf Ebene der G-Proteine mit Aussagen über nachgeschaltete Signaltransduktionswege kombiniert werden.

3.1 Ergebnisse methodischer Vorversuche

3.1.1 Vergleich der stabilen CHO-h M_2 -Expressionszelllinien (CHO- M_2 / Flp-CHO- M_2)

Ein erstes Projekt, das im Rahmen dieser Dissertation bearbeitet wurde, war die Generierung von neuen, stabil transfizierten Expressionszelllinien des humanen muskarinischen M_2 -Rezeptors und definierter Punktmutanten. Das experimentelle Vorgehen ist in den Kapiteln 2.4.5 und 2.5.5.2 beschrieben; zur genauen Zielsetzung der Erstellung der Zelllinien siehe auch Kapitel 1.5.

Die erhaltene Flp-CHO- M_2 -Zelllinie sollte mit der bereits im Arbeitskreis etablierten stabilen CHO- M_2 -Zelllinie verglichen werden. Eine Gegenüberstellung der Rezeptoraktivierung, gemessen durch [^{35}S]GTP γ S-Bindung, ist unter 3.3.4 zu finden. Der Vergleich der K_D - und B_{\max} -Werte der Bindung des Radioliganden [^3H]N-Methylscopolamin ([^3H]NMS) an Membransuspensionen aus CHO- M_2 und Flp-CHO- M_2 -Zellen ist im Folgenden dargestellt. Zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften der verwendeten Membransuspensionen aus CHO- M_2 und Flp-CHO- M_2 -Zellen wurden homologe Kompetitions-Experimente durchgeführt, auf deren Basis die Parameter pK_D (Gleichgewichts-Dissoziationskonstante) und B_{\max} (Anzahl der Bindungsstellen) des Radioliganden [^3H]NMS errechnet wurden (Formeln siehe 2.6.1). Es wurde in den vorliegenden Versuchen jeweils ein Experiment je Membran-

suspension durchgeführt und ein Mittelwert aus den unabhängig voneinander hergestellten Homogenaten erstellt, da hier die Kenngrößen pK_D und B_{max} weniger zur Bestimmung der einzelnen Membransuspension als vielmehr der gesamten Zelllinie herangezogen wurden.

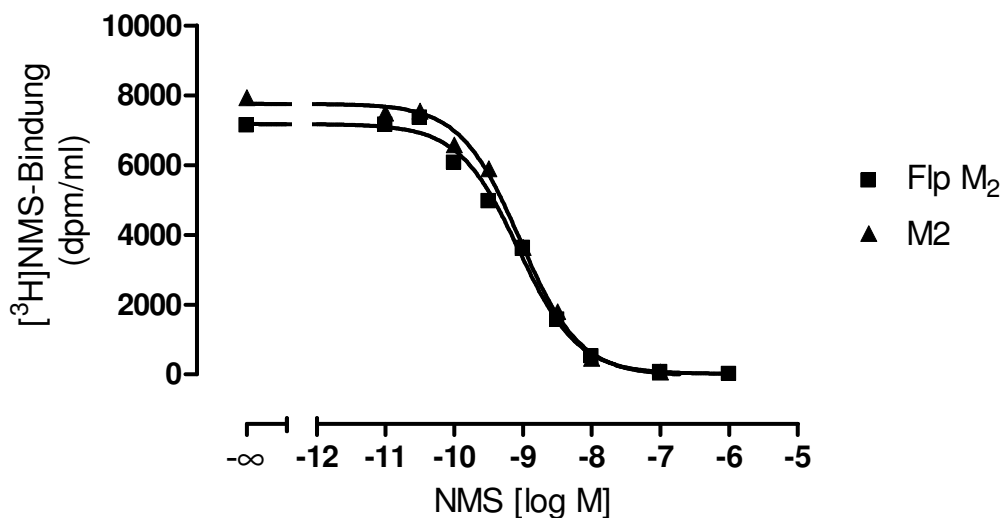


Abbildung 9: Repräsentatives Ergebnis einer homologen Konkurrenz mit $[^3\text{H}]\text{NMS}$ (0,2 nM) und NMS (nicht markiert) an je einer Membransuspension aus CHO- M_2 -Zellen und Flp-CHO- M_2 -Zellen. **Ordinate:** $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in dpm/ml. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der NMS-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = -1$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler eines in Dreifachbestimmung durchgeführten Experiments.

Abbildung 9 zeigt ein repräsentatives Ergebnis eines homologen Konkurrenz-Experiments. Der Hill-Koeffizient unterschied sich nicht signifikant von -1, sodass davon auszugehen ist, dass es sich um eine 1:1-Interaktion des Liganden mit dem Rezeptorprotein handelte (Monod, 1965). Durch Anwendung der Gleichung von Cheng und Prussoff (Gl. 7) wurde die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante ermittelt. Als weiterer charakteristischer Parameter wurde die Anzahl der Bindungsstellen nach DeBlasi et al. (Gl. 8) berechnet. Tabelle 8 zeigt die Mittelwerte der charakteristischen Kenngrößen der beiden in dieser Arbeit eingesetzten Expressionszelllinien des M_2 -Rezeptors. Ein durchgeführter t-Test ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p \geq 0,05$).

	pK_D	B_{max} (fmol/mg Protein)	n
M_2	$9,20 \pm 0,07$	3118 ± 963	3
Flp M_2	$9,11 \pm 0,10$	3677 ± 307	4

Tabelle 8: pK_D - und B_{max} -Werte des Radioliganden $[^3\text{H}]\text{NMS}$ basierend auf den in Abbildung 9 dargestellten homologen Konkurrenz-Experimenten an Membransuspensionen aus CHO- M_2 -Zellen und Flp-CHO- M_2 -Zellen. **pK_D :** Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des Radioliganden. **B_{max} :** Anzahl der Bindungsstellen. **n:** Anzahl der Wiederholungen.

3.1.2 Einfluss von Na⁺-Butyrat auf die [³⁵S]GTP_γS-Bindung an Membranhomogenaten aus CHO-M₂-Zellen

Auf Grund der von Kruh (1982) beschriebenen Modulation der Genexpression durch den Einsatz von Na⁺-Butyrat, die zu einer Erhöhung der Rezeptordichte führen soll, wurden die kultivierten Zellen am Vortag der Membranpräparation im Rahmen der Untersuchungen dieser Arbeit standardmäßig mit 5 mM Na⁺-Butyrat behandelt (siehe 2.5.3). Bei den durchgeführten Ganzzellmessungen zur dynamischen Massenumverteilung war der Gebrauch von Butyrat schwierig in das Protokoll zu integrieren. Außerdem stoppt das Reagenz die Zellproliferation in der frühen G1-Phase (Kruh, 1982), sodass die Bildung eines konfluenten Monolayers verhindert wird. Mit den folgenden Vorversuchen sollte deshalb der Einfluss von Butyrat auf das verwendete Zellexpressionssystem systematisch untersucht werden. So sollten Aussagen über die Auswirkung eines Verzichts sowie zur Vergleichbarkeit von Ergebnissen, die mit bzw. ohne Butyrat-Vorbehandlung der Zellen erhoben wurden, getroffen werden.

Dazu wurden, neben den nach Standardprotokoll hergestellten Homogenaten, Membranpräparationen getestet, bei denen am Vortag frisches Nährmedium ohne Butyrat-Zusatz zugesetzt wurde. Um eine optimale Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden alle Arbeiten parallel durchgeführt, sodass z. B. die Passage der verwendeten Zellen identisch war.

Die Bestimmung des Proteingehalts (Methode nach Lowry et al., 1951; siehe 2.5.4) ergab einen identischen Wert für beide parallel angefertigten Homogenate (2,3 mg/ml).

Um den Einfluss von Na⁺-Butyrat auf die charakteristischen Parameter der Konzentrations-Effekt-Kurve von muskarinischen Agonisten zu bestimmen, wurde exemplarisch Acetylcholin untersucht (Abbildung 10). Die Kenngrößen beider Kurven sind in Tabelle 9 wiedergegeben.

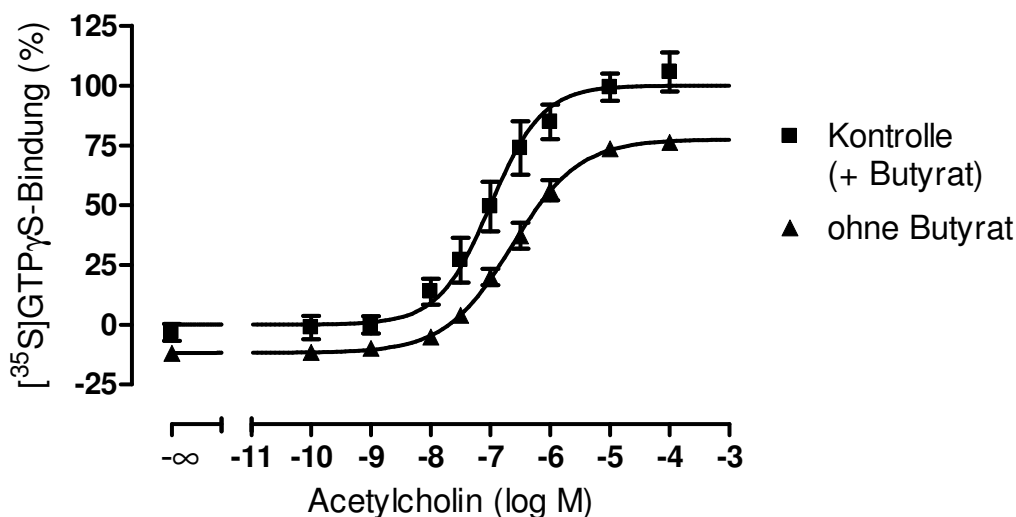


Abbildung 10: Acetylcholin-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung an Membransuspensionen aus Flp-CHO-M₂-Zellen. Kontrolle: Inkubation mit 5 mM Na⁺-Butyrat, 18 h vor Membranpräparation; „ohne Butyrat“: Medienwechsel, 18 h vor Membranpräparation. **Ordinate:** Prozentuale [³⁵S]GTPγS-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Kontroll-Konzentrations-Effekt-Kurve von Acetylcholin. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Acetylcholin-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), konstanter Hill-Koeffizient von n_H = 1 (Kontrolle); signifikanter Unterschied des Hill-Koeffizienten von n_H = 1 (F-Test, p < 0,05), n_H = 0,78 ± 0,07 („ohne Butyrat“). **Datenpunkte:** Mittelwerte ± Standardfehler aus je drei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC ₅₀	Basalwert (%)	E _{max} (%)	n _H (frei)	n
Kontrolle	7,00 ± 0,10	0 ± 4	100 ± 4	0,73 ± 0,14	3
„ohne Butyrat“	6,64 ± 0,06*	-12 ± 1*	77 ± 2*	0,78 ± 0,07 [#]	3

Tabelle 9: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 10. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von n_H = 1 für die Kontrolle und auf einer Kurvenanpassung mit einem freilaufenden Hill-Koeffizienten für die Membranpräparation „ohne Butyrat“. **pEC₅₀:** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung hervorruft. **Basalwert:** Basale, Agonist-unabhängige [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{max}:** Maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden Kontroll-Kenngröße (t-Test, p < 0,05)

signifikant bessere Anpassung mit variablem Hill-Koeffizienten (F-Test, p < 0,05)

Der pEC₅₀-Wert wurde unter Kontrollbedingungen mit 7,00 ± 0,10 ermittelt und lag in der gleichen Größenordnung wie der unter Auslassung der Butyrat-Behandlung erhaltene Wert (6,64 ± 0,06). Ein durchgeführter t-Test ergab jedoch eine signifikante Abnahme (p < 0,05). Die minimale und die maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung waren ohne Butyrat-Behandlung signifikant niedriger als unter Kontrollbedingungen, allerdings unterschieden sich die zwischenliegenden „Messfenster“ nicht signifikant voneinander (Kontrolle: 100 % ± 8, „ohne Butyrat“: 89 % ± 3). Die freilaufenden Hill-Koeffizienten der Kurvenanpassungen zeigten keinen signifikanten Unterschied (t-Test, p ≥ 0,05).

Am Beispiel der Konzentrations-Effekt-Kurve von Acetylcholin am M₂-Rezeptor konnte gezeigt werden, dass die Butyrat-Behandlung einen modulierenden Effekt auf die Genexpression hat. Bei Vergleich der Ergebnisse, die aus verschiedenen funktionellen Messsystemen stammen, muss neben weiteren variablen Komponenten (wie z. B. Puffersystem, Temperatur) auch die Verwendung von Butyrat beachtet werden.

3.2 Funktionelle Untersuchungen: [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimente CHO-M₂-Zellen (Wildtyp)

3.2.1 Beeinflussung der [³⁵S]GTPγS-Bindung an CHO-M₂-Zellen durch rezeptorsättigende Konzentrationen muskarinischer Liganden

Neben den Experimenten zur homologen Kompetition diente die Untersuchung rezeptorsättigender Konzentrationen bereits bekannter und eingehend an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren getesteter Liganden der näheren Charakterisierung der Membransuspensionen. Dabei wurden supramaximale Konzentrationen gewählt (siehe dazu Verweis auf die Konzentrations-Effekt-Kurve), sodass davon auszugehen war, dass durch eine weitere Erhöhung der Konzentration keine Verstärkung des Effekts mehr erreicht werden konnte. Zum Einsatz kamen die Vollagonisten Acetylcholin (0,1 mM; siehe 3.2.2.1) und Oxotremorin M (0,1 mM, siehe 3.2.2.2), der Partialagonist Pilocarpin (1 mM, siehe 3.2.2.6), der inverse Agonist Atropin (0,001 mM, Hilf und Jakobs, 1992) und der allosterische Modulator Alcuronium (0,1 mM, Jakubík et al., 1998) für den ebenfalls ein inversagonistisches Verhalten beschrieben war (Jakubík et al., 1998). Die Ergebnisse von je drei unabhängigen Untersuchungen (A und B) sind in Abbildung 11 dargestellt.

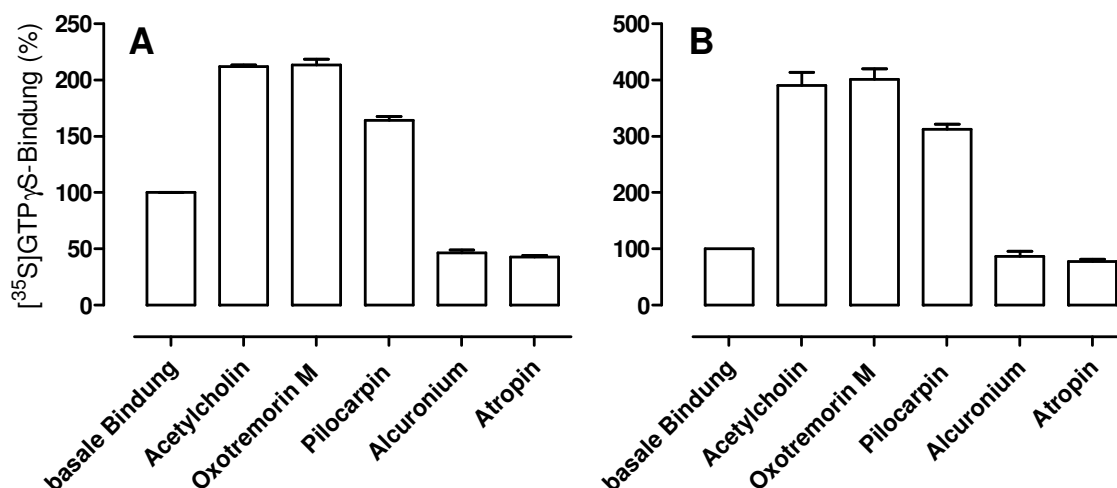


Abbildung 11: Effekte rezeptorsättigender Konzentrationen muskarinischer Liganden auf die [³⁵S]GTPγS-Bindung an Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen. **A:** Erste Versuchsreihe. **B:** Zweite Versuchsreihe. **Ordinate:** [³⁵S]GTPγS-Bindung in Prozent der basalen Bindung. **Abszisse:** Testsubstanzen: Acetylcholin 0,1 mM, Oxotremorin M 0,1 mM, Pilocarpin 1 mM, Alcuronium 0,1 mM, Atropin 0,001 mM. **Balken:** Mittelwerte ± Standardfehler aus je drei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

Ergebnisse

	Basale Bindung	Acetylcholin (0,1 mM)	Oxotremorin M (0,1 mM)	Pilocarpin (1 mM)	Alcuronium (0,1 mM)	Atropin (0,001 mM)
M ₂ (A)	100	212 ± 1* [#]	214 ± 5* [#]	164 ± 4* [#]	47 ± 2* [#]	43 ± 1* [#]
M ₂ (B)	100	390 ± 23* [#]	401 ± 19* [#]	312 ± 10* [#]	87 ± 9 [#]	78 ± 4 [#]

Tabelle 10: Effekte rezeptorsättigender Konzentrationen muskarinischer Liganden auf die [³⁵S]GTPγS-Bindung an Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen. **A:** Erste Versuchsreihe. **B:** Zweite Versuchsreihe. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

* signifikanter Unterschied zur basalen [³⁵S]GTPγS-Bindung (t-Test, p < 0,05)

signifikanter Unterschied zwischen den beiden Testreihen (t-Test, p < 0,05)

Die vorliegenden [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimente wurden in zwei Versuchsreihen unterteilt (A: erste Versuchsreihe und B: zweite Versuchsreihe). Die Zuordnung der Versuche erfolgte chronologisch. Die im Folgenden beschriebenen Unterschiede zeigten sich, obwohl alle Versuche unter den gleichen Versuchsbedingungen und nach dem gleichen Versuchsprotokoll (siehe 2.7.1.2) durchgeführt wurden. Die den unterschiedlichen Ergebnissen zu Grunde liegende Ursache konnte experimentell nicht identifiziert werden. Im Rahmen der durchgeführten Versuche konnte ein Einfluss durch die verwendete Membransuspension, die verwendete Charge an [³⁵S]GTPγS oder die verwendeten Testsubstanzen ausgeschlossen werden. In beiden Versuchsreihen unterschied sich der Effekt der untersuchten Vollagonisten Acetylcholin und Oxotremorin M nicht signifikant. Das partialagonistische Verhalten von Pilocarpin konnte bestätigt werden. Obwohl die beiden Versuchsreihen unter den gleichen Versuchsbedingungen und nach dem gleichen Versuchsprotokoll (siehe 2.7.1.2) durchgeführt wurden, führten sie jedoch zu signifikant unterschiedlichen Ergebnissen in Bezug auf das Ausmaß der Rezeptoraktivierung. Ausgehend von der basalen [³⁵S]GTPγS Bindung in Abwesenheit eines Liganden erreichten die Vollagonisten in der ersten Versuchsreihe einer Steigerung von ca. 100 %-Punkten (Acetylcholin: + 112 ± 1 %-Punkte, Oxotremorin M: + 114 ± 5 %-Punkte). In der zweiten Versuchsreihe wurde eine signifikant höhere G-Protein-Aktivierung von ca. 300 %-Punkten ermittelt (Acetylcholin: + 290 ± 23 %-Punkte, Oxotremorin M: + 301 ± 19 %-Punkte). Auch in Bezug auf den invers agonistischen Effekt des allosterischen Modulators Alcuronium und des orthosterischen Antagonisten Atropin unterscheiden sich die beiden Testreihen voneinander signifikant: In der zweiten Reihe ist zwar numerisch eine Absenkung der basalen [³⁵S]GTPγS Bindung durch die inversen Agonisten zu erkennen, diese ist jedoch sehr schwach ausgeprägt und bei Überprüfung durch einen t-Test nicht signifikant verschieden von 100 % (entspricht der basalen Bindung). Bei der ersten Versuchsreihe kam es hingegen zu einer statistisch signifikanten Absenkung der

Ligand-unabhängigen G-Protein-Aktivierung um mehr als 50 %-Punkte (Alcuronium: $- 53 \pm 2$ %-Punkte, Atropin: $- 57 \pm 1$ %-Punkte).

Unter der Annahme, dass Atropin als inverser Agonist zu einer Aufhebung der M_2 -Rezeptor-vermittelten spontanen G-Proteinaktivierung führte, kann aus den Messwerten geschlossen werden, dass in der ersten Versuchsreihe 57 % der basalen [35 S]GTP γ S-Bindung auf eine spontane Aktivität des M_2 -Rezeptors zurückzuführen waren, in der zweiten Versuchsreihe jedoch nur 22 %. Wird berücksichtigt, dass in der ersten Versuchsreihe durch den Vollagonisten Acetylcholin die basale [35 S]GTP γ S-Bindung um durchschnittlich 112 %-Punkte erhöht wurde, hatte die spontane Aktivität des M_2 -Rezeptors einen Anteil von 34 % und die durch Agonisten induzierbare [35 S]GTP γ S-Bindung einen Anteil von 66 % am gesamten Messfenster der M_2 -Rezeptor-vermittelten G-Protein-Aktivierung. Bei der zweiten Versuchsreihe erhöhte Acetylcholin die basale [35 S]GTP γ S-Bindung um durchschnittlich 290 %-Punkte. Der Anteil der spontanen, Atropin-supprimierbaren Aktivität betrug hier 7 %, der Anteil der Agonist induzierbaren Aktivierung 93 % des gesamten Messfenster der M_2 -Rezeptor-vermittelten G-Protein-Aktivierung. Die in der zweiten Versuchsreihe ermittelten Werte stimmen gut mit den von Kellershohn (2007) erhobenen Werten überein: die spontane Aktivität der M_2 -Rezeptoren betrug hier 9 %, die Agonist-induzierbare Aktivierung 91 %.

3.2.2 Orthosterische Agonisten

Die folgenden Abbildungen zeigen die Mittelwertskurven der Stimulation der [³⁵S]GTPγS-Bindung durch die untersuchten orthosterischen Agonisten. Die Ergebnisse der einzelnen, voneinander unabhängigen Versuchstage wurden so normiert, dass das untere Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve von Vollagonisten auf 0 % und das obere Plateau auf 100 % festgesetzt wurde. Alle erhobenen Ergebnisse wurden zusammengefasst und sodann wurde eine Kurvenanpassung vorgenommen. Wenn die zugrundeliegenden Einzelversuche stark variierten, (z. B. signifikant verschiedene Steigungen besaßen) wurde eine weitere Kurvenanpassung vorgenommen. Hierbei wurde der betreffende Parameter auf den zuvor errechneten Mittelwert festgesetzt.

Bei Partialagonisten wurde die prozentuale Rezeptoraktivierung auf einen am gleichen Versuchstag untersuchten Vollagonisten bezogen.

3.2.2.1 Acetylcholin-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung

Acetylcholin, der endogene Agonist an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren, diente in vielen Experimenten als Referenzsubstanz. Abbildung 12 zeigt die Zusammenfassung der Konzentrations-Effekt-Kurven von Acetylcholin zu einer Mittelwertskurve. Die Kenngrößen der Kurve sind in Tabelle 11 wiedergegeben.

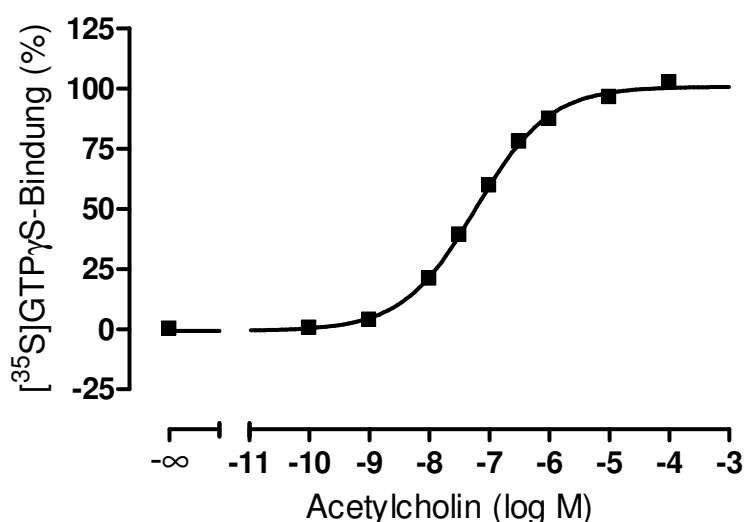


Abbildung 12: Acetylcholin-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung an Membransuspensionen aus Flp-CHO-M₂-Zellen. **Ordinate:** Prozentuale [³⁵S]GTPγS-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau (basale [³⁵S]GTPγS-Bindung) und 100 % dem oberen Plateau (maximal induzierbarer Acetylcholin-Effekt) der Konzentrations-Effekt-Kurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Acetylcholin-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), signifikanter Unterschied der Hill-Koeffizienten von n_H = 1 (F-Test, p < 0,05), n_H = 0,71 ± 0,03. **Datenpunkte:** Mittelwerte ± Standardfehler aus neun voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC ₅₀	Basalwert (%)	E _{max} (%)	n _H (frei)	n
Acetylcholin	7,23 ± 0,03	-1 ± 1	101 ± 1	0,71 ± 0,3 [#]	9

Tabelle 11: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 12. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem freilaufenden Hill-Koeffizienten. **pEC₅₀:** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung hervorruft. **Basalwert:** Basale, Agonist-unabhängige [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{max}:** Maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

[#] signifikant bessere Anpassung mit variablem Hill-Koeffizienten (F-Test, p < 0,05)

Der pEC₅₀-Wert wurde mit 7,23 ± 0,03 (n = 9) ermittelt und liegt in der gleichen Größenordnung wie die von Lazareno und Birdsall (1993) bzw. Birdsall et al. (1999) bestimmten Werte: pEC₅₀ = 7,40 ± 0,06 und n_H = 0,69 ± 0,02 bzw. pEC₅₀ = 7,20. Die Steigung der Mittelwertskurve wich signifikant von eins ab, nur zwei der Einzelversuche konnten ausreichend (F-Test, p < 0,05) mit einem konstanten Hillkoeffizienten von n_H = 1 beschrieben werden. Dies bestätigte, dass die signifikant flachere Mittelwertskurve nicht dadurch zustande kam, dass Datenpunkte aus Einzelexperimenten mit normal steilen aber parallel verschobenen Kontrollkurven zusammengenommen und einer gemeinsamen Kurvenanpassung unterworfen wurden. Das Phänomen von flachen Kurvenverläufen mit Steilheiten kleiner n_H = 1 wurde zuvor schon von Schmalenbach (Dissertationsschrift 2005) beschrieben.

3.2.2.2 Oxotremorin M-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung

Oxotremorin M ist wie Acetylcholin ein Vollagonist an muskarinischen Rezeptoren. Die Experimentalsubstanz Oxotremorin M bzw. deren Derivat Iperoxo stellen die orthosterische Muttersubstanz der agonistischen Hybride, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, dar. Im folgenden Abschnitt sollte der Effekt dieser Substanz auf die [³⁵S]GTPγS-Bindung untersucht und anschließend mit Literaturdaten verglichen werden. In Abbildung 13 ist die Konzentrations-Effekt-Kurve von Oxotremorin M, im Vergleich zur Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve, dargestellt. Die Kenngrößen sind Tabelle 12 zu entnehmen.

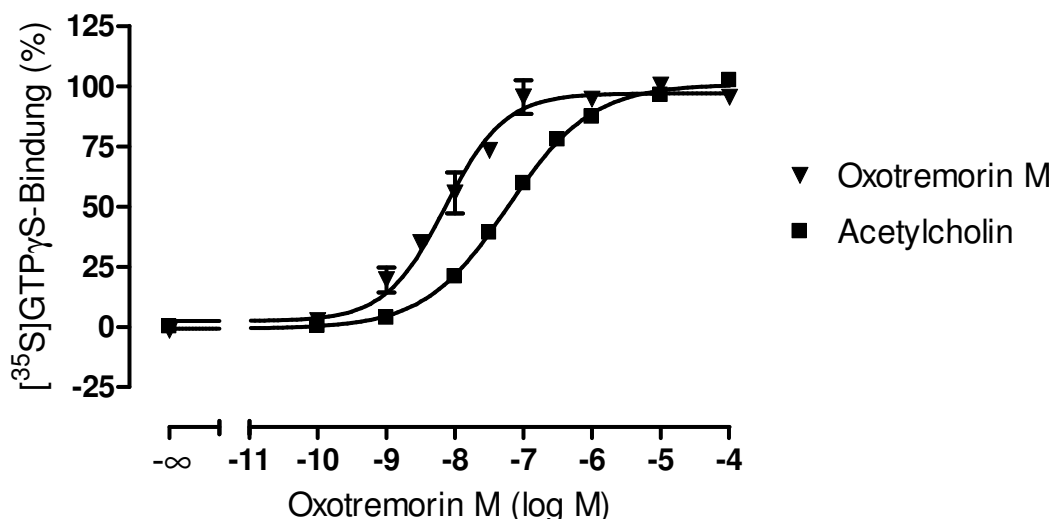


Abbildung 13: Vergleich von Oxotremorin M- und Acetylcholin-induzierter $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung an Membransuspensionen aus Flp-CHO- M_2 -Zellen. **Ordinate:** Prozentuale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Vollagonist-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = 1$ (Oxotremorin M), signifikanter Unterschied der Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$ (F-Test, $p < 0,05$), Acetylcholin: $n_H = 0,71 \pm 0,03$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei (Oxotremorin M) bzw. neun (Acetylcholin) voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC ₅₀	Basalwert (%)	E _{max} (%)	n _H (frei)	n
Oxotremorin M	8,14 \pm 0,10*	2 \pm 3	97 \pm 2	0,80 \pm 0,07	3
Acetylcholin	7,23 \pm 0,03	-1 \pm 1	101 \pm 1	0,71 \pm 0,3 [#]	9

Tabelle 12: Kenngrößen \pm Standardfehler der gemittelten Oxotremorin M- und Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 13. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$ für Oxotremorin M und auf einer Kurvenanpassungen mit freilaufendem Hill-Koeffizienten für Acetylcholin. **pEC₅₀:** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung hervorruft. **Basalwert:** Basale, Agonist-unabhängige $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{max}:** Maximale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden Acetylcholin-Kenngröße (t-Test, $p < 0,05$)

signifikant bessere Anpassung mit variablem Hill-Koeffizienten (F-Test, $p < 0,05$)

Oxotremorin M besaß eine um etwa eine Dekade höhere Wirksamkeit (pEC₅₀) als Acetylcholin. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zu dem von Kellershohn (2008) mit $8,18 \pm 0,09$ ($n = 4$) und Schmalenbach (2005) mit $8,13 \pm 0,11$ ($n = 2$) ermittelten pEC₅₀-Werten (t-Test, $p \geq 0,05$). Bei Vergleich der sehr gut übereinstimmenden Werte aus den $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsversuchen mit anderen funktionellen Experimenten zeigt sich, dass hier relativ große Abweichungen zu finden sind: Chronotropie-Messungen an murinen, atrialen, embryonalen Kardiomyozyten ergaben einen pEC₅₀-Wert von $6,80 \pm 0,06$ ($n = 3$)

(mündliche Mitteilung, Wiebke Seemann). In Experimenten, in denen die Hemmung der cAMP-Akkumulation bestimmt wurde, wurden Werte von $pEC_{50} = 6,87 \pm 0,03$ (Michal et al., 2007) und $pEC_{50} = 7,32 \pm 0,07$ (Griffin et al., 2007) erhoben.

3.2.2.3 Iperoxo-induzierte [35 S]GTP γ S-Bindung

Iperoxo (Strukturformel siehe Seite 35) ist ein Derivat des Vollagonisten Oxotremorin M, wobei der Pyrrolidin-2-on-Rest des Oxotremorin-M gegen einen Isoxazolinyl-Ether-Rest ausgetauscht wurde. Iperoxo zeigt in Organbadexperimenten am linken Meerschweinchen-Herzvorhof eine außerordentlich hohe Wirksamkeit (Dallanocce et al., 1999). Im vorliegenden Versuch sollte in [35 S]GTP γ S-Bindungsexperimenten die Wirksamkeit von Iperoxo bestimmt werden. Zum Vergleich ist in Abbildung 14 der Referenzagonist Acetylcholin dargestellt. Die Kenngrößen sind Tabelle 13 zu entnehmen.

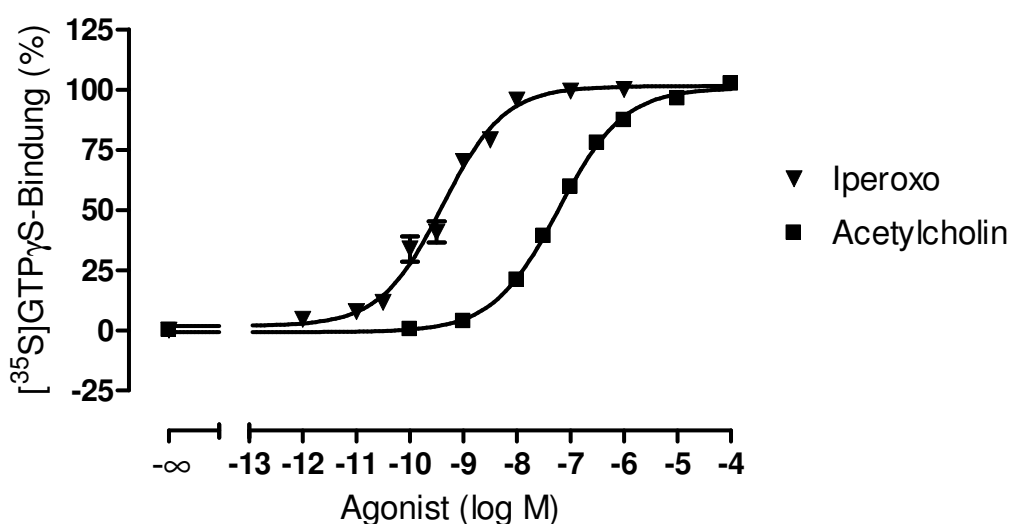


Abbildung 14: Vergleich von Iperoxo- und Acetylcholin-induzierter [35 S]GTP γ S-Bindung an Membransuspensionen aus Flp-CHO-M $_2$ -Zellen. **Ordinate:** Prozentuale [35 S]GTP γ S-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Vollagonist-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), signifikanter Unterschied der Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$ (F-Test, $p < 0,05$), Iperoxo: $n_H = 0,75 \pm 0,06$, Acetylcholin: $n_H = 0,71 \pm 0,03$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus sieben (Iperoxo) bzw. neun (Acetylcholin) voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC ₅₀	Basalwert (%)	E _{max} (%)	n _H (frei)	n
Iperoxo	9,40 ± 0,06*	2 ± 2	101 ± 2	0,75 ± 0,06 [#]	7
Acetylcholin	7,23 ± 0,03	-1 ± 1	101 ± 1	0,71 ± 0,3 [#]	9

Tabelle 13: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Iperoxo- und Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 14. Die Kenngrößen beruhen auf Kurvenanpassungen mit freilaufenden Hill-Koeffizienten. **pEC₅₀:** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung hervorruft. **Basalwert:** Basale, Agonist-unabhängige [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{max}:** Maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden Acetylcholin-Kenngröße (t-Test, p < 0,05)

signifikant bessere Anpassung mit variablem Hill-Koeffizienten (F-Test, p < 0,05)

Iperoxo wies einen um mehr als zwei Dekaden signifikant höheren pEC₅₀-Wert auf als Acetylcholin (t-Test, p < 0,05). Der Wert stimmt mit dem zuvor veröffentlichten Wert (Antony et al., 2009) pEC₅₀ = 9,40 ± 0,04 überein. Der von Kellershohn (2007) beschriebene charakteristische flache Kurvenverlauf wurde ebenfalls gefunden.

3.2.2.4 JSW 236-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Testsubstanz JSW 236 (Strukturformel siehe Seite 36) erstmalig untersucht. Strukturell handelt es sich um ein Derivat des Iperoxo. Der quartäre Stickstoff ist mit einer Hexylammonium-Kette verknüpft, sodass eine Alkan-Bisammonium-Verbindung entsteht, ein Strukturteil, der auch in den allosterischen Modulatoren W84 und Naphmethonium sowie den abgeleiteten Hybriden vorkommt. Unter anderem sollte untersucht werden, ob die beiden quartären Stickstoffe für eine allosterisch-orthosterische Rezeptorinteraktion ausreichen (siehe 1.5). Die Kenngrößen der Substanz-Wirkung sind in Tabelle 14 wiedergegeben.

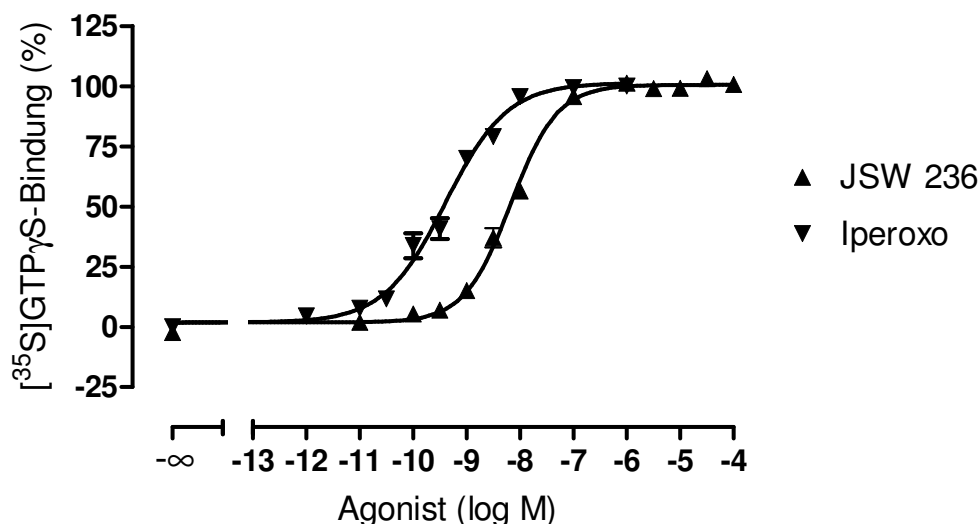


Abbildung 15: Vergleich von JSW 236- und Iperoxo-induzierter $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung an Membransuspensionen aus Flp-CHO- M_2 -Zellen. **Ordinate:** Prozentuale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Vollagonist-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = 1$ (JSW 236); signifikanter Unterschied der Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$ (F-Test, $p < 0,05$), Iperoxo: $n_H = 0,75 \pm 0,06$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus 13 (JSW 236) bzw. sieben (Iperoxo) voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC_{50}	Basalwert (%)	E_{max} (%)	n_H (frei)	n
JSW 236	$8,17 \pm 0,04^*$	2 ± 1	101 ± 1	$0,87 \pm 0,07$	13
Iperoxo	$9,40 \pm 0,06$	2 ± 2	101 ± 2	$0,75 \pm 0,06^\#$	7

Tabelle 14: Kenngrößen \pm Standardfehler der gemittelten JSW 236- und Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 15. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$ für JSW 236 und auf einer Kurvenanpassungen mit freilaufendem Hill-Koeffizienten für Iperoxo. **pEC_{50} :** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung hervorruft. **Basalwert:** Basale, Agonist-unabhängige $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{max} :** Maximale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden Iperoxo-Kenngröße (t-Test, $p < 0,05$)

signifikant bessere Anpassung mit variablem Hill-Koeffizienten (F-Test, $p < 0,05$)

Der pEC_{50} -Wert von JSW 236 lag mit $8,17 \pm 0,04$ mehr als eine Dekade unter dem pEC_{50} -Wert der Muttersubstanz Iperoxo. JSW 236 hat trotz der verminderten Wirksamkeit volle intrinsische Aktivität.

3.2.2.5 Methylperoxo (MIO)-induzierte [³⁵S]GTP γ S-Bindung

Als weiteres Derivat des Iperoxo wurde MIO in dieser Arbeit erstmals untersucht (Strukturformel siehe Seite 36). Als strukturelle Modifikation enthält die Substanz eine Methylgruppe in Position drei des Isoxazolinyl-Ether-Rings. Abbildung 16 zeigt den Vergleich mit der Referenzsubstanz Acetylcholin. Hierzu wurde an jedem der drei Versuchstage eine Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve aufgenommen, auf die die jeweilige MIO-Konzentrations-Effekt-Kurve bezogen wurde. Ein direkter Vergleich mit der Muttersubstanz Iperoxo war nicht möglich, da diese Substanz nicht käuflich erwerblich ist und so nur in beschränktem Ausmaß zur Verfügung steht.

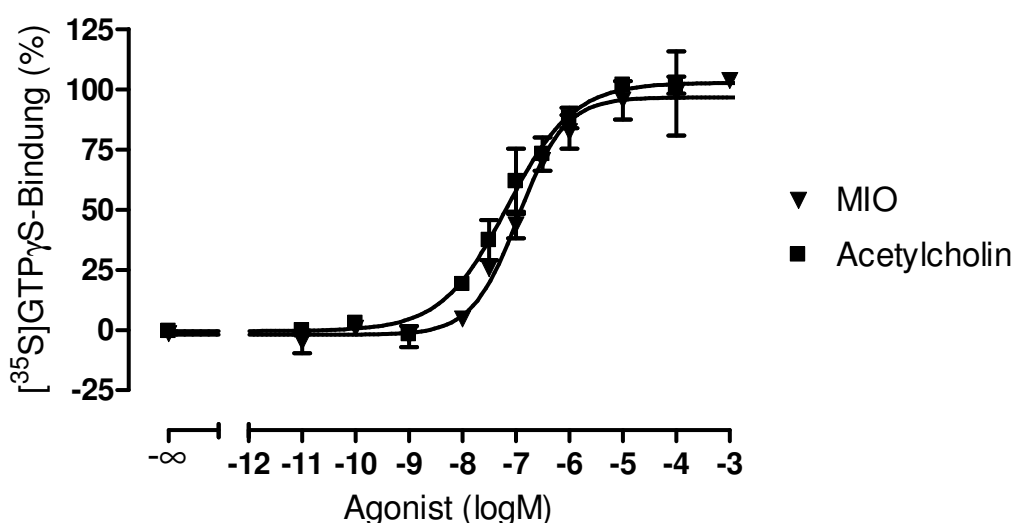


Abbildung 16: Vergleich von Methylperoxo (MIO)- und Acetylcholin-induzierter [³⁵S]GTP γ S-Bindung an Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen. **Ordinate:** Prozentuale [³⁵S]GTP γ S-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = 1$ (MIO); signifikanter Unterschied der Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$ (F-Test, $p < 0,05$), Acetylcholin: $n_H = 0,71 \pm 0,11$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC ₅₀	Basalwert (%)	E _{max} (%)	n _H (frei)	n
MIO	6,95 \pm 0,08	-2 \pm 2	97 \pm 3	0,84 \pm 0,14	3
Acetylcholin	7,16 \pm 0,11	0 \pm 3	103 \pm 4	0,71 \pm 0,12 [#]	3

Tabelle 15: Kenngrößen \pm Standardfehler der gemittelten MIO- und Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 16. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$ für MIO und auf einer Kurvenanpassungen mit freilaufendem Hill-Koeffizienten für Acetylcholin. **pEC₅₀:** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [³⁵S]GTP γ S-Bindung hervorruft. **Basalwert:** Basale, Agonist-unabhängige [³⁵S]GTP γ S-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{max}:** Maximale [³⁵S]GTP γ S-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

[#] signifikant bessere Anpassung mit variablem Hill-Koeffizienten (F-Test, $p < 0,05$)

Der pEC_{50} -Wert von MIO unterschied sich nicht signifikant vom pEC_{50} -Wert von Acetylcholin. Im Vergleich mit dem Standard-Vollagonisten zeigte MIO ebenfalls volle intrinsische Aktivität. Die Einführung einer Methylgruppe führte zu einem Verlust an Affinität von über 2,4 Dekaden im Vergleich zu Iperoxo.

3.2.2.6 Pilocarpin-induzierte [35 S]GTP γ S-Bindung

In Abbildung 17 wird die Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin der des Vollagonisten Acetylcholin gegenübergestellt. Der Partialagonismus von Pilocarpin zeigte sich durch einen signifikant niedrigeren Maximaleffekt (62 ± 2 %; t-Test, $p < 0,05$). Außerdem wies Pilocarpin eine im Vergleich zu Acetylcholin signifikant geringere Wirksamkeit am M_2 -Rezeptor auf ($pEC_{50} = 5,86 \pm 0,11$; t-Test, $p < 0,05$).

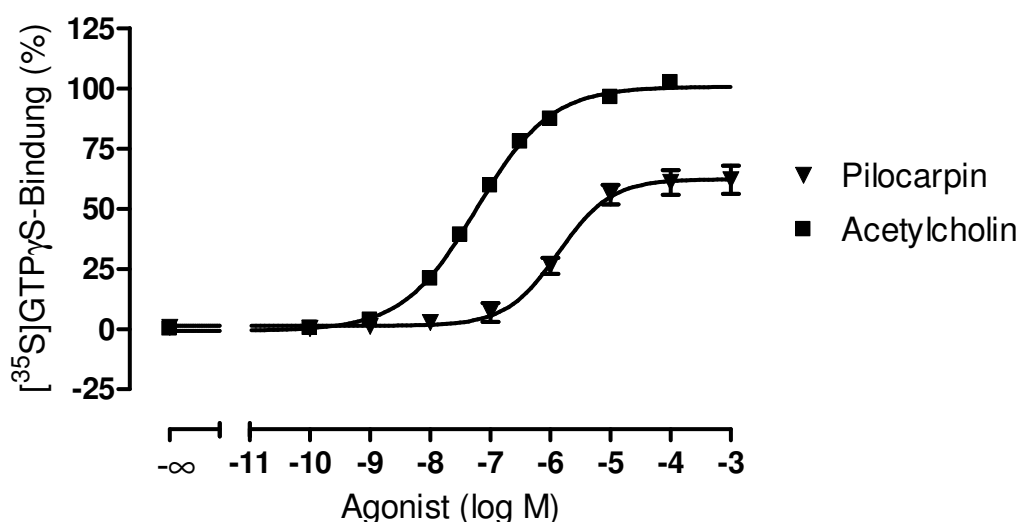


Abbildung 17: Vergleich von Pilocarpin- und Acetylcholin-induzierter [35 S]GTP γ S-Bindung an Membransuspensionen aus Flp-CHO- M_2 -Zellen. **Ordinate:** Prozentuale [35 S]GTP γ S-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = 1$ für Pilocarpin; signifikanter Unterschied des Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$ (F-Test, $p < 0,05$) für Acetylcholin: $n_H = 0,71 \pm 0,03$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus sechs (Pilocarpin) bzw. neun (Acetylcholin) voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC ₅₀	Basalwert (%)	E _{max} (%)	n _H (frei)	n
Pilocarpin	5,86 ± 0,11*	1 ± 2	62 ± 2*	0,99 ± 0,11	6
Acetylcholin	7,23 ± 0,03	-1 ± 1	101 ± 1	0,71 ± 0,3 [#]	9

Tabelle 16: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Pilocarpin- und Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 17. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von n_H = 1 für Pilocarpin und auf einer Kurvenanpassungen mit freilaufendem Hill-Koeffizienten für Acetylcholin. **pEC₅₀:** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung hervorruft. **Basalwert:** Basale, Agonist-unabhängige [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{max}:** Maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden Acetylcholin-Kenngröße (t-Test, p < 0,05)

signifikant bessere Anpassung mit variablem Hill-Koeffizienten (F-Test, p < 0,05)

Der ermittelte pEC₅₀-Wert stimmte gut überein mit dem Wert von Zahn et al. (2002), der bei 5,48 ± 0,12 liegt. Klemt (2005) und Schmalenbach (2005) bestimmten in [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimenten signifikant größere pEC₅₀-Werte (Klemt: 6,43 ± 0,03; Schmalenbach: 6,35 ± 0,09). Auch eine Literaturrecherche ergab eine relativ große Streuung der Werte für die Wirksamkeit von Pilocarpin am M₂-Rezeptor: In Organbadversuchen mit isolierten Meerschweinchen-Herzvorhöfen bestimmten Zahn et al. (2002) einen Wert von pEC₅₀ = 6,10 ± 0,03. Dong et al. (1995) ermittelten in [³H]NMS-Bindungsexperimenten an Sf9-Insektzellen einen pK_I von 5,78 ± 0,08. McKinney et al. (1991) bestimmten die Wirksamkeit von Pilocarpin durch die Inhibition der Bildung von cAMP mit pEC₅₀ = 5,0. Chronotropie-Messungen an atrialen, embryonalen Kardiomyozyten ergaben einen pEC₅₀-Wert von 4,99 ± 0,03 (n = 3) (mündliche Mitteilung, Wiebke Seemann).

3.2.2.7 McN-A-343-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung

Es wurde der konzentrationsabhängige Effekt von McN-A-343 (Strukturformel siehe Seite 36) mit dem von Acetylcholin verglichen (Abbildung 18). Ebenso wie Pilocarpin erwies sich McN-A-343 als Partialagonist. Der Maximaleffekt war mit 52 ± 1 % signifikant geringer als der von Acetylcholin (t-Test, p < 0,05). Auch der Wendepunkt der McN-A-343-Kurve unterschied sich signifikant (pEC₅₀ = 5,56 ± 0,04; t-Test, p < 0,05).

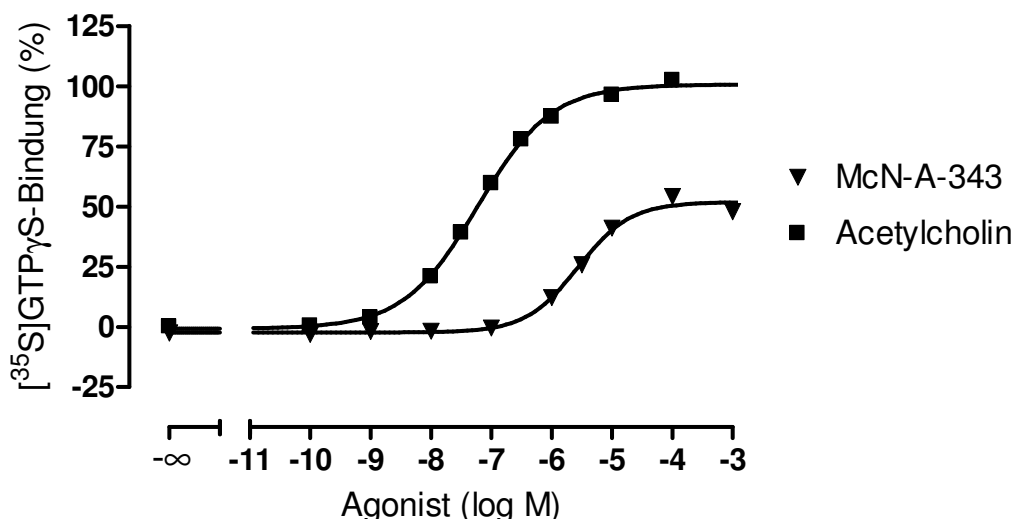


Abbildung 18: Vergleich von Mc-N-A-343- und Acetylcholin-induzierter [³⁵S]GTPγS-Bindung an Membransuspensionen aus Flp-CHO-M₂-Zellen. **Ordinate:** Prozentuale [³⁵S]GTPγS-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Vollagonist-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), konstanter Hill-Koeffizient von n_H = 1 für Mc-N-A-343; signifikanter Unterschied des Hill-Koeffizienten von n_H = 1 (F-Test, p < 0,05), Acetylcholin: n_H = 0,71 ± 0,03. **Datenpunkte:** Mittelwerte ± Standardfehler aus sechs (Mc-N-A-343) bzw. neun (Acetylcholin) voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC ₅₀	Basalwert (%)	E _{max} (%)	n _H (frei)	n
Mc-N-A-343	5,56 ± 0,04*	-2 ± 1	52 ± 1*	1,10 ± 0,04	6
Acetylcholin	7,23 ± 0,03	-1 ± 1	101 ± 1	0,71 ± 0,3 [#]	9

Tabelle 17: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Mc-N-A-343- und Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 18. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von n_H = 1 für Mc-N-A-343 und auf einer Kurvenanpassung mit freilaufendem Hill-Koeffizienten für Acetylcholin. **pEC₅₀:** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung hervorruft. **Basalwert:** Basale, Agonist-unabhängige [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{max}:** Maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden Acetylcholin-Kenngröße (t-Test, p < 0,05)

[#] signifikant bessere Anpassung mit variablem Hill-Koeffizienten (F-Test, p < 0,05)

Der im Rahmen dieser Arbeit gefundene pEC₅₀-Wert liegt in der gleichen Größenordnung wie der Wert von Schmalenbach (2007): pEC₅₀ = 5,83 ± 0,06. Literaturdaten für die Wirksamkeit von McN-A-343 am muskarinischen M₂-Rezeptor wichen von dem Wert dieser Arbeit ab (t-Test, p < 0,05): 4,76 (McKinney et al., 1991; Inhibition von cAMP); 4,8 (Elnatan und Mitchelson, 1993; Organbadversuche an Meerschweinchen-Herzvorhöfen); 4,64 (Dong et al., 1995; [³H]NMS Bindungsexperimente).

3.2.3 Von Agonisten abgeleitete dualsterische Testsubstanzen

Das Konzept der dualsterischen Testsubstanzen (siehe 1.3) beinhaltet eine Verknüpfung von orthosterischen und allosterischen Molekülbausteinen mit dem Ziel neue Möglichkeiten für das Design muskarinischer Liganden zu eröffnen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden von verschiedenen orthosterischen Agonisten abgeleitete Hybride mit Hilfe von [35 S]GTP γ S-Bindungsexperimenten auf agonistische Eigenschaften hin untersucht.

3.2.3.1 Hybride aus Iperoxo und allosterischen Modulatoren

3.2.3.1.1 Hybrid 1-induzierte [35 S]GTP γ S-Bindung

Der Agonist-Anteil des Hybrid 1 (Strukturformel siehe Seite 40) leitet sich von Iperoxo ab, das sich sowohl in [35 S]GTP γ S-Bindungsexperimenten (siehe 3.2.2.3) als auch in Organbadversuchen (Dallanoce et al., 1999) als Vollagonist mit hoher Wirksamkeit erwiesen hatte. In Abbildung 19 ist die Hybrid 1-Konzentrations-Effekt-Kurve im Vergleich zur orthosterischen Muttersubstanz Iperoxo dargestellt. Die Kenngrößen beider Kurven sind in Tabelle 18 wiedergegeben.

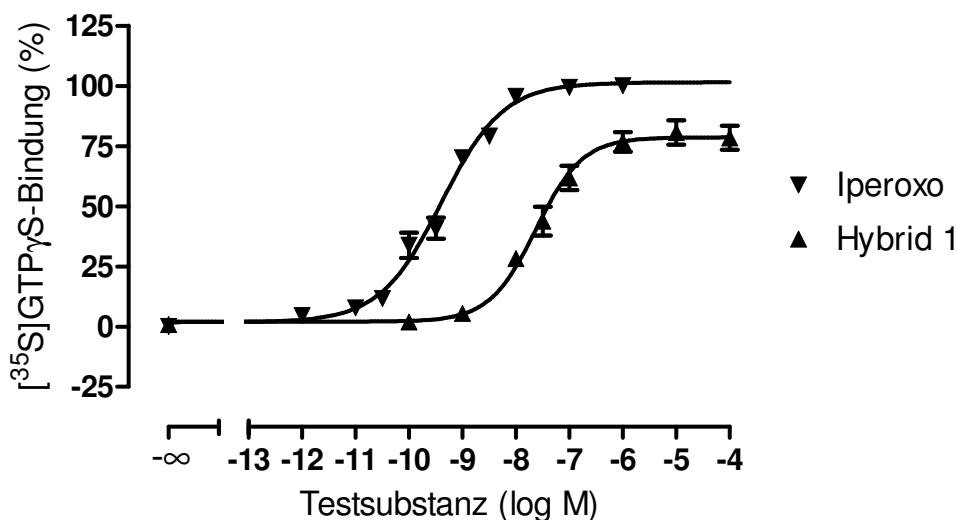


Abbildung 19: Vergleich von Hybrid 1- und Iperoxo-induzierter [35 S]GTP γ S-Bindung an Membransuspensionen aus Flp-CHO-M₂-Zellen. **Ordinate:** Prozentuale [35 S]GTP γ S-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Vollagonist-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = 1$ (Hybrid 1); signifikanter Unterschied des Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$ (F-Test, $p < 0,05$), Iperoxo: $n_H = 0,75 \pm 0,06$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus fünf (Hybrid 1) bzw. sieben (Iperoxo) voneinander unabhängigen Experimenten, die als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC ₅₀	Basalwert (%)	E _{max} (%)	n _H (frei)	n
Hybrid 1	7,63 ± 0,07*	2 ± 2	79 ± 2*	0,82 ± 0,13	5
Iperoxo	9,40 ± 0,06	2 ± 2	101 ± 2	0,75 ± 0,06 [#]	7

Tabelle 18: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Hybrid 1- und Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 19. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von n_H = 1 für Hybrid 1 und auf einer Kurvenanpassung mit freilaufendem Hill-Koeffizienten für Iperoxo. **pEC₅₀:** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung hervorruft. **Basalwert:** Basale, Agonist-unabhängige [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{max}:** Maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden Iperoxo-Kenngröße (t-Test, p < 0,05)

signifikant bessere Anpassung mit variablem Hill-Koeffizienten (F-Test, p < 0,05)

Die Hybride, die als orthosterischen Molekülteil Iperoxo enthalten, wurden bereits von Kellershohn (2007) und Schmalenbach (2005) untersucht. In den Dissertationsschriften ist die Substanz unter der Bezeichnung DDT5 zu finden. Der in dieser Arbeit gefundene pEC₅₀-Wert von 7,63 ± 0,07 unterscheidet sich signifikant (t-Test, p < 0,05) von den, von Kellershohn (7,96 ± 0,04, n = 5) und Schmalenbach (8,05 ± 0,12, n = 2) gefundenen Werten. Im Vergleich mit der Muttersubstanz Iperoxo wurde jedoch ebenfalls eine signifikante Abnahme der Wirksamkeit durch die Hybridformation gefunden. Ebenfalls auffällig ist die Diskrepanz der Ergebnisse in Bezug auf die intrinsische Aktivität der Hybrid-Substanz. Frühere Arbeiten wie die Dissertationsschriften von Kellershohn (2007) und Schmalenbach (2005) charakterisierten Hybrid 1 als Vollagonisten. Im Gegensatz dazu lagen bei den Untersuchungen dieser Arbeit (siehe auch 3.5.4.3) die oberen Plateaus der Konzentrations-Effekt-Kurven signifikant unter denen der Vollagonisten Acetylcholin und Iperoxo.

3.2.3.1.2 Hybrid 2-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung

Entsprechend der Hybridverbindung Hybrid 1 (3.2.3.1.1) leitet sich der Agonist-Anteil des Hybrid 2 (Strukturformel siehe Seite 40) ebenfalls von Iperoxo ab. In Abbildung 20 ist die Konzentrations-Effekt-Kurve des Hybrid 2 im Vergleich zur Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurve dargestellt. Die entsprechenden Kenngrößen sind Tabelle 19 zu entnehmen.

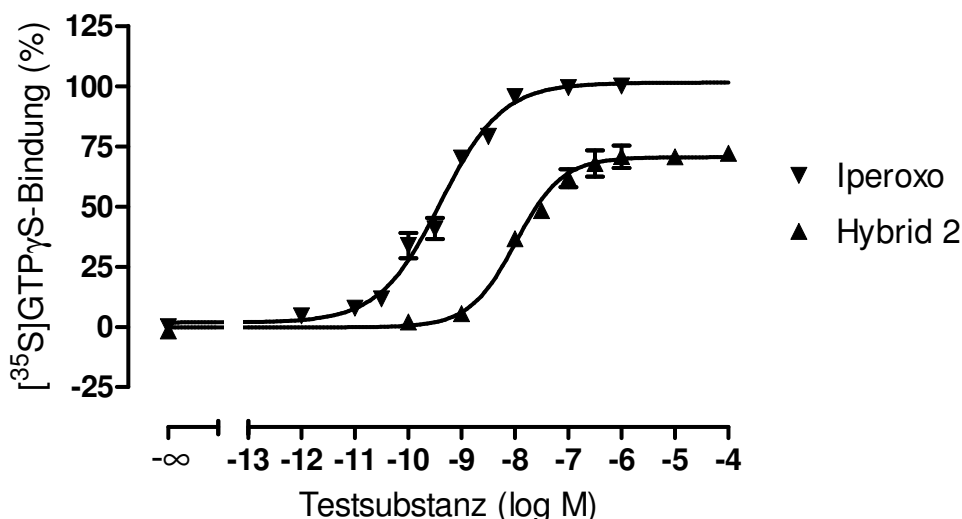


Abbildung 20: Vergleich von Hybrid 2- und Iperoxo-induzierter $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung an Membransuspensionen aus Flp-CHO- M_2 -Zellen. **Ordinate:** Prozentuale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Vollagonist-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = 1$ (Hybrid 2); signifikanter Unterschied des Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$ (F-Test, $p < 0,05$), Iperoxo: $n_H = 0,75 \pm 0,06$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus sechs (Hybrid 2) bzw. sieben (Iperoxo) voneinander unabhängigen Experimenten, die als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC₅₀	Basalwert (%)	E_{max} (%)	n_H (frei)	n
Hybrid 2	$7,98 \pm 0,06^*$	0 ± 2	$70 \pm 1^*$	$0,85 \pm 0,11$	6
Iperoxo	$9,40 \pm 0,06$	2 ± 2	101 ± 2	$0,75 \pm 0,06^\#$	7

Tabelle 19: Kenngrößen \pm Standardfehler der gemittelten Hybrid 2- und Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 20. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$ für Hybrid 2 und auf einer Kurvenanpassung mit freilaufendem Hill-Koeffizienten für Iperoxo. **pEC₅₀:** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung hervorruft. **Basalwert:** Basale, Agonist-unabhängige $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{max}:** Maximale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden Iperoxo-Kenngröße (t-Test, $p < 0,05$)

signifikant bessere Anpassung mit variablem Hill-Koeffizienten (F-Test, $p < 0,05$)

Die Hybrid-Bildung führte auch beim Hybrid 2 mit einem pEC₅₀-Wert von $7,98 \pm 0,06$ zu einer signifikanten Abnahme der Wirksamkeit im Vergleich zu Iperoxo (t-Test, $p < 0,05$). Analog zu Hybrid 1 wurde auch das Hybrid 2 schon von Kellershohn (2007) und Schmalenbach (2005) untersucht. In den Dissertationsschriften ist die Substanz unter der Bezeichnung MMH5-6 zu finden. Der in dieser Arbeit gefundene pEC₅₀-Wert von $7,98 \pm 0,06$ unterscheidet sich signifikant (t-Test, $p < 0,05$) von den von Kellershohn ($8,29 \pm 0,05$, $n = 5$) und Schmalenbach ($8,29 \pm 0,12$, $n = 2$) gefundenen Werten. Die hier gefundene Wirksamkeit ist, wie auch im Fall des Hybrid 1, um 0,3 Dekaden geringer. Auch der zuvor für Hybrid 2

gefundene vollagonistische Effekt konnte nicht bestätigt werden. Die maximale [^{35}S]GTP γ S-Bindung, definiert durch das obere Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve der Testsubstanz, liegt bei 70 % der maximalen Rezeptoraktivierung.

3.2.3.2 Hybride aus Methylperoxo und allosterischen Modulatoren

3.2.3.2.1 MF-1-induzierte [^{35}S]GTP γ S-Bindung

Der Agonist-Anteil des Hybrids MF-1 (Strukturformel siehe Seite 40) leitet sich von Methylperoxo (MIO) ab, das sich in [^{35}S]GTP γ S-Bindungsexperimenten (siehe 3.2.2.5) als Vollagonist erwiesen hatte. Die Wirksamkeit von MIO unterschied sich nicht signifikant von Acetylcholin. MF-1 ist somit strukturell das Methyl-Analogon zu Hybrid 1. Acetylcholin wurde an jedem Versuchstag als Kontrolle mitgeführt. In Abbildung 21 ist der Effekt von MF-1 im Vergleich zur Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve dargestellt.

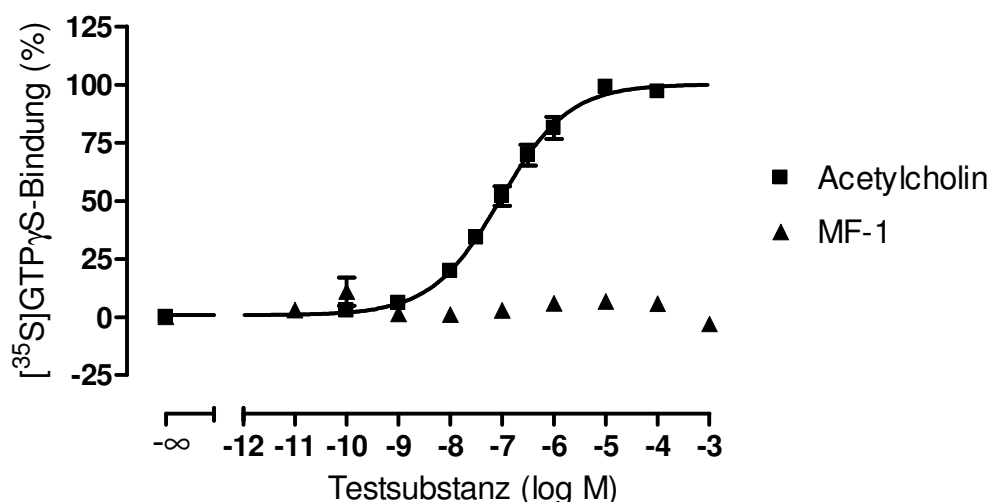


Abbildung 21: Vergleich von MF-1- und Acetylcholin-induzierter [^{35}S]GTP γ S-Bindung an Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen. **Ordinate:** Prozentuale [^{35}S]GTP γ S-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), signifikanter Unterschied der Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$ (F-Test, $p < 0,05$), Acetylcholin: $n_H = 0,65 \pm 0,05$. MF-1: keine Kurvenanpassung möglich. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

Die [^{35}S]GTP γ S-Bindung, die in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen des Hybrids MF-1 bestimmt wurde, unterschied sich nicht signifikant von der basalen [^{35}S]GTP γ S-Bindung. Im untersuchten Konzentrationsbereich besaß MF-1 demnach keine agonistische Aktivität am M₂-Rezeptor.

3.2.3.2.2 MF-2-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung

Auch der Agonist-Anteil des Hybrids MF-2 (Strukturformel siehe Seite 40) leitet sich von Methylperoxo (MIO) ab und stellt strukturell das Methyl-Analogon zu Hybrid 2 dar. In Abbildung 22 ist der Effekt von MF-2 im Vergleich zur Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve abgebildet.

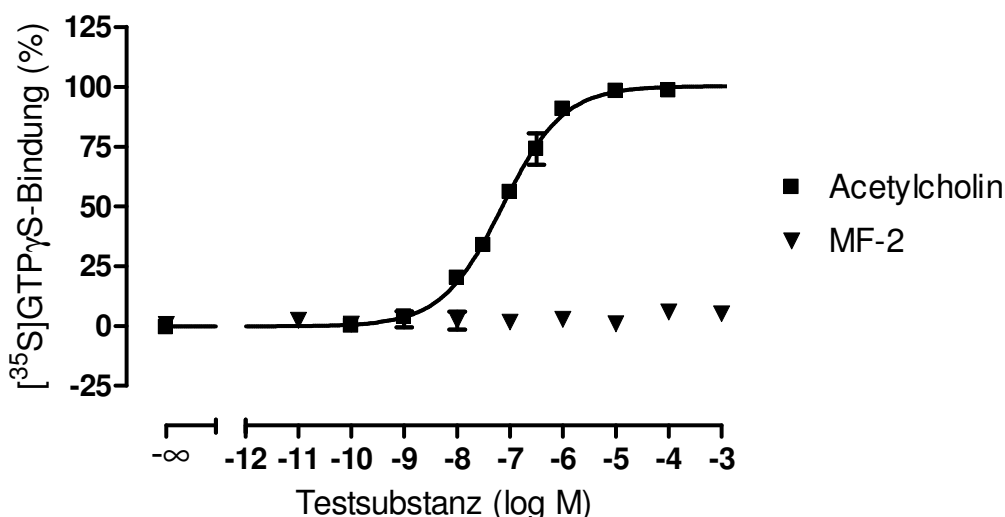


Abbildung 22: Vergleich von MF-2- und Acetylcholin-induzierter [³⁵S]GTPγS-Bindung an Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen. **Ordinate:** Prozentuale [³⁵S]GTPγS-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), signifikanter Unterschied der Hill-Koeffizienten von n_H = 1 (F-Test, p < 0,05), Acetylcholin: n_H = 0,75 ± 0,05. MF-2: keine Kurvenanpassung möglich. **Datenpunkte:** Mittelwerte ± Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

Analog zu MF-1 war die [³⁵S]GTPγS-Bindung in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen des Hybrids MF-2 nicht signifikant verschieden von der basalen [³⁵S]GTPγS-Bindung. Im untersuchten Konzentrationsbereich besaß MF-2 demnach keine agonistische Aktivität am M₂-Rezeptor.

3.2.3.3 Hybride aus McN-A-343 und allosterischen Modulatoren

3.2.3.3.1 MG-1-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung

Der Agonist-Anteil des Hybrids MG-1 (Strukturformel siehe Seite 41) leitet sich von McN-A-343 ab, das sich in [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimenten (siehe 3.2.2.7) als Partialagonist gezeigt hatte. In Abbildung 23 ist der Effekt steigender MG-1 Konzentrationen im Vergleich zur Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve dargestellt.

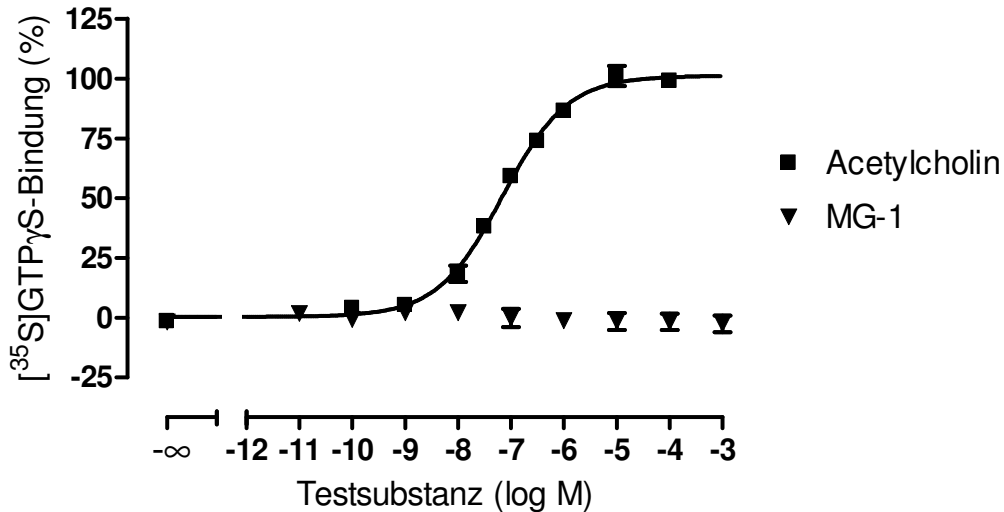


Abbildung 23: Vergleich von MG-1- und Acetylcholin-induzierter $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung an Membransuspensionen aus CHO- M_2 -Zellen. **Ordinate:** Prozentuale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), signifikanter Unterschied der Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$ (F-Test, $p < 0,05$), Acetylcholin: $n_H = 0,71 \pm 0,05$. MG-1: keine Kurvenanpassung möglich. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

Die $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung, die in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen des Hybrids MG-1 bestimmt wurde, unterschied sich nicht signifikant von der basalen $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung. Die Verknüpfung des Partialagonisten McN-A-343 mit einem halben Molekül W84 führte zum vollständigen Verlust der intrinsischen Aktivität.

3.2.3.3.2 MG-2-induzierte $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung

Auch die Testsubstanz MG-2 (Strukturformel siehe Seite 41) leitet sich von McN-A-343 ab. Es handelt sich um das Hybrid aus McN-A-343 und einem Baustein des allosterischen Modulators Naphmethonium, analog zu Hybrid 2. In Abbildung 24 ist der Effekt von MG-2 im Vergleich zur Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve dargestellt.

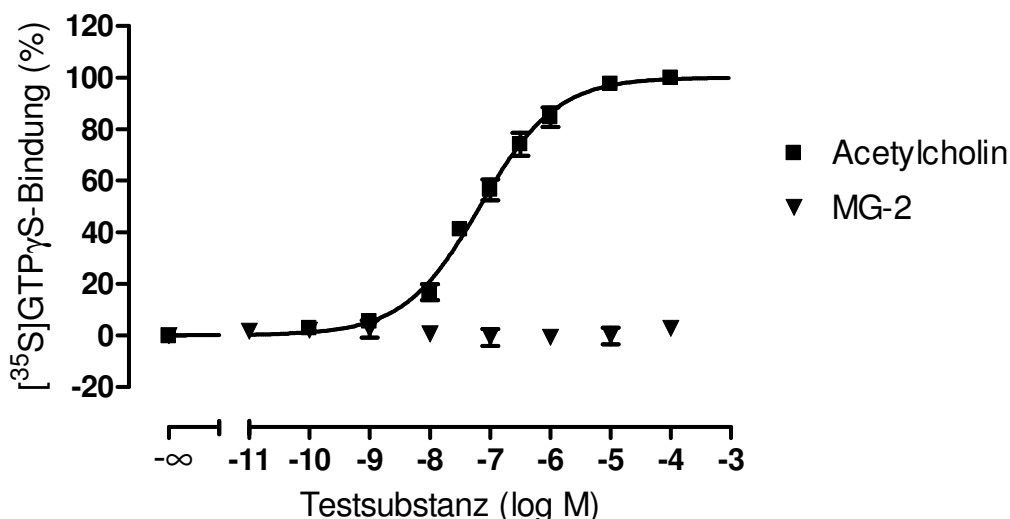


Abbildung 24: Vergleich von MG-2- und Acetylcholin-induzierter $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung an Membransuspensionen aus CHO- M_2 -Zellen. **Ordinate:** Prozentuale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung, 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), signifikanter Unterschied der Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$ (F-Test, $p < 0,05$), Acetylcholin: $n_H = 0,69 \pm 0,06$. MG-2: keine Kurvenanpassung möglich. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

Analog zum W 84 Derivat von McN-A-343 zeigte auch die Testsubstanz MG-2 keine $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung, die signifikant verschieden war von der Agonist-unabhängigen, basalen Bindung.

3.3 Einfluss verschiedener Epitope des M_2 -Rezeptors auf die G-Protein-Aktivierung

In Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals der Einfluss verschiedener Epitope des M_2 -Rezeptors auf Ebene der G-Protein-Aktivierung untersucht. Die funktionelle Bedeutung verschiedener Aminosäuren der orthosterischen bzw. allosterischen Bindungsstelle, die sich zuvor in Bindungsstudien als wichtige Interaktionspartner der Testsubstanzen erwiesen hatten (Dissertationsschrift Mohr, 2006; Prilla et al., 2006; Jäger et al., 2008), sollte aufgeklärt werden. Zunächst wurden hierzu Membranhomogenate aus transient mit dem M_2 -Rezeptor bzw. der entsprechenden Rezeptor-Mutante transfizierten CHO-Zellen benutzt. Durch die, im Rahmen dieser Arbeit neu generierten, stabil transfizierten Flp-CHO-Zelllinien konnten jedoch bald effizientere Messungen durchgeführt werden.

Für den Vergleich der Membranhomogenate der verschiedenen Rezeptormutanten mit dem M_2 -Wildtyp wurde die eingesetzte Menge an Zellmembransuspension nach Proteingehalt

bestimmt (Proteinkonzentration: 40 µg/ml). Diese Bezugsgröße wurde gewählt, da die gemessene [³⁵S]GTPγS-Akkumulation als Maß für die Rezeptoraktivierung nicht nur von der Anzahl der Rezeptoren sondern auch von der Menge der vorhandenen G-Proteine abhängt. Auch in der Literatur (Valant et al., 2008) ist die Verwendung dieser Bezugsgröße bei Vergleich von Homogenaten aus verschiedenen Zelllinien (M₂-Wildtyp und Mutanten des M₂-Rezeptors) gewählt.

3.3.1 Untersuchungen zum Einfluss des Epitops M₂⁴²²Trp auf die G-Protein-Aktivierung am M₂-Rezeptor

Das Schlüsselepitop der allosterischen Bindungsstelle ist M₂⁴²²Trp in Position 7.35 (Nomenklatur nach Ballesteros und Weinstein, 1992). Die Aminosäure ist konserviert zwischen den fünf Muskarinrezeptorsubtypen. Prilla (2007) konnte in ihrer Dissertationsschrift durch Bindungsexperimente zeigen, dass von der Wechselwirkung mit diesem Epitop sowohl Basisaffinität als auch Subtypselektivität sowie Effektivität und Kooperativität der allosterischen Interaktion abhängen. Mit den folgenden Untersuchungen sollte die funktionelle Bedeutung der Aminosäure M₂⁴²²Trp für die orthosterische und dualsterische Rezeptoraktivierung aufgeklärt werden.

3.3.1.1 [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimente mit transient transfizierten M₂⁴²²Trp→Ala-Rezeptoren im Vergleich zum M₂-Wildtyp

In ersten [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimenten wurden die transient exprimierte M₂-Wildtyp bzw. M₂⁴²²Trp→Ala Rezeptoren (transiente Transfektion, siehe 2.5.5.1), vorliegend als Membranhomogenate (Membranpräparation, siehe 2.5.3) bezüglich der G-Protein-Aktivierung untersucht.

3.3.1.1.1 Einfluss sättigender Konzentrationen verschiedener Liganden auf die [³⁵S]GTPγS-Bindung an M₂⁴²²Trp→Ala-Rezeptoren

Abbildung 25 zeigt den Einfluss rezeptorsättigender Konzentrationen der bereits in 3.2.1 beschriebenen Liganden. Es sollte festgestellt werden, ob die Testsubstanzen sich bezüglich der G-Protein-Aktivierung an M₂⁴²²Trp→Ala-Rezeptoren vom M₂-Wildtyp unterscheiden.

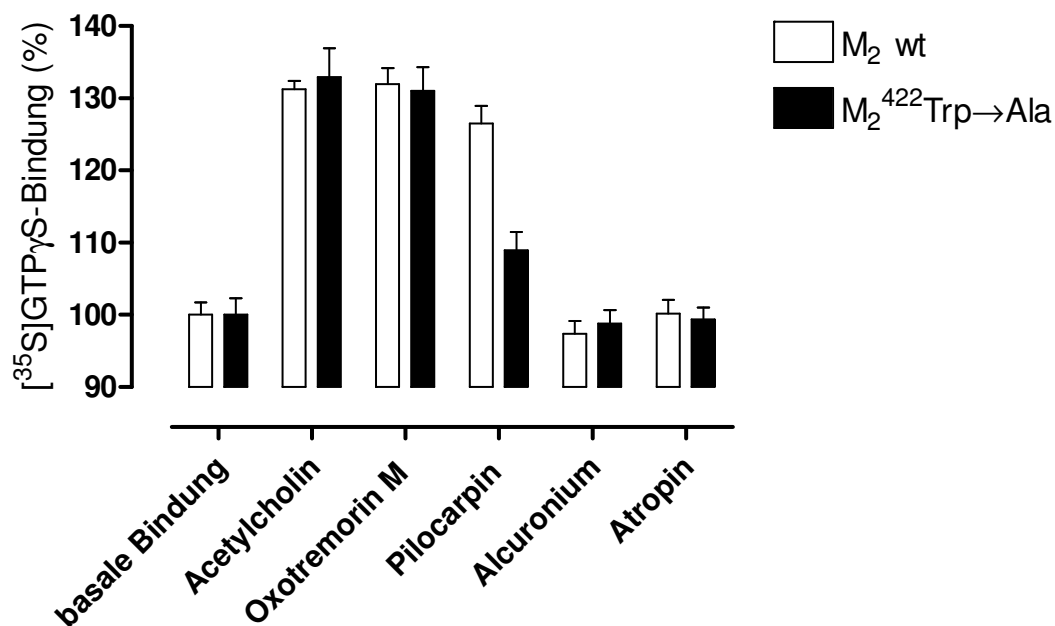


Abbildung 25: Effekte rezeptorsättigender Konzentrationen muskarinischer Liganden auf die [³⁵S]GTPγS-Bindung an Membransuspensionen aus transient mit der M₂-Wildtyp-cDNA (M₂ wt) bzw. mit der punktmultierten Rezeptor-cDNA M₂⁴²²Trp→Ala transfizierten CHO-K1-Zellen. **Ordinate:** [³⁵S]GTPγS-Bindung in Prozent der basalen Bindung. **Abszisse:** Testsubstanzen: Acetylcholin 0,1 mM, Oxotremorin M 0,1 mM, Pilocarpin 1 mM, Alcuronium 0,1 mM, Atropin 0,001 mM. **Balken:** Mittelwerte ± Standardfehler aus 16-32 Einzelwerten, aus zwei bis vier voneinander unabhängigen Experimenten.

	Basale Bindung	Acetylcholin (0,1 mM)	Oxotremorin M (0,1 mM)	Pilocarpin (1 mM)	Alcuronium (0,1 mM)	Atropin (0,001 mM)
M ₂ wt	100 ± 2	131 ± 1*	132 ± 2*	126 ± 2*	97 ± 2	97 ± 2
M ₂ ⁴²² Trp→Ala	100 ± 2	133 ± 4*	131 ± 3*	109 ± 2 [#]	99 ± 2	99 ± 2

Tabelle 20: Effekte rezeptorsättigender Konzentrationen muskarinischer Liganden auf die [³⁵S]GTPγS-Bindung an Membransuspensionen aus transient mit der M₂-Wildtyp-cDNA (M₂ wt) bzw. mit der punktmultierten Rezeptor-cDNA M₂⁴²²Trp→Ala transfizierten CHO-K1-Zellen. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 16-32 Einzelwerten, aus zwei bis vier voneinander unabhängigen Experimenten.

* signifikanter Unterschied zur basalen [³⁵S]GTPγS-Bindung (t-Test, p < 0,05)

signifikanter Unterschied zur [³⁵S]GTPγS-Bindung am M₂-Wildtyp (t-Test, p < 0,05)

Am transient exprimierten M₂-Wildtyp zeigten die Testsubstanzen das gleiche Muster der G-Protein-Aktivierung wie bei Untersuchung der Homogenate von stabil transfizierten Zellen (siehe Abbildung 11). Jedoch war nur eine maximale Steigerung der G-Protein-Bindung von ca. 30 %-Punkten gegenüber der basalen [³⁵S]GTPγS-Bindung in Abwesenheit eines Liganden, die auf 100 % festgesetzt wurde, möglich. Das „Messfenster“ war somit im Vergleich mit der Agonist-induzierten Steigerung der G-Protein-Aktivierung an stabil transfizierten Zellen, die im Bereich 100-300 %-Punkte lag, stark verkleinert.

Der Effekt der Vollagonisten Acetylcholin und Oxotremorin M unterschied sich nicht signifikant zwischen der untersuchten Rezeptormutante M₂⁴²²Trp→Ala und dem M₂-Wildtyp.

Im Gegensatz dazu war der maximale Effekt des Partialagonisten Pilocarpin (1 mM) stark reduziert (von $126 \% \pm 2$ am Wildtyp auf $109 \% \pm 2$) und unterschied sich nicht signifikant von der Agonist-unabhängigen [^{35}S]GTP γ S-Bindung. Der Effekt von Atropin und Alcuronium führte in beiden untersuchten Homogenaten zu keiner signifikanten Änderung der basalen Bindung.

3.3.1.1.2 Einfluss des Epitops $\text{M}_2^{422}\text{Trp}$ auf die Acetylcholin-induzierte [^{35}S]GTP γ S-Bindung

Der Konzentrations-Effekt-Kurve des endogenen Liganden Acetylcholin am M_2 -Wildtyp im Vergleich zur $\text{M}_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptormutante ist in Abbildung 26 gezeigt. Im Unterschied zum stabilen Expressionssystem (M_2 -Wildtyp, Acetylcholin siehe Abbildung 12) fällt eine deutlich höhere Streuung der einzelnen Messwerte innerhalb der Vierfachbestimmung auf. Der hier bestimmte pEC_{50} -Wert unterscheidet sich jedoch nicht signifikant vom Wert, der mit den stabil transfizierten Zellen bestimmt wurde ($7,23 \pm 0,03$).

Zusätzlich war die unspezifische Bindung (siehe Abbildung 27) stark erhöht, was zu einer Reduzierung der Agonist-vermittelten [^{35}S]GTP γ S-Bindung führte. Eine Ursache hierfür könnten sich im Homogenat befindliche Reste des positiv geladenen Transfektionsreagenzes sein, die einen Teil des durch die Phosphatgruppen negativ geladenen [^{35}S]GTP γ S über Kation-Anion-Wechselwirkung binden. Hiermit könnte auch der Unterschied zu der niedrigeren unspezifischen Bindung bei den Homogenaten aus stabil transfizierten Zellen erklärt werden, die aus dem gleichen Zellsystem (CHO-Zellen) angefertigt wurden.

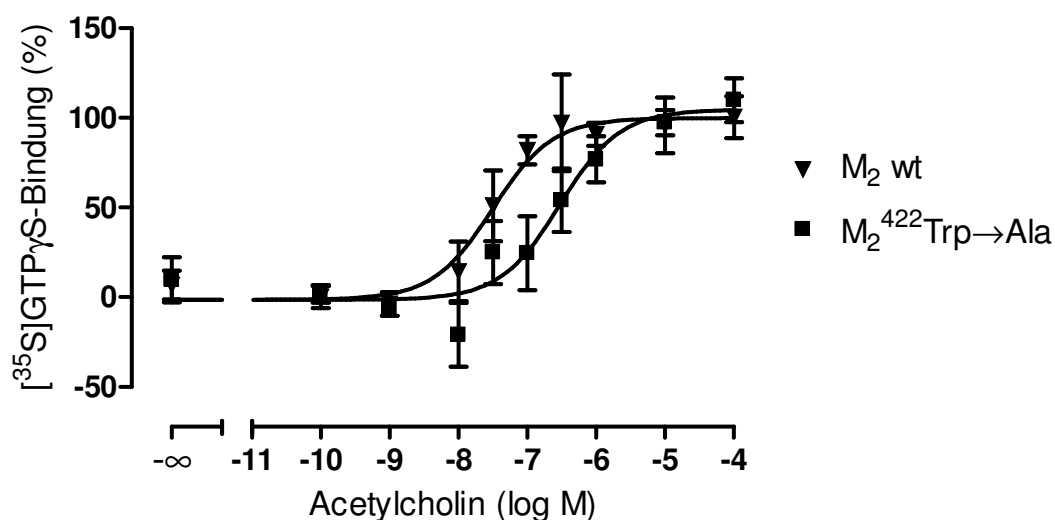


Abbildung 26: Vergleich von Acetylcholin-induzierter [³⁵S]GTPγS-Bindung an Membransuspensionen aus transient mit der M₂-Wildtyp-cDNA (M₂ wt) bzw. mit der punktmutierten Rezeptor-cDNA M₂⁴²²Trp→Ala transfizierten CHO-K1-Zellen. **Ordinate:** Prozentuale [³⁵S]GTPγS-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), konstanter Hill-Koeffizient von n_H = 1. **Datenpunkte:** Mittelwerte ± Standardfehler aus vier (M₂ wt) bzw. drei (M₂⁴²²Trp→Ala) voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC ₅₀	Basalwert (%)	E _{max} (%)	n _H (frei)	n
M ₂ wt	7,51 ± 0,20	-1 ± 8	100 ± 7	1,58 ± 0,77	4
M ₂ ⁴²² Trp→Ala	6,53 ± 0,20*	-1 ± 6	105 ± 10	0,89 ± 0,37	3

Tabelle 21: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 26. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von n_H = 1. **pEC₅₀:** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung hervorruft. **Basalwert:** Basale, Agonist-unabhängige [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{max}:** Maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden M₂-Wildtyp-Kenngröße (t-Test, p < 0,05)

Die Wirksamkeit (pEC₅₀-Wert) von Acetylcholin war am punktmutierten Rezeptor M₂⁴²²Trp→Ala um eine Dekade niedriger als am M₂-Wildtyp und wurde somit durch die Mutation signifikant herabgesetzt (t-Test, p < 0,05). Die intrinsische Aktivität des Vollagonisten blieb jedoch erhalten, die oberen Plateaus unterschieden sich nicht voneinander. Im Vergleich mit Bindungsdaten aus heterologen Kompetitions-Experimenten mit Acetylcholin und dem Radioantagonisten [³H]N-Methylscopolamin zeigt sich eine Übereinstimmung der Befunde (Jäger et al., 2007): Die apparente Affinität des Agonisten wurde durch Punktmutation des Epitops M₂⁴²²Trp→Ala signifikant um ca. eine Dekade vermindert.

3.3.1.1.3 Einfluss des Epitops M₂⁴²²Trp auf die Pilocarpin-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung

Eine repräsentative Konzentrations-Effekt-Kurve des Partialagonisten Pilocarpin am M₂-Wildtyp, im Vergleich zur M₂⁴²²Trp→Ala-Rezeptormutante, ist in Abbildung 27 gezeigt. Auf Grund der allgemein sehr hohen Streuung und der unterschiedlich stark abweichenden Absenkung des unteren Plateaus bei der Mutante war eine Mittelung der Versuchstage nicht möglich (siehe hierzu auch 3.2.1 und 3.3.1.2). Eine Validierung des gezeigten beispielhaften Einzelversuchs (in Vierfachbestimmung) erfolgte über die später durchgeführten Versuche mit stabil transfizierten Zellen. Der hier bestimmte pEC₅₀-Wert von Pilocarpin (6,02 ± 0,20)

unterscheidet sich nicht signifikant vom Wert, der mit den stabil transfizierten Zellen bestimmt wurde ($5,86 \pm 0,11$).

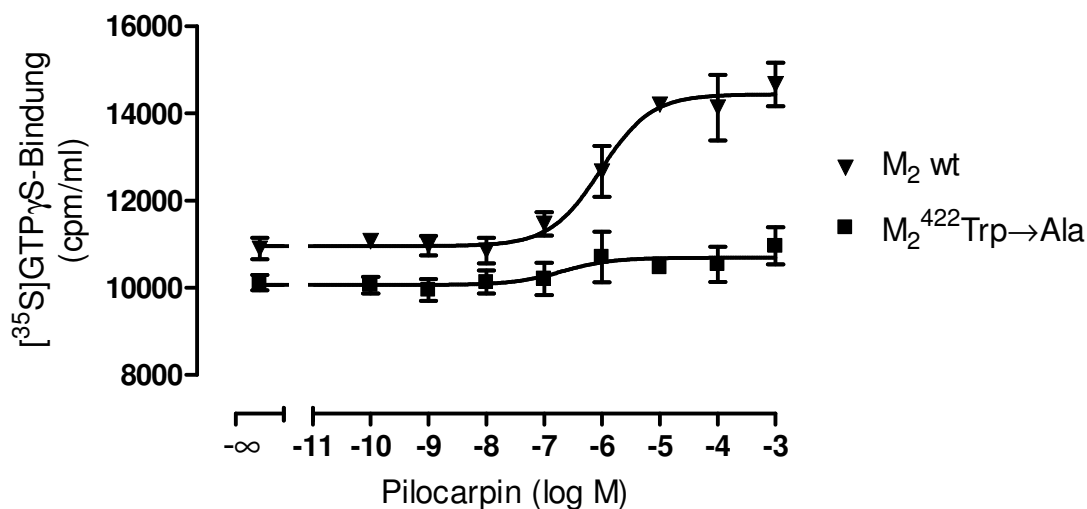


Abbildung 27: Vergleich von Pilocarpin-induzierter [^{35}S]GTP γ S-Bindung an Membransuspensionen aus transient mit der M_2 -Wildtyp-cDNA (M_2 wt) bzw. mit der punktmutierten Rezeptor-cDNA $M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ transfizierten CHO-K1-Zellen. **Ordinate:** [^{35}S]GTP γ S-Bindung in cpm/ml. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = 1$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus einem Experiment, das als Vierfachbestimmung durchgeführt wurde. Zwei Wiederholungen zeigten gleichartige Ergebnisse.

	pEC ₅₀	Basalwert (cpm/ml)	E _{max} (cpm/ml)	n _H (frei)	n
M_2 wt	$6,02 \pm 0,20$	10960 ± 162	14441 ± 241	$0,86 \pm 0,37$	1
$M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$	$6,68 \pm 0,96$	$10067 \pm 145^*$	$10691 \pm 178^*$	$-0,27 \pm 0,57$	1

Tabelle 22: Kenngrößen \pm Standardfehler der repräsentativen Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 27. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$. **pEC₅₀:** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [^{35}S]GTP γ S-Bindung hervorruft. **Basalwert:** Basale, Agonist-unabhängige [^{35}S]GTP γ S-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{max}:** Maximale [^{35}S]GTP γ S-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden M_2 -Wildtyp-Kenngröße (t-Test, $p < 0,05$)

Die Wirksamkeit von Pilocarpin lag am M_2 -Wildtyp-Rezeptor und bei der Punktmutante $M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ in der gleichen Größenordnung. Die intrinsische Aktivität des Partialagonisten ist durch die Mutation jedoch auf ein Minimum reduziert. Oberes und unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (t-Test, $p < 0,05$). Pilocarpin hat im untersuchten Konzentrationsbereich demnach keine agonistische Aktivität am $M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptor mehr.

3.3.1.2 [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimente mit stabil transfizierten M₂⁴²²Trp→Ala-Rezeptoren

Zur Optimierung der [³⁵S]GTPγS-Bindungsversuche und um die Ergebnisse aus Kapitel 3.3.1.1 zu bestätigen, wurden stabile Expressionszelllinien mit Hilfe des Flp-InTM-Systems generiert (siehe 2.5.5.2). Die zuvor mit Zellhomogenaten aus transient transfizierten Zellen durchgeführten Versuche sollten nun mit den Ergebnissen verglichen werden, die aus Versuchen mit stabil transfizierten Zellen stammen. In diesem robusteren Versuchssystem sollte zudem der Einfluss der Punktmutation M₂⁴²²Trp→Ala auf den Effekt weiterer Testsubstanzen untersucht werden.

Bei Auswertung der Versuche zu den Unterpunkten dieses Kapitels ergab sich die Schwierigkeit von Versuchstag-abhängigen Unterschieden bezüglich der konstitutiven Aktivität der untersuchten M₂-Rezeptoren und punktmultierten M₂⁴²²Trp→Ala-Rezeptoren. Wie die folgenden Ergebnisse zeigen, war die Fähigkeit zur Spontanaktivierung bei den Wildtyprezeptoren sehr viel stärker ausgeprägt und ging durch Austausch des Epitops M₂⁴²²Trp→Ala verloren. Eine zusammenfassende Normierung und Mittelung der Ergebnisse mit Bezug auf den Wildtyp war somit schwierig. Die Versuche wurden deshalb teils in zwei Versuchsreihen (Versuche mit bzw. ohne vorhandene konstitutive Aktivität) unterteilt. Falls eine solche Unterteilung nicht klar möglich war und eine Mittelung der Versuche die Darstellung sehr stark verzerrte, wurden Einzelversuche abgebildet bei denen keine spontane Aktivität vorlag. (Zur Problematik der diskontinuierlich auftretenden konstitutiven Aktivität siehe auch 3.2.1 und 3.3.5.)

3.3.1.2.1 Einfluss sättigender Konzentrationen verschiedener Liganden auf die basale [³⁵S]GTPγS-Bindung an M₂⁴²²Trp→Ala-Rezeptoren

Analog zu Abbildung 25 zeigt Abbildung 28 den Einfluss rezeptorsättigender Konzentrationen der bereits in 3.2.1 beschriebenen Liganden. Es sollte festgestellt werden, ob die Testsubstanzen sich bezüglich der G-Protein-Aktivierung an M₂⁴²²Trp→Ala-Rezeptoren vom M₂-Wildtyp unterscheiden und ob sich, bezüglich des Musters der Effekte unterschiedlicher Liganden, Veränderungen gegenüber den transient transfizierten Zellen zeigen.

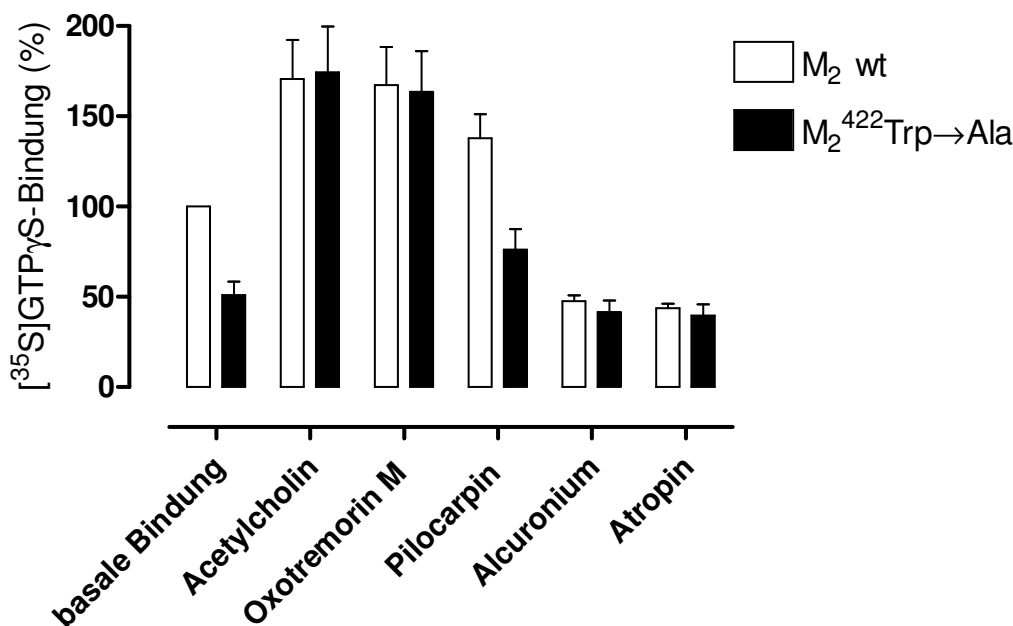


Abbildung 28: Effekte rezeptorsättigender Konzentrationen muskarinischer Liganden auf die [³⁵S]GTPγS-Bindung an Membransuspensionen aus Flp-CHO-M₂-Zellen und Flp-CHO-M₂⁴²²Trp→Ala-Zellen. **Ordinate:** [³⁵S]GTPγS-Bindung in Prozent der basalen Bindung (des M₂-Wildtyps). **Abszisse:** Testsubstanzen: Acetylcholin 0,1 mM, Oxotremorin M 0,1 mM, Pilocarpin 1 mM, Alcuronium 0,1 mM, Atropin 0,001 mM. **Balken:** Mittelwerte ± Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	Basale Bindung	Acetylcholin (0,1 mM)	Oxotremorin M (0,1 mM)	Pilocarpin (1 mM)	Alcuronium (0,1 mM)	Atropin (0,001 mM)
M ₂ wt	100	171 ± 22 [*]	167 ± 21 [*]	137 ± 13 [*]	47 ± 3 [*]	43 ± 3 [*]
M ₂ ⁴²² Trp→Ala	51 ± 7 [#]	174 ± 25 [*]	163 ± 23 [*]	76 ± 11 [#]	44 ± 3	40 ± 6

Tabelle 23: Effekte rezeptorsättigender Konzentrationen muskarinischer Liganden auf die [³⁵S]GTPγS-Bindung an Membransuspensionen aus Flp-CHO-M₂-Zellen und Flp-CHO-M₂⁴²²Trp→Ala-Zellen. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

* signifikanter Unterschied zur basalen [³⁵S]GTPγS-Bindung (t-Test, p < 0,05)

signifikanter Unterschied zur [³⁵S]GTPγS-Bindung am M₂-Wildtyp (t-Test, p < 0,05)

Die Agonist-unabhängige [³⁵S]GTPγS-Bindung wurde am punktmultierten Rezeptor M₂⁴²²Trp→Ala auf die Hälfte (51 ± 7) der Kontrolle reduziert. Am Wildtyp-Rezeptor zeigten der untersuchte allosterische Modulator und der Antagonist ein vergleichbares Ausmaß an G-Protein-Aktivierung (Alcuronium: 47 ± 3, Atropin: 43 ± 3), welches sich nicht signifikant von den Werten der untersuchten Rezeptormutante unterschied (Alcuronium: 44 ± 3, Atropin: 40 ± 6). Die Effekte dieser Testsubstanzen waren bei den Untersuchungen mit den Homogenaten aus transient transfizierten Zellen nicht detektierbar. Am Wildtyp entsprachen die Ergebnisse denen der ersten Versuchsreihe (siehe 3.2.1), wo an M₂-Wildtyp-Homogenaten ebenfalls eine Absenkung der basalen Bindung gefunden wurde.

Der Vollagonismus von Oxotremorin M und Acetylcholin wurde durch den Austausch des Tryptophans 7.35 nicht beeinflusst. Der Partialagonismus von Pilocarpin jedoch wurde sehr stark abgeschwächt, sodass am punktmutierten Rezeptor keine signifikante Steigerung der basalen [^{35}S]GTP γ S-Bindung durch die eingesetzte Konzentration von Pilocarpin möglich war. Diese Ergebnisse entsprechen denen zuvor an Homogenaten aus transient transfizierten Zellen erhobenen Daten (siehe 3.3.1.1.1).

3.3.1.2.2 Einfluss des Epitops $\text{M}_2^{422}\text{Trp}$ auf die Acetylcholin-induzierte [^{35}S]GTP γ S-Bindung

Analog zu den Versuchen an den Homogenaten aus transienten Zellen sollte der Effekt der Mutation auf die Konzentrations-Effekt-Kurve bestimmt werden. Die folgenden Abbildungen zeigen zwei Versuchsreihen und die zugehörigen Kenngrößen. Die Zuordnung der Versuche erfolgte wie auch unter 3.2.1 chronologisch. Die im Folgenden beschriebenen Unterschiede zeigten sich, obwohl alle Versuche unter den gleichen Versuchsbedingungen und nach dem gleichen Versuchsprotokoll (siehe 2.7.1.2) durchgeführt wurden. Die den unterschiedlichen Ergebnissen zu Grunde liegende Ursache konnte experimentell nicht identifiziert werden. Im Rahmen der durchgeführten Versuche konnte ein Einfluss durch die verwendete Membransuspension, die Charge an [^{35}S]GTP γ S oder die Testsubstanzen ausgeschlossen werden.

3.3.1.2.2.1 Erste Versuchsreihe

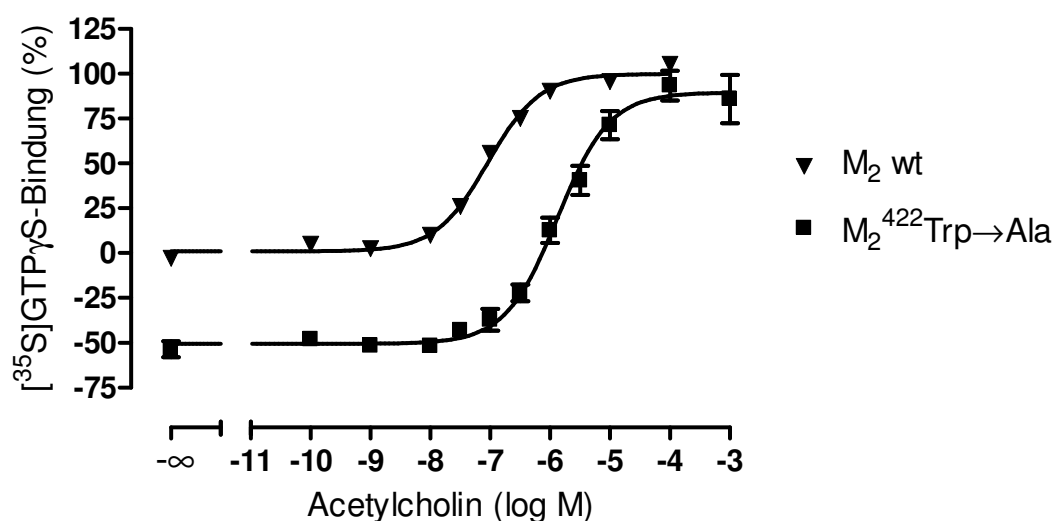


Abbildung 29: Vergleich von Acetylcholin-induzierter [^{35}S]GTP γ S-Bindung an Membransuspensionen aus Flp-CHO- M_2 -Zellen und Flp-CHO- $\text{M}_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Zellen. **Ordinate:** Prozentuale [^{35}S]GTP γ S-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve (M_2 wt). **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), konstanter Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC ₅₀	Basalwert (%)	E _{max} (%)	n _H (frei)	n
M ₂ wt	7,04 ± 0,04	1 ± 1	100 ± 2	0,93 ± 0,07	3
M ₂ ⁴²² Trp→Ala	5,88 ± 0,07*	-51 ± 3*	90 ± 4	0,86 ± 0,11	3

Tabelle 24: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 29. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von n_H = 1. **pEC₅₀:** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung hervorruft. **Basalwert:** Basale, Agonist-unabhängige [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{max}:** Maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden M₂-Wildtyp-Kenngröße (t-Test, p < 0,05)

Die in Abbildung 29 dargestellten Versuche zeigten eine starke Absenkung (um ca. 50 %) des unteren Plateaus der Konzentrations-Effekt-Kurve von Acetylcholin am M₂⁴²²Trp→Ala-Rezeptor. Das obere Plateau ist nicht herabgesetzt, sodass, wie bereits durch die vorangegangenen Abbildungen gezeigt, eine vollständige Rezeptoraktivierung möglich ist. Die Wirksamkeit (pEC₅₀-Wert) von Acetylcholin war am punktmutierten Rezeptor M₂⁴²²Trp→Ala um mehr als eine Dekade niedriger als am M₂-Wildtyp. Sie wurde somit durch die Mutation signifikant herabgesetzt (t-Test, p < 0,05). Die durch die Mutation verursachte Rechtsverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurve, die zuvor, wenn auch mit hohen Streuungen, im transienten Versuchssystem gefunden wurde, konnte bestätigt werden.

3.3.1.2.2.2 Zweite Versuchsreihe

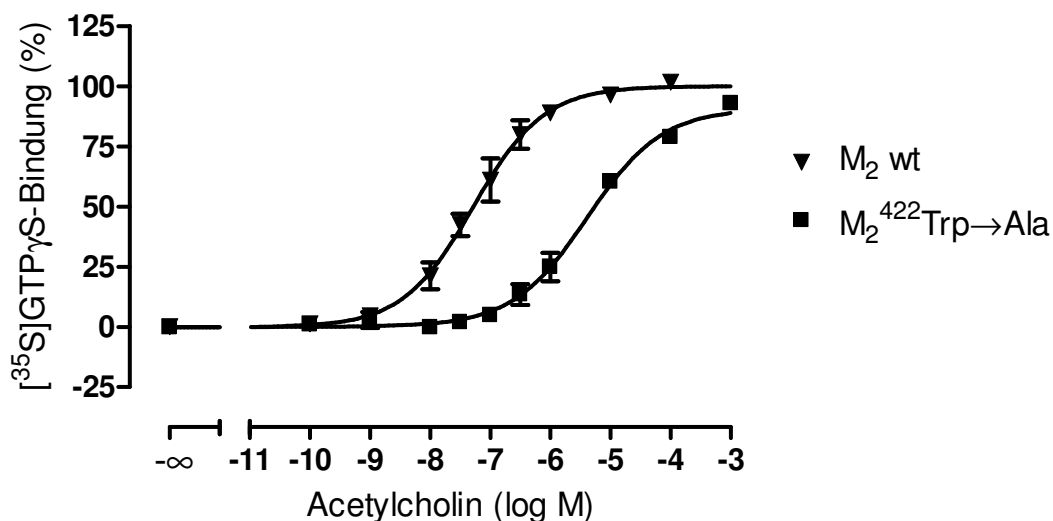


Abbildung 30: Vergleich von Acetylcholin-induzierter [³⁵S]GTPγS-Bindung an Membransuspensionen aus Flp-CHO-M₂-Zellen und Flp-CHO-M₂⁴²²Trp→Ala-Zellen. **Ordinate:** Prozentuale [³⁵S]GTPγS-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve (M₂ wt). **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), signifikanter Unterschied der Hill-Koeffizienten von n_H = 1 (F-Test, p < 0,05), M₂ wt: n_H = 0,74 ± 0,09, M₂⁴²²Trp→Ala: n_H = 0,70 ± 0,08. **Datenpunkte:** Mittelwerte ± Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC ₅₀	Basalwert (%)	E _{max} (%)	n _H (frei)	n
M ₂ wt	7,28 ± 0,08	0 ± 3	100 ± 3	0,74 ± 0,09 [#]	3
M ₂ ⁴²² Trp→Ala	5,39 ± 0,09*	0 ± 1	91 ± 4	0,70 ± 0,08 [#]	3

Tabelle 25: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 30. Die Kenngrößen beruhen auf Kurvenanpassungen mit freilaufenden Hill-Koeffizienten. **pEC₅₀:** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung hervorruft. **Basalwert:** Basale, Agonist-unabhängige [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{max}:** Maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden M₂-Wildtyp-Kenngröße (t-Test, p < 0,05)

signifikant bessere Anpassung mit variablem Hill-Koeffizienten (F-Test, p < 0,05)

Die Versuche der zweiten Reihe unterschieden sich von den vorangegangenen Versuchen dadurch, dass die unteren Plateaus der Konzentrations-Effekt-Kurven von Wildtyp und Mutante deckungsgleich waren. Auch die in Anwesenheit von Atropin (1 μM) gemessene [³⁵S]GTPγS-Bindung lag auf diesem Niveau. Es ist somit anzunehmen, dass bei diesen Versuchen keine konstitutive Rezeptoraktivität vorlag. Übereinstimmend zur ersten Versuchsreihe wurde hier ebenfalls gefunden, dass die maximale intrinsische Aktivität durch den Austausch des Epitops M₂⁴²²Trp→Ala nicht verändert war und dass die Wirksamkeit (ausgedrückt durch den pEC₅₀-Wert) des Agonisten stark abnahm. Hierbei fiel auf, dass sich bei Vergleich der Versuchsreihen die am Wildtyp-Rezeptor bestimmten Wendepunkte nicht signifikant voneinander unterschieden. Ein signifikanter Unterschied war jedoch bei Vergleich der für den punktmutierten Rezeptor erhaltenen Parameter zu finden. Bei Betrachtung der Rechtsverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurven zeigte sich ebenfalls eine signifikante Abweichung. Bei den Versuchen mit Absenkung der basalen Bindung fiel der Wirksamkeitsverlust mit ca. 1,2 Dekaden geringer aus als bei den parallel verschobenen Kurven der zweiten Versuchsreihe, wo eine Abnahme um ca. 1,9 Dekaden gefunden wurde.

3.3.1.2.3 Einfluss des Epitops M₂⁴²²Trp auf die Pilocarpin-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung

Abbildung 31 zeigt die Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin an Homogenaten aus stabil transfizierten Flp-CHO-M₂⁴²²Trp→Ala-Zellen, im Vergleich mit Flp-CHO-M₂-Zellen.

Für den Partialagonisten wurde eine Versuchsreihe aufgenommen, bei der eine starke Absenkung der basalen Bindung gefunden wurde. Einzelversuche, die hier keinen Effekt zeigten, wurden nicht mit in die Auswertung einbezogen. Die Konzentrations-Effekt-Kurven von Pilocarpin wurden zeitgleich mit der ersten Versuchsreihe von Acetylcholin (siehe 3.3.1.2.2.1) aufgenommen.

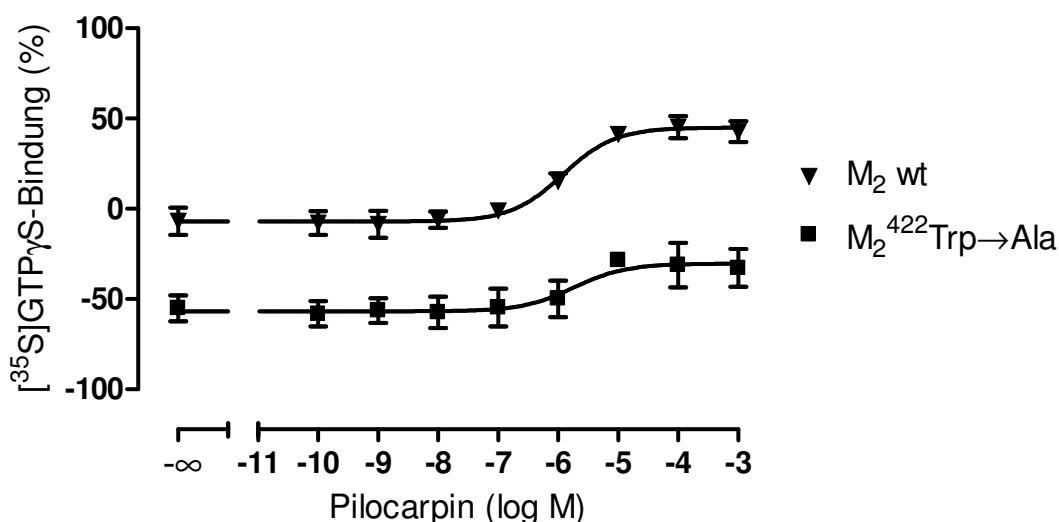


Abbildung 31: Vergleich von Pilocarpin-induzierter $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung an Membransuspensionen aus Flp-CHO- M_2 -Zellen und Flp-CHO- $\text{M}_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Zellen. **Ordinate:** Prozentuale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Kontroll-Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve (M_2 wt). **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), konstanter Hill-Koeffizienten von $n_{\text{H}} = 1$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC₅₀	Basalwert (%)	E_{max} (%)	n_H (frei)	n
M₂ wt	5,92 \pm 0,18	-7 \pm 2	45 \pm 3	1,04 \pm 0,46	3
M₂⁴²²Trp→Ala	5,74 \pm 0,59	-57 \pm 4*	-30 \pm 5*	4,76 \pm 904	3

Tabelle 26: Kenngrößen \pm Standardfehler der gemittelten Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 31. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von $n_{\text{H}} = 1$. **pEC₅₀:** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung hervorruft. **Basalwert:** Basale, Agonist-unabhängige $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{max}:** Maximale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden M_2 -Wildtyp-Kenngröße (t-Test, $p < 0,05$)

Die Abschwächung des Partialagonismus von Pilocarpin, die bei Untersuchung der transienten Homogenate gefunden wurde, konnte bestätigt werden. Anders als bei den Befunden für den Vollagonisten Acetylcholin wurde das obere Plateau des Partialagonisten signifikant abgesenkt. Es war jedoch noch eine schwache, Agonist-induzierte Zunahme

messbar: Am punktmutierten Rezeptor $M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ erlangte Pilocarpin 17 % der intrinsischen Aktivität des Vollagonisten Acetylcholin im Vergleich zu 52 % am M_2 -Wildtyp.

3.3.1.2.4 Einfluss des Epitops $M_2^{422}\text{Trp}$ auf die Oxotremorin M-induzierte $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung

Neben Acetylcholin sollte als weiterer Vollagonist Oxotremorin M an der Punktmutante $M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ untersucht werden. Für den Vollagonisten wurde eine Versuchsreihe aufgenommen, bei der sich keine signifikante Absenkung der basalen Bindung zeigte. Die Mittelwertskurven sind in Abbildung 32 dargestellt, die pharmakologischen Kenngrößen können Tabelle 27 entnommen werden. Die Konzentrations-Effekt-Kurven von Oxotremorin M wurden zeitgleich mit der zweiten Versuchsreihe von Acetylcholin (siehe 3.3.1.2.2.2) aufgenommen.

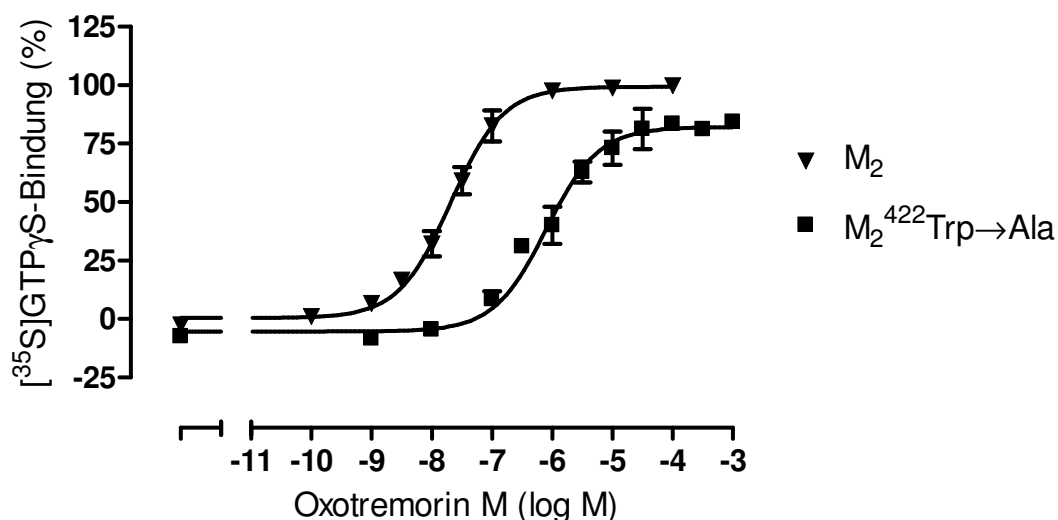


Abbildung 32: Vergleich von Oxotremorin M-induzierter $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung an Membransuspensionen aus Flp-CHO- M_2 -Zellen und Flp-CHO- $M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Zellen. **Ordinate:** Prozentuale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Oxotremorin M-Konzentrations-Effekt-Kurve (M_2 wt). **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), konstanter Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

Ergebnisse

	pEC₅₀	Basalwert (%)	E_{max} (%)	n_H (frei)	n
M₂ wt	7,68 ± 0,05	0 ± 2	99 ± 2	0,92 ± 0,09	3
M₂⁴²²Trp→Ala	6,10 ± 0,09*	-5 ± 3	82 ± 3*	0,74 ± 0,11	3

Tabelle 27: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Oxotremorin M-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 32. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$. **pEC₅₀:** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung hervorruft. **Basalwert:** Basale, Agonist-unabhängige [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{max}:** Maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden M₂-Wildtyp-Kenngröße (t-Test, $p < 0,05$)

Der Austausch des Epitops M₂⁴²²Trp→Ala führte zu einem starken Wirksamkeitsverlust von Oxotremorin M, wie auch schon bei Acetylcholin beobachtet. Die Verschiebung des Wendepunkts zwischen dem Wildtyp und der Mutante liegt mit 1,58 Dekaden in der gleichen Größenordnung wie bei Acetylcholin (1,89). Ein t-Test zeigt keinen signifikanten Unterschied ($p \geq 0,05$). Es fällt auf, dass das obere Plateau am M₂⁴²²Trp→Ala-Rezeptor signifikant unterhalb des Wildtyps liegt. Bei Acetylcholin konnte dies, auch beim Vorliegen einer starken Absenkung der basalen Bindung nicht mit einer signifikanten Ausprägung beobachtet werden (siehe 3.3.1.2.2.1). Allerdings war hier der Wert des oberen Plateaus mit 90 % ebenfalls numerisch kleiner. Der Einfluss des konservierten Tryptophans auf die beiden Vollagonisten Acetylcholin und Oxotremorin M ist somit gleichartig, bezüglich der Wirksamkeit und der intrinsischen Aktivität.

3.3.1.2.5 Einfluss des Epitops M₂⁴²²Trp auf die Iperoxo-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung

Es sollte die Hypothese überprüft werden, ob der Einfluss des Epitops M₂⁴²²Trp auf die Rezeptoraktivierung weiterer Vollagonisten gleichartig ist. Abbildung 33 zeigt ein Einzelexperiment, das mit der Testsubstanz Iperoxo durchgeführt wurde.

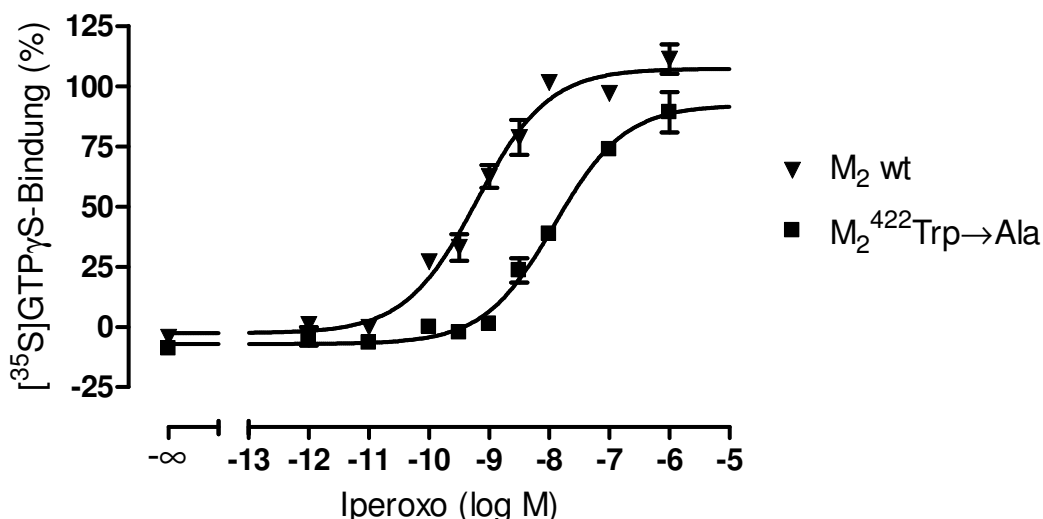


Abbildung 33: Vergleich von Iperoxo-induzierter $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung an Membransuspensionen aus Flp-CHO- M_2 -Zellen und Flp-CHO- $\text{M}_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Zellen. **Ordinate:** Prozentuale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurve (M_2 wt). **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = 1$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus einem Experiment, das in Vierfachbestimmung durchgeführt wurde und einmal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt wurde (siehe Text).

	pEC_{50}	Basalwert (%)	E_{max} (%)	n_H (frei)	n
M_2 wt	$9,21 \pm 0,08$	-3 ± 3	107 ± 4	$0,73 \pm 0,09$	1
$\text{M}_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$	$7,91 \pm 0,11^*$	-7 ± 2	92 ± 5	$0,74 \pm 0,10$	1

Tabelle 28: Kenngrößen \pm Standardfehler der gemittelten Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 33. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$. **pEC_{50} :** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung hervorruft. **Basalwert:** Basale, Agonist-unabhängige $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{max} :** Maximale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden M_2 -Wildtyp-Kenngröße (t-Test, $p < 0,05$)

Übereinstimmend mit dem hier gezeigten Versuch zeigte ein weiteres Experiment ebenfalls eine Rechtsverschiebung des Wendepunkts um 1,3 Dekaden. Das obere Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve der Rezeptormutante $\text{M}_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ unterschied sich nicht vom M_2 -Wildtyp. Die untersuchten Vollagonisten zeigten quantitativ ein sehr ähnliches Verhalten bezüglich der $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung an $\text{M}_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren.

3.3.1.2.6 Einfluss des Epitops $\text{M}_2^{422}\text{Trp}$ auf die McN-A-343-induzierte $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung

Neben Pilocarpin sollte als weiterer Partialagonist McN-A-343 auf Abhängigkeit vom Tryptophan in Position 422 untersucht werden. Eine Mittelwertskurve basierend auf vier

einzelnen Versuchstagen ist in Abbildung 34 gezeigt. Aus der Abbildung geht nicht hervor, dass McN-A-343 nur ca. 50 % der intrinsischen Aktivität eines Vollagonisten besitzt (siehe 3.2.2.7), da bei den hier gezeigten Versuchen kein Vollagonist mitgeführt wurde.

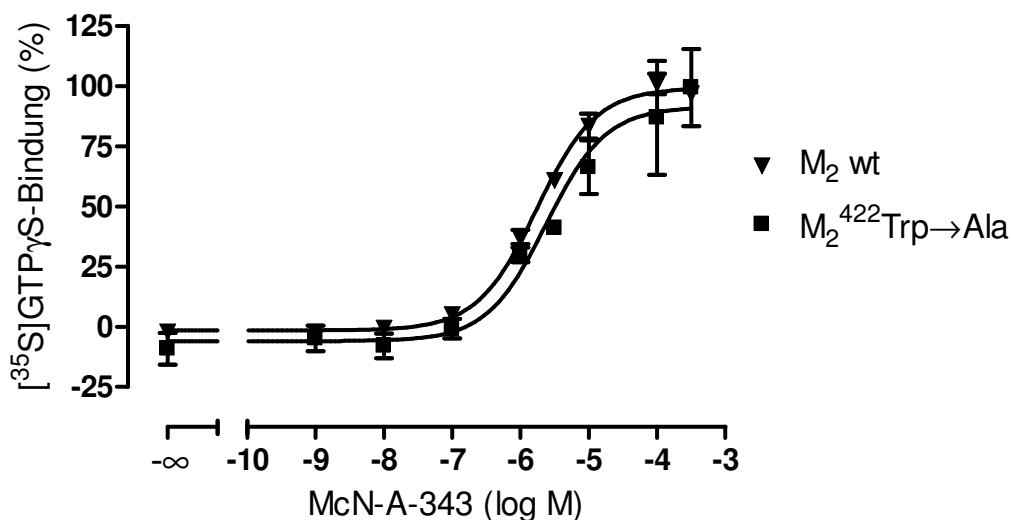


Abbildung 34: Vergleich von McN-A-343-induzierter [³⁵S]GTPγS-Bindung an Membransuspensionen aus Flp-CHO-M₂-Zellen und Flp-CHO-M₂⁴²²Trp→Ala-Zellen. **Ordinate:** Prozentuale [³⁵S]GTPγS-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der McN-A-343-Konzentrations-Effekt-Kurve (M₂ wt). **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameterlogistische-Gleichung“ (Gl. 5), konstanter Hill-Koeffizient von n_H = 1. **Datenpunkte:** Mittelwerte ± Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC ₅₀	Basalwert (%)	E _{max} (%)	n _H (frei)	n
M ₂ wt	5,76 ± 0,05	-2 ± 1	99 ± 2	0,91 ± 0,10	3
M ₂ ⁴²² Trp→Ala	5,62 ± 0,16	-6 ± 4	91 ± 7	0,63 ± 0,20	3

Tabelle 29: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten McN-A-343-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 34. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von n_H = 1. **pEC₅₀:** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung hervorruft. **Basalwert:** Basale, Agonist-unabhängige [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{max}:** Maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

Die beiden Konzentrations-Effekt-Kurven unterscheiden sich in keinem der bestimmten Parameter signifikant voneinander. Vier weitere Versuchstage konnten nicht in die Mittelung mit einbezogen werden, da signifikante Absenkungen des unteren Plateaus bei der Rezeptormutante vorlagen. An allen Einzelversuchstagen zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied bei den Kurvenparametern pEC₅₀-Wert und oberes Plateau, bei Vergleich von Wildtyp und mutiertem Rezeptor. McN-A-343 zeigte auch bezüglich der Bindung an M₂-

Rezeptoren keine Abhängigkeit vom Epitop $M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ (Dissertationsschrift Antony, 2007).

3.3.1.2.7 Einfluss des Epitops $M_2^{422}\text{Trp}$ auf die Hybrid 1-induzierte [^{35}S]GTP γ S-Bindung

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die Wirksamkeit und die intrinsische Aktivität des orthosterisch-allosterische Hybridagonist Hybrid 1 ebenfalls vom Epitop M_2^{422} Tryptophan abhängt und ob sich hier ein mit dem Mutter-Agonisten Iperoxo vergleichbares Profil zeigt. Abbildung 35 stellt die Konzentrations-Effekt-Kurven von Hybrid 1 am Wildtyp M_2 -Rezeptor und am punktmutierten $M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptor dar.

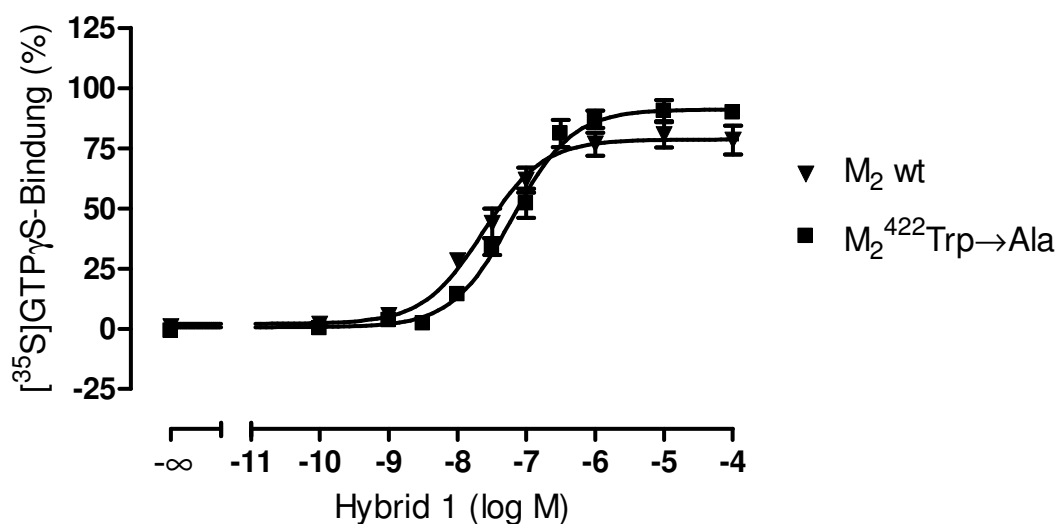


Abbildung 35: Vergleich von Hybrid 1-induzierter [^{35}S]GTP γ S-Bindung an Membransuspensionen aus Flp-CHO- M_2 -Zellen und Flp-CHO- $M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Zellen. **Ordinate:** Prozentuale [^{35}S]GTP γ S-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Kontroll-Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve (M_2 wt). **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = 1$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus vier ($M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$) bzw. fünf (M_2 wt) voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC ₅₀	Basalwert (%)	E _{max} (%)	n _H (frei)	n
M₂ wt	7,63 \pm 0,08	2 \pm 9	79 \pm 2	0,82 \pm 0,15	5
M₂⁴²²Trp→Ala	7,21 \pm 0,06*	1 \pm 2	91 \pm 2*	0,96 \pm 0,11	4

Tabelle 30: Kenngrößen \pm Standardfehler der gemittelten Hybrid 1-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 35. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$. **pEC₅₀:** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [^{35}S]GTP γ S-Bindung hervorruft. **Basalwert:** Basale, Agonist-unabhängige [^{35}S]GTP γ S-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{max}:** Maximale [^{35}S]GTP γ S-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden M_2 -Wildtyp-Kenngröße (t-Test, $p < 0,05$)

Im Unterschied zum orthosterischen Molekülteil Iperoxo wurde, durch die in Hybrid 1 vorliegende Verknüpfung mit dem allosterischen W84-Rest, der durch die Mutation $M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ verursachte Wirksamkeitsverlust abgeschwächt. Der für die Mutante bestimmte pEC_{50} -Wert unterscheidet sich vom Wildtyp um ca. 0,4 Dekaden, die Abweichung ist signifikant (t-Test, $p < 0,05$). Am M_2 -Wildtyp-Rezeptor zeigte Hybrid 1 mit ca. 80 % intrinsischer Aktivität einen starken partialagonistischen Effekt, dieser wird durch die Mutation $M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ signifikant auf ca. 90 % erhöht.

3.3.1.2.8 Einfluss des Epitops $M_2^{422}\text{Trp}$ auf die Hybrid 2-induzierte [^{35}S]GTP γ S-Bindung

Analog zum vorhergehenden Abschnitt sind in Abbildung 36 die entsprechenden Konzentrations-Effekt-Kurven von Hybrid 2 dargestellt. Die zugehörigen Kenngrößen sind Tabelle 31 zu entnehmen.

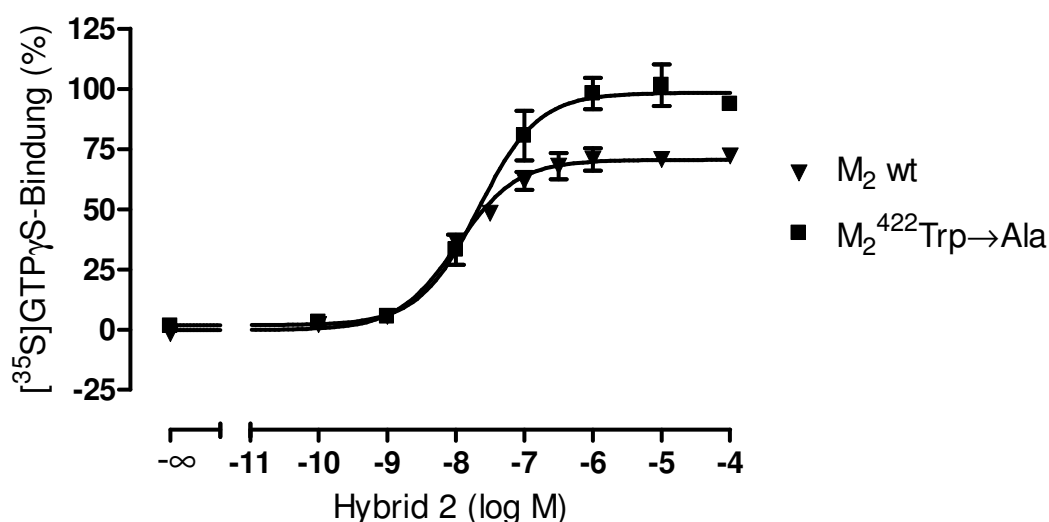


Abbildung 36: Vergleich von Hybrid 2-induzierter [^{35}S]GTP γ S-Bindung an Membransuspensionen aus Flp-CHO- M_2 -Zellen und Flp-CHO- $M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Zellen. **Ordinate:** Prozentuale [^{35}S]GTP γ S-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Kontroll-Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve (M_2 wt). **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = 1$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei ($M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$) bzw. sechs (M_2 wt) voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC ₅₀	Basalwert (%)	E _{max} (%)	n _H (frei)	n
M ₂ wt	7,98 ± 0,06	0 ± 2	70 ± 1	0,85 ± 0,11	6
M ₂ ⁴²² Trp→Ala	7,67 ± 0,11*	2 ± 3	98 ± 3*	1,00 ± 0,21	3

Tabelle 31: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Hybrid 2-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 36. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von n_H = 1. **pEC₅₀:** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung hervorruft. **Basalwert:** Basale, Agonist-unabhängige [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{max}:** Maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden M₂-Wildtyp-Kenngröße (t-Test, p < 0,05)

Die für Hybrid 2 am M₂⁴²²Trp→Ala-Rezeptor erhobenen Befunde ergaben einen signifikanten Wirksamkeitsverlust von 0,3 Dekaden im Vergleich zum Wildtyp. Die durch die Mutation M₂⁴²²Trp→Ala ausgelöste Steigerung der intrinsischen Aktivität war für Hybrid 2 stärker ausgeprägt als für Hybrid 1. Hybrid 2 zeigte somit volle intrinsische Aktivität am M₂⁴²²Trp→Ala-Rezeptor.

3.3.2 Untersuchungen zum Einfluss des Epitops M₂¹⁰⁴Tyr auf die G-Protein-Aktivierung am M₂-Rezeptor

Die Aminosäure M₂¹⁰⁴Tyrosin befindet sich im Bereich der dritten transmembranären Domäne des M₂-Rezeptorproteins. Sie ist benachbart zum konservierten Epitop M₂¹⁰³Aspartat, das auch in anderen Rezeptoren für biogene Amine, u.a. dem β₂-Rezeptor, vorhanden ist (Wess, 1993). Durch die negative Ladung ist M₂¹⁰³Aspartat entscheidender Interaktionspartner für die Bindung der positiv geladenen Aminogruppe, die in fast allen muskarinischen Liganden vorhanden ist. Die Mutation M₂¹⁰³Asp→Ala führte zu einem vollständigen Verlust der spezifischen Bindung der Antagonisten [³H]N-Methylscopolamin und [³H]Quinuclidinylbenzilat, sodass Bindungsstudien mit dieser Mutante nicht möglich waren (Heitz et al., 1999). Im Arbeitskreis von Prof. Dr. Dr. h.c. H.-D. Höltje (Pharmazeutisches Institut, Universität Düsseldorf) durchgeführte Molecular Modelling-Untersuchungen lokalisierten M₂¹⁰⁴Tyrosin ebenfalls im Bereich der orthosterischen Bindungsstelle. Dies wurde durch Bindungsstudien an dieser Mutante bestätigt, die zu einem großen Affinitätsverlust und einer stark beschleunigten Dissoziation von orthosterischen Liganden führten (Dissertationsschrift Antony, 2007). Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten, stabil transfizierten Flp-CHO-M₂¹⁰⁴Tyr→Ala-Zellen dienten als Modell zur Detektion einer Interaktion mit der orthosterischen Bindungsstelle sowie zur Untersuchung von funktionellen Konsequenzen auf G-Protein-Ebene.

3.3.2.1 [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimente mit stabil transfizierten M₂¹⁰⁴Tyr→Ala-Rezeptoren

3.3.2.1.1 Einfluss des Epitops M₂¹⁰⁴Tyr auf die Acetylcholin-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung

Die folgende Abbildung 37) zeigt den Einfluss der Mutation M₂¹⁰⁴Tyr→Ala auf die Acetylcholin-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung. Die Kenngrößen der Konzentrations-Effekt-Kurven sind in Tabelle 32 zusammen gestellt.

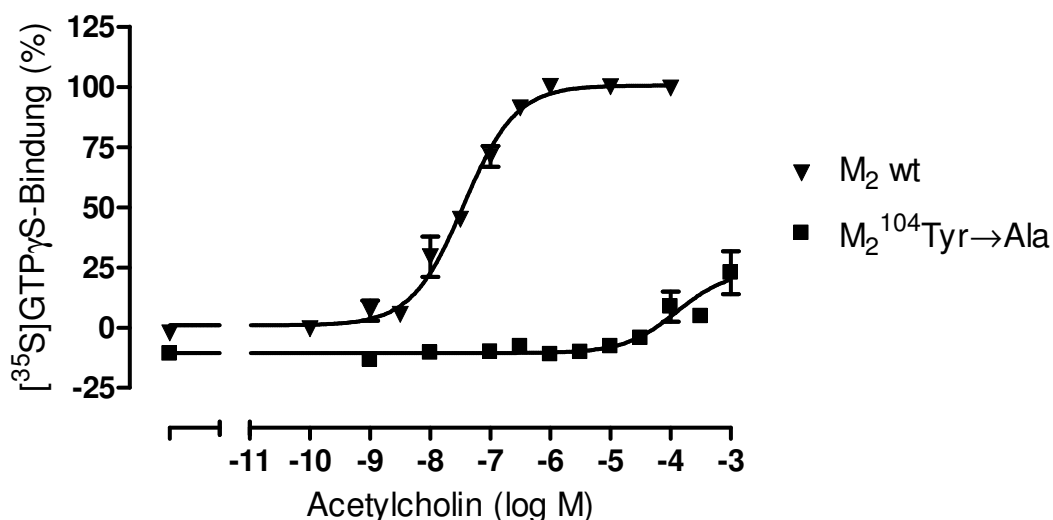


Abbildung 37: Vergleich von Acetylcholin-induzierter [³⁵S]GTPγS-Bindung an Membransuspensionen aus Flp-CHO-M₂-Zellen und Flp-CHO-M₂¹⁰⁴Tyr→Ala-Zellen. **Ordinate:** [³⁵S]GTPγS-Bindung in cpm/ml. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische Gleichung“ (Gl. 5), konstanter Hill-Koeffizient von n_H = 1. **Datenpunkte:** Mittelwerte ± Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC ₅₀	Basalwert (%)	E _{max} (%)	n _H (frei)	n
M ₂ wt	7,44 ± 0,06	1 ± 2	101 ± 2	0,86 ± 0,10	3
M ₂ ¹⁰⁴ Tyr→Ala	3,90 ± 0,23*	11 ± 1*	24 ± 5*	0,56 ± 0,37	3

Tabelle 32: Kenngrößen ± Standardfehler der repräsentativen Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 37. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von n_H = 1. **pEC₅₀:** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung hervorruft. **Basalwert:** Basale, Agonist-unabhängige [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{max}:** Maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden M₂-Wildtyp-Kenngröße (t-Test, p < 0,05)

Alle pharmakologischen Kenngrößen waren an M₂¹⁰⁴Tyr→Ala-Rezeptoren im Vergleich zum Wildtyp signifikant herabgesetzt. Erst bei sehr hohen Konzentrationen (> 100 μM) zeigte sich

eine signifikante Erhöhung der basalen [^{35}S]GTP γ S-Bindung durch Acetylcholin an der Rezeptormutante $\text{M}_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$.

3.3.2.1.2 Einfluss des Epitops $\text{M}_2^{104}\text{Tyr}$ auf die Oxotremorin M-induzierte [^{35}S]GTP γ S-Bindung

Die Abbildung 38 zeigt den Einfluss der Mutation $\text{M}_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ auf die Oxotremorin M-induzierte [^{35}S]GTP γ S-Bindung. Die Kenngrößen der Konzentrations-Effekt-Kurven sind in Tabelle 32 zusammengestellt.

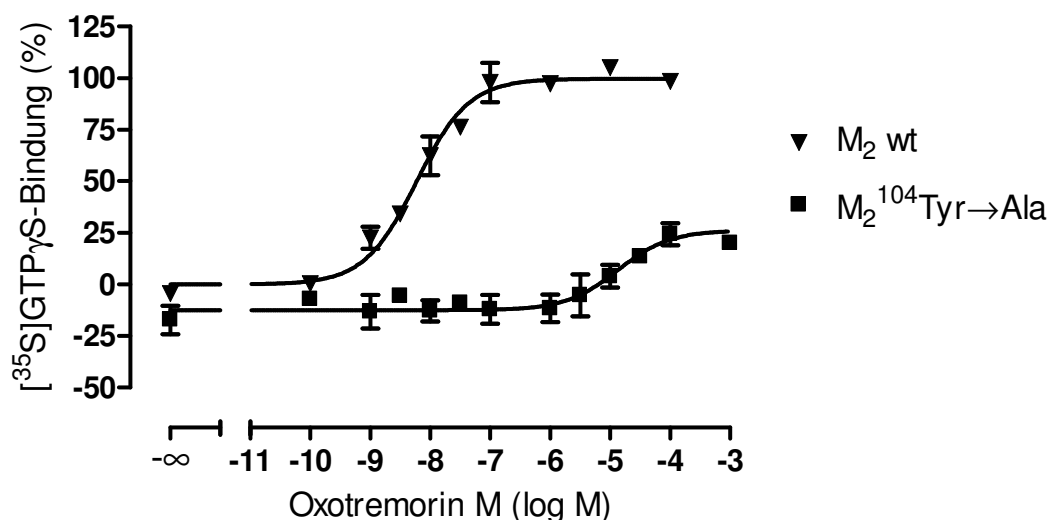


Abbildung 38: Vergleich von Oxotremorin M-induzierter [^{35}S]GTP γ S-Bindung an Membransuspensionen aus Flp-CHO- M_2 -Zellen und Flp-CHO- $\text{M}_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ -Zellen. **Ordinate:** Prozentuale [^{35}S]GTP γ S-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Oxotremorin M-Konzentrations-Effekt-Kurve am M_2 -Wildtyp. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = 1$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Drei- oder Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC₅₀	Basalwert (%)	E_{max} (%)	n_H (frei)	n
M₂ wt	8,23 \pm 0,08	0 \pm 3	100 \pm 3	0,77 \pm 0,11	3
M₂¹⁰⁴Tyr→Ala	4,88 \pm 0,27*	-13 \pm 2*	26 \pm 6*	1,31 \pm 0,91	3

Tabelle 33: Kenngrößen \pm Standardfehler der gemittelten Oxotremorin M-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 38. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$. **pEC₅₀:** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [^{35}S]GTP γ S-Bindung hervorruft. **Basalwert:** Basale, Agonist-unabhängige [^{35}S]GTP γ S-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{max}:** Maximale [^{35}S]GTP γ S-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden M_2 -Wildtyp-Kenngröße (t-Test, $p < 0,05$)

Die bereits für Acetylcholin gefundene starke Abhängigkeit der Wirksamkeit und intrinsischen Aktivität vom Epitop $M_2^{104}\text{Tyr}$ wurde auch für Oxotremorin M gefunden. Eine Rezeptoraktivierung war nur durch Konzentrationen größer $10\ \mu\text{M}$ messbar. Unteres Plateau, oberes Plateau und Wendepunkt waren im Vergleich zum Wildtyp M_2 -Rezeptor signifikant herabgesetzt.

3.3.2.1.3 Einfluss des Epitops $M_2^{104}\text{Tyr}$ auf die Iperoxo-induzierte $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung

Abbildung 39 zeigt die Konzentrations-Effekt-Kurve, Tabelle 34 die pharmakologischen Kenngrößen von Iperoxo an $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren im Vergleich zum M_2 -Wildtyp.

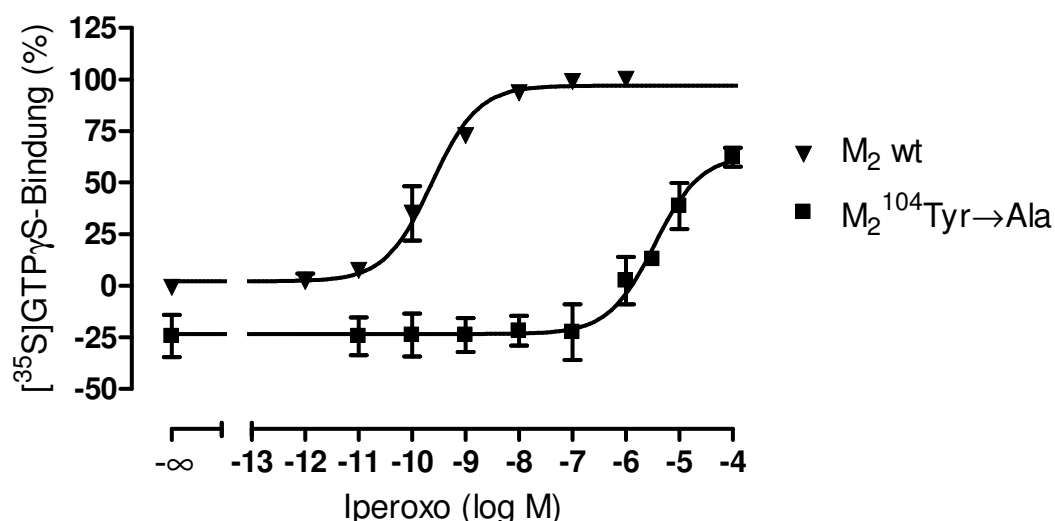


Abbildung 39: Vergleich von Iperoxo-induzierter $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung an Membransuspensionen aus Flp-CHO- M_2 -Zellen und Flp-CHO- $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ -Zellen. **Ordinate:** Prozentuale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurve am M_2 -Wildtyp. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = 1$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC_{50}	Basalwert (%)	E_{max} (%)	n_H (frei)	n
M_2 wt	$9,63 \pm 0,10$	2 ± 3	97 ± 3	$0,71 \pm 0,11$	2
$M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$	$5,46 \pm 0,10^*$	$-23 \pm 3^*$	63 ± 8	$0,76 \pm 0,30$	2

Tabelle 34: Kenngrößen \pm Standardfehler der gemittelten Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 39. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$. **pEC_{50} :** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung hervorruft. **Basalwert:** Basale, Agonist-unabhängige $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{max} :** Maximale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden M_2 -Wildtyp-Kenngröße (t-Test, $p < 0,05$)

Aus Abbildung 39 wird ersichtlich, dass Iperoxo an der $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ Mutante das typische G-Protein-Aktivierungsverhalten eines orthosterischen Agonisten aufwies: Die Mutation $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ führte zu einem massiven Wirksamkeitsverlust (mehr als 4 Dekaden!). Gleichzeitig ist die intrinsische Aktivität von Iperoxo herabgesetzt (E_{\max} : $63 \pm 8 \%$), jedoch musste hier das ebenfalls signifikant herabgesetzte untere Plateau beachtet werden (Basalwert: -23 ± 3). Bei Vergleich der „Messfenster“ ist somit kein signifikanter Unterschied (M_2 wt: 99 ± 6 ; $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$: 86 ± 11 , t-Test, $p < 0,05$) zu finden. Der bisher potenteste bekannte muskarinische Agonist zeigte, dass auch an dieser Rezeptormutante eine G-Protein-Aktivierung detektierbar war. Die gezielte Punktmutation innerhalb der orthosterischen Bindungsstelle ermöglicht den Nachweis funktioneller Abhängigkeit vom orthosterischen Haftareal, ohne die Konformation der Bindungsstelle komplett zu restrukturieren.

3.3.2.1.4 Einfluss des Epitops $M_2^{104}\text{Tyr}$ auf die McN-A-343-induzierte [^{35}S]GTP γ S-Bindung

McN-A-343 verhielt sich in funktionellen Untersuchungen als partieller M_2 -Rezeptor Agonist. Bei Betrachtung der bisher veröffentlichten Daten blieb jedoch unklar, ob eine G-Protein-Aktivierung von der orthosterischen oder der allosterischen Bindungsstelle ausgeht (Langmead und Christopoulos, 2006; May et al., 2007). In Bindungsstudien an $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ Mutanten konnte Antony (Dissertationsschrift, 2007) keine signifikante Änderung des Bindungsverhaltens im Vergleich zum M_2 Wildtyp feststellen. Der Einfluss des Epitops $M_2^{104}\text{Tyr}$ auf die G-Protein-Aktivierung durch verschiedene Konzentrationen von McN-A-343 wurde durch Einsatz von $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren untersucht (siehe Abbildung 40).

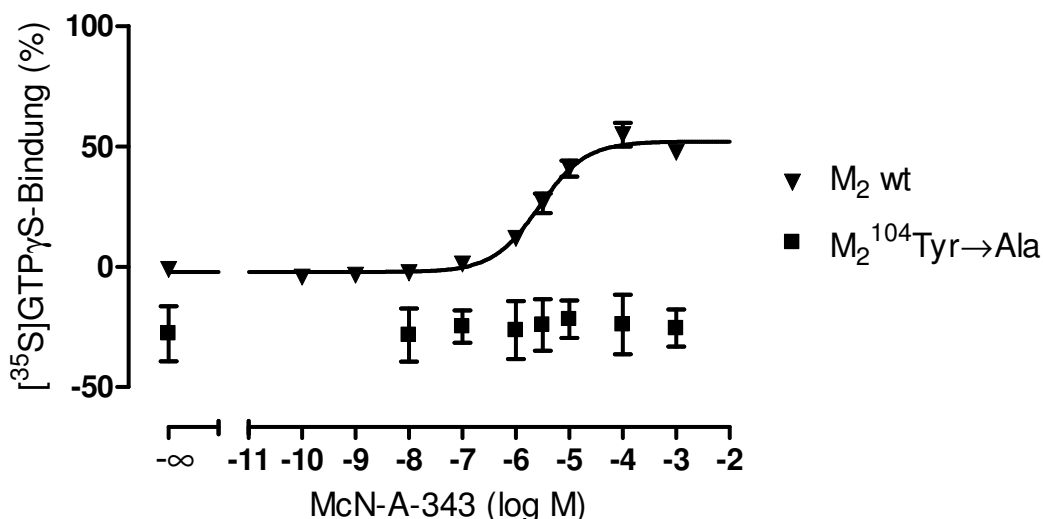


Abbildung 40: Vergleich von McN-A-343-induzierter [³⁵S]GTPγS-Bindung an Membransuspensionen aus Flp-CHO-M₂-Zellen und Flp-CHO-M₂¹⁰⁴Tyr→Ala-Zellen. **Ordinate:** Prozentuale [³⁵S]GTPγS-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Vollagonist-Konzentrations-Effekt-Kurve am M₂-Wildtyp. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), konstanter Hill-Koeffizient von n_H = 1. M₂¹⁰⁴Tyr→Ala: Keine Kurvenanpassung möglich. **Datenpunkte:** Mittelwerte ± Standardfehler aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

Die [³⁵S]GTPγS-Bindung, die in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen McN-A-343 bestimmt wurde, unterschied sich bei keiner der eingesetzten Konzentration signifikant von der basalen [³⁵S]GTPγS-Bindung an M₂¹⁰⁴Tyr→Ala-Rezeptoren. Die rechnerische Anpassung einer sigmoidalen Konzentrations-Effekt-Kurve war nicht möglich. Die Punktmutation M₂¹⁰⁴Tyr→Ala führte zum vollständigen Verlust der intrinsischen Aktivität. Die funktionellen Konsequenzen der Mutation stehen somit im Gegensatz zu den von Antony (Dissertationsschrift, 2007) erhobenen Befunden auf Ebene der Bindung von McN-A-343 an M₂¹⁰⁴Tyr→Ala-Rezeptoren, die durch die Mutation nicht signifikant beeinflusst wurde. Folglich war das Kernepitop des orthosterischen Haftareals bei der Bindung von McN-A-343 an das Rezeptorprotein nicht entscheidend beteiligt, wohl aber bei der konsekutiven G-Protein-Aktivierung.

Auch der Partialagonist Pilocarpin zeigte in einer an M₂-Wildtyprezeptoren sättigenden Konzentration (1 mM) keine signifikante Erhöhung der [³⁵S]GTPγS-Bindung an M₂¹⁰⁴Tyr→Ala-Rezeptoren (Daten nicht gezeigt). Auch die Affinität von Pilocarpin zum Rezeptor, die von Antony (Dissertationsschrift, 2007) in Radioligandbindungsstudien untersucht worden war, nahm um 2,5 Dekaden ab.

Durch die allosterisch-orthosterischen Hybride Hybrid 1 und Hybrid 2 zeigte sich keine signifikante Steigerung der [³⁵S]GTPγS-Bindung an M₂¹⁰⁴Tyr→Ala-Rezeptoren (persönliche Mitteilung, Dorina Kaufel) im Gegensatz zur orthosterischen Muttersubstanz Iperoxo.

3.3.3 Untersuchungen zum Einfluss des Epitope M₂¹⁷⁷Tyr und M₂⁴²³Thr auf die G-Protein-Aktivierung am M₂-Rezeptor

Verschiedene Untersuchungen aus den vergangenen Jahren (Ellis et al., 1993; Buller et al., 2002; Voigtländer et al., 2003; Tränkle et al., 2005; Prilla et al., 2006) führten zur Identifizierung von Aminosäuren, welche für die Bindung allosterischer Modulatoren und somit für eine Interaktion mit dem allosterischen Haftareal von Bedeutung sind.

Voigtländer et al. (2003) zeigten mit Hilfe von punktmutierten M₂-Rezeptoren, in denen einzelne Aminosäuren gegen die korrespondierenden Aminosäuren im M₅-Rezeptor ausgetauscht worden waren, dass die ausgeprägte M₂/M₅-Selektivität, die viele allosterische Modulatoren zeigen, vollständig auf zwei Epitope zurückzuführen ist: M₂¹⁷⁷Tyrosin im Bereich der zweiten extrazellulären Schleife (Voigtländer et al., 2003) sowie M₂⁴²³Threonin in der Grenzregion der dritten extrazellulären Schleife und der siebten Transmembrandomäne (Buller et al., 2002). Neben dem zuvor besprochenen (siehe 3.3.1) und im Fokus dieser Arbeit stehenden konservierten Kernepitop der allosterischen Bindungsstelle (M₂⁴²²Tryptophan), wurden auch zu den beiden anderen bekannten allosterischen Epitopen, die für die Subtypeselektivität verantwortlich sind, die entsprechenden punktmutierten Expressionszelllinien hergestellt. Hierbei wurden sowohl die Zelllinien, in denen mittels Substitution durch Alanin, die Funktionalität der endogenen Aminosäure aufgehoben wurde, als auch die Zelllinien mit Substitution durch die entsprechende M₅-Aminosäure (d.h. M₂¹⁷⁷Tyr→Gln und M₂⁴²³Thr→His) generiert. Die erhobenen Ergebnisse sind in den Unterpunkten dieses Kapitels zusammengestellt.

3.3.3.1 [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimente mit stabil transfizierten M₂¹⁷⁷Tyr→Ala-Rezeptoren

Die Ergebnisse der [³⁵S]GTPγS-Bindung, die durch verschiedene Agonisten an M₂¹⁷⁷Tyr→Ala-Rezeptoren induziert wurde, sind im folgenden Kapitel dargestellt. Durch zielgerichtete Mutagenese war zuvor in der M₂-Rezeptor DNA die Aminosäure 177 Tyrosin gegen Alanin ausgetauscht worden. Alanin besitzt keine spezifischen Eigenschaften wie z. B. funktionelle Gruppen und fungierte somit als ‚inaktives Substitut‘.

3.3.3.1.1 Einfluss der Punktmutation $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ auf die Acetylcholin-induzierte $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung

Der Einfluss der Punktmutation $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ auf die Acetylcholin-induzierte $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

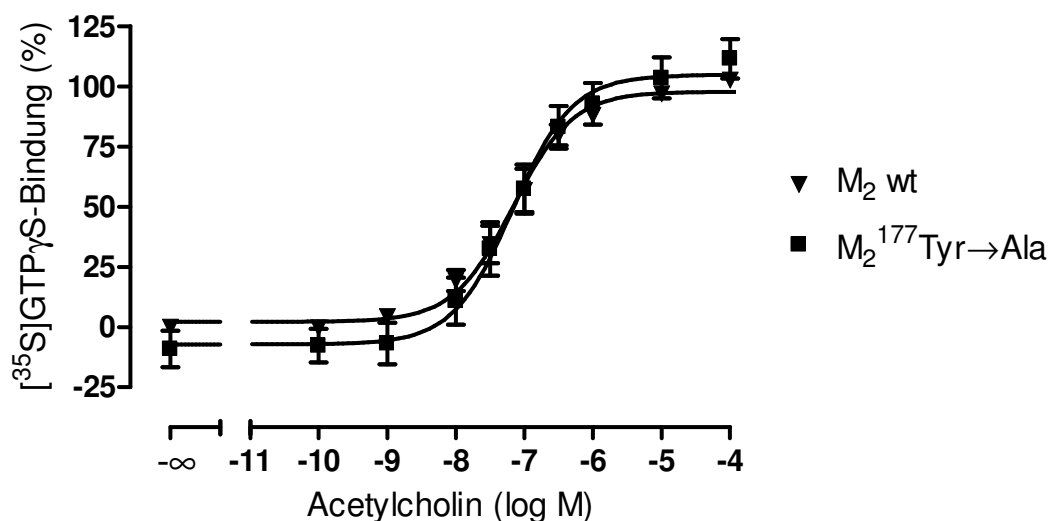


Abbildung 41: Vergleich von Acetylcholin-induzierter $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung an Membransuspensionen aus Flp-CHO- M_2 -Zellen und Flp-CHO- $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ -Zellen. **Ordinate:** Prozentuale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve am M_2 -Wildtyp. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = 1$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus vier voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC₅₀	Basalwert (%)	E_{max} (%)	n_H (frei)	n
M_2 wt	7,17 \pm 0,07	2 \pm 2	98 \pm 3	0,77 \pm 0,10	4
$M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$	7,17 \pm 0,11	-7 \pm 5	105 \pm 5	0,78 \pm 0,17	4

Tabelle 35: Kenngrößen \pm Standardfehler der gemittelten Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 41. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$. **pEC₅₀:** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung hervorruft. **Basalwert:** Basale, Agonist-unabhängige $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{max}:** Maximale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

Bei Vergleich der in Tabelle 35 aufgeführten pharmakologischen Kenngrößen der Konzentrations-Effekt-Kurven am M_2 Wildtyp und an der Rezeptormutante $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ zeigte sich keine signifikante Abweichung. Die G-Protein-Aktivierung durch den endogenen Liganden Acetylcholin war nicht beeinflusst durch das Epitop der allosterischen Bindungsstelle.

3.3.3.1.2 Einfluss der Punktmutation $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ auf die Iperoxo-induzierte $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung

In Abbildung 42 ist der Einfluss steigender Konzentrationen von Iperoxo auf die $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung an $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren, im Vergleich zum M_2 -Wildtyp dargestellt. Die entsprechenden Kenngrößen sind der Tabelle 36 zu entnehmen.

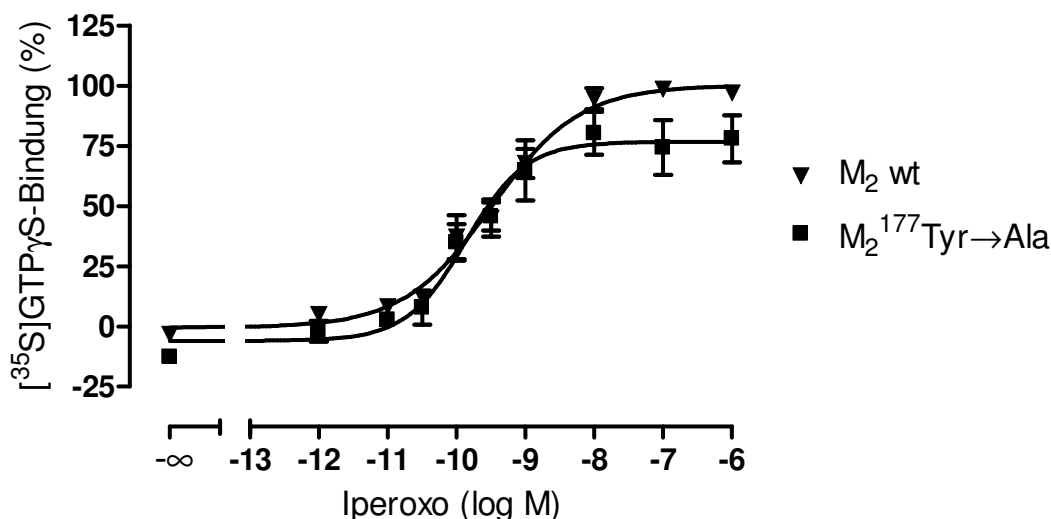


Abbildung 42: Vergleich von Iperoxo-induzierter $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung an Membransuspensionen aus Flp-CHO- M_2 -Zellen und Flp-CHO- $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ -Zellen. **Ordinate:** Prozentuale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurve am M_2 -Wildtyp. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), signifikanter Unterschied des Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$ (F-Test, $p < 0,05$), $n_H = 0,68 \pm 0,11$ (M_2 wt); konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = 1$ ($M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$). **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC ₅₀	Basalwert (%)	E _{max} (%)	n _H (frei)	n
M_2 wt	9,49 \pm 0,10	-1 \pm 4	100 \pm 4	0,68 \pm 0,11 [#]	3
$M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$	9,87 \pm 0,14	-6 \pm 4	77 \pm 4 [*]	0,78 \pm 0,21	3

Tabelle 36: Kenngrößen \pm Standardfehler der gemittelten Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 42. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$ ($M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$) und auf einer Kurvenanpassung mit einem freilaufenden Hill-Koeffizienten für den M_2 wt. **pEC₅₀:** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung hervorruft. **Basalwert:** Basale, Agonist-unabhängige $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{max}:** Maximale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden M_2 -Wildtyp-Kenngröße (t-Test, $p < 0,05$)

signifikant bessere Anpassung mit variablem Hill-Koeffizienten (F-Test, $p < 0,05$)

Bei Vergleich der Kenngrößen aus Tabelle 36 fällt auf, dass bei Iperoxo anders als bei Acetylcholin, durch den Austausch der Aminosäure $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ das obere Plateau um ca.

20 % herabgesetzt ist. Um die Relevanz dieses unerwarteten Befundes zu erklären, musste zusätzlich in Betracht gezogen werden, dass das untere Plateau ebenfalls erniedrigt war: Vergleicht man die ‚Messfenster‘, findet man keinen Unterschied im Ausmaß der G-Protein-Aktivierung zwischen M_2 Wildtyp und $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$.

3.3.3.1.3 Einfluss der Punktmutation $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ auf die Pilocarpin-induzierte $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung

Abbildung 43 zeigt den Einfluss steigender Konzentrationen von Pilocarpin auf die $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung an $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren im Vergleich zum M_2 -Wildtyp. Die sich daraus ergebenden Kenngrößen sind der Tabelle 37 zu entnehmen.

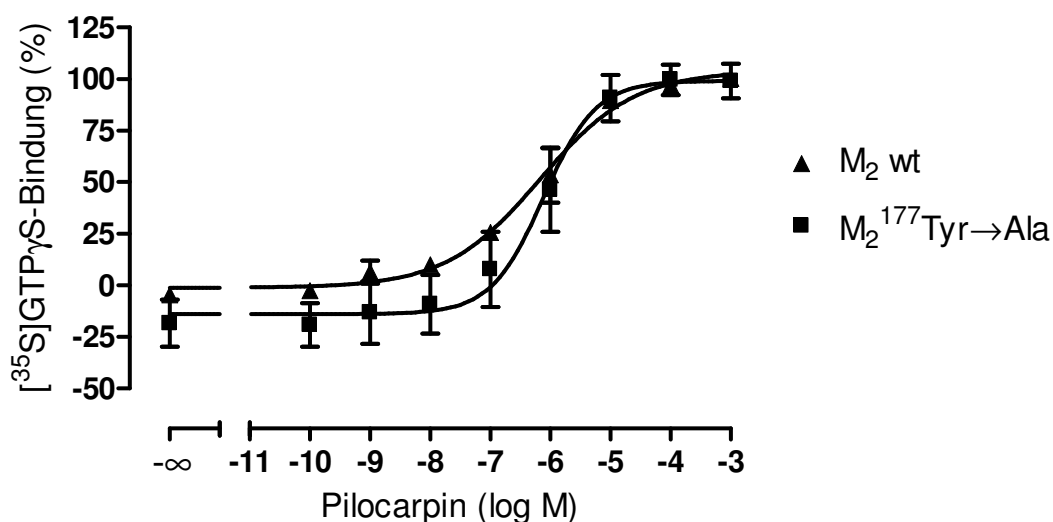


Abbildung 43: Vergleich von Pilocarpin-induzierter $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung an Membransuspensionen aus Flp-CHO- M_2 -Zellen und Flp-CHO- $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ -Zellen. **Ordinate:** Prozentuale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve am M_2 -Wildtyp. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), signifikanter Unterschied des Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$ (F-Test, $p < 0,05$), $n_H = 0,56 \pm 0,11$ (M_2 wt); konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = 1$ ($M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$). **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Drei- oder Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC ₅₀	Basalwert (%)	E _{max} (%)	n _H (frei)	n
M ₂ wt	6,17 ± 0,16	-1 ± 3	104 ± 5	0,56 ± 0,11 [#]	3
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Ala	6,11 ± 0,20	-14 ± 6	99 ± 8	0,72 ± 0,28	3

Tabelle 37: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 43. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von n_H = 1 (M₂¹⁷⁷Tyr→Ala) und auf einer Kurvenanpassung mit einem freilaufenden Hill-Koeffizienten für den M₂ wt. **pEC₅₀:** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung hervorruft. **Basalwert:** Basale, Agonist-unabhängige [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{max}:** Maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

[#] signifikant bessere Anpassung mit variablem Hill-Koeffizienten (F-Test, p < 0,05)

Auch die G-Protein-Aktivierung durch den Partialagonisten Pilocarpin zeigte keine signifikante Abhängigkeit vom allosterischen Kernepitop M₂¹⁷⁷Tyr. Ein Funktionsverlust, hergeführt durch den Austausch Tyrosin zu Alanin, führte zu keinen Änderungen bezüglich der charakteristischen Parameter der Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin.

3.3.3.1.4 Einfluss der Punktmutation M₂¹⁷⁷Tyr→Ala auf die McN-A-343-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung

Neben Pilocarpin sollte als weiterer Partialagonist McN-A-343 auf Abhängigkeit vom Tyrosin in Position 177 untersucht werden. In Studien zur Phosphorylierung von ERK (*Extracellular-signal regulated kinase*) aus dem Arbeitskreis von Herrn Prof. A. Christopoulos (May et al., 2007; Valant et al., 2008; Valant et al., 2009) konnte für McN-A-343 ein Gewinn an intrinsischer Aktivität gezeigt werden, ausgelöst durch die Mutation M₂¹⁷⁷Tyr→Ala.

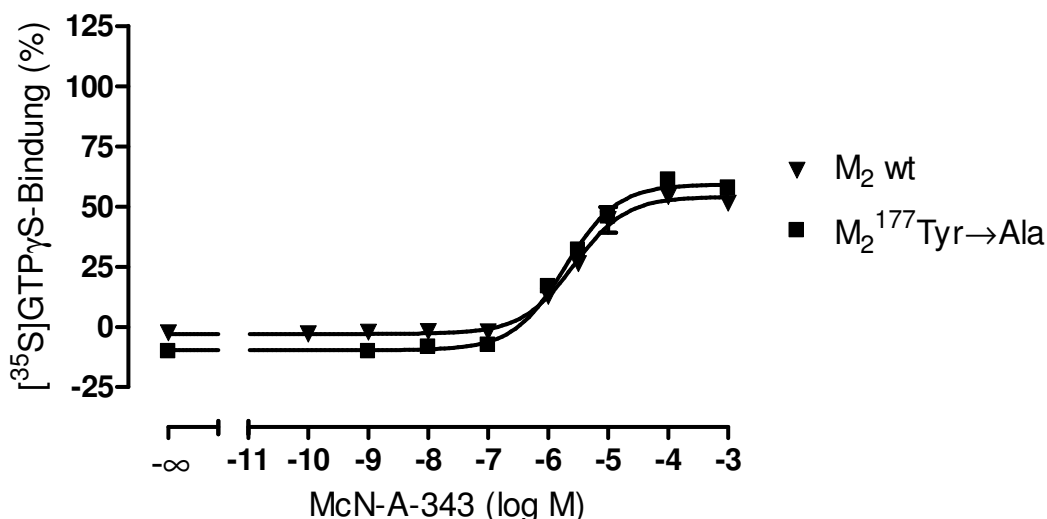


Abbildung 44: Vergleich von McN-A-343-induzierter [³⁵S]GTPγS-Bindung an Membransuspensionen aus Flp-CHO-M₂-Zellen und Flp-CHO-M₂¹⁷⁷Tyr→Ala-Zellen. **Ordinate:** Prozentuale [³⁵S]GTPγS-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Vollagonist-Konzentrations-Effekt-Kurve am M₂-Wildtyp. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), konstanter Hill-Koeffizient von n_H = 1. **Datenpunkte:** Mittelwerte ± Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC ₅₀	Basalwert (%)	E _{max} (%)	n _H (frei)	n
M ₂ wt	5,57 ± 0,05	-3 ± 1	54 ± 1	1,15 ± 0,14	2
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Ala	5,72 ± 0,04	-10 ± 1*	59 ± 1	0,89 ± 0,09	2

Tabelle 38: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten McN-A-343-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 44. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von n_H = 1. **pEC₅₀:** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung hervorruft. **Basalwert:** Basale, Agonist-unabhängige [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{max}:** Maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden M₂-Wildtyp-Kenngröße (t-Test, p < 0,05)

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Befunde wiesen keine Abhängigkeit auf, es zeigte sich keine signifikante Änderung der Parameter pEC₅₀-Wert und E_{max} durch die untersuchte Mutation M₂¹⁷⁷Tyr→Ala. Das untere Plateau wurde hingegen signifikant herabgesetzt, numerisch fällt der Wert mit -7 % jedoch klein aus. Bei vergleichender Betrachtung der ‚Messfenster‘ unterscheidet sich der numerisch höhere Wert an der Rezeptormutante M₂¹⁷⁷Tyr→Ala jedoch nicht signifikant vom Wildtyp (t-Test, p < 0,05). Die von May et al. (2007) gefundene Zunahme an intrinsischer Aktivität bei Untersuchung der ERK Phosphorylierung konnte durch die Messungen der G-Protein-Aktivierung nicht bestätigt werden. Außer den hier gezeigten Befunden wurden noch weitere [³⁵S]GTPγS-Bindung-

Experimente von McN-A-343 an $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren im Vergleich zum Wildtyp durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Sie konnten nicht mit in die Mittelung einbezogen werden, da an den Versuchstagen kein Vollagonist untersucht wurde und so keine Normierung erfolgen konnte. An jedem Einzeltag zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den maximalen Effekten an Wildtyp und Mutante.

3.3.3.2 [^{35}S]GTP γ S-Bindungsexperimente mit stabil transfizierten $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$ -Rezeptoren

Die Ergebnisse der [^{35}S]GTP γ S-Bindung, die durch verschiedene Agonisten an stabil transfizierten $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$ -Rezeptoren induziert wurde, sind im folgenden Kapitel dargestellt. Durch zielgerichtete Mutagenese war zuvor in der M_2 -Rezeptor DNA die Aminosäure 177 Tyrosin gegen Glutamin ausgetauscht worden. Glutamin stellt die korrespondierende Aminosäure des M_5 -Rezeptors dar und leistet einen wesentlichen Beitrag zur M_2/M_5 Subtypselektivität von allosterischen Modulatoren.

3.3.3.2.1 Einfluss der Punktmutation $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$ auf die Acetylcholin-induzierte [^{35}S]GTP γ S-Bindung

Der Austausch des Tyrosin in Position 177 gegen Alanin verursachte keine Veränderung der Acetylcholin-induzierten [^{35}S]GTP γ S-Bindung am M_2 -Rezeptor. Des Weiteren sollte der Einfluss der Punktmutation $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$ auf die Acetylcholin-induzierte [^{35}S]GTP γ S-Bindung untersucht werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 45 dargestellt.

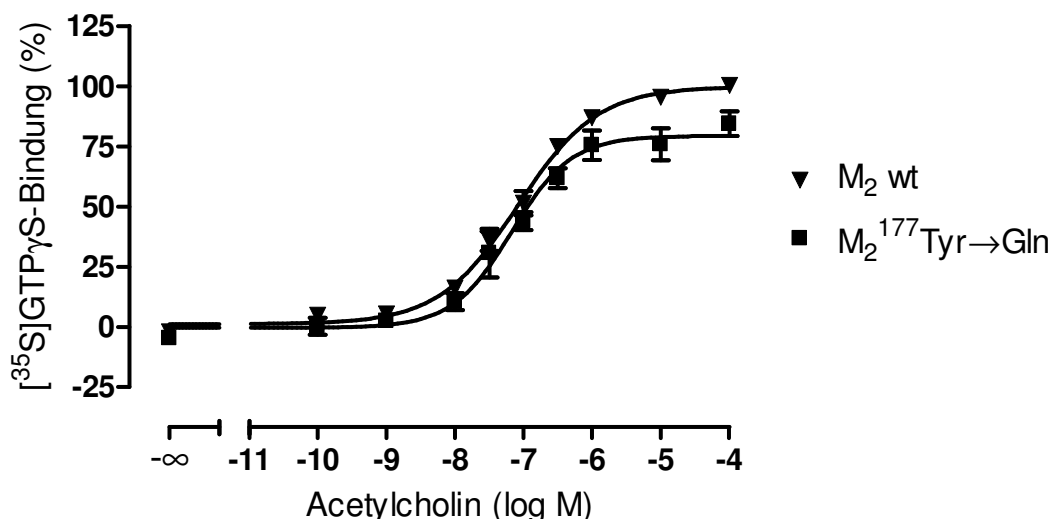


Abbildung 45: Vergleich von Acetylcholin-induzierter [^{35}S]GTP γ S-Bindung an Membransuspensionen aus F1p-CHO- M_2 -Zellen und F1p-CHO- $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$ -Zellen. **Ordinate:** Prozentuale [^{35}S]GTP γ S-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve am M_2 -Wildtyp. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), signifikanter Unterschied des Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$ (F-Test, $p < 0,05$), $n_H = 0,75 \pm 0,06$ (M_2 wt); konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = 1$ ($M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$). **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC ₅₀	Basalwert (%)	E _{max} (%)	n _H (frei)	n
M_2 wt	7,08 \pm 0,06	1 \pm 2	100 \pm 2	0,75 \pm 0,06 [#]	2
$M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$	7,17 \pm 0,09	0 \pm 3	79 \pm 3 [*]	0,77 \pm 0,13	2

Tabelle 39: Kenngrößen \pm Standardfehler der gemittelten Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 45. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$ ($M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$) und auf einer Kurvenanpassung mit einem freilaufenden Hill-Koeffizienten für den M_2 wt. **pEC₅₀:** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [^{35}S]GTP γ S-Bindung hervorruft. **Basalwert:** Basale, Agonist-unabhängige [^{35}S]GTP γ S-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{max}:** Maximale [^{35}S]GTP γ S-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden M_2 -Wildtyp-Kenngröße (t-Test, $p < 0,05$)

signifikant bessere Anpassung mit variablem Hill-Koeffizienten (F-Test, $p < 0,05$)

Mit Hilfe des t-Tests wurde festgestellt, dass sich das obere Plateau, das für die Konzentrations-Effekt-Kurve am $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$ -Rezeptor gefunden (79 \pm 3 %) wurde, signifikant vom Wildtyp, dessen oberes Plateau bei der Normierung auf 100 % festgesetzt wurde, unterschied. Antony hatte in seinen Untersuchungen (Dissertationsschrift, 2007) mittels Radioligand-Bindungsstudien einen Affinitätsverlust von Acetylcholin durch den Austausch von $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$ gefunden (pK_{app} M_2 wt: 7,59 \pm 0,07; pK_{app} $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$:

6,14 ± 0,06) und die Hypothese aufgestellt, dass die Einführung des Glutamins sich störend auswirken könnte.

3.3.3.2 Einfluss der Punktmutation $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$ auf die Pilocarpin-induzierte $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung

Des Weiteren wurde der Einfluss der Punktmutation $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$ auf die Pilocarpin-induzierte $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung untersucht. Abbildung 46 zeigt die zugehörigen Konzentrations-Effekt-Kurven. Die pharmakologischen Parameter sind Tabelle 40 zu entnehmen.

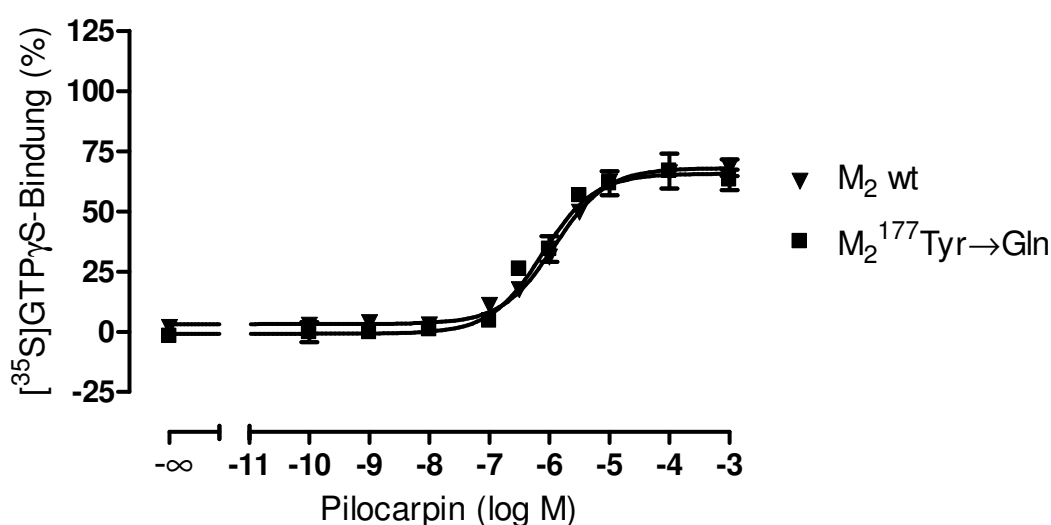


Abbildung 46: Vergleich von Pilocarpin-induzierter $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung an Membransuspensionen aus Flp-CHO- M_2 -Zellen und Flp-CHO- $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$ -Zellen. **Ordinate:** Prozentuale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Kontroll-Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve am M_2 -Wildtyp. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = 1$. **Datenpunkte:** Mittelwerte ± Standardfehler aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC_{50}	Basalwert (%)	E_{max} (%)	n_H (frei)	n
M_2 wt	5,91 ± 0,05	3 ± 1	68 ± 1	0,94 ± 0,11	3
$M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$	6,11 ± 0,10	-1 ± 2	66 ± 2	1,05 ± 0,22	3

Tabelle 40: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 46. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$. **pEC_{50} :** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung hervorruft. **Basalwert:** Basale, Agonist-unabhängige $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{max} :** Maximale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

Die G-Protein-Aktivierung durch den Partialagonisten Pilocarpin zeigte keine signifikante Abhängigkeit vom allosterischen Kernepitop $M_2^{177}\text{Tyr}$. Auch eine Veränderung der Funktionalität, hergeführt durch den Austausch von Tyrosin zur korrespondierenden M_5 Aminosäure Glutamin, hatte keinen Einfluss auf die charakteristischen Parameter der Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin.

3.3.3.3 $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsexperimente mit stabil transfizierten $M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren

Durch zielgerichtete Mutagenese war in der M_2 -Rezeptor DNA die Aminosäure 423 Threonin gegen Alanin ausgetauscht worden. An Membranhomogenaten aus stabil transfizierten $M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{Ala}$ -Zellen wurden die Versuche dieses Unterkapitels durchgeführt.

3.3.3.3.1 Einfluss der Punktmutation $M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{Ala}$ auf die Iperoxo-induzierte $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung

In Abbildung 47 sind die Konzentrations-Effekt-Kurven von Iperoxo an $M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{Ala}$ -Zellen im Vergleich zum M_2 Wildtyp dargestellt.

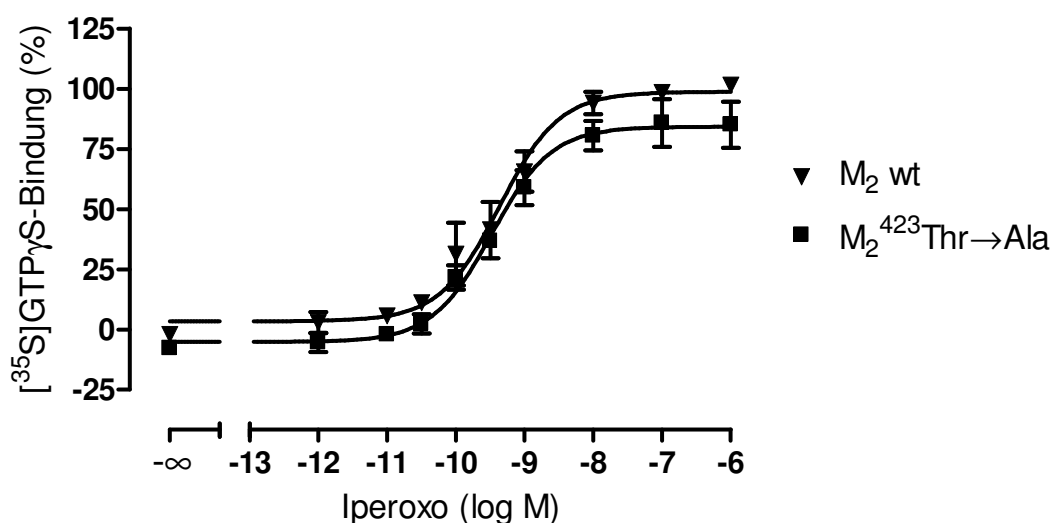


Abbildung 47: Vergleich von Iperoxo-induzierter $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung an Membransuspensionen aus Flp-CHO- M_2 -Zellen und Flp-CHO- $M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{Ala}$ -Zellen. **Ordinate:** Prozentuale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve am M_2 -Wildtyp. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = 1$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC ₅₀	Basalwert (%)	E _{max} (%)	n _H (frei)	n
M ₂ wt	9,37 ± 0,10	3 ± 3	99 ± 4	0,79 ± 0,13	2
M ₂ ⁴²³ Thr→Ala	9,48 ± 0,08	-5 ± 3	84 ± 3	0,80 ± 0,14	2

Tabelle 41: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 47. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von n_H = 1. **pEC₅₀:** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung hervorruft. **Basalwert:** Basale, Agonist-unabhängige [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{max}:** Maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

Durch die Punktmutation M₂⁴²³Thr→Ala, die sich im Bereich der allosterischen Bindungsstelle befindet, wurde der Effekt von Iperoxo am M₂-Rezeptor nicht verändert. Die in Tabelle 41 gezeigten Parameter der Rezeptormutante M₂⁴²³Thr→Ala unterscheiden sich nicht signifikant vom Wildtyp.

3.3.3.2 Einfluss des Punktmutation M₂⁴²³Thr→Ala auf die McN-A-343-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung

Der Partialagonist McN-A-343 sollte auf Abhängigkeit vom Epitop M₂⁴²³Thr untersucht werden. Valant et al. (2008) konnten zeigen, dass der bei Mutation der allosterischen Epitope gefundene Anstieg an intrinsischer Aktivität an der Doppelmutante M₂¹⁷⁷Tyr→Ala + ⁴²³Thr→Ala alleine durch die Mutation M₂¹⁷⁷Tyr→Ala erklärt werden konnte.

Bei Messungen zur ERK-Phosphorylierung war keine Abhängigkeit der intrinsischen Aktivität vom Epitop M₂⁴²³Thr nachzuweisen (Valant et al., 2008). Dies stimmt überein mit den Ergebnissen der [³⁵S]GTPγS-Bindungsuntersuchungen dieser Arbeit, wie Abbildung 48 zeigt. Keine der entsprechenden Kenngrößen der Konzentrations-Effekt-Kurven an der M₂⁴²³Thr→Ala Mutante unterschied sich signifikant vom Wildtyp (siehe Tabelle 42).

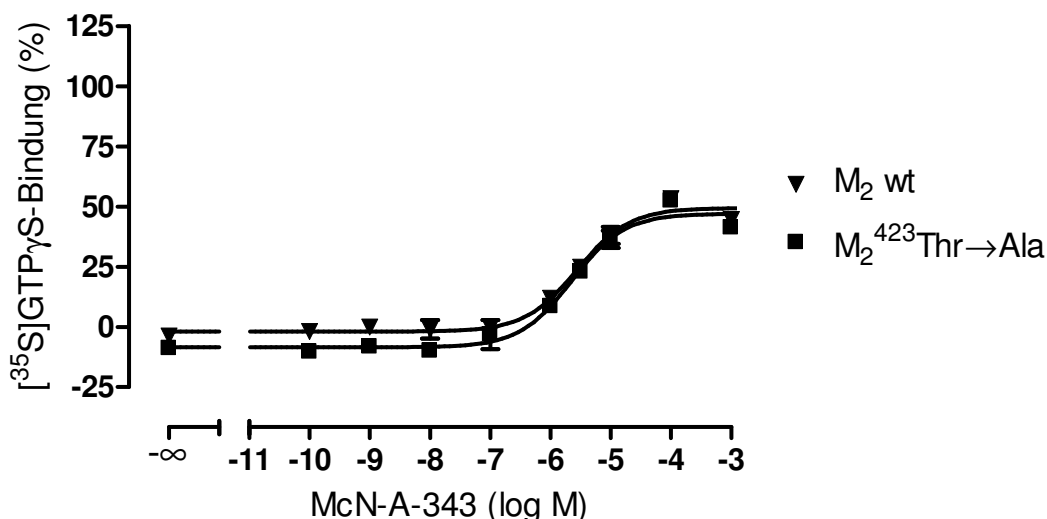


Abbildung 48: Vergleich von McN-A-343-induzierter [³⁵S]GTPγS-Bindung an Membransuspensionen aus Flp-CHO-M₂-Zellen und Flp-CHO-M₂⁴²³Thr→Ala-Zellen. **Ordinate:** Prozentuale [³⁵S]GTPγS-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurve am M₂-Wildtyp. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), konstanter Hill-Koeffizient von n_H = 1. **Datenpunkte:** Mittelwerte ± Standardfehler aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC ₅₀	Basalwert (%)	E _{max} (%)	n _H (frei)	n
M ₂ wt	5,56 ± 0,08	-2 ± 1	49 ± 2	1,06 ± 0,20	2
M ₂ ⁴²³ Thr→Ala	5,64 ± 0,10	-9 ± 2	47 ± 2	0,98 ± 0,23	2

Tabelle 42: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten McN-A-343-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 48. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von n_H = 1. **pEC₅₀:** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung hervorruft. **Basalwert:** Basale, Agonist-unabhängige [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{max}:** Maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

3.3.4 Beeinflussung der [³⁵S]GTPγS-Bindung durch Veränderung der Konzentration an Na⁺ Ionen

Für monovalente Kationen ist ein starker Einfluss auf die [³⁵S]GTPγS-Bindung bekannt (Horstman et al., 1990; Hilf und Jakobs, 1992; Ananthanarayanan und Kerman, 2006). Eine Bindung an konservierte Aspartat-Reste in den Transmembranhelices II und III wird postuliert, die zu einer Entkopplung der Rezeptor-G-Protein-Komplexe führt und somit in einer Verminderung der basalen GTP-Bindung resultiert.

Da der vollinversagonistische Effekt des Atropins am M₂-Rezeptor bereits bekannt war (Dissertationsschrift Eckstein, 2004), wurde eine rezeptorsättigende Konzentration

(0,001 mM) eingesetzt, um die Rezeptor-unabhängige [³⁵S]GTPγS-Bindung zu bestimmen. Die konstitutive Aktivität der Rezeptoren wurde in Abwesenheit eines Liganden bestimmt. Zur Überprüfung der maximalen Aktivität wurde der endogene Vollagonist Acetylcholin (100 mM) verwendet. Die Abhängigkeit der drei Bindungsniveaus (minimale, spontane und maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung) von der Na⁺-Ionenkonzentration sollte überprüft werden. Dazu wurde der Einfluss steigender Konzentrationen NaCl auf die [³⁵S]GTPγS-Bindung an M₂-Rezeptoren untersucht. Außerdem wurden die Untersuchungen auf punktmutierte M₂-Rezeptoren erweitert, bei denen das Tryptophan in Position 422 gegen Alanin ausgetauscht worden war. Es sollte festgestellt werden, inwieweit das Verhältnis der Bindungsniveaus verändert war und ob das Auftreten der spontanen [³⁵S]GTPγS-Bindung in Abhängigkeit der Na⁺ Konzentration verändert war, im Vergleich zum Wildtyprezeptor.

Abbildung 49 zeigt die Beeinflussung der [³⁵S]GTPγS-Bindungs-Niveaus durch steigende Konzentration an Na⁺ Ionen an Membranhomogenaten aus CHO-M₂-Zellen. In Abbildung 50 sind die gleichen Versuche, die jedoch an Membranhomogenaten aus den im Rahmen dieser Arbeit generierten Flp-CHO-M₂-Zellen durchgeführt worden sind, dargestellt. Die Vorversuche zur Validierung dieser neuen Expressionszelllinie sind in Kapitel 3.1.1 gezeigt. Auch die hier gezeigten Befunde zeigen keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Aktivierbarkeiten und Inaktivierbarkeiten der neuen und alten M₂-Rezeptor Expressionszelllinien. Bei der geringsten vermessene NaCl Konzentration (4 mM) fällt auf, dass es bei den Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen zu einem Überlappen der basalen Bindung und der Acetylcholin-induzierten Bindung kam. Bei Betrachtung der aus Flp-CHO-Zellen gewonnenen M₂-Rezeptoren war der basale Wert numerisch immer kleiner als der Acetylcholin-induzierte Wert. Eine statistische Auswertung zeigte bei einer Überschreitungswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ (t-Test) jedoch keine signifikanten Abweichungen. Weder die Versuche an Membranpräparationen aus CHO-M₂-Zellen (Abbildung 49) noch aus Flp-CHO-M₂-Zellen (Abbildung 50) zeigten bei 4 mM Na⁺, dass eine über die basale Bindung hinausgehende, Agonist-vermittelte Steigerung der [³⁵S]GTPγS-Bindung möglich war (CHO-M₂: basal 101 ± 6 %; Acetylcholin-Wert 98 ± 2 %; Flp-CHO-M₂: basal 89 ± 5 %, Acetylcholin-Wert 99 ± 1 %, alle Werte nicht signifikant, t-Test, $p < 0,05$). Alle erreichbaren Rezeptoren lagen somit gekoppelt an G-Proteine vor, ohne Bindung eines Agonisten. Diese vollständige, konstitutive Rezeptoraktivität konnte durch Steigerung der NaCl Konzentration bis auf 20 ± 3 % (CHO-M₂) bzw. 17 ± 3 % (Flp-CHO-M₂) bei 104 mM NaCl gesenkt werden (Werte nicht signifikant, t-Test, $p < 0,05$).

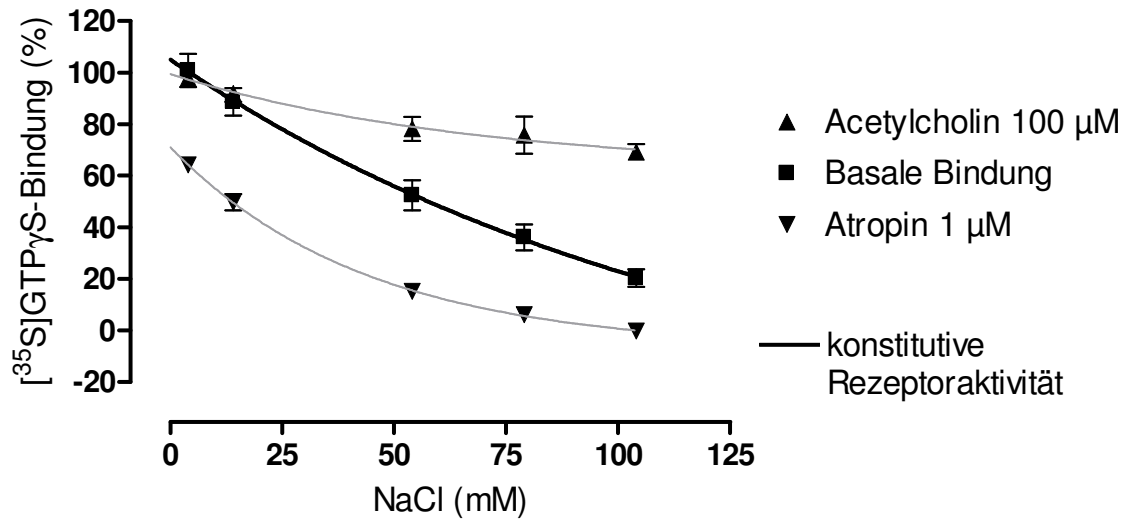


Abbildung 49: Einfluss der NaCl Konzentration auf die Rezeptor-unabhängige (in Anwesenheit von Atropin, 1 μM), die basale bzw. die Vollagonist-induzierte [^{35}S]GTP γS -Bindung (durch Acetylcholin, 100 μM) an Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen. **Ordinate:** G-Protein-vermittelte [^{35}S]GTP γS -Bindung in Prozent: 0 % entspricht der [^{35}S]GTP γS -Bindung durch Atropin 1 μM bei einer maximalen Konzentration von NaCl (104 mM), 100 % entspricht der (extrapolierten) [^{35}S]GTP γS -Bindung durch Acetylcholin 100 μM , in Abwesenheit von NaCl (0 mM). **Abszisse:** NaCl Konzentration. **Kurvenanpassung:** Einphasiger exponentieller Zerfall. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung ausgeführt wurden.

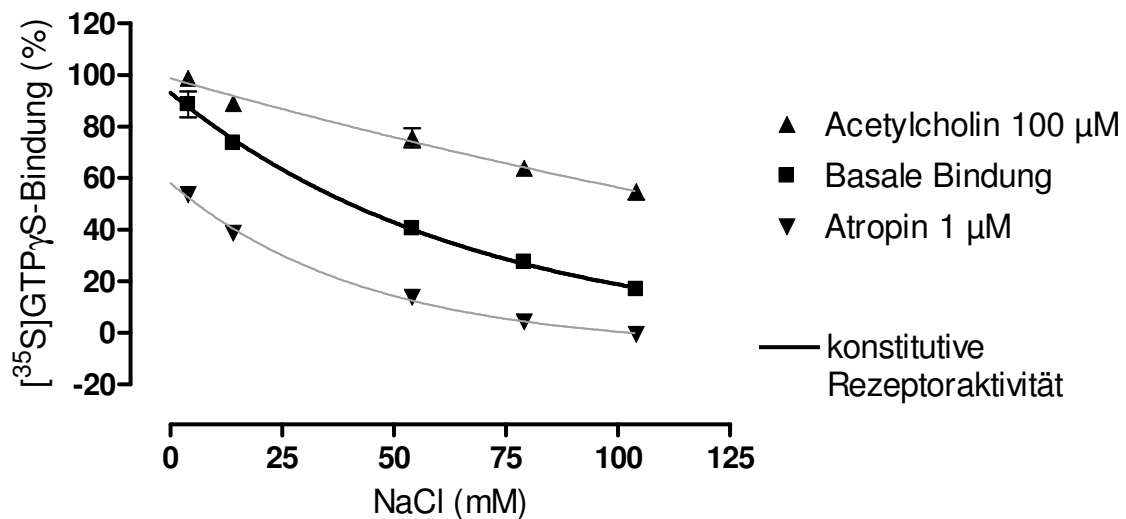


Abbildung 50: Einfluss der NaCl Konzentration auf die Rezeptor-unabhängige (in Anwesenheit von Atropin, 1 μM), die basale bzw. die Vollagonist-induzierte [^{35}S]GTP γS -Bindung (durch Acetylcholin, 100 μM) an Membransuspensionen aus Flp-CHO-M₂-Zellen. **Ordinate:** G-Protein-vermittelte [^{35}S]GTP γS -Bindung in Prozent: 0 % entspricht der [^{35}S]GTP γS -Bindung durch Atropin 1 μM bei einer maximalen Konzentration von NaCl (104 mM), 100 % entspricht der (extrapolierten) [^{35}S]GTP γS -Bindung durch Acetylcholin 100 μM , in Abwesenheit von NaCl (0 mM). **Abszisse:** NaCl Konzentration. **Kurvenanpassung:** Einphasiger exponentieller Zerfall. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung ausgeführt wurden.

Abbildung 51 zeigt den Einfluss der NaCl Konzentration auf die Rezeptor-unabhängige (in Anwesenheit von Atropin, 1 μM), die basale bzw. die Vollagonist-induzierte [^{35}S]GTP γS -Bindung (durch Acetylcholin, 100 μM) an Membransuspensionen aus Flp-CHO-M $_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Zellen.

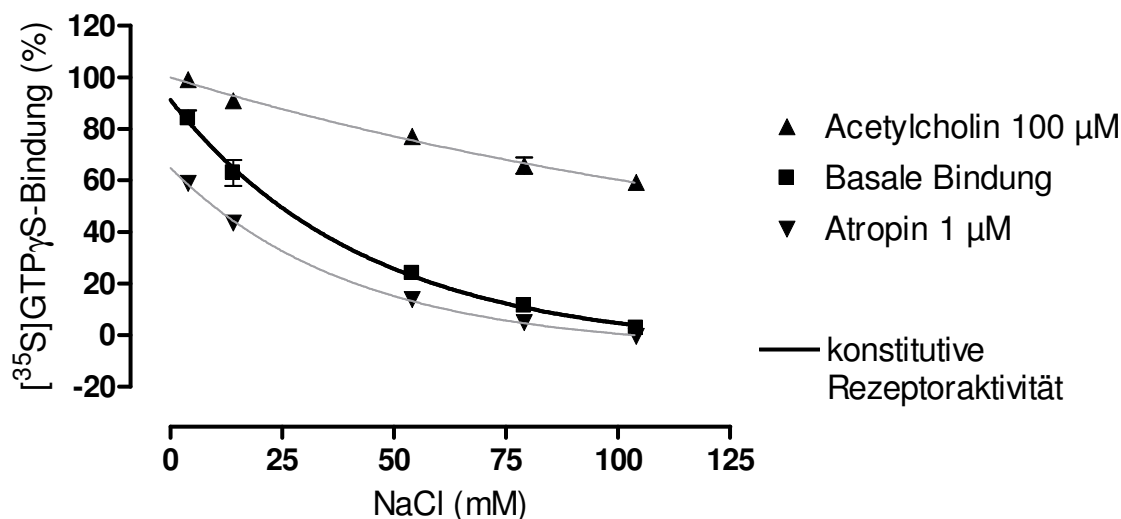


Abbildung 51: Einfluss der NaCl Konzentration auf die Rezeptor-unabhängige (in Anwesenheit von Atropin, 1 μM), die basale bzw. die Vollagonist-induzierte [^{35}S]GTP γS -Bindung (durch Acetylcholin, 100 μM) an Membransuspensionen aus Flp-CHO-M $_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Zellen. **Ordinate:** G-Protein-vermittelte [^{35}S]GTP γS -Bindung in Prozent: 0 % entspricht der [^{35}S]GTP γS -Bindung durch Atropin 1 μM bei einer maximalen Konzentration von NaCl (104 mM), 100 % entspricht der (extrapolierten) [^{35}S]GTP γS -Bindung durch Acetylcholin 100 μM , in Abwesenheit von NaCl (0 mM). **Abszisse:** NaCl Konzentration. **Kurvenanpassung:** Einphasiger exponentieller Zerfall. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung ausgeführt wurden.

Beim Vorliegen eines Milieus mit niedrigem Na $^+$ Gehalt ist der Level an konstitutiver Rezeptoraktivität auf einem deutlich niedrigeren Niveau am hM $_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor. In Anwesenheit der höchsten Na $^+$ -Konzentration (104 mM) ist keine messbare Spontanaktivität nachweisbar (Atropin-Wert: 0, basal: 3 ± 2 %, nicht signifikant, t-Test, $p < 0,05$). Unter diesen Bedingungen ist die maximale Agonist-induzierte [^{35}S]GTP γS -Bindung im Vergleich zum Wildtyp jedoch unverändert. Der Acetylcholin-Wert an der Mutante hM $_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ (59 ± 3 %) unterscheidet sich nicht signifikant vom Wildtyp (55 ± 3 %). Diese Befunde gehen einher mit den nicht verschiedenen Maximalwerten der Konzentration-Effekt-Kurven der Vollagonisten aus Kapitel 3.3.1.

3.3.5 Inverser Agonismus

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren können spontan eine aktive Konformation annehmen, wodurch es auch in Abwesenheit von Agonisten zu einer G-Protein-Aktivierung kommen kann (Costa et al., 1992; Milligan et al., 1995; Tuček, 1997; Kenakin, 1997). Unter anderem ist der Anteil der spontan aktiven Rezeptoren von der Konzentration einwertiger Kationen im Puffer (siehe 3.3.4) abhängig. Die konstitutive Aktivität kann durch inverse Agonisten herabgesetzt werden, da sie die Rezeptoren in der inaktiven Konformation stabilisieren (Kenakin, 2002). Für den orthosterischen Standard-Agonisten Atropin war ein invers-agonistischer Effekt bekannt (Hilf und Jakobs, 1992; Jakubík et al., 1995; Dissertationsschrift Eckstein, 2004). Deshalb konnte in den folgenden Versuchen Atropin (Konzentration 1 μ M) genutzt werden, um die Muskarinrezeptor-unabhängige [35 S]GTP γ S-Bindung zu bestimmen. Somit konnte eine Normierung der Versuche auf den Effekt eines inversen Vollagonisten erfolgen. Die Versuche wurden im Inkubationspuffer C (L16) bei einem Na $^{+}$ Restgehalt von 4 mM durchgeführt.

Es zeigte sich jedoch im Verlauf der experimentellen Arbeiten dieser Dissertation, dass das Ausmaß an konstitutiver Rezeptoraktivität außer von der Na $^{+}$ -Ionen Konzentration des Puffers noch von anderen Faktoren beeinflusst wurde. Hierfür sprach auch, dass der standardmäßig verwendete HEPES-Inkubationspuffer A (Na $^{+}$ Konzentration: 100 mM) an einem Teil der Versuchstage (siehe 3.2.1 und 3.3.1.2.2.1) ebenfalls zu einer hohen spontanen Aktivität der Rezeptoren beitrug. Auch in der Literatur sind unterschiedliche Ergebnisse zur spontanen Aktivität von M $_2$ -Rezeptoren zu finden: Lazareno und Birdsall (1993) berichten von einem neutralen Antagonismus von Atropin, Hilf und Jakobs (1992), Jakubík et al. (1998) und Zahn et al. (2002) fanden einen inversen Agonismus.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnte die Ursache für die starken Unterschiede zwischen den Messungen nicht bestimmt werden. Festzustellen war, dass die verwendeten Zellhomogenate und Testsubstanzen keinen Einfluss hatten, sodass eine Komponente des Versuchsansatzes oder des Messgeräts ursächlich sein musste. Im Rahmen der Diplomarbeit von Harm Michalski (2009) wurde der Einfluss folgender Parameter untersucht: Einsatz von hochreinem Wasser zur Herstellung des Puffers, Substitution von NaCl durch KCl, Substitution von NaCl durch Saccharose, Variation der GDP-Konzentration. Außerdem wurde von Dorina Kaufel der kinetische Verlauf der [35 S]GTP γ S-Bindung untersucht (mündliche Mitteilung). In der Literatur wird berichtet, dass basale und Agonist-induzierte [35 S]GTP γ S-Bindung unterschiedlichen Kinetiken folgen (Senogles et al., 1990; Munshi et al., 1991; Negishi et al.,

1993). Der Grund für die starken Schwankungen der konstitutiven Rezeptoraktivität konnte bisher nicht ermittelt werden.

Um ein robusteres Versuchssystem zu erhalten, wurde versucht durch eine Erhöhung der zur Verfügung stehenden $G_{i\alpha}$ -Untereinheiten zu einer Erhöhung der spontanen Rezeptor-G-Protein-Kopplung beizutragen. Dazu wurde eine zusätzliche transiente Transfektion mit $G_{i\alpha}$ in Flp-CHO- M_2 -Zellen durchgeführt. Durch die Überexpression zeigte sich jedoch kein veränderter Effekt.

Die im Folgenden abgebildeten Ergebnisse zu Untersuchungen des inversen Agonismus von allosterischen Modulatoren und allosterisch-orthosterischen Hybriden basieren teilweise auf einer kleinen Anzahl an Wiederholungen. Wie oben dargelegt, konnte kein stabiles Messsystem für inverse Agonisten etabliert werden. Dies führte zu Problemen bei der Reproduzierbarkeit der Versuche. An allen Versuchstagen wurde jedoch Atropin als bereits bekannter inverser Vollagonist mitgeführt. Es wurden nur Experimente in die Auswertung mit einbezogen, an denen Atropin eine starke Absenkung der basalen Bindung herbeiführte. Die Validität der abgebildeten Daten ist somit sichergestellt, da keine absolute Absenkung dargestellt wurde, sondern eine Normierung auf Atropin erfolgte.

3.3.5.1 Allosterische Modulatoren

3.3.5.1.1 Effekt von W84 auf die basale [35 S]GTP γ S-Bindung

Für den allosterischen Modulator W84 war aus Literaturdaten eine, orthosterischen Agonisten entgegengesetzte, intrinsische Aktivität bekannt (Hilf und Jakobs, 1992). Im vorliegenden Test-System sollte mittels [35 S]GTP γ S-Bindungsexperimenten der Einfluss auf die konstitutive Aktivität, die durch den Verzicht auf Na^+ stark erhöht war, untersucht werden. Abbildung 52 zeigt den konzentrationsabhängigen Effekt von W84 auf die basale [35 S]GTP γ S-Bindung. Die pharmakologischen Kenngrößen sind in Tabelle 43 aufgeführt.

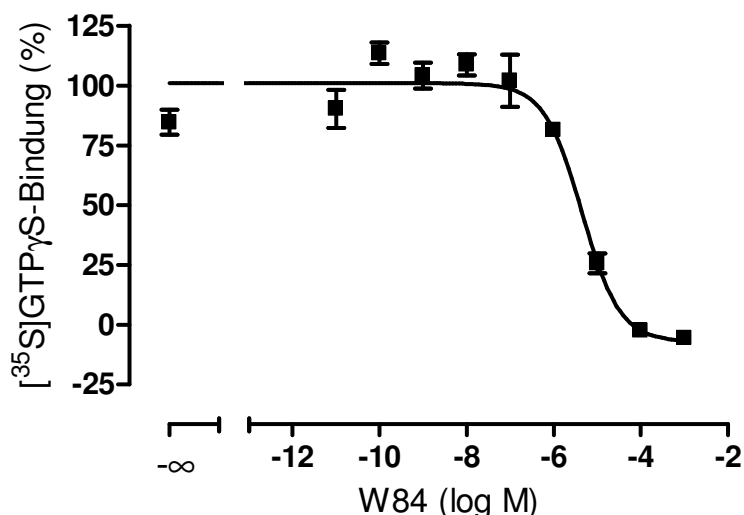


Abbildung 52: Senkung der basalen [^{35}S]GTP γ S-Bindung durch W84 an Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen. **Ordinate:** G-Protein-vermittelte [^{35}S]GTP γ S-Bindung in Prozent: 0 % entspricht der Rezeptor-unabhängigen [^{35}S]GTP γ S-Bindung (in Anwesenheit von Atropin, 1 μM). 100 % entspricht dem oberen Plateau der W84-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der W84-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), konstanter Hill-Koeffizient von $n_{\text{H}} = -1$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC_{50}	E_{max} (%)	E_{min} (%)	n_{H} (frei)	n
W84	$5,35 \pm 0,14$	101 ± 3	-7 ± 7	$-1,07 \pm 0,28$	3

Tabelle 43: Kenngrößen \pm Standardfehler der gemittelten W84-Konzentrations-Effekt-Kurve aus Abbildung 52. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von $n_{\text{H}} = -1$. **pEC_{50} :** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des inversen Agonisten, die eine halbmaximale [^{35}S]GTP γ S-Bindung hervorruft. **E_{max} :** Maximale [^{35}S]GTP γ S-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{min} :** Minimale [^{35}S]GTP γ S-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_{H} (frei):** Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. **n :** Anzahl unabhängiger Experimente.

Der erhaltene pEC_{50} -Wert konnte als Annäherung an die Affinität von W84 zu orthosterisch unbesetzten M₂-Rezeptoren, bei denen das Gleichgewicht zwischen aktiver und inaktiver Rezeptorkonformation fast vollständig auf der aktiven Seite liegt, betrachtet werden. Ein Vergleich mit Affinitäten aus Bindungsdaten war schwierig: Die bisher in der Arbeitsgruppe unter Gleichgewichtsbedingungen durchgeführten Radioligand-Bindungsstudien mit [^3H]NMS führten zu Affinitätswerten der Allosterie (pK_{A} -Werte = Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten) am freien, nicht Orthoster-besetzten Rezeptor. Allerdings war bei dem z.B. von Strassmann (Dissertationsschrift, 2008) verwendeten HEPES-Puffersystem eine Konzentration von 100 mM NaCl anwesend, sodass davon auszugehen ist, dass das Gleichgewicht zwischen aktiver und inaktiver Rezeptorkonformation auf die inaktive Seite verschoben ist. Der hier gefundene pEC_{50} -Wert ($5,35 \pm 0,14$) weicht signifikant vom

pK_A -Wert ($6,60 \pm 0,03$), der von Strassmann gefunden wurde, ab. Neben der unterschiedlichen NaCl Konzentration wurden als zweiter variierender Parameter COS7-Zellen (hepatische Fibroblasten der Grünen Meerkatze) verwendet. Dorina Kaufel (mündliche Mitteilung) fand an Membranhomogenaten aus CHO-M₂-Zellen in HEPES-Puffer (100 mM NaCl) einen pK_A -Wert von $6,14 \pm 0,16$, der sich ebenfalls signifikant vom hier gefundenen Wert unterscheidet. Bei Bestimmung der Affinität von W84 zum Acetylcholin-besetzten Rezeptor durch [³⁵S]GTP γ S-Bindungs-Experimente, in denen der Einfluss von W84 auf die Acetylcholin-induzierte [³⁵S]GTP γ S-Bindung untersucht wurde, führte zu einem Wert von $6,40 \pm 0,09$ (Jäger et al., 2007). Obwohl auch hier durch den Vollagonisten der aktive Rezeptorzustand stabilisiert vorliegt, stimmt die bestimmte Affinität von W84 nicht gut mit dem im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Wert überein. Zu beachten ist, dass die Versuche in einer anderen Pufferzusammensetzung durchgeführt worden waren und dass es mehrere aktive Rezeptorkonformationen geben kann (Kenakin, 2003). Die spontan auftretende aktive Rezeptorkonformation könnte von der Agonist-induzierten und stabilisierten aktiven Rezeptorkonformation abweichen. Ein weiterer Vergleich soll mit den Daten von Großmüller (Dissertationsschrift, 2003) erhoben werden: In Bindungsuntersuchungen am [³H]Oxotremorin M besetzten Rezeptor wurde die Affinität von W84 in Na⁺, K⁺, P_i-Puffer bestimmt. Der Puffer enthielt 10 mM einwertige Kationen und ist in dieser Hinsicht ähnlich dem 4 mM HEPES Puffer. Der $pEC_{50, Diss}$ -Wert (als Maß für die Affinität eines allosterischen Modulators zu Ligand-besetzten Rezeptoren) wurde mit $5,77 \pm 0,12$ bestimmt und unterscheidet sich nicht signifikant vom pEC_{50} -Wert dieser Arbeit (t-Test, $p < 0,05$).

Das untere Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve liegt mit $-7 \pm 7 \%$ auf dem gleichen Niveau wie die Muskarinrezeptor-unabhängige [³⁵S]GTP γ S-Bindung in Anwesenheit von Atropin (1 μ M). Ein durchgeführter t-Test ($p < 0,05$) zeigte keinen Unterschied, sodass der allosterische Ligand W84 im vorliegenden Testsystem einen inversen Vollagonisten darstellt.

3.3.5.1.2 Effekt von Naphmethonium auf die basale [³⁵S]GTP γ S-Bindung

Naphmethonium, ein Derivat von W84, sollte ebenfalls bezüglich seines Effekts auf die basale [³⁵S]GTP γ S-Bindung untersucht werden. Die Konzentrations-Effekt-Kurve ist in Abbildung 53 gezeigt, die zugehörigen Kenngrößen in Tabelle 44.

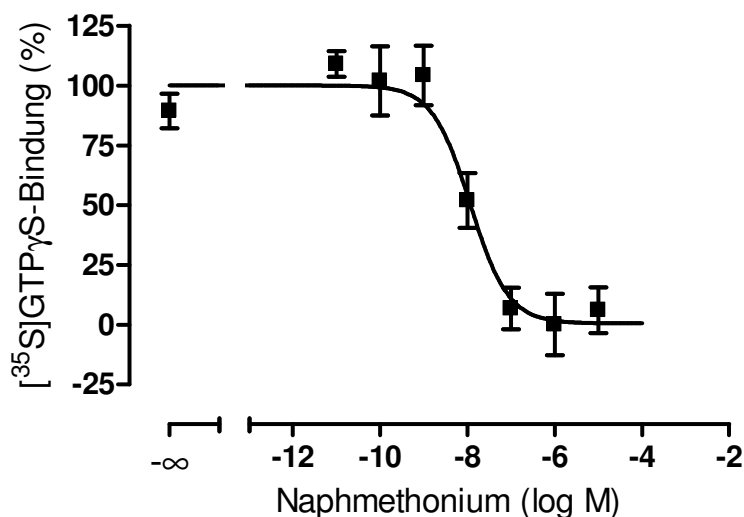


Abbildung 53: Senkung der basalen [³⁵S]GTPγS-Bindung durch Naphmethonium an Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen. **Ordinate:** G-Protein-vermittelte [³⁵S]GTPγS-Bindung in Prozent: 0 % entspricht der Rezeptor-unabhängigen [³⁵S]GTPγS-Bindung (in Anwesenheit von Atropin, 1 μM). 100 % entspricht dem oberen Plateau der Naphmethonium-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Naphmethonium-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), konstanter Hill-Koeffizient von n_H = -1. **Datenpunkte:** Mittelwerte ± Standardfehler aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC ₅₀	E _{max} (%)	E _{min} (%)	n _H (frei)	n
Naphmethonium	7,94 ± 0,20	100 ± 5	1 ± 7	-5,66 ± 50000	2

Tabelle 44: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Naphmethonium-Konzentrations-Effekt-Kurve aus Abbildung 53. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von n_H = -1. **pEC₅₀:** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des inversen Agonisten, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung hervorruft. **E_{max}:** Maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{min}:** Minimale [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

Wie zuvor für W84 gezeigt, konnte auch Naphmethonium die basale [³⁵S]GTPγS-Bindung bis auf das Niveau der M-Rezeptor-unabhängigen [³⁵S]GTPγS-Bindung (in Anwesenheit von Atropin, 1 μM) senken und besaß somit volle inversagonistische Aktivität an M₂-Rezeptoren. Der pEC₅₀-Wert von Naphmethonium wurde mit 7,94 ± 0,20 bestimmt und unterschied sich damit bedeutsam vom pEC₅₀-Wert von W84 (5,35 ± 0,14). Systematische Strukturveränderungen am W84-Molekül hatten zur Testsubstanz Naphmethonium geführt, einem allosterischen Modulator, der auch in Bindungsuntersuchungen durch eine besonders hohe Affinität zum M₂-Rezeptor im Vergleich zur Muttersubstanz auffiel. Die Affinität zum [³H]N-Methylscopolamin besetzten Rezeptor stieg von pEC_{50Diss(W84)} = 5,87 ± 0,06 auf pEC_{50Diss(Naphmethonium)} = 7,41 ± 0,09 (Muth et al., 2003). Prilla (Dissertationsschrift, 2007) bestimmte abweichende Affinitäten: pEC_{50Diss(W84)} = 7,40 ± 0,03; pEC_{50Diss(Naphmethonium)} =

$9,04 \pm 0,04$. Die Differenz liegt jedoch in einer ähnlichen Größenordnung. Zusätzlich zeichnete sich Naphmethonium als Förderer der Bindung des antagonistischen Radioliganden [^3H]N-Methylscopolamin aus.

3.3.5.1.3 Effekt von Seminaph auf die basale [^{35}S]GTP γS -Bindung

Seminaph (frühere Bezeichnung: MM7A) sollte als verkürztes Derivat des Naphmethoniums auf negative intrinsische Aktivität untersucht werden. Dies war von besonderem Interesse, da strukturell Seminaph als allosterischer Baustein im Hybrid 2 vertreten ist. Die Konzentrations-Effekt-Kurve ist in Abbildung 54 gezeigt.

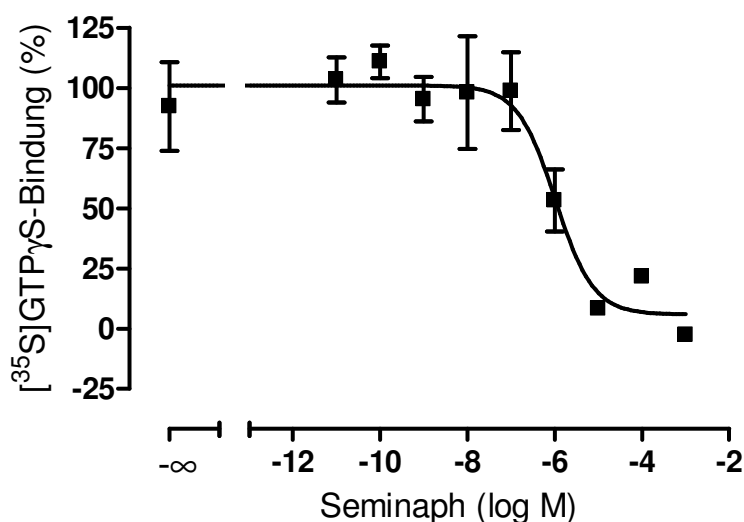


Abbildung 54: Senkung der basalen [^{35}S]GTP γS -Bindung durch Seminaph an Membransuspensionen aus CHO-M $_2$ -Zellen. **Ordinate:** G-Protein-vermittelte [^{35}S]GTP γS -Bindung in Prozent: 0 % entspricht der Rezeptor-unabhängigen [^{35}S]GTP γS -Bindung (in Anwesenheit von Atropin, 1 μM). 100 % entspricht dem oberen Plateau der Seminaph-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Seminaph-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = -1$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC_{50}	E_{max} (%)	E_{min} (%)	n_H (frei)	n
Seminaph	$5,99 \pm 0,24$	101 ± 5	6 ± 11	$-2,08 \pm 6,14$	2

Tabelle 45: Kenngrößen \pm Standardfehler der gemittelten Seminaph-Konzentrations-Effekt-Kurve aus Abbildung 54. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = -1$. **pEC $_{50}$:** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des inversen Agonisten, die eine halbmaximale [^{35}S]GTP γS -Bindung hervorruft. **E $_{\text{max}}$:** Maximale [^{35}S]GTP γS -Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E $_{\text{min}}$:** Minimale [^{35}S]GTP γS -Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n $_H$ (frei):** Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

In Bindungsstudien (Dissertationsschrift Prilla, 2007) war die bestimmte Rezeptor-Affinität durch Verkürzung des Naphmethoniums stark herabgesetzt: $pEC_{50Diss(Naphmethonium)} = 9,04 \pm 0,04$; $pEC_{50Diss(Seminaph)} = 6,31 \pm 0,05$.

3.3.5.1.4 Effekt von Duo3 auf die basale [³⁵S]GTP γ S-Bindung

Die Oximverbindung Duo3 wurde als atypischer allosterischer Modulator klassifiziert (Dissertationsschrift Linsel, 2008). Es sollte untersucht werden, ob die Testsubstanz trotz der postulierten Bindung an eine andere allosterische Bindungsstelle (Voigtländer et al., 2003; Huang et al., 2005; Tränkle et al., 2005) ebenfalls invers agonistisches Verhalten zeigt.

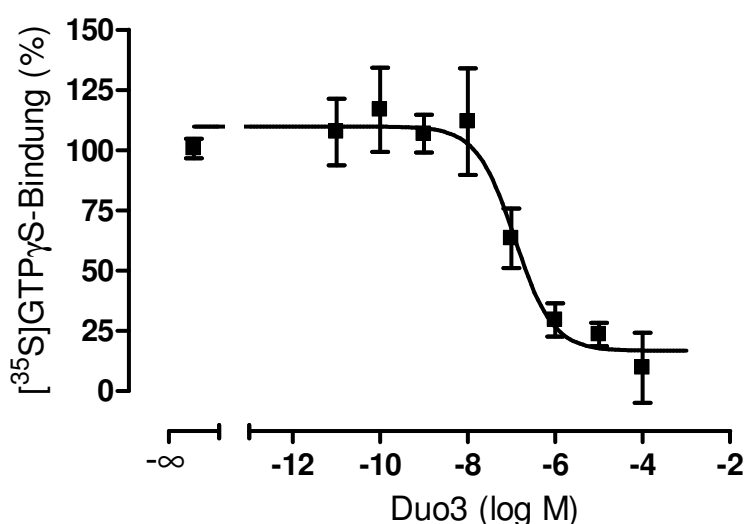


Abbildung 55: Senkung der basalen [³⁵S]GTP γ S-Bindung durch Duo3 an Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen. **Ordinate:** G-Protein-vermittelte [³⁵S]GTP γ S-Bindung in Prozent: 0 % entspricht der Rezeptor-unabhängigen [³⁵S]GTP γ S-Bindung (in Anwesenheit von Atropin, 1 μ M). 100 % entspricht dem oberen Plateau der Duo3-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Duo3-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = -1$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC_{50}	E_{max} (%)	E_{min} (%)	n_H (frei)	n
Duo3	$6,92 \pm 0,24$	110 ± 6	17 ± 7	$-1,20 \pm 0,85$	3

Tabelle 46: Kenngrößen \pm Standardfehler der gemittelten Duo3-Konzentrations-Effekt-Kurve aus Abbildung 55. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = -1$. **pEC_{50} :** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des inversen Agonisten, die eine halbmaximale [³⁵S]GTP γ S-Bindung hervorruft. **E_{max} :** Maximale [³⁵S]GTP γ S-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{min} :** Minimale [³⁵S]GTP γ S-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

Das untere Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve von Duo3 unterscheidet sich nicht signifikant von der Rezeptor-unabhängigen [³⁵S]GTP γ S-Bindung in Anwesenheit von Atropin

(1 μM). Auch der atypische allosterische Modulator zeigte in den vorliegenden Versuchen ein inversagonistisches Verhalten.

3.3.5.1.5 Effekt von Alcuronium auf die basale [^{35}S]GTP γS -Bindung

Die zuvor untersuchten allosterischen Modulatoren gehören zur Klasse der Alkan-Bisammonium-Verbindungen. Als strukturell verschiedene Testsubstanz wurde Alcuronium untersucht.

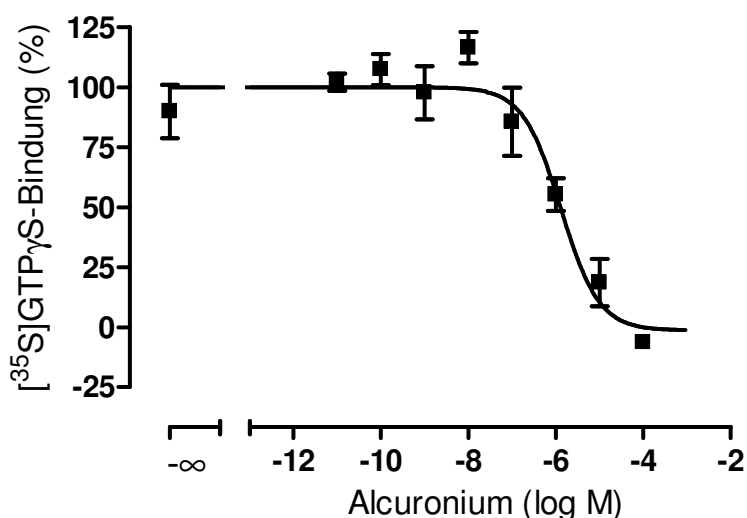


Abbildung 56: Senkung der basalen [^{35}S]GTP γS -Bindung durch Alcuronium an Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen. **Ordinate:** G-Protein-vermittelte [^{35}S]GTP γS -Bindung in Prozent: 0 % entspricht der Rezeptor-unabhängigen [^{35}S]GTP γS -Bindung (in Anwesenheit von Atropin, 1 μM). 100 % entspricht dem oberen Plateau der Alcuronium-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Alcuronium-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = -1$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus einem Experiment, das als Vierfachbestimmung durchgeführt wurde und einmal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt wurde.

	pEC_{50}	E_{max} (%)	E_{min} (%)	n_H (frei)	n
Alcuronium	$5,88 \pm 0,21$	100 ± 4	-1 ± 10	$-0,74 \pm 0,35$	1

Tabelle 47: Kenngrößen \pm Standardfehler der gemittelten Alcuronium-Konzentrations-Effekt-Kurve aus Abbildung 56. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = -1$. **pEC₅₀:** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des inversen Agonisten, die eine halbmaximale [^{35}S]GTP γS -Bindung hervorruft. **E_{max}:** Maximale [^{35}S]GTP γS -Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{min}:** Minimale [^{35}S]GTP γS -Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

Für Alcuronium wurde eine maximale Senkung der basalen [^{35}S]GTP γS -Bindung gefunden. Auch Jakubík et al. (1998) fanden für Alcuronium einen inversagonistischen Effekt, der genauso stark ausgeprägt war wie der von Atropin. Allerdings konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt vom Verhältnis zwischen Rezeptoren und G-Proteinen abhängt. Bei Vorliegen

des Verhältnisses 1:2 (Rezeptor : G-Protein) wurde der auch hier gefundene inversagonistische Effekt beobachtet. Bei einem hohen Überschuss an G-Proteinen (1:100) wurde eine schwache Rezeptor-Aktivierung durch Alcuronium beobachtet. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Expressionssystem ist nicht regulierbar oder induzierbar bezüglich der Proteinexpression von Rezeptoren oder G-Proteinen. Das vorliegende Verhältnis ist nicht bekannt, kann aber auf Grund des Vergleichs mit den Daten von Jakubík et al. (1998), anhand des charakteristischen Kurvenverlaufs von Alcuronium auf ca. 1:2 (Rezeptor : G-Protein) geschätzt werden.

3.3.5.2 Hybride aus Methylperoxo und allosterischen Modulatoren

Bei den Untersuchungen der Hybride Methylperoxo und W84 bzw. Naphmethonium (analog Hybrid 1 und 2) war aufgefallen, dass die Methylierung zu einem kompletten Verlust an intrinsischer Aktivität geführt hatte (siehe 3.2.3.2). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob nun der inversagonistische Effekt der Alloster-Bausteine auch im Hybridmolekül dominiert.

3.3.5.2.1 Effekt von MF-1 auf die basale [³⁵S]GTP γ S-Bindung

In Abbildung 57 ist der konzentrationsabhängige Effekt von MF-1 auf die basale [³⁵S]GTP γ S-Bindung dargestellt. Die Kenngrößen sind der Tabelle 48 zu entnehmen.

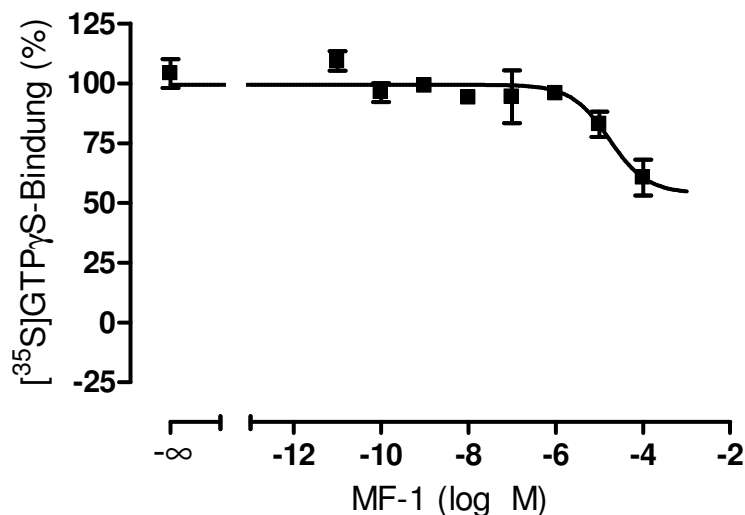


Abbildung 57: Senkung der basalen [³⁵S]GTP γ S-Bindung durch MF-1 an Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen. **Ordinate:** G-Protein-vermittelte [³⁵S]GTP γ S-Bindung in Prozent: 0 % entspricht der Rezeptor-unabhängigen [³⁵S]GTP γ S-Bindung (in Anwesenheit von Atropin, 1 μ M). 100 % entspricht dem oberen Plateau der MF-1-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der MF-1-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = -1$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC ₅₀	E _{max} (%)	E _{min} (%)	n _H (frei)	n
MF-1	4,78 ± 0,32	99 ± 2	54 ± 9*	-0,32 ± 0,42	2

Tabelle 48: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten MF-1-Konzentrations-Effekt-Kurve aus Abbildung 57. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = -1$. **pEC₅₀:** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des inversen Agonisten, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung hervorruft. **E_{max}:** Maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{min}:** Minimale [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

* signifikanter Unterschied zur Rezeptor-unabhängigen [³⁵S]GTPγS-Bindung (in Anwesenheit von Atropin, 1 μM) (t-Test, $p < 0,05$)

In den beiden höchsten eingesetzten Konzentrationen (10 und 100 μM) führte MF-1 zu einer signifikanten Senkung der basalen [³⁵S]GTPγS-Bindung. Bei rechnerischer Anpassung einer sigmoidalen Konzentrations-Effekt-Kurve liegt das untere Plateau bei $54 \pm 9 \%$ und ist damit signifikant verschieden vom Niveau der Rezeptor-unabhängigen [³⁵S]GTPγS-Bindung in Anwesenheit von (Atropin, 1 μM). Die Wirksamkeit des partiellen inversen Agonisten wurde mit $pEC_{50} = 4,78 \pm 0,32$ bestimmt.

3.3.5.2.2 Effekt von MF-2 auf die basale [³⁵S]GTPγS-Bindung

Der konzentrationsabhängige Effekt von MF-2 auf die basale [³⁵S]GTPγS-Bindung ist in Abbildung 58 abgebildet.

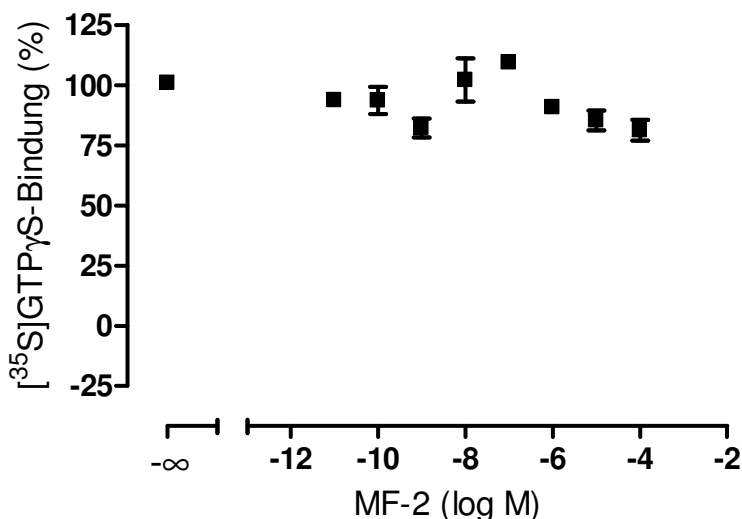


Abbildung 58: Senkung der basalen [³⁵S]GTPγS-Bindung durch MF-2 an Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen. **Ordinate:** G-Protein-vermittelte [³⁵S]GTPγS-Bindung in Prozent: 0 % entspricht der Rezeptor-unabhängigen [³⁵S]GTPγS-Bindung (in Anwesenheit von Atropin, 1 μM). 100 % entspricht dem oberen Plateau der MF-2-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der MF-2-Konzentration. **Kurvenanpassung:** keine Kurvenanpassung möglich. **Datenpunkte:** Mittelwerte ± Standardfehler aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

In keiner der untersuchten Konzentrationen hatte MF-2 einen signifikanten Einfluss auf die basale [³⁵S]GTPγS-Bindung (t-Test, p < 0,05). Im untersuchten Konzentrationsbereich besaß MF-2 demnach keine inversagonistische Aktivität am M₂-Rezeptor.

3.4 Einfluss des orthosterischen Antagonisten Atropin auf die Iperoxo- bzw. JSW 236-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung

Zur Charakterisierung einer Kompetition um die orthosterische Bindungsstelle und der Abgrenzung zu einer allosterischen Modulation auf Ebene der G-Protein-Aktivierung wurde der Einfluss des orthosterischen Antagonisten Atropin auf die Kenngrößen der Konzentrations-Effekt-Kurve von Iperoxo und JSW 236 untersucht. In den folgenden Interaktions-Experimenten sollte der Einfluss eines orthosterischen Antagonisten auf die Konzentrations-Effekt-Kurven der beiden Testsubstanzen untersucht werden. Für die Testsubstanz Iperoxo wurde eine kompetitive Interaktion mit Atropin um die orthosterische Bindungsstelle postuliert. Im Falle des JSW 236, das strukturell als verkürztes Derivat von Hybrid 1 bzw. Hybrid 2 gesehen werden kann, war unter der Voraussetzung, dass JSW 236 seinen agonistischen Effekt über die orthosterische Bindungsstelle vermittelt, davon auszugehen, dass eine Aktivierung des Rezeptors nicht mehr möglich wäre, wenn der Antagonist den agonistischen Anteil der Testsubstanz aus der orthosterischen Bindungstasche „verdrängt“. Es wäre allerdings denkbar, dass im Falle des Antagonist-besetzten Rezeptors JSW 236 immer noch mit seinem verkürzten allosterischen Anteil (dem quartären Stickstoff) an das allosterische Haftareal binden kann. In einem solchen Fall käme es zur Bildung ternärer Komplexe aus Antagonist, Alloster-Anteil des JSW 236 und Rezeptor.

3.4.1 Interaktion von Atropin mit Iperoxo

In Abbildung 59 ist der Einfluss des orthosterischen Antagonisten Atropin auf die Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurve dargestellt. Die entsprechenden Kenngrößen sind in Tabelle 49 wiedergegeben.

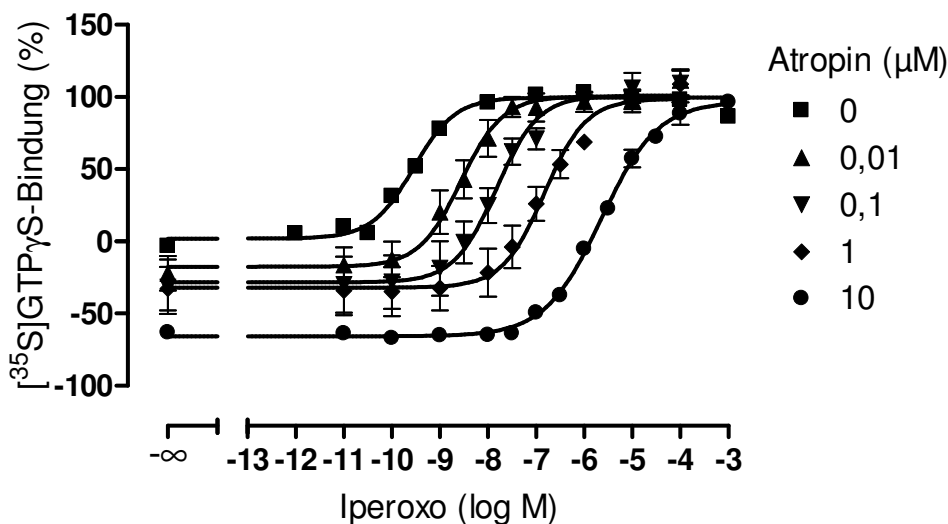


Abbildung 59: Einfluss von Atropin auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Iperoxo an Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen. **Ordinate:** Prozentuale [³⁵S]GTPγS-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Iperoxo-Kontrollkurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Iperoxo-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = 1$; signifikanter Unterschied der Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$ (F-Test, $p < 0,05$), „Atropin 10 μM“: $n_H = 0,74 \pm 0,05$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus $n = 2 - 5$ voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	Kontrolle	Atropin 0,01 μM	Atropin 0,1 μM	Atropin 1 μM	Atropin 10 μM
pEC₅₀	9,55 \pm 0,04	8,56 \pm 0,12*	7,83 \pm 0,15*	6,83 \pm 0,14*	5,64 \pm 0,05*
Basalwert (%)	2 \pm 2	-18 \pm 6*	-28 \pm 6*	-32 \pm 5*	-66 \pm 2*
E_{max} (%)	100 \pm 1	101 \pm 5	101 \pm 7	99 \pm 8	97 \pm 4
n_H (frei)	0,96 \pm 0,09	0,80 \pm 0,02	0,90 \pm 0,07	0,69 \pm 0,18	0,74 \pm 0,05 [#]
n	4	3	3	3	2

Tabelle 49: Kenngrößen \pm Standardfehler der in Abbildung 59 dargestellten gemittelten Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurven unter Kontrollbedingungen sowie unter dem Einfluss von Atropin. Die Kenngrößen der Konzentrations-Effekt-Kurven beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$ und auf einer Kurvenanpassungen mit freilaufendem Hill-Koeffizienten für „Atropin 10 μM“. **pEC₅₀:** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung hervorruft. **Basalwert:** Basale, Agonist-unabhängige [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{max}:** Maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden Kenngröße der Kontrollkurve (t-Test, $p < 0,05$)

signifikant bessere Anpassung mit variablem Hill-Koeffizienten (F-Test, $p < 0,05$)

Der nach Lew und Angus (1995) durchgeführte F-Test ergab, dass, trotz des von eins signifikant abweichenden Hill-Koeffizienten, bei einer Atropin-Konzentration von 10 μM die gesamte Kurvenschar durch einen Hill-Koeffizienten von eins ausreichend beschrieben wurde und somit von einer Parallelverschiebung ausgegangen werden konnte.

Atropin führte in allen eingesetzten Konzentrationen zu einer signifikanten Rechtsverschiebung des Wendepunkts (pEC_{50}) der Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurve, aber zu keiner signifikanten Senkung des Maximal-effekts (E_{max}) (t-Test, $p < 0,05$). Darüber hinaus wurde in allen eingesetzten Atropin-Konzentrationen eine signifikante Senkung des unteren Plateaus (Basalwert) (t-Test, $p < 0,05$) der Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurve beobachtet.

Zur Quantifizierung des Atropin-Effekts bezüglich des Wendepunkts der Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurve wurden in Abbildung 60 die bei einer bestimmten Atropin-Konzentration erhaltenen Verschiebefaktoren gegen die logarithmische Atropin-Konzentration aufgetragen.

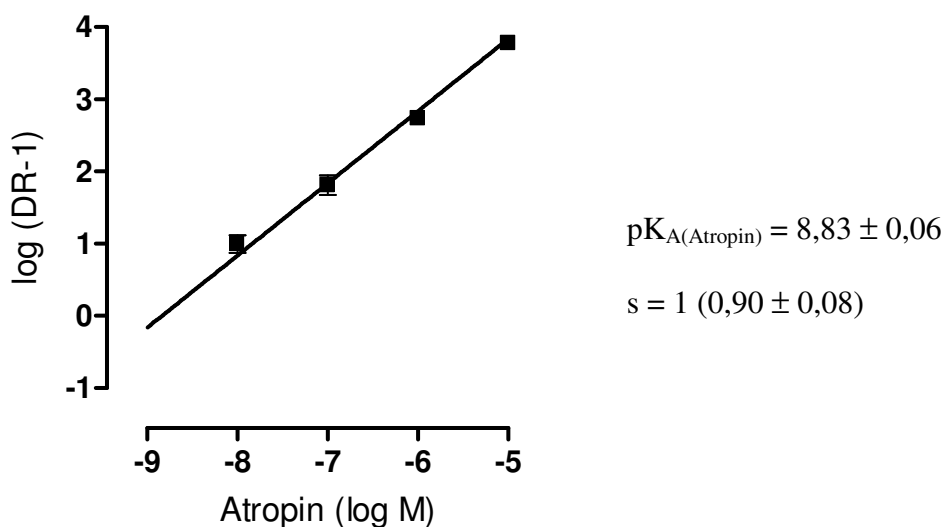


Abbildung 60: Schild-Auftragung der Atropin-induzierten Rechtsverschiebung der Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Dekadischer Logarithmus der Differenz aus Verschiebungsfaktor (dose ratio, DR) und eins. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Atropin-Konzentration. **Kurvenanpassung:** Gleichung von Arunlakshana und Schild (Gleichung 10). **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus $n = 2 - 5$ voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

Aus den $\log(\text{DR}-1)$ -Werten ergab sich die in Abbildung 60 dargestellte Schild-Auftragung. Mithilfe der Gleichung von Arunlakshana und Schild zur Auswertung von kompetitivem Antagonismus (1959; Gleichung 10) wurden die Daten analysiert. Aus dem Schnittpunkt der

Geraden mit der Abszisse konnte die Affinität von Atropin zum freien Rezeptor mit $pK_A = 8,83 \pm 0,06$ ermittelt werden.

Durch den erhaltenen Schild-Plot konnte die Annahme, dass es sich bei Iperoxo um einen Agonisten an der orthosterischen Bindungsstelle handelt, bestätigt werden. Aus der Linearität und der Steigung (=1) der Geraden lässt sich eine kompetitive Interaktion von Iperoxo mit Atropin um die gemeinsame, orthosterische Bindungsstelle ableiten.

3.4.2 Interaktion von Atropin mit JSW 236

In Abbildung 61 ist der Einfluss des orthosterischen Antagonisten Atropin auf die JSW 236-Konzentrations-Effekt-Kurve (Strukturformel siehe Seite 36) dargestellt. Die entsprechenden Kenngrößen sind in Tabelle 50 wiedergegeben.

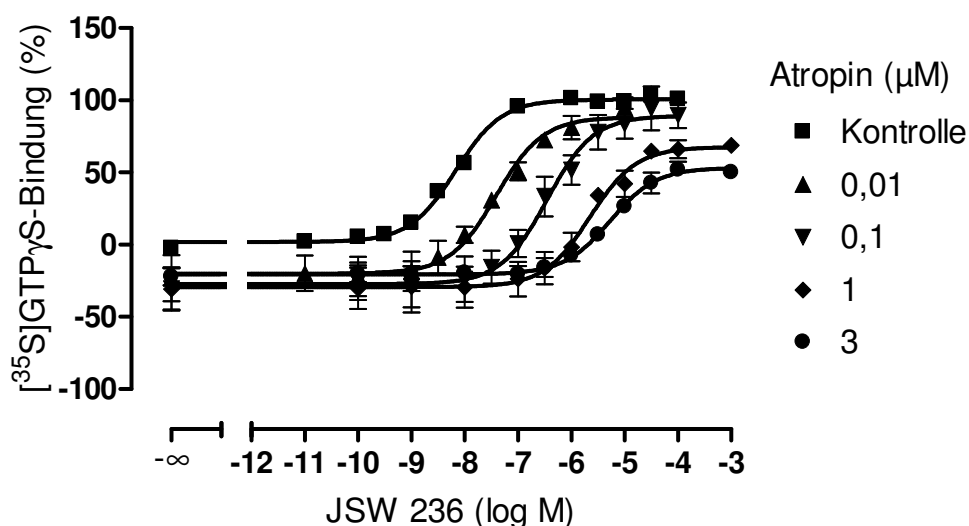


Abbildung 61: Einfluss von Atropin auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von JSW 236 an Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen. **Ordinate:** Prozentuale [³⁵S]GTPγS-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Iperoxo-Kontrollkurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Iperoxo-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = 1$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus $n = 3 - 13$ voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

Ergebnisse

	Kontrolle	Atropin 0,01 μ M	Atropin 0,1 μ M	Atropin 1 μ M	Atropin 3 μ M
pEC₅₀	8,17 \pm 0,04	7,40 \pm 0,13*	6,46 \pm 0,15*	5,65 \pm 0,17*	5,27 \pm 0,10*
Basalwert (%)	2 \pm 1	-20 \pm 4*	-27 \pm 5*	-29 \pm 4*	-21 \pm 2*
E_{max} (%)	101 \pm 1	88 \pm 6	89 \pm 7	68 \pm 7*	53 \pm 4*
n_H (frei)	0,87 \pm 0,07	0,71 \pm 0,18	0,82 \pm 0,24	0,90 \pm 0,30	0,98 \pm 0,20
n	13	3	3	4	3

Tabelle 50: Kenngrößen \pm Standardfehler der in Abbildung 61 dargestellten gemittelten JSW 236-Konzentrations-Effekt-Kurven unter Kontrollbedingungen sowie unter dem Einfluss von Atropin. Die Kenngrößen der Konzentrations-Effekt-Kurven beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$. **pEC₅₀:** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [³⁵S]GTP γ S-Bindung hervorruft. **Basalwert:** Basale, Agonist-unabhängige [³⁵S]GTP γ S-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{max}:** Maximale [³⁵S]GTP γ S-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden Kenngröße der Kontrollkurve (t-Test, $p < 0,05$)

Atropin führte in allen eingesetzten Konzentrationen zu einer signifikanten Rechtsverschiebung des Wendepunkts (pEC₅₀) der JSW 236-Konzentrations-Effekt-Kurve und in den Konzentrationen 1 μ M und 3 μ M zu einer signifikanten Senkung des Maximaleffekts (E_{max}) (t-Test, $p < 0,05$). Darüber hinaus wurde in allen eingesetzten Atropin-Konzentrationen eine signifikante Senkung des unteren Plateaus (Basalwert) (t-Test, $p < 0,05$) der JSW 236-Konzentrations-Effekt-Kurve beobachtet.

Zur Quantifizierung der Atropin-induzierten Rechtsverschiebung der JSW 236-Konzentrations-Effekt-Kurve wurden gemäß Abschnitt 2.7.1.3.1 Verschiebefaktoren berechnet. Es erfolgte eine Auftragung der errechneten Verschiebefaktoren gegen die logarithmische Konzentration von Atropin. Ein F-Test ($p < 0,05$) ergab, dass die Datenpunkte bei einer Anpassung mit der Gleichung nach Lanzafame et al. (1996, Gleichung 12) signifikant besser beschrieben wurden als bei einer Anpassung mit der Gleichung nach Arunlakshana und Schild (1959, Gleichung 10).

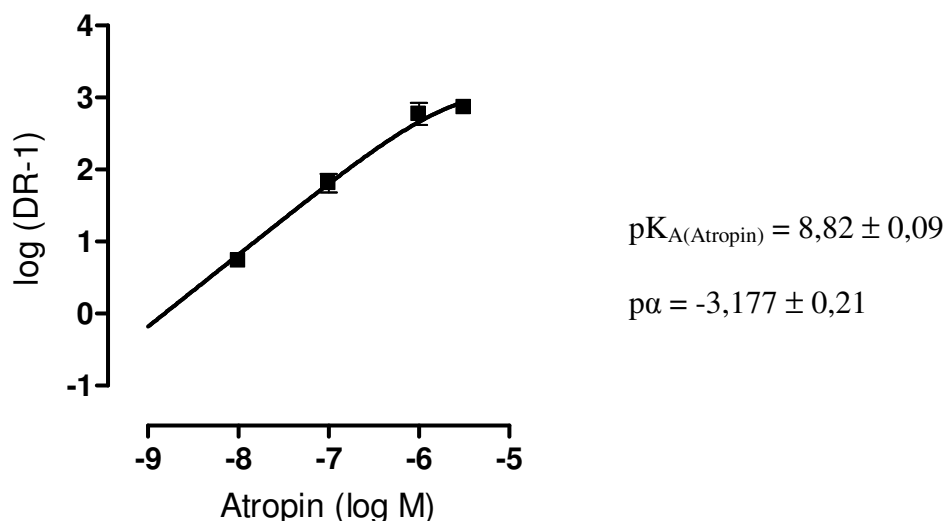


Abbildung 62: Schild-Auftragung der Atropin-induzierten Rechtsverschiebung der JSW 236-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Dekadischer Logarithmus der Differenz aus Verschiebungsfaktor (dose ratio, DR) und eins. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Atropin-Konzentration. **Kurvenanpassung:** Gleichung nach Lanzafame et al. (Gleichung 12). **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus $n = 3 - 13$ voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

Aus der nichtlinearen Regressionsanalyse resultierte für die Substanz Atropin ein pK_A -Wert von $8,82 \pm 0,09$. Dieser stimmt mit dem pK_A -Wert, der aus dem Interaktionsexperiment mit Iperoxo ermittelt wurde (siehe 3.4.1), überein. Es zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zu dem von Klemt (2005) in Interaktionsexperimenten mit Pilocarpin gefundenen pK_A -Wert $8,74 \pm 0,08$ (t-Test, $p \geq 0,05$). Der Kooperativitätsfaktor für die Interaktion von Atropin mit JSW 236 wurde mit $p\alpha = -3,18 \pm 0,21$ bestimmt. Dabei handelt es sich um den Wert, dem die Kurve aus Abbildung 62 asymptotisch entgegen strebt. Die negative Kooperativität von Atropin mit JSW 236 ist mit einem Kooperativitätsfaktor von $p\alpha = -3,18 \pm 0,21$ stärker ausgeprägt, als bei der Interaktion von Atropin mit Hybrid 1 ($p\alpha = -2,36 \pm 0,24$) und Hybrid 2 ($p\alpha = -0,81 \pm 0,13$) (Dissertationsschrift Kellersohn, 2007). Im Vergleich mit Hybrid 1 und Hybrid 2 fehlt JSW 236 das für die Interaktion mit der allosterischen Bindungsstelle maßgebliche Ringsystem.

3.5 Funktionelle Untersuchungen: Messungen der zellulären dynamischen Massenumverteilung (DMR-Messungen)

Für Versuche zur Messung der zellulären dynamischen Massenumverteilung wurde der optische Biosensor Epic[®] genutzt. Dankenswerterweise konnten die Experimente im Labor von Frau Prof. Dr. Evi Kostenis am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Bonn durchgeführt werden. Im Verlauf der Arbeit wurde diese innovative Technologie verfügbar, mit deren Hilfe Signalwegsaktivierung auf Ganzzelebene untersucht werden konnte. Die zuvor begonnene Systematik der [³⁵S]GTPγS-Bindungsuntersuchungen zum Einfluss verschiedener Punktmutationen auf die Rezeptoraktivierung wurde aufgegeben. Stattdessen wurde das funktionelle Ganzzell-Messsystem zur Bestimmung der intrinsischen Aktivität von Testsubstanzen an muskarinischen Rezeptoren und zur Untersuchung der spezifischen Aktivierung von intrazellulären Signalwegen durch verschiedene Liganden genutzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst ein Standard-Versuchsprotokoll für die in CHO-Zellen exprimierten Rezeptoren etabliert. Die Ergebnisse der verschiedenen variablen Parameter, sowie die Validierung der Verwendung von Pertussistoxin, Cholera toxin und Forskolin sind im Anhang dieser Arbeit zu finden (Unterkapitel von 8.1).

Das Prinzip der Messung sowie das genaue experimentelle Vorgehen, nach dem die im Folgenden dargestellten Versuche durchgeführt wurden, ist im Material und Methoden Teil dieser Arbeit beschrieben (2.7.2).

3.5.1 Orthosterische Agonisten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben den Konzentrations-Effekt-Kurven aus [³⁵S]GTPγS-Bindung Experimenten, die eine Rezeptoraktivierung auf Ebene der G-Proteine widerspiegeln auch Konzentrations-Effekt-Kurven erhoben, die sich auf die Summe der Zellantworten beziehen. Hierzu wurden mittels des optischen Biosensors Epic[®] Messungen zur zellulären dynamischen Massenumverteilung durchgeführt. Einige wichtige Testsubstanzen (orthosterische und dualsterische Agonisten) sollten erneut, vor allem im Hinblick auf den Wendepunkt, als Maß für die Wirksamkeit der Testsubstanzen untersucht werden. Es sollte geklärt werden, ob sich Unterschiede zwischen den beiden Testsystemen zeigen, die z. B. durch eine im Ganzzellsystem bestehende Rezeptorreserve hervorgerufen werden könnten.

Die Abbildungen der folgenden Unterpunkte zeigen die Mittelwertskurven der mittels DMR-Messungen untersuchten Agonisten. Für Acetylcholin ist beispielhaft eine repräsentative Originalregistrierung der verschiedenen untersuchten Konzentrationen gezeigt

(Abbildung 63). Es ergab sich folgende Vorgehensweise: An jedem Versuchstag wurde das Maximum der aufwärts gerichteten Signatur (in Mehrfachbestimmung) ermittelt und gegen den Logarithmus der eingesetzten Konzentration aufgetragen. Vor der Mittelung erfolgte eine Normierung auf das untere Plateau (entspricht 0 %) und das obere Plateau (entspricht 100 %) des jeweiligen Versuchstages. Alle erhobenen Ergebnisse wurden zusammengefasst und sodann wurde eine Kurvenanpassung vorgenommen. Wenn die zugrundeliegenden Einzelversuche stark variierten, (z. B. signifikant verschiedene Steigungen besaßen) wurde vergleichend eine weitere Kurvenanpassung vorgenommen. Hierbei wurde der betreffende Parameter auf den zuvor errechneten Mittelwert festgesetzt.

3.5.1.1 Acetylcholin

Acetylcholin, der endogene Agonist an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren, diente, wie auch in den [35 S]GTP γ S-Bindungsexperimenten, als Referenzsubstanz bei den DMR-Messungen. Abbildung 63 zeigt die Originalregistrierung aller eingesetzten Konzentrationen eines repräsentativen Versuchstages. Zu jedem Versuchstag wurde aus den maximalen Zellantworten eine Konzentrations-Effekt-Kurve ermittelt. Abbildung 64 zeigt die Zusammenfassung der Konzentrations-Effekt-Kurven von Acetylcholin zu einer Mittelwertskurve. Die Kenngrößen der Kurve sind in Tabelle 51 wiedergegeben.

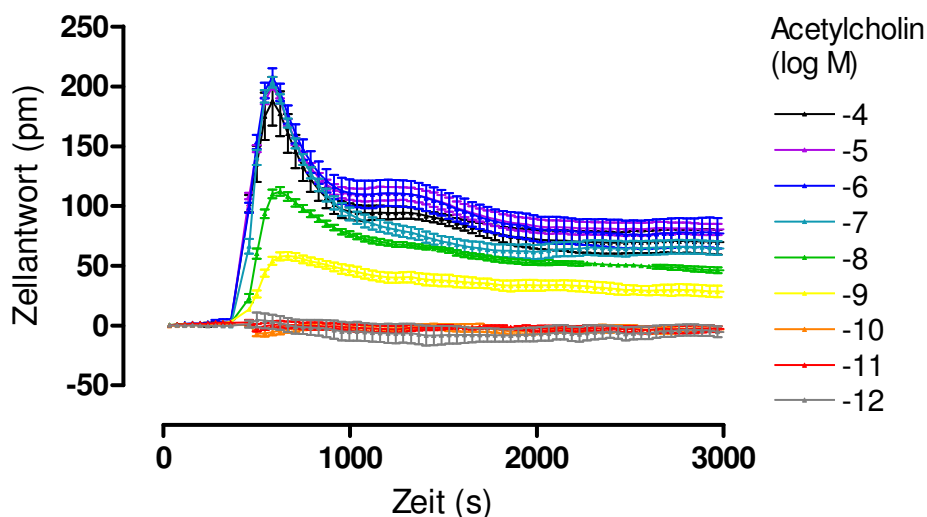


Abbildung 63: Acetylcholin-induzierte, zelluläre dynamische Massenumverteilung in Flp-CHO-M₂-Zellen. **Ordinate:** Zelluläre Antwort, entspricht der Wellenlängenverschiebung in Picometer (pm). **Abszisse:** Zeit in Sekunden (s). **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler einer Vierfachbestimmung eines repräsentativen Experiments, ergänzt durch eine Verbindungslinie, das zehnmal mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde.

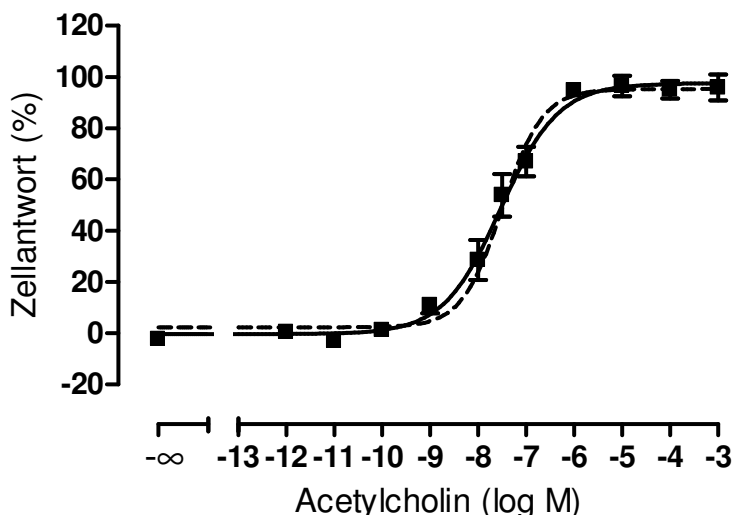


Abbildung 64: Acetylcholin-induzierte, zelluläre dynamische Massenumverteilung in Flp-CHO-M₂-Zellen. **Ordinate:** Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht dem unteren Plateau (Puffer-induzierte Zellantwort) und 100 % dem oberen Plateau (maximal induzierbarer Acetylcholin-Effekt) der Konzentrations-Effekt-Kurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Acetylcholin-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), signifikanter Unterschied der Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$ (F-Test, $p < 0,05$), $n_H = 0,73 \pm 0,10$. Der gestrichelte Verlauf stellt die Anpassung mit $n_H = 1,04$ dar (siehe Text). **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus sechs bis elf voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Drei- oder Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC ₅₀	Basalwert (%)	E _{max} (%)	n _H (frei)	n
Acetylcholin	7,53 \pm 0,09	0 \pm 2	97 \pm 2	0,73 \pm 0,10 [#]	6-11

Tabelle 51: Kenngrößen \pm Standardfehler der gemittelten Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 64. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem freilaufenden Hill-Koeffizienten. **pEC₅₀:** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale Zellantwort hervorruft. **Basalwert:** Basale Zellantwort (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{max}:** Maximale Zellantwort (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

[#] signifikant bessere Anpassung mit variablem Hill-Koeffizienten (F-Test, $p < 0,05$)

Der pEC₅₀-Wert wurde mit $7,53 \pm 0,09$ ermittelt. Er liegt in der gleichen Größenordnung wie der durch Messung der [³⁵S]GTPγS-Bindung erhaltene Wert ($7,23 \pm 0,03$), unterscheidet sich jedoch signifikant (t-Test, $p < 0,05$). Die Steigung der Mittelwertskurve wich signifikant von eins ab ($n_H = 0,73 \pm 0,10$). Allerdings konnten neun der elf Versuchstage ausreichend mit einem konstanten Hillkoeffizienten von $n_H = 1$ beschrieben werden (F-Test, $p < 0,05$). Die signifikant flachere Mittelwertskurve kam dadurch zustande, dass Datenpunkte aus Einzelexperimenten mit normal steilen, aber parallel verschobenen Kontrollkurven zusammengenommen und einer gemeinsamen Kurvenanpassung unterworfen wurden. Um den Kurvenverlauf besser zu beschreiben, wurde der Mittelwert der Steigungen mit $n_H = 1,04 \pm 0,12$ berechnet und bei der Anpassung festgesetzt (Darstellung als gestrichelter

Verlauf). Dies hatte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf den Wendepunkt der Kurve, der dann mit $7,49 \pm 0,08$ ermittelt wurde.

3.5.1.2 Iperoxo

In vorliegendem Versuch sollte mittels Messungen der zellulären dynamischen Massenverteilung die Wirksamkeit von Iperoxo bestimmt werden. Die Mittelwertskurve ist in Abbildung 65 gezeigt, die pharmakologischen Kenngrößen sind Tabelle 52 zu entnehmen.

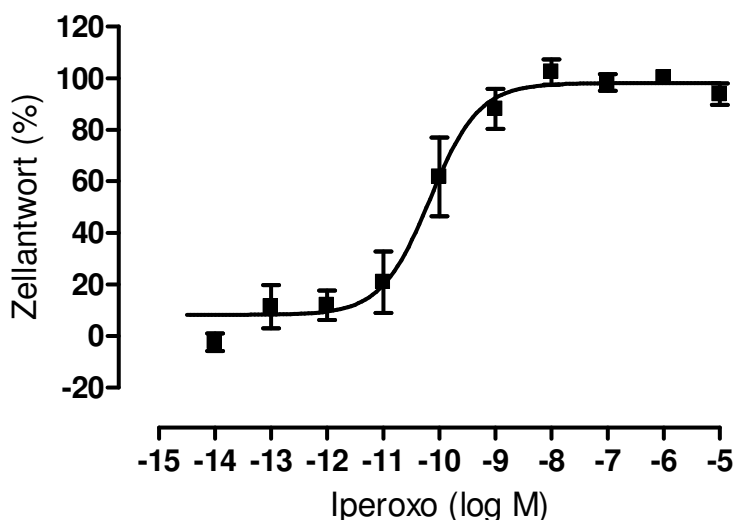


Abbildung 65: Iperoxo-induzierte, zelluläre dynamische Massenverteilung in Flp-CHO-M₂-Zellen. **Ordinate:** Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht dem unteren Plateau (Puffer-induzierte Zellantwort) und 100 % dem oberen Plateau (maximal induzierbarer Iperoxo-Effekt) der Konzentrations-Effekt-Kurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Iperoxo-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = 1$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei bis sieben voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Drei- oder Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC ₅₀	Basalwert (%)	E _{max} (%)	n _H (frei)	n
Iperoxo	10,16 \pm 0,16	8 \pm 5	98 \pm 3	0,83 \pm 0,19	3-7

Tabelle 52: Kenngrößen \pm Standardfehler der gemittelten Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 65. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit konstantem Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$. **pEC₅₀:** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale Zellantwort hervorruft. **Basalwert:** Basale Zellantwort (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{max}:** Maximale Zellantwort (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

Iperoxo wies einen pEC₅₀-Wert von $10,16 \pm 0,16$ auf, der signifikant höher lag als der in dieser Arbeit gefundene Wert aus [³⁵S]GTPγS-Bindungsuntersuchungen ($9,40 \pm 0,06$; t-Test, $p < 0,05$). Eine gute Übereinstimmung fand sich mit den in Organbadversuchen (linker Meerschweinchen-Vorhof) bestimmten Wirksamkeiten: Dallanoce et al. (1999) fanden hier

einen pD_2 -Wert von $10,1 \pm 0,13$. Ein direkter Vergleich von pEC_{50} und pD_2 -Wert ist möglich; der pD_2 -Wert beschreibt den negativen dekadischen Logarithmus der Agonist-Konzentration, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft. Die Bestimmung erfolgte mittels linearer Regressionsanalyse (Dallanoce et al., 1999).

3.5.1.3 JSW 236

Auch JSW 236 (Strukturformel siehe Seite 36) wurde hinsichtlich der konzentrationsabhängigen Rezeptoraktivierung im Ganzzell-System untersucht. In Abbildung 66 ist die Konzentrations-Effekt-Kurve von JSW 236 dargestellt. Der pEC_{50} -Wert wurde mit $8,26 \pm 0,10$ ermittelt. Ein durchgeführter t-Test ($p \geq 0,05$) ergab keinen Unterschied zu dem in [35 S]GTP γ S-Bindungsuntersuchungen bestimmten Wert von $8,17 \pm 0,04$.

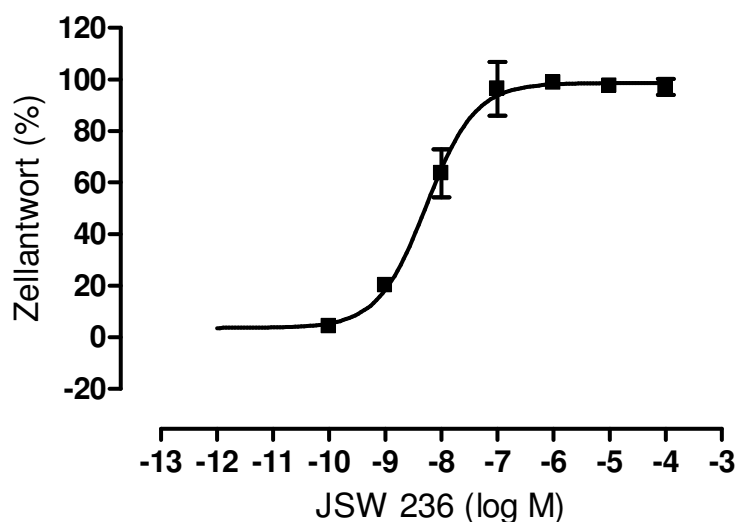


Abbildung 66: JSW 236-induzierte, zelluläre dynamische Massenumverteilung in Flp-CHO-M₂-Zellen. **Ordinate:** Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht dem unteren Plateau (Puffer-induzierte Zellantwort) und 100 % dem oberen Plateau (maximal induzierbarer JSW 236-Effekt) der Konzentrations-Effekt-Kurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der JSW 236-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameterlogistische-Gleichung“ (Gl. 5), konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = 1$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC_{50}	Basalwert: (%)	E_{max} (%)	n_H (frei)	n
JSW 236	$8,26 \pm 0,10$	4 ± 4	99 ± 2	$0,97 \pm 0,12$	2

Tabelle 53: Kenngrößen \pm Standardfehler der gemittelten JSW 236-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 66. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit konstantem Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$. **pEC_{50} :** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale Zellantwort hervorruft. **Basalwert:** Basale Zellantwort (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{max} :** Maximale Zellantwort (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

3.5.2 Von Agonisten abgeleitete dualsterische Testsubstanzen

3.5.2.1 Hybrid 1

In Abbildung 67 ist die Konzentrations-Effekt-Kurve von Hybrid 1 (Strukturformel siehe Seite 40) abgebildet, die durch Messungen der zellulären dynamischen Massenumverteilung ermittelt wurde. Zur Mittelung wurden die einzelnen Versuchstage auf ihr jeweiliges unteres und oberes Plateau normiert. Aus der Darstellung wird nicht ersichtlich, dass Hybrid 1 keine volle intrinsische Aktivität besitzt. Dieser Punkt wurde in den Versuchen zum Abschnitt 3.5.4.2 untersucht.

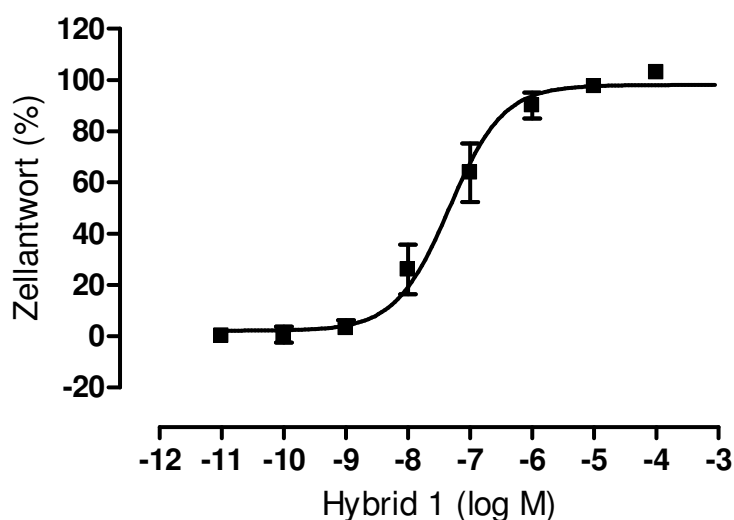


Abbildung 67: Hybrid 1-induzierte, zelluläre dynamische Massenumverteilung in Flp-CHO-M₂-Zellen. **Ordinate:** Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht dem unteren Plateau (Puffer-induzierte Zellantwort) und 100 % dem oberen Plateau (maximal induzierbarer Hybrid 1-Effekt) der Konzentrations-Effekt-Kurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Hybrid 1-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = 1$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus fünf voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Drei- oder Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC ₅₀	Basalwert (%)	E _{max} (%)	n _H (frei)	n
Hybrid 1	7,33 \pm 0,12	2 \pm 3	98 \pm 4	0,69 \pm 0,15	5

Tabelle 54: Kenngrößen \pm Standardfehler der gemittelten Hybrid 1-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 67. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit konstantem Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$. **pEC₅₀:** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale Zellantwort hervorruft. **Basalwert:** Basale Zellantwort (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{max}:** Maximale Zellantwort (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

Für den dualsterischen Agonisten Hybrid 1 zeigte sich eine gute Übereinstimmung der hier ermittelten Wirksamkeit ($pEC_{50} = 7,33 \pm 0,12$) mit [³⁵S]GTP γ S-Bindungsuntersuchungen

($pEC_{50} = 7,63 \pm 0,07$); ein durchgeführter t-Test ($p < 0,05$) zeigte keinen signifikanten Unterschied. In Organbadversuchen wurde am linken Meerschweinchen-Vorhof (als M_2 -Modell) ein Wert in der gleichen Größenordnung gefunden ($pEC_{50} = 7,16 \pm 0,10$; Antony et al., 2009).

3.5.2.2 Hybrid 2

Analog zu Hybrid 1 wurde auch das von Naphmethonium und Iperoxo abgeleitete Hybrid 2 (Strukturformel siehe Seite 40) hinsichtlich seines Einflusses auf die zelluläre dynamische Massenumverteilung untersucht. Die Konzentrations-Effekt-Kurve ist in Abbildung 68 dargestellt. Die Normierung erfolgte auf das untere und obere Plateau des jeweiligen Versuchstages, um eine Mittelung der Versuche zu ermöglichen. Die Untersuchung des Maximaleffekts ist in 3.5.4.2 beschrieben.

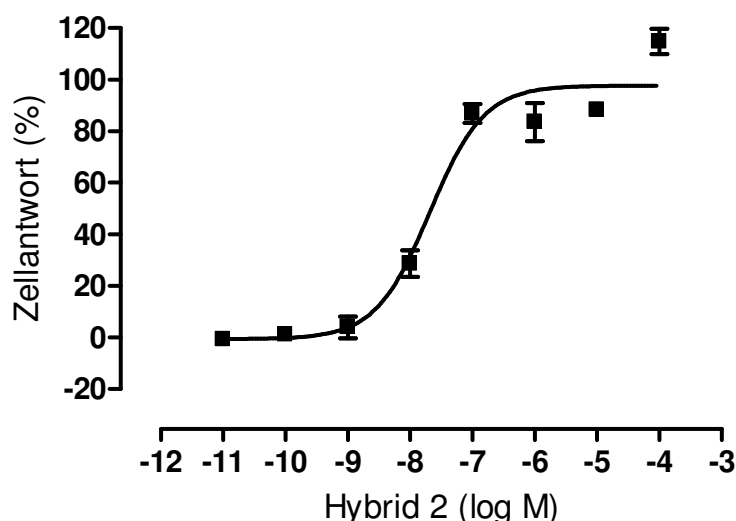


Abbildung 68: Hybrid 2-induzierte, zelluläre dynamische Massenumverteilung in Flp-CHO- M_2 -Zellen. **Ordinate:** Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht dem unteren Plateau (Puffer-induzierte Zellantwort) und 100 % dem oberen Plateau (maximal induzierbarer Hybrid 2-Effekt) der Konzentrations-Effekt-Kurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Hybrid 2-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = 1$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus vier voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Drei- oder Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC_{50}	Basalwert (%)	E_{max} (%)	n_H (frei)	n
Hybrid 2	$7,68 \pm 0,12$	-1 ± 4	98 ± 3	$1,21 \pm 0,30$	4

Tabelle 55: Kenngrößen \pm Standardfehler der gemittelten Hybrid 2-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 68. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit konstantem Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$. **pEC_{50} :** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale Zellantwort hervorruft. **Basalwert:** Basale Zellantwort (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{max} :** Maximale Zellantwort (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

Der pEC_{50} -Wert wurde mit $7,68 \pm 0,12$ bestimmt. Der Unterschied zum pEC_{50} -Wert, der im Rahmen dieser Arbeit in [^{35}S]GTP γ S-Bindungsuntersuchungen ($7,98 \pm 0,06$) bestimmt wurde, war gering, jedoch signifikant (t-Test, $p = 0,04$). In Organbadversuchen wurde am linken Meerschweinchen-Vorhof (als M_2 -Modell) ein pEC_{50} -Wert von $8,13 \pm 0,13$ gefunden (Antony et al., 2009).

3.5.3 Einfluss von Forskolin auf die Acetylcholin-induzierte Zellantwort in Flp-CHO- M_2 -Zellen

Bereits im Rahmen der methodischen Voruntersuchungen der Epic[®]-Messungen war aufgefallen, dass sich der Maximaleffekt von muskarinischen Agonisten durch eine vorangehende Inkubation mit dem direkten Aktivator der Adenylylzyklase Forskolin verstärken lässt (siehe 8.1.4 und Abbildung 101). In weiterführenden Untersuchungen sollte exemplarisch der Effekt einer Forskolin-Vorstimulation auf die Kenngrößen der Konzentrations-Effekt-Kurve von Acetylcholin geklärt werden. Diese Frage ist von besonderer Relevanz, da klassischerweise Untersuchungen zur Inhibition der Forskolin-induzierten cAMP-Akkumulation durchgeführt werden, um die Aktivierung von G_i -Proteinen auf Ebene des ‚second Messengers‘ cAMP zu untersuchen.

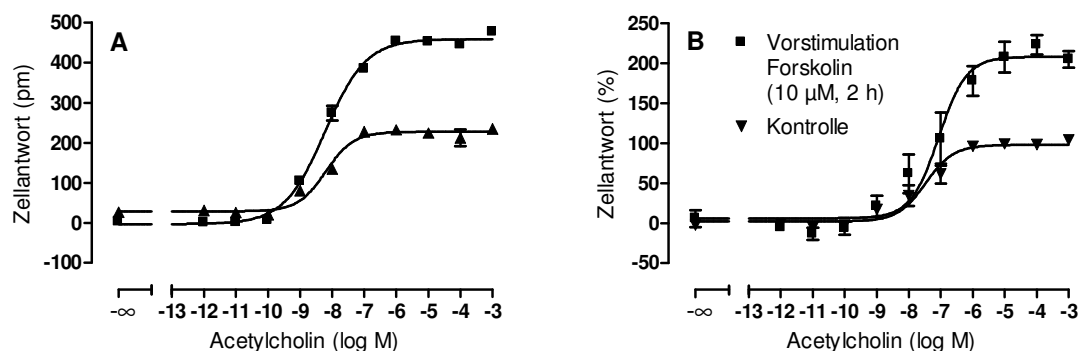


Abbildung 69: Einfluss einer Forskolin-Vorstimulation (10 μ M, 2 h) auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Acetylcholin an Flp-CHO- M_2 -Zellen. **A:** Ein repräsentativer Versuchstag in Vierfachbestimmung. **Ordinate (A):** Maximale, zelluläre Antwort, entspricht der Wellenlängenverschiebung in Picometer (pm). **B:** Normierte Mittelwertskurven aus fünf Versuchstagen. **Ordinate (B):** Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Kontrollkonzentrations-Effekt-Kurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Acetylcholin-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = 1$ (siehe Text). **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus einem (A) bzw. fünf (B) voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Drei- oder Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC ₅₀	Basalwert (%)	E _{max} (%)	n _H (frei)	n
Kontrolle	7,47 ± 0,15	2 ± 3	98 ± 4	0,53 ± 0,11 [#]	5
Nach Forskolin VS	7,07 ± 0,16	6 ± 8	208 ± 9*	0,51 ± 0,13 [#]	5

Tabelle 56: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 69 B. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem festgesetzten Hill-Koeffizienten n_H = 1 (siehe Text). **pEC₅₀:** Negativer dekadischer Logarithmus der Acetylcholin-Konzentration, die eine halbmaximale Zellantwort hervorruft. **Basalwert:** Basale Zellantwort (unteres Plateau der Kontroll-Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{max}:** Maximale Zellantwort (oberes Plateau der Kontroll-Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden Kenngröße der Kontroll-Konzentrations-Effekt-Kurve (t-Test, p < 0,05)

signifikant bessere Anpassung mit variablem Hill-Koeffizienten (F-Test, p < 0,05)

In Abbildungsteil B ist die Mittelwertskurve aus fünf unabhängigen Versuchstagen dargestellt. Ein repräsentativer Einzelversuch ist in Teil A gezeigt. Die zweistündige Vorstimulation der Adenylylcyclase mit Forskolin führte zu einer signifikanten Änderung des maximalen Effekts von Acetylcholin. Im Bezug auf die Zellantwort unter Kontrollbedingungen kam es zu einer Zunahme der Zellantwort um 110 ± 13 %-Punkte. Alle anderen pharmakologischen Parameter blieben unverändert. Zwischen den einzelnen Versuchstagen unterlagen die Wendepunkte einer relativ großen Streuung. Die Einzelversuche konnten alle ausreichend mit einer konstanten Steigung von n_H = 1 beschrieben werden. Eine Mittelung führte hingegen zu flachen Kurven, sodass bei der Kurvenanpassung die Steigung auf n_H = 1 festgesetzt wurde. Die Wirksamkeit von Acetylcholin wurde durch die veränderten intrazellulären Bedingungen nicht signifikant beeinflusst (t-Test, p ≥ 0,05).

3.5.4 Signalwegsaktivierung durch muskarinische Liganden an M₂-Rezeptoren

Der überwiegende Teil der in dieser Arbeit erhobenen Daten stammt aus Experimenten an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren des Subtyps M₂. Die aus Voruntersuchungen (siehe 8.1) zum Einsatz des Epic[®] Messsystems erhaltenen Erkenntnisse wurden genutzt, um Ligand-spezifische Signalwegsaktivierung am M₂-Rezeptor zu untersuchen. In der Literatur ist für muskarinische Vollagonisten am M₂-Rezeptor neben der bevorzugten G_{i/o}-Kopplung eine zusätzliche Kopplung über den Adenylylzyklase-stimulierenden G_s-Signaltransduktionsweg beschrieben (Mistry et al., 2005; Michael et al., 2006; Griffin et al., 2007). Durch den Einsatz von Pertussistoxin (siehe 8.1.9) sollte das promiskuitive Verhalten der klassischen Agonisten im Vergleich zu den dualsterischen Testsubstanzen untersucht werden.

Die Versuche der folgenden Abschnitte wurden, wenn nicht abweichend in der Legende angegeben, mit den im Rahmen dieser Arbeit stabil transfizierten Flp-CHO-M₂-Zellen (M₂-Wildtyp) durchgeführt. Auch die bereits seit Langem verwendeten CHO-M₂-Zellen (siehe Tabelle 3) wurden hinsichtlich der Ligand-induzierten Signalwegsaktivierung untersucht und zeigten hier gleichartige Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

3.5.4.1 Ligand-induzierte zelluläre dynamische Massenumverteilung (DMR)

Die Testsubstanzen wurden hinsichtlich ihrer Signalwegsaktivierung unter Kontrollbedingungen sowie nach Ausschaltung der G_{i/o}-Proteine durch Übernacht-Inkubation mit Pertussistoxin untersucht, um so alternative Signaltransduktionswege isoliert darzustellen.

3.5.4.1.1 Vollagonist-induzierte DMR

Abbildung 70 zeigt ein repräsentatives Experiment zur Messung der intrazellulären dynamischen Massenumverteilung, die uniform durch die muskarinischen Vollagonisten Acetylcholin (100 µM; siehe 3.2.2.1), Carbachol (1000 µM; Dissertationsschrift Schmalenbach, 2005) und Oxotremorin M (10 µM; siehe 3.2.2.2) induziert wurde. Eingesetzt wurden äquieffektive, supramaximale Konzentrationen. Das experimentelle Vorgehen ist in Kapitel 2.7.2.2 beschrieben.

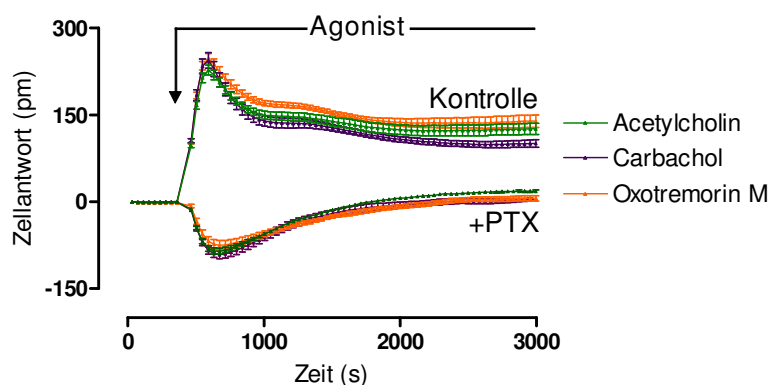


Abbildung 70: Effekt der orthosterischen Agonisten Acetylcholin (100 µM), Carbachol (1000 µM) und Oxotremorin M (10 µM) auf Flp-CHO-M₂-Zellen; Kontrollbedingungen im Vergleich zur Vorinkubation mit PTX (20 h, 100 ng/ml). **Ordinate:** Zelluläre Antwort, entspricht der Wellenlängenverschiebung in Picometer (pm). **Abszisse:** Zeit in Sekunden (s). **Datenpunkte:** Mittelwerte ± Standardfehler einer Sechsfachbestimmung eines repräsentativen Experiments, ergänzt durch eine Verbindungslinie, das zweimal (Acetylcholin: zehnmal) mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde.

Die Kontroll-Zellantwort zeigte einen initialen steilen Gipfel, der sofort nach Agonist-Zugabe auftrat, gefolgt von einem abfallenden Verlauf. Diese charakteristische Signatur wird im Folgenden als G_i-DMR bezeichnet. Als Folge der PTX-Behandlung wurde die G_i-vermittelte

Inhibition der Adenylylzyklase verhindert und das aufwärts gerichtete Signal eliminiert. Stattdessen zeigte sich eine DMR in entgegengesetzter Richtung, im Bereich negativer Massenumverteilungen. Wie später gezeigt werden konnte, ist diese Signatur mit einer Stimulation des G_s -Signaltransduktionswegs kompatibel. Die hier untersuchten Agonisten zeigten eine nahezu identische optische Signatur.

3.5.4.1.2 Partialagonist-induzierte DMR

Die muskarinischen Partialagonisten Pilocarpin und McN-A-343 wurden hinsichtlich ihrer Signalwegsaktivierung an Flp-CHO-M₂-Zellen untersucht. Ein repräsentatives Experiment ist in Abbildung 71 dargestellt. Eingesetzt wurden supramaximale Konzentrationen: Pilocarpin (100 μ M; siehe 3.2.2.6), McN-A-343 (100 μ M, siehe 3.2.2.7).

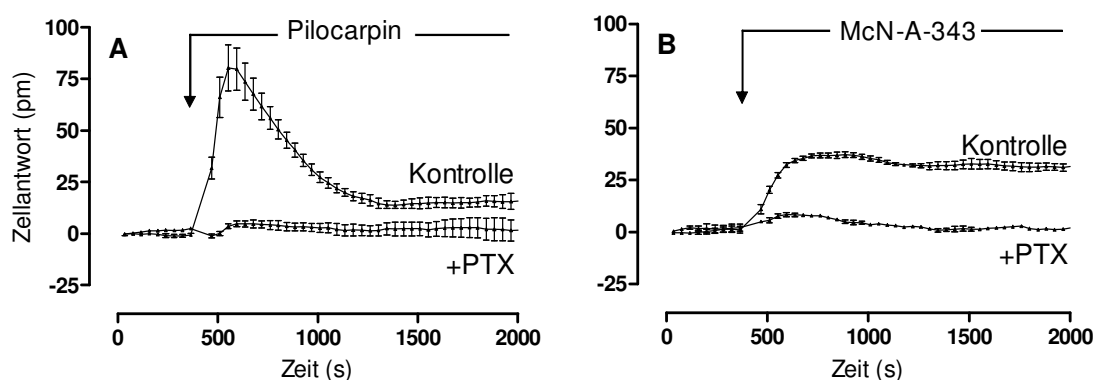


Abbildung 71: Effekt der Partialagonisten Pilocarpin (100 μ M) (A) und McN-A-343 (100 μ M) (B) auf Flp-CHO-M₂-Zellen; Kontrollbedingungen im Vergleich zur Vorinkubation mit PTX (20 h, 100 ng/ml). **Ordinate:** Zelluläre Antwort, entspricht der Wellenlängenverschiebung in Picometer (pm). **Abszisse:** Zeit in Sekunden (s). **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler einer Dreifachbestimmung eines repräsentativen Experiments, ergänzt durch eine Verbindungslinie, das zweimal (Pilocarpin) bzw. dreimal (McN-A-343) mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde.

Der beschriebene Partialagonismus der Testsubstanzen konnte auch bezüglich der intrazellulären Massenumverteilung gezeigt werden. Als Kontrolle diente der mitgeführte Vollagonist Acetylcholin (in Abbildung 71 nicht gezeigt). Für Pilocarpin waren in [³⁵S]GTP γ S-Bindungsexperimenten 62 ± 2 % der intrinsischen Aktivität von Acetylcholin ermittelt worden (siehe 3.2.2.6), für McN-A-343 52 ± 1 % (siehe 3.2.2.7). In den DMR-Messungen ergaben sich folgende prozentuale Werte (Bezugsgröße: maximale Acetylcholin-induzierte DMR des jeweiligen Versuchstags entsprach 100 %): Pilocarpin 44 ± 5 % (n = 3), McN-A-343 22 ± 5 % (n = 4). Bei Vergleich der beiden funktionellen Analysemethoden unterscheiden sich die ermittelten intrinsischen Aktivitäten signifikant voneinander (t-Test, $p < 0,05$).

Nach Inkubation mit Pertussistoxin war keine vom Nullwert verschiedene Zellantwort detektierbar. Dies stimmte mit den Befunden von Mistry et al. (2005) überein: in Messungen zur Akkumulation von cAMP zeigte Pilocarpin am M₂-Rezeptor eine alleinige G_i-Aktivierung. Die durch Voll- bzw. Partialagonisten stabilisierten Rezeptorkonformationen können unterschiedliche G-Proteine aktivieren (Akam et al., 2001).

Eine weitere Steigerung der eingesetzten Konzentration (auf 1 mM) führte zu Rezeptor-unabhängigen Effekten, die auch in nicht-transfizierten Flp-CHO-Zellen auftraten.

3.5.4.1.3 Durch Iperoxo- und CZA 1-induzierte DMR

Iperoxo hatte sich in funktionellen Untersuchungen zur G-Protein-Aktivierung als Vollagonist mit hoher Wirksamkeit gezeigt. Außer dem Monomer stand als Testsubstanz ein Dimer (CZA 1, Strukturformel siehe Seite 39) zur Verfügung, in dem zwei Moleküle Iperoxo über eine Hexan-Zwischenkette verbunden waren. Harm Michalski (Diplomarbeit, 2009) hatte CZA 1 in [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimenten untersucht. Der pEC₅₀-Wert war mit 7,61 ± 0,07 signifikant vermindert (t-Test, p < 0,05) gegenüber der Muttersubstanz (pEC₅₀ = 9,40 ± 0,06). Die volle intrinsische Aktivität blieb jedoch erhalten. Iperoxo und CZA 1 wurden hinsichtlich der dynamischen Massenumverteilung an Flp-CHO-M₂-Zellen im Epic[®] untersucht; Abbildung 72 zeigt die Ergebnisse.

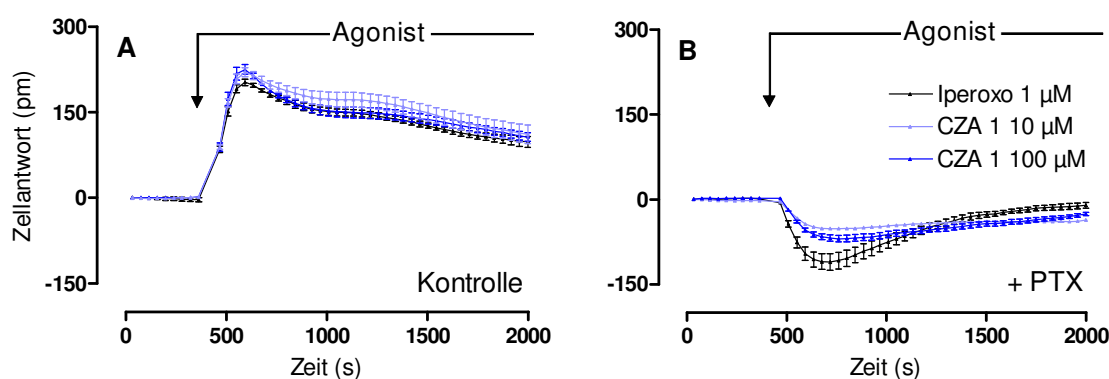


Abbildung 72: Effekt von Iperoxo und dem Iperoxo-Dimer (CZA 1) auf Flp-CHO-M₂-Zellen, unter Kontrollbedingungen (A) bzw. nach 20-stündiger Vorinkubation mit PTX (100 ng/ml) (B). **Ordinate:** Zelluläre Antwort, entspricht der Wellenlängenverschiebung in Picometer (pm). **Abszisse:** Zeit in Sekunden (s). **Datenpunkte:** Mittelwerte ± Standardfehler einer Vierfachbestimmung eines repräsentativen Experiments, ergänzt durch eine Verbindungslinie, das fünfmal (Iperoxo) bzw. zweimal (CZA 1) mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde.

Bei Einsatz äquieffektiver, supramaximaler Konzentrationen (Iperoxo 1 μM, siehe 3.2.2.3; CZA 1 100 μM, Diplomarbeit Harm Michalski) unterschieden sich die G_i-DMR Signaturen

nicht voneinander. Der Vollagonismus, der auf G-Protein Ebene festgestellt wurde, konnte somit bestätigt werden. Nach Ausschalten der G_i -Proteine durch PTX zeigt sich für beide Testsubstanzen eine abwärts gerichtete Signatur. Die Stärke der Auslenkung unterschied sich für Iperoxo an den einzelnen durchgeführten Versuchstagen nicht von den klassischen Vollagonisten (Acetylcholin, Carbachol, Oxotremorin M). CZA 1 zeigte ebenfalls eine abwärts gerichtete Signatur, die an allen drei Versuchstagen schwächer ausgeprägt war als das Iperoxo G_s -Signal. Zur quantitativen Auswertung wurden das Minimum jedes Versuchstages in Prozent des Iperoxo-induzierten Minimums ausgedrückt. Es errechnet sich ein Mittelwert von $58 \pm 6 \%$ ($n=3$) G_s -Aktivierung durch CZA 1 ($100 \mu\text{M}$) bzw. $41 \pm 2 \%$ ($n=3$) G_s -Aktivierung durch CZA 1 ($10 \mu\text{M}$).

3.5.4.1.4 Durch Oxotremorin M- und CZA 2-induzierte DMR

Aus dem Arbeitskreis von Herrn Prof. De Amici (Universität Mailand, Italien) stand die Testsubstanz CZA 2 (Strukturformel siehe Seite 39) zur Verfügung. Zwei Moleküle Oxotremorin M wurden über eine Hexanzwischenkette verknüpft. Harm Michalski (Diplomarbeit 2009) hatte die Substanz in $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsexperimenten untersucht und neben einer Abnahme der Wirksamkeit ($\text{pEC}_{50(\text{CZA } 2)} = 6,39 \pm 0,10$; $\text{pEC}_{50(\text{Oxo M})} = 8,14 \pm 0,10$) auch eine Abnahme an intrinsischer Aktivität beobachtet. CZA 2 war mit $73 \pm 3 \%$ ein starker Partialagonist am M_2 -Rezeptor.

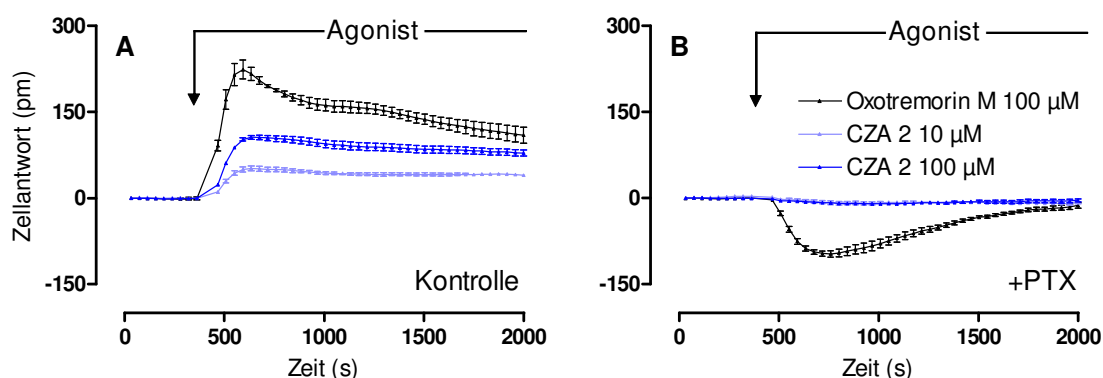


Abbildung 73: Effekt von Oxotremorin M und dem Oxotremorin M-Dimer (CZA 2) auf Flp-CHO- M_2 -Zellen, unter Kontrollbedingungen (A) bzw. nach 20-stündiger Vorinkubation mit PTX (100 ng/ml) (B). **Ordinate:** Zelluläre Antwort, entspricht der Wellenlängenverschiebung in Picometer (pm). **Abszisse:** Zeit in Sekunden (s). **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler einer Vierfachbestimmung eines repräsentativen Experiments, ergänzt durch eine Verbindungslinie, das dreimal (Oxotremorin M) bzw. zweimal (CZA 2) mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde.

Durch die Epic[®] Messungen konnte bestätigt werden, dass CZA 2, abweichend vom Monomer Oxotremorin M, nur partielle intrinsische Aktivität besitzt. Bei einer eingesetzten

Konzentration von 100 μM wurden $54 \pm 9 \%$ der intrinsischen Aktivität von Oxotremorin M erreicht ($n = 3$), bei 10 μM $37 \pm 7 \%$. Durch Vorinkubation mit dem irreversiblen G_i -Inaktivator PTX wurde das Signal, wie auch bei Pilocarpin und McN-A-343, zwei Partialagonisten mit ähnlicher intrinsischer Aktivität, komplett verhindert.

3.5.4.1.5 JSW 236-induzierte DMR

Auch die Testsubstanz JSW 236 sollte hinsichtlich ihrer Signalwegsaktivierung untersucht werden. Abgeleitet von Iperoxo stellt sie ein Hexylammonium-Derivat dar (siehe 3.2.2.4, Strukturformel siehe Seite 36). Es wurden äquieffektive, supramaximale Konzentrationen von JSW 236 (100 μM ; siehe 3.2.2.4) und Iperoxo (1 μM ; siehe 3.2.2.3) bezüglich ihres Effekts auf die zelluläre dynamische Massenumverteilung verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 74 dargestellt.

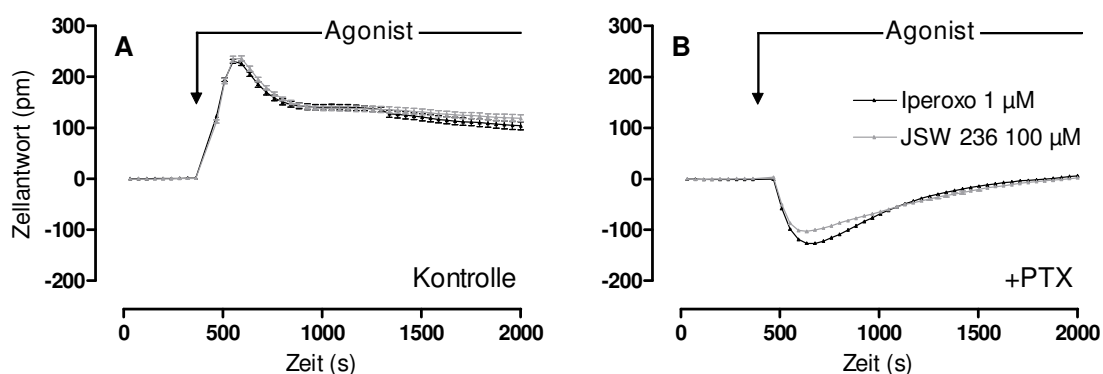


Abbildung 74: Effekt von JSW 236 auf Flp-CHO- M_2 -Zellen im Vergleich zu Iperoxo, unter Kontrollbedingungen (A) bzw. nach 20-stündiger Vorinkubation mit PTX (100 ng/ml) (B). **Ordinate:** Zelluläre Antwort, entspricht der Wellenlängenverschiebung in Picometer (pm). **Abszisse:** Zeit in Sekunden (s). **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler einer Vierfachbestimmung eines repräsentativen Experiments, ergänzt durch eine Verbindungslinie, das fünfmal (Iperoxo) bzw. zweimal (JSW 236) mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde.

Die beiden Agonisten zeigten in den eingesetzten Konzentrationen, unter Kontrollbedingungen sowie nach Vorinkubation mit PTX, nur marginale Unterschiede bezüglich der induzierten Zellantwort.

3.5.4.2 Durch dualsterische Agonisten induzierte zelluläre dynamische Massenumverteilung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die allosterisch-orthosterischen Hybridsubstanzen Hybrid 1 und Hybrid 2 hinsichtlich der intrazellulären Signalwegsaktivierung untersucht werden.

Hierbei sollte geklärt werden, ob sich der Effekt der Testsubstanzen durch die Einführung des allosterischen Molekülbausteins vom Effekt der orthosterischen Agonisten unterscheidet.

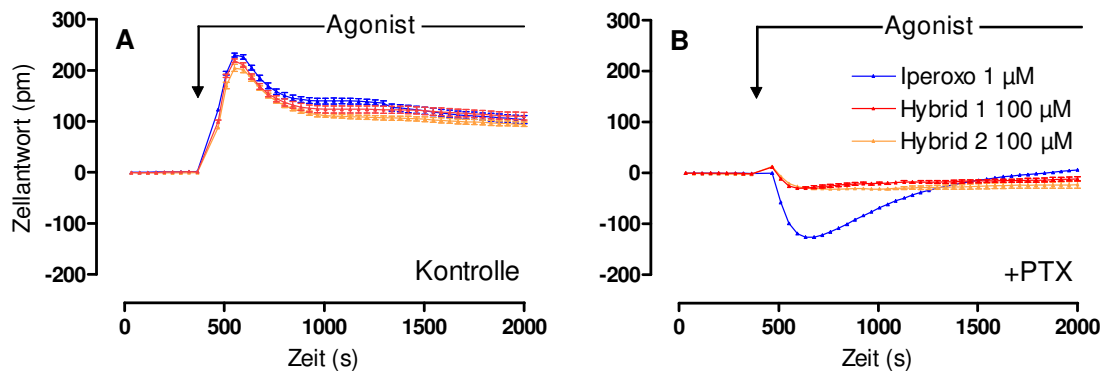


Abbildung 75: Effekt von Hybrid 1 (100 μM) und Hybrid 2 (100 μM) auf Flp-CHO- M_2 -Zellen im Vergleich zu Iperoxo (1 μM), unter Kontrollbedingungen (A) bzw. nach 20-stündiger Vorinkubation mit PTX (100 ng/ml) (B). **Ordinate:** Zelluläre Antwort, entspricht der Wellenlängenverschiebung in Picometer (pm). **Abszisse:** Zeit in Sekunden (s). **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler einer Vierfachbestimmung eines repräsentativen Experiments, ergänzt durch eine Verbindungslinie, das fünfmal (Hybrid 1) bzw. zweimal (Hybrid 2) mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde.

Die Befunde zeigten, dass die Kontroll-Signaturen, die die Hybrid-induzierte dynamische Massenumverteilung repräsentieren, sich nicht vom Verlauf von Iperoxo, dem rein orthosterischen Agonisten, unterschieden. Anders die Befunde nach 20-stündiger Vorinkubation der Zellen mit PTX: Hybrid 1 und Hybrid 2 zeigten keinen detektierbaren Effekt, während Iperoxo zu der für Agonisten typischen abwärts gerichteten Signatur führte, wie bereits in 3.5.4.1.3 erläutert.

Um festzustellen, ob die nach PTX-Vorbehandlung fehlende, Hybrid-induzierte DMR auf die wechselseitige Inaktivierung von positiven und negativen Massenverschiebungen zurückzuführen sein könnte, oder ob sich tatsächlich nach Vorinkubation mit PTX durch die Hybride keine G-Protein-vermittelte Rezeptorantwort mehr zeigt, sollte dieser Befund durch ein [^{35}S]GTP γS -Bindungsexperiment bestätigt werden. Exemplarisch wurden Hybrid 1 und Iperoxo an nach 20-stündiger Vorinkubation mit PTX angefertigten Membranhomogenaten untersucht, analog den Bedingungen der DMR-Messungen.

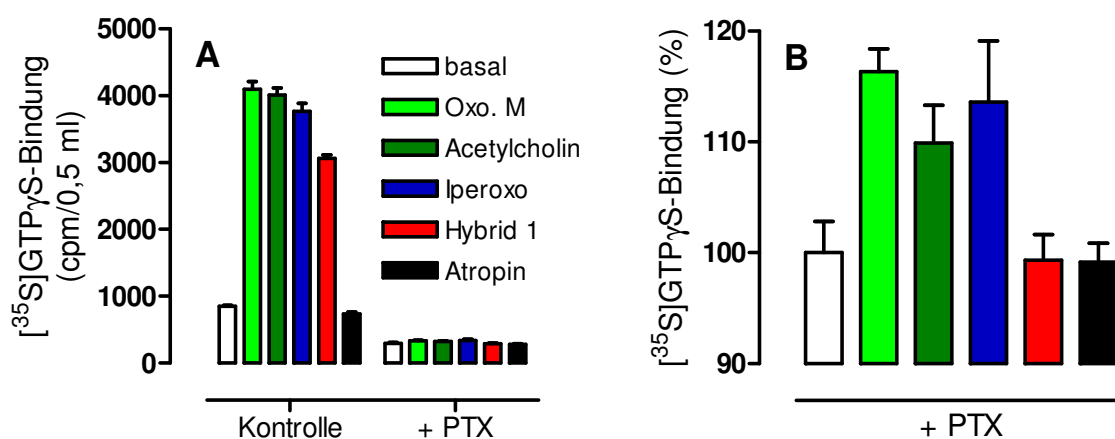


Abbildung 76: Effekte rezeptorsättigender Konzentrationen muskarinischer Liganden auf die [³⁵S]GTPγS-Bindung an Membransuspensionen aus Flp-CHO-M₂-Zellen. **A:** Kontroll-Membranpräparation im Vergleich zur Membranpräparation nach 20 stündiger PTX-Vorinkubation. **B:** Normierte Darstellung der Ergebnisse an PTX-vorbehandelten Membranen. **Ordinate:** [³⁵S]GTPγS-Bindung in cpm/0,5 ml (A); bzw. in Prozent der basalen Bindung (B). **Abzisse:** Testsubstanzen: Acetylcholin 100 μM, Oxtremorin M 100 μM, Iperoxo 1 μM, Hybrid 1 100 μM, Atropin 1 μM. **Balken:** Mittelwerte ± Standardfehler eines Experiments, das in Achtfachbestimmung durchgeführt wurde und einmal mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde.

	Basale Bindung	Acetylcholin (100 μM)	Oxtremorin M (100 μM)	Iperoxo (1 μM)	Hybrid 1 (100 μM)	Atropin (1 μM)
+ PTX	100 ± 3	110 ± 3	116 ± 2*	114 ± 6*	99 ± 2	99 ± 2

Tabelle 57: Effekte rezeptorsättigender Konzentrationen muskarinischer Liganden auf die [³⁵S]GTPγS-Bindung an Membransuspensionen aus Flp-CHO-M₂-Zellen, die mit PTX vorbehandelt waren. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler des in Abbildung 76 B gezeigten Experiments.

* signifikanter Unterschied zur basalen [³⁵S]GTPγS-Bindung (t-Test, p < 0,05)

Das in Abbildung 76 A gezeigte Experiment zeigt deutlich, dass die Inaktivierung der G_i-Proteine zu einer ca. 90-prozentigen Reduktion der detektierbaren Bindungsstellen von [³⁵S]GTPγS führte. Durch Normierung der Ergebnisse an den Homogenaten von PTX-vorbehandelten Zellen auf die Ligand-unabhängige basale Bindung des Nukleotids (entspricht 100 %), zeigte sich eine Zunahme der G-Protein-Aktivierung bei den getesteten orthosterischen Agonisten. Im Falle von Oxtremorin M und Iperoxo ergab sich ein signifikanter Unterschied zur basalen Bindung (t-Test, p < 0,05). Der für Acetylcholin gefundene Wert war ebenfalls numerisch höher als die basale Bindung. Der durchgeführte t-Test ergab jedoch mit einem p-Wert von 0,06 keinen signifikanten Effekt. Hybrid 1 und Atropin zeigten keine G-Protein-Aktivierung, die über den Ligand-unabhängigen Wert hinausging.

Es lagen neue orthosterisch-allosterische Testsubstanzen vor, die synthetisiert worden waren, um zu verbesserten Hybrid-Eigenschaften zu führen. Zwei der Hybride sind strukturell vom

Hybrid 1 abgeleitet und unterscheiden sich nur durch die Länge der Zwischenkette. Die C₆-Zwischenkette im Hybrid 1 ist bei der Substanz CZA7 um eine Methylenkette verlängert; im Folgenden wird deshalb auch die Bezeichnung C₇-Hybrid verwendet. Die zusätzliche Einführung einer Ethylenkette in das Hybrid 1 führte zur Substanz CZA8 (C₈-Hybrid) (Strukturformeln siehe Seite 40). Im Rahmen seiner Diplomarbeit hatte Michalski (2009) in [³⁵S]GTPγS-Bindungsuntersuchungen festgestellt, dass die Verlängerung der Zwischenkette zu einer Zunahme der Wirksamkeit und zu einer Steigerung der intrinsischen Aktivität führte. Folgende pEC₅₀-Werte wurden von Michalski gefunden: Hybrid 1 < CZA7 < CZA8 (7,69 ± 0,06 < 8,44 ± 0,09 < 8,67 ± 0,07). Der Wert für Hybrid 1 stimmt sehr gut überein mit dem Wert aus der vorliegenden Arbeit (pEC₅₀ = 7,63 ± 0,07). CZA7 und CZA8 zeigten in der Arbeit von Michalski keine verminderte intrinsische Aktivität gegenüber Acetylcholin. In Abbildung 77 A ist die dynamische Massenumverteilung, die durch äquieffektive Konzentrationen der ‚verlängerten Hybride‘ ausgelöst wurde, im Vergleich zur orthosterischen Muttersubstanz Iperoxo und zu Hybrid 1 dargestellt. An keinem der durchgeführten Versuchstage zeigte sich ein Hinweis auf eine submaximale intrinsische Aktivität. Abbildungsteil B zeigt die Signaturen der Testsubstanzen nach Vorinkubation mit PTX. Für CZA8 zeigte sich eine Selektivität des Auftretens einer G_i-Signatur, für CZA7 zeigte sich eine weitgehende Elimination der Signatur durch PTX.

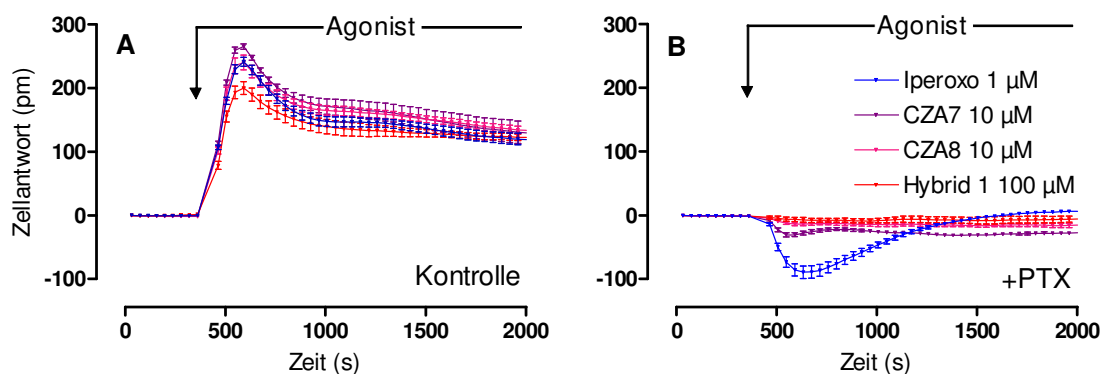


Abbildung 77: Effekt von CZA 7 (10 µM) und CZA 8 (10 µM) auf Flp-CHO-M₂-Zellen im Vergleich zu Iperoxo (1 µM) und Hybrid 1 (100 µM), unter Kontrollbedingungen (A) bzw. nach 20-stündiger Vorinkubation mit PTX (100 ng/ml) (B). **Ordinate:** Zelluläre Antwort, entspricht der Wellenlängenverschiebung in Picometer (pm). **Abszisse:** Zeit in Sekunden (s). **Datenpunkte:** Mittelwerte ± Standardfehler einer Vierfachbestimmung eines repräsentativen Experiments, ergänzt durch eine Verbindungslinie, das fünfmal (Iperoxo, Hybrid 1) bzw. zweimal (CZA 7, CZA 8) mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde.

3.5.4.3 Einfluss von hohen cAMP-Spiegeln (Forskolin-Vorstimulation) auf die Agonist-induzierte DMR

Bereits bei den methodischen Vorversuchen (siehe Abbildung 101) wurde deutlich, dass die Vorstimulation der Adenylylzyklase mit dem direkten Enzymaktivator Forskolin zu einer amplifizierten Zellantwort führte. Durch die hohen Spiegel an cAMP wurde der inhibierende Effekt auf die Adenylylzyklase verstärkt. Unter diesen Versuchsbedingungen sollten die allosterisch-orthosterischen Testsubstanzen untersucht werden, um festzustellen, ob sie volle intrinsische Aktivität besitzen oder ob die fehlende G_s -Komponente auf eine nur partielle Rezeptoraktivierung zurückgeführt werden kann. In Abbildung 78 ist die durch Hybrid 1 und Hybrid 2 induzierte dynamische Massenumverteilung im Vergleich zu den orthosterischen Vollagonisten Acetylcholin und Iperoxo dargestellt. Abbildung 79 zeigt einen entsprechenden, repräsentativen Versuchstag der Testsubstanzen CZA 7 und CZA 8. Die unter Kontrollbedingungen erzielten Effekte (Abbildungsteil A) sind den nach Forskolin-Vorstimulation erhaltenen Zellantworten (Abbildungsteil B) des entsprechenden Versuchstages gegenübergestellt.

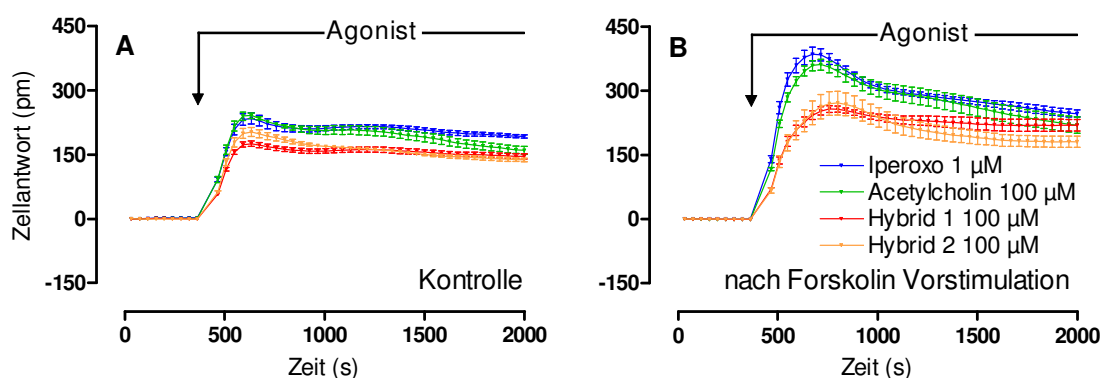


Abbildung 78: Vorstimulation der Adenylylzyklase durch Forskolin führt zu einer Verstärkung der inhibitorischen Zellantwort durch die M_2 -Rezeptor Aktivatoren Acetylcholin (100 μ M), Iperoxo (1 μ M), Hybrid 1 (100 μ M) und Hybrid 2 (100 μ M). **A:** DMR-Antwort in Flp-CHO- M_2 -Zellen unter Kontrollbedingungen und **B:** nach Vorstimulation mit Forskolin (10 μ M, 2 h). **Ordinate:** Zelluläre Antwort, entspricht der Wellenlängenverschiebung in Picometer (pm). **Abszisse:** Zeit in Sekunden (s). **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler einer Dreifach- bis Vierfachbestimmung eines beispielhaften Experiments, ergänzt durch eine Verbindungslinie, repräsentativ für mindestens drei solcher Experimente.

Bereits unter Kontrollbedingungen fiel im Rahmen der Epic[®]-Versuche dieser Arbeit auf, dass Hybrid 1 und Hybrid 2 eine schwächere Zellantwort induzierten als die bereits beschriebenen Vollagonisten. Auch die durchgeführten [³⁵S]GTP γ S-Bindungsexperimente dieser Arbeit hatten diese Hybride als Partialagonisten identifiziert: Hybrid 1 zeigte 79 ± 2 %, Hybrid 2 70 ± 1 % der intrinsischen Aktivität, im Vergleich mit einer vollagonistischen

Testsubstanz. Diese Befunde stehen im Gegensatz zu den von Kellershohn (Dissertationsschrift 2007) erhobenen Daten: Hybrid 1 ($E_{\max} = 100 \pm 2$) und Hybrid 2 ($E_{\max} = 99 \pm 2$) wurden als Vollagonisten identifiziert. Nach Vergrößerung des ‚Messfensters‘ durch Vorstimulation der Adenylylzyklase wurde der nur partielle Agonismus von Hybrid 1 und Hybrid 2 deutlich (siehe Abbildung 78). Bei Normierung des maximalen Effekts auf die Zellantwort von Iperoxo (entspricht 100 %) des jeweiligen Versuchstages erreichte Hybrid 1 $57 \pm 5 \%$ ($n = 4$) und Hybrid 2 $60 \pm 6 \%$ ($n = 3$).

Die beiden Hybride, die durch die Verlängerung der Zwischenkette strukturell modifiziert worden waren, um zu verbesserten Eigenschaften zu führen, zeigten in den [35 S]GTP γ S-Bindungsexperimenten vollständige Rezeptoraktivierung: Die Effekte von CZA 7 ($E_{\max} = 97 \pm 2$) und CZA 8 ($E_{\max} = 95 \pm 3$) unterschieden sich nicht signifikant vom maximalen Effekt von Acetylcholin (t-Test, $p < 0,05$). Abbildung 79 zeigt im Teil A die Messung der Gesamtheit der Rezeptorsignalwege unter Kontrollbedingungen. Die Signalwegsaktivierung des G_i -Weges nach maximaler Aktivierung der Adenylylzyklase mit Forskolin ist in Teil B dargestellt. Als Vergleichssubstanzen dienen die orthosterische Muttersubstanz Iperoxo und Hybrid 1; für dieses Hybrid war zuvor eine nur partielle Rezeptoraktivierung nachgewiesen worden (siehe Abbildung 78).

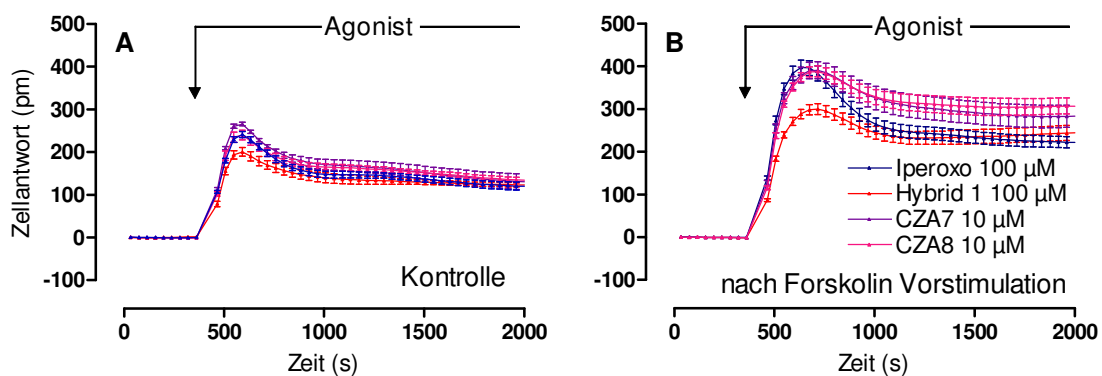


Abbildung 79: Vorstimulation der Adenylylzyklase durch Forskolin führt zu einer Verstärkung der inhibitorischen Zellantwort durch die M_2 -Rezeptor Aktivatoren Iperoxo (1 μ M), Hybrid 1 (100 μ M), CZA7 (10 μ M) und CZA8 (10 μ M) **A:** DMR-Antwort in Flp-CHO- M_2 -Zellen unter Kontrollbedingungen und **B:** nach Vorstimulation mit Forskolin (10 μ M, 2 h). **Ordinate:** Zelluläre Antwort, entspricht der Wellenlängenverschiebung in Picometer. **Abszisse:** Zeit in Sekunden (s). **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler einer Dreifach- bis Vierfachbestimmung eines beispielhaften Experiments, ergänzt durch eine Verbindungslinie, repräsentativ für mindestens drei solcher Experimente.

Im vorliegenden Versuch zur Messung der zellulären dynamischen Massenumverteilung konnte der auf G-Protein-Ebene gefundene Vollagonismus der orthosterisch-allosterischen Hybridsubstanzen mit verlängerter Zwischenkette bestätigt werden. Auch bei hohen cAMP-

Spiegeln und maximal stimulierter Adenylylzyklase war die maximale Zellantwort, die durch CZA 7 und CZA 8 ausgelöst wurde, nicht geringer als die von Iperoxo.

Es wurde erneut Pertussistoxin eingesetzt, um den Nachweis zu erbringen, dass die verstärkte intrazelluläre Massenverteilung, die als Folge der Forskolin-Vorstimulation durch die muskarinischen Agonisten induziert wurde, eine verstärkte Signalwegsaktivierung über G_i -Proteine widerspiegelt. In Abbildung 80 ist die Zellantwort dargestellt, die durch Acetylcholin, Iperoxo sowie Hybrid 1 nach Forskolin-Vorstimulation induziert wurde (A), im Vergleich zur Zellantwort nach 20-stündiger Vorinkubation der Zellen mit PTX und Forskolin-Vorstimulation.

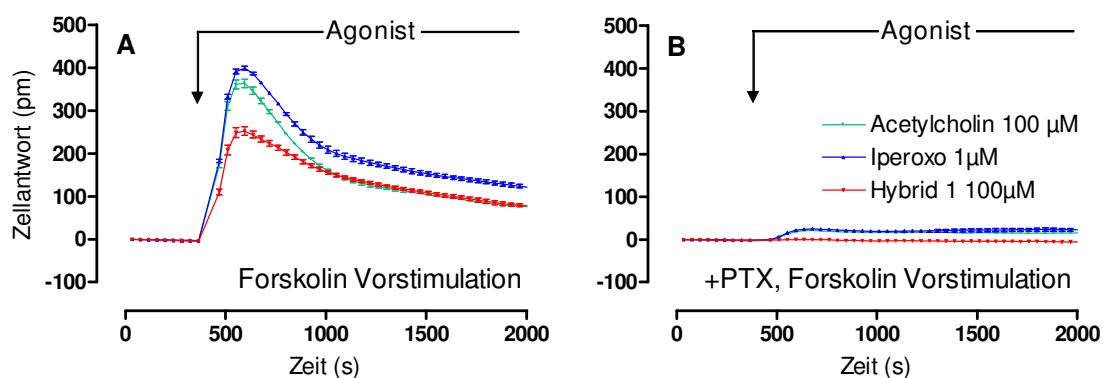


Abbildung 80: Einfluss von Pertussistoxin auf die durch Vorstimulation der Adenylylzyklase verstärkten, inhibitorischen Zellantworten der M_2 -Rezeptor Aktivatoren Iperoxo (1 μ M), Hybrid 1 (100 μ M) und Acetylcholin (100 μ M). **A:** DMR-Antwort in Flp-CHO- M_2 -Zellen nach Vorstimulation mit Forskolin (10 μ M, 2 h) und **B:** nach Vorbehandlung mit PTX (100 ng/ml, 20 h) und Vorstimulation mit Forskolin (10 μ M, 2 h). **Ordinate:** Zelluläre Antwort, entspricht der Wellenlängenverschiebung in Picometer (pm). **Abszisse:** Zeit in Sekunden (s). **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler eines repräsentativen Experiments in Vierfachbestimmung, ergänzt durch eine Verbindungslinie. Es wurde eine Wiederholung mit gleichartigen Ergebnissen durchgeführt.

Es zeigte sich, dass die Inaktivierung der G_i -Proteine durch PTX im Falle von Hybrid 1 zu einer vollständigen Inhibition der dynamischen Massenverschiebung führte. Auch die verstärkte Zellantwort ist alleine vom G_i -Signaltransduktionsweg abhängig. Da durch die bereits maximale Stimulation der Adenylylzyklase durch Forskolin keine weitere G_s -Aktivierung induziert werden konnte, war auch für Acetylcholin und Iperoxo keine negative Massenverschiebung, die eine G_s -Aktivierung bedeuten würde, zu erwarten (vgl. Abbildung 70 und Abbildung 72). Es zeigte sich jedoch, dass für beide Agonisten zwar eine ca. 95-prozentige Reduktion des Signals auftrat, jedoch ein Restsignal von ca. 30 pm auch nach PTX-Behandlung und Forskolin-Vorstimulation übrig blieb. Es ist unklar, ob es sich hier um ein streuungsbedingtes Messartefakt handelt, oder ob hier ein Hinweis auf die in der Literatur

(Griffin et al., 2007; Michael et al., 2006) beschriebene G_q -Kopplung der M_2 -Rezeptoren zu finden ist.

Eine kombinierte Anwendung der Toxine (PTX und CTX) führte, wie in Abbildung 81 gezeigt, für Acetylcholin zu einer kompletten Elimination des DMR-Signals. Es war kein Hinweis auf einen weiteren Signaltransduktionsweg (G_q) zu erkennen. Beachtet werden muss jedoch, dass die gleichzeitige Anwendung beider Toxine zu einer Beeinträchtigung des konfluenten Zellmonolayers führt, was eine Störung der optimalen Signaltransduktion zur Folge haben könnte.

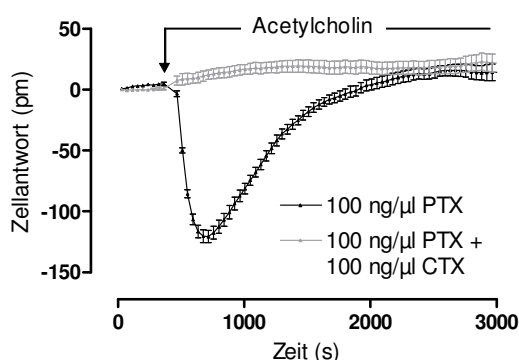


Abbildung 81: Einfluss von CTX auf die nach PTX-Vorstimulation erhaltene Zellantwort durch Acetylcholin ($100 \mu\text{M}$) am M_2 -Rezeptor. **A:** DMR-Antwort in Flp-CHO- M_2 -Zellen nach Vorinkubation mit PTX (100 ng/ml , 20 h) bzw. mit PTX und CTX (je 100 ng/ml , 20 h). **Ordinate:** Zelluläre Antwort, entspricht der Wellenlängenverschiebung in Picometer (pm). **Abszisse:** Zeit in Sekunden (s). **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler eines repräsentativen Experiments in Vierfachbestimmung, ergänzt durch eine Verbindungslinie. Es wurden zwei Wiederholungen mit gleichartigen Ergebnissen durchgeführt.

3.5.4.4 Einfluss der allosterischen Bindungsstelle des M_2 -Rezeptors auf die Ligand-induzierte dynamische Massenumverteilung

Abbildung 82 zeigt die Signaturen der orthosterischen Agonisten Acetylcholin, Iperoxo, sowie des Hybridliganden Hybrid 1 an M_2 -Rezeptoren, bei denen durch zielgerichtete Mutagenese zwei Kernepitope der allosterischen Bindungsstelle (Tyrosin in Position 177 und Threonin in Position 423) durch Alanin substituiert worden waren. Es sollte so untersucht werden, ob sich ein Einfluss der Mutation auf die Signalwegsaktivierung des Rezeptors zeigt. Dies würde die Hypothese einer Beteiligung der allosterischen Bindungsstelle an der Regulation nachgeschalteter Signaltransduktionswege stützen.

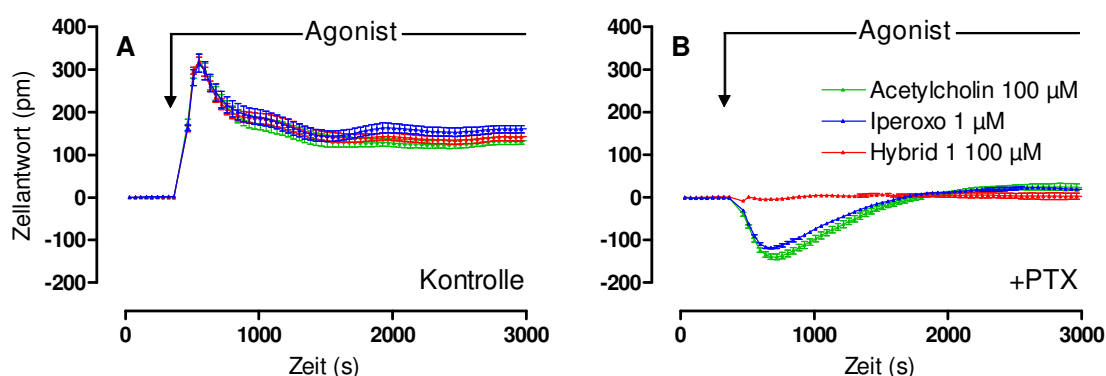


Abbildung 82: Effekt der Doppelmutation der allosterischen Kernepitope $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln} + M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$ auf die Acetylcholin ($100\ \mu\text{M}$)-, Iperoxo ($1\ \mu\text{M}$)- und Hybrid 1 ($100\ \mu\text{M}$)-induzierte Zellantwort. **A:** unter Kontrollbedingungen bzw. **B:** nach 20-stündiger Vorinkubation mit PTX ($100\ \text{ng/ml}$). **Ordinate:** Zelluläre Antwort, entspricht der Wellenlängenverschiebung in Picometer (pm). **Abszisse:** Zeit in Sekunden (s). **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler einer Dreifachbestimmung eines repräsentativen Experiments, ergänzt durch eine Verbindungslinie, das ein- bis zweimal mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde.

Bei Vergleich der Abbildung 82 mit den Signaturen der Agonisten am M_2 -Wildtyp (siehe Abbildung 72 und Abbildung 75) zeigten sich keine charakteristischen Unterschiede. Auch nach Mutation der beiden Kernepitope sind die Kopplungseigenschaften der Testsubstanzen unverändert. Es ergab sich kein Hinweis auf eine regulatorische Eigenschaft der allosterischen Epitope. Es ist allerdings zu beachten, dass es auch trotz der vorliegenden Doppelmutation weiterhin eine Bindung an das allosterische Haftareal erfolgen könnte, da andere Kernsequenzen wie z. B. die EDGE Sequenz noch intakt waren. Außerdem sind keine Aussagen zum Einfluss auf die Wirksamkeit möglich. Zur genaueren Abklärung des Befunds müssen umfangreichere Untersuchungen erfolgen.

3.5.4.5 Einfluss der Punktmutation $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ auf die McN-A-343-induzierte dynamische Massenumverteilung

$[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsexperimente (siehe 3.3.3.1.4) konnten den von Valant et al. (2008; 2009) in Studien zur ERK-Phosphorylierung gefundenen Gewinn an intrinsischer Aktivität von McN-A-343, ausgelöst durch die Mutation $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$, nicht bestätigen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die beobachtete Steigerung von E_{max} auf einem G-Protein-unabhängigen Weg erfolgt. Dies könnte die Diskrepanz zwischen den verschiedenen Studien erklären. Es wurden Untersuchungen zur dynamischen Massenumverteilung durchgeführt, die eine Aufnahme der Ganzzellantwort ermöglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 83 dargestellt.

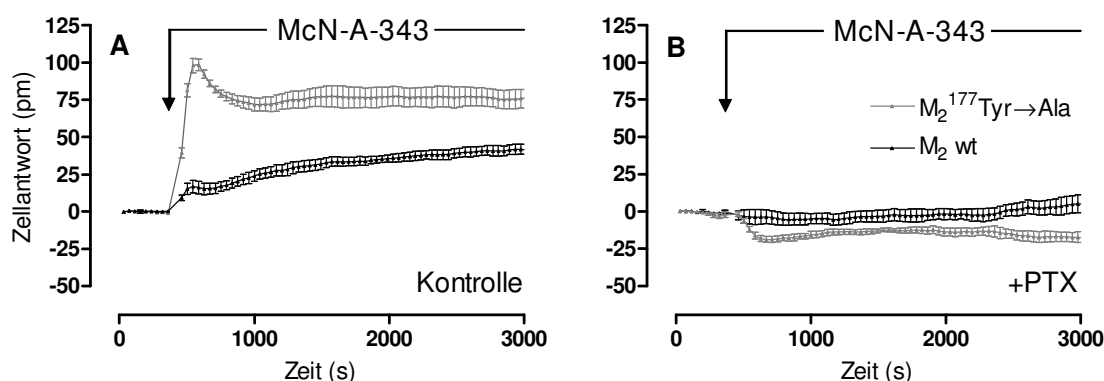


Abbildung 83: Effekt der Mutation $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ McN-A-343 ($100\ \mu\text{M}$)-induzierte Zellantwort im Vergleich zum Wildtyp M_2 -Rezeptor. **A:** unter Kontrollbedingungen bzw. **B:** nach 20-stündiger Vorinkubation mit PTX ($100\ \text{ng/ml}$). **Ordinate:** Zelluläre Antwort, entspricht der Wellenlängenverschiebung in Picometer (pm). **Abszisse:** Zeit in Sekunden (s). **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler einer Dreifachbestimmung eines repräsentativen Experiments, ergänzt durch eine Verbindungslinie, das zweimal (A) bzw. einmal mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen der ERK-Phosphorylierungsversuche von Valant et al. (2008) konnte eine deutliche Verstärkung des Effekts von McN-A-343 ($100\ \mu\text{M}$) am punktmutierten Rezeptor $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ gefunden werden. Abbildungsteil B zeigt, dass nach Vorinkubation mit PTX und Ausschaltung des G_i -Effekts weder an der Rezeptormutante noch am Wildtyp eine charakteristische Massenverschiebung messbar war.

Bezüglich der Steigerung der McN-A-343-induzierten Zellantwort wurde auch die allosterischen Doppelmutante ($M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln} + M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$) untersucht. Hier zeigte sich, übereinstimmend mit den Befunden von Valant et al. (2008; 2009), ebenfalls eine Verstärkung des Effekts, die jedoch vollständig auf das Epitop $M_2^{177}\text{Tyr}$ zurückzuführen war.

3.5.4.6 Einfluss des Epitops $M_2^{422}\text{Trp}$ auf die Ligand-induzierte dynamische Massenumverteilung

Die Befunde der $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsuntersuchungen zeigten die wichtige Rolle des Epitops $M_2^{422}\text{Trp}$ für die Rezeptoraktivierung (siehe 3.3.1). Durch Messungen zur zellulären dynamischen Massenumverteilung sollte untersucht werden, ob die zwischen den Rezeptorsubtypen konservierte Aminosäure zusätzlich einen Einfluss auf die Induktion von intrazellulären Signaltransduktionswegen hat. Abbildung 84 zeigt ein repräsentatives Experiment, das an stabil transfizierten Flp-CHO- $M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Zellen durchgeführt wurde.

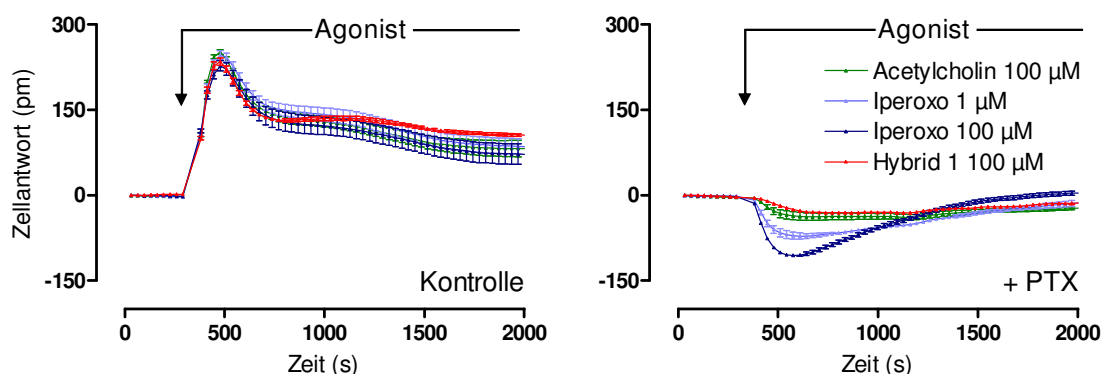


Abbildung 84: Effekt der Mutation $M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ auf die Acetylcholin ($100\ \mu\text{M}$)-, Iperoxo ($1\ \mu\text{M}$)- und Hybrid 1 ($100\ \mu\text{M}$)-induzierte Zellantwort. **A:** unter Kontrollbedingungen bzw. **B:** nach 20-stündiger Vorinkubation mit PTX ($100\ \text{ng/ml}$). **Ordinate:** Zelluläre Antwort, entspricht der Wellenlängenverschiebung in Picometer (pm). **Abszisse:** Zeit in Sekunden (s). **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler einer Dreifachbestimmung eines repräsentativen Experiments, ergänzt durch eine Verbindungslinie, das ein- bis zweimal mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde.

Die Signaturen der Aktivatoren zeigen keine Veränderung im Vergleich zum in Abbildung 70 und Abbildung 75 dargestellten Wildtyp. Bei Testung der am M_2 -Wildtyp-Rezeptor verwendeten Konzentrationen der Liganden fiel nach PTX-Vorbehandlung auf, dass für Acetylcholin ($100\ \mu\text{M}$) kein und für Iperoxo ($1\ \mu\text{M}$) nur ein sehr schwaches, abwärts gerichtetes Signal erreicht wurde, das mit einer G_s -Kopplung kompatibel wäre. Zu beachten ist jedoch, dass die G_s -Proteine mit geringerer Affinität als die G_i -Kopplung angesprochen werden. Bei den Versuchen am Wildtyp-Rezeptor wurden rezeptorsättigende Konzentrationen verwendet. Die Konzentrations-Effekt-Kurven der $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung der Vollagonisten (siehe Abbildung 29) zeigen jedoch eine durch die Mutation $M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ ausgelöste starke Rechtsverschiebung. Auf Grund der außerordentlich hohen Wirksamkeit von Iperoxo konnte durch den Einsatz höherer Konzentrationen der Substanz ($10\ \mu\text{M}$, nicht gezeigt und $100\ \mu\text{M}$, Abbildung 84) gezeigt werden, dass auch die vorliegende Rezeptor-Mutante in der Lage ist, konzentrationsabhängig an G_i - und alternativ an G_s -Proteine zu koppeln. Bei Acetylcholin war eine dem Wirksamkeitsverlust entsprechende Konzentrationssteigerung nicht möglich. Ab einer Konzentration von $1000\ \mu\text{M}$ Acetylcholin traten unspezifische Effekte auf. Die nicht Rezeptor-vermittelte DMR zeigte sich ebenfalls bei Untersuchungen an nicht transfizierten CHO-Zellen.

4 Diskussion

Aus den im vorangegangenen Kapitel vorgestellten Ergebnissen lassen sich die folgenden Kernbefunde ableiten:

- (1) Die dualsterischen Muskarinrezeptoraktivatoren (Hybrid 1 und Hybrid 2), bestehend aus dem orthosterischen Agonisten Iperoxo und einem Baustein eines allosterischen Modulators (W84 oder Naphmethonium), ermöglichten eine selektive Aktivierung des G_i-Signaltransduktionsweges. Die zusätzliche Aktivierung von Adenylylzyklase-stimulierenden G_s-Proteinen, die für orthosterische Agonisten nachgewiesen wurde, konnte durch Einführung des allosterischen Molekülteils verhindert werden.
- (2) Hybrid 1 und Hybrid 2 zeigten keine vollständige Rezeptoraktivierung. Vor allem beim Vorliegen hoher cAMP-Spiegel und einer maximal stimulierten Adenylylzyklase ergab sich ein nur partieller inhibitorischer Effekt über G_i-Proteine.
- (3) Durch Verlängerung der im Hybrid 1 vorliegenden C₆-Zwischenkette um eine bzw. zwei Methylengruppen konnte eine volle intrinsische Aktivität wiederhergestellt werden, bei gleichzeitiger Konservierung der selektiven Signalwegsaktivierung des G_i-Signaltransduktionsweges in Messungen der zellulären dynamischen Massenumverteilung.
- (4) Die Reduktion des allosterischen Anteils der von Iperoxo abgeleiteten dualsterischen Hybride auf die Bisammoniumstruktur (JSW 236) führte zum Verlust der Eigenschaft der dualsterischen Rezeptorbesetzung.
- (5) Erstmals konnte gezeigt werden, dass die orthosterische Aktivierung des muskarinischen M₂-Rezeptors beeinflussbar ist durch ein Rezeptor-Epitop, das am inaktiven Rezeptor eine zentrale Rolle innerhalb der allosterischen Bindungsstelle einnimmt: Die Wirksamkeit von Vollagonisten wie Acetylcholin und die intrinsische Aktivität des Partialagonisten Pilocarpin wurden durch die Punktmutation M₂⁴²²Trp→Ala stark herabgesetzt.
- (6) Die konservierte, allosterische Aminosäure M₂⁴²²Trp (Trp 7.35) wurde als wichtiges Epitop für die konstitutive Rezeptoraktivität identifiziert.
- (7) Die Aktivierung des M₂-Rezeptors durch den muskarinischen Liganden McN-A-343 hängt von orthosterischen und allosterischen Epitopen ab. Postuliert wird ein Einfluss des allosterischen Epitops M₂¹⁷⁷ auf die McN-A-343 vermittelte Signalwegsaktivierung des M₂-Rezeptors.

4.1 Verknüpfung allosterischer und orthosterischer Liganden des muskarinischen Acetylcholinrezeptors zu dualsterischen Hybridverbindungen

Das Konzept der dualsterischen Hybridverbindungen beinhaltet die kovalente Verknüpfung eines orthosterischen und eines allosterischen Strukturelements. Ziel war, über die simultane Besetzung beider Haftareale des muskarinischen M_2 -Rezeptors, die in der Wirkstoffforschung hoch erwünschte Eigenschaft der Selektivität zu erreichen.

Vorangehende Untersuchungen unseres Arbeitskreises konnten durch dieses rationale Design mit den Substanzen Hybrid 1 und Hybrid 2 eine neue Klasse von Aktivatoren G-Proteingekoppelter Rezeptoren begründen. In Organbadversuchen wurde die erwünschte Selektivität für den Subtyp M_2 gezeigt. Radioligandbindungsuntersuchungen an Wildtyp- und mutierten Rezeptoren bestätigten die Interaktion mit der orthosterischen und der allosterischen Bindungsstelle des Rezeptorproteins. Hierfür wurde von uns die Bezeichnung des **dualsterischen Bindungsmodus** eingeführt. Abbildung 85 zeigt eine Simulation des dualsterischen „Dockings“ von Hybrid 1 an den M_2 -Rezeptor.

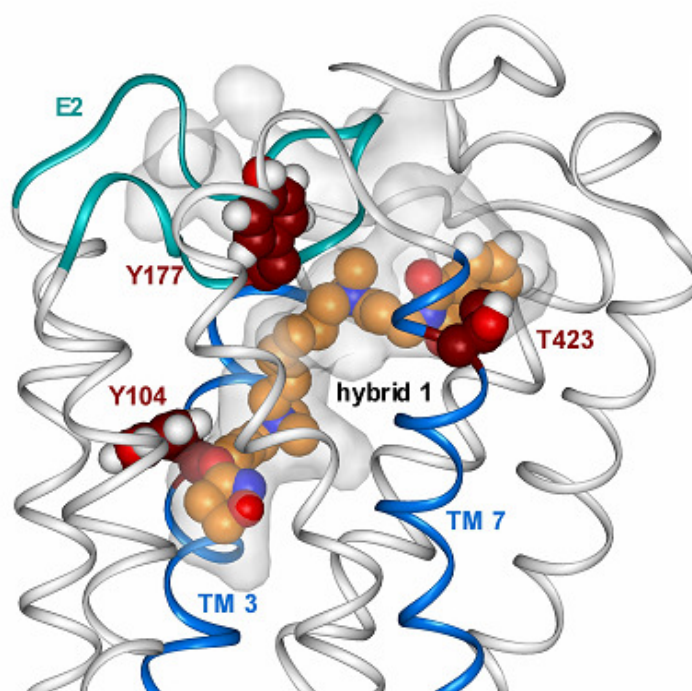


Abbildung 85: Dualsterisches M_2 -Rezeptor-„Docking“ von Hybrid 1. Gezeigt ist eine repräsentative Struktur der Molekül-Dynamik-Simulation. Farbcodierung des Proteinrückgrats: türkis, E2; blau, TM3 und TM7; weiß, andere Helices und Schleifen. Farbcodierung der Atome: weiß, Wasserstoff; blau, Stickstoff; rot, Sauerstoff; orange, Kohlenstoff; dunkelrot M_2^{104} Tyr, M_2^{177} Tyr, M_2^{423} Thr: Kohlenstoff, Volumina der Bindungsstellen: weiß-transparente Silhouette (Antony et al., 2009).

Tabelle 58 gibt einen Überblick über die Strukturen der verschiedenen Hybridverbindungen, die im Rahmen dieser sowie in früheren Arbeiten (Dallanocce et al., 1999; Dissertationsschrift Kellershohn, 2007) untersucht wurden. Gemeinsam haben sie den strukturellen Aufbau aus einem orthosterischen Agonisten, der von Oxotremorin M abgeleitet ist, und einem allosterischen inversen Agonisten, der entweder aus einem W84-Rest oder einem Naphmethonium-Rest besteht. Weiter abgeleitet sind die Hybride MG 1 und MG 2 mit McN-A-343 als Agonisten.

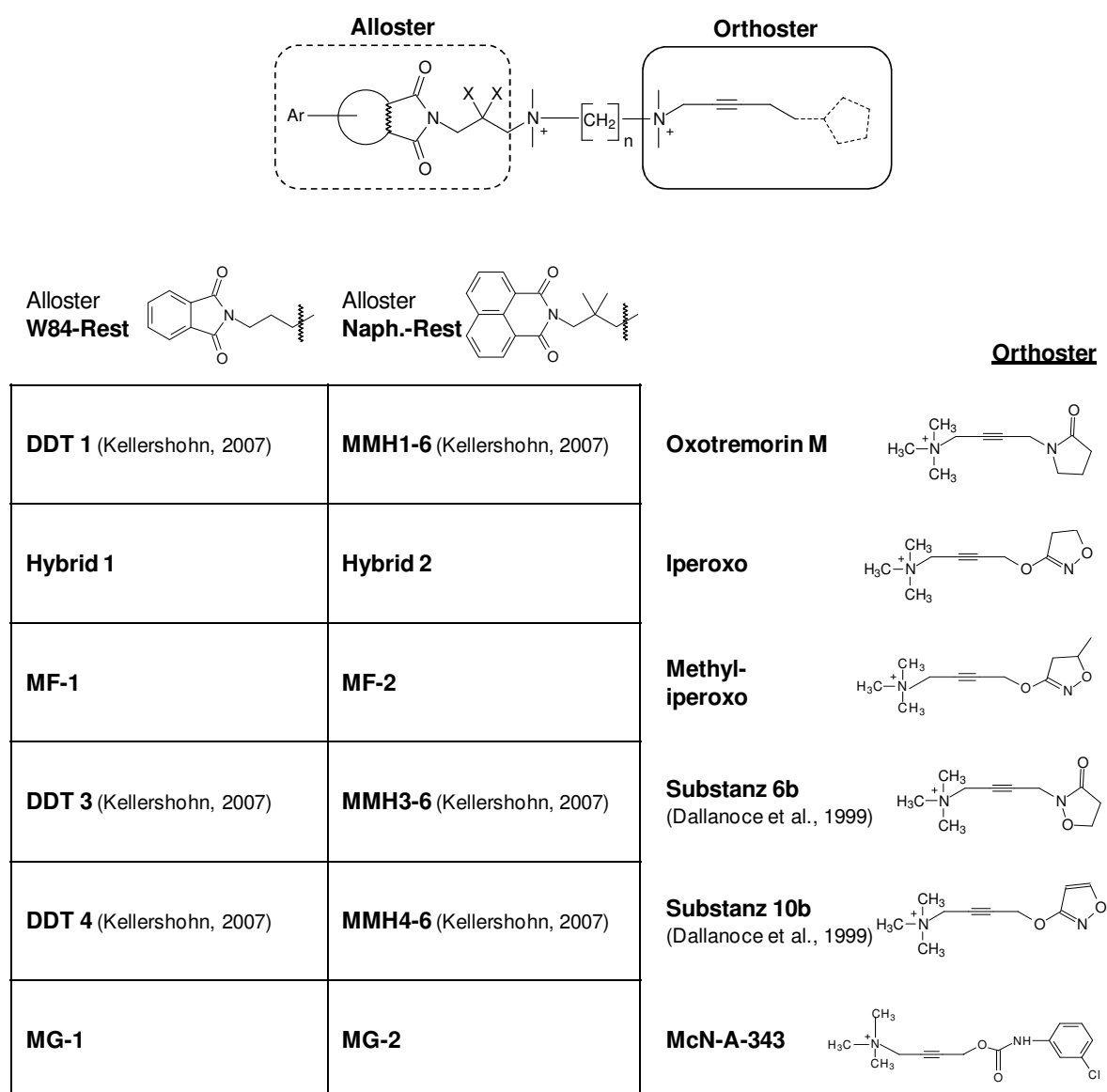


Tabelle 58: Schematische Übersicht über die dualsterischen Hybride. Orthosterischer Agonist-Baustein (durchgezogene Umrandung): Derivate von Oxotremorin M, allosterischer Baustein (gestrichelte Umrandung): W84- bzw. Naphmethonium-Rest. Bei Testsubstanzen, die vor dieser Arbeit untersucht wurden, ist die Quelle in Klammern angegeben.

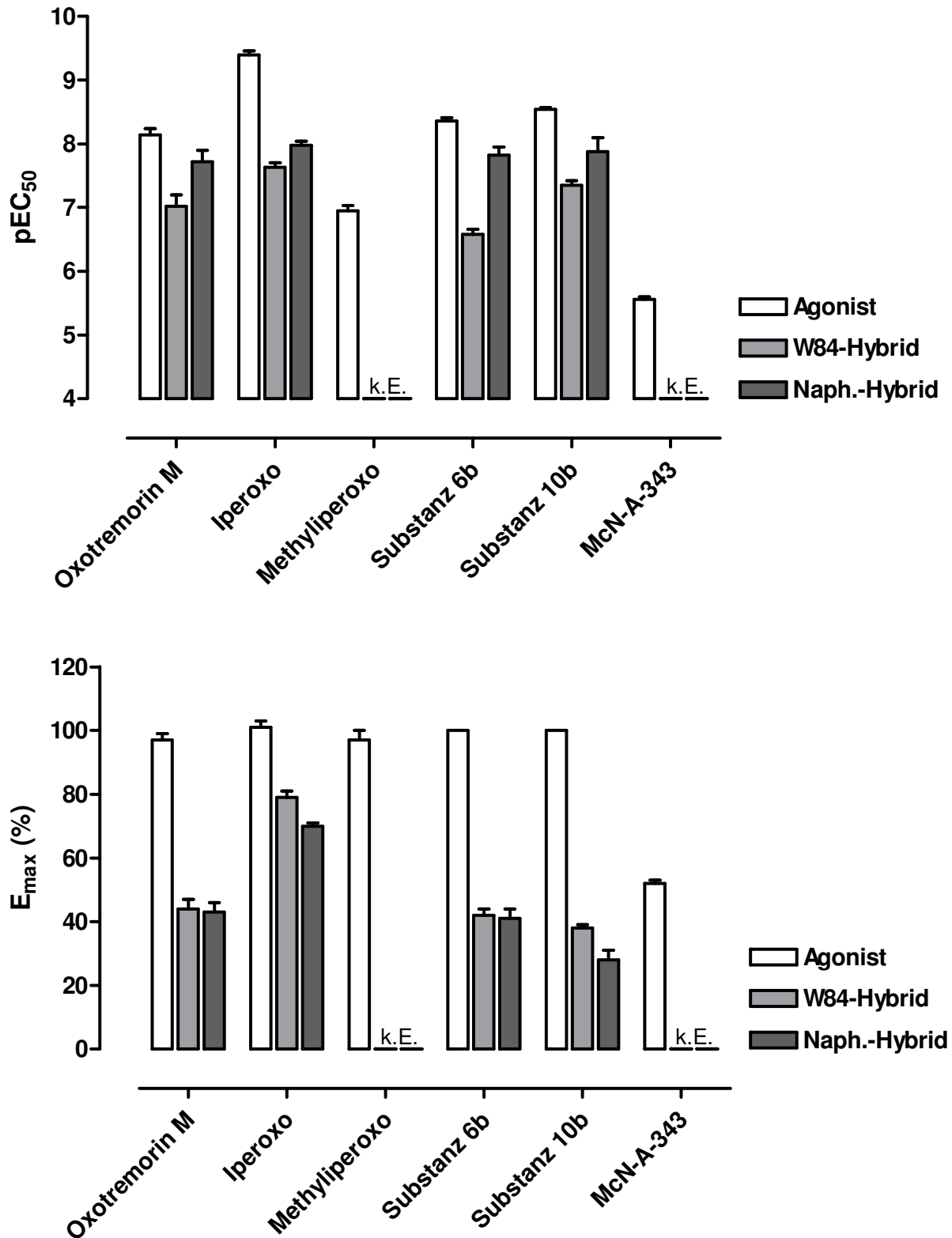


Abbildung 86: Vergleich der pEC₅₀- und E_{max}-Werte der orthosterischen Agonisten (weiß) und der abgeleiteten Hybride. Die entsprechenden W84-Hybride sind in hellgrau dargestellt, die Naphmethonium-Hybride in dunkelgrau. Die Werte der Testsubstanzen, die nicht im Rahmen dieser Arbeit erhoben wurden, sind den in Tabelle 58 angegebenen Quellen entnommen. k. E.: kein Effekt, für diese Testsubstanzen war kein agonistischer Effekt detektierbar. Für die Agonisten 6b und 10b, die in Dallanoce et al. (1999) als Vollagonisten klassifiziert wurden, wurde E_{max} auf 100 % festgesetzt.

Abbildung 86 zeigt einen Vergleich der pEC_{50} - und E_{max} -Werte der orthosterischen Agonisten und der abgeleiteten Hybride. Die orthosterische Muttersubstanz zeigte im Vergleich mit den jeweiligen Hybriden die höchste Wirksamkeit, gefolgt vom entsprechenden Naphmethonium- und W84-Hybrid. Die geringfügig höhere Affinität der Naphmethoniumverbindungen könnte den Affinitätsgewinn, den das Alloster Naphmethonium gegenüber der Muttersubstanz der Alkan-Bisammonium-Verbindungen W84 hat, widerspiegeln.

Auffällig war, dass die Hybridbildung über die C_6 -Zwischenkette des Allostere in allen Fällen zu einer signifikanten Reduktion des Maximaleffekts führte. Nur durch einen agonistischen Baustein, der im Vergleich mit dem endogenen Liganden Acetylcholin eine „supermaximale“ Wirksamkeit hat, ließ sich nach Hybridbildung eine intrinsische Aktivität konservieren. Auch zuvor synthetisierte dualsterische Hybride weniger wirksamer Agonisten hatten sich in Organbadexperimenten am isolierten linken Meerschweinchenvorhof als M_2 -selektive Antagonisten (Disingrini et al., 2006) gezeigt.

Die höchste intrinsische Aktivität in [^{35}S]GTP γ S-Bindungsexperimenten zeigten die von Iperoxo abgeleiteten Hybride. In Organbadexperimenten am isolierten linken Meerschweinchenvorhof als M_2 -Modell wurde sogar ein vollagonistischer Effekt erreicht (Antony et al., 2009). Die hoch potente Rezeptoraktivierung durch Iperoxo „gewann“ gegenüber dem invers agonistischen Alloster. Die außerordentlich starken Eigenschaften (Wirksamkeit und intrinsische Aktivität) von Iperoxo wurden besonders deutlich im Vergleich mit dem Derivat Methyliperoxo. Die Einführung einer Methylgruppe als zusätzlichen Substituenten im Ringsystem (Strukturformeln, siehe Tabelle 58) führte zu einem Wirksamkeitsverlust von 2,5 Dekaden und beeinflusste offenbar massiv die optimale Passform, welche Iperoxo für die Bindungstasche des Rezeptors besitzt. Auch Methyliperoxo war in der Lage den Rezeptor maximal zu aktivieren, die abgeleiteten Hybride zeigten jedoch keine intrinsische Aktivität.

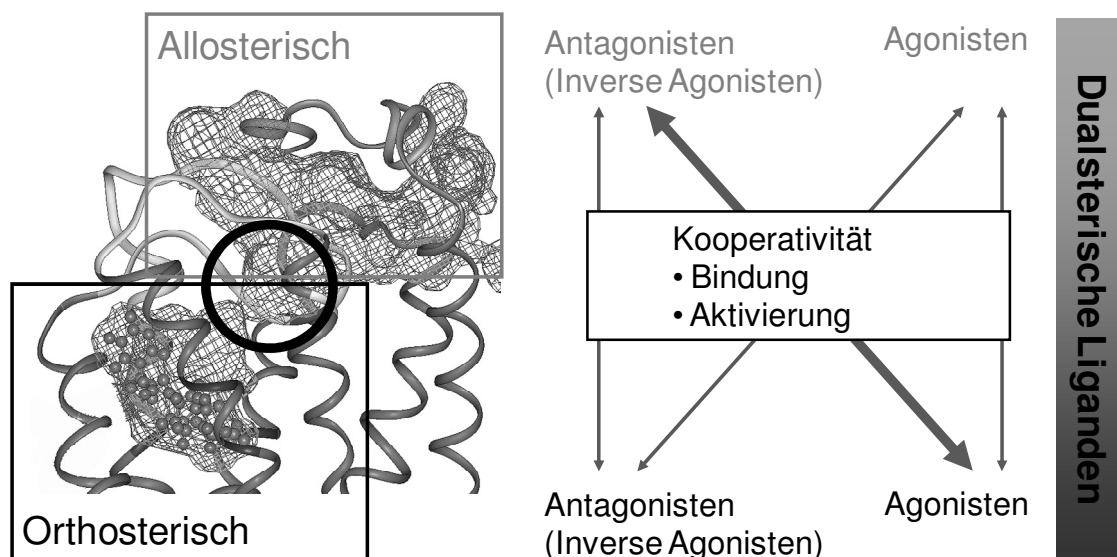


Abbildung 87: Linker Teil: Räumliche Anordnung der orthosterischen und der allosterischen Bindungstasche des muskarinischen M_2 -Rezeptors im inaktiven Rezeptorzustand. In die orthosterische Bindungsstelle ist der inverse Agonist N-Methylscopolamin eingepasst. Die freien Volumina sind als graue Netzstruktur angedeutet. Die Schlüsselregion der allosterischen Bindungsstelle ($M_2^{177}\text{Tyr}$, $M_2^{422}\text{Trp}$, $M_2^{423}\text{Thr}$) liegt innerhalb des schwarzen Kreises. Rechter Teil: Mögliche allosterisch-orthosterische Ligand-Rezeptor Interaktionen. Der herausgestellte Pfeil deutet die Art der Verknüpfung, die bei den Hybriden dieser Arbeit vorliegt, an (dualsterische Liganden aus einem agonistischen Orthoster und einem invers agonistischen Alloster). Abbildung modifiziert nach De Amici et al., 2009.

Abbildung 87 gibt einen Überblick über die möglichen allosterisch-orthosterischen Ligand-Rezeptorinteraktionen. Bei gleichzeitiger Besetzung beider Bindungsstellen kommt es zur Kooperativität der Liganden bezüglich ihrer Bindung an den Rezeptor und dessen Aktivierung. Diese gegenseitige Beeinflussung dürfte auch bei den Molekülbausteinen eine Rolle spielen, wenn diese in den Hybriden kovalent verknüpft sind. Dualsterische Liganden können im Prinzip aus zwei funktionell gleichgerichteten Teilen bestehen (d. h. zwei Agonisten bzw. zwei inverse Agonisten) oder aus funktionell einander gegengerichteten Anteilen (d. h. Kopplung von Agonist und inversem Agonist). Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Hybride waren aus einem orthosterischen Agonisten und einem allosterischen inversen Agonisten aufgebaut (siehe Tabelle 58).

Die Kombination der funktionell gegensätzlichen Bausteine kann auch als Grund dafür angesehen werden, dass sich die Affinitäten nicht, wie nach thermodynamischen Grundsätzen zu erwarten wäre (Mammen et al., 1998), addieren. In vorangegangenen Untersuchungen zeigten sich stark negative Bindungskoopertivitäten zwischen orthosterischen Agonisten und allosterischen Modulatoren vom Typ der Alkan-Bisammonium-Verbindungen (Jäger et al., 2007). Wahrscheinlich wird der Rezeptor in ein Spannungsverhältnis versetzt, da die allosterische Besetzung die inaktive Konformation stabilisiert, die orthosterische hingegen

eine aktive Konformation induziert. Dies ist auch eine mögliche Erklärung für die im Vergleich mit dem Mutteragonisten Iperoxo herabgesetzte intrinsische Aktivität von Hybrid 1 und Hybrid 2. Die suboptimale Rezeptoraktivierung zeigt sich zudem in einer verminderten Wirksamkeit. Im Fall der Hybride, die Methyliperoxo und McN-A-343 als Agonist enthalten, resultierte sogar der vollständige Verlust des Agonismus am M_2 -Rezeptor.

Die Verbindung von orthosterischen und allosterischen Bausteinen zu dualsterischen Liganden kann so ein neues Spektrum an pharmakologischen Werkzeugen eröffnen. Durch geschickte Kombination von Bausteinen könnte es möglich werden, intrinsische Aktivität von Testsubstanzen zu „titrieren“ und das Spektrum zwischen inversem Vollagonismus und maximaler intrinsischer Aktivität auszuschöpfen. In dieser Arbeit konnte mit der Substanz MF-2 (siehe 3.3.5.2.2) der erste Hinweis auf einen neutralen Antagonisten an M_2 -Rezeptoren erbracht werden. Alle klassischen orthosterischen und allosterischen Antagonisten erwiesen sich als inverse Agonisten. Die neutrale Besetzung einer Rezeptorbindungsstelle ist theoretisch nur möglich, wenn der Ligand mit gleicher Affinität an das Protein in der inaktiven und der aktiven Rezeptorkonformation bindet. Im Gegensatz dazu ist es vorstellbar, dass dualsterische neutrale Liganden durch die simultane Besetzung beider Bindungsstellen, den Rezeptor in einer neuen Konformation fixieren, deren Aktivität derjenigen der unbesetzten Konformation gleicht.

Die Verknüpfung der beiden Bausteine erfolgte bei der ersten Hybrid-Reihe über eine C_6 -Zwischenkette, analog zur allosterisch/allosterischen Struktur des W84 Moleküls. Anzumerken ist, dass für die Wirksamkeit der allosterischen Modulatoren vom Typ der Alkan-Bisammonium-Verbindungen ein Optimum der Zwischenkette von sechs bis sieben Kohlenstoffatomen gefunden worden war (Nassif-Makki et al., 1999). Prilla (Dissertationschrift, 2006) hatte den Einfluss einer Veränderung der Kettenlänge beim Alloster untersucht (Verkürzung auf vier C-Atome und Verlängerung auf acht C-Atome). Hier zeigte sich, dass bei der maximalen untersuchten Kettenlänge C_8 die Affinität am höchsten und auch die M_2/M_5 -Subtypselektivität am stärksten ausgeprägt war.

Als neue Testsubstanzen standen die zwischenkettenverlängerten allosterisch/orthosterischen Hybride CZA 7 und CZA 8 zur Verfügung. Wie Hybrid 1 bestehen sie aus einem Iperoxo-Teil und einem W84-Rest. Die beiden quartären Stickstoffatome sind über eine Alkylkette verbunden: Hybrid 1 enthält, wie beschrieben eine Hexyl-, CZA 7 eine Heptyl- und CZA 8 eine Octylzwischenkette. Im Rahmen seiner Diplomarbeit konnte Harm Michalski (2009) in [35 S]GTP γ S-Bindungsexperimenten zeigen, dass sich eine Kettenverlängerung förderlich auf

die Wirksamkeit und auf die intrinsische Aktivität auswirkt. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die im Hybrid 1 vorliegende Verknüpfung eine optimale Anpassung der Molekülbausteine in die zugehörigen Bindungstaschen des Rezeptors verhindert. Durch die Verlängerung der Zwischenkette kann das Hybrid offenbar in einer relaxierteren Form mit dem Rezeptor interagieren, sodass eine gesteigerte Wirksamkeit und eine maximale intrinsische Aktivität resultieren.

Diese Ergebnisse zeigen, dass beim „Design“ dualsterischer Liganden neben dem orthosterischen und dem allosterischen Molekülbaustein die Zwischenkette einen dritten variablen Parameter darstellt, der entscheidend ist für die resultierenden Eigenschaften des Hybridmoleküls.

4.2 Erörterung der intrazellulären Signalwegsaktivierung durch orthosterische und dualsterische Testsubstanzen

Neben der selektiven Aktivierung des muskarinischen Subtyps M₂ sollte durch die Vergrößerung des Haftareals eine Stabilisierung des Ligand-Rezeptor-Komplexes erreicht werden. Die gleichzeitige Besetzung beider Bindungsstellen des Rezeptors hat Auswirkungen auf die Rezeptorkonformation und kann so eine spezifische Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktionswege bewirken.

Für orthosterische Vollagonisten ist eine promiskuitive Kopplung über verschiedene Klassen von G-Proteinen bekannt. Neben den bevorzugten G_i-Proteinen werden mit geringerer Affinität auch Adenylylzyklase stimulierende G_s-Proteine sowie G_q-Proteine (Mistry et al., 2005; Michal et al., 2007) angesprochen. Die zusätzlichen Kopplungen über G_i- und komplementäre G_s-Proteine konnten in der vorliegenden Arbeit für die untersuchten Vollagonisten bei Einsatz Rezeptor-sättigender Konzentrationen auf G-Protein-Ebene mit Hilfe des [³⁵S]GTPγS-Bindungsversuchs und auf Ganzzell-Ebene durch Untersuchungen der zellulären dynamischen Massenumverteilung nachgewiesen werden.

Die Validierung der Epic[®]-Signaturen, die M₂-Rezeptor-vermittelt in den untersuchten CHO-Zellen auftraten, erfolgte durch den Einsatz von Toxinen: Forskolin, als direkter Aktivator der Adenylylzyklase, führte analog zur G_s-Signatur zu einem abwärtsgerichteten Signal im Bereich negativer Massenverschiebungen. Die Aktivität von Forskolin trat Rezeptor-unabhängig auf. G_i-Proteine sind Pertussistoxin-sensitiv, sodass eine G_i-Signatur charakterisiert werden konnte. Nach einem initialen steilen Anstieg und einem spitzen „Peak“,

kam es im weiteren zeitlichen Verlauf zu einer Abnahme der dynamischen Massenumverteilung. Die kombinierte Vorinkubation mit Pertussistoxin und Cholera toxin bzw. Pertussistoxin und Forskolin führte zur kompletten Inhibition der M_2 -Rezeptorvermittelten Zellantwort. Pertussistoxin inaktivierte dabei das „ G_i -Signaling“. Cholera toxin bzw. Forskolin führten durch die Vorinkubation bereits zu einer maximalen Aktivierung der G_s -Proteine, unabhängig von der Rezeptoraktivierung. Es konnte so keine weitere Rezeptorvermittelte G_s -Aktivierung erzielt werden.

Die dualsterischen Testsubstanzen Hybrid 1 und Hybrid 2 waren in der Lage, selektiv den Signaltransduktionsweg über G_i -Proteine anzusprechen. Durch die Einführung des allosterischen Molekülbausteins wurde neben der selektiven Aktivierung des Subtyps M_2 , die in Organbadversuchen gefunden wurde (Antony et al., 2009), eine selektive Signalwegsaktivierung über Adenylylzyklase inhibierende G_i -Proteine erreicht (siehe Abbildung 75). Die Befunde wurden auf G-Protein-Ebene durch [35 S]GTP γ S-Bindungsversuche an Membranen, die aus Pertussistoxin-vorbehandelten Zellen gewonnen worden waren, bestätigt (siehe Abbildung 76). Auch ein klassischer Versuchsansatz zur Messung der Akkumulation des *second messengers* cAMP, bestätigte die Stimulation der cAMP-Bildung durch orthosterische, nicht aber durch dualsterische Testsubstanzen (Anke Müller, persönliche Mitteilung).

Die Untersuchung der Substanz CZA 1, einem Dimer von Iperoxo, verknüpft über eine Hexylzwischenkette, zeigte in Bezug auf die Signalwegsaktivierung ein gleichartiges Verhalten wie das Monomer: G_i - und G_s - Proteine wurden aktiviert. Diese Befunde zeigen, dass die Selektivität für den G_i -Weg offenbar durch die Einführung eines spezifischen allosterischen Bausteins erreicht wird, denn weder die Zwischenkette alleine (siehe JSW 236, Kapitel 4.3) noch die Kopplung an ein zweites Orthoster (siehe Abbildung 72) führen zu einer spezifischen Aktivierung des G_i -Signaltransduktionsweges.

Die experimentellen Befunde dieser Arbeit zeigen, dass sowohl Hybrid 1 als auch Hybrid 2 nicht in der Lage waren, M_2 -Rezeptoren vollständig zu aktivieren ([35 S]GTP γ S-Bindungsversuche siehe Abbildung 19 und Abbildung 20). Dies wurde besonders in DMR-Experimenten unter Versuchsbedingungen mit einem maximal geöffneten Fenster für einen G_i -Effekt auf die Adenylylzyklase deutlich, nämlich beim Vorliegen einer maximal stimulierten Adenylylzyklase, sei es direkt durch Forskolin oder indirekt durch Cholera toxin (siehe Abbildung 78). Messungen der Sarkomerverkürzung an murinen Kardiomyozyten

bestätigten die submaximale intrinsische Aktivität von Hybrid 1 (Wiebke Seemann, persönliche Mitteilung, Hybrid 2 wurde nicht untersucht).

Als neuere dualsterische Hybridliganden standen, wie oben erwähnt, die zwischenkettenverlängerten Hybride CZA 7 und CZA 8 zur Verfügung. Dadurch konnte eine volle intrinsische Aktivität erzielt werden (Diplomarbeit, Michalski 2009). Auch unter Bedingungen einer maximal vorstimulierten Adenylylzyklase zeigte sich die Fähigkeit dieser Hybride zur maximalen Rezeptoraktivierung. Die Eigenschaft der spezifischen Aktivierung des G_i -Weges blieb in den DMR-Messungen hingegen erhalten (siehe Abbildung 77 und Abbildung 78).

Diese Befunde liefern einen ersten Hinweis, dass die allosterische Bindungsstelle des M_2 -Rezeptors einen Einfluss auf die Spezifität der Signalwegsaktivierung haben kann. Durch zusätzliche Ausnutzung dieses Haftareals wird ein gezieltes Ansprechen von bestimmten Signalwegen ermöglicht.

4.3 Erörterungen zur Interaktion des verkürzten Hybrids JSW 236 mit dem M_2 -Rezeptor

Bei den im Focus dieser Arbeit stehenden dualsterischen Testsubstanzen handelt es sich strukturell um relativ große Moleküle. Im Bezug auf eine potenzielle Eignung als Arzneistoffe (*drugability*) könnten M_2 -selektive Agonisten als starke, opioidähnliche Analgetika eingesetzt werden (Duttaroy et al., 2002). Um eine enterale Resorption und eine Passage der Bluthirnschranke zu gewährleisten, stellen die beiden quartären Stickstoffe ein Hindernis dar. Durch stufenweise Verkürzung sollen Strukturwirkungsbeziehungen aufgeklärt werden und die essentiellen Strukturelemente identifiziert werden.

Mit JSW 236 stand ein erstes strukturell verkürztes Derivat der dualsterischen Agonisten zu synthetisieren zur Verfügung (Strukturformeln: siehe Abbildung 88). Es sollte geklärt werden, ob die konservierte Bisammoniumstruktur für eine gleichzeitige Interaktion mit orthosterischer und allosterischer Bindungsstelle ausreicht. Bindungsstudien hatten einen dissoziationsverzögernden Einfluss auf den Radioantagonisten [^3H]NMS gezeigt (persönliche Mitteilung, Dorina Kaufel). Dies bestätigt, dass eine Interaktion mit der allosterischen Bindungsstelle im Prinzip möglich ist. Mittels dieser Versuche konnte jedoch nicht geklärt werden, ob eine synchrone Besetzung beider Bindungsstellen durch die Testsubstanz möglich ist.

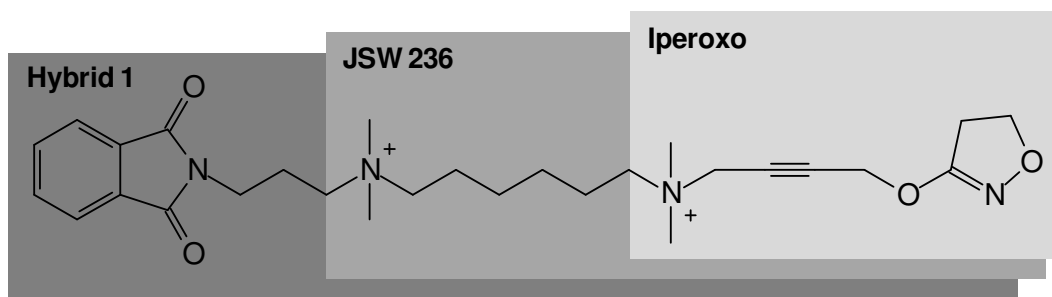


Abbildung 88: Strukturformeln von Iperoxo, JSW 236 und Hybrid 1, stufenweiser Aufbau des allosterischen Bausteins. Die Verbindungen wurden in den Arbeitskreisen von Herrn Prof. Dr. M. De Amici an der Universität Mailand, Italien und von Frau Prof. Dr. U. Holzgrabe an der Universität Würzburg synthetisiert.

$[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsversuche zeigten, dass JSW 236, wie auch Iperoxo, am M_2 -Rezeptor ein Vollagonist ist. Die Wirksamkeit war zwar im Vergleich zu Iperoxo um mehr als eine Dekade herabgesetzt, aber dennoch signifikant höher als bei Hybrid 1. Dies spricht dafür, dass die optimale Konformation, die Iperoxo gebunden an das Rezeptorprotein annehmen kann, nach Einführung der Seitenkette nur noch eingeschränkt möglich ist.

	pEC_{50}	$\text{E}_{\text{max}} (\%)$
JSW 236	$8,17 \pm 0,04^*$	101 ± 1
Iperoxo	$9,40 \pm 0,06^\#$	101 ± 2
Hybrid 1	$7,63 \pm 0,07^{*\#}$	$79 \pm 2^{*\#}$

Tabelle 59: Vergleich der erhaltenen pEC_{50} - und E_{max} -Werte für Hybrid 1, JSW 236 und Iperoxo (Mittelwerte \pm Standardfehler) aus $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsexperimenten (siehe Abbildung 14, Abbildung 15, Abbildung 19) pEC_{50} : Negativer dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration, die zu einer halbmaximalen $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung führt. E_{max} : Maximale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

* signifikanter Unterschied zum pEC_{50} - bzw. E_{max} -Wert von Iperoxo (t-Test, $p < 0,05$)

signifikanter Unterschied zum pEC_{50} - bzw. E_{max} -Wert von JSW 236 (t-Test, $p < 0,05$)

In weiteren Versuchen wurde die Interaktion von Atropin mit dem verkürzten Hybrid JSW 236 untersucht. Atropin ist ein kompetitiver Antagonist an der orthosterischen Bindungsstelle. Er führt zu einer parallelen Rechtsverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurven konventioneller orthosterischer Agonisten ohne das Auftreten eines Sättigungseffekts. Die kompetitive Interaktion von Iperoxo und Atropin an der orthosterischen Bindungsstelle konnte in dieser Arbeit gezeigt werden (siehe Abbildung 59). Abweichend kam es bei der Interaktion von Atropin mit JSW 236 zur Bildung ternärer Komplexe, bestehend aus Atropin, JSW 236 und Rezeptor. Auch die Abnahme des JSW 236-induzierten Maximaleffekts deutet auf eine zusätzliche Interaktion mit dem Rezeptorprotein außerhalb der orthosterischen

Bindungsstelle hin. Das Bild gleicht Befunden der Interaktion von Atropin mit Hybrid 1 und Hybrid 2 (Dissertationsschrift Kellershohn, 2007; Antony et al., 2009). Es ist somit wahrscheinlich, dass JSW 236 am orthosterisch-besetzten, inaktiven Rezeptor eine Interaktion mit der allosterischen Bindungsstelle eingehen kann, aber dies ist ein rein allosterischer Bindungsmodus wie im Fall des Atropin-besetzten Rezeptors.

Am orthosterisch freien Rezeptor erscheint eine gleichzeitige Besetzung allosterischer und orthosterischer Areale jedoch unwahrscheinlich, denn in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die JSW 236-induzierte, intrazelluläre Signalwegsaktivierung dem für orthosterische Agonisten typischen, promiskuitiven Verhalten entspricht. Wie Iperoxo konnte JSW 236 sowohl eine Kopplung des M₂-Rezeptors über G_i- und als auch über G_s-Proteine induzieren. Die für dualsterische Hybridliganden gefundene selektive Aktivierung des G_i-Signaltransduktionsweges wurde nicht erreicht (siehe Abbildung 74). Auch in Bindungsstudien an Rezeptoren, die im Bereich der allosterischen Bindungsstelle durch Punktmutationen verändert waren, ergab sich kein Hinweis auf eine mögliche gleichzeitige Besetzung beider Haftareale durch JSW 236 (mündliche Mitteilung, Dorina Kaufel).

Bezüglich des Bindungsmodus wird so für das verkürzte Hybrid am freien Rezeptor eine Interaktion mit der orthosterischen Bindungsstelle angenommen. Am inaktiven Rezeptor hingegen, dessen orthosterische Bindungsstelle durch einen Antagonisten besetzt ist, ist eine Interaktion von JSW 236 mit der allosterischen Bindungsstelle möglich.

Um genaueren Einblick zu erlangen, welche funktionellen Strukturen der Hybridliganden für eine dualsterische Interaktion notwendig sind, wären Untersuchungen mit kleinschrittig verkürzten Derivaten von Hybrid 1 und Hybrid 2 notwendig.

4.4 Erörterungen zum Einfluss des Epitops M₂¹⁰⁴Tyr auf die G-Protein-Aktivierung durch orthosterische Agonisten

Als erste Aufgabenstellung dieser Dissertation wurden erfolgreich stabile Expressionszelllinien des muskarinischen M₂-Rezeptors und von punktmutierten Rezeptoren generiert. Es wurden Aminosäuren zur Mutation ausgewählt, die in früheren Arbeiten als entscheidende Interaktionspartner für die Bindung von orthosterischen und allosterischen Liganden identifiziert worden waren. Mit den nun vorliegenden permanenten Expressionszelllinien stand in unserem Arbeitskreis erstmals ein geeignetes Versuchssystem zur Verfügung, um die funktionelle Bedeutung dieser Schlüsselepitope zu untersuchen.

Besonderes Interesse galt dabei der Fragestellung, ob, ausgehend von allosterischen Epitopen, ein Einfluss auf die orthosterische Rezeptoraktivierung möglich ist (siehe 4.5). Zuvor sollte jedoch anhand des Nachweises der bekannten und naheliegenden Interaktion orthosterischer Testsubstanzen mit einem orthosterischen Kernepitop ein Vergleich von Bindungsstudien und funktionellen Untersuchungen betrachtet werden.

Ausgewählt wurde die Aminosäure M_2^{104} Tyrosin, die sich im Bereich der dritten transmembranären Domäne des M_2 -Rezeptorproteins befindet. Das Epitop liegt in direkter Nachbarschaft zu M_2^{103} Aspartat, einem über die Muskarinrezeptorfamilie hinaus konservierten Epitop (Wess, 1993), das durch die negative Ladung hauptverantwortlich ist für die Bindung der in orthosterischen Liganden enthaltenen positiv geladenen Aminogruppe. Im Arbeitskreis von Prof. Dr. Dr. h.c. H.-D. Höltje (Pharmazeutisches Institut, Universität Düsseldorf) durchgeführte Molecular Modelling-Untersuchungen sprachen für eine wichtige Rolle von M_2^{104} Tyrosin für die Bindung orthosterischer Liganden. Im Rahmen seiner Dissertationsschrift konnte Antony (2007) punktmutierte, transient in COS 7-Zellen exprimierte M_2^{104} Tyr→Ala-Rezeptoren erfolgreich für Bindungsstudien nutzen und somit die durch computergestützte Simulation erhobenen Annahmen bestätigen. Anders als die Punktmutation M_2^{103} Asp→Ala, die zu einem vollständigen Verlust der spezifischen Bindung der Antagonisten [3 H]N-Methylscopolamin und [3 H]Quinuclidinylbenzilat (Heitz et al., 1999) führte, konnte die Punktmutation M_2^{104} Tyr→Ala genutzt werden, um einen großen Affinitätsverlust und eine stark beschleunigte Dissoziation von orthosterischen Liganden nachzuweisen (Dissertationsschrift Antony, 2007). Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten, stabil transfizierten Flp-CHO- M_2^{104} Tyr→Ala-Zellen konnten nun zur Detektion einer Interaktion mit der orthosterischen Bindungsstelle sowie zur Untersuchung von funktionellen Konsequenzen auf G-Protein-Ebene eingesetzt werden.

Abbildung 89 zeigt, dass die Mutation des Epitops M_2^{104} Tyr der orthosterischen Bindungsstelle zu einem massiven Verlust an Wirksamkeit führte, die bei den untersuchten Vollagonisten Acetylcholin, Oxotremorin M und Iperoxo zwischen 3,4 und 4,2 Dekaden lag. Der Wirksamkeitsverlust war somit sogar noch stärker ausgeprägt als der von Antony (Dissertationsschrift, 2007) gefundene Affinitätsverlust, der zwischen 2,7 und 3,6 Dekaden lag. Auffällig war, dass die McN-A-343-vermittelte Rezeptoraktivierung komplett aufgehoben war (siehe 4.7.1). Weitere Untersuchungen ergaben, dass auch die dualsterischen Testsubstanzen Hybrid 1 und Hybrid 2 nicht in der Lage waren, den orthosterisch veränderten Rezeptor M_2^{104} Tyr→Ala zu aktivieren (mündlich Mitteilung, Dorina Kaufel).

Die intrinsische Aktivität, die durch die untersuchten Agonisten an $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren vermittelt wird, war stark herabgesetzt. Acetylcholin und Oxotremorin M erreichten eine maximale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung von ca. 25 % des Wildtyps. Beachtenswert war, dass sich für Iperoxo an dieser Rezeptormutante der Maximaleffekt im Vergleich zu Acetylcholin mehr als verdoppelte (E_{max} 63 ± 8 %, Effekte jeweils bezogen auf E_{max} der Testsubstanz am M_2 -Wildtyp). Da Iperoxo auch eine besonders hohe Wirksamkeit hatte, wird eine optimale Passform in die Bindungstasche des M_2 -Rezeptors angenommen. Die Wirksamkeit war am M_2 -Wildtyp um zwei Dekaden höher als die des endogenen Liganden Acetylcholin. An punktmutierten $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren wurde nun deutlich, dass auch hinsichtlich der intrinsischen Aktivität Iperoxo Acetylcholin überlegen war. Basierend auf diesen Befunden kann postuliert werden, dass Iperoxo im Vergleich mit Acetylcholin für die Interaktion mit dem Rezeptorprotein auf einen zusätzlichen Kontaktpartner zurückgreifen kann. Diese Wechselwirkung sichert auch in Abwesenheit des Tyrosins in Position 104 eine erhebliche intrinsische Aktivität von über 50 % der maximal möglichen.

Die ausgewählte Mutation $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ war als Modellrezeptor für den Nachweis funktioneller Konsequenzen einer Interaktion mit der orthosterischen Bindungsstelle geeignet.

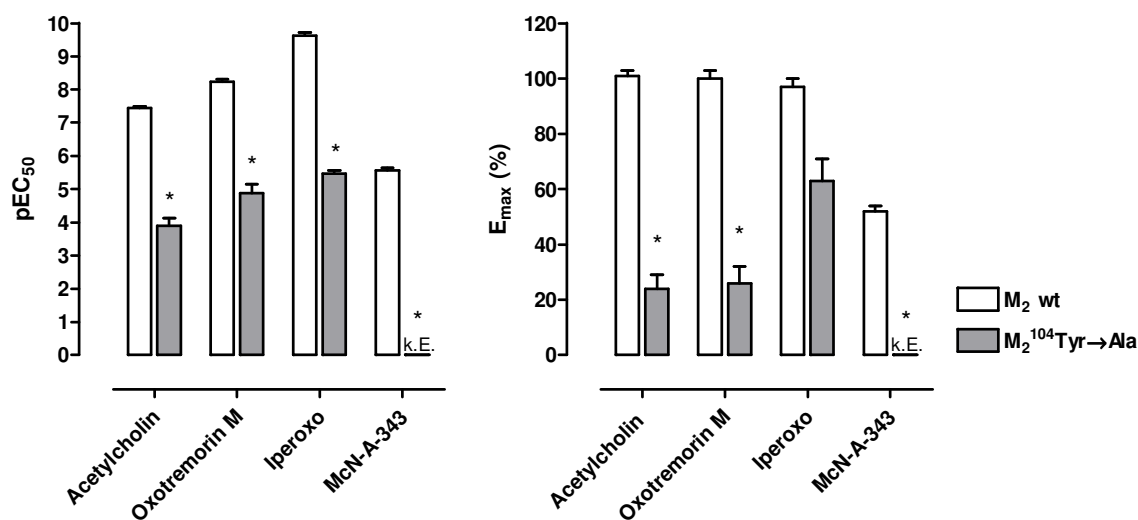


Abbildung 89: Vergleich der pEC_{50} - und E_{max} -Werte der muskarinischen Agonisten. Die Kenngrößen (Mittelwerte \pm Standardfehler) stammen aus $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsexperimenten an Membransuspensionen aus Flp-CHO- M_2 -Zellen und Flp-CHO- $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ -Zellen (siehe Abbildung 37, Abbildung 38, Abbildung 39, Abbildung 40). k. E.: kein Effekt, für diese Testsubstanz war kein agonistischer Effekt, d.h. keine von der basalen Bindung signifikant verschiedene $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung detektierbar.

* signifikanter Unterschied zum pEC_{50} - bzw. E_{max} -Wert am M_2 -Wildtyp (t-Test, $p < 0,05$)

4.5 Abhängigkeit der orthosterischen Aktivierung des muskarinischen M₂-Rezeptors von allosterischen Epitopen

Eine zentrale Frage, die im Rahmen dieser Dissertation beantwortet werden sollte, war ein möglicher Einfluss bekannter allosterischer Epitope auf die orthosterische Aktivierung muskarinischer M₂-Rezeptoren. In früheren Untersuchungen unseres Arbeitskreises (Buller et al., 2002; Voigtländer et al., 2003; Tränkle et al., 2005; Prilla et al., 2006; Dissertationsschrift Prilla, 2006; Jäger et al., 2008) waren drei Kernepitope der allosterischen Bindungsstelle am inaktiven Rezeptor identifiziert worden: M₂¹⁷⁷Tyr, M₂⁴²²Trp, M₂⁴²³Thr. Diese wurden, nach erfolgreicher stabiler Expression in Flp-CHO-Zellen, hinsichtlich ihrer Bedeutung für die funktionelle Rezeptoraktivierung in [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimenten untersucht.

Die folgende Abbildung (Abbildung 90) zeigt den Einfluss der drei untersuchten allosterischen Epitope auf die pharmakologischen Parameter Wirksamkeit (pEC₅₀-Wert) und intrinsische Aktivität (E_{max}) der Agonisten Acetylcholin und Iperoxo.

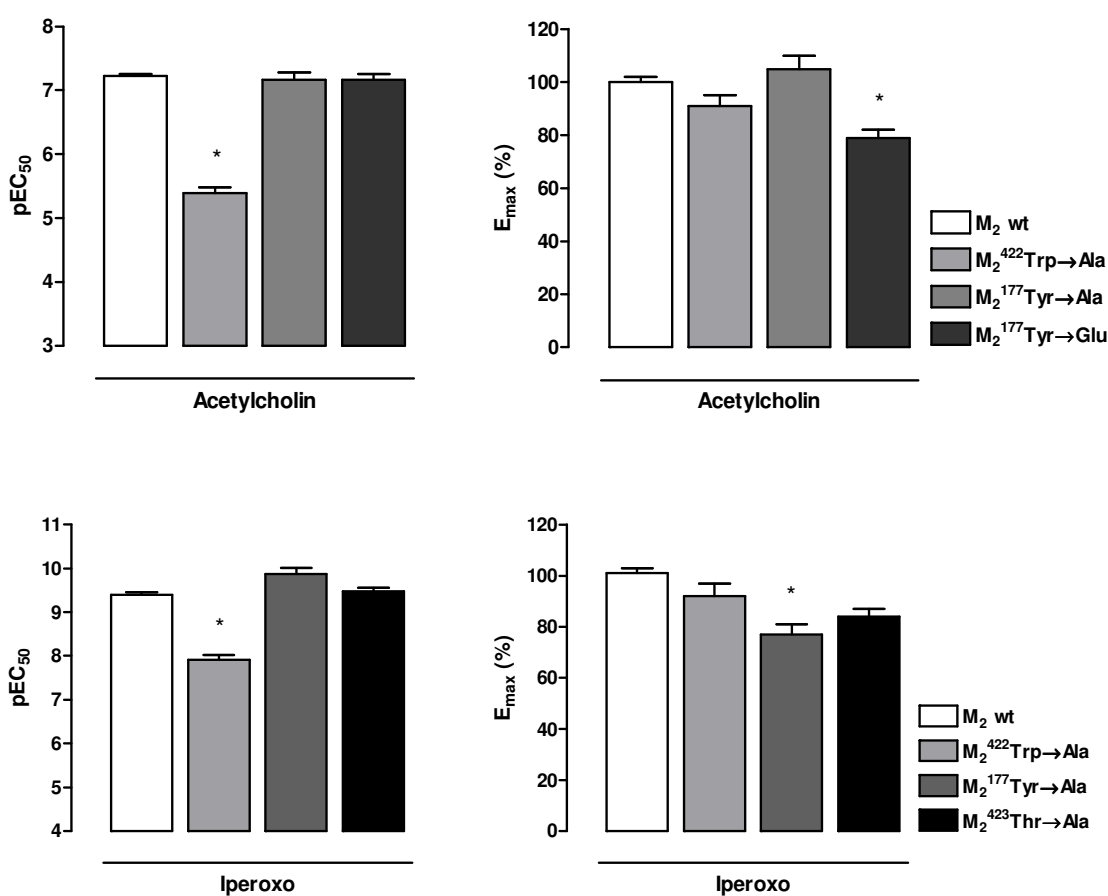


Abbildung 90: Epitopabhängigkeit von Acetylcholin und Iperoxo: Vergleich der pEC₅₀- und E_{max}-Werte. Die Kenngrößen (Mittelwerte ± Standardfehler) stammen aus [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimenten an Membransuspensionen aus Flp-CHO-M₂-Zellen und Membransuspensionen der angegebenen Mutanten.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden M₂-Wildtyp-Kenngröße (t-Test, p < 0,05)

Die Übersicht der Kenngrößen der drei untersuchten allosterischen Epitope zeigt, dass innerhalb der von Prilla (Dissertationsschrift, 2006) definierten Kernregion der allosterischen Bindungsstelle das konservierte Epitop $M_2^{422}\text{Trp}$ (in Position 7.35) hinsichtlich der Rezeptoraktivierung eine entscheidende Funktion übernimmt. Aus diesem Grunde wurde der Focus dieser Arbeit auf die Rolle der allosterischen Aminosäure $M_2^{422}\text{Trp}$ bei der Rezeptoraktivierung gelegt. Detaillierte Ausführungen hierzu sind dem nächsten Unterpunkt (4.6) zu entnehmen.

4.6 Funktionelle Bedeutung der Aminosäure $M_2^{422}\text{Tryptophan}$ für die M_2 -Rezeptor vermittelte G-Protein-Aktivierung

Ein Schlüsselepitop der allosterischen Bindungsstelle ist $M_2^{422}\text{Trp}$ in Position 7.35 (Nomenklatur nach Ballesteros und Weinstein, 1992). Die Aminosäure ist konserviert zwischen den fünf Muskarinrezeptorsubtypen. Prilla (2007) konnte in ihrer Dissertationsschrift durch Bindungsexperimente zeigen, dass von der Wechselwirkung mit diesem Epitop sowohl Basisaffinität als auch Subtypselektivität sowie Effektivität und Kooperativität der allosterischen Interaktion abhängen können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle dieser Aminosäure für die Rezeptoraktivierung untersucht. Erörterungen zur Ligand-induzierten Aktivierung sind unter 4.6.1 zu finden; die konstitutive Aktivierung wird unter 4.6.2 diskutiert.

4.6.1 Erörterungen zum Einfluss des Epitops $M_2^{422}\text{Trp}$ auf die G-Protein-Aktivierung durch orthosterische und dualsterische Agonisten

Durch verschiedene methodische Ansätze konnte bisher für den verwendeten Modellrezeptor (M_2 -Rezeptor) gezeigt werden, dass es bei Aktivierung durch einen Agonisten zu einer Konformationsänderung der allosterischen Bindungsstelle kommt (Jäger et al., 2007). Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Befunde zeigen erstmals, dass das konservierte Epitop $M_2^{422}\text{Trp}$ involviert ist. Es konnte nachgewiesen werden, dass der in Bindungsuntersuchungen gefundene Beitrag zur Affinität orthosterischer Vollagonisten auf die funktionelle Ebene übertragen wird. Neben dem endogenen Liganden Acetylcholin zeigte sich auch für die orthosterischen Vollagonisten Oxotremorin M und Iperoxo ein Wirksamkeitsverlust von über einer Dekade, wenn die Aminosäure $M_2^{422}\text{Tryptophan}$ durch Alanin substituiert wurde (siehe Abbildung 91).

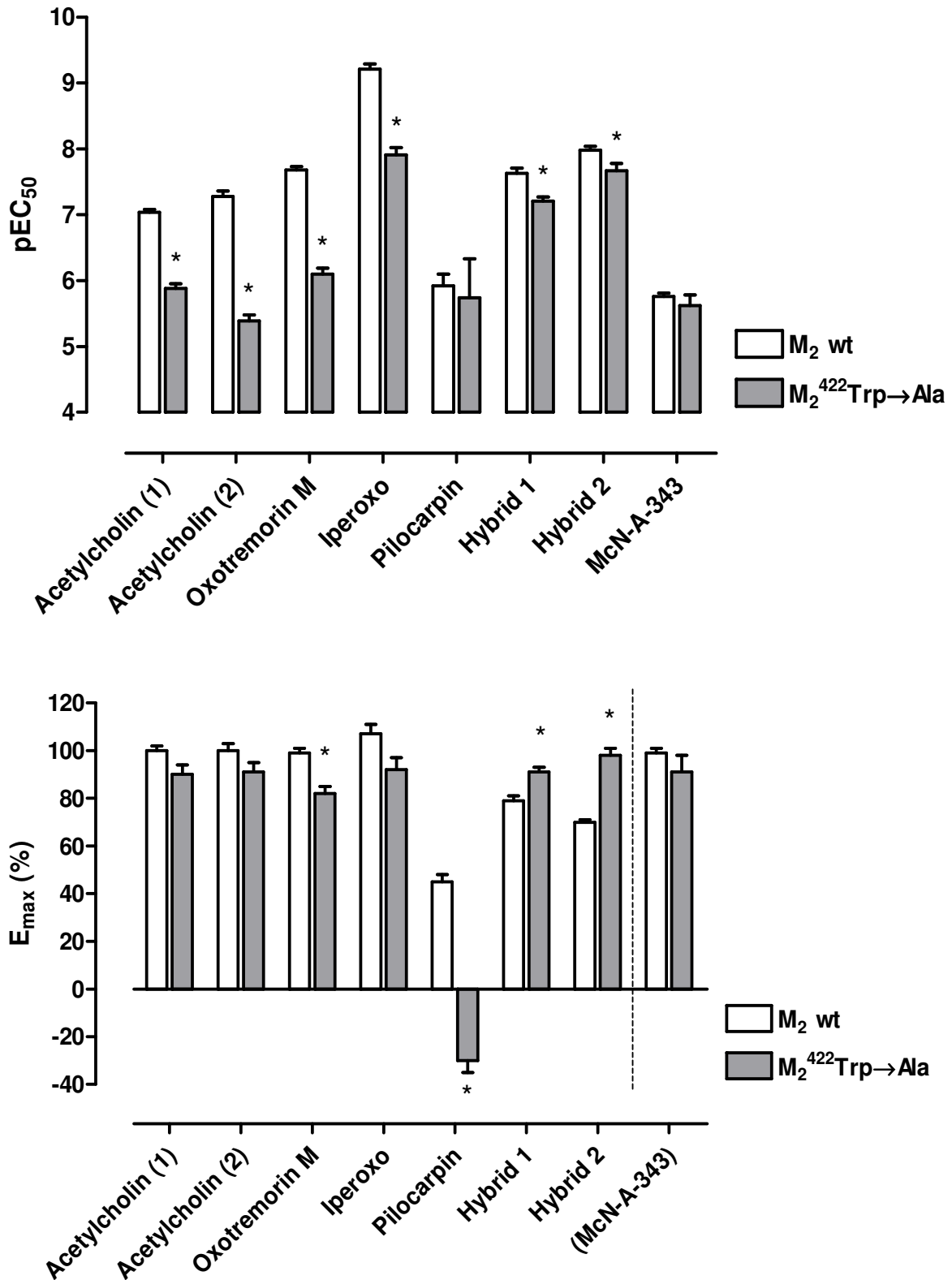


Abbildung 91: Vergleich der pEC₅₀- und E_{max}-Werte der muskarinischen Agonisten. Die Kenngrößen (Mittelwerte ± Standardfehler) stammen aus [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimenten an Membransuspensionen aus Flp-CHO-M₂-Zellen und Flp-CHO-M₂⁴²²Trp→Ala-Zellen. Zur Erklärung der unterschiedlichen Werte von Acetylcholin (1, 2) wird auf den Text verwiesen. McN-A-343 wurde nicht im Vergleich zu einem Vollagonisten untersucht (siehe 3.3.1.2.6), der Partialagonismus ist in dieser Abbildung nicht ersichtlich!

* signifikanter Unterschied zum pEC₅₀- bzw. E_{max}-Wert am M₂-Wildtyp (t-Test, p < 0,05)

Für Acetylcholin wurden, wie im Ergebnisteil (3.3.1.2.2) beschrieben, zwei Versuchsreihen durchgeführt. Diese führten, obwohl unter identischen Bedingungen erhoben, zu quantitativ unterschiedlich stark ausgeprägten Ergebnissen. Qualitativ war der beobachtete Effekt der Mutation $M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ jedoch vergleichbar. Bei Versuchsreihe 1 (siehe 3.3.1.2.2.1) lag keine konstitutive Aktivität des M_2 -Rezeptors vor, bei Versuchsreihe 2 (siehe 3.3.1.2.2.2) lag eine stark ausgeprägte konstitutive Aktivität des M_2 -Rezeptors vor. Dieser Punkt wird im Folgenden (4.6.2) noch genauer diskutiert.

Hinsichtlich der intrinsischen Aktivität der Vollagonisten war die Aminosäure $M_2^{422}\text{Trp}$ von untergeordneter Bedeutung (siehe hierzu die in Abbildung 91 dargestellten E_{\max} -Werte). Trotz des erheblichen Beitrags zur Wirksamkeit, war das maximale Ausmaß der G-Protein-Aktivierung im Vergleich zum Wildtyp kaum beeinträchtigt. Dies könnte folgendermaßen erklärt werden: Nach Bindung eines Vollagonisten kommt es mit der Rezeptoraktivierung zu einer Kation- π -Interaktion zwischen dem positiv geladenen Stickstoff und den benachbarten aromatischen Aminosäuren (Lu et al., 2002). Diese konformative Änderung resultiert in einer Reorientierung der Aminosäuren, die an der Stabilisierung des aktiven Ligand-Rezeptor-Komplexes beteiligt sind. Ein dreidimensionales Rezeptormodell des inaktiven Rezeptorzustands (Jäger et al., 2007) zeigt die aromatische Wechselwirkung zwischen $M_2^{422}\text{Trp}$ und $M_2^{177}\text{Tyr}$, der Aminosäure, die für die Subtyp-Selektivität allosterischer Modulatoren wichtig ist. Bei Aktivierung des Rezeptors kommt es durch die Lösung der aromatischen π - π -Interaktion zur Umorientierung von $M_2^{422}\text{Trp}$. Die Aminosäure kann nun zur Affinität des Vollagonisten beitragen. Diese Hypothese der Umorientierung von $M_2^{422}\text{Trp}$, die zur Stabilisierung des aktiven Ligand-Rezeptor-Komplex führt, wird gestützt von Befunden, die für Acetylcholin eine 100-fach höhere Affinität zum aktiven als zum inaktiven Rezeptor ergaben (Jäger et al., 2007).

Neben Pilocarpin wurde auch für den Partialagonisten McN-A-343 (für Überlegungen zur Interaktion mit den verschiedenen Haftarealen siehe 4.7) keine signifikante Reduktion der Wirksamkeit durch die untersuchte Mutation gefunden. Anders als bei der Rezeptoraktivierung durch Vollagonisten scheint diese bei Pilocarpin fast vollständig über das Epitop $M_2^{422}\text{Trp}$ vermittelt zu werden. Bei den Versuchen zeigte sich, auf Grund der durch Mutation verloren gegangenen Spontanaktivität, dass bei der untersuchten Rezeptormutante noch nicht einmal die basale Bindung des Wildtyps erreicht werden konnte. Pilocarpin, als Partialagonist mit geringer Wirksamkeit, zeigt ein weniger stark ausgeprägtes Vermögen, den Rezeptor im aktiven Zustand zu stabilisieren und bezieht so das Tryptophan in die

Stabilisierung der aktiven Konformation mit ein. Nach Austausch gegen Alanin entfällt dieser stützende Effekt, und es kommt folglich zum Verlust an intrinsischer Aktivität.

Neben dem Einfluss auf rein orthosterische Voll- und Partialagonisten wurde auch die Rolle des allosterischen Epitops $M_2^{422}\text{Trp}$ für die dualsterische Rezeptoraktivierung untersucht. Wie zu Beginn der Diskussion (4.1) beschrieben, sollte die Hybridbildung, neben der gesteigerten Selektivität, durch die Ausweitung des Areal der Ligand-Rezeptor-Interaktion zu einer Stabilisierung des Ligand-Rezeptor-Komplexes führen. Ebenfalls angesprochen wurde das Spannungsverhältnis, das durch die Kombination orthosterischer Agonisten mit allosterischen inversen Agonisten zu Stande kommt. Vor dem Hintergrund der bifunktionellen Bedeutung des Epitops $M_2^{422}\text{Trp}$ sollte geklärt werden, welche Auswirkungen auf die Hybrid- M_2 -Rezeptor-Interaktion resultieren.

Am inaktiven Rezeptor, dessen Konformation durch die Interaktion des allosterischen inversen Agonisten mit den Aminosäuren des entsprechenden Haftareals stabilisiert wird, würde das Epitop $M_2^{422}\text{Trp}$ vom allosterischen Molekülteil beansprucht werden. Am aktiven Rezeptor jedoch konnte nachgewiesen werden, dass Orthostere bei der Rezeptorbesetzung und -aktivierung ebenfalls auf $M_2^{422}\text{Trp}$ als Interaktionspartner für die Vermittlung von intrinsischer Aktivität oder Wirksamkeit zurückgreifen. Die untersuchten Hybride zeigen hinsichtlich der Wirksamkeit ein Verhalten, das tendenziell dem von Orthosteren ähnlich ist. Abbildung 91 zeigt, dass auch bei den dualsterischen Testsubstanzen die Wirksamkeit durch Austausch des Epitops $M_2^{422}\text{Trp} \rightarrow \text{Ala}$ signifikant herabgesetzt wurde. Allerdings war der Effekt wesentlich schwächer ausgeprägt als bei orthosterischen Testsubstanzen. Der direkte Vergleich des Wirksamkeitsverlusts mit der orthosterischen Muttersubstanz zeigte für Iperoxo 1,3 Dekaden, für die Hybride jedoch nur 0,4 (Hybrid 1) bzw. 0,3 (Hybrid 2) Dekaden. In Bezug auf die intrinsische Aktivität zeigten beide Hybride einen signifikanten Gewinn an intrinsischer Aktivität, wenn die Aminosäure $M_2^{422}\text{Trp}$ gegen Alanin ausgetauscht war (t-Test, $p < 0,05$). Die zuvor (siehe 4.1) als starke Partialagonisten charakterisierten, dualsterischen Aktivatoren Hybrid 1 und Hybrid 2 waren in der Lage, den punktmultierten $M_2^{422}\text{Trp} \rightarrow \text{Ala}$ -Rezeptor voll zu aktivieren. Dies kann mit einer besseren Ausnutzung der Kontaktpartner der beiden angesprochenen Bindungsstellen begründet werden. Die Anwesenheit der aromatischen Aminosäure Tryptophan scheint für die dualsterische Rezeptoraktivierung störend zu sein. Möglicherweise wird der Rezeptor durch die gegensätzlich gerichteten Effekte der beiden Hybridbausteine (allosterischer Antagonist + orthosterischer Agonist) in einen sterischen und/oder funktionellen Spannungszustand

gebracht. Die postulierte Umorientierung der Aminosäure $M_2^{422}\text{Trp}$ beim Umschalten vom inaktiven in den aktiven Rezeptorzustand kann dann eventuell nicht ungehindert ablaufen. Fehlt nun dieses Epitop, herrscht im Übergang zwischen den beiden Bindungsstellen eine größere sterische Freiheit, die durch die Hybridagonisten für eine günstigere Konformation und somit für ein Wiedererlangen der vollen intrinsischen Aktivität genutzt werden konnte (siehe [^{35}S]GTP γ S-Bindungsexperimenten: Abbildung 35 und Abbildung 36, DMR-Untersuchungen: Abbildung 84).

In der neueren Literatur sind vermehrt Liganden-selektive Rezeptorkonformationen nachgewiesen (Kenakin, 2003; Hoffmann et al., 2008). Nach dem aktuellen Stand der Forschung ist es anerkannt, dass strukturell verschiedene Liganden verschiedene Konformationen des adressierten G-Protein-gekoppelten Rezeptors induzieren. Als Bezeichnung für dieses Phänomen wurde von Perez und Karnik (2005) *functional selectivity* bzw. *ligand-induced differential signaling* vorgeschlagen, da als Folge der unterschiedlichen Konformationen unterschiedliche Signalwege angesprochen werden können. Die lange Zeit gültige Vorstellung eines einfachen Umschaltens (*switch*) des Rezeptors vom inaktiven in den aktiven Zustand und umgekehrt kann nicht länger getragen werden.

Die Untersuchungen dieser Arbeit zur Epitopabhängigkeit der Rezeptoraktivierung werden von diesem Konzept gestützt. Vor allem für das untersuchte allosterische Epitop $M_2^{422}\text{Trp}$ wird eine unterschiedliche Orientierung in der Rezeptorkonformation postuliert, abhängig von der Art des betrachteten Liganden. Es zeigte sich aber auch, dass diese nach ihrer strukturellen Verwandtschaft in Klassen eingeteilt werden können und eine sehr ähnlich Konformation für die untersuchten Vollagonisten angenommen werden kann. Bei differenzierter Betrachtung der Abhängigkeit vom Epitop $M_2^{104}\text{Tyr}$ offenbarte sich jedoch, dass Iperoxo im Vergleich zu Acetylcholin am punktmultierten Rezeptor die intrinsische Aktivität in einem stärkeren Ausmaß konservieren konnte. Dies könnte auf einen weiteren, wichtigen Interaktionspartner innerhalb der orthosterischen Bindungsstelle zurückzuführen sein. Eine Konsequenz daraus wären folglich auch Unterschiede zwischen der Konformation des durch Iperoxo aktivierten und der Konformation des durch Acetylcholin aktivierten Rezeptors.

Zur Klärung der funktionellen Bedeutung des allosterischen Epitops $M_2^{422}\text{Trp}$ wurde außerdem der Einfluss der Mutation auf die Agonist-vermittelte dynamische Massenumverteilung intrazellulärer Komponenten untersucht. Auch hinsichtlich der Ganzzellantwort war die Wirksamkeit der Vollagonisten herabgesetzt. Der Einsatz

äquieffektiver Konzentrationen resultierte jedoch in einem ähnlichen Bild wie am Wildtyp- M_2 -Rezeptor (siehe 4.1): Die orthosterischen Agonisten Acetylcholin und Iperoxo zeigten die typischen Signaturen, die für eine Kopplung über den G_i -Signaltransduktionsweg sowie (nach Pertussistoxin-Vorbehandlung) über den alternativen G_s -Signaltransduktionsweg stehen. Der dualsterische Agonist Hybrid 1 zeigte durch Einführung des allosterischen Molekülteils eine selektive Aktivierung des G_i -Weges.

4.6.2 Erörterung zum Einfluss des Epitops M_2^{422} Trp auf die konstitutive Rezeptor-G-Protein-Kopplung

Bereits in mehreren Kapiteln wurde darauf hingewiesen, dass an einigen Versuchstagen die verwendeten M_2 -Rezeptoren spontan ein hohes Maß an konstitutiver Rezeptor-G-Protein-Kopplung aufwiesen. Dieser spontane, Agonist-unabhängige Übergang zur aktiven Rezeptorkonformation benötigt das Epitop M_2^{422} Trp. Zum experimentellen Nachweis wurden, wie im Folgenden erläutert, zwei Ansätze genutzt:

Membranen von CHO-Zellen zeigten, dass die Agonist-unabhängige G-Proteinaktivierung in [35 S]GTP γ S-Bindungsexperimenten an der Rezeptormutante M_2^{422} Trp \rightarrow Ala fast vollständig aufgehoben war und sich auf dem Niveau des inversen Vollagonisten Atropin befand. Kontrollexperimente mit M_2 -Wildtyp-Rezeptoren zeigten ein hohes Maß an konstitutiver Aktivität.

Durch Absenkung des Gehalts an Na^+ -Ionen im verwendeten Puffer wurde die Entkopplung von Rezeptor-G-Protein-Komplexen verhindert (Horstman et al., 1990; Hilf und Jakobs, 1992; Ananthanarayanan und Kerman, 2006). Es konnte gezeigt werden, dass eine Verminderung der Na^+ -Ionen in einer Steigerung der spontanen Rezeptor-G-Protein-Kopplung resultiert. Am M_2 -Rezeptor-Wildtyp verlief die konstitutive Aktivität auf einem konstant höheren Niveau im Vergleich zur Rezeptormutante M_2^{422} Trp \rightarrow Ala.

Diese Befunde passen zu der zuvor erhobenen Überlegung, dass die Aminosäure M_2^{422} Trp einer konformativen Umorientierung unterworfen ist, wenn der Rezeptor vom inaktiven in den aktiven Zustand übergeht und umgekehrt. Weiterführend kann die Hypothese aufgestellt werden, dass dieses Epitop, das an der allosterisch/orthosterischen Grenzregion gelegen ist, als regulatorisches Stellglied fungiert und die Umschaltung des Rezeptors vom inaktiven Zustand in eine aktive Konformation erleichtert.

Neben der Einflussnahme auf die orthosterische Rezeptoraktivierung, die für das allosterische Epitop nachgewiesen werden konnte, stellt auch der Einfluss auf die Agonist-unabhängige Rezeptoraktivität einen neuen Aspekt in der Betrachtung der allosterischen Bindungsstelle dar. Erstmals konnte gezeigt werden, dass eine Aminosäure aus der allosterischen Kernregion zur physiologischen Funktion der Rezeptoraktivierung beiträgt. Diese Befunde können einen Hinweis zur Klärung der Frage nach der endogenen Aufgabe der allosterischen Bindungsstelle muskarinischer Rezeptoren geben.

4.7 Erörterungen zum Bindungsmodus und zur M₂-Rezeptoraktivierung durch McN-A-343

McN-A-343 ist ein selektiver muskarinischer Agonist. Seine Selektivität wird über funktionelle Unterschiede zwischen den Subtypen vermittelt: An M₁- und M₄-Rezeptoren ist McN-A-343 ein potenter Vollagonist, an den anderen Subtypen wirkt die Testsubstanz partialagonistisch (Roszkowski et al., 1961, Mutschler et al., 1995). Neben dieser charakteristischen Eigenschaft zeigte sich, dass sich McN-A-343 mit orthosterischen Agonisten kompetitiv verhält, auf Antagonisten jedoch eine dissoziationsverzögernde Wirkung ausübt. Eine Rezeptoraktivierung ausgehend von der allosterischen Bindungsstelle wurde postuliert (Langmead und Christopoulos, 2006; Langmead et al., 2006; May et al., 2007), weshalb die Substanz als allosterischer Agonist bezeichnet wurde.

Antony (Dissertationsschrift, 2007) hatte in Bindungsstudien mit dem Radioantagonisten [³H]NMS herausgefunden, dass es nach Austausch des orthosterischen Epitops M₂¹⁰⁴Tyr→Ala zu keinem signifikanten Affinitätsverlust kam. Für orthosterische Agonisten jedoch war dieser stark ausgeprägt. Untersuchungen von May et al. (2007) hatten ebenfalls durch Radioligandbindungsstudien einen Einfluss von typisch allosterischen Epitopen auf die Bindung von McN-A-343 an den M₂-Rezeptor gezeigt.

In den neuesten Publikationen, die sich mit McN-A-343 beschäftigen (Valant et al., 2008; Valant et al., 2009), wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Substanz ähnlich der dualsterischen Hybride beide Bindungsstellen ansprechen kann. Postuliert wurde eine Verminderung der intrinsischen Aktivität durch den Anteil des Moleküls, der mit der allosterischen Bindungsstelle interagiert und so die optimale Ausrichtung der orthosterischen Komponente in seiner Bindungstasche verhindert.

Vor diesem Hintergrund sollten die Befunde, die im Rahmen dieser Arbeit erhoben wurden, dazu genutzt werden, um die Interaktion von McN-A-343 mit dem Rezeptorprotein zu erklären. Die Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass es sich bei McN-A-343 nicht um einen klassischen, rein orthosterischen Liganden des M₂-Rezeptors handelt. Eine Interaktion mit der orthosterischen und der allosterischen Bindungsstelle kann auch zur Erklärung der funktionellen Konsequenzen der Rezeptoraktivierung herangezogen werden, wie im Folgenden näher erläutert wird.

4.7.1 Epitopabhängigkeit Aktivierung des muskarinischen M₂-Rezeptors durch McN-A-343

Der Einfluss verschiedener Epitope des M₂-Rezeptors auf die Aktivierung durch McN-A-343 wurde mittels [³⁵S]GTPγS-Bindungsversuchen an Membranen, die aus den entsprechenden stabil transfizierten Zellen angefertigt worden waren, untersucht. Mutationen der allosterischen Bindungsstelle dienten dem Nachweis einer allosterischen Interaktion; M₂¹⁰⁴Tyr→Ala (siehe 4.4) diente dem Nachweis einer orthosterischen Interaktion.

Am orthosterisch-mutierten Rezeptor war keine signifikant von der basalen Bindung verschiedene, [³⁵S]GTPγS-Bindung unter Zugabe von McN-A-343 detektierbar. Obwohl die Bindung der Substanz an den Rezeptor nicht vom Epitop M₂¹⁰⁴Tyr abhängig ist (Dissertationsschrift Antony, 2007), resultierte die Substitution durch Alanin in einem kompletten Verlust der Rezeptoraktivierung (siehe Abbildung 40). Es kann deshalb postuliert werden, dass die orthosterische Bindungsstelle nicht am ersten Kontakt zwischen McN-A-343 und dem M₂-Rezeptor beteiligt ist. Eindeutig scheint jedoch, dass die konsekutive G-Protein-Aktivierung von Epitopen der orthosterischen Bindungsstelle ausgeht.

Die Wirksamkeit (Abbildung 92) und auch die intrinsische Aktivität (Abbildung 93) der Testsubstanz war an den untersuchten allosterisch-mutierten Rezeptoren nicht signifikant verändert. Überraschend war, dass McN-A-343 als Partialagonist kein Pilocarpin-ähnliches Verhalten zeigte, sondern seine intrinsische Aktivität auch an M₂⁴²²Trp→Ala-Rezeptoren erhalten blieb. Numerisch war sogar ein leichter Zugewinn des maximalen Effekts zu sehen, der jedoch nicht signifikant war, anders als bei den dualsterischen Hybridsubstanzen.

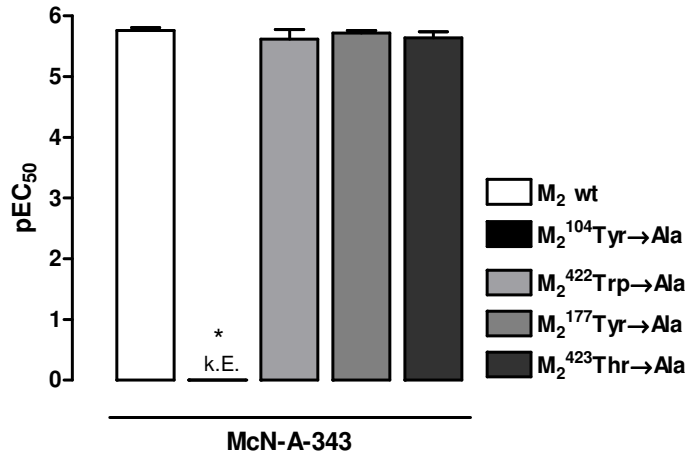


Abbildung 92: Epitopabhängigkeit von McN-A-343: Vergleich der pEC₅₀-Werte. Die Kenngrößen (Mittelwerte ± Standardfehler) stammen aus [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimenten an Membransuspensionen aus Flp-CHO-M₂-Zellen und Membransuspensionen der angegebenen Mutanten. k. E.: kein Effekt, es war keine, von der basalen Bindung signifikant verschiedene [³⁵S]GTPγS-Bindung detektierbar.

* signifikanter Unterschied zum pEC₅₀-Wert am M₂-Wildtyp (t-Test, p < 0,05)

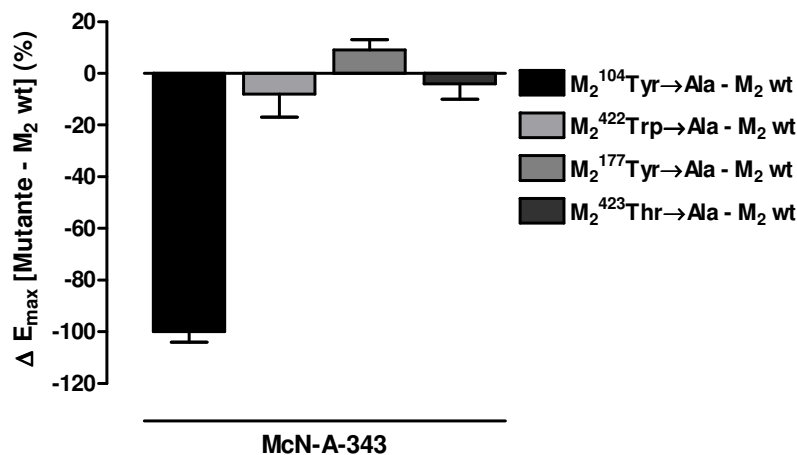


Abbildung 93: Epitopabhängigkeit von McN-A-343: Vergleich der E_{max}-Werte. Die Kenngrößen (Mittelwerte ± Standardfehler) stammen aus [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimenten an Membransuspensionen aus Flp-CHO-M₂-Zellen und Membransuspensionen der angegebenen Mutanten. Ordinate: Dargestellt sind die Differenzen (Mittelwerte ± Standardfehler) der gefundenen Maximaleffekte aus der angegebenen Punktmutante und dem Wildtyp (entspricht 100 %).

Überraschenderweise zeigte sich auf Ebene der G-Protein-Aktivierung nicht die von Valant et al. (2008; 2009) beschriebene Enthemmung der intrinsischen Aktivität, wenn das allosterische Epitop M₂¹⁷⁷Tyr nicht zur Interaktion zur Verfügung stand. Die Befunde von Valant et al. waren mittels Messungen der ERK1/2-Phosphorylierung erhoben worden. Der Messparameter lag somit im Bereich nachgeschalteter Signalwege, die sich weiter im Intrazellulären befinden. Die Befunde der [³⁵S]GTPγS-Bindungsversuche repräsentieren die erste Stufe der Rezeptoraktivierung auf Ebene der G-Proteine. Auf Grund dieser unterschiedlichen

Versuchsansätze wurde der Einfluss des Epitops $M_2^{177}\text{Tyr}$ hinsichtlich der intrazellulären Signalwegsaktivierung, die für eine ganzheitliche Zellantwort steht, untersucht (siehe 4.7.2).

4.7.2 Einfluss des Epitops $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ auf die Signalwegsaktivierung durch McN-A-343

Untersuchungen zur Signalwegsaktivierung durch McN-A-343 zeigten eine spezifische Aktivierung des Signalweges über Adenylzyklase inhibierende G_i -Proteine. Der Grund hierfür ist jedoch wahrscheinlich der schwach-partialagonistische Effekt und die relativ geringe Wirksamkeit der Substanz am M_2 -Rezeptor. Eine ursächliche Involvierung zusätzlicher allosterischer Epitope, die für die dualsterischen Hybride (siehe 4.2), die den M_2 -Rezeptor fast vollständig aktivieren, nachgewiesen wurde, ist eher unwahrscheinlich.

Auffällig war, dass die intrinsische Aktivität der Testsubstanz in $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsversuchen an M_2 -Wildtyprezeptoren bei über 50 % lag, in Messungen zur dynamischen Massenumverteilung wurden jedoch nur ca. 20 % erreicht, bezogen auf den Vollagonisten Acetylcholin. Auch der ERK1/2-Phosphorylierungsversuch (Valant et al., 2008) zeigte eine nur ca. 20-prozentige Rezeptoraktivierung. Die Hypothese ist naheliegend, dass zwar die G-Protein-Aktivierung, die über den Wildtyprezeptor vermittelt wird, bei ca. der Hälfte der maximal möglichen Antwort liegt, aber bei der Weiterleitung an nachgeschaltete Signalwege entweder ein Teil verloren geht, oder es zu einer Aufteilung auf verschiedene Signalwege kommt. Diese würden dann mit unterschiedlichen Wirkstärken angesprochen werden.

Die Befunde aus den Messungen der zellulären dynamischen Massenumverteilung, die durch McN-A-343 in CHO- $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ -Zellen induziert wurde, bestätigten den Gewinn an intrinsischer Aktivität in Bezug auf die Ganzzellantwort in einem dem ERK1/2 Phosphorylierungsversuch ähnlichen Ausmaß (siehe Abbildung 94). Die naheliegende Vermutung, dass durch Einführung der Punktmutation ein zweiter, G-Protein-unabhängiger Signaltransduktionsweg angesprochen werden könnte, wurde durch die Pertussistoxin-Sensitivität des kompletten DMR-Signals nicht gestützt.

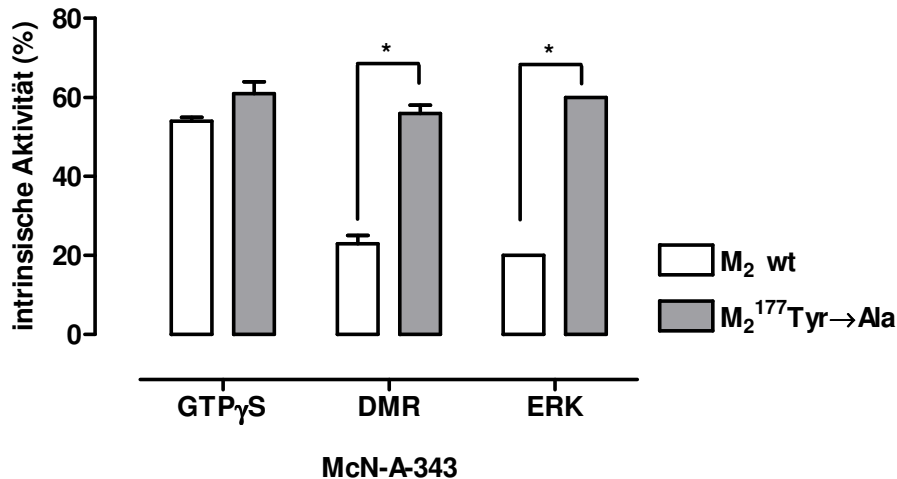


Abbildung 94: Einfluss des Epitops M₂¹⁷⁷Tyr→Ala auf die intrinsische Aktivität von McN-A-343. Dargestellt sind die Effekte (Mittelwerte \pm Standardfehler) von McN-A-343 (100 μ M) im [³⁵S]GTP γ S-Bindungsexperiment (GTP γ S), im Epic[®]-Versuch (DMR) und im ERK1/2 Phosphorylierungs-Versuch (ERK). 100 % entsprechen dem Effekt von Acetylcholin (100 μ M) am M₂-Wildtyp im entsprechenden Versuchssystem. Die Werte des ERK1/2 Phosphorylierungs-Versuchs stammen aus Valant et al., 2008, die anderen Werte aus dieser Arbeit.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden M₂-Wildtyp-Kenngröße (t-Test, p < 0,05)

Eine Hypothese zur Erklärung der unterschiedlichen Ergebnisse in den verschiedenen Messsystemen überträgt dem allosterischen Epitop M₂¹⁷⁷Tyr→Ala eine Rolle bei der Vermittlung nachgeschalteter Signalwege. Auf Grund der räumlichen Anordnung scheint dies zunächst unwahrscheinlich: Die allosterische Bindungsstelle ist im Bereich des M₂-Rezeptors lokalisiert, der zum Extrazellulärraum hin orientiert ist. Die Kopplung an das G-Protein erfolgt an der intrazellulären Seite des Rezeptorproteins. Die weiterführende Signalwegsaktivierung über verschiedene Proteinkaskaden verläuft im Intrazellulärraum über membranständige Proteine und lösliche Faktoren. Die allosterische Bindungsstelle liegt somit örtlich entfernt. Die Ergebnisse lassen jedoch darauf schließen, dass das Ausmaß an G-Protein-Aktivierung bei Betrachtung des nativen M₂-Wildtyprezeptors auf weiterführende Signalwege aufgeteilt wurde bzw. nicht in vollem Umfang übertragen wurde. Fehlt das allosterische Epitop M₂¹⁷⁷Tyr als Interaktionspartner für den Liganden McN-A-343, kam es zu einer vollständigen Weiterleitung und Aufrechterhaltung der intrinsischen Aktivität.

5 Zusammenfassung

Neben der orthosterischen Bindungsstelle für den endogenen Liganden Acetylcholin und andere konventionelle Agonisten und Antagonisten besitzen muskarinische Acetylcholinrezeptoren eine zweite, allosterische Bindungsstelle. Vorangegangene Untersuchungen führten zu einer umfangreichen Charakterisierung dieses Haftareals und zur Identifizierung von spezifischen allosterischen Liganden, die orthosterische Ligandeigenschaften modulieren können. Bisher ist die physiologische Funktion der allosterischen Bindungsstelle jedoch unbekannt. Hauptziel dieser Arbeit war durch verschiedene methodische Herangehensweisen zu untersuchen, ob bzw. welchen Einfluss die allosterische Bindungsstelle auf die Signalwegsaktivierung muskarinischer M_2 -Rezeptoren hat. Da die meisten allosterischen Modulatoren, zu denen auch die Alkan-Bisammonium-Verbindungen W84 [N,N'-Bis[3-(1,3-dihydro-1,3-dioxo-2H-isoindol-2-yl)propyl]-N,N,N',N'-tetramethyl-1,6-hexan-diammoniumdibromid] und Naphmethonium [2-[3-[1-[6-[1,1-Dimethyl-1-[3-(1,3-dioxo-1,3-dihydroisoindol-2-yl)propyl]ammonium]hexyl]-1,1-dimethylammonium]-2,2-dimethylpropyl]benzo[de]isoquinolin-1,3-dion] gehören, die höchste Affinität zum M_2 -Rezeptor aufweisen, stand dieser Subtyp im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit.

Als erster methodischer Ansatz wurde die Untersuchung des Einflusses allosterischer Epitope auf die orthosterische Aktivierung von M_2 -Rezeptoren gewählt. Ziel war es, herauszufinden, wie die Eigenschaften eines orthosterischen Liganden am M_2 -Rezeptor durch gezielte Mutagenese von Epitopen im Bereich der allosterischen Bindungsstelle beeinflusst werden. Von besonderem Interesse war die Untersuchung der Rezeptoraktivierung durch den endogenen Agonisten Acetylcholin, sodass [35 S]GTP γ S-Bindungsexperimente ein geeignetes Versuchssystem waren. Die Untersuchungen wurden an Membransuspensionen aus CHO-Zellen durchgeführt, in die zuvor, mittels stabiler Transfektion, die M_2 -Rezeptor-cDNA vom Wildtyp bzw. die im Bereich der allosterischen Bindungsstelle punktmutierte Rezeptor-cDNA eingebracht worden waren.

Erstmals konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des muskarinischen M_2 -Rezeptors durch orthosterische Liganden von allosterischen Rezeptor-Epitopen beeinflussbar ist. Das konservierte Epitop M_2 ⁴²²-Tryptophan (Trp 7.35), das im Kernbereich der allosterischen Bindungsstelle liegt, leistete einen erheblichen Beitrag zur Wirksamkeit des endogenen

Liganden Acetylcholin und von anderen Vollagonisten. Außerdem wurde durch die Punktmutation $M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ die intrinsische Aktivität von Pilocarpin entscheidend herabgesetzt. Darüber hinaus wurde $M_2^{422}\text{Trp}$ als wichtiges Epitop für die konstitutive Rezeptoraktivität identifiziert und hatte einen hohen Anteil am spontanen, Agonist-unabhängigen Übergang in die aktive Rezeptorkonformation. Das Epitop M_2^{422} -Tryptophan zeigte ein bifunktionales Verhalten: Mit diesen Befunden konnte ein Hinweis erbracht werden, dass durch die Agonist-induzierte Veränderung der Rezeptorkonformation die Aminosäure der allosterischen Bindungsstelle entzogen wird und für die orthosterische Rezeptoraktivierung zur Verfügung steht.

Als zweite methodische Herangehensweise wurden dualsterische Hybridagonisten, die eine orthosterische und eine allosterische Strukturkomponente vereinigen, als pharmakologische Werkzeuge verwendet. Die räumliche Nähe der im Bereich der extrazellulären Schleifen angesiedelten, allosterischen Bindungsstelle zum orthosterischen Haftareal, das sich im oberen Drittel der transmembranären Domänen befindet, hatte zur Entwicklung dieser Hybridliganden geführt. Die untersuchten Substanzen bestanden aus einem orthosterischen Agonisten (Derivat von Oxotremorin M) und einem Strukturelement eines allosterischen Antagonisten vom Typ der Alkan-Bisammonium-Verbindungen. Die kovalente Verbindung erfolgte über eine Alkan-Zwischenkette. Durch die Hybridbildung sollte eine gleichzeitige Interaktion mit beiden Bindungsstellen ermöglicht und so dem orthosterischen Liganden zu einer besseren Haftung am Rezeptor und einer Subtypselektivität verholfen werden. Es wurde untersucht, welche Auswirkung die zusätzliche Ausnutzung der allosterischen Bindungsstelle hat, hinsichtlich der Rezeptoraktivierung auf der ersten Stufe, d.h. auf G-Protein-Ebene sowie auf Ganzzell-Ebene. Durch Ganzzell-Messungen zur dynamischen Massenumverteilung mit Hilfe des optischen Biosensors Epic[®] konnte festgestellt werden, dass durch die dualsterischen Rezeptoraktivatoren Hybrid 1 [2-{3-[1-(6-{1,1-Dimethyl-1-[4-(4,5-dihydro-isoxazol-3-yloxy)but-2-ynyl]-ammonium}hexyl)-1,1-dimethylammonium] propyl}isoindolin-1,3-dion] und Hybrid 2 [2-{3-[1-(6-{1,1-Dimethyl-1-[4-(4,5-dihydro-isoxazol-3-yloxy)but-2-ynyl]-ammonium}hexyl)-1,1-dimethylammonium]-2,2-dimethylpropyl}benzo[de]isoquinolin-1,3-dion] eine selektive Aktivierung des Signaltransduktionsweges über Adenylylzyklase inhibierende G_i -Proteine erfolgte. Die Aktivierung von Adenylylzyklase stimulierenden G_s -Proteinen, die für orthosterische Agonisten nachgewiesen wurde, konnte durch Einführung des allosterischen Molekülteils verhindert werden.

Ferner zeigten Hybrid 1 und Hybrid 2 keine vollständige Rezeptoraktivierung, im Gegensatz zum orthosterischen Mutteragonisten Iperoxo [3-[4-(Trimethylammonium)-2-butynyl]oxy- Δ^2 -isoxazolin]. Vor allem beim Vorliegen hoher cAMP-Spiegel und einer maximal stimulierten Adenylylzyklase ergab sich ein nur partieller inhibitorischer Effekt über G_i -Proteine. Durch Verlängerung der im Hybrid 1 vorliegenden C_6 -Zwischenkette um eine bzw. zwei Methylengruppen konnte eine volle intrinsische Aktivität wiederhergestellt werden, bei Konservierung der selektiven Signalwegsaktivierung des G_i -Signaltransduktionsweges in Messungen der zellulären dynamischen Massenumverteilung.

Die gleichzeitige Besetzung beider Bindungsstellen des Rezeptors durch dualsterische Liganden hatte Auswirkungen auf die Rezeptorkonformation und konnte durch zusätzliche Ausnutzung des allosterischen Haftareals ein gezieltes Ansprechen von bestimmten Signalwegen ermöglichen. Diese Befunde liefern somit einen ersten Anhaltspunkt dafür, dass die allosterische Bindungsstelle des M_2 -Rezeptors einen Einfluss auf die Spezifität der Signalwegsaktivierung haben kann.

6 Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylylzyklase
Ala	Alanin
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i> (destilliertes Wasser)
ATP	Adenosintriphosphat
B _{max}	Gesamtmenge der spezifischen Bindungsstellen
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
CHO-Zellen	<i>Chinese hamster ovary cells</i> (Ovarialzellen des chinesischen Seidenhamsters)
cpm	<i>counts per minute</i> (Zählrate (1/min))
CTX	Choleratoxin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i> (Zellkulturbasismedium)
DMR	<i>Dynamic mass redistribution</i> (Dynamische Massenumverteilung)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
D-PBS	<i>Dulbeccos phosphate buffered saline</i> (Dulbeccos phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
dpm	<i>disintegrations per minute</i> (Zerfälle pro Minute)
DTT	Dithiothreitol
e1-3	1. bis 3. extrazelluläre Schleife des Rezeptorproteins
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E _{max}	maximaler Effekt (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve)
E _{min}	minimaler Effekt (unteres Plateau der Konzentration-Effekt-Kurve)

Abkürzungsverzeichnis

Fsk	Forskolin
Fw	<i>forward</i> (Primer in 5' → 3' Richtung)
GABA	γ -Aminobuttersäure
GDP	Guanosindiphosphat
GDP	Guanosindiphosphat
Gln	Glutamin
GPCR	<i>G protein coupled receptor</i> (G-Protein-gekoppelter Rezeptor)
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
^3H	Tritium (Radionuklid des Wasserstoffs)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His	Histidin
Hm2	cDNA des humanen Muskarinrezeptorsubtyps M ₂
hM _x	Humaner Muskarinrezeptor, Subtyp: x = 1 bis 5
i1-3	1. bis 3. intrazelluläre Schleife des Rezeptorproteins
kb	Kilobase (1000 Basenpaare)
LB	Luria-Bertani (Medium bzw. Agar)
MIO	Methylperoxo
n	Versuchsumfang, Anzahl der unabhängigen Einzelversuche
n _H	Hill-Koeffizient, Maß für die Kurvensteilheit
NMS	N-Methylscopolamin
p	p-Wert, Überschreitungswahrscheinlichkeit, Wahrscheinlichkeit für einen zufällig entstandenen Unterschied zweier Testgrößen
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
pEC ₅₀	negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die den halbmaximalen Effekt auslöst
PEI	Polyethylenimin

Abkürzungsverzeichnis

Pfu	Proofreading-DNA-Polymerase aus <i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Oxoniumionenkonzentration
PTX	Pertussistoxin
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
Rv	<i>reverse</i> (Primer in 3' → 5' Richtung)
SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
SEM	<i>standard error of means</i> (Standardfehler des Mittelwerts)
Thr	Threonin
TM I – VII	Transmembranäre Domäne I – VII
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

7 Literaturverzeichnis

Akam E. C., Challiss R. A., Nahorski S. R. (2001) $G_{q/11}$ and $G_{i/o}$ activation profiles in CHO cells expressing human muscarinic acetylcholine receptors: dependence on agonist as well as receptor-subtype. *Br J Pharmacol.* 132: 950-958.

Ananthanarayanan V. S., Kerman A. (2006) Role of metal ions in ligand-receptor interaction: insights from structural studies. *Mol Cell Endocrinol.* 246: 53-59.

Antony J. (2007) Bindungsstopografie allosterisch/orthosterischer Hybridagonisten an M_2 -Acetylcholinrezeptoren. Dissertationsschrift, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Antony J., Kellershohn K., Mohr-Andrä M., Kebig A., Prilla S., Muth M., Heller E., Disingrini T., Dallanocce C., Bertoni S., Schrobang J., Tränkle C., Kostenis E., Christopoulos A., Hölftje H. D., Barocelli E., De Amici M., Holzgrabe U., Mohr K. (2009) Dualsteric GPCR targeting: a novel route to binding and signaling pathway selectivity. *FASEB J.* 23: 442-450.

Arunlakshana O., Schild H. O. (1959) Some quantitative uses of drug antagonists. *Brit J Pharmacol.* 14: 48-58.

Ballesteros J. A., Weinstein H. (1992) Analysis and refinement of criteria for predicting the structure and relative orientations of transmembranal helical domains. *Biophys J.* 62: 107-9.

Barlow R., Blake J. F. (1989) Hill coefficients and the logistic equation. *Trends Pharmacol Sci.* 10: 440-441.

Barocelli E., Ballabeni V., Bertoni S., Dallanocce C., De Amici M., De Micheli C., Impicciatore M. (2000) New analogues of oxotremorine and oxotremorine-M: estimation of their in vitro affinity and efficacy at muscarinic receptor subtypes. *Life Sci.* 67: 717-723.

Bennet J. P., Yamamura H. I. (1985) Neurotransmitter, hormone or drug receptor binding methods. Neurotransmitter receptor binding. New York, Raven Press, 2. Ausgabe.

Birdsall N. J., Farries T., Gharagozloo P., Kobayashi S., Lazareno S., Sugimoto M. (1999) Subtype-selective positive cooperative interactions between brucine analogs and acetylcholine at muscarinic receptors: functional studies. *Mol Pharmacol.* 55: 778-786.

Block G. A., Martin K. J., de Francisco A. L., Turner S. A., Avram M. M., Suranyi M. G., Hercz G., Cunningham J., Abu-Alfa A. K., Messa P., Coyne D. W., Locatelli F., Cohen R. M., Evenepoel P., Moe S. M., Fournier A., Braun J., McCary L. C., Zani V. J., Olson K. A., Druke T. B., Goodman W. G. (2004) Cinacalcet for secondary hyperparathyroidism in patients receiving hemodialysis. *N Engl J Med.* 350: 1516-1525.

Bonner T. I., Buckley N. J., Young A. C., Brann M. R. (1987) Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science.* 237: 527-531.

Bonner T. I., Young A. C., Brann M. R., Buckley N. J. (1988) Cloning and expression of the human and rat m_5 muscarinic acetylcholine receptor genes. *Neuron.* 1: 403-410

- Buller S., Zlotos D. P., Mohr K., Ellis J. (2002) Allosteric site on muscarinic acetylcholine receptors: a single amino acid in transmembrane region 7 is critical to the subtype selectivities of caracurine v derivatives and alkane-bisammonium ligands. *Mol Pharmacol.* 61: 160-168.
- Caulfield M. P., Birdsall N. J. (1998) International union of pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev.* 50: 279-290.
- Cheng Y., Prusoff W. H. (1973) Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol.* 23: 3099-3108.
- Christopoulos A., Kenakin T. (2002) G protein-coupled receptor allosterism and complexing. *Pharmacol Rev.* 54: 323-374.
- Clark A. L., Mitchelson F. (1976) The inhibitory effect of gallamine on muscarinic receptors. *Br J Pharmacol.* 58: 323-331.
- Costa T., Ogino Y., Munson P. J., Onaran H. O., Rodbard D. (1992) Drug efficacy at guanine nucleotide-binding regulatory protein-linked receptors: thermodynamic interpretation of negative antagonism and of receptor activity in the absence of ligand. *Mol Pharmacol.* 41: 549-560.
- Dallanoce C., Conti P., De Amici M., De Micheli C., Barocelli E., Chiavarini M., Ballabeni V., Bertoni S., Impicciatore M. (1999) Synthesis and functional characterization of novel derivatives related to oxotremorine and oxotremorine-M. *Bioorg Med Chem.* 7: 1539-1547.
- De Amici M., Dallanoce C., Holzgrabe U., Tränkle C., Mohr K. (2009) Allosteric ligands for G protein-coupled receptors: A novel strategy with attractive therapeutic opportunities. *Med Res Rev.* Jun 25. [Epub].
- DeBlasi A., O'Reilly K., Motulsky H. J. (1989) Calculating receptor number from binding experiments using same compound as radioligand and competitor. *Trends Pharmacol Sci.* 10: 227-229.
- DeWire S. M., Ahn S., Lefkowitz R. J., Shenoy S. K. (2007) Beta-arrestins and cell signaling. *Annu Rev Physiol.* 69: 483-510.
- Disingrini T., Muth M., Dallanoce C., Barocelli E., Bertoni S., Kellershohn K., Mohr K., De Amici M., Holzgrabe U. (2006) Design, synthesis, and action of oxotremorine-related hybrid-type allosteric modulators of muscarinic acetylcholine receptors. *J Med Chem.* 49: 366-372.
- Dong G. Z., Kameyama K., Rinken A., Haga T. (1995) Ligand binding properties of muscarinic acetylcholine receptor subtypes (M1-M5) expressed in baculovirus-infected insect cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 274: 378-384.
- Duttaroy A., Gomeza J., Gan J. W., Siddiqui N., Basile A. S., Harman W. D., Smith P. L., Felder C. C., Levey A. I., Wess J. (2002) Evaluation of muscarinic agonist-induced analgesia in muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Mol Pharmacol.* 62: 1084-1093.
- Eckstein N. (2004) Pharmakologische und biochemische Untersuchungen zur allosterischen Modulation Agonist-induzierter Wirkungen an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren. Dissertationsschrift, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Eglen R. M. (2005) Muscarinic receptor subtype pharmacology and physiology. *Prog Med Chem.* 43: 105-136.

- Ehlert F. J. (1988) Estimation of the affinities of allosteric ligands using radioligand binding and pharmacological null methods. *Mol Pharmacol.* 33: 187-194.
- Ellis J. (1997) Allosteric binding sites on muscarinic receptors. *Drug Development Research.* 40: 193-204.
- Ellis J., Huyler J., Brann M. R. (1991) Allosteric regulation of cloned m1-m5 muscarinic receptor subtypes. *Biochem Pharmacol.* 42: 1927-1932.
- Ellis J., Seidenberg M. (1992) Two allosteric modulators interact at a common site on cardiac muscarinic receptors. *Mol Pharmacol.* 42: 638-641.
- Ellis J., Seidenberg M. (2000) Interactions of alcuronium, TMB-8, and other allosteric ligands with muscarinic acetylcholine receptors: studies with chimeric receptors. *Mol Pharmacol.* 58: 1451-1460.
- Ellis J., Seidenberg M., Brann M. R. (1993) Use of chimeric muscarinic receptors to investigate epitopes involved in allosteric interactions. *Mol Pharmacol.* 44: 583-588.
- Elnatan A., Mitchelson F. (1993) The interaction of McN-A-343 with muscarinic receptors in cardiac and smooth muscle. *Biochem Pharmacol.* 46: 993-1003.
- Fang Y. (2007) Non-invasive optical biosensor for probing cell signaling. *Sensors.* 7: 2316-2329.
- Fang Y., Ferrie A. M., Fontaine N. H., Mauro J., Balakrishnan J. (2006) Resonant waveguide grating biosensor for living cell sensing. *Biophys J.* 91: 1925-1940.
- Fang Y., Li G., Ferrie A. M. (2007). Non-invasive optical biosensor for assaying endogenous G protein-coupled receptors in adherent cells. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 55: 314-322.
- Franken C, Tränkle C, Mohr K (2000) Testing the specificity of allosteric modulators of muscarinic receptors in phylogenetically closely related histamine H₁-receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 361: 107-112.
- Fredriksson R., Lagerström M. C., Lundin L. G., Schiöth H. B. (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol.* 63: 1256-72.
- Gaddum J. H., Hameed K. A., Hathway D. E., Stephens F. F. (1955) Quantitative studies of antagonists for 5-hydroxytryptamine. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci.* 40: 49-74.
- Gao Z. G., Ijzerman A. P. (2000) Allosteric modulation of A_{2A} adenosine receptors by amiloride analogues and sodium ions. *Biochem Pharmacol.* 60: 669-676.
- Gill D. M. and Meren R. (1978) ADP-ribosylation of membrane proteins catalyzed by cholera toxin: basis of the activation of adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75: 3050-3054.
- Gnagey A., Ellis J. (1996) Allosteric regulation of the binding of [³H]acetylcholine to m2 muscarinic receptors. *Biochem Pharmacol* 52: 1767-1775.
- Gnagey A., Seidenberg M., Ellis J. (1999) Site-directed mutagenesis reveals two epitopes involved in the subtype selectivity of the allosteric interactions of gallamine at muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol.* 56: 1245-1253.
- Griffin M. T., Figueroa K. W., Liller S., Ehlert F. J. (2007) Estimation of agonist activity at G protein coupled receptors: analysis of M₂ muscarinic receptor signaling through G_{i/o}, G_s and G₁₅. *J Pharmacol Exp Ther.* 321: 1193-1207

- Großmüller M. (2003) Interaktion allosterischer Modulatoren mit dem Agonisten [³H]Oxotremorin M und dem Antagonisten [³H]N-Methylscopolamin an muskarinischen M₂-Rezeptoren. Dissertationsschrift, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Harrison C., Traynor J. R. (2003) The [³⁵S]GTPγS binding assay: approaches and applications in pharmacology. *Life Sci.* 74: 489-508.
- Heitz F., Holzwarth J. A., Gies J. P., Pruss R. M., Trumpp-Kallmeyer S., Hibert M. F., Guenet C. (1999) Site-directed mutagenesis of the putative human muscarinic M₂ receptor binding site. *Eur J Pharmacol.* 380: 183-195.
- Hilf G., Jakobs K. H. (1992) Agonist-independent inhibition of G protein activation by muscarinic acetylcholine receptor antagonists in cardiac membranes. *Eur J Pharmacol.* 225: 245-252.
- Hoare S. R., Strange P. G. (1996) Regulation of D₂ dopamine receptors by amiloride and amiloride analogs. *Mol Pharmacol.* 50: 1295-1308.
- Hoffmann C., Zürn A., Bünemann M., Lohse M. J. (2008) Conformational changes in G-protein-coupled receptors-the quest for functionally selective conformations is open. *Br J Pharmacol.* 153: Suppl 1358-366.
- Holzgrabe U., De Amici M., Mohr K. (2006) Allosteric modulators and selective agonists of muscarinic receptors. *J Mol Neurosci.* 30: 165-168.
- Holzgrabe U., Mohr K. (1998) Allosteric modulators of ligand binding to muscarinic acetylcholine receptors. *Drug Discovery Today.* 3: 214-222.
- Horstman D. A., Brandon S., Wilson A. L., Guyer C. A., Cragoe E. J. Jr., Limbird L. E. (1990) An aspartate conserved among G-protein receptors confers allosteric regulation of alpha 2-adrenergic receptors by sodium. *J Biol Chem.* 265: 21590-21595.
- Huang X. P., Prilla S., Mohr K., Ellis J. (2005) Critical amino acid residues of the common allosteric site on the M₂ muscarinic acetylcholine receptor: more similarities than differences between the structurally divergent agents gallamine and bis(ammonio)alkane-type hexamethylene-bis-[dimethyl-(3-phthalimidopropyl)ammonium]dibromide. *Mol Pharmacol.* 68: 769-778.
- Hulme E. C., Curtis C. A., Wheatley M., Aitken A., Harris A. C. (1989) Localization and structure of the muscarinic receptor ligand binding site. *Trends Pharmacol Sci.* Suppl: 22-25.
- Jacoby E., Rochdi B., Gerspacher M., Seuwen K. (2006) The GPCR Target Family. *Chem Med Chem.* 1: 760-782.
- Jäger D., Schmalenbach C., Prilla S., Schrobang J., Kebig A., Sennwitz M., Heller E., Tränkle C., Holzgrabe U., Höltje H. D., Mohr K. (2007) Allosteric small molecules unveil a role of an extracellular E2/TM7 junction for GCPR activation. *J Biol Chem,* 282: 34968-34976.
- Jakubík J., Bačákováč L., El Fakahany E. E., Tuček S. (1995) Subtype selectivity of the positive allosteric action of alcuronium at cloned M₁-M₅ muscarinic acetylcholine receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 274: 1077-1083.
- Jakubík J., Haga T., Tuček S. (1998) Effects of an agonist, allosteric modulator, and antagonist on guanosine-γ-[³⁵S]thiotriphosphate binding to liposomes with varying muscarinic receptor/G_o protein stoichiometry. *Mol Pharmacol.* 54: 899-906.

- Kaslow H. R., Lim L. K., Moss J., Lesikar D. D. (1987) Structure-activity analysis of the activation of pertussis toxin. *Biochemistry*. 26: 123-127
- Kebig A., Kostenis E., Mohr K., Mohr-Andrä M. (2009) An optical dynamic mass redistribution assay reveals biased signaling of dualsteric GPCR activators. *J Recept Signal Transduct Res*. 29: 140-145.
- Kebig A., Mohr K. (2008) Cinacalcet - an allosteric enhancer at the Ca²⁺-receptor *Dtsch Med Wochenschr*. 133: 1681-3
- Kellershohn K. (2007) Allosterisch/orthosterische Hybridliganden des muskarinischen Acetylcholinrezeptors: Rezeptorbindung und -aktivierung Dissertationsschrift, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Kenakin T. (1982) The Schild regression in the process of receptor classification. *Can J Physiol Pharmacol*. 60: 249-265.
- Kenakin T. (1992) Tissue response as a functional discriminator of receptor heterogeneity: effects of mixed receptor populations on Schild regressions. *Mol Pharmacol*. 41: 699-707.
- Kenakin T. (1997) Pharmacologic analysis of drug-receptor interaction. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, New York.
- Kenakin T. (1997) Agonist-specific receptor conformations. *Trends Pharmacol Sci*. 18: 416-417.
- Kenakin T. (2002) Efficacy at G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Drug Discov*. 1: 103-110.
- Kenakin T. (2003) Ligand-selective receptor conformations revisited: the promise and the problem. *Trends Pharmacol Sci*. 24: 346-354.
- Kenakin T. (2007) Collateral efficacy in drug discovery: taking advantage of the good (allosteric) nature of 7TM receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 28: 407-415.
- Klemt D. (2005) Allosterische Modulation der Pilocarpin-induzierten G Protein-Aktivierung an muskarinischen M₂- und M₄-Rezeptoren. Dissertationsschrift, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Kollias-Baker C. A., Ruble J., Jacobson M., Harrison J. K., Ozeck M., Shryock J. C., Belardinelli L. (1997) Agonist-independent effect of an allosteric enhancer of the A₁ adenosine receptor in CHO cells stably expressing the recombinant human A₁ receptor. *J Pharmacol Exp Ther*. 281: 761-768.
- Kords H., Lullmann H., Ohnesorge F. K., Wassermann O. (1968) Action of atropine and some hexane-1.6-bis-ammonium derivatives upon the toxicity of DFP in mice. *Eur J Pharmacol*. 3: 341-346.
- Kruh J. (1982) Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture. *Mol Cell Biochem*. 42: 65-82.
- Kubo T., Fukuda K., Mikami A., Maeda A., Takahashi H., Mishina M., Haga T., Haga K., Ichiyama A., Kangawa K. (1986b) Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. *Nature*. 323: 411-416.
- Kubo T., Maeda A., Sugimoto K., Akiba I., Mikami A., Takahashi H., Haga T., Haga K., Ichiyama A., Kangawa K. (1986a) Primary structure of porcine cardiac muscarinic acetylcholine receptor deduced from the cDNA sequence. *FEBS Lett*. 209: 367-372.

- Langmead C. J., Christopoulos A. (2006) Allosteric agonists of 7TM receptors: expanding the pharmacological toolbox. *Trends Pharmacol Sci.* 27: 475-81.
- Langmead C. J., Fry V. A., Forbes I. T., Branch C. L., Christopoulos A., Wood M. D., Herdon H. J. (2006) Probing the molecular mechanism of interaction between 4-n-butyl-1-[4-(2-methylphenyl)-4-oxo-1-butyl]-piperidine (AC-42) and the muscarinic M₁ receptor: direct pharmacological evidence that AC-42 is an allosteric agonist. *Mol Pharmacol.* 69: 236-246.
- Lanzafame A., Christopoulos A., Mitchelson F. (1996) Interactions of agonists with an allosteric antagonist at muscarinic acetylcholine M₂ receptors. *Eur J Pharmacol.* 316: 27-32.
- Lanzafame A., Christopoulos A., Mitchelson F. (1997) Three allosteric modulators act at a common site, distinct from that of competitive antagonists, at muscarinic acetylcholine M₂ receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 282: 278-285.
- Lazareno S. (1999) Measurement of agonist-stimulated [³⁵S]GTP gamma S binding to cell membranes. *Methods Mol Biol.* 106: 231-245.
- Lazareno S., Birdsall N. J. (1993) Pharmacological characterization of acetylcholine-stimulated [³⁵S]-GTPγS binding mediated by human muscarinic m1-m4 receptors: antagonist studies. *Br J Pharmacol.* 109: 1120-1127.
- Lazareno S., Farries T., Birdsall N. J. (1993) Pharmacological characterization of guanine nucleotide exchange reactions in membranes from CHO cells stably transfected with human muscarinic receptors m1-m4. *Life Sci.* 52: 449-456.
- Lazareno S., Gharagozloo P., Kuonen D., Popham A., Birdsall N. J. (1998) Subtype-selective positive cooperative interactions between brucine analogues and acetylcholine at muscarinic receptors: radioligand binding studies. *Mol Pharmacol.* 53: 573-589.
- Lazareno S., Popham A., Birdsall N. J. (2000) Allosteric interactions of staurosporine and other indolocarbazoles with *N*-[methyl-³H]scopolamine and acetylcholine at muscarinic receptor subtypes: identification of a second allosteric site. *Mol Pharmacol.* 58: 194-207.
- Lazareno S., Popham A., Birdsall N. J. (2002) Analogs of WIN 62,577 define a second allosteric site on muscarinic receptors. *Mol Pharmacol.* 62: 1492-1505.
- Lee P. H., Gao A., van Staden C., Ly J., Salon J., Xu A., Fang Y., Verkleeen R. (2008) Evaluation of dynamic mass redistribution technology for pharmacological studies of recombinant and endogenously expressed GPCRs. *Assay Drug Dev Technol.* 6: 83-94.
- Lefkowitz R. J., Shenoy S. K. (2005) Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science.* 308: 512-517.
- Leppik R. A., Birdsall N. J. (2000) Agonist binding and function at the human α_{2A}-adrenoceptor: allosteric modulation by amilorides. *Mol Pharmacol.* 58: 1091-1099.
- Leppik R. A., Miller R. C., Eck M., Paquet J. L. (1994) Role of acidic amino acids in the allosteric modulation by gallamine of antagonist binding at the m2 muscarinic acetylcholine receptor. *Mol Pharmacol.* 45: 983-990.
- Leppik R. A., Mynett A., Lazareno S., Birdsall N. J. (2000) Allosteric interactions between the antagonist prazosin and amiloride analogs at the human α_{1A}-adrenergic receptor. *Mol Pharmacol.* 57: 436-445.

- Lew M. J., Angus J. A. (1995) Analysis of competitive agonist-antagonist interactions by nonlinear regression. *Trends Pharmacol Sci.* 16: 328-337.
- Linsel N. (2008) Einfluss von Rezeptorglykosylierung und Lipidmembranumgebung auf die Ligandbindung muskarinischer Acetylcholinrezeptoren unter besonderer Berücksichtigung der allosterischen Bindungsstelle. Dissertationsschrift, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Litschig S., Gasparini F., Rueegg D., Stoehr N., Flor P. J., Vranesic I., Prezeau L., Pin J. P., Thomsen C., Kuhn R. (1999) CPCCOEt, a noncompetitive metabotropic glutamate receptor 1 antagonist, inhibits receptor signaling without affecting glutamate binding. *Mol Pharmacol.* 55: 453-461.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193: 265-275.
- Lu Z. L., Saldanha J. W., Hulme E. C. (2002) Seven-transmembrane receptors: crystals clarify. *Trends Pharmacol Sci.* 23: 140-146.
- Lüllmann H., Ohnesorge F. K., Schauwecker G. C., Wassermann O. (1969) Inhibition of the actions of carbachol and DFP on guinea pig isolated atria by alkane-bis-ammonium compounds. *Eur J Pharmacol.* 6: 241-247.
- Mammen M., Choi S.-K., Whitesides G. M., (1998) Polyvalent interactions in biological systems: implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors. *Angewandte Chemie Int Ed.* 37: 2754-2794.
- May L. T., Leach K., Sexton P. M., Christopoulos A. (2007) Allosteric modulation of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 47: 1-51.
- McKinney M., Miller J. H., Gibson V.A., Nickelson L., Aksoy S. (1991) Interactions of agonists with M2 and M4 muscarinic receptor subtypes mediating cyclic AMP inhibition. *Mol Pharmacol.* 40: 1014-1022.
- Messer W. S., Jr. (2004) Bivalent ligands for G protein-coupled receptors. *Curr Pharm Des.* 10: 2015-2020.
- Michal P., El Fakahany E. E., Dolezal V. (2007) Muscarinic M₂ receptors directly activate G_{q/11} and G_s G-proteins. *J Pharmacol Exp Ther.* 320: 607-614.
- Michalski H. (2009) Binding topology and functional properties of allosteric/orthosteric hybrid ligands at muscarinic M₂ receptors. Diplomarbeit, Molekulare Biomedizin, Mathematisch-Naturwissenschaftliche und Medizinische Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Michel M. C., Alewijnse A. E. (2007) Ligand-directed signaling: 50 ways to find a lover. *Mol Pharmacol.* 72: 1097-1099.
- Miedlich S. U., Gama L., Seuwen K., Wolf R. M., Breitwieser G. E (2004) Homology modeling of the transmembrane domain of the human calcium sensing receptor and localization of an allosteric binding site. *J Biol Chem.* 279:7254-7263.
- Milligan G. (2003) Principles: Extending the utility of [³⁵S]GTPγS binding assays. *Trends Pharmacol Sci.* 24: 87-90.
- Milligan G., Bond R. A., Lee M. (1995) Inverse agonism: pharmacological curiosity or potentialtherapeutic strategy? *Trends Pharmacol Sci.* 16: 10-13.

- Milligan G., Kostenis E. (2006) Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br J Pharmacol.* 147 Suppl 1: 46-55.
- Mistry R., Dowling M. R., Challiss R. A. (2005) An investigation of whether agonist-selective receptor conformations occur with respect to M₂ and M₄ muscarinic acetylcholine receptor signalling via G_{i/o} and G_s proteins. *Br. J. Pharmacol.* 144: 566-575.
- Mohr K., Tränkle C., Holzgrabe U. (2003) Structure/activity relationships of M₂ muscarinic allosteric modulators. *Receptors Channels.* 9: 229-240.
- Mohr M. (2004) Interaktion eines M₂-selektiven Antagonisten und strukturverwandter orthosterisch/allosterischer Hybridsubstanzen mit dem muskarinischen M₂-Acetylcholinrezeptor. Dissertationsschrift, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Monod J., Changeux J.-P., Jacob F. (1963) Allosteric proteins and cellular control systems. *J Mol Biol.* 6: 306-329.
- Motulsky H. J. (1995) *Intuitive biostatistics*. Oxford University Press.
- Motulsky H. J. (2003) *Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression: a practical guide to curve fitting*. GraphPad Software Inc.
- Munshi R., Pang I. H., Sternweis P. C., Linden J. (1991) A₁ adenosine receptors of bovine brain couple to guanine nucleotide-binding proteins G_{i1}, G_{i2}, and G_o. *J Biol Chem.* 266: 22285-22289.
- Muth M., Bender W., Scharfenstein O., Holzgrabe U., Balatkova E., Tränkle C., Mohr K. (2003) Systematic development of high affinity bis(ammonio)alkane-type allosteric enhancers of muscarinic ligand binding. *J Med Chem.* 46: 1031-1040.
- Mutschler E., Moser U., Wess J., Lambrecht G. (1995) Muscarinic receptor subtypes pharmacological, molecular biological and therapeutical aspects. *Pharm Acta Helv.* 69: 243-258
- Nagano N., Nemeth E. F. (2005) Functional proteins involved in regulation of intracellular Ca²⁺ for drug development: the extracellular calcium receptor and an innovative medical approach to control secondary hyperparathyroidism by calcimimetics. *J Pharmacol Sci.* 97: 355-360.
- Nassif-Makki T., Tränkle C., Zlotos D., Bejeuhr G., Cambareri A., Pflutschinger C., Kostenis E., Mohr K., Holzgrabe U. (1999) Bisquaternary ligands of the common allosteric site of M₂ acetylcholine receptors: Search for the minimum essential distances between the pharmacophoric elements. *J Med Chem.* 42: 849-858.
- Negishi M., Namba T., Sugimoto Y., Irie A., Katada T., Narumiya S., Ichikawa A. (1993) Opposite coupling of prostaglandin e receptor EP3C with G_s and G_o. Stimulation of G_s and inhibition of G_o. *J Biol Chem.* 268: 26067-26070.
- Neubig R. R., Spedding M., Kenakin T., Christopoulos A. (2003) International union of pharmacology committee on receptor nomenclature and drug classification. XXXVIII. update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacol Rev.* 55: 597-606.
- Oldham W. M., Hamm H. E. (2008) Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9: 60-71.
- Pankov R., Yamada K. M. (2002). Fibronectin at a glance. *Journal of cell science.* 115: 3861–3863.

- Peralta E. G., Ashkenazi A., Winslow J. W., Smith D. H., Ramachandran J., Capon D. J. (1987) Distinct primary structures, ligand-binding properties and tissue-specific expression of four human muscarinic acetylcholine receptors. *EMBO J.* 6: 3923-3929.
- Perez D. M., Karnik S. S. (2005) Multiple signaling states of G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Rev.* 57: 147-161.
- Petrel C., Kessler A., Dauban P., Dodd R. H., Rognan D., Ruat M (2004) Positive and negative allosteric modulators of the Ca²⁺-sensing receptor interact within overlapping but not identical binding sites in the transmembrane domain. *J Biol Chem* 279: 18990-18997.
- Pfaffendorf M., Batink H. D., Tränkle C., Mohr K., van Zwieten P. A. (2000) Probing the selectivity of allosteric modulators of muscarinic receptors at other G-protein-coupled receptors. *J Auton Pharmacol.* 20: 55-62.
- Portoghese P. S. (1989) Bivalent ligands and the message-address concept in the design of selective opioid receptor antagonists. *Trends Pharmacol Sci.* 10: 230-235.
- Prilla S. (2007) Muskarinische Acetylcholinrezeptoren: Identifizierung einer Kernregion für allosterisch-orthosterische Rezeptorinteraktionen. Dissertationsschrift, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Prilla S., Schrobang J., Ellis J., Höltje H. D., Mohr K. (2006) Allosteric interactions with muscarinic acetylcholine receptors: complex role of the conserved tryptophan M₂⁴²²Trp in a critical cluster of amino acids for baseline affinity, subtype selectivity, and cooperativity. *Mol Pharmacol.* 70: 181-193.
- Roszkowski, A. P. (1961) An unusual type of sympathetic ganglionic stimulant. *J Pharmacol Exp Ther.* 132: 156-170.
- Sabroe I., Peck M. J., Van Keulen B. J., Jorritsma A., Simmons G., Clapham P. R., Williams T. J., Pease J. E. (2000) A small molecule antagonist of chemokine receptors CCR1 and CCR3. Potent inhibition of eosinophil function and CCR3-mediated HIV-1 entry. *J Biol Chem.* 275: 25985-25992.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74: 5463-5467.
- Schmalenbach C. (2005) Allosterische Modulation der durch Acetylcholin und weitere Agonisten ausgelösten Aktivierung von muskarinischen M₂-Rezeptoren. Dissertationsschrift, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Schwartz T. W., Frimurer T. M., Holst B., Rosenkilde M. M., Elling C. E. (2006) Molecular mechanism of 7TM receptor activation - a global toggle switch model. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 46:481-519.
- Schwyzler R. (1977) ACTH: a short introductory review. *Ann N Y Acad Sci.* 297: 3-26.
- Senogles S. E., Spiegel A. M., Padrell E., Iyengar R., Caron M. G. (1990) Specificity of receptor-G protein interactions. Discrimination of G_i subtypes by the D₂ dopamine receptor in a reconstituted system. *J Biol Chem.* 265: 4507-4514.
- Simonds, W. F. (1999) G protein regulation of adenylate cyclase *TiPs.* 20: 66-72
- Spalding T. A., Ma J. N., Ott T. R., Friberg M., Bajpai A., Bradley S. R., Davis R. E., Brann M. R., Burstein E. S. (2006) Structural requirements of transmembrane domain 3 for activation by the M₁ muscarinic receptor agonists AC-42, AC-260584, clozapine, and n-desmethylozapine: evidence for three distinct modes of receptor activation. *Mol Pharmacol.* 70: 1974-1983.

- Stockton J. M., Birdsall N. J., Burgen A. S., Hulme E. C. (1983) Modification of the binding properties of muscarinic receptors by gallamine. *Mol Pharmacol.* 23: 551-557.
- Straßmann V. (2007) Rezeptorepitop-Abhängigkeit der Bindung muskarinischer allosterischer Modulatoren unter verschiedenen ionalen Bedingungen. Dissertationsschrift, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Suzuki G., Tsukamoto N., Fushiki H., Kawagishi A., Nakamura M., Kurihara H., Mitsuya M., Ohkubo M., Ohta H. (2007) In vitro pharmacological characterization of novel isoxazolopyridone derivatives as allosteric metabotropic glutamate receptor 7 antagonists. *J Pharmacol Exp Ther.* 323: 147-156.
- Tang M. X., Redemann C. T., Szoka F. C. Jr. (1996) In vitro gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers. *Bioconjug Chem.* 6: 703-714.
- Tränkle C., Andresen I., Lambrecht G., Mohr K. (1998) M₂ receptor binding of the selective antagonist AF-DX 384: possible involvement of the common allosteric site. *Mol Pharmacol.* 53: 304-312.
- Tränkle C., Dittmann A., Schulz U., Weyand O., Buller S., Jöhren K., Heller E., Birdsall N. J., Holzgrabe U., Ellis J., Holtje H. D., Mohr K. (2005) Atypical muscarinic allosteric modulation: cooperativity between modulators and their atypical binding topology in muscarinic M₂ and M₂/M₅ chimeric receptors. *Mol Pharmacol.* 68: 1597-1610.
- Tränkle C., Kostenis E., Burgmer U., Mohr K. (1996) Search for lead structures to develop new allosteric modulators of muscarinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 279: 926-933.
- Tränkle C., Mohr K. (1997) Divergent modes of action among cationic allosteric modulators of muscarinic M₂ receptors. *Mol Pharmacol.* 51: 674-682.
- Tuček S. (1997) Is the R and R dichotomy real? *Trends Pharmacol Sci.* 18: 414-416.
- Tuček S., Prošca J. (1995) Allosteric modulation of muscarinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 16: 205-212.
- Ui M., Katada T., Murayama T., Kurose H., Yajima M., Tamura M., Nakamura T., Nogimori K. (1984) Islet-activating protein, Pertussis toxin: a specific uncoupler of receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.* 17: 145-151.
- Valant C., Gregory K. J., Hall N. E., Scammells P. J., Lew M. J., Sexton P. M., Christopoulos A. (2008). A novel mechanism of G protein-coupled receptor functional selectivity. Muscarinic partial agonist McN-A-343 as a bitopic orthosteric/allosteric ligand. *J Biol Chem.* 283: 29312-21.
- Valant C., Sexton P. M., Christopoulos A. (2009) Orthosteric/allosteric bitopic ligands: going hybrid at GPCRs. *Mol Interv.* 9: 125-35.
- Violin J. D., Lefkowitz J. (2007) β -arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 28: 416-422.
- Voigtländer U., Jöhren K., Mohr M., Raasch A., Tränkle C., Buller S., Ellis J., Hölte H. D, Mohr K. (2003) Allosteric site on muscarinic acetylcholine receptors: identification of two amino acids in the muscarinic M₂ receptor that account entirely for the M₂/M₅ subtype selectivities of some structurally diverse allosteric ligands in N-methylscopolamine-occupied receptors. *Mol Pharmacol.* 64: 21-31.
- Wassermann O. (1972) Studies on the pharmacokinetics of bisquaternary ammonium compounds. I. synthesis, physico-chemical properties and protein-binding of ³H-labelled hexamethonium and of some of its derivatives. *Arzneimittelforschung.* 22: 1993-1995.

Wess J. (1993) Molecular basis of muscarinic acetylcholine receptor function. *Trends Pharmacol Sci.* 14: 308-313.

Wess J. (2003) Novel insights into muscarinic acetylcholine receptor function using gene targeting technology. *Trends Pharmacol Sci*, 24: 414-420.

Wess J. (2004) Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice: Novel phenotypes and clinical implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 44: 423-450.

Zahn K., Eckstein N., Tränkle C., Sadée W., Mohr K. (2002) Allosteric modulation of muscarinic receptor signaling: alcuronium-induced conversion of pilocarpine. From an Agonist into an Antagonist. *J Pharmacol Exp Ther.* 301:720-728.

8 Anhang

8.1 Methodische Vorversuche zur Etablierung eines Standard-Versuchsprotokolls für DMR-Messungen mit CHO-Zellen

Zur Messung der intrinsischen Aktivität von Testsubstanzen an muskarinischen Rezeptoren und zur Bestimmung der spezifischen Aktivierung von intrazellulären Signalwegen durch verschiedene Liganden wurde ein funktionelles Messsystem genutzt. Im Verlauf der experimentellen Arbeiten dieser Dissertation stand unserem Arbeitskreis mit dem optischen Biosensor Epic[®] erstmals ein geeignetes, innovatives Messsystem zur Verfügung. Zunächst wurde ein Standard-Versuchsprotokoll für die in CHO-Zellen exprimierte Rezeptoren etabliert. Die Unterpunkte zu diesem Abschnitt zeigen die verschiedenen Parameter, die hierbei validiert wurden. Das experimentelle Vorgehen ist detailliert im Unterkapitel 2.7.2.2 beschrieben.

8.1.1 Einfluss der eingesetzten Zellzahl

Abbildung 95 veranschaulicht den Einfluss der eingesetzten Zahl an Flp-CHO-Zellen bei der Durchführung von Messungen zu dynamischen Massenumverteilung am Epic[®] Biosensor. Die angegebene Größe entspricht der Anzahl an Zellen, die am Vortag des Versuchs in einer Kavität der Messplatte ausgesät wurden (siehe Versuchsdurchführung 2.7.2.2).

Abbildung 95 zeigt die Validierung bezüglich des Einflusses der Zelldichte, die exemplarisch am Beispiel der Konzentrations-Effekt-Kurve von Acetylcholin an Flp-CHO-M₂-Zellen durchgeführt wurde.

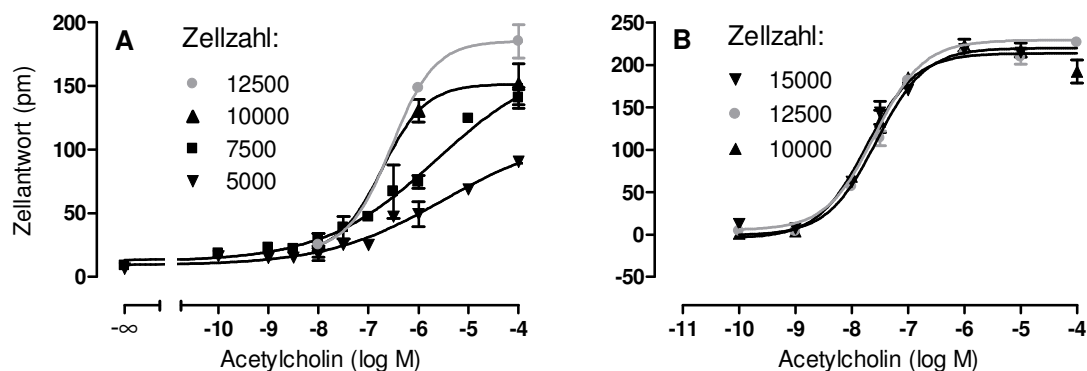


Abbildung 95: Einfluss der eingesetzten Zellzahl auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Acetylcholin an Flp-CHO-M₂-Zellen. **Ordinate:** Maximum der zellulären Antwort, entspricht der maximalen Wellenlängenverschiebung in Picometer (pm). **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Acetylcholin-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 5), freilaufender Hill-Koeffizient. **Datenpunkte:** Mittelwerte ± Standardfehler einer Zwei- oder Dreifachbestimmung je eines Experiments (**A** und **B**), welches einmal (Zellzahlen: 5000, 15000) oder zweimal (andere Zellzahlen) mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde.

Als Ergebnis der oben gezeigten Versuche wurde in den durchgeführten Biosensorstudien standardmäßig eine Anzahl von 12500 Zellen pro Kavität der Mikrotiterplatte eingesetzt. Dieser Wert stimmt gut überein mit dem von der Herstellerfirma des Biosensors angegebenen Anzahl von 10000-15000 CHO-Zellen pro Kavität (persönliche Information, Corning Epic® Training, Universität Bonn November 2007). Er ließ sich auf die eingesetzten stabil transfizierten CHO-Expressionszelllinien und die entsprechende nichttransfizierte Zelllinie zur Kontrolle auf Spezifität der Signale übertragen.

Vom Hersteller der Messplatten mit integriertem Biosensor (Corning™) wurden zwei verschiedene Plattentypen für die Durchführung von zellulären Versuchen angeboten. Es gibt neben der Standard-Messplatte (M11) eine mit Fibronectin beschichtete Messplatte (M12), die bei Versuchen mit schlecht adhärierenden Zelllinien Vorteile bieten kann, da das Anhaften durch Wechselwirkung von Fibronectin zu verschiedenen Membranproteinen (darunter Integrine und Kollagen) erleichtert wird (Pankov et al., 2002). Da die verwendeten CHO-Zellen gut adhärten und auch der Hersteller die nicht-beschichteten Messplatten empfohlen hatte, wurde in einem Einzelversuch getestet, ob es einen Unterschied zwischen den beiden Plattentypen bei Vermessung der Flp-CHO-M₂-Zelllinie gibt. Bei der eingesetzten Zellzahl von 12500 Zellen pro Kavität zeigte sich kein auffälliger Unterschied (Einzelversuch, Daten nicht gezeigt). Bei allen durchgeführten Experimenten wurde so mit der Standard-Messplatte (M11) gearbeitet.

8.1.2 Einfluss der Position auf der Messplatte

Abbildung 96 und Abbildung 97 zeigen die Ergebnisse eines Epic®-Experiments, bei dem der Einfluss der Position der Kavität auf der Microtiterplatte auf das Agonist-vermittelte Signal untersucht wurde. In allen 384 Kavitäten wurde hierzu die gleiche Bestimmung durchgeführt. Flp-CHO-M₂ Zellen wurden mit Acetylcholin (100 µM) versetzt und die zeitabhängige, dynamische Massenumverteilung gemessen.

Abbildung 96 zeigt im Zentrum eine schematische Plattenabbildung und einzelne ausgewählte Signatur-Verläufe. Zur Orientierung ist bei $y = 150 \text{ pm}$ in eine Parallele zur Abszisse eingeblendet.

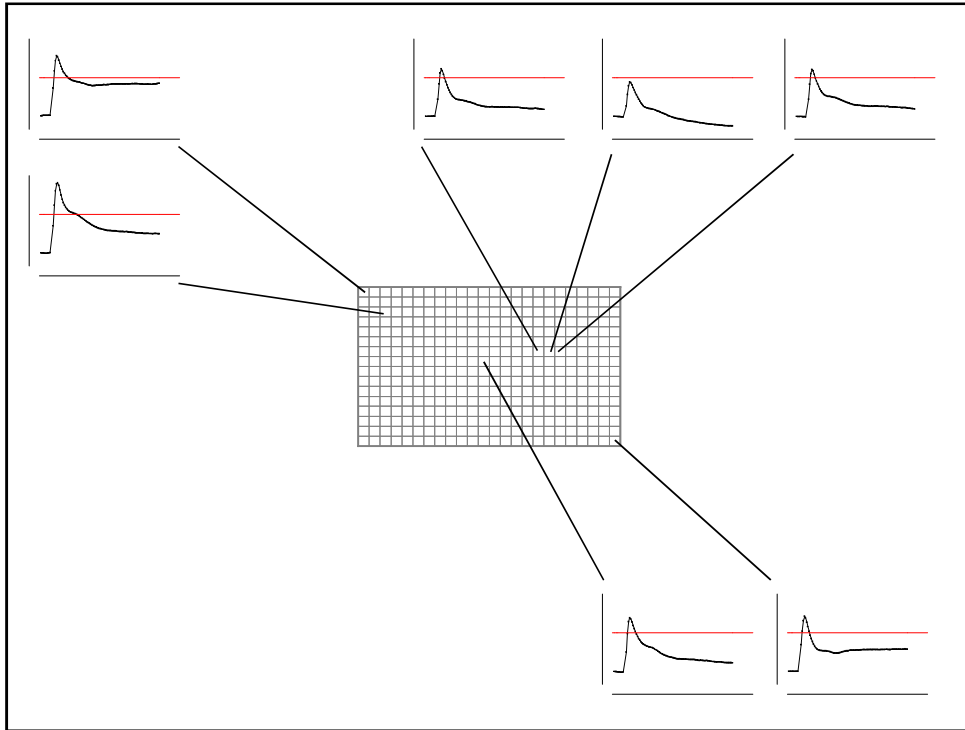


Abbildung 96: Einfluss der Position auf der Microtiterplatte, Effekt von Acetylcholin ($100 \mu\text{M}$) auf Flp-CHO- M_2 -Zellen. **Zentrum:** Schematische Abbildung der Messplatte. **Peripherie:** Signaturen ausgewählter Kavitäten. **Ordinate:** Zelluläre Antwort, entspricht der Wellenlängenverschiebung in Picometer (pm). **Abszisse:** Zeit in Sekunden (s). **Datenpunkte:** Messwerte mit zugehöriger Verbindungslinie, jeder Graph zeigt eine Einzelmessung ($n = 384$), (Orientierungslinie $y = 150 \text{ pm}$).

Abbildung 97 zeigt verschiedene zusammenfassende Darstellungen des oben beschriebenen Experiments.

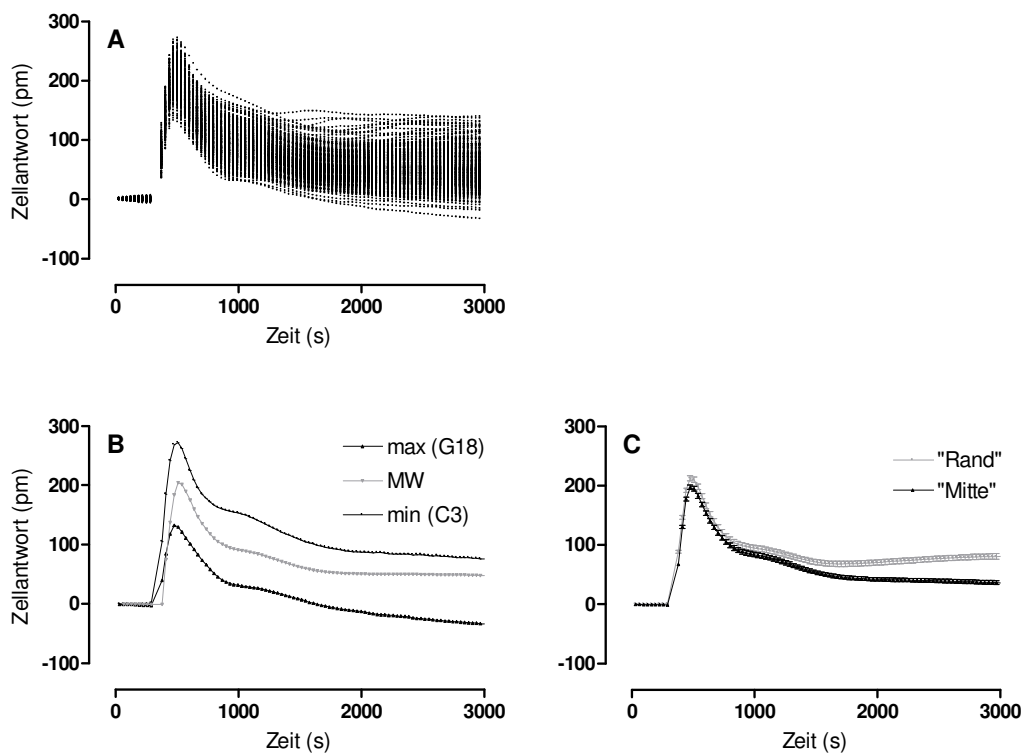


Abbildung 97: Einfluss der Position auf der Microtiterplatte, Effekt von Acetylcholin (100 μM) auf Flp-CHO-M₂-Zellen. **Ordinate:** Zelluläre Antwort, entspricht der Wellenlängenverschiebung in Picometer (pm). **Abzisse:** Zeit in Sekunden (s). **A:** Auftragung aller Messpunkte. **B:** Mittelwert (n = 384) in grau, minimale (Kavität C3) und maximale (Kavität G18) Wellenlängenverschiebung in schwarz, mit entsprechender Verbindungslinie der einzelnen Datenpunkte. **C:** Vergleich zwischen einer Randposition (definiert als die beiden äußeren Reihen und Spalten) und einer zentralen Position (definiert als die übrigen Kavitäten), Datenpunkt: Mittelwerte \pm Standardfehler der Mittelwerte jeder Spalte („Mitte“: n = 240 Messpunkte, „Rand“: n = 144 Messpunkte).

Die Ergebnisse der 384-fachen Bestimmung des Effekts von Acetylcholin (100 μM) auf Flp-CHO-M₂-Zellen bilden die Streuung der Einzelbestimmungen ab. Teil C der Abbildung 97 zeigt, dass sich der ‚Randeffekt‘ im ‚Peak‘ der Messung nicht bemerkbar macht, wohl aber zu späteren Zeitpunkten, wo es im mittleren Bereich der Platte zu signifikant niedrigeren Signaturverläufen kommt. Um einen systematischen Fehler auszuschließen, wurde die Plattenbelegung (Rand- und zentrale Kavitäten) zwischen den einzelnen Versuchstagen variiert.

8.1.3 Effekt von Adenosintriphosphat auf CHO-M₂-Zellen

In Abbildung 98 ist der Effekt von Adenosintriphosphat (ATP) auf Flp-CHO-M₂-Zellen gezeigt. ATP ist ein Agonist an P2X-Rezeptoren aus der Klasse der Ionenkanäle und P2Y-Rezeptoren (GPCR). Gleichzeitig dient ATP verschiedenen Kinasen als Cosubstrat (cAMP-

abhängige Proteinkinase A, Ca^{2+} -abhängige Proteinkinase C) und kann so vielfältige Signaltransduktionswege anschalten. Bei den ersten durchgeführten Versuchen wurde die Substanz als Positiv-Kontrolle mitgeführt, um die Signalstärke zu untersuchen. Bei späteren Versuchen an M-Rezeptor exprimierenden Zellen wurde darauf verzichtet, da die durch muskarinische Standard-Vollagonisten (Acetylcholin, Carbachol) induzierte Signatur als Kontrolle diente.

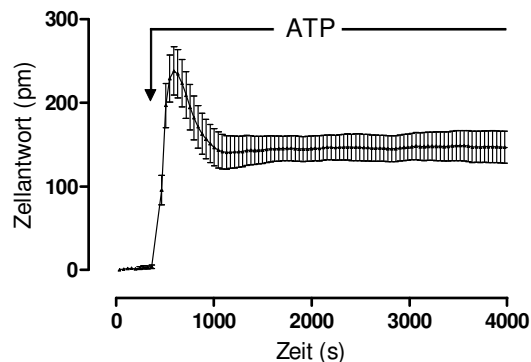


Abbildung 98: Einfluss von Adenosintriphosphat (ATP, 100 μM) auf Flp-CHO-M₂-Zellen. **Ordinate:** Zelluläre Antwort, entspricht der Wellenlängenverschiebung in Picometer (pm). **Abszisse:** Zeit in Sekunden (s). **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler einer Vierfachbestimmung eines beispielhaften Experiments, ergänzt durch eine Verbindungsline, repräsentativ für drei solcher Experimente.

ATP führte zu einem aufwärts gerichteten Signal im Bereich positiver Massenverschiebungen. Sofort nach Substanzzugabe (300 Sekunden) setzte der Effekt ein und erreichte nach 300 Sekunden ein Maximum (ca. 230 pm). Nach weiteren 300 Sekunden stellte sich ein konstanter Wert (ca. 140 pm) der dynamischen Massenumverteilung ein, der für ein Gleichgewicht der zellulären Signalwege steht.

8.1.4 Effekt von Forskolin auf CHO-Zellen

Es sollte untersucht werden, welchen Einfluss eine Stimulation der Adenylylzyklase durch das Diterpen Forskolin auf die DMR hat. Forskolin ist membrangängig und kann so unabhängig von einem Rezeptor-vermittelten Effekt zu einer direkten Stimulation des Enzyms führen (Simonds, 1999). Abbildung 99 zeigt den konzentrationsabhängigen Effekt von Forskolin auf Flp-CHO-M₂-Zellen (**A**) und nichttransfizierte Flp-CHO-Zellen (**B**).

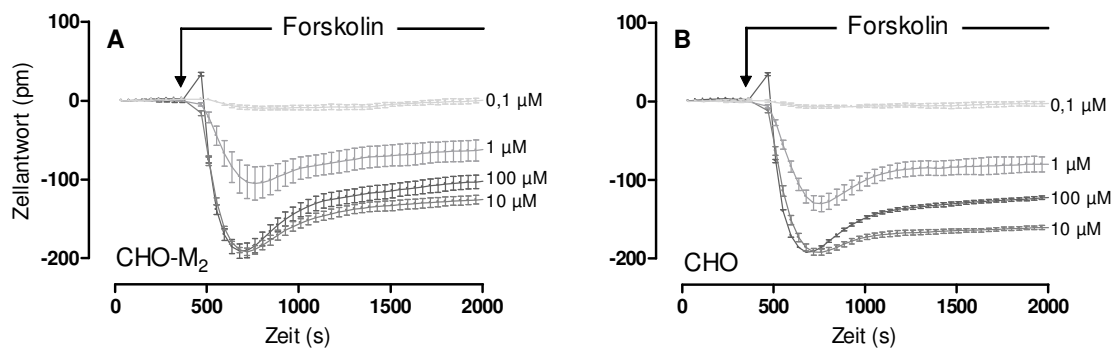


Abbildung 99: Die Aktivierung der Adenylylzyklase durch Forskolin führt zu einer Rezeptor-unabhängigen DMR-Signatur. Der Effekt von Forskolin (in den angegebenen Konzentrationen) auf Flp-CHO-M₂-Zellen (A) und nichttransfizierte Flp-CHO-Zellen (B) wurde untersucht. **Ordinate:** Zelluläre Antwort, entspricht der Wellenlängenverschiebung in Picometer (pm). **Abszisse:** Zeit in Sekunden (s). **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler einer Vierfachbestimmung eines beispielhaften Experiments, ergänzt durch eine Verbindungslinie, repräsentativ für drei solcher Experimente.

Forskolin führte konzentrationsabhängig zu einer abwärtsgerichteten Signatur im Bereich negativer Massenumverteilungen. Unabhängig von der Expression des M₂-Rezeptors entstand eine gleichartige Signatur. Beim Minimum zeigte sich, dass durch 10 μ M Forskolin eine maximale Zellantwort erreicht wurde, die durch Erhöhung der Konzentration auf 100 μ M nicht mehr gesteigert werden konnte. Im Unterschied zu den restlichen Signaturverläufen fiel für Forskolin 100 μ M ein initialer Anstieg auf ca. + 30 pm auf. Auch der weitere Verlauf des durch Forskolin 100 μ M ausgelösten Effekts liegt um ca. + 30 pm über dem Effekt von Forskolin 10 μ M. Unter Einbezug der Ergebnisse zum Einfluss des Lösungsmittels DMSO (siehe 8.1.6) war davon auszugehen, dass der Signaturverlauf von Forskolin 100 μ M durch den höheren Anteil von DMSO (finale Konzentration: 0,25 %) im Puffer bedingt war. Bei den weiteren Versuchen, die bei maximal stimulierter Adenylylzyklase durchgeführt wurden, wurde deshalb Forskolin in einer Konzentration von 10 μ M verwendet.

Abbildung 99 zeigt, dass der Forskolin-Effekt unabhängig von der Expression des M₂-Rezeptors vermittelt wurde. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob dieser Effekt eine Abhängigkeit von der Expression von G_i-Proteinen zeigte. Die Anwesenheit von funktionalen G_i α -Untereinheiten, die nach Bindung an die Adenylylzyklase als Enzym-Inhibitoren wirken, könnte einen stärkeren Forskolin-Effekt ermöglichen. Dies sollte durch den Einsatz von Pertussistoxin (100 ng/ml) untersucht werden; in Abbildung 100 sind die Ergebnisse dargestellt.

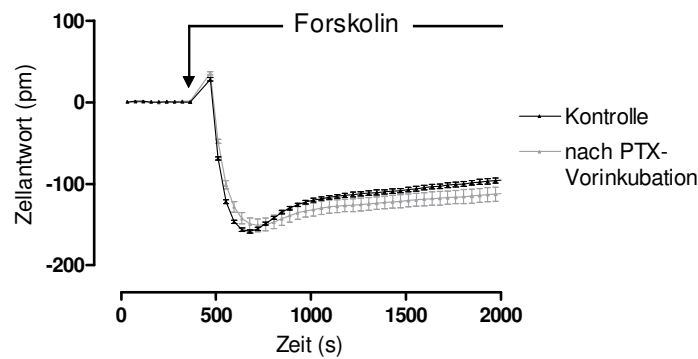


Abbildung 100: Die Aktivierung der Adenylylzyklase durch Forskolin führt zu einer G_i -unabhängigen DMR-Signatur. Der Effekt von Forskolin ($10 \mu\text{M}$) auf Flp-CHO- M_2 -Zellen wurde untersucht. **Ordinate:** Zelluläre Antwort, entspricht der Wellenlängenverschiebung in Picometer (pm). **Abszisse:** Zeit in Sekunden (s). **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler einer Vierfachbestimmung eines beispielhaften Experiments, ergänzt durch eine Verbindungslinie, repräsentativ für drei solcher Experimente.

Abbildung 100 zeigt ein repräsentatives Ergebnis einer DMR-Signatur durch Forskolin ($10 \mu\text{M}$) unter Kontrollbedingungen im Vergleich mit Pertussistoxin Vorinkubation. Die irreversible Inaktivierung der $G_i\alpha$ -Untereinheiten durch die Inkubation mit Pertussistoxin (100 ng/ml , 20 h) führte zu keiner Änderung des DMR-Verlaufs. In den durchgeführten Versuchen lag eine direkte Stimulation der Adenylylzyklase somit unabhängig von einer basalen, G_i -Protein-induzierten Enzyminhibition vor.

In Abbildung 101 A sind vergleichend noch einmal die Signaturen der M_2 -Rezeptor-Aktivierung durch Acetylcholin ($100 \mu\text{M}$), die für eine Inhibition der Adenylylzyklase steht und die Signatur von Forskolin ($10 \mu\text{M}$), das eine Stimulation des Enzyms induziert, abgebildet. Im zweiten Teil der Abbildung (B) wurden die Zellen vor Beginn der gezeigten Messung mit Forskolin vorstimuliert ($10 \mu\text{M}$, 2 h) und dann zusätzlich Acetylcholin ($100 \mu\text{M}$) oder einer weiteren Dosis Forskolin ($10 \mu\text{M}$) ausgesetzt. Das Ausbleiben eines Effekts der zweiten Dosis Forskolin zeigte an, dass die erste Dosis ausreichend war, um die Adenylylzyklase maximal zu stimulieren. Auffällig ist, dass die maximale inhibitorische Zellantwort auf Acetylcholin in Abbildungsteil B relativ zu A vergrößert ist. Die Zunahme der Zellantwort stimmt dabei mit dem Ausmaß überein, mit dem Forskolin die dynamische Massenumverteilung in die entgegengesetzte Richtung bewirkt.

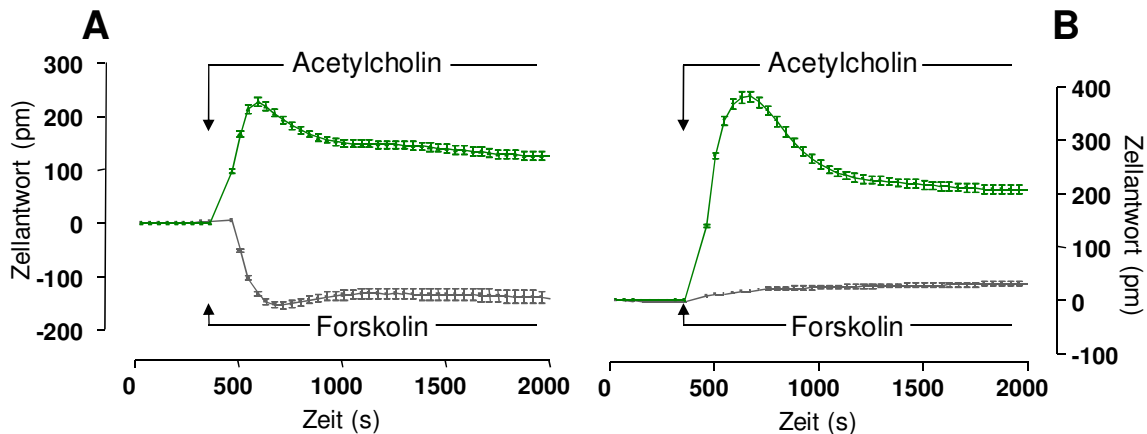


Abbildung 101: Vorstimulation der Adenylylzyklase durch Forskolin führt zu einer Verstärkung der inhibitorischen Zellantwort durch M_2 -Rezeptor-Aktivierung. **A:** DMR-Antwort in Flp-CHO- M_2 -Zellen, die durch Acetylcholin alleine (100 μ M, grün) oder Forskolin alleine (10 μ M, grau) ausgelöst wurde. **B:** Flp-CHO- M_2 -Zellen wurden mit Forskolin vorstimuliert (10 μ M, 2 h) und dann zusätzlich Acetylcholin (100 μ M, grün) oder einer weiteren Dosis Forskolin (10 μ M, grau) ausgesetzt. **Ordinate:** Zelluläre Antwort, entspricht der Wellenlängenverschiebung in Picometer (pm). **Abszisse:** Zeit in Sekunden (s). **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler einer Vierfach- bis Achtfachbestimmung eines beispielhaften Experiments, ergänzt durch eine Verbindungslinie, repräsentativ für drei solcher Experimente.

8.1.5 Basislinien Korrektur durch Lösungsmittel-Kontrolle

Auf Grund der hohen Empfindlichkeit des Epic[®] Messsystems wurden an jedem Versuchstag und zu den verschiedenen untersuchten Bedingungen entsprechende Lösungsmittel- (Epic[®]-Puffer L4) Kontrollen mitgeführt. An vielen Versuchstagen zeigte sich durch die Puffer-Zugabe kein von der Basislinie verschiedener Effekt. An einzelnen Versuchstagen zeigte sich jedoch ein Signal (bis ca. ± 50 pm) durch Puffer-Zugabe, welches von den Testsubstanz-induzierten Signaturen subtrahiert wurde. Die in dieser Arbeit abgebildeten optischen Registrierungen der DMR sind (wenn nicht anders vermerkt) um den testsubstanzfreien Lösungsmittelleffekt korrigiert ("baseline corrected"). Abbildung 102 zeigt die "baseline correction" anhand eines beispielhaften Experiments.

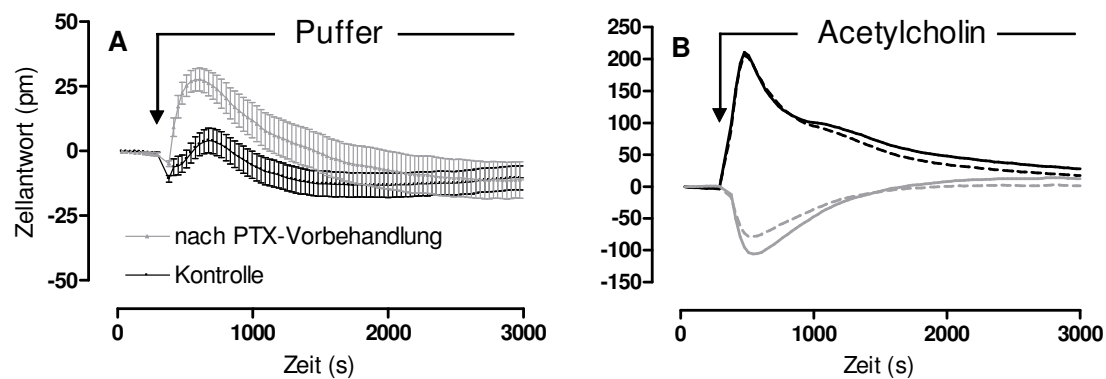


Abbildung 102: Basislinien Korrektur: Der Effekt von Epic[®]-Puffer (**A**) sowie der Effekt von Acetylcholin (**B**, 100 μ M) auf Flp-CHO-M₂-Zellen unter Kontrollbedingungen und nach PTX-Vorinkubation wurde untersucht. In (**B**) deuten die gestrichelten Linien die Original-Registrierungen an. Die durchgezogenen Linien stehen für die Puffer-korrigierten Werte. **Ordinate:** Zelluläre Antwort, entspricht der Wellenlängenverschiebung in Picometer (pm). **Abszisse:** Zeit in Sekunden (s). **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler (**A**) bzw. Mittelwerte (**B**) einer Achtfachbestimmung eines beispielhaften Experiments, ergänzt durch eine Verbindungslinie, repräsentativ für alle durchgeführten Experimente.

Teil A der Abbildung zeigt, dass der Effekt der Zugabe von Epic[®]-Puffer (L4) zu den untersuchten Zellen je nach vorliegenden Versuchsbedingungen (hier: Kontroll-Bedingungen im Vergleich mit Pertussistoxin Vorbehandlung), unterschiedlich stark ausgeprägt sein kann. Um eine Beeinflussung des Testsubstanz-induzierten Effekts zu korrigieren, wurde die entsprechende Puffer-Signatur subtrahiert. In Teil B der Abbildung zeigen die gestrichelten Signaturen die Original-Registrierungen und die durchgezogenen Linien die entsprechenden Signaturen nach Abzug der Puffer-Werte aus A.

Es zeigte sich ebenfalls ein großer Einfluss des pH-Werts des Epic[®]-Puffers (L4) auf die Zellantwort. Leicht saure pH-Werte unterhalb des Normalwerts von 7,0 führten in den eingesetzten CHO-Zellen zu extremen, Agonist-unabhängigen Massenverschiebungen.

8.1.6 Einfluss des Lösungsmittels DMSO auf die DMR-Messung an CHO-M₂-Zellen

Für einige Testsubstanzen (z.B. Forskolin) war die Löslichkeit in Wasser bzw. wässriger Pufferlösung so gering, dass DMSO als Lösungsmittel zur Herstellung der Stammlösung eingesetzt werden musste. Daher wurden Vorversuche zur Charakterisierung des DMSO-Effekts durchgeführt, um festzustellen, welche DMSO-Konzentration in den Ganzzellversuchen einsetzbar waren, ohne dass ein Lösungsmittelleffekt den Testsubstanz-spezifischen Effekt überdeckt. Im Folgenden wurde zunächst die Konzentrationsabhängigkeit des Effekts von DMSO untersucht (siehe Abbildung 103).

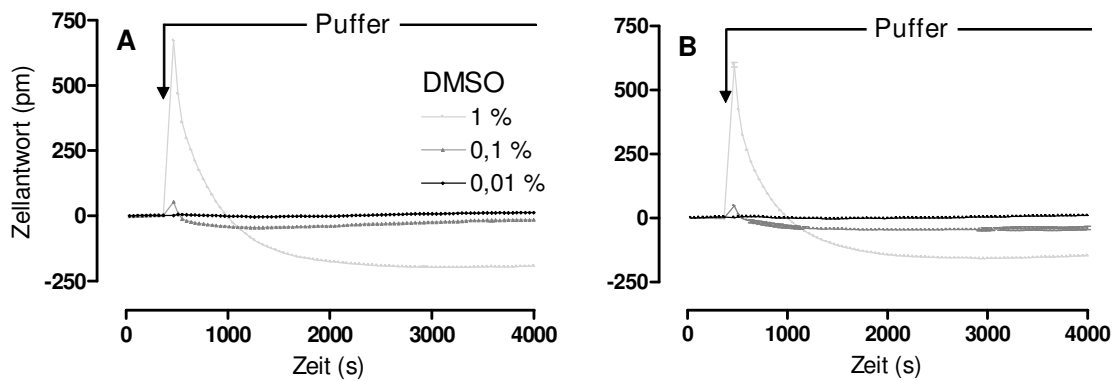


Abbildung 103: Der Effekt von DMSO-Zusatz (in den angegebenen Konzentrationen) auf FIp-CHO-M₂-Zellen (A) und FIp-CHO-M₂-Zellen, die am Vortag in Medium, das die entsprechende DMSO-Konzentration enthielt ausgesät wurden, sowie mit DMSO-haltigem Puffer gewaschen wurden (B). **Ordinate:** Zelluläre Antwort, entspricht der Wellenlängenverschiebung in Picometer (pm). **Abszisse:** Zeit in Sekunden (s). **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler einer Vierfachbestimmung eines repräsentativen Experiments, ergänzt durch eine Verbindungslinie, das zweimal (A) bzw. einmal (B) mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde.

Der in Abbildungsteil A dargestellte Versuch zeigte einen sehr starken zellulären Effekt durch die Zugabe von 1-prozentiger DMSO Lösung. Bei einer Konzentration von 0,1 % ist eine geringe, jedoch charakteristische Massenumverteilung zu erkennen. 0,01 % DMSO zeigen keine messbare Zellantwort. Um die DMSO-Toleranz der untersuchten Zellen zu erhöhen, wurden diese am Vortag der Messung in Medium, das die entsprechende DMSO-Konzentration enthielt, ausgesät und mit DMSO-haltigem Puffer gewaschen. Teil B von Abbildung 103 zeigt, dass durch diese Vorbehandlung der Zellen keine Gewöhnung erzielt werden konnte. Der Einfluss von DMSO blieb unverändert. Nach Abschluss der experimentellen Arbeiten für diese Dissertation konnte bei Versuchen in Zusammenarbeit mit Nicole Janßen festgestellt werden, dass durch Waschen der Zellen mit einem Puffer, der das Vierfache der DMSO-Endkonzentration enthielt und anschließende Inkubation (2h, siehe Protokoll unter 2.7.2.2) in Puffer des gleichen DMSO-Gehalts, bis zu 2 % DMSO (maximale getestete Konzentration) toleriert wurden.

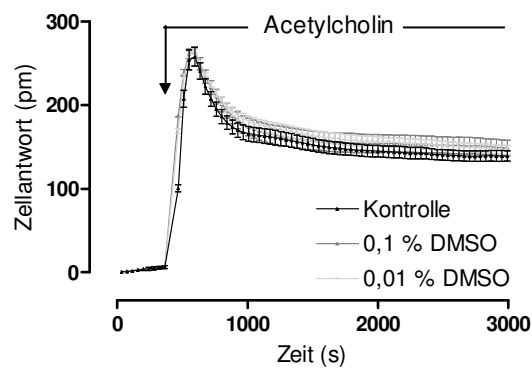


Abbildung 104: Der Effekt von DMSO-Zusatz auf die Antwort von Flp-CHO-M₂-Zellen auf Acetylcholin (100µM). **Ordinate:** Zelluläre Antwort, entspricht der Wellenlängenverschiebung in Picometer (pm). **Abszisse:** Zeit in Sekunden (s). **Datenpunkte:** Mittelwerte ± Standardfehler einer Vierfachbestimmung eines repräsentativen Experiments, ergänzt durch eine Verbindungslinie, das einmal mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde.

Neben der Bestimmung des konzentrationsabhängigen Effekts von DMSO in Abwesenheit von Testsubstanzen wurde abschließend überprüft, ob der Zusatz von DMSO (0,1 und 0,01 %) einen Effekt auf die Acetylcholin (100 µM)-induzierte Antwort von Flp-CHO-M₂-Zellen hat. Abbildung 104 zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen dem Verlauf der Kontroll-Signatur und dem Verlauf in Anwesenheit von DMSO. In den eingesetzten Konzentrationen (0,1 und 0,01 %) hatte das Lösungsmittel somit keinen messbaren Effekt auf die Agonist-induzierte dynamische Massenumverteilung.

8.1.7 Rezeptorspezifität der Zellantworten

Um die Rezeptorspezifität der zellulären dynamischen Massenumverteilungen zu untersuchen, wurden nicht-transfizierte Flp-CHO Zellen untersucht. Exemplarisch ist in Abbildung 105 der Einfluss einiger, für diese Arbeit wichtiger Testsubstanzen auf die Ausgangszelllinie dargestellt.

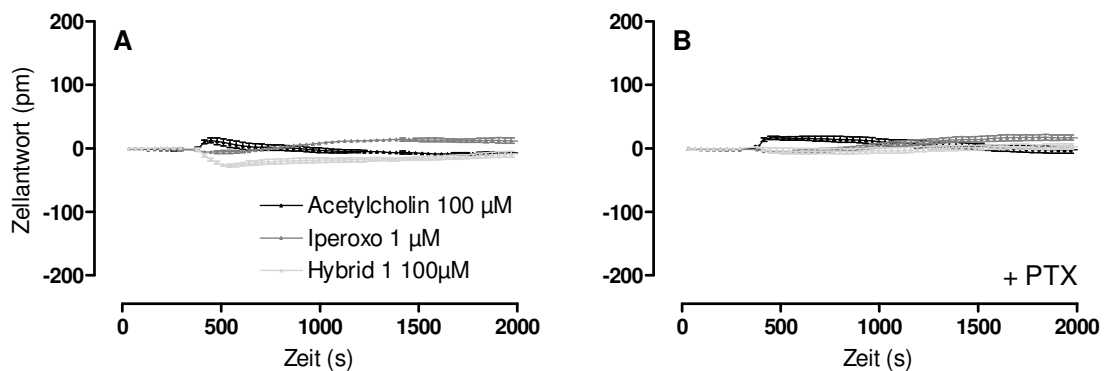


Abbildung 105: Effekt der Testsubstanzen auf nicht-transfizierte Flp-CHO-Zellen unter Kontrollbedingungen (**A**), nach PTX-Vorinkubation (**B**). **Ordinate:** Zelluläre Antwort, entspricht der Wellenlängenverschiebung in Picometer (pm). **Abszisse:** Zeit in Sekunden (s). **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler einer Vierfachbestimmung eines repräsentativen Experiments, ergänzt durch eine Verbindungslinie, das mindestens zweimal mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde.

In den vorliegenden Epic[®]-Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Testsubstanzen an der nicht-transfizierten Ausgangszelllinie (Flp-CHO) keine charakteristischen Zellantworten auslösten. Ein Muskarinrezeptor-unabhängiger Effekt würde sich hier durch das Auftreten charakteristischer Signaturen zeigen. Es ist somit davon auszugehen, dass alle Effekte der untersuchten Testsubstanzen Rezeptor-vermittelt sind. Neben den hier gezeigten orthosterischen Agonisten Acetylcholin und Iperoxo sowie dem dualsterischen Liganden Hybrid 1 wurden auch die weiteren Testsubstanzen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, bezüglich ihrer Spezifität untersucht. (Daten nicht gezeigt). Keiner der eingesetzten Liganden zeigte in den für die weiteren Experimente relevanten Konzentrationen Effekte an der Ausgangszelllinie, die signifikant von den Pufferwerten verschieden waren. Erst bei weiterer Steigerung der eingesetzten Konzentration (≥ 1 mM) zeigten sich Rezeptor-unabhängige, unspezifische Effekte.

8.1.8 Effekt des Antagonisten Atropin auf CHO-M₂-Zellen

Im folgenden Versuch (Abbildung 106) wurde Atropin als Standard-Antagonist ausgewählt und der Einfluss der Testsubstanz auf die dynamische Massenumverteilung in Flp-CHO-M₂-Zellen untersucht. So sollte getestet werden, ob durch den Antagonisten, der als inverser Agonist wirkt (siehe 3.3.5), eine zelluläre Antwort messbar war und somit im vorliegenden Testsystem die untersuchten Rezeptoren eine konstitutive Aktivität besaßen.

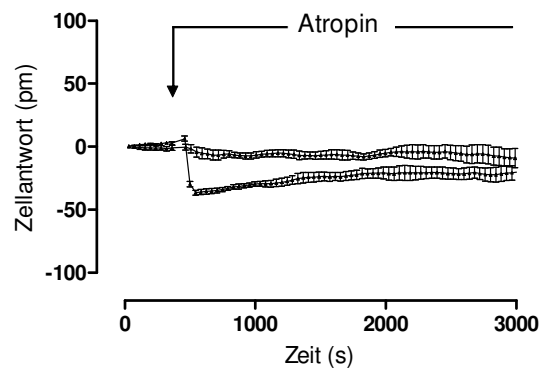


Abbildung 106: Einfluss von Atropin ($10 \mu\text{M}$) auf Flp-CHO- M_2 -Zellen. **Ordinate:** Zelluläre Antwort, entspricht der Wellenlängenverschiebung in Picometer (pm). **Abszisse:** Zeit in Sekunden (s). **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler von zwei unabhängigen Vierfachbestimmungen, ergänzt durch eine Verbindungslinie. Das Experiment wurde fünfmal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

Eingesetzt wurde eine Konzentration von $10 \mu\text{M}$ Atropin für die in [^{35}S]GTP γ S-Bindungsexperimenten eine Rezeptorsättigung beschrieben worden war (Hilf und Jakobs, 1992). Abbildung 106 zeigt den Effekt von Atropin in zwei, voneinander unabhängigen Versuchen. Es war festzustellen, dass abhängig vom Versuchstag, die verwendeten Flp-CHO- M_2 -Zellen keine messbare konstitutive Aktivität oder ein geringes Ausmaß (DMR bis zu $\Delta -40 \text{ pm}$) an konstitutiver Aktivität, die durch Atropin aufgehoben werden konnte, besaßen. Eine Korrelation des Auftretens eines höheren Anteils an spontan aktiven Rezeptoren mit dem Zellalter (Zellpassage) konnte nicht beobachtet werden.

8.1.9 Pertussistoxin (PTX)

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss verschiedener Testsubstanzen auf die Aktivierung intrazellulärer Signalwege aufgeklärt werden. Im Fokus stand hierbei die Aktivierung verschiedener Gruppen von G-Proteinen. Durch den Einsatz von Pertussistoxin können $G_{i/o}$ und G_t selektiv und irreversibel inaktiviert werden. PTX katalysiert die ADP-Ribosylierung der α -Untereinheiten und hindert so G-Proteine an der Interaktion mit dem G-Protein-gekoppelten Rezeptor. Die $G\alpha$ -Untereinheiten verbleiben im GDP-bindenden, inaktiven Zustand. $G_t\alpha$ kann somit keinen inhibitorischen Einfluss auf die Adenylylzyklase ausüben (Kaslow, 1987). In den für die Versuche verwendeten CHO-Zellen waren endogen PTX-sensitive $G_{i/o}$ -Proteine vorhanden. Die Untergruppe G_t (Transducin) hat beim Sehprozess eine entscheidende Funktion. Bei den verwendeten Ovarialzellen war sie nicht von Relevanz.

Bei den Versuchen, die zu Anfang der Arbeiten mit PTX durchgeführt wurden, wurde eine Konzentration von 100 ng/ml PTX verwendet, basierend auf Literaturangaben zu Versuchen mit CHO-Zellen (Michael et al., 2007; Suzuki et al., 2007). Die Inkubation erfolgte analog der Publikationen für 20-24 Stunden. Diese Bedingungen führten zuverlässig zur Inaktivierung aller $G_{i/o}$ -Proteine. Abbildung 107 zeigt den Einfluss verschiedener Konzentrationen des Toxins auf die Agonist-induzierte Zellantwort.

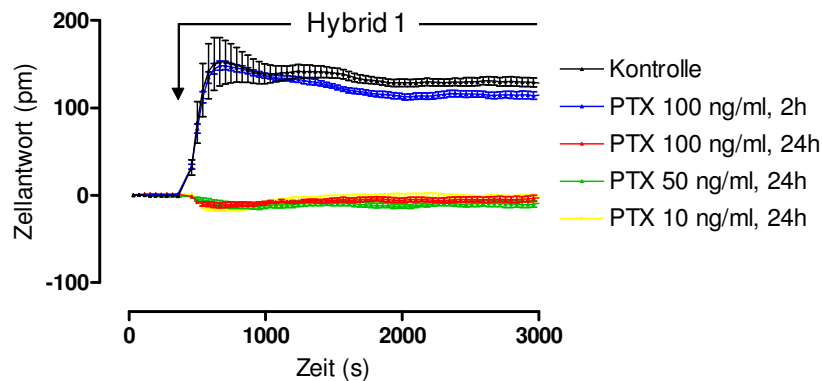


Abbildung 107: Einfluss verschiedener Konzentrationen von Pertussistoxin (PTX) auf die Hybrid 1 (1 μ M)-induzierte Zellantwort in Flp-CHO-M₂-Zellen. **Ordinate:** Zelluläre Antwort, entspricht der Wellenlängenverschiebung in Picometer (pm). **Abszisse:** Zeit in Sekunden (s). **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler einer Vierfachbestimmung eines repräsentativen Experiments, ergänzt durch eine Verbindungslinie, das einmal (Inkubationszeit 2 h) bzw. zweimal (restliche Bedingungen) mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde.

Um den Effekt von PTX zu untersuchen, erwies sich Hybrid 1 als ein geeigneter Agonist, da wie in 3.5.4.2 gezeigt, die induzierte Zellantwort nur über den $G_{i/o}$ Signaltransduktionsweg abläuft. Übernacht-Inkubation mit PTX eliminierte das aufwärts gerichtete Kontroll-DMR Signal von Hybrid 1 in den Flp-CHO-M₂-Zellen. Aber auch nach Inkubation mit niedrigeren Konzentrationen (50 und 10 ng/ml) war keine Zellantwort mehr messbar. Bei drastischer Verkürzung der Inkubationszeit auf zwei Stunden zeigte sich jedoch noch kein signifikanter Einfluss auf die Zellantwort. Bei allen in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen wurde PTX in der Konzentration 100 ng/ml verwendet. Wie Abbildung 107 verdeutlicht ist davon auszugehen, dass auch um bis zu Faktor 10 geringere Konzentrationen ausreichend sind, um $G_{i/o}$ vermittelte Effekte in den verwendeten Flp-CHO-Zellen auszuschalten.

8.1.10 Cholera toxin (CTX)

Des Weiteren wurde Cholera toxin eingesetzt, um intrazelluläre, G_s -Protein-vermittelte Signalwege zu untersuchen. Die Untereinheit A katalysiert ADP-Ribosylierung der

α -Untereinheit von stimulierenden G-Proteinen ($G_s\alpha$). Somit wird deren GTPase-Aktivität reduziert und die α -Untereinheit aktiviert. Die $G_s\alpha$ -Aktivierung führt zu einer Stimulation der Adenylylzyklase und somit zu hohen cAMP-Spiegeln. Außer G_s -Proteinen können auch Transducin und Tubulin ADP-ribosyliert werden (Gill und Meren, 1978). Da kein Toxin bekannt ist, das zu einer Inaktivierung von $G_s\alpha$ führt und somit analog zu PTX verwendet werden könnte, wurde CTX verwendet, um den G_s -Weg zu untersuchen. Dies war möglich, da eine Vorinkubation mit CTX eine vollständige Aktivierung des G_s -Weges bewirkt und so eine weitere, Rezeptor-vermittelte Steigerung nicht mehr möglich ist. Da kein bevorzugt über den G_s -Weg koppelnder Rezeptor bei den Untersuchungen dieser Arbeit verwendet wurde, diente die M_2 -Rezeptor vermittelte G_s -Aktivierung durch Acetylcholin, die nach Inhibition der G_i -Proteine durch PTX isoliert auftrat, als Kontroll-Signal (Abbildung 108).

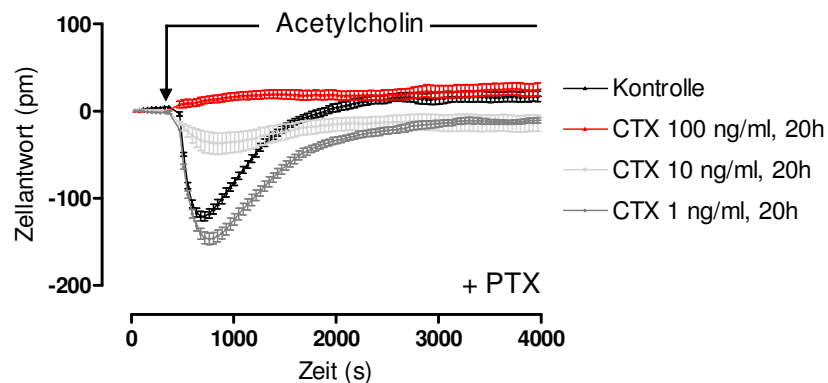


Abbildung 108: Einfluss verschiedener Konzentrationen von Cholera-toxin (CTX) auf die Acetylcholin ($100\ \mu\text{M}$)-induzierte Zellantwort in Flp-CHO- M_2 -Zellen, die zusätzlich 20 h mit PTX inkubiert wurden. **Ordinate:** Zelluläre Antwort, entspricht der Wellenlängenverschiebung in Picometer (pm). **Abszisse:** Zeit in Sekunden (s). **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler einer Vierfachbestimmung eines repräsentativen Experiments, ergänzt durch eine Verbindungslinie, das einmal (Inkubationszeit 2 h) bzw. zweimal (restliche Bedingungen) mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde.

Die Übernacht-Inkubation mit CTX eliminierte das abwärts gerichtete Kontroll-DMR Signal, das nach PTX-Behandlung der Flp-CHO- M_2 -Zellen durch Acetylcholin induziert wurde. Der beobachtete Effekt von Cholera-toxin trat konzentrationsabhängig auf. Bei einer Inkubationszeit von 20 h war eine Konzentration von 100 ng/ml CTX notwendig, um eine vollständige G_s -Aktivierung vor Zugabe der Testsubstanz zu erhalten. Weitere Untersuchungen mit CTX wurden nach Abschluss der experimentellen Arbeiten für diese Dissertationsschrift zusammen mit Nicole Janßen am adrenergen β_2 -Rezeptor, der bevorzugt an G_s -Proteine koppelt, durchgeführt. Hier zeigte sich ebenfalls, dass durch die Agonisten Isoprenalin und Orciprenalin nach CTX Vorinkubation (100 ng/ml, 20 h) keine Aktivierung

des β_2 -Rezeptors mehr detektierbar war und somit keine Kopplung über den G_s -Signaltransduktionsweg mehr nachweisbar war.

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob Cholera toxin einen Einfluss auf die Acetylcholin-induzierte M_2 -Aktivierung hat. Der in 8.1.4 gezeigte Effekt einer direkten Vorstimulation der Adenylylzyklase mit Forskolin führte zu einer Vergrößerung der messbaren Inhibition des Enzyms (über G_i). Mechanistisch ist der Einfluss von Cholera toxin ähnlich: durch das Toxin wird ebenfalls die Adenylylzyklase aktiviert, jedoch auf einem indirekten Weg über G_s -Proteine. Es sollte nun getestet werden, ob auch CTX zu einer Erweiterung des ‚Messfensters‘ der M_2 -vermittelten G_i -Kopplung, die durch Acetylcholin induziert wird, führt. Die Ergebnisse der CTX-Vorinkubation sind im Vergleich zum Einfluss der Forskolin-Vorstimulation in Abbildung 109 gezeigt.

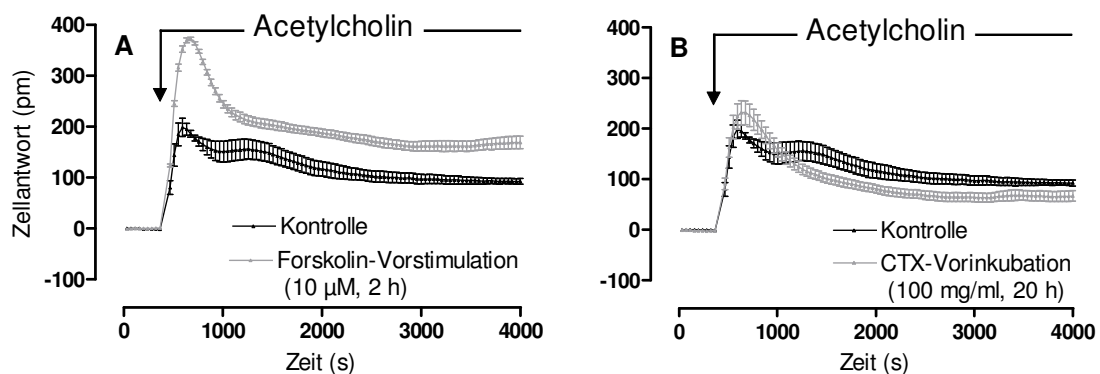


Abbildung 109: Einfluss der Vorstimulation der Adenylylzyklase durch **A:** Forskolin (10 μ M, 2 h) und **B:** Cholera toxin (100 mg/ml, 20 h) auf die Acetylcholin (100 μ M)-induzierte Zellantwort in Flp-CHO- M_2 -Zellen. **Ordinate:** Zelluläre Antwort, entspricht der Wellenlängenverschiebung in Picometer (pm). **Abszisse:** Zeit in Sekunden (s). **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler einer Vierfachbestimmung eines repräsentativen Experiments, ergänzt durch eine Verbindungslinie, das viermal (Forskolin) bzw. einmal (CTX) mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde.

Abbildungsteil A zeigt, wie bereits zuvor untersucht (siehe Abbildung 101), die massive Steigerung der G_i -Signatur nach Forskolin-Vorstimulation. CTX-Vorinkubation (B) erhöht die Antwort auf Acetylcholin im Vergleich zur Kontrolle nur in einem sehr geringen Ausmaß. Die direkte Stimulation der Adenylylzyklase führt im Gegensatz zur indirekten Stimulation zu einer stärkeren G_i -Antwort. Als Ursache kann ein unterschiedlicher Mechanismus in Erwägung gezogen werden. Evtl. wird durch die Bindung der $G_s\alpha$ -Untereinheiten eine verstärkte Bindung der $G_i\alpha$ -Untereinheiten verhindert, nicht aber durch die direkte Bindung von Forskolin an das Enzym, die an einer räumlich verschiedenen Stelle abläuft (Simonds, 1999). Außerdem ist zu beachten, dass die 20-stündige Cholera toxin Behandlung zu einer

Desensibilisierung der Rezeptoren führen könnte. Die verwendeten Zellen werden ferner durch die Cholera-toxin-Behandlung in ihrem Wachstums- und Vermehrungsprozess beeinträchtigt, sodass die verminderte Signaturstärke auch auf einer gestörten Zell-Zell-Interaktion basieren könnte.

8.2 Signalwegsaktivierung durch muskarinische Liganden an M_4 -Rezeptoren

Der Subtyp M_4 der muskarinischen Acetylcholinrezeptoren zeigt wie M_2 eine Kopplungspräferenz an Pertussistoxin-sensitive G_i -Proteine. Die von Nicole Janßen in unserem Arbeitskreis mit Hilfe des Flp-Systems (K3) hergestellte, stabil-exprimierende M_4 -Expressionszelllinie sollte auf funktionelle Rezeptorexpression im Epic[®] System untersucht werden. In Abbildung 111 sind die Ergebnisse eines repräsentativen Versuchs gezeigt, bei dem die Orthostere Acetylcholin und Iperoxo sowie der orthosterisch-allosterische Hybridligand Hybrid 1 unter Kontrollbedingungen und nach Inaktivierung der G_i -Proteine mit PTX getestet wurden. Weiterführende Untersuchungen zur Signalwegsaktivierung am M_4 -Rezeptor werden im Rahmen der Dissertation von Frau Janßen durchgeführt.

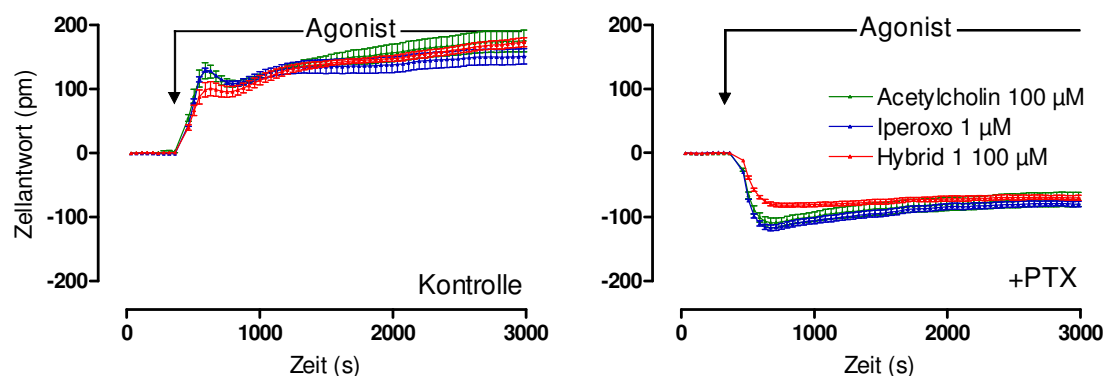


Abbildung 110: Effekt von Acetylcholin (100 μ M), Iperoxo (1 μ M) und Hybrid 1 (100 μ M) auf Flp-CHO- M_4 -Zellen, **A:** unter Kontrollbedingungen bzw. **B:** nach 20-stündiger Vorinkubation mit PTX (100 ng/ml). **Ordinate:** Zelluläre Antwort, entspricht der Wellenlängenverschiebung in Picometer (pm). **Abszisse:** Zeit in Sekunden (s). **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler einer Vierfachbestimmung eines repräsentativen Experiments, ergänzt durch eine Verbindungslinie, das zweimal mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde.

8.3 Normierte Darstellung der Adenylylzyklaseaktivität

Die Abbildungen zu Epic[®]-Versuchen zur Messung der zellulären dynamischen Massenumverteilung dieser Arbeit und auch in verschiedenen Publikationen unseres

Arbeitskreises (Jäger et al., 2009; Kebig et al., 2009) sind Darstellungen von beispielhaften Einzelversuchen, die repräsentativ für mehrere Versuchstage stehen. Durch die hochsensiblen Biosensor-Messungen ist die Ausprägung der Zellantwort quantitativ und zu einem gewissen Ausmaß auch qualitativ versuchstagabhängigen Schwankungen unterlegen. Auch wenn im Rahmen der ersten Arbeiten charakteristische Signaturen für die Kopplungen über verschiedene G-Proteine identifiziert werden konnten, ist bislang die detaillierte Entstehung der Signaturen ungeklärt. Die für die Signalgebung determinierenden Prozesse sind unklar. Eine Normierung und Mittelung der einzelnen Versuchstage ist somit schwierig.

Die folgende Abbildung stellt den Versuch einer Normierung der Muskarinrezeptor-vermittelten Signale über G_i - und G_s -Proteine dar. Bezugsgröße ist die Aktivität der Adenylylzyklase. Die maximale Stimulation des Enzyms durch Forskolin entspricht bei der Darstellung in Abbildung 111 0 %. Die maximale Inhibition der Adenylylzyklase (entspricht 100 %) wurde über M_2 -Rezeptor-Stimulation durch den Vollagonisten Acetylcholin in einer Rezeptor-sättigenden Konzentration und die sukzessive Kopplung an inhibitorische G-Proteine erreicht. Die initiale Messung, die in der Originalaufnahme auf Null festgesetzt wurde, gibt in dieser Darstellung den prozentualen Anteil an konstitutiv vorhandener Adenylylzyklase-Aktivität an. Abbildung 111 stellt vergleichend die Subtypen M_2 und M_4 gegenüber.

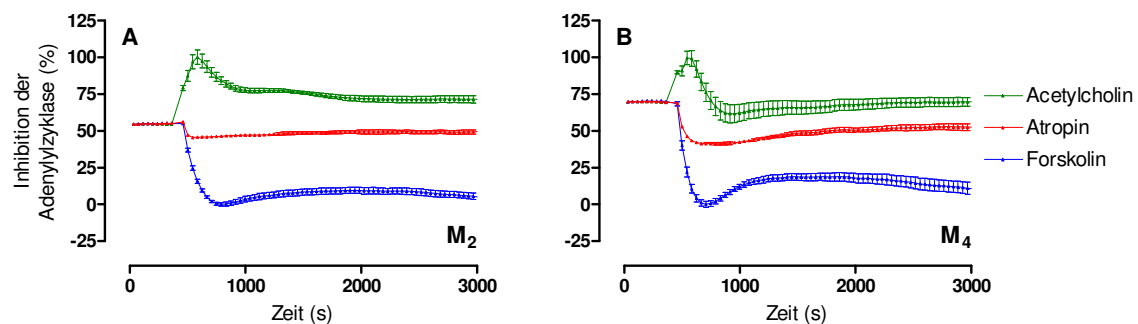


Abbildung 111: Effekt von Acetylcholin (100 μ M), Atropin (1 μ M) und Forskolin (10 μ M) auf **A:** Flp-CHO- M_2 -Zellen und **B:** Flp-CHO- M_4 -Zellen. **Ordinate:** Normierte Zellantwort, 0 % entspricht der maximalen Stimulation der Adenylylzyklase („Peak“ des Forskolin-Effekts); 100 % entspricht der maximalen G_i -vermittelten Inhibition der Adenylylzyklase („Peak“ des G_i -Signals von Acetylcholin). **Abszisse:** Zeit in Sekunden (s). **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler einer Vierfachbestimmung eines repräsentativen Experiments, ergänzt durch eine Verbindungslinie, das zweimal (M_2) bzw. einmal (M_4) mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde.

Die oben beschriebene Normierung lässt vermuten, dass am M_2 -Rezeptor das basale Niveau der Adenylylzyklase-Aktivität ca. 50 % der möglichen Aktivität entspricht. Atropin als inverser Agonist am M_2 -Rezeptor hatte einen sehr geringen, enthemmenden Effekt auf das

Enzym, was für ein sehr geringes Ausmaß an konstitutiver G_i -Kopplung unter den vorliegenden Versuchsbedingungen spricht. Die CHO-M₄-Zellen hatten im vorliegenden Versuch ein Ausgangsniveau von nur ca. 30 % der messbaren Adenylylzyklase-Aktivität. Das Ausmaß der maximalen Stimulation durch Forskolin war relativ dazu verstärkt. Diese Befunde sprechen für ein stärkeres Ausmaß an konstitutiver Aktivität am M₄-Rezeptor als am M₂-Rezeptor. Tatsächlich zeigte der inverse Agonist Atropin eine relativ starke, invers-intrinsische Aktivität, d.h. eine Dämpfung des G_i -Weges und eine Enthemmung des Enzyms. Nicole Janßen (persönliche Kommunikation) fand jedoch in weiteren Versuchen abweichende Befunde, die ein gleiches Bild für beide Subtypen zeigten. Die Ursache und Bedeutung des zeitweisen Auftretens spontaner Aktivität muss in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden. Ausgeschlossen wurde ein Einfluss der verwendeten Passage an Zellen.

8.4 Signalwegsaktivierung durch Acetylcholin an M₅-Rezeptoren

Als Beispiel für einen Rezeptor, der über Proteine der Klasse G_q koppelt, sollte exemplarisch der muskarinische Subtyp M₅ untersucht werden. Als Agonist wurde der endogene Ligand Acetylcholin verwendet. Die DMR-Signatur ist in Abbildung 112 dargestellt.

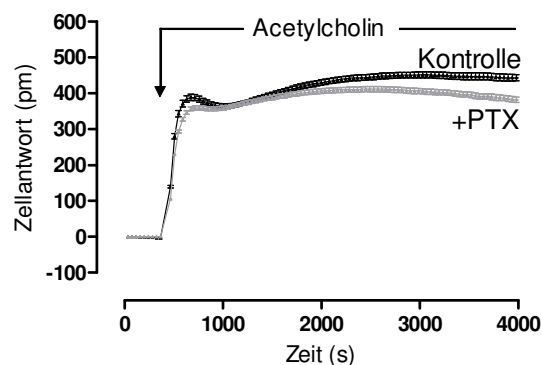


Abbildung 112: Effekt von Acetylcholin (100 μ M) auf CHO-M₅-Zellen, unter Kontrollbedingungen (schwarz) bzw. nach 20-stündiger Vorinkubation mit PTX (100 ng/ml) (grau). **Ordinate:** Zelluläre Antwort, entspricht der Wellenlängenverschiebung in Picometer (pm). **Abszisse:** Zeit in Sekunden (s). **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler einer Sechsfachbestimmung eines repräsentativen Experiments, ergänzt durch eine Verbindungslinie, das zweimal mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde.

Die Kontroll-Zellantwort zeigte einen initialen, steilen Anstieg, der sofort nach Agonist-Zugabe auftrat. Im Gegensatz zur G_i -Signatur kam es nicht zu einem abfallenden Verlauf. Es ist bekannt, dass G_q -Proteine PTX-insensitiv sind; als Folge PTX-Behandlung wird die Signatur nicht markant verändert. Der Verlauf beider Signaturen (Kontrolle: schwarz; + PTX:

grau) unterschied sich nur marginal. Auch wenn bei mikroskopischer Betrachtung der Zelllayer kein Unterschied auffiel, kann die Zellgestalt durch die Toxin-Behandlung verändert sein, was einen Einfluss auf die hoch empfindlichen Messungen im optischen Biosensor haben könnte.

9 Veröffentlichungen

9.1 Wissenschaftliche Originalarbeiten

Kebig A., Kostenis E., Mohr K., Mohr-Andrä M. (2009) An optical dynamic mass redistribution assay reveals biased signaling of dualsteric GPCR activators. *Journal of Receptors and Signal Transduction* 29 (3-4): 140-145.

Antony J., Kellershohn K., Mohr-Andrä M., Kebig A., Prilla S., Muth M., Heller E., Disingrini T., Dallanoce C., Bertoni S., Schrobang J., Tränkle C., Kostenis E., Christopoulos A., Höltje H.D., Barocelli E., De Amici M., Holzgrave U., Mohr K. (2009) Dualsteric GPCR targeting: a novel route to binding and signaling pathway selectivity. *The FASEB Journal* 23 (2): 442-450.

Jäger D., Schmalenbach C., Prilla S., Schrobang J., Kebig A., Sennwitz M., Heller E., Tränkle C., Holzgrave U., Höltje H.D., Mohr K. (2007) Allosteric small molecules unveil a role of an extracellular E2/transmembrane helix 7 junction for G protein-coupled receptor activation. *The Journal of Biological Chemistry* 282 (48): 34968-34976.

9.2 Übersichtsarbeiten

Kebig A., Mohr K. (2008) Cinacalcet - ein allosterischer Verstärker am Ca^{2+} -Rezeptor. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 133: 1681-1683.

Fieth C., Kebig A., Mohr K. (2007) Bevacizumab gegen Dickdarmkarzinom, Angiogenese-Hemmung in der Krebstherapie. *Pharmazie in unserer Zeit* 36 (6): 442-445.

9.3 Abstrakta/Kongressmitteilungen

Kebig A., Michalski H., De Amici M., Mohr K. (2009) New dualsteric agonists prove allosteric modulation of muscarinic receptor signaling. *Internationales Symposium des Graduiertenkollegs 677 2009*, Bonn

Janßen N., Kebig A., Mohr K. (2009) Using a new, label-free whole cell assay to get insight into promiscuous signaling of the M₄-muscarinic acetylcholine receptor. *Programm/Abstraktband der DPHG-Jahrestagung 2009*, Jena

Kebig A., Holzgrabe U., De Amici M., Kostenis E., Mohr K., Mohr-Andrä M. (2009) Cellular dynamic mass redistribution reveals biased signaling of a novel class of GPCR activators. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 379* (Supplement 1): 21

Janßen N., Kebig A., Mohr-Andrä M., Mohr K. (2009) Role of the muscarinic allosteric site for receptor activation: The conserved epitope Trp 7.35 is critical for the potency of acetylcholine at the hM₄ subtype. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 379* (Supplement 1): 38

Seemann W., Kebig A., Mohr-Andrä M., Mohr K., Meyer R. (2009) Effect of a new type of muscarinic acetylcholine receptor activator on sarcomere shortening in isolated murine cardiac myocytes. *Acta Physiologica P165*

Kebig A., Kostenis E., Mohr K., Mohr-Andrä M. (2008) Dynamic mass redistribution reflects G protein-coupled receptor signal trafficking. *Programm/Abstraktband der DPHG-Jahrestagung 2008*, Bonn

Kebig A., Mohr-Andrä M., Mohr K. (2008) Critical role of an extracellular E2/transmembrane helix 7 junction for the constitutive activity of a G protein-coupled receptor. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 377* (Supplement 1): 26

Kebig A., Mohr-Andrä M., Mohr K. (2007) Essential role of the amino acid hM₂⁴²²Trp for partial agonist-induced muscarinic receptor activation. *Programm/Abstraktband der DPHG-Jahrestagung 2007*, Erlangen

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klaus Mohr für die ausgezeichnete Betreuung der vorliegenden Arbeit. Seine ständige Bereitschaft zu richtungsweisenden Diskussionen, die konstruktiven Ratschläge sowie die vertrauensvolle Zusammenarbeit haben entscheidend zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen.

Herzlich danke ich auch Frau Prof. Dr. Evi Kostenis für die aktive Zweitbetreuung im Rahmen des Graduiertenkollegs 677 und die Mitwirkung in der Prüfungskommission. Die intensive Unterstützung sowie ihr sachkundiger Rat haben mich sehr beeindruckt.

Herrn Prof. Dr. Heinz Bönisch danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Herrn Prof. Dr. Hanns Häberlein möchte ich für seine Mitwirkung in der Prüfungskommission herzlich danken.

Mein Dank gilt außerdem Frau Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe und Herrn Prof. Dr. Marco De Amici sowie deren Mitarbeitern für die Synthese und freundliche Bereitstellung der meisten von mir untersuchten Verbindungen.

Herrn Harm Michalski, dessen Diplomarbeit im Fach Molekulare Biomedizin von mir mitbetreut wurde, danke ich für die erfolgreiche Erhebung der ersten Befunde der dualsterischen, zwischenkettenverlängerten Hybride.

Außerdem danke ich den Forschungsstudenten Herrn Viktor Rempel, Herrn Christian Lenz, Frau Anna Tzvetkova und Frau Kerstin Piwek, die im Rahmen des Graduiertenkollegs von mir betreut wurden, für die Durchführung von [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimenten, deren Ergebnisse in diese Arbeit mit einbezogen wurden.

Allen Kollegen der Abteilung Pharmakologie und Toxikologie, besonders Frau Dr. Marion Mohr-Andrä, danke ich für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre.