

Kontext-abhängige Signalwegsaktivierung des muskarinischen M₂-Rezeptors

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Wiebke Kirsten Seemann

aus

Oldenburg

Bonn 2012

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

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

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Christian Steinhäuser

Tag der Promotion: 18.04.2013

Erscheinungsjahr: 2013

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2008 bis einschließlich Oktober 2012 in der Abteilung Pharmakologie & Toxikologie des Pharmazeutischen Institutes der Universität Bonn unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. K. Mohr angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Muskarinische Acetylcholinrezeptoren	1
1.2	Rezeptoraktivierung.....	3
1.3	Rezeptorzustände und Rezeptorreserve	6
1.4	Allosterische Liganden	9
1.5	Dualsterische Liganden	11
1.6	Promiskuitive G-Proteinaktivierung.....	13
1.7	Fragestellung.....	16
2	Materialien.....	17
2.1	Substanzen	17
2.1.1.	Radioliganden.....	17
2.1.2.	Muskarinische Agonisten	17
2.1.3.	Dualsterische muskarinische Agonisten	18
2.1.4.	Muskarinische Antagonisten	19
2.1.5.	Muskarinische Allosterie	19
2.1.6.	Adrenerge Agonisten	20
2.1.7.	Adrenerge Antagonisten	20
2.2	Reagenzien und Chemikalien.....	21
2.2.1.	Säuren, Laugen, Salze, Puffer	21
2.2.2.	Lösungsmittel.....	22
2.2.3.	Oberflächen- und Filterbeschichtungen	22
2.2.4.	Zucker	22
2.2.5.	Medien und Mediumzusätze	22
2.2.6.	Proteine, Enzyme, Enzyminhibitoren und -aktivatoren.....	23
2.2.7.	G-Protein-Hemmer.....	24
2.3	Lösungen und Puffer	25

2.4	Verbrauchsmaterialien.....	27
2.5	Geräte	29
2.6	Computerprogramme	30
2.7	Herstellerverzeichnis	31
3	Methoden	33
3.1.	Zellkultur.....	33
3.1.1.	Zellbiologisches Arbeiten	33
3.1.2.	Kryokonservierung und Reaktivierung	35
3.2.	Mausstämme (WT).....	36
3.2.1.	CD1.....	36
3.2.2.	C57BL/6.....	36
3.3.	Herstellung von Rezeptorhomogenaten	37
3.3.1.	Homogenate aus kardialem Gewebe.....	37
3.3.2.	Homogenate aus Zellen.....	39
3.4.	Isolierung von Kardiomyozyten	40
3.4.1.	Isolierung von embryonalen atrialen Kardiomyozyten.....	40
3.4.2.	Isolierung von adulten ventrikulären Kardiomyozyten.....	42
3.5.	Proteinbestimmung.....	45
3.6.	Radioligand-Bindungsstudien.....	46
3.6.1.	Inhibitionsexperimente im Gleichgewicht	48
3.6.1.1.	Homologe Konkurrenz	49
3.6.1.2.	Heterologe Konkurrenz	50
3.6.2.	Kinetische Experimente	51
3.6.3.	Durchführung der Radioligandbindungsexperimente	53
3.6.3.1.	Gleichgewichtsbindungsexperimente	54
3.6.3.2.	Kinetische Experimente	55
3.6.4.	Filtration mit dem Brandel Harvester.....	57
3.6.5.	Bestimmung der Radioaktivität (Flüssigszintillation)	57

3.7.	Dynamische Massenumverteilung (DMR)	58
3.7.1.	Versuchsdurchführung.....	59
3.7.2.	Auswertung.....	60
3.8.	Bestimmung von intrazellulärem cAMP	62
3.8.1.	Versuchsdurchführung.....	62
3.8.1.1.	Versuche mit adhärenen Zellen.....	62
3.8.1.2.	Versuche mit Suspensionszellen.....	63
3.8.2.	Auswertung.....	64
3.9.	Frequenzuntersuchungen an embryonalen atrialen Kardiomyozyten.....	65
3.9.1.	Versuchsdurchführung.....	65
3.9.2.	Auswertung.....	67
3.10.	Bestimmung der Sarkomerverkürzung an adulten ventrikulären Kardiomyozyten	69
3.10.1.	Versuchsdurchführung.....	69
3.10.2.	Auswertung.....	72
3.11.	Berechnung des Kopplungsparameters (τ)	73
3.12.	Statistik.....	75
3.12.1.	Deskriptive Statistik	75
3.12.2.	Statistische Prüfverfahren.....	76
3.12.2.1.	Der F-Test	77
3.12.2.2.	Der t-Test	78
3.12.2.3.	Die Varianzanalyse (ANOVA).....	79
4	Ergebnisse	80
4.1.	Das rekombinante Expressionssystem CHO-hM ₂	80
4.1.1.	Oxotremorin M aktiviert den M ₂ -Rezeptor in CHO-Zellen im selben Ausmaß wie Acetylcholin.....	81
4.1.1.1.	DMR-Messungen unter Kontrollbedingungen.....	81
4.1.1.2.	DMR-Messungen nach Ausschaltung von G _{i/o}	83

4.1.1.3.	DMR-Messungen nach Ausschaltung von $G_{q/11}$	86
4.1.1.4.	DMR-Messungen nach Maskierung von G_s	89
4.1.2.	Dualsterische Liganden besitzen Signalwegsselektivität	91
4.1.2.1	DMR-Messungen mit CHO-hM ₂ -Zellen nach Ausschaltung inhibitorischer G-Proteine.....	91
4.1.2.2	cAMP-Messungen mit adhärenen CHO-hM ₂ -Zellen nach Ausschaltung inhibitorischer G-Proteine.....	92
4.1.3.	cAMP-Erhöhung legt den Partialagonismus offen.....	94
4.1.4.	Forskolin induziert Rezeptorinternalisierung.....	98
4.1.4.1.	Bindungsverhalten des Radioliganden [³ H]NMS.....	98
4.1.4.2.	Bindungsverhalten muskarinischer Agonisten	100
4.2.	Untersuchungen an der nativen Zelllinie MRC-5	102
4.2.1.	Die Agonist-induzierten DMR-Signaturen in MRC-5 sind rezeptorvermittelt.....	102
4.2.2.	Der muskarinische M ₂ -Rezeptor wird dominant exprimiert.	105
4.2.1.1	Bestimmung des Rezeptorsubtyps über die Kinetik der [³ H]NMS-Dissoziation.....	105
4.2.1.2	Bestimmung des Rezeptorsubtyps über die allosterische Bindungsstelle	107
4.2.3.	Der M ₂ -Rezeptor - ein selektiv G _{i/o} -gekoppelter Rezeptor?.....	110
4.2.4.	MRC-5-Zellen besitzt einen hohen intrazellulären cAMP-Gehalt	117
4.2.5.	Dualsterische Liganden sind Partialagonisten	118
4.2.6.	Bindungsaffinitäten sind unabhängig vom Expressions-system.....	120
4.3.	Untersuchungen an primären murinen Kardiomyozyten.....	124
4.3.1.	Bindungseigenschaften des M ₂ -Rezeptors sind unabhängig von der Spezies.....	124
4.3.1.1.	Charakterisierung der orthosterischen Bindungsstelle.....	125
4.3.1.1.1.	Inhibition mit N-Methylscopolamin.....	125
4.3.1.1.2.	Inhibition mit Oxotremorin M.....	127

4.3.1.2.	Charakterisierung der allosterischen Bindungsstelle	129
4.3.2.	Muskarinische Agonisten wirken negativ chronotrop	130
4.3.3.	Der negativ chronotrope Effekt ist M ₂ -vermittelt	134
4.3.4.	Der kardiale M ₂ -Rezeptor ist G _{i/o} -gekoppelt.	135
4.3.4.1.	Beeinflussung der Frequenz	136
4.3.4.2.	Untersuchung des intrazellulären cAMP-Anstiegs	137
4.3.5.	Sympathikusaktivierung reduziert die intrinsische Wirksamkeit von Iper-6-phth in Kardiomyozyten	139
4.3.5.1.	Reduzierter negativ chronotroper Effekt	139
4.3.5.2.	Reduzierter negativ inotroper Effekt	142
5	Diskussion	144
5.1.	Der muskarinische M ₂ -Rezeptor wird in allen Zellsystemen dominant exprimiert	144
5.2.	Die promiskuitive G-Proteinaktivierung des M ₂ -Rezeptors beschränkt sich auf das artifizielle Zellsystem	147
5.3.	Das Ausmaß der Kopplungseffizienz bestimmt die promiskuitive G-Proteinaktivierung in CHO-hM ₂	155
5.4.	Der zelluläre Kontext beeinflusst die intrinsische Aktivität (E _{max}) und die Wirksamkeit (EC ₅₀) muskarinischer Agonisten.....	158
5.5.	Primäre hoch-cAMP-Systeme sind weniger empfindlich gegenüber dualsterischen Agonisten – Befunde aus <i>in vitro</i> - und <i>in vivo</i> -Experimenten	162
6	Zusammenfassung	165
7	Literaturverzeichnis	167
8	Abkürzungsverzeichnis.....	178
9	Anhang	180
9.1	DMR-Messungen mit dem optischen Biosensor Epic [®]	180
9.1.1.	Beeinflussung des DMR-Signals durch Beschichtung der Messplatten mit Fibronectin	180
9.1.2.	Zellzahlbestimmung von MRC-5 für DMR-Messungen	182

9.1.3.	Beeinflussung des Acetylcholin-induzierten DMR-Signals.....	183
9.1.4.	Vergleich unterschiedlicher Auswertungsmethoden zur Erhebung von Konzentration-Effekt-Kurven in MRC-5.....	184
9.1.4.1.	Untersuchung des $G_{i/o}$ -induzierten DMR-Signals.....	184
9.1.4.2.	Untersuchung des G_s -induzierten DMR-Signals.....	186
9.1.5.	Kopplungseffizienzen (τ) muskarinischer Agonisten	188
9.1.6.	Beeinflussung des Agonist-induzierten DMR-Signals in MRC-5 nach Vorbehandlung mit MH 362-63-08	189
9.2	Stabilitätsuntersuchungen von kardialen Membranhomogenaten	190
9.3	Funktionelle Untersuchungen mit Kardio-myozyten aus ES-Zellen	193
9.3.1.	Generierung von Kardiomyozyten aus ES-Zellen	194
9.3.2.	Untersuchung der Agonist-induzierten zellulären dynamischen Massenverschiebung (DMR)	195
9.3.3.	Untersuchung des negativ chronotropen Effektes von Acetylcholin....	196
10	Veröffentlichungen.....	200
10.1	Publikationen.....	200
10.2	Abstrakta / Kongressbeiträge	200
11	Danksagung.....	202
12	Lebenslauf	204

1 Einleitung

1.1 Muskarinische Acetylcholinrezeptoren

Die muskarinischen Acetylcholinrezeptoren (mAChR) zählen zu den 7-Transmembranrezeptoren (7TMR), welche ihre Signale nach Bindung des endogenen Agonisten Acetylcholin hauptsächlich über die Aktivierung von Guanylnukleotid-bindenden Proteinen (G-Proteinen) vermitteln. Aufgrund ihrer Eigenschaft an G-Proteine zu koppeln, werden 7TMR auch als GPCRs (*G protein-coupled receptors*) bezeichnet. Sie bestehen aus einem unverzweigten Proteinstrang mit sieben transmembranären Helixstrukturen, welche durch drei intra- und drei extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind. Der Aminoterminus befindet sich extra- und der Carboxyterminus intrazellulär (Boeckart und Pin, 1999). Phylogenetisch zählen die mAChR zur Gruppe der Rhodopsin-Familie, welche auch als Familie der Klasse A bezeichnet wird und die größte Gruppe innerhalb der GPCRs repräsentiert (Fredriksson et al., 2003). Die Bindungstasche des endogenen Liganden befindet sich bei dieser Rezeptorgruppe im Zentrum der sieben transmembranären Domänen und wird als orthosterische Bindungsstelle bezeichnet (ortho-, griechisch: richtig). Mittlerweile sind fünf verschiedene muskarinische Rezeptorsubtypen nachgewiesen (M_1 - M_5), welche sich basierend auf ihrer präferentiellen G-Proteinkopplung in zwei Gruppen unterteilen lassen ($G_{i/o}$ und $G_{q/11}$). Während M_2 - und M_4 -Rezeptoren vorzugsweise an inhibitorische G-Proteine koppeln, zählen M_1 , M_3 und M_5 zu den $G_{q/11}$ -gekoppelten Rezeptoren (Abb. 1.1).

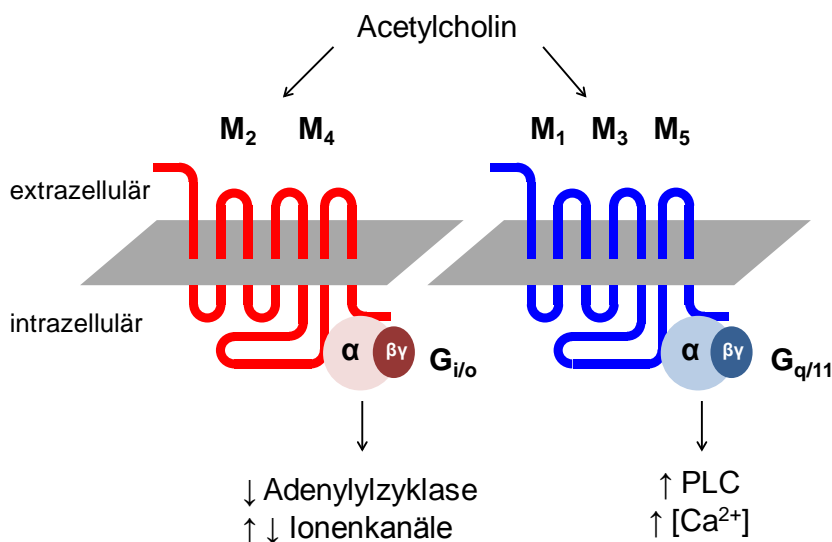


Abb. 1.1 Einteilung der mAChR anhand ihrer G-Proteinkopplung.

Unterteilung mAChR in $G_{i/o}$ -gekoppelte bzw. $G_{q/11}$ -gekoppelte Rezeptoren. Die G-Protein-abhängigen Signale werden sowohl über die α - als auch über die $\beta\gamma$ -Untereinheit der heterotrimeren G-Proteine vermittelt. Modifiziert nach Wess et al., 2007.

Die mAChR sind im Organismus weit verbreitet und werden sowohl im zentralen Nervensystem als auch in der Körperperipherie exprimiert (Caulfield, 1993). Periphere mAChR befinden sich vornehmlich auf den parasympathisch innervierten Endorganen wie Herz, glatte Muskulatur und Drüsen. Zwar lässt sich die Gewebeverteilung der verschiedenen Subtypen über die Quantifizierung der mRNA oder mittels immunologischer Verfahren bestimmen (Caulfield, 1993), jedoch ist die Charakterisierung der entsprechenden physiologischen Funktionen sehr komplex. Meist werden in Organen und Geweben mehrere Rezeptorsubtypen nebeneinander exprimiert und Agonisten mit ausgeprägter Subtypselektivität fehlen (Caulfield und Birdsall, 1998). Die Generierung gentechnisch veränderter Mausstämmen, welche einzelne Rezeptorsubtypen nicht exprimieren (KO-Mäuse = *Knockout-Mäuse*), ermöglichte schließlich die genauere Untersuchung ihrer physiologischen Funktionen (Wess, 2004; Abb. 1.2).

$G_{i/o}$ -gekoppelte Rezeptoren

M₂ (Herz, glatte Muskulatur, ZNS – Hippocampus)
Regulierung der Herzfrequenz, Förderung der Kontraktion glatter Muskulatur, Beeinflussung kognitiver Funktionen, Antinozizeption, Kontrolle der Körpertemperatur, inhibitorische Auto- und Heterorezeptoren

M₄ (ZNS – Striatum)
Antinozizeption, inhibitorische Auto- und Heterorezeptoren, motorische Aktivität, Verhalten

$G_{q/11}$ -gekoppelte Rezeptoren

M₁ (ZNS – Zerebraler Kortex, Hippocampus, Striatum)
Motorische Aktivität, Beeinflussung kognitiver Funktionen

M₃ (Drüsen, glatte Muskulatur, ZNS – Hypothalamus)
Kontraktion glatter Muskulatur, Salivation (in Kombination mit M₁, M₄ und M₅), Nahrungsaufnahme, Insulinsekretion

M₅ (ZNS – Mesencephalon, Hypothalamus, Hippocampus)
Endothelvermittelte Dilatation zerebraler Arterien und Arteriolen

Abb. 1.2 Physiologische Funktionen muskarinischer Acetylcholinrezeptoren (Wess, 2004)

Aufgrund ihrer hohen Beteiligung in physiologischen und pathophysiologischen Prozessen ist die Entwicklung von Liganden, welche einzelne muskarinische Rezeptorsubtypen selektiv aktivieren/hemmen, von großer Relevanz für die klinische Therapie. Ihre Entwicklung wird jedoch durch die Gegebenheit erschwert, dass die orthosterische Bindungsstelle innerhalb der fünf Rezeptorsubtypen hoch konserviert ist (Hulme et al., 1990).

Neben der orthosterischen Bindungsstelle im Zentrum der sieben transmembranären Domänen existieren noch weitere, sogenannte allosterische Haftareale (allo-, griechisch: anders). Allosterische Haftareale bezeichnen alle Bindungsstellen außer der orthosterischen Bindungsstelle. Folglich wird auch die intrazellulär gelegene Bindungsstelle für das G-Protein als allosterische Bindungsstelle bezeichnet. Der Begriff der '*common allosteric site*' muskarinischer Rezeptoren bezeichnet dagegen eine Region, welche sich im Bereich der extrazellulären Schleifen befindet (Tränkle et al., 2003). Dieses allosterische Haftareal besitzt eine größere Variabilität innerhalb der fünf Rezeptorsubtypen als die orthosterische Bindungsstelle und birgt somit das Potenzial für die Entwicklung subtypeselektiver Liganden (Wess, 2005). Dieses Bestreben kann aufgrund der erfolgreichen Kristallisation muskarinischer Acetylcholinrezeptoren (M_2 : Haga et al., 2012; M_3 : Kruse et al., 2012) in Kombination mit bekannten Struktur-Wirkungs-Beziehungen (Leach et al., 2012) mittlerweile gezielter verfolgt werden.

1.2 Rezeptoraktivierung

GPCRs induzieren nach Agonistbindung die Aktivierung verschiedener Signalwege, welche vornehmlich über G-Proteine vermittelt werden, jedoch auch G-Protein-unabhängig sein können. Heterotrimere G-Proteine lassen sich hinsichtlich der Sequenzhomologie ihrer α -Untereinheit in vier verschiedene Familien einteilen: $G_{i/o}$, G_s , $G_{q/11}$ und $G_{12/13}$ (Milligan und Kostenis, 2006). Nach Rezeptoraktivierung kommt es an der α -Untereinheit zu einem Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) gegen Guanosintriphosphat (GTP), woraufhin sich α - und $\beta\gamma$ -Untereinheit voneinander trennen und unabhängig voneinander Signalwege aktivieren (siehe Abb. 1.3). Die α -Untereinheit besitzt eine intrinsische GTPase-Aktivität, woraufhin GTP in GDP umgewandelt wird, was die Reassoziierung mit der $\beta\gamma$ -Untereinheit ermöglicht und den G-Proteinzyklus beendet. Die Hydrolyse von GTP zu GDP wird dabei durch die RGS-Proteine (*regulators of G protein signaling*) katalysiert (Zhong und Neubig, 2001; Reiter und Lefkowitz, 2006).

Über die α -Untereinheit stimulatorischer G-Proteine (G_s) kommt es zur Aktivierung der Adenylylzyklase, welche die Bildung von cAMP aus ATP katalysiert. Der Anstieg des sekundären Botenstoffs cAMP moduliert wiederum die Aktivität der Proteinkinase

A (PKA), welche über Phosphorylierung zellulärer Proteine weitere Signalwege steuert. Um das Signal zu terminieren, wandeln Phosphodiesterasen (PDEs) cAMP rasch in Adenosinmonophosphat (AMP) um. Die inhibitorischen G-Proteine ($G_{i/o}$) stellen den Gegenspieler der G_s -Proteine dar. Sie induzieren nach Aktivierung über die α -Untereinheit eine Hemmung der Adenylzyklase, woraufhin der cAMP-Spiegel sinkt und die Aktivität der PKA inhibiert wird. $G_{q/11}$ -Proteine aktivieren die Phospholipase C (PLC), welche die sekundären Botenstoffe Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) bildet. IP_3 bewirkt die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern, welches unter anderem zusammen mit DAG die Proteinkinase C (PKC) aktiviert. Die PKC arbeitet prinzipiell wie die PKA, obwohl sich die meisten Zielproteine beider Kinasen voneinander unterscheiden. (Alberts et al., 2005; Klinke et al., 2009)

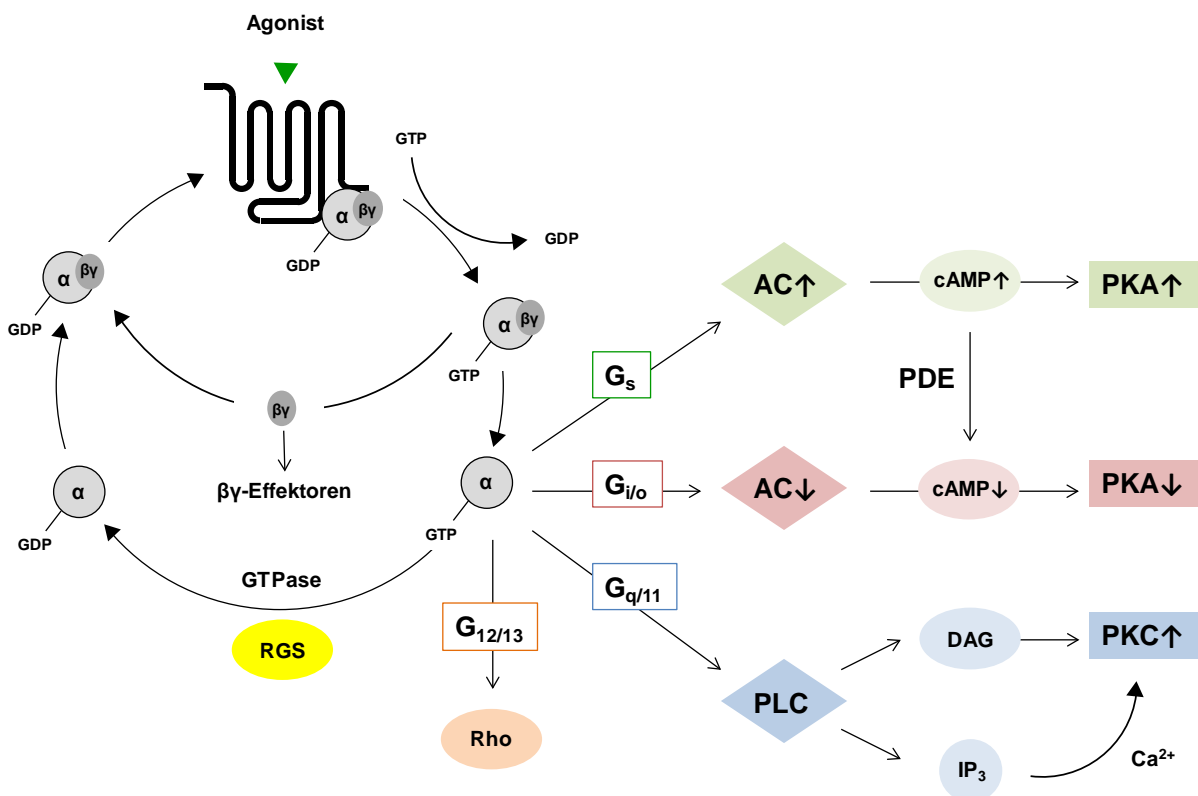


Abb. 1.3 Schematische Darstellung der Aktivierung von GPCRs. Modifiziert nach Miligan and Kostenis (2006); Erläuterungen siehe Text.

Über $G_{12/13}$ -Proteine werden demgegenüber monomere G-Proteine wie die kleine GTPase Rho aktiviert, welche eine wichtige Rolle in der Regulation der Signaltransduktion spielen (Seasholtz et al., 1999).

Zelluläre Signalwege werden ebenfalls über die $\beta\gamma$ -Untereinheit der G-Proteine gesteuert. So reguliert beispielsweise die $\beta\gamma$ -Untereinheit inhibitorischer G-Proteine die Öffnungswahrscheinlichkeit Acetylcholin-abhängiger Kaliumkanäle (Logothetis et al., 1987), ist in der Lage die Aktivierung der Phospholipase C zu modulieren (Boyer et al., 1994; Exton, 1997) und aktiviert Signalwege der MAP-Kinasen (*'mitogen-activated protein kinases'*) (Koch et al., 1994).

Neben der Rezeptoraktivierung und der anschließenden Aktivierung von G-Proteinen initiieren agonistische Liganden ebenfalls Desensibilisierungsprozesse. Die Desensibilisierung beinhaltet die koordinierte Aktivierung von zwei Proteinfamilien, den G-Protein-gekoppelten Rezeptor-Kinasen (GRKs) und den β -Arrestinen. GRKs phosphorylieren den Rezeptor von der intrazellulären Seite und ermöglichen so die Bindung von β -Arrestinen, was die weitere Kopplung des Rezeptors an G-Proteine unterbindet. GPCRs können jedoch ebenfalls durch andere Kinasen wie der PKA und der PKC phosphoryliert und desensibilisiert werden (Kohout und Lefkowitz, 2002). Im Gegensatz zur kurzzeitigen Entkopplung der Rezeptoren von den G-Proteinen wird ein langfristiger Verlust der Ansprechbarkeit der Zelle durch Abnahme der Rezeptorzahl als *'downregulation'* bezeichnet. Die Abnahme der Rezeptorzahl kann einerseits durch Rezeptorinternalisierung und lysosomalem Abbau, sowie andererseits durch eine reduzierte Neusynthese der GPCRs erfolgen (Lohse, 1993).

1.3 Rezeptorzustände und Rezeptorreserve

Das einfachste Modell der Rezeptoraktivierung geht von zwei Rezeptorzuständen aus, wobei es sich entweder um den inaktiven Zustand oder den Agonist-gebundenen aktiven Zustand handelt. Jedoch wurde bereits 1980 von Lefkowitz und Kollegen beschrieben, dass GPCRs zwei unterschiedlich affine Rezeptorzustände für die Bindung von Agonisten aufweisen, wobei es sich um den G-Protein-gebundenen hochaffinen (ARG) sowie den G-Protein-freien niedrigaffinen Zustand (AR) handelt (De Lean et al., 1980). Dieser Zusammenhang zwischen Agonistbindung, G-Proteinkopplung und Rezeptoraktivierung wird durch das ternäre Komplexmodell beschrieben (siehe Abb. 1.4).

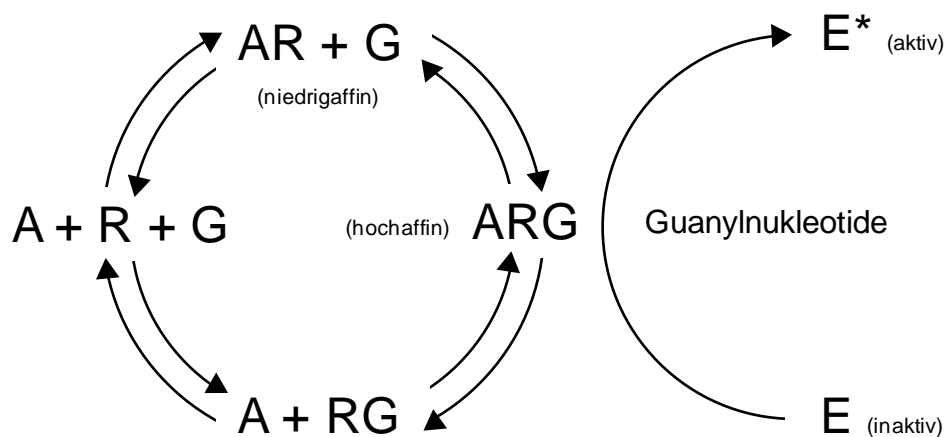


Abb. 1.4 Schematische Darstellung des ternären Komplexmodells. Das Modell berücksichtigt die Interaktion des Agonisten (A) mit dem Rezeptor (R) in An- und Abwesenheit des G-Proteins (G). Der G-Protein-gekoppelte Rezeptor repräsentiert den hochaffinen Rezeptorzustand für den Agonisten und der G-Protein-freie Rezeptor den niedrigaffinen Zustand. Effektorprotein (E) Modifiziert nach De Lean et al. (1980); Erläuterungen siehe Text.

Der hochaffine Rezeptorzustand (ARG) aus Agonist, Rezeptor und G-Protein ist die Grundvoraussetzung für die nachfolgende Aktivierung von Effektorproteinen ($E \rightarrow E^*$) durch das G-Protein. Der Übergang vom hoch- zum niedrigaffinen Rezeptorzustand wird dabei durch Guanylnukleotide reguliert, welche den ternären Rezeptorzustand (ARG) destabilisieren indem sie die Entkopplung des G-Proteins vom Rezeptor fördern (De Lean et al., 1980; Gilman, 1987).

Eine Erweiterung des ternären Komplexmodells war notwendig, nachdem entdeckt wurde, dass Rezeptoren auch ohne Bindung eines Agonisten fähig sind von dem inaktiven in den aktiven Rezeptorzustand zu wechseln. Dies wird als Spontanaktivität bezeichnet (Samama et al., 1993). Rezeptoren befinden sich somit in einem

Gleichgewicht zwischen dem aktiven (R^*) und dem inaktiven Zustand (R). In Abwesenheit eines Agonisten befindet sich der Rezeptor vornehmlich im inaktiven Zustand. Nach Agonistbindung wird das Gleichgewicht zwischen inaktiv und aktiv dagegen in Richtung des aktiven Zustands verschoben. Je nachdem ob es sich dabei um einen Vollagonisten oder einen Partialagonisten handelt, ist dabei das Ausmaß der Gleichgewichtsverschiebung unterschiedlich stark ausgeprägt. Ein Antagonist unterscheidet dagegen nicht zwischen beiden Rezeptorzuständen und übt keinen Einfluss auf das Gleichgewicht aus, während ein inverser Agonist das Gleichgewicht in Richtung des inaktiven Zustands verschiebt. Folglich ist in einem System ohne Spontanaktivität keine Unterscheidung zwischen einem Antagonisten und einem inversen Agonisten möglich.

Ein Partialagonist kann zudem ebenfalls einen vollagonistischen Effekt induzieren, wenn in dem System eine hohe Rezeptorreserve vorherrscht ('*spare receptors*'). Dies bedeutet, dass bereits die Aktivierung eines Bruchteils der Rezeptorpopulation bzw. eine partielle Rezeptoraktivierung zu einer maximalen Systemantwort führt. In Systemen mit einer hohen Rezeptorreserve weichen Wirksamkeit (EC_{50}) und Affinität (K_D) stark voneinander ab, während in Systemen ohne Rezeptorreserve die Wirksamkeit der Affinität entspricht ($EC_{50} = K_D$) (siehe Abb. 1.5). Experimentell kann die Existenz einer vorhandenen Rezeptorreserve durch den Einsatz irreversibler Antagonisten untersucht werden, welche die Besetzung der Rezeptoren durch Agonisten blockieren. Je größer die Elimination der Rezeptorreserve ist, umso stärker nähert sich die Wirksamkeit der Affinität an. Ist die Rezeptorreserve komplett eliminiert, wirkt sich eine weitere irreversible Rezeptorblockade schließlich auf die maximal induzierbare Zellantwort (E_{max}) aus (Katzung et al., 2012).

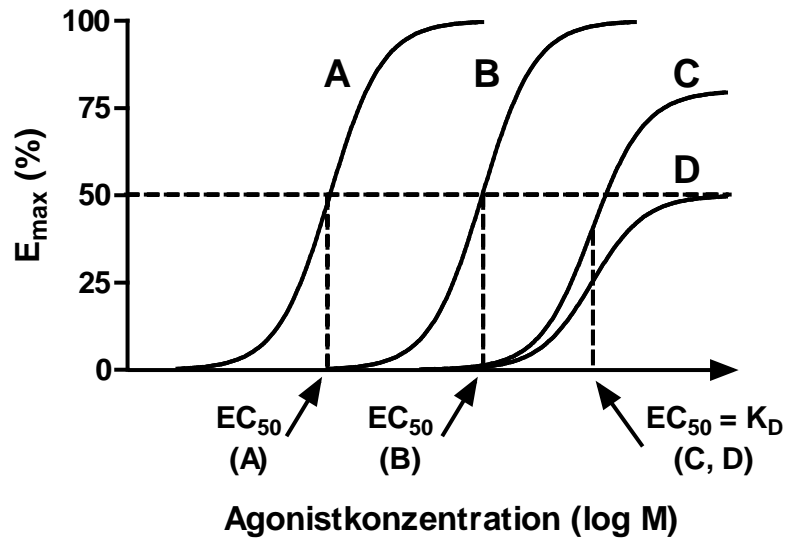


Abb. 1.5 Die Rezeptorreserve. Dargestellt ist die Auswirkung ansteigender Konzentrationen eines irreversiblen Antagonisten auf die Wirksamkeit und den Maximaleffekt eines Agonisten. (A) Konzentrations-Effekt-Kurve eines Agonisten in Abwesenheit eines irreversiblen Antagonisten und (B) nach partieller Eliminierung der Rezeptorreserve. (C, D) Eine mehr als komplette Eliminierung der Rezeptorreserve ($EC_{50} = K_D$), äußert sich schließlich in einer Reduktion der maximal induzierbaren Zellantwort. Modifiziert nach Katzung et al., 2012.

Ob sich ein Ligand wie ein Partialagonist, ein Vollagonist, ein Antagonist oder ein inverser Agonist verhält, ist folglich stark vom untersuchten System abhängig. Mittlerweile existiert zudem eine Vielzahl von Hinweisen, dass ein Rezeptor mehr als einen aktiven Zustand annehmen kann. Unterschiedliche Liganden können folglich verschiedene Rezeptorkonformationen stabilisieren, welche sich hinsichtlich ihrer Fähigkeit, mit G-Proteinen zu interagieren, unterscheiden können (Maudsley et al., 2005).

1.4 Allosterische Liganden

Orthosterische Agonisten induzieren nach Bindung an den Rezeptor eine Konformationsänderung des Rezeptorproteins, welche die Aktivierung G-Protein-abhängiger und -unabhängiger Signalwege ermöglicht (Abb. 1.6 A). Neben orthosterischen Agonisten besitzen jedoch auch allosterische Liganden die Fähigkeit den Rezeptor zu aktivieren (Abb. 1.6 D). Die Mehrzahl allosterischer Liganden besitzt allein jedoch keine intrinsische Aktivität (Abb. 1.6 B), sondern entfaltet ihre Wirkung oft nur in Anwesenheit orthosterischer Liganden. Im Falle der simultanen Bindung eines orthosterischen und allosterischen Liganden an das Rezeptorprotein, spricht man von der Bildung ternärer Komplexe aus Orthoster, Rezeptor und Alloster. Über die Bildung ternärer Komplexe können allosterische Liganden sowohl die Bindungseigenschaften eines Orthosters als auch das Ausmaß der Rezeptoraktivierung beeinflussen (Abb. 1.6 C und E). Neben orthosterischen Agonisten können ebenfalls orthosterische Antagonisten/inverse Agonisten durch allosterische Liganden beeinflusst werden.

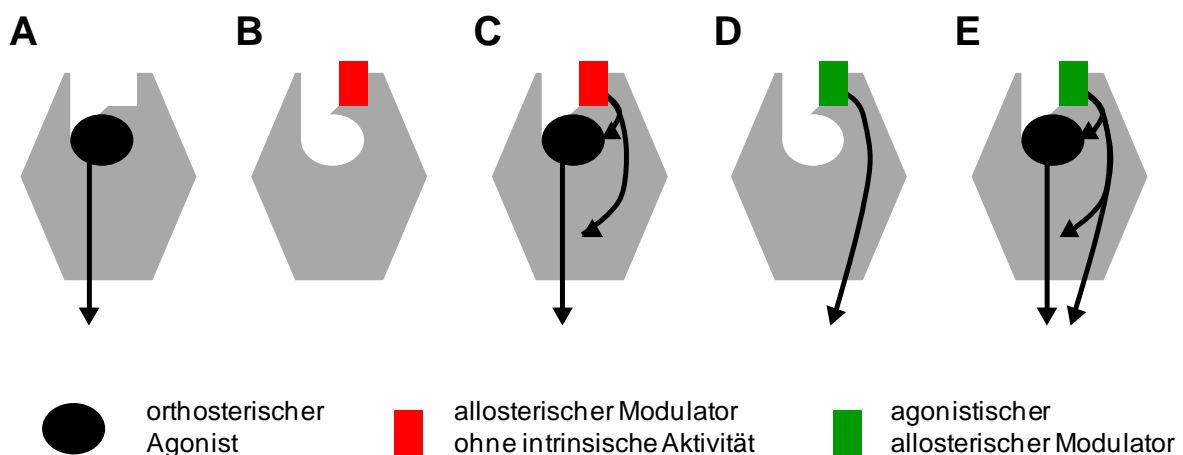


Abb. 1.6 Schematische Darstellung orthosterisch-allosterischer Rezeptorinteraktionen. (A) Rezeptoraktivierung durch einen orthosterischen Agonisten; (B und D) Besetzung der allosterischen Bindungsstelle in Abwesenheit eines orthosterischen Agonisten; (C, E) Beeinflussung der Affinität und/oder der intrinsischen Aktivität eines orthosterischen Liganden. Modifiziert nach Smith et al., 2011; Erläuterungen siehe Text.

Allosterische Modulatoren können zu einer Verstärkung oder Abschwächung der Effekte orthosterischer Liganden führen, aber auch ohne Einfluss sein. Je nach ihrem Einfluss werden sie folglich als positive, negative oder neutrale allosterische Modulatoren bezeichnet (PAM = 'positive allosteric modulator'; NEM = 'negative allosteric modulator'; SAM = 'silent allosteric modulator'). Diese Effekte sind jedoch

von wechselseitiger Natur und somit stark vom eingesetzten orthosterischen Liganden abhängig, d.h. ein Alloster kann ein Orthoster bezüglich Bindungsaffinität und Rezeptoraktivierung beeinflussen und analog beeinflusst das Orthoster "sein" Alloster (Jäger et al., 2007; Valant et al., 2012). Untersuchungen allosterischer Modulatoren zur Klärung der physiologischen Relevanz sollten folglich in Gegenwart des endogenen Liganden erfolgen. Eine weitere interessante Eigenschaft allosterischer Modulatoren im Gegensatz zu orthosterischen Agonisten ist ihre stärker ausgeprägte Selektivität gegenüber einzelnen Rezeptorsubtypen (Christopoulos, 2002).

Ein erster Hinweis bezüglich der allosterischen Modulation muskarinischer Acetylcholinrezeptoren erfolgte mit der Alkan-Bisammonium-Verbindung W84 an isolierten Meerschweinchenvorhöfen (M_2 -Modell). Lüllmann und Kollegen beobachteten mit W84 einen sättigbaren antagonistischen Effekt gegenüber dem muskarinischen Agonisten Carbachol (Lüllmann et al., 1969). Dieser antagonistische Effekt unterschied sich deutlich von dem des kompetitiven Antagonisten Atropin und wies erstmals auf eine nicht-kompetitive Interaktion hin, was heisst, dass W84 mit Carbachol nicht um die gleiche Bindungsstelle konkurriert. Diese Hypothese konnte später mit Hilfe von Radioligandbindungsstudien bestätigt werden (Jepsen et al., 1988). Mit der Zeit wurden weitere allosterische Modulatoren muskarinischer Rezeptoren wie Gallamin und Alcuronium identifiziert und prägten aufgrund der Besetzung der gleichen Bindungsstelle wie W84 den Begriff der '*common allosteric site*'.

Im Fall der muskarinischen Acetylcholinrezeptoren wiesen M_1 - und M_4 -selektive allosterische Modulatoren bereits präklinisch *in vivo* erste Erfolge hinsichtlich der Behandlung zentralnervöser Störungen und neurodegenerativer Erkrankungen auf, jedoch erlangte bislang noch kein Alloster muskarinischer Acetylcholinrezeptoren die Zulassung zum Arzneimittel (Conn et al., 2009; Müller et al., 2012).

1.5 Dualsterische Liganden

Die Idee hinter dem Design dualsterischer Liganden ist die Verbesserung der Subtypselektivität orthosterischer Agonisten durch Fusion eines Orthosters mit einem subtypselektiven allosterischen Liganden. Dualsterische Liganden binden definitionsgemäß gleichzeitig an das orthosterische und das allosterische Haftareal eines Rezeptorproteins (Abb. 1.7 A). Der dualsterische Bindungsmodus ist somit von der Formation ternärer Komplexe abzugrenzen, was die simultane Bindung von zwei unabhängigen Molekülen an die orthosterische und eine allosterische Bindungsstelle beschreibt (Mohr et al., 2010). Neben dem dualsterischen Bindungsmodus besitzen diese Liganden jedoch auch die Fähigkeit rein allosterisch zu binden, was die wechselseitige Beeinflussung von und durch orthosterische Liganden ermöglicht (Abb. 1.7 B).

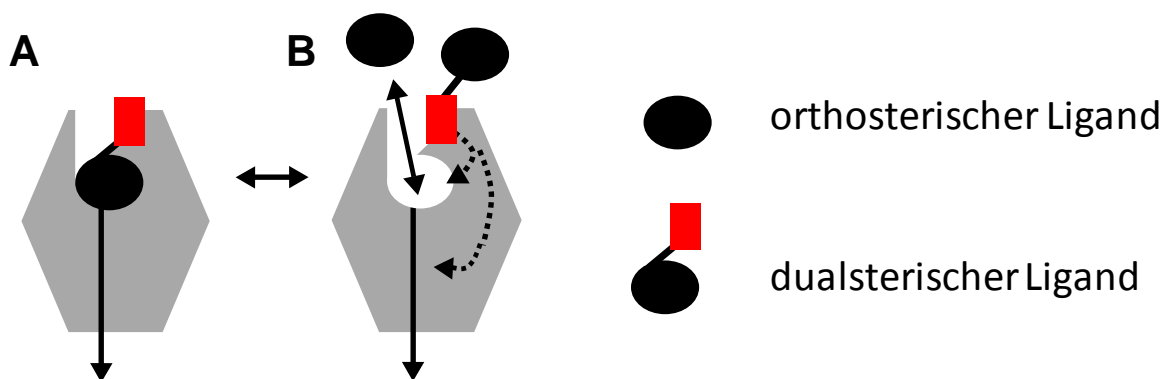


Abb. 1.7 Schematische Darstellung potentieller Bindungsmodi dualsterischer Liganden. (A) Dualsterischer Bindungsmodus; (B) Allosterischer Bindungsmodus, welcher die Bildung ternärer Komplexe ermöglicht; Modifiziert nach Smith et al., 2011; Erläuterungen siehe Text.

Mit dem Ziel M_2 -selektive Agonisten zu erhalten, wurden Oxotremorin- und Oxotremorin M-artige Agonisten mit Strukturelementen der M_2 -selektiven allosterischen Modulatoren W84 und Naphmethonium miteinander verknüpft (Desingrini et al., 2006). Die Verknüpfung beider Ligandbausteine erfolgte über eine Kohlenwasserstoffkette aus sechs Kohlenstoffatomen. Diese ersten Liganden verhielten sich funktionell zum Großteil antagonistisch oder wiesen nur eine schwache intrinsische Aktivität auf. Spätere Hybridliganden, welche den hochaffinen orthosterischen Baustein Iperoxo enthielten, zeichneten sich dagegen durch eine stärkere intrinsische Aktivität aus. Zudem wiesen diese Liganden eine Subtypselektivität für den M_2 -Rezeptor auf und zeigten dort eine Signalwegsselektivität für die Aktivierung inhibitorischer G-Proteine (Antony et al.,

2009; Kebig et al., 2009). Ihre Wirksamkeit und Affinität war jedoch deutlich geringer als die des orthosterischen Bausteins Iperoxo, was durch eine ungünstige wechselseitige Beeinflussung beider Ligandbausteine erklärt wird (*'functional misfit of building blocks'*; Mohr et al., 2010): Während der orthosterische Agonist den Rezeptor aktiviert, stabilisieren die allosterischen Bausteine den inaktiven Rezeptorzustand. Aufgrund der Tatsache, dass die einzelnen Bausteine unterschiedliche Rezeptorkonformationen bevorzugen, wirkt sich dies folglich negativ auf die Wirksamkeit und Affinität der Hybride aus. Dualsterische Agonisten des Bauprinzips "Iper-x-phth" (siehe Abb. 1.8) wurden im Rahmen dieser Arbeit in verschiedenen Expressionssystemen des M₂-Rezeptors hinsichtlich ihrer Fähigkeit den Rezeptor zu aktivieren untersucht. Erstmals wurden in diesem Arbeitskreis dazu native (Fibroblasten) und primäre (Kardiomyozyten) Expressionssysteme des M₂-Rezeptors eingesetzt, welche eine Voraussage hinsichtlich der Effekte *in vivo* ermöglichten.

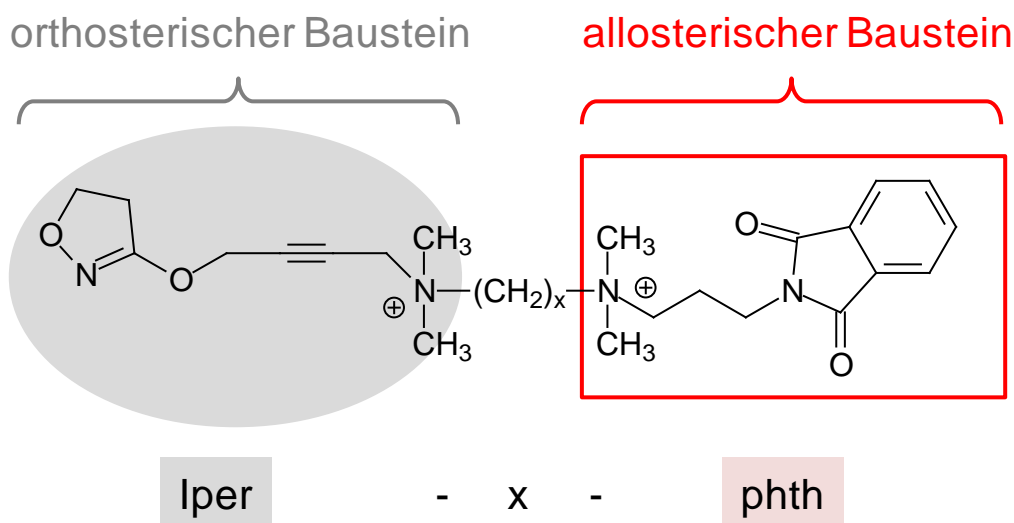


Abb. 1.8 Bauprinzip der dualsterischen Liganden vom Typ "Iper-x-phth". Iperoxo bildet den orthosterischen Baustein (Iper) und das Phthalimid-haltige Strukturelement des M₂-selektiven allosterischen Modulators W84 den allosterischen Baustein (phth). Beide Bausteine sind durch eine Kohlenwasserstoffkette aus x Kohlenstoffatomen miteinander verbunden (x = 6, Iper-6-phth; x = 8, Iper-8-phth).

Neben der Entwicklung subtypelektiver dualsterischer Agonisten wurde das Konzept der Fusion eines orthosterischen Bausteins mit einem allosterischen Baustein ebenfalls für die Generierung subtypelektiver Antagonisten eingesetzt. Erste Untersuchungen dualsterischer Hybridliganden aus unselektiven Antagonisten und Strukturelementen der M₂-selektiven allosterischen Modulatoren W84 und Naphmethonium ergaben für Atropin-haltige Hybridliganden eine M₂-Prävalenz

(Kaufel D., 2010). Ein weiterer dualsterischer Antagonist entstand durch die Fusion eines orthosterischen 3-Benzylhydripyrrolinyl-Bausteins über eine Heptankette mit einem allosterischen 4-Aminobenzylpiperidin-Baustein. Der resultierende Antagonist THRX-160209 wies neben seiner M_2 -Prävalenz zudem eine deutlich höhere Rezeptor-Affinität als die Einzelkomponenten auf (Steinfeld et al., 2007). Alle Erkenntnisse bezüglich Affinität und Wirksamkeit dualsterischer Liganden wurden jedoch bislang einzig *in vitro* erlangt und geben noch keinen Aufschluss hinsichtlich ihrer möglichen Effekte *in vivo*.

1.6 Promiskuitive G-Proteinaktivierung

Viele GPCRs sind in der Lage mehrere Signalwege simultan zu aktivieren (Abb. 1.9). So reguliert beispielsweise der kardiale M_2 -Rezeptor die Herzfrequenz einerseits über die G_α -vermittelte Reduzierung des intrazellulären cAMP-Gehaltes sowie andererseits über die $G\beta\gamma$ -induzierte Öffnung Acetylcholin-abhängiger Kaliumkanäle (Yamada, 2001; DiFrancesco, 2010; Abb. 1.9 Modell 1). Neben der Steuerung verschiedener Signalwege über die Aktivierung eines G-Proteins, können außerdem simultan weitere Proteinfamilien wie RGS-Proteine (RGS = '*regulators of G protein signaling*') und β -Arrestine aktiviert werden (Reiter and Lefkowitz, 2006; Abb. 1.9 Modell 2). GPCRs sind ebenfalls in der Lage, mehr als eine Klasse von G-Proteinen zu aktivieren (Milligan, 1993; Abb. 1.9 Modell 3), was auch als promiskuitive G-Proteinaktivierung bezeichnet wird.

Bei dem Phänomen der promiskuitiven G-Proteinaktivierung steht jedoch immer die Frage im Raum, ob es sich um ein physiologisch relevantes Phänomen handelt oder ob diese Beobachtung das Resultat einer Überexpression von Rezeptoren oder G-Proteinen darstellt (Hermans, 2003). Im Fall des dominant $G_{i/o}$ -gekoppelten muskarinischen M_2 -Rezeptors ist beispielsweise ebenfalls die Aktivierung von G_s - und $G_{q/11}$ -Proteinen beschrieben (Michal et al., 2001; Griffin et al., 2002; Mistry et al., 2005; Nelson et al., 2006; Michal et al., 2007; Griffin et al., 2007). Der Vergleich der Wirksamkeiten muskarinischer Agonisten verdeutlicht die unterschiedliche Affinität des M_2 -Rezeptors zu den einzelnen G-Proteinklassen ($G_{i/o} > G_s > G_{q/11}$). Während niedrigere Agonistkonzentrationen den sensitivsten Signalweg aktivieren, können

weitere Signalwege dagegen erst durch höhere Agonistkonzentrationen aktiviert werden. Neben dem M₂-Rezeptor ist die promiskuitive G-Proteinaktivierung ebenfalls für weitere muskarinische Rezeptorsubtypen beschrieben, auch dies jedoch nur in artifiziellen Zellsystemen (Nahorski et al., 1997; Akam et al., 2001; Mistry et al., 2005; Thomas et al., 2008).

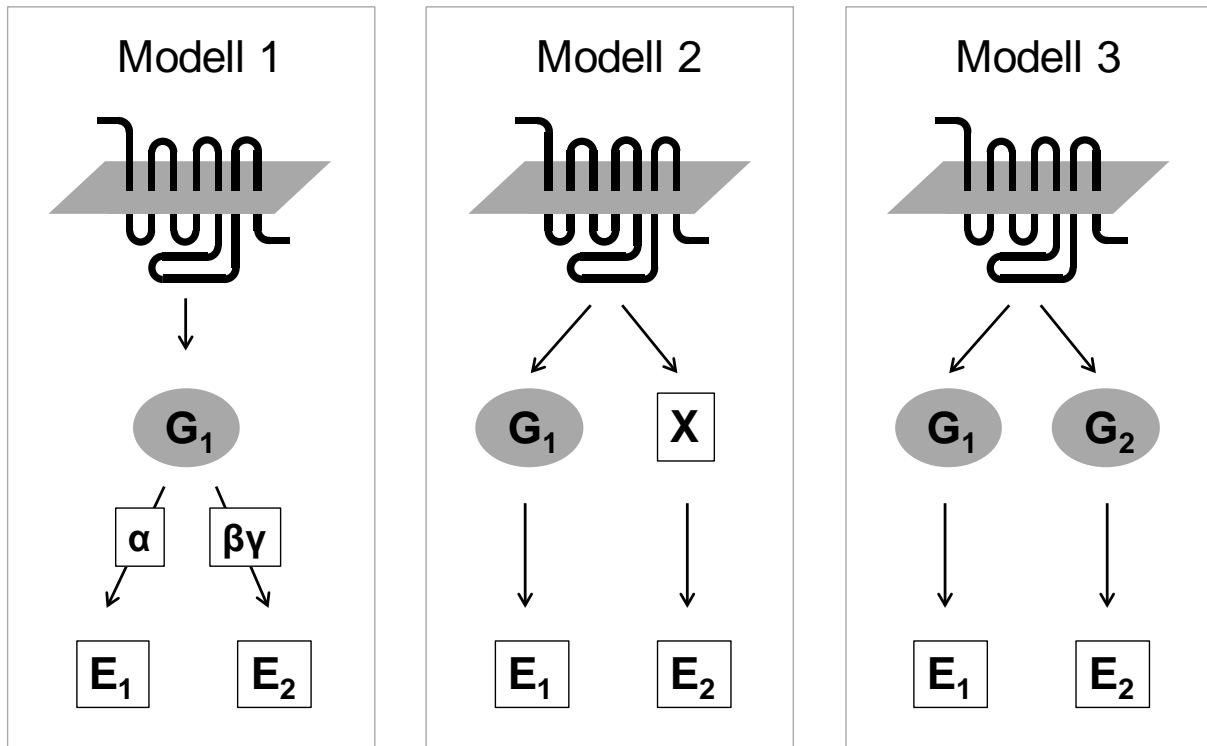


Abb. 1.9 Schematische Darstellung der promiskuitiven Signalwegsaktivierung. (Modell 1) Aktivierung verschiedener Effekte über die α- und βγ-Untereinheit eines G-Proteins; (Modell 2) Aktivierung G-Protein-abhängiger und -unabhängiger Signalwege; (Modell 3) Aktivierung verschiedener Effekte über die Aktivierung mehrerer G-Proteine. Modifiziert nach Milligan (1993). G = G-Protein, X = Effektorprotein, z.B. β-Arrestin, E = Effekt

Für einige GPCRs konnte jedoch die Rezeptor-vermittelte Aktivierung verschiedener G-Proteine in physiologisch relevanten Expressionssystemen nachgewiesen werden, wie im Fall des humanen Thyreotropin-Rezeptors und des Dopamin-Rezeptors vom Typ D₁ (Laugwitz et al., 1996; Jin et al., 2001).

Weisen Agonisten in einem promiskuitiven System eine Selektivität für bestimmte Signalwege auf, wird dies als '*functional selectivity*', '*biased agonism*' oder '*stimulus trafficking*' bezeichnet (Kenakin, 2007). GPCRs besitzen zudem die Fähigkeit, ihre Selektivität für verschiedene G-Proteine unter bestimmten Voraussetzungen zu ändern. So zeigte sich beispielsweise für den dominant G_s-gekoppelten β₂-Rezeptor, dass dieser in Gegenwart erhöhter intrazellulärer cAMP-Konzentrationen ebenfalls in

der Lage ist, an inhibitorische G-Proteine zu koppeln, was auf einer PKA-abhängigen Phosphorylierung des Rezeptorproteins beruht (Daaka et al., 1997). Dieser $G_s/G_{i/o}$ -switch des β_2 -Rezeptors (siehe Abb. 1.10) konnte sowohl in artifiziellen wie auch in physiologisch relevanten Zellen nachgewiesen werden (Xiao et al., 1999; Liu et al. 2009). Interessanterweise beschränkt sich dieser Mechanismus nicht nur auf den β_2 -Rezeptor, sondern ist ebenfalls für weitere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, wie dem VIP-Rezeptor (VIP = Vasoaktives Intestinales Peptid), dem Histamin-Rezeptor, dem Serotonin-Rezeptor, dem Glukagon-Rezeptor und dem Prostazyklin-Rezeptor, nachgewiesen (Luo et al., 1999; Kiltz et al., 2000; Lawler et al.; 2001).

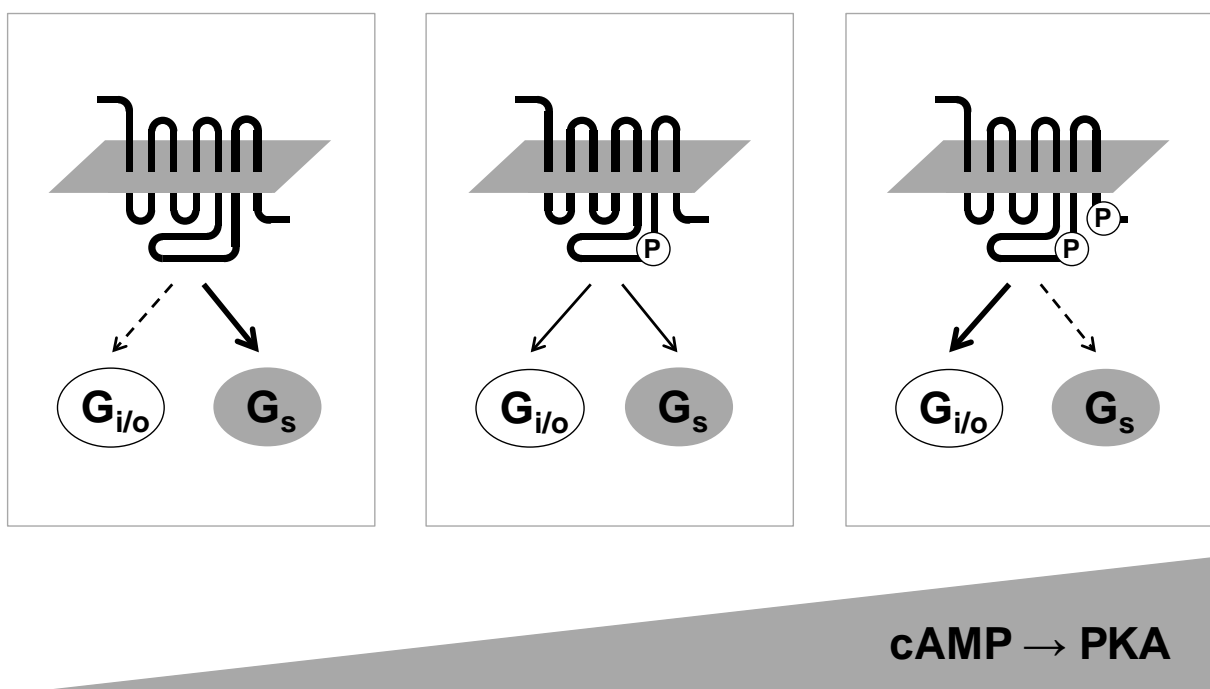


Abb. 1.10 Schematische Darstellung des cAMP-abhängigen $G_s/G_{i/o}$ -switches am Beispiel des β_2 -Rezeptors. Modifiziert nach Daaka et al., 1997; PKA-induzierte Phosphorylierung (P); cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP); Proteinkinase A (PKA)

1.7 Fragestellung

Im Fokus der vorliegenden Arbeit stand die Untersuchung der M_2 -vermittelten Signalwegsaktivierung und deren Beeinflussung durch Veränderungen des zellulären Kontextes. Zwei Fragestellungen waren hierbei von besonderem Interesse:

- 1) Ist die promiskuitive G-Proteinaktivierung des muskarinischen M_2 -Rezeptors auf das artifizielle Expressionssystem begrenzt oder ist der M_2 -Rezeptor in nativen und/oder primären Zellen ebenfalls in der Lage, verschiedene G-Proteinklassen zu aktivieren?
- 2) Wie stark verändert sich die Affinität, die Wirksamkeit und die intrinsische Aktivität muskarinischer Agonisten in den gewählten Expressionssystemen "rekombinant" (CHO-h M_2), "nativ" (humane Lungenfibroblasten - MRC-5) und "primär" (Kardiomyozyten)?

Die Effekte der eingesetzten Testsubstanzen wurden zunächst im artifiziellen Expressionssystem (CHO-h M_2) primär anhand der intrazellulären dynamischen Massenumverteilung (DMR; Kapitel 3.7) beurteilt. Diese phänotypische Reaktion der Zellen auf die applizierten Testsubstanzen wurde anschließend weitergehend über die spezifische Maskierung/Hemmung einzelner Signalwege und der Bestimmung sekundärer Botenstoffe analysiert. Ob die in CHO-h M_2 erhobenen Befunde auch auf native und primäre Expressionssysteme übertragbar sind, wurde unter Verwendung der humanen Lungenfibroblasten-Zelllinie MRC-5 sowie embryonalen (eCM) und adulten murinen Kardiomyozyten (aCM) geprüft.

Verglichen wurden die Auswirkungen des zellulären Kontextes auf die Wirkung dualsterischer Hybridliganden im Gegensatz zu konventionellen orthosterischen Liganden. Bei den untersuchten Hybriden handelte es sich um die muskarinischen Agonisten Iper-6-phth (Antony et al., 2009) und dessen verlängertes Derivat Iper-8-phth (Bock et al., 2012). Beide Liganden entsprachen dem Design vom Typ "Iper-x-phth" (Abb. 1.8), welche sich nur in der Länge ihrer Kohlenwasserstoffkette voneinander unterschieden.

2 Materialien

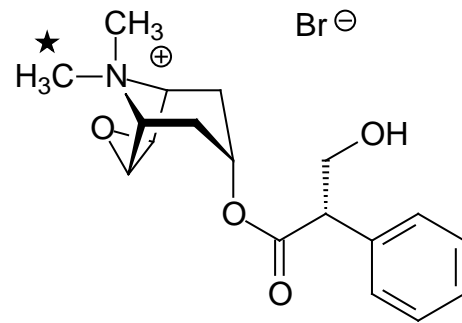
2.1 Substanzen

2.1.1. Radioliganden

[³H]N-Methylscopolamin ([³H]NMS)

M_R: 398,3 g/mol
Hersteller: Perkin Elmer
Artikelnr.: NET636001MC

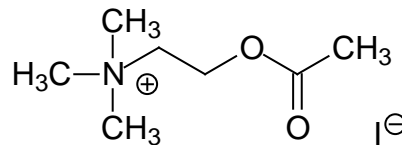
- ★ Position der radioaktiven Markierung; alle drei Wasserstoffatome sind durch Tritium ausgetauscht.



2.1.2. Muskarinische Agonisten

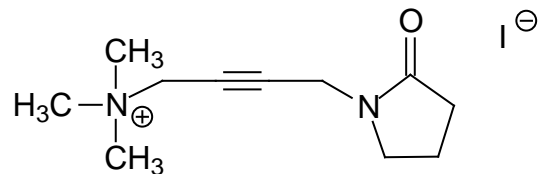
Acetylcholin (ACh)

M_R: 273,1 g/mol
Hersteller: Sigma Aldrich
Artikelnr.: A7000



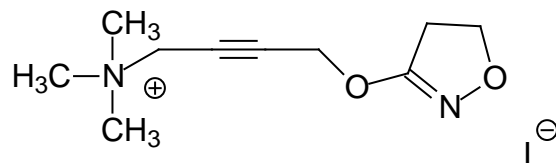
Oxotremorin M (Oxo M)

M_R: 322,2 g/mol
Hersteller: Sigma Aldrich
Artikelnr.: O100



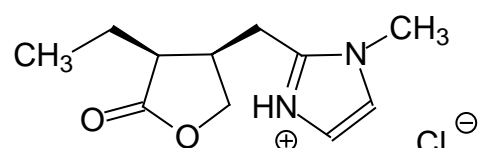
Iperoxo (Ipx)

M_R: 324,2 g/mol
Hersteller: AK Holzgrabe
Universität Würzburg, Deutschland



Pilocarpin (Pilo)

M_R: 244,7 g/mol
Hersteller: Sigma Aldrich
Artikelnr.: P6503



2.1.3. Dualsterische muskarinische Agonisten

Iper-6-phth (I-6-p)

ehemals Phth-6-iper^a, Iper-W84^b, Hybrid 1^c und DDT5^d

M_R: 658,5 g/mol

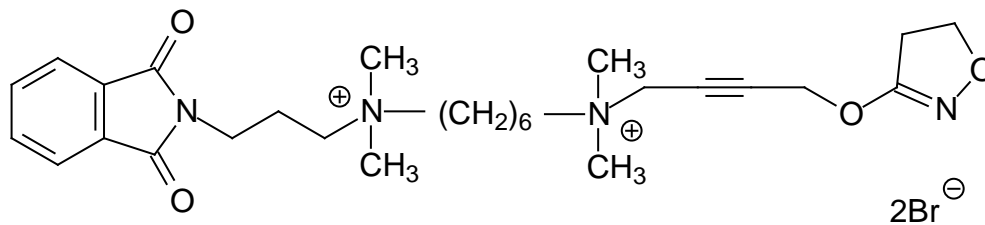
Hersteller: AK Holzgrabe, Universität Würzburg, Deutschland

^a Janßen N., 2011

^b Kaufel D., 2010

^c Antony et al., 2009; Kebig A. et al., 2009, Kebig A., 2010; Michalski H., 2009

^d Antony J., 2007; Kellersohn K., 2007; Schmalenbach C., 2005



Iper-8-phth (I-8-p)

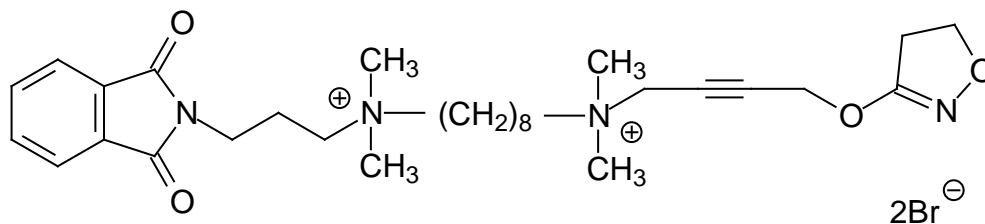
ehemals Phth-8-iper^a und CZA8^b

M_R: 686,5 g/mol

Hersteller: AK Holzgrabe, Universität Würzburg, Deutschland

^a Janßen N., 2011

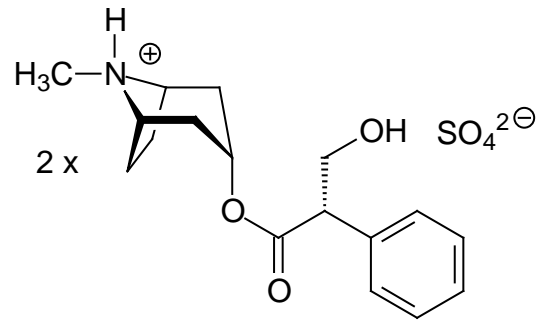
^b Kebig A., 2010; Michalski H., 2009



2.1.4. Muskarinische Antagonisten

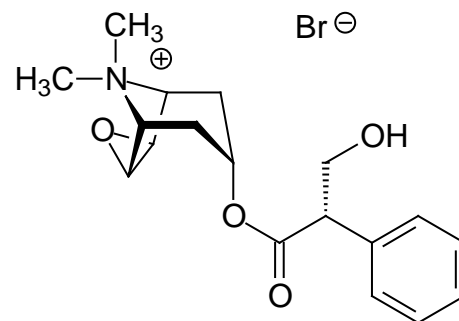
Atropin (Atr)

M_R: 694,8 g/mol
Hersteller: Sigma Aldrich
Artikelnr.: A0257



N-Methylscopolamin (NMS)

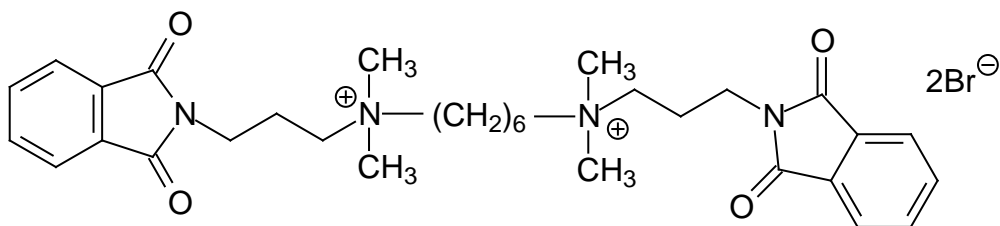
M_R: 398,3 g/mol
Hersteller: Sigma Aldrich
Artikelnr.: S8502



2.1.5. Muskarinische Allosterie

W84

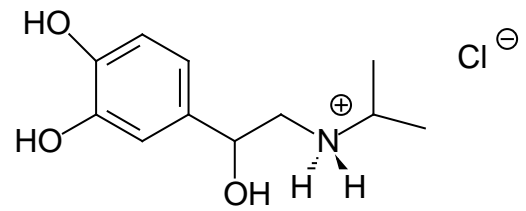
M_R: 708,5 g/mol
Hersteller: Dr. Pfeffer, Universität Kiel, Deutschland



2.1.6. Adrenerge Agonisten

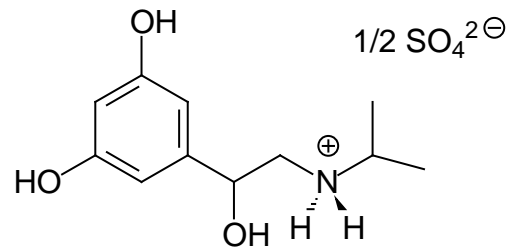
Isoprenalin (ISO)

M_R: 247,7 g/mol
Hersteller: Sigma Aldrich
Artikelnr.: I5627



Orciprenalin (Orci)

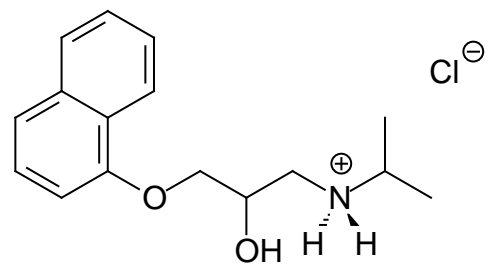
M_R: 260,3 g/mol
Hersteller: Sigma Aldrich
Artikelnr.: M2398



2.1.7. Adrenerge Antagonisten

Propranolol (Prop)

M_R: 295,8 g/mol
Hersteller: Sigma Aldrich
Artikelnr.: P0884



2.2 Reagenzien und Chemikalien

2.2.1. Säuren, Laugen, Salze, Puffer

	Bezeichnung	Artikelnr.	Hersteller
R1	Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl ₂ x 2 H ₂ O)	2110	Fluka
R2	Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O)	A3567	AppliChem
R3	Hank's Buffered Salt Solution (HBSS)	14025	Invitrogen
R4	HEPES-Pufferlösung 1 M	15630056	Invitrogen
R5	Kaliumchlorid (KCl)	104936	Merck
R6	Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	104873	Merck
R7	Kaliumnatriumtartrat-Tetrahydrat (C ₄ H ₄ KNaO ₆ x 4 H ₂ O)	379832	Sigma-Aldrich
R8	Kupfer(II)sulfat-Pentahydrat (CuSO ₄ x 5 H ₂ O)	102790	Merck
R9	Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ x 6 H ₂ O)	31413	Riedel-de-Haen
R10	Na ₂ EDTA-Lösung 0,1 M	20271	Grüssing
R11	Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	106392	Merck
R12	Natriumchlorid (NaCl)	106404	Merck
R13	Natronlauge (0,1 M)	35263	Fluka
R14	Natronlauge (1 M)	35256	Fluka
R15	Phosphorsäure 85%	124715	ZVE

2.2.2. Lösungsmittel

	Bezeichnung	Artikelnr.	Hersteller
R16	Dimethylsulfoxide (DMSO)	D2438	Sigma-Aldrich
R17	Folin-Ciocalteu's Phenolreagenz	109001	Merck
R18	Ready Protein™ Szintillationscocktail	586604	Beckman

2.2.3. Oberflächen- und Filterbeschichtungen

	Bezeichnung	Artikelnr.	Hersteller
R19	Fibronectin	F1141	Sigma-Aldrich
R20	Gelatine	G 2500	Fluka
R21	Laminin	L2020	Sigma-Aldrich
R22	Polyethylenimin-Lösung 50% (w/v)	P3143	Fluka

2.2.4. Zucker

	Bezeichnung	Artikelnr.	Hersteller
R23	D(+)-Glucose-Monohydrat	104047	Merck
R24	Saccharose	107687	Merck

2.2.5. Medien und Mediumzusätze

	Bezeichnung	Artikelnr.	Hersteller
R25	2-Mercaptoethanol	M 3148	Sigma-Aldrich
R26	Earle's Minimum Essential Medium (MEM)	E 15-825	PAA

	Bezeichnung	Artikelnr.	Hersteller
R27	Fötale Kälberserum (FKS)	P30-3702	PAN
		10500	Invitrogen
R28	Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	21980	Invitrogen
R29	L-Glutramin-Lösung (200 mM)	G7513	Sigma-Aldrich
R30	Nicht-essentielle Aminosäuren	11140	Invitrogen
		M-11-003	PAA
R31	Natriumpyruvat (100 mM)	S11-003	PAA
R32	Nutrient Mixture F-12 Ham	N4888	Sigma-Aldrich
R33	Penicillin/Streptomycin	15140	Invitrogen
		P0781	Sigma-Aldrich

2.2.6. Proteine, Enzyme, Enzyminhibitoren und -aktivatoren

	Bezeichnung	Artikelnr.	Hersteller
R34	3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX)	15879	Sigma-Aldrich
R35	BSA	A 7906	Sigma-Aldrich
R36	Forskolin	A 2165	AppliChem
		F 6886	Sigma-Aldrich
R37	Humanes Serumalbumin (HSA)	A 1653	Sigma-Aldrich
R38	Kollagenase B	11088807001	Roche
R39	Kollagenase L (40 U/mg)	C8167	Sigma Aldrich

	Bezeichnung	Artikelnr.	Hersteller
R40	Trypsin (9000 U/mg)	93610	Fluka
R41	Trypsin-EDTA-Lösung	T3914	Sigma Aldrich
R42	Trypsin-Inhibitor	T6522	Sigma Aldrich

2.2.7. G-Protein-Hemmer

	Bezeichnung	Artikelnr.	Hersteller
R43	Pertussis Toxin (PTX); hemmt $G_{i/o}$	C8052	Sigma-Aldrich
R44	362-63-08 (MH); hemmt $G_{q/11}$ (Nesterov et al., 2010)		

2.3 Lösungen und Puffer

Lösungen und Puffer	
L1	Arbeitslösung Proteinbestimmung Lowry 100 Teile 2 %ige Natriumcarbonat-Lösung in 0,1 N NaOH (m/m) + 1 Teil 2 %ige wässrige Kalium-Natrium-Tartrat-Lösung (m/m) + 1 Teil 1 %ige wässrige Kupfer(II)sulfat-Lösung (m/m)
L2	40 mM Na,K,PO₄-Puffer: 33,3 mM Na ₂ HPO ₄ und 6,7 mM KH ₂ PO ₄ Aus dieser Stammlösung erfolgte die Herstellung weiterer Konzentrationen: 10 mM, 7 mM, 6,8 mM und 5 mM (pH 7,4 mit H ₃ PO ₄); Lagerung: 2-8°C
L3	EGTA-Lösung (pH 7,4 mit NaOH) 135 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM MgCl ₂ , 2,6 mM EGTA, 2 mM HEPES; Lagerung: 2-8°C
L4	Fibronectin-haltige 0,02 %ige Gelatinelösung (0,5 mg/100 mL) Zu 0,1 g Gelatine wurden 500 ml Aqua dest. hinzugefügt und anschließend autoklaviert. 199 ml dieser 0,02 %igen Gelatine-Lösung wurden anschließend mit 1 ml Fibronectin-Lösung versetzt. Lagerung: -30°C
L5	Folin-Ciocalteu's Phenolreagenz-Lösung Für die Proteinbestimmung nach Lowry wurde aus dem Reagenz (R17) eine 1:3 bzw. in einigen Fällen eine 1:4-Verdünnung mit Aqua dest. hergestellt.
L6	Gelatine-Lösung 0,1% Die Herstellung erfolgte aus einer 1%igen Stammlösung (1 g Gelatine ad 100 ml PBS), welche 1:10 mit PBS unter sterilen Bedingungen verdünnt wurde. Lagerung: 2-8°C
L7	HBSS-Puffer (R3) + 20 mM HEPES (R4) (pH 7,0)

Lösungen und Puffer

L8 Hoch konzentrierte Kaliumlösung (pH 7,4 mit KOH)

130 mM $C_5H_7K_2NO_4$, 4 mM NaCl, 10 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 0,02 mM $CaCl_2$, 9 mM Glucose, 4 mM HEPES; Lagerung: 2-8°C

L9 Homogenisationspuffer (pH 7,4 mit NaOH)

20 mM HEPES, 10 mM Na_2EDTA ; Lagerung: 2-8°C.

L10 Kollagenase B-Lösung (1 mg/ml) (pH 6,9)

120 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 5 mM $MgSO_4$, 5 mM Natriumpyruvat, 20 mM Taurin, 10 mM HEPES, 20 mM Glucose, 30 μ M $CaCl_2$; Lagerung: -30°C

L11 Kollagenase L-Lösung (0,6 mg/ml) (pH 7,4)

130 mM $C_5H_7K_2NO_4$, 4 mM NaCl, 10 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 0,02 mM $CaCl_2$, 9 mM Glucose, 4 mM HEPES, 0,6 mg/ml Kollagenase L

(15 mg Kollagenase L (R39) ad 25 ml hoch konz. Kaliumlösung (L8))

An jedem Messtag wurde die Lösung frisch hergestellt.

L12 Mercaptoethanol-Stammlösung (100 mM)

35 μ l 2-Mercaptoethanol ad 5 ml PBS; Lagerung: -30°C

L13 Messlösung für murine adulte ventrikuläre Kardiomyozyten (pH 7,4 mit NaOH)

135 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 1,8 mM $CaCl_2$, 2 mM HEPES; 9 mM Glucose, BSA 1 mg/ml, Trypsininhibitor 0,017 mg/ml; An jedem Messtag wurde die Lösung frisch hergestellt.

L14 Messlösung für murine embryonale atriale Kardiomyozyten (pH 7,4 mit NaOH)

140 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 1,8 mM $CaCl_2$, 10 mM HEPES, 10 mM Glucose; An jedem Messtag wurde die Lösung frisch hergestellt.

Lösungen und Puffer

L15 Trypsinlösung (pH 7,4)

130 mM C₅H₇K₂NO₄, 4 mM NaCl, 10 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0,02 mM CaCl₂,
9 mM Glucose, 4 mM HEPES, 0,005 mg/ml Trypsin

(1 mg Trypsin (R40) ad 30 ml hoch konz. Kaliumlösung (L8))

An jedem Messtag wurde die Lösung frisch hergestellt.

L16 Zentrifugationspuffer (pH 7,4 mit NaOH)

20 mM HEPES, 0,1 mM Na₂EDTA; Lagerung: 2-8°C.

2.4 Verbrauchsmaterialien

	Bezeichnung	Artikelnr	Hersteller
V1	Borosilikatgläser 16 x 100 mm	FB-51330	Fisher Scientific
V2	cAMP dynamic 2- <i>kit</i>	62AM4PEC	Cisbio
V3	Cellstar [®] Zellkulturflasche 175 cm ²	660175	Greiner
V4	Cellstar [®] Zellkulturschale mit Nocken 145 x 20 mm, steril	639160	Greiner
V5	Cryogenic vials, 1 ml	50001012	Nalgene
V6	CyBi [®] - <i>Tip trays</i> 384/25 µl	OL 3800-25- 513-N	CyBio
V7	Deckgläser 22 x 22 mm	0101050	Marienfeld
V8	Epic [®] Mikrotiterplatte 384 <i>well</i>	5040	Corning Inc.
V9	Epic [®] Mikrotiterplatte 384 <i>well</i> (<i>Source plate</i>)	3657	Corning Inc.

	Bezeichnung	Artikelnr	Hersteller
V10	Epic® Mikrotiterplatte 384 well (Fibronectin)	5042	Corning Inc.
V11	Exadrop® Präzisions-Tropfenregler	4061284	B.Braun
V12	Glasfaserfilter MGB 125 x 379 mm	2.1102.125379 G	Munktell
V13	Microtiterplatte, 384 well	784080	Greiner
V14	Microtitierplatte, clear-bottom, 384 well	788093	Greiner
V15	Perfusor®-Spritze OPS 50 ml	8728810F	B.Braun
V16	Petrischalen 35 x 10 mm	627102	Greiner
V17	Petrischalen 92 x 16 mm	82.1473	Sarstedt
V18	Reaktionsgefäß 1,5 ml	616 201	Greiner
V19	Standardplatte PP,95 µl, 384 well	3657	Corning Inc.
V20	Sterican®-Injektions-Kanüle, 27G x ¾	4657705	B.Braun
V21	Szintillisationsgefäße, PE, 27/60 mm	619301	Greiner
	+ Schraubverschlüsse 27 mm	619080	Greiner
V22	Zentrifugationsröhrchen 50 ml	3138-0050	Nalgene

2.5 Geräte

	Bezeichnung	Hersteller
G1	Beckman Coulter LS-6500 SC	Beckman
G2	Brandel Harvester	Brandel
G3	Einfriercontainer „Mr Frosty“ 5100 Cryo 1°C	Nalgene
G4	Epic® Biosensor (beta Version)	Corning Inc.
G5	Glaskornsterilisator Steri 250	Simon Keller
G6	Julabo F10 Umwälzthermostat	Julabo
G7	Julabo ME-4 Umwälzthermostat	Julabo
G8	Kamera IonOptix MyoCam	IonOptix
G9	Kamera Sony XCD-X710	Sony
G10	Mikroskop Axiovert 100 TV	Carl Zeiss
G11	Mikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss
G12	Mithras LB 960	Berthold
G13	Polytron Homogenisator	Kinematica AG
G14	Potter Elvehjem Glashomogenisator	Janke/Kunkel
G15	UV-Meter: Ultrospec 3300 pro	Biochrom
G16	Waring-Blendor-Homogenisator	Waring

2.6 Computerprogramme

	Bezeichnung	Hersteller
P1	ChemWindow [®] 6.0	Bio-Rad Laboratories
P2	GraphPad InStat [®] 3.05	GraphPad Software
P3	GraphPad Prism [®] 4.02	GraphPad Software
P4	MathType [™] (Lite Modus) 6.7	Design Science
P5	Microsoft [®] Office Excel [®] 2007	Microsoft Corporation
P6	Microsoft [®] Office PowerPoint [®] 2007	Microsoft Corporation
P7	Microsoft [®] Office Word [®] 2007	Microsoft Corporation
P8	Microsoft [®] Excel [®] Makro "Microplate Analyzer v2.0"	Corning Inc.
P9	IonWizard 5.0	IonOptix
P10	IGOR Demo Pro 4.0	Wave Metrics
P11	Labview 7.1	National Instruments

2.7 Herstellerverzeichnis

AppliChem:	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
B.Braun:	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Beckman:	Beckman Coulter Incorporated, Fullerton, CA, USA
Berthold:	Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Deutschland
Biochrom:	Biochrom Ltd., Cambridge, UK
Bio-Rad:	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Brandel:	Brandel, Biomedical Research and Development Laboratories, Gaithersburg, MD, USA
Carl Zeiss:	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland
Cisbio:	Cisbio Bioassays, Bagnols-sur-Cèze Cedex, Frankreich
Corning Inc.:	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
CyBio:	CyBio AG, Jena, Deutschland
Design Science:	Design Science, Inc., Long Beach, CA, USA
Fisher Scientific:	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Fluka:	Fluka Chemie GmbH; seit 2005 Vertrieb der Chemikalien unter Sigma-Aldrich
GraphPad:	GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA
Greiner:	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Grüssing:	Grüssing GmbH, Filsum, Deutschland
Invitrogen:	Invitrogen AG, Carlsbad, CA, USA; seit 2008 Life Technologies
IonOptix:	IonOptix, Milton, MA, USA
Janke/Kunkel:	Janke und Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland

Julabo: Julabo Labortechnik, Seelbach, Deutschland

Kinematica AG: Kinematika AG, Littau-Luzern, Schweiz

Marienfeld: Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen, Deutschland

Merck: Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Microsoft: Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA

Munktell: Munktell & Filtrak GmbH, Bärenstein, Deutschland

Nalgene: Thermo Scientific Nalgene und Nunc, Rochester, NY, USA

National Instr.: National Instruments, Austin, TX, USA

PAA: PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

PAN: PAN-Biotech GmbH, Passau, Deutschland

Riedel-de-Haën: Riedel-de Haën, seit 2008 Vertrieb der Chemikalien unter Sigma-Aldrich

Roche: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

Sarstedt: Sarstedt, Inc., Newton, NC, USA

Sigma-Aldrich: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Simon Keller: Simon Keller AG, Burgdorf, Schweiz; Waring: Waring Laboratory, Torrington, CT, USA

Wave Metrics: Wave Metrics, Inc., Portland, OR, USA

ZVE: Zentrale Chemikalienversorgung Enderich, Bonn, Deutschland

3 Methoden

3.1. Zellkultur

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit stabil transfizierten CHO-Zellen (Ovarialzellen des chinesischen Hamsters) gearbeitet. Bei der verwendeten Wirtszelllinie handelt es sich um die Flp-InTM-CHO-Zelllinie, welche entweder mit dem humanen M₂-Rezeptor (CHO-hM₂) oder dem humanen M₃-Rezeptor (CHO-hM₃) stabil transfiziert ist (Kebig A., 2010; Janßen N., 2011). Da bei untransfizierten Flp-InTM-CHO -Zellen keine muskarinischen Rezeptoren detektierbar sind (Peters L., 2010), handelt es sich um hierbei um ein reines Expressionssystem für den M₂- bzw. den M₃-Rezeptor.

Ebenfalls wurde die kommerziell erwerbliche humane Lungenfibroblasten-Zelllinie MRC-5 (CCL-171, ATCC, Manassas, VA, USA) verwendet, welche freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. K. Racké (Institut für Pharmakologie & Toxikologie, Universität Bonn) zur Verfügung gestellt wurde. Die Generierung dieser Zelllinie aus fötalem Lungengewebe wurde erstmals in der Arbeit von Jacobs et al. (1970) beschrieben. MRC-5-Zellen exprimieren verschiedene muskarinische Rezeptorsubtypen, die stärkste Expression zeigt jedoch der M₂-Rezeptor (Matthiesen et al., 2006). Diese Zelllinie bietet somit die Möglichkeit, M₂-Rezeptor-vermittelte Effekte in einem physiologisch relevanten Kontext zu untersuchen.

3.1.1. Zellbiologisches Arbeiten

Die Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchte kultiviert. Es handelt sich bei beiden Zelllinien um adhärent wachsende Zellen, wobei die CHO-Zellen in Zellkulturschalen (Ø145 mm) und die MRC-5-Zellen in Zellkulturflaschen (T175) mit den entsprechenden Medien kultiviert wurden. Alle zellbiologischen Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen an einer Werkbank mit laminarem Luftstrom.

CHO-hM₂/hM₃

Die CHO-Zellen wurden alle 2-3 Tage passagiert, sobald sie eine Konfluenz von ca. 80-100% erreicht hatten. Dafür wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml PBS (37°C) gewaschen. Anschließend wurde 3 ml Trypsin (RT) zugegeben und die Schale für 1-2 Minuten bei 37°C inkubiert, woraufhin sich die Zellen

abkugelten und nur noch locker am Boden der Zellkulturschale hafteten. Durch kurzes Klopfen an den Rand der Zellkulturschale wurden die Zellen endgültig vom Boden abgelöst. Die Zugabe von 7 ml Medium (37°C) stoppte die Trypsinisierung und die Zellen wurden 1:10 (ca. 2 Millionen Zellen) in neue Zellkulturschalen mit jeweils 20 ml Medium aufgeteilt.

Medium für Flp-In™-CHO

500 ml	Nutrient Mixture F-12 HAM	(R32)
+ 50 ml	Fötale Kälberserum (PAN)	(R27)
+ 5 ml	Penicillin/Streptomycin	(R33)
+ 6 ml	L-Glutamin-Lösung (200 mM)	(R29)

Humane Lungenfibroblasten (MRC-5)

Die MRC-5-Zellen wurden 1-2 x pro Woche passagiert, sobald sie eine Konfluenz von 100% erreichten und sich eng aneinanderlagerten. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen zweimal mit 10 ml PBS (37°C) gewaschen, anschließend wurden 5 ml Trypsin (37°C) zugegeben. Durch Schwenken der Zellkulturflasche wurde das Trypsin verteilt und danach sofort abgesaugt. Nach weiteren 10-15 Sekunden Inkubation in der Werkbank zogen sich die länglichen Fibroblasten zusammen und konnten durch kurzes Klopfen am Flaschenrand vom Boden gelöst werden. Mit 10 ml Medium (37°C) wurde die Trypsinisierung gestoppt, und die Zellen wurden entweder 1:20 (ca. 0,5 Millionen Zellen) oder je nach Bedarf in neue Zellkulturflaschen mit jeweils 25 ml Medium aufgeteilt. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2 - 3 Tage.

Medium für MRC-5

500 ml	Earle's MEM	(R26)
+ 50 ml	Fötale Kälberserum (PAN)	(R27)
+ 5 ml	Penicillin/Streptomycin	(R33)
+ 5 ml	Nicht-essentielle Aminosäuren (PAA)	(R30)
+ 5 ml	Natrium-Pyruvat	(R31)

Vor einem Versuch wurden die abgelösten Zellen (CHO und MRC-5) bei 185 x g für 4 Minuten (4°C) zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und die Zellen in frischem Medium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl mittels einer Zählkammer wurde die Zellsuspension entsprechend der gewünschten Zellzahl verdünnt und eingesetzt.

3.1.2. Kryokonservierung und Reaktivierung

Für die Kryokonservierung wurden einige Zellen eingefroren. Dazu wurden die Zellen wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben durch Trypsinisierung abgelöst und zentrifugiert (185 x g, 4 Minuten, 4°C). Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in eiskaltem DMSO-haltigen Medium resuspendiert. Bei den CHO-Zellen betrug der DMSO-Gehalt 10%, während bei den Fibroblasten 5% zum Gefrierschutz ausreichend waren. Bei den CHO-Zellen wurden jeweils die Zellen einer Platte (ø145 mm) in ein Einfrierröhrchen (V5) überführt, während die MRC-5-Zellen einer Zellkulturflasche (T175) auf fünf Einfrierröhrchen aufgeteilt wurden. Anschließend wurden die Röhrchen zügig in den mit 100%igen Isopropanol gefüllten Einfriercontainer (G3) überführt und bei -80°C eingefroren (1°C pro Minute). Nach ca. 24 Stunden wurden die Röhrchen mit den Zellen entnommen. Die Langzeitlagerung der Zellen erfolgte in bzw. über flüssigem Stickstoff. Für die Reaktivierung wurde der Inhalt eines Einfrierröhrchens rasch aufgetaut und die Zellen in Zellkulturschalen bzw. Zellkulturflaschen mit 37°C warmem Medium überführt. Nachdem sich erste Zellen angeheftet hatten, erfolgte am nächsten Tag ein Mediumwechsel.

3.2. Mausstämme (WT)

3.2.1. CD1

Bei diesem Albino-Mausstamm handelt es sich um eine Auszuchtlinie, welche sich durch ein gutmütiges Wesen auszeichnet und leicht zu handhaben ist. Aufgrund der hohen Reproduktionsrate (11-14 Nachkommen pro Wurf) eigneten sich diese Tiere besonders für die Gewinnung der atrialen embryonalen Kardiomyozyten, welche in den Frequenzmessungen verwendet wurden. Die adulten Herzen der schwangeren Muttertiere wurden zu Membranhomogenaten weiterverarbeitet und für Radioligand-Bindungsuntersuchungen verwendet.

Die Mäuse der Auszuchtlinie CD1 wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. B. Fleischmann aus dem Physiologischen Institut (Physiologie I) der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn zur Verfügung gestellt.

3.2.2. C57BL/6

Die Inzuchtlinie C57BL/6 ist eine der am häufigsten verwendeten Mausstämme und die Basis vieler Knock-out-Mäuse. Sie wurde für die Gewinnung von adulten Kardiomyozyten verwendet, an denen die Sarkomerverkürzung untersucht wurde. Einige Herzen wurden außerdem zur Herstellung von rezeptorhaltigen Homogenaten und anschließenden Radioligand-Bindungsuntersuchungen verwendet.

Die Mäuse der Inzuchtlinie C57BL/6 wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. R. Meyer aus dem Physiologischen Institut (Physiologie II) der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn zur Verfügung gestellt.

3.3. Herstellung von Rezeptorhomogenaten

3.3.1. Homogenate aus kardialem Gewebe

Zur Untersuchung der Bindungseigenschaften des murinen M_2 -Rezeptors wurden Membranhomogenate aus adulten Mäuseherzen der Mausstämme CD1 und C57BL/6 hergestellt. Aufgrund der Tatsache, dass sowohl im murinen Ventrikel, als auch im Atrium der M_2 -Rezeptor fast ausschließlich vertreten ist (Kitazawa et al., 1999), eigneten sich Membranhomogenate aus kardialem Gewebe besonders gut für die Charakterisierung des murinen M_2 -Rezeptors. Die Herstellung der Homogenate erfolgte analog der Beschreibung von Tränkle et al. (1996). Als interne Kontrolle wurden ebenfalls Homogenate aus Hausschwein-Herzventrikelgewebe hergestellt, welche in diesem Arbeitskreis bereits gut untersucht sind (Dittmann A., 2003; Antony J., 2007).

Die Mäuseherzen wurden in den Arbeitskreisen von Herrn Prof. Dr. Fleischmann (Physiologie I) und Herrn Prof. Dr. Meyer (Physiologie II) der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn von adulten Tieren entnommen. Nach der Isolierung wurden die Herzen mit PBS gespült, in ein Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Weiterverarbeitung erfolgte die Lagerung bei -80°C . Zur Herstellung der Schweineherzhomogenate aus Ventrikelgewebe wurden Schweineherzen vom Schlachthof Köln verwendet, welche ebenfalls bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert wurden.

Alle Schritte der Membranpräparation von murinen und porcinen Gewebhomogenaten wurden in einer Kühlkammer bei 4°C durchgeführt. Für das Schweineherzhomogenat (HSV = Homogenat Schwein Ventrikel) wurde ca. 40 g Ventrikelgewebe verwendet. Bei den Homogenaten aus Mäuseherzen musste aufgrund der Verfügbarkeit weniger Gewebe verwendet werden. Als Kontrolle wurde zusätzlich ebenfalls ein Schweineherzhomogenat mit 6 g Gewebereinwaage (HSV_{verd}) hergestellt, um evtl. auftretende Unterschiede in den Ergebnissen aufgrund der unterschiedlichen Einwaagen auszuschließen. Die eingefrorenen Mäuseherzen, sowie die abgeteilten Stücke der Schweineherzventrikel, wurden mit einem Wiegemesser möglichst fein zerteilt und zweimal mit ca. 20 ml 0,32 M Saccharoselösung gewaschen. Das Gewebe wurde anschließend mittels eines Waring-Blendor-Homogenisators (G16) weiter zerkleinert: 5 x im Abstand von je 30

Sekunden für jeweils 10 Sekunden auf Stufe „high“. Die erhaltene Suspension wurde dann mit 0,32 M Saccharoselösung auf das ca. 20-fache (bei 40 g Gewebe) bzw. auf das 50-fache (bei 5-14 g Gewebe) der Einwaage aufgefüllt. Mit Hilfe eines Glashomogenisators (G14) wurde die Suspension bei 1750 U/min homogenisiert: 5 x für 45 Sekunden pro Auf- und Abbewegung. Zur Abtrennung von Partikeln hoher Dichte, wie z.B. unzureichend zerkleinerten Gewebefragmenten, erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 300 x g für 11 Minuten (4°C). Die erhaltenen 'pellets' wurden verworfen und der Überstand einem zweiten Zentrifugationsschritt bei 80000 x g für 41 Minuten unterzogen (4°C), um die rezeptorhaltigen Membranfragmente abzutrennen. Diese rezeptorhaltigen Pellets wurden anschließend in Aqua dest. aufgenommen und mit Hilfe des Glashomogenisators nochmals bei 1500 U/min homogenisiert. Die 'pellets' des Schweineherzhomogenates wurden standardmäßig in einem Volumen resuspendiert, welches dem 4-fachen der Gewebeeinwaage entsprach. Demgegenüber wurden die Mäuseherzhomogenate (CD1, C57/BL6) und das verdünnte Schweineherzhomogenat (HSV_{verd}) in einem Volumen von der 14-fachen Einwaage resuspendiert. Die hergestellten Homogenate wurden anschließend durch ständiges Rühren stabil gehalten, à 1 ml aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu den Bindungsversuchen bei -80°C gelagert. Mit einem Aliquot der hergestellten Charge wurde der Proteingehalt nach Kapitel 3.5 bestimmt.

Bezeichnung	Homogenatgewebe	Einwaage	Proteingehalt
		[g]	[fmol/mg Protein]
HSV	Hausschwein-Ventrikelgewebe	42	8,20
HSV _{verd}	Hausschwein-Ventrikelgewebe	5,7	2,94
C57BL/6	Mäuseherzen (43)	5,6	7,46
CD1	Mäuseherzen (80)	13,7	8,09

Tab. 3.1 Homogenate aus kardialem Gewebe: Bezeichnung der hergestellten Gewebekomponente inklusive der Einwaagen für die Herstellung sowie deren Proteingehalte.

3.3.2. Homogenate aus Zellen

Für die Herstellung von rezeptorhaltigen Homogenaten aus Zellen wurden die Zelllinien CHO-hM₂ und -hM₃ sowie die humane Lungenfibroblasten-Zelllinie MRC-5 verwendet. Alle Zellen wurden dafür zuvor auf Zellkulturschalen (Ø145 mm) ausgesät und bis zum Erreichen einer Konfluenz von 100 % in Kultur gehalten. Vor der Präparation wurde den Zellen keine Substanz zur Steigerung der Proteinbiosynthese (z.B. Butyrat) zugefügt.

Zu Beginn der Präparation wurde das Medium abgesaugt und auf jede Zellkulturschale 2,4 ml Homogenisationspuffer (L9) gegeben. Die Zellen wurden anschließend vom Boden der Platte geschabt und der Inhalt von jeweils 5 Schalen in ein Zentrifugationsröhrchen (V22) überführt, welche auf Eis gelagert wurden. Die fünf Zellkulturschalen wurden anschließend insgesamt mit 6 ml Homogenisationspuffer gespült, welcher ebenfalls in das Zentrifugationsröhrchen überführt wurde. Die Zerkleinerung der Zellsuspension erfolgte bei Stufe 6 mit dem Polytron Homogenisator (G13) für 20 Sekunden. Nachdem jedes Zentrifugationsröhrchen diesen Zerkleinerungsschritt zweimal durchlaufen hatte, folgten drei Zentrifugationsschritte:

1. 40000 x *g* für 10 Minuten (2°C): Der Überstand wurde verworfen und die erhaltenen '*pellets*' in jeweils 20 ml Zentrifugationspuffer resuspendiert.
2. 40000 x *g* für 10 Minuten (2°C): Der Überstand wurde verworfen und die erhaltenen '*pellets*' erneut in jeweils 20 ml Zentrifugationspuffer resuspendiert.
3. Zentrifugation bei 40000 x *g* für 10 Minuten (2°C)

Nach dem dritten Zentrifugationsschritt wurden die '*pellets*' in Aqua dest. aufgenommen und sorgfältig resuspendiert.

- CHO-Zellen: Die Pellets von 40 Platten wurden in 30 ml Aqua dest aufgenommen.
- MRC-5-Zellen: Die Pellets von 40 Platten wurden in 15 ml Aqua dest aufgenommen.

Die erhaltenen Membranhomogenate wurden zu jeweils 1 ml aliquotiert, eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.4. Isolierung von Kardiomyozyten

Experimente mit primären Zellen wurden mit Kardiomyozyten durchgeführt, welche zuvor aus Mäusen isoliert wurden. Die Isolierung erfolgte in den Laboren des Physiologischen Instituts der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn. Embryonale atriale Kardiomyozyten wurden in den Laboren von Herrn Prof. Dr. Fleischmann (Physiologie I) isoliert, während die Isolierung adulter ventrikulärer Kardiomyozyten in den Laboren von Herrn Prof. Dr. Mayer (Physiologie II) erfolgte.

3.4.1. Isolierung von embryonalen atrialen Kardiomyozyten

Vor dem Beginn der Isolation wurden Gelatine-beschichtete Deckgläser (V7) hergestellt, sowie das chirurgische Besteck mittels eines Glaskornsterilisators (G5) bei 250°C für ca. 20 Sekunden hitzesterilisiert. Für die Herstellung der Deckgläser wurden diese autoklaviert, unter sterilen Bedingungen in Petrischalen (35 mm) gelegt und mit 0,1%iger Gelatine-Lösung (L6) überschichtet. Nach einer Inkubation von 1 h bei 37°C wurde die Gelatine abgesaugt. Nach einer kurzen Antrocknung der Gelatine (ca. 10 Minuten) konnten die Deckgläser verwendet werden.

Das verwendete chirurgische Besteck bestand aus 1 anatomischen Schere (stumpf/stumpf) 13 cm, 1 Mikroskopierschere 11 cm, 1 anatomischen Pinzette 16 cm, 1 chirurgischen Pinzette (2x3 Zähne) 15,5 cm und 2 feinen Pinzetten (#5/45) 11 cm.

Die Isolierung der embryonalen Kardiomyozyten erfolgte analog der Beschreibung von Fleischmann et al. (2004). Es wurden schwangere Muttertiere des Mausstamms CD1 verwendet. Die Kardiomyozyten wurden aus den Atrien der Embryonen gewonnen, welche sich im Entwicklungsstadium E 14,5 - 16,5 befanden (Abb.3.1). Die Tötung der schwangeren Muttertiere erfolgte mittels zervikaler Dislokation, anschließend wurde das Tier mit 70%igem Ethanol zur Desinfektion und Vermeidung von Haaren in der Präparation besprüht. Durch Öffnung der Bauchdecke wurde die Bauchhöhle freigelegt und die beiden Uterushörner entnommen. Die Uterushörner und die darin enthaltenen Embryonen wurden in eine mit eiskaltem PBS gefüllte Petrischale (∅ 92 mm) überführt. Alle weiteren Arbeitsschritte der Isolierung erfolgten unter sterilen Bedingungen.

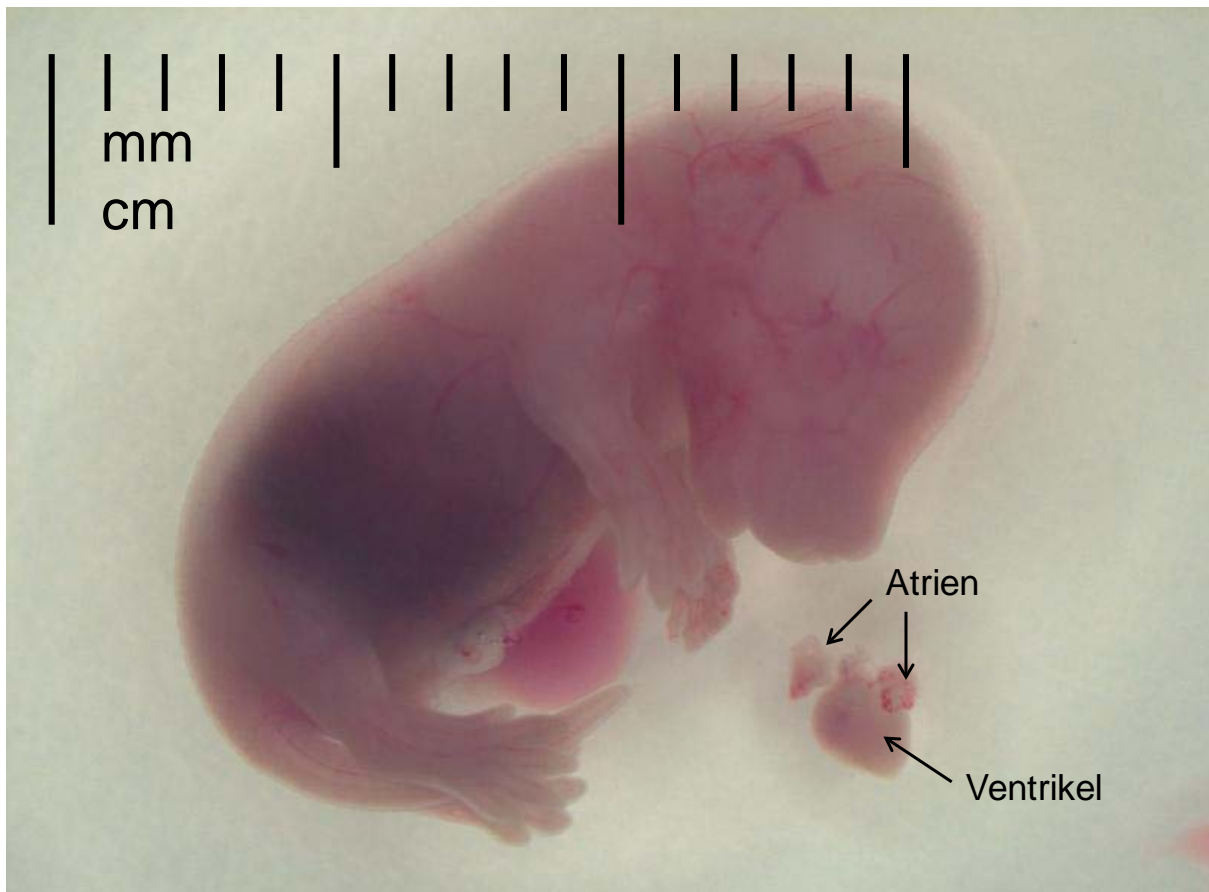


Abb.3.1 Muriner Embryo: Abbildung eines murinen Embryo des Mausstamms CD1 im Entwicklungsstadium E 14.5-16.5 mit einem isolierten Herzen

Die Embryonen wurden aus dem Uterus präpariert und anschließend dekapitiert. Unter Zuhilfenahme eines Stereomikroskops wurden die Herzen aus den Embryonen mittels feiner Pinzetten entnommen und die Atrien von den Ventrikeln getrennt. Jeweils 15-20 Atrien wurden in mit Collagenase B-Lösung (L10) gefüllte Reaktionsgefäße (1,5 ml) überführt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Atrien für ca. 5 Sekunden kurz anzentrifugiert, so dass ein Pellet entstand. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet mit 1 ml frischem Medium aufgewirbelt. Die Triturierung der Atrien erfolgte mittels einer 1 ml Pipette bis keine Gewebsfragmente mehr sichtbar waren. Um die Vereinzelnung der Zellen zu fördern wurde die Zellsuspension bei 300 U/min für weitere 10 Minuten rotiert. Jeweils 200-250 µL der hergestellten Zellsuspension wurden auf Gelatinebeschichtete Deckgläser ausgesät und bis zur Messung für 48 Stunden kultiviert (37°C, 5% CO₂ und 96%iger Luftfeuchte). 24 Stunden nach der Isolierung wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um nicht angewachsene und abgestorbene Zellen zu entfernen. Bei diesem Mediumwechsel konnten bereits erste spontan schlagende Kardiomyozyten beobachtet werden.

Medium für embryonale Kardiomyozyten (100 ml)

77,9 ml	IMDM	(R28)
20 ml	Fötale Kälberserum (Invitrogen)	(R27)
1 ml	Penicillin/Streptomycin	(R33)
1 ml	Nicht-essentielle Aminosäuren (Invitrogen)	(R30)
100 µl	2-Mercaptoethanol-Stammlösung (100 mM)	(R25)

3.4.2. Isolierung von adulten ventrikulären Kardiomyozyten

Für die Isolierung der adulten ventrikulären Kardiomyozyten wurden männliche und weibliche Mäuse des Mausstamms C57BL/6 verwendet. Die Isolation erfolgte analog der Beschreibung von Tiemann et al. (2003). Aufgrund der Tatsache, dass die isolierten Zellen noch am selben Tag vermessen wurden, erfolgte die Präparation nicht unter sterilen Bedingungen. Das verwendete chirurgische Besteck bestand aus 1 anatomischen Schere (stumpf/stumpf) 13 cm, 1 Mikroskopierschere 11 cm, 1 anatomischen Pinzette 16 cm, 1 Augenschere und 2 feinen Pinzetten (#5/45) 11 cm.

Die Tiere wurden mittels zervikaler Dislokation getötet, auf einer Unterlage fixiert und die Bauchhöhle wurde großflächig bis zum Rippenbogen freigelegt. Die anschließende Öffnung des Thorax erfolgte, indem das Zwerchfell am Rippenbogen entlang aufgeschnitten und das Brustbein durchtrennt wurde. Das noch schlagende Herz wurde entnommen und in eine Petrischale mit einer Calcium-freien EGTA-Tyrode (L3) überführt (EGTA = Ethylenglycol-tetra-Acetessigsäure). Unter einer Stereolupe wurde das Herz von unerwünschten Geweberesten befreit und der Aortenstumpf mittels einer Augenschere freipräpariert. Dieser wurde anschließend über eine mit EGTA-Tyrode (L3) gefüllte Glaskanüle gezogen, bis die Kanülenspitze in den linken Ventrikel hineinragte. Nach Fixierung des Herzens mittels eines Fadens wurde die Glaskanüle mit der Langendorff-Perfusionsanlage luftblasenfrei verbunden (siehe Abb.3.2) und die Perfusion gestartet.

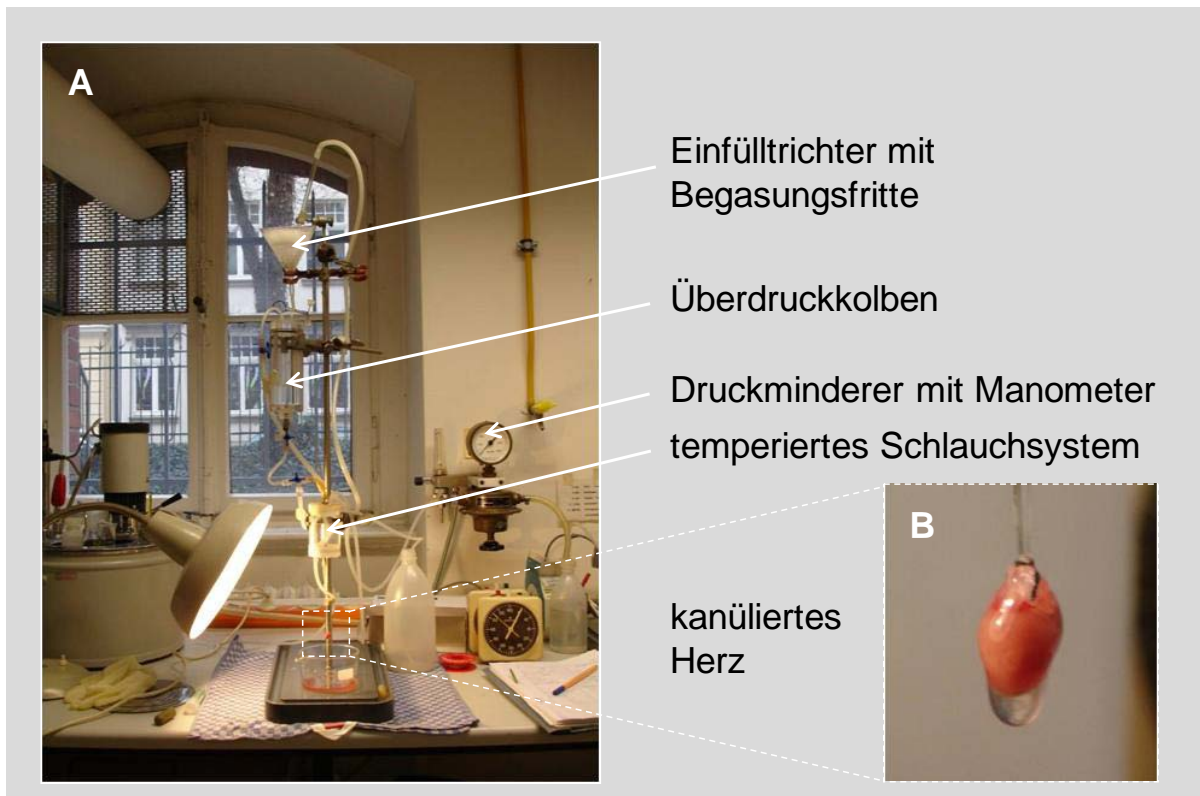


Abb.3.2 Langendorff-Perfusionsanlage: (A) Aufbau der Anlage; (B) Aufnahme eines kanülierten Herzens.

Die Perfusionsanlage bestand aus einem Trichter mit Begasungsfritte, einem Überdruckkolben und einem beheizten Schlauchsystem, an dessen Ende sich die Glaskanüle mit dem fixierten Herzen befand. Die Begasungsfritte ermöglichte die Anreicherung der Lösungen mit Sauerstoff, welche anschließend in den Überdruckkolben geleitet wurden. Vom Überdruckkolben aus gelangten die Lösungen in das beheizte Schlauchsystem, in dem die Erwärmung der Lösungen auf 36°C stattfand. Nach Beginn der Perfusion erkannte man bei einem korrekten Sitz der Glaskanüle wie sich das Herz aufblähte. Während der Perfusion wurde die Tropfgeschwindigkeit visuell kontrolliert, sowie die Temperatur des Herzens (34 - 36°C) mittels eines Thermometers geprüft. Über die Änderung des Perfusionsdrucks bzw. der Positionierung einer externen Wärmequelle wurde die Einhaltung der optimalen Perfusionsbedingungen gewährleistet. Der angestrebte Perfusionsdruck betrug während der Perfusion maximal 0,03 bar.

Alle Lösungen wurden vor ihrem Einsatz für mindestens 30 Sekunden mit Sauerstoff begast und nach folgendem Schema eingesetzt:

- EGTA-Lösung (Ca^{2+} -frei) (L3) 5 Minuten
- Hoch konzentrierte Kaliumlösung (L8) 5 Minuten
- Trypsinlösung (c = 1 mg/30 ml) (L15) 7-8 Minuten
- Hoch konzentrierte Kaliumlösung (L8) 2 Minuten
- Kollagenaselösung (c = 15 mg/25 ml) (L11) 7-8 Minuten

Durch den Einsatz Ca^{2+} -freier EGTA-Lösung wurden weitere spontane Kontraktionen des Herzens reduziert. Der Chelatbildner EGTA diente dazu, das restliche extrazelluläre Calciumionen zu komplexieren. Die anschließende Erhöhung der extrazellulären K^+ -Konzentration, führte einerseits zu einer Reduktion der Triebkraft für den K^+ -Ausstrom und erhöhte andererseits die Leitfähigkeit für den K^+ -Einstrom. Dies führte zu einer Absenkung des Ruhemembranpotentials und zur Inaktivierung der schnellen Na^+ - und Ca^{2+} -Kanäle. Der Herzmuskel war somit nicht mehr in der Lage zu kontrahieren, was die Ausbeute an lebensfähigen Zellen nach der enzymatischen Isolation erhöht. Die eingesetzten enzymatischen Lösungen führten zur Auftrennung von Zell-Zell-Verbindungen und ermöglichten die Gewinnung von Einzelzellen. Während der Perfusion mit Trypsin nahm die Tropfgeschwindigkeit langsam ab und die aus dem Herz abtropfende Lösung wurde viskös. Bei der anschließenden Perfusion mit Kollagenase stieg dagegen die Tropfgeschwindigkeit wieder stark an, was auf eine Auflösung der Zell-Zell-Verbindungen hindeutete. Nach dem Ende der Perfusion wurde das Herz eingeschnitten, damit restliche Kollagenaselösung abtropfen konnte. Das Herz wurde oberhalb des Kammergewebes von der Kanüle abgeschnitten und in ein Becherglas mit ca. 10 - 15 ml Messlösung (L13; 36°C) überführt. Mit einer Schere wurde das Herz mechanisch zerkleinert und anschließend mit einem Glasstab noch feiner zerrieben. Durch den Zusatz eines Trypsinhibitors und BSA (Bovine Serum Albumin) in der Messtyrode wurden mögliche Reste der Enzymlösungen inaktiviert. Die Zellsuspension wurde nach Filtration über eine Filtergaze (Maschenweite: 125 μm) in zwei Zentrifugationsröhrchen überführt und kurz anzentrifugiert. Das gebildete 'pellet' war von bräunlicher Farbe, der Überstand wurde abpipettiert und die 'pellet' mit 5 ml

frischer Messlösung aufgewirbelt. Danach schloss sich eine Sedimentationszeit von 7 Minuten bei 36°C an. Zellen, welche sich in dieser Zeitspanne auf den Boden der Röhren abgesetzt hatten, wurden für weitere Messungen verwendet. Der Überstand wurde erneut abpipettiert und das sedimentierte *'pellet'*, welches nun von gelber Farbe war, mit frischer Messlösung versetzt. Die Zellen wurden bis zu ihrer Vermessung in einem mit Sauerstoff begasten Erlenmeyerkolben (RT) verwahrt.

3.5. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von Lowry et al. (1951) durchgeführt. Die Basis dieser Methode ist die Molybdänblau-Reaktion, welche auf der Reduktion von Molybdän im sechswertigen Zustand in den vierwertigen beruht. Dieser reduzierte Zustand ist als kolloidal gelöstes Mischoxid definiert ($\text{MoO}_2 + \text{MoO}_3$).

Für die Proteinbestimmung wurde zuerst eine Eichreihe aus humanem Serumalbumin (HSA) generiert (0,25 – 2 mg/ml), anhand derer die Proteinkonzentrationen von Homogenaten und zerkleinerten Zellsuspensionen bestimmt wurde. Jeweils 200 µl der hergestellten Albuminverdünnungen wurden mit 2 ml Arbeitslösung (L1) versetzt. Durch die Zugabe der Arbeitslösung wurden die Polypeptidketten in Kupfer-Protein-Komplexe überführt, welche die Empfindlichkeit der Molybdänblau-Reaktion erhöhen. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurde den Ansätzen unter Schütteln 200 µl Folin-Ciocalteu's Phenolreagenz-Lösung (L5) zugegeben und weitere 30 Minuten unter Lichtausschluss inkubiert. Während dieser Inkubation reduziert der Kupfer-Protein-Komplex das Molybdän. Anschließend wurde die Absorption der Proben bei einer Wellenlänge von 500 nm mittels eines UV-VIS-Spektrometers (G15) bestimmt. Durch Auftragung der Absorption gegen die Proteinmenge wurde die Eichgerade erstellt. Alle Werte wurden in Doppelbestimmung erhoben. Die hergestellten rezeptorhaltigen Homogenate und die Zellsuspensionen wurden vor ihrer Vermessung entsprechend verdünnt (1:1, 1:2, 1:4 und 1:8), so dass sich die Absorptionswerte im Gültigkeitsbereich des Lambert-Beerschen-Gesetzes befanden.

3.6. Radioligand-Bindungsstudien

Zur Ermittlung der Bindungseigenschaften muskarinischer Rezeptoren aus verschiedenen Expressionssystemen wurden Radioligand-Bindungsexperimente durchgeführt. Die Analyse von Bindungsexperimenten beruht auf dem Massenwirkungsgesetz, mit dessen Hilfe die Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor quantifiziert wird. Dieses Gesetz besagt, dass die Geschwindigkeit einer chemischen Reaktion proportional dem Produkt der Konzentrationen der Reaktionspartner ist. Um das Massenwirkungsgesetz zur Analyse von Bindungsexperimenten anwenden zu können, müssen nach Motulsky und Christopoulos (2004) folgende Annahmen erfüllt sein:

- Alle Rezeptoren sind für den Liganden gleichermaßen zugänglich.
- Die Rezeptoren liegen entweder frei oder mit einem Liganden gebunden vor.
- Die Bindung verändert weder den Liganden noch den Rezeptor.
- Die Bindung ist reversibel.

Im Fall der reversiblen Ligand-Rezeptor-Bindung laufen Assoziations- und Dissoziationsvorgänge gleichzeitig ab:



- [R]: Konzentration freier Rezeptor
- [L]: Konzentration freier Ligand
- [RL]: Konzentration Rezeptor-Ligand-Komplex
- k_{+1} : Geschwindigkeitskonstante der Assoziation
- k_{-1} : Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation

Bezüglich des Massenwirkungsgesetzes ergeben sich für die Geschwindigkeiten der Assoziation (v_{Ass}) und Dissoziation (v_{Diss}) folgende Gleichungen:

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

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

Ein Gleichgewicht stellt sich dann ein, wenn Assoziation und Dissoziation dieselben Geschwindigkeiten haben ($v_{\text{Ass}} = v_{\text{Diss}}$):

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

Aus dem Quotienten der Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation (k_{-1}) und der Assoziation (k_{+1}) berechnet sich die Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_D). Sie entspricht der Ligandkonzentration, bei der die Hälfte des Liganden gebunden am Rezeptor vorliegt (= halbmaximale Rezeptorbesetzung). Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante ist somit ein Maß für die Affinität des Liganden zum Rezeptor.

$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{[R][L]}{[RL]} = \frac{1}{K_A} \quad \text{Gleichung 5}$$

K_D : Gleichgewichtsdissoziationskonstante

K_A : Gleichgewichtsassoziationskonstante

Ist beispielsweise die Geschwindigkeitskonstante der Assoziation (k_{+1}) im Vergleich zur Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation (k_{-1}) groß, so wird die Bildung von Ligand-Rezeptor-Komplexen begünstigt. In diesem Fall ist K_D klein und die Affinität des Liganden zum Rezeptor hoch.

Da die Konzentration an frei vorliegenden Rezeptoren ($[R]$) nicht direkt bestimmt werden kann, wird sie aus der in dem System maximal vorhandenen Anzahl an Rezeptoren (B_{max}) und den gebildeten Rezeptor-Ligand-Komplexen ($[RL]$) berechnet:

$$[R] = B_{\text{max}} - [RL] \quad \text{Gleichung 6}$$

$[R]$: Konzentration freier Rezeptoren

B_{max} : maximale Anzahl der Bindungsstellen

$[RL]$: Konzentration von Rezeptor-Ligand-Komplexen

Die die anschließende Multiplikation mit der freien Ligandkonzentration ergibt:

$$[R][L] = B_{\text{max}}[L] - [RL][L] \quad \text{Gleichung 7}$$

Durch den Ersatz von $[R][L]$ durch $K_D \times [RL]$ erfolgt eine weitere Umformung zu:

$$K_D \times [RL] = B_{\max} [L] - [RL][L] \quad \text{Gleichung 8}$$

Die Auflösung nach $[RL]$ verdeutlicht, dass das Ausmaß der Bildung von Rezeptor-Ligand-Komplexen von der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten, der eingesetzten Ligandkonzentration und der Anzahl an Rezeptoren abhängt:

$$[RL] = \frac{B_{\max} \times [L]}{[L] + K_D} \quad \text{Gleichung 9}$$

3.6.1. Inhibitionsexperimente im Gleichgewicht

In Gleichgewichtsbindungsexperimenten wird die Rezeptorbindung einer fixen Radioligandkonzentration in Gegenwart verschiedener Konzentrationen eines unmarkierten Liganden (Inhibitor) nach dem Erreichen des Gleichgewichts bestimmt. Zur Auswertung wird die gemessene Radioaktivität (= Gesamtbindung) gegen den Logarithmus der eingesetzten Konzentration des Inhibitors aufgetragen. Binden Radioligand und Inhibitor reversibel an die gleiche Bindungsstelle, ergibt sich nach Anwendung der 4-Parameter-logistischen Gleichung (Barlow und Blake, 1989) eine sigmoide Kurve.

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

B_{ges} :	Gesamtbindung des Radioliganden
Bottom:	unteres Plateau der Kurve
Top:	oberes Plateau der Kurve
EC_{50} :	Wendepunkt der Kurve
x:	Konzentration des unmarkierten kalten Liganden
n_H :	Kurvensteilheit

Das obere Plateau der Kurve (Top) entspricht der Bindung des Radioliganden in Abwesenheit eines Inhibitors, während das untere Plateau (Bottom) der unspezifischen Bindung entspricht. Die unspezifische Bindung bezeichnet die Radioligandbindung, welche nicht rezeptorspezifisch ist. Diese wurde in den durchgeführten Versuchen mit einem Überschuss des orthosterischen Liganden Atropin bestimmt. Zieht man von der Gesamtbindung die ermittelte unspezifische

Bindung ab, erhält man die spezifische Bindung des Radioliganden für den untersuchten Rezeptor. Die Konzentration des Inhibitors, welcher die Bildung der Radioligand-Rezeptor-Komplexe um 50% reduziert, wird durch den Wendepunkt der Kurve beschrieben und als IC_{50} angegeben. Der Hill-Koeffizient (n_H) beschreibt die Steilheit der Kurve. Ein Hill-Koeffizient von -1 entspricht einer 1:1-Interaktion von Ligand und Rezeptor. Flache Kurven ($n_H > -1$) können sich ergeben, wenn die Rezeptoren den unmarkierten Liganden nicht mit derselben Affinität binden, steile Kurven ($n_H < -1$) dagegen, wenn das Bindungsgleichgewicht noch nicht erreicht ist. Mittels eines F-Tests kann geprüft werden, ob die Datenpunkte besser mit einer monophasischen Kurvenanpassung beschrieben werden, deren Steilheit -1 beträgt, oder ob das Steilheitsmaß von -1 signifikant verschieden ist.

3.6.1.1. Homologe Konkurrenz

Homologen Konkurrenzversuche werden durchgeführt, um die Affinitätskonstante der Radioligandbindung (K_D) und die Anzahl der vorhandenen Bindungsstellen (B_{max}) zu bestimmen. Mittels der Gleichung von Cheng und Prusoff (1973) wird der Wendepunkt der sigmoiden Inhibitionskurve (IC_{50}) in die Affinitätskonstante des Inhibitors (K_I) umgewandelt.

$$K_I = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L]}{K_D}} \quad \text{Gleichung 11}$$

K_I : Affinitätskonstante des Inhibitors zum Rezeptor

$[L]$: Konzentration des eingesetzten Radioliganden

K_D : Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Radioligandbindung

Die Affinitätskonstante ist im Gegensatz zum Wendepunkt weder von der Art des Radioliganden abhängig, noch von dessen eingesetzter Konzentration. Da bei der homologen Konkurrenz Radioligand und Inhibitor die gleiche chemische Struktur besitzen, sind die Affinitätskonstanten K_D und K_I identisch und die Gleichung vereinfacht sich zu:

$$K_D = K_I = IC_{50} - [L] \quad \text{Gleichung 12}$$

Das Ausmaß der Rezeptorexpression (B_{\max}) wurde mit Hilfe der Gleichung von DeBlasi et al. (1989) bestimmt:

$$B_{\max} = \frac{B_0 \times IC_{50}}{[L]} \quad \text{Gleichung 13}$$

B_{\max} : maximale Anzahl der Bindungsstellen

B_0 : spezifische Bindung des Radioliganden (Top - Bottom)

Im Falle der Untersuchung von Membranhomogenaten wurde die Anzahl der Bindungsstellen in fmol pro mg Protein angegeben und bei Bindungsexperimenten mit ganzen Zellen in Rezeptoren pro Zelle. Durch die Vermeidung einer Wegbindung der eingesetzten Radioligandkonzentration von mehr als 10%, konnte die Radioligandkonzentration $[L]$ in den genannten Gleichungen mit der eingesetzten Radioligandkonzentration gleichgesetzt werden.

3.6.1.2. Heterologe Konkurrenz

Bei der heterologen Konkurrenz sind Radioligand und Inhibitor strukturell verschieden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl rein orthosterische Liganden als auch dualsterische Hybridliganden eingesetzt. Die Hybridliganden besitzen aufgrund ihres allosterischen Bausteins die Fähigkeit rein allosterisch am Rezeptor zu binden und verzögern aus diesem Grund in kinetischen Experimenten die Dissoziationsgeschwindigkeit des orthosterischen Radioliganden [^3H]NMS vom Rezeptor. In Gleichgewichtsexperimenten überwiegt bei den Hybridliganden jedoch der dualsterische Bindungsmodus, bei dem der orthosterische Radioligand aus seiner Bindungstasche verdrängt wird. Aufgrund der Tatsache, dass für die Berechnung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten im dualsterischen Bindungsmodus (K_{Bdual}) nach Antony et al. (2009) benötigte Parameter unbekannt waren, erfolgte die Auswertung analog orthosterischer Agonisten. Die Inhibitionskonstante K_i des kalten Liganden, ergibt sich aus dem Wendepunkt der sigmoiden Inhibitionskurve (IC_{50}) nach Anwendung der Cheng-Prusoff-Korrektur (Gleichung 11). Weicht die Steilheit stark von -1 ab, ist es schwer, den IC_{50} zu interpretieren und es wurde die apparente Affinitätskonstante (K_{app}) angegeben.

Aufgrund der Fähigkeit dualsterischer Liganden, die Dissoziationsgeschwindigkeit orthosterischer Radioliganden zu verändern, wurde vor ihrem Einsatz in Gleichgewichtsexperimenten die notwendige Inkubationszeit berechnet. Dazu wurde zunächst der Einfluss der dualsterischen Liganden auf die [³H]NMS-Dissoziation mit Hilfe der "Zwei-Punkt-Kinetik" nach Kostenis und Mohr (1996) (Kapitel 3.6.2) untersucht und der EC_{50Diss} bestimmt. Mit Hilfe der Gleichung nach Lazareno und Birdsall (1995) konnte anschließend die Dissoziationshalbwertszeit des Radioliganden in Gegenwart des allosterischen Modulators (t_{1/2G}) berechnet werden. Die Inkubationszeit für Gleichgewichtsuntersuchungen betrug das Drei- bis Fünffache der berechneten Halbwertszeit t_{1/2G}.

$$t_{1/2G} = t_{1/2off} \times \left(1 + \frac{[A]}{EC_{50Diss}} \right) \quad \text{Gleichung 14}$$

- t_{1/2G}: Dissoziationshalbwertszeit der Radioligand-Rezeptor-Komplexe in Gegenwart der Modulatorkonzentration [A]
- t_{1/2off}: Dissoziationshalbwertszeit des Radioligand-Rezeptor-Komplexe unter Kontrollbedingungen
- [A]: Konzentration des Modulators
- EC_{50Diss}: Konzentration des Liganden, welche die Radioliganddissoziation um 50% verzögert.

3.6.2. Kinetische Experimente

Mit Hilfe von kinetischen Experimenten wurde die Wirkung allosterischer Modulatoren und dualsterischer Hybridliganden auf die Dissoziationsgeschwindigkeit des orthosterischen Radioliganden [³H]NMS vom Rezeptor betrachtet. Zur Bestimmung der Dissoziation von [³H]NMS erfolgte zuerst eine Vorinkubation von Radioligand und Rezeptor, welche die initiale Bildung von Radioligand-Rezeptorkomplexen ermöglichte. Anschließend wurde durch die Zugabe einer hohen Konzentration des unmarkierten orthosterischen Liganden Atropin die Dissoziationsmessung gestartet. Durch den Überschuss an Atropin wurden alle frei vorliegenden Rezeptoren von Atropin besetzt und das Gleichgewicht zwischen Radioligandassoziation und –dissoziation zugunsten der Dissoziation verschoben. Folglich sankt die Anzahl von Radioligand-Rezeptorkomplexen, wenn zu verschiedenen Zeitpunkten nach Atropinzugabe die gebundene Radioaktivität bestimmt wurde.

Durch die Abnahme der spezifischen Radioligandbindung über die Zeit konnte nun durch Anwendung der einphasigen exponentiellen Zerfallsfunktion die Geschwindigkeit, mit welcher der Radioligand vom Rezeptor dissoziiert, beschrieben werden:

$$[B_t] = [B_0] \times e^{-k_{-1} \times t} \quad \text{Gleichung 15}$$

- [B_t]: Spezifische Bindung des Radioliganden zum Zeitpunkt t
[B₀]: Spezifische Bindung des Radioliganden zum Zeitpunkt t = 0
k₋₁: Geschwindigkeitskonstante der Radioliganddissoziation
t: Zeit nach Atropinzugabe

Aus der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k₋₁) lässt sich die Halbwertszeit (t_{1/2}) berechnen. Diese gibt an, innerhalb welcher Zeit die Anzahl der Radioligand-Rezeptorkomplexe um die Hälfte reduziert wurde:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{-1}} \quad \text{Gleichung 16}$$

Die Dissoziation eines orthosterischen Radioliganden vom Rezeptor kann nur von einem Liganden modifiziert werden, der an eine Bindungsstelle bindet, welche sich von der orthosterischen Bindungsstelle unterscheidet. Folglich ist eine veränderte Radioliganddissoziation bezeichnend für einen allosterischen Effekt. Die Verzögerung der Radioligand-Dissoziationsgeschwindigkeit um 50% durch den Einsatz allosterischer Liganden wurde mittels der "Zwei-Punkt-Kinetik" nach Kostenis und Mohr (1996) bestimmt und als EC_{50Dis} angegeben.

Im Gegensatz zur Bestimmung kompletter Dissoziationsverläufe wird bei der Methode der "Zwei-Punkt-Kinetik" die Menge der Radioligand-Rezeptor-Komplexe nur zu zwei Zeitpunkten bestimmt. Der erste Messwert wird zu Beginn des Versuchs nach einer 30-minütigen Vorinkubation von Radioligand und Rezeptor aufgenommen (t = 0). Anschließend erfolgt die alleinige Zugabe von Atropin (Kontrolle) bzw. von Atropin + allosterischem Modulator. Der zweite Messpunkt wird nun nach ca. 1,5 Halbwertszeiten der Radioliganddissoziation unter Kontrollbedingungen erfasst. Nach Berechnung der spezifischen Bindung werden die beiden Messpunkte mit der einphasigen exponentiellen Zerfallsfunktion (Gleichung 15) ausgewertet und man

erhält die Geschwindigkeitskonstante der [³H]NMS-Dissoziation in Gegenwart der verwendeten Alloster-Konzentrationen. Trägt man die Werte der ermittelten Geschwindigkeitskonstanten gegen die logarithmische Konzentration des eingesetzten Allostere auf, erhält man durch die Anwendung der 4-Parameter-logistischen Gleichung (Gleichung 10) eine sigmoide Kurve. Der Wendepunkt dieser Kurve entspricht der eingesetzten Allosterkonzentration, welche notwendig ist, um die Dissoziationsgeschwindigkeit des Radioliganden halbmaximal zu reduzieren (EC_{50Dis}). Der EC_{50Dis} ist folglich ein Maß für die Affinität des allosterischen Modulators zum [³H]NMS-besetzten Rezeptor.

3.6.3. Durchführung der Radioligandbindungsexperimente

Die Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Bindungsexperimente wurden an rezeptorhaltigen Homogenaten sowie an ganzen Zellen durchgeführt. Bei den Homogenaten handelte es sich um Gewebshomogenate aus porcinem oder murinem kardialem Gewebe, sowie um Zellhomogenate, die entweder aus CHO-hM₂-, CHO-hM₃- oder MRC-5-Zellen hergestellt wurden. Die Bindungsexperimente mit rezeptorhaltigen Homogenaten wurden bei 23°C in 5 mM Na,K,PO₄-Puffer (pH 7,4) durchgeführt. Dieser Puffer begünstigt eine hohe Radioligandbindung und ermöglicht außerdem eine gute Detektion von Unterschieden hinsichtlich der allosterischen Rezeptorbesetzung (Straßmann V., 2007). Die Zelllinien (CHO-hM₂, CHO-hM₃ und MRC-5) wurden zusätzlich in Ganzzell-Bindungsexperimenten eingesetzt. Die Experimente an ganzen Zellen wurde bei 28°C im HBSS-Puffer (L7) durchgeführt, welcher ebenfalls in verschiedenen funktionellen Experimenten zum Einsatz kam.

Tritiiertes N-Methylscopolamin ([³H]NMS), ein inverser Agonist am muskarinischen Acetylcholinrezeptor, wurde in allen Versuchen als orthosterischer Radioligand eingesetzt. Die Bestimmung der unspezifischen Radioligandbindung erfolgte durch die Zugabe von Atropin im Überschuss. Alle Bindungsexperimente wurden in Borosilikatgläsern (V1) in einem Ansatzvolumen von 1,5 ml in Doppelbestimmung durchgeführt.

3.6.3.1. Gleichgewichtsbindungsexperimente

Die Versuche im Gleichgewicht wurden entsprechend der Pipettierschemata für Homogenate (Tab. 3.2) bzw. ganze Zellen (Tab. 3.3) in die Versuchsgläschen pipettiert und bis zur Einstellung des Gleichgewichts bei 23°C im Wasserbad inkubiert. Nach Ablauf der vorgesehenen Inkubationszeit wurde der Versuch durch Abfiltration mit dem Brandel Harvester (G2) beendet (siehe Kapitel 0) und die Radioaktivität mittels Flüssigszintillation (siehe Kapitel 3.6.5) bestimmt.

Eingesetzte Lösung	Gesamtbindung	Unspezifische Bindung	Bindung mit Inhibitor	Endkonzentration im Ansatz
[³ H]NMS	100 µl	100 µl	100 µl	0,2 nM
Aqua dest.	50 µl	-	-	
Atropin	-	50 µl	-	1 µM
Inhibitor			50 µl	quantum satis
Puffer Na,K,PO ₄	1100 µl	1100 µl	1100 µl	5 mM
Homogenat	250 µl	250 µl	250 µl	quantum satis

Tab. 3.2 Pipettierschema für Inhibitionsexperimenten mit Membranhomogenaten: Ausgenommen vom Puffer wurden alle Komponenten in A.dest gelöst und eingesetzt. Die eingesetzte Na,K,PO₄-Pufferkonzentration betrug 6,8 mM.

Eingesetzte Lösung	Gesamtbindung	Unspezifische Bindung	Bindung mit Inhibitor	Endkonzentration im Ansatz
[³ H]NMS	100 µl	100 µl	100 µl	0,2 nM
Atropin	-	50 µl	-	1 µM
Inhibitor			50 µl	quantum satis
Puffer (L7)	900 µl	850 µl	850 µl	
Zellsuspension	500 µl	500 µl	500 µl	100 000 Zellen/ml

Tab. 3.3 Pipettierschema für Inhibitionsexperimenten mit ganzen Zellen: Radioligand, Atropin, Inhibitor und die Zellsuspension wurden für diese Versuche im HBSS-Puffer (L7) hergestellt und eingesetzt.

3.6.3.2. Kinetische Experimente

War die Dissoziationsgeschwindigkeit des eingesetzten Radioliganden [³H]NMS vom Rezeptor unbekannt (z.B. bei MRC-5), wurden zuerst komplette Dissoziationsverläufe aufgenommen. Anschließend wurde die [³H]NMS-dissoziationsverzögernde Wirkung allosterischer Liganden mit Hilfe der "2-Punkt-Kinetik" bestimmt. Kinetische Experimente wurden im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich mit Rezeptorhomogenaten im 5 mM Na,K,PO₄-Puffer (pH 7,4) bei 23°C durchgeführt. Die Radioligandkonzentration betrug 0,2 bzw. 1 nM und die Atropinkonzentration zur Bestimmung der unspezifischen Bindung dementsprechend 1 bzw. 3 µM.

Kompletter Dissoziationsverlauf

Radioligand, Puffer und Aqua dest. bzw. Atropin (unspezifische Bindung) wurden in die Versuchsgläschen vorgelegt (Tab. 3.4). Nach Zugabe der Membransuspension erfolgte eine Inkubation der Proben für 30 Minuten bei 23°C. Anschließend wurde die Dissoziationsmessung durch Zugabe von Atropin im Überschuss gestartet. Durch die Bestimmung der gebundenen Radioaktivität zu verschiedenen Zeitpunkten nach Atropinzugabe konnten komplette Dissoziationsverläufe aufgenommen werden.

Eingesetzte Lösung	Gesamtbindung	Unspezifische Bindung	Dissoziations-Gläschen	Endkonzentration
[³ H]NMS	100 µl	100 µl	100 µl	1 nM
Aqua dest.	50 µl	-	50 µl	
Atropin	-	50 µl	-	3 µM
Puffer Na,K,PO ₄	1000 µl	1000 µl	1000 µl	5 mM
Homogenat t = 0	250 µl	250 µl	250 µl	quantum satis
Atropin t = 30 min			100 µl	3 µM

Tab. 3.4 Pipettierschema für die komplette Dissoziationsmessung: Ausgenommen vom Puffer und der Atropinlösung zum Start der Dissoziationsmessung wurden alle Komponenten in A.dest gelöst und eingesetzt. Die eingesetzte Na,K,PO₄-Pufferkonzentration betrug 7 mM; Die Atropinlösung zum Start der Dissoziationsmessung wurde in 5 mM Na,K,PO₄-Puffer gelöst.

“Zwei-Punkt-Kinetik”

Zur Untersuchung der [³H]NMS-dissoziationsverzögernden Wirkung von allosterischen Liganden wurde die Methode der “Zwei-Punkt-Kinetik” durchgeführt. In alle Versuchsansätze erfolgte zum Zeitpunkt t = 0 die Zugabe des Homogenates. Nach einer Vorinkubation von 30 Minuten wurde die Dissoziationsmessung gestartet.

Startlösungen: 1 Teil Aqua dest. + 1 Teil Atropin in 10 mM Na,K,PO₄ (Kontrolle)

1 Teil Alloster in A.dest + 1 Teil Atropin in 10 mM Na,K,PO₄

Anschließend wurde der Versuch nach einer Inkubationszeit von der ca. 1,5-fachen Halbwertszeit der Dissoziationsgeschwindigkeit des Radioliganden durch Filtration beendet.

Eine Ausnahme bildeten die Ansätze für die Messung der Gesamtbindung und der unspezifischen Bindung. Hier wurde das Homogenat zeitversetzt 30 Minuten vor der Abfiltration zugegeben und der Einsatz einer Startlösung unterblieb.

Eingesetzte Lösung	Gesamtbindung	Unspezifische Bindung	Dissoziations-Gläschen	Endkonzentration
[³ H]NMS	100 µl	100 µl	100 µl	0,2 bzw. 1 nM
Aqua dest.	50 µl	-	50 µl	
Atropin	-	50 µl	-	1 bzw. 3 µM
Puffer; Na,K,PO ₄	1000 µl	1000 µl	1000 µl	5 mM
Homogenat t = 0	250 µl	250 µl	250 µl	quantum satis
Startlösung t = 30 min			100 µl	

Tab. 3.5 Pipettierschema für die “Zwei-Punkt-Kinetik”: Ausgenommen vom Puffer und der Startlösung wurden alle Komponenten in A.dest gelöst und eingesetzt. Die eingesetzte Na,K,PO₄-Pufferkonzentration betrug 7 mM; Die Na,K,PO₄-Pufferkonzentration der Startlösungen betrug 5 mM.

3.6.4. Filtration mit dem Brandel Harvester

Alle durchgeführten radioaktiven Bindungsversuche wurden durch Filtration mit dem Brandel Harvester (G2) beendet. Die Filtration erfolgte über einen Glasfaserfilter (V12), welcher zur Reduktion der unspezifischen Bindung 15 Minuten in 0,1%ige Polyethyleniminlösung (2-8°C) eingelegt wurde. Nach Filtration der Versuchsansätze wurde die Filtrationsanlage 2 x mit eiskaltem Puffer bzw. Aqua dest. gespült. Bei Versuchen im 5 mM Na,K,PO₄-Puffer wurde 40 mM Na,K,PO₄-Puffer (L2) verwendet und bei Versuchen im HBSS-Puffer (L7) Aqua dest. Nach der Filtration wurden die Proben in Szintillationsgefäße (V21) überführt und mit jeweils 5 ml Ready-Protein™ (R18) versetzt. Die Proben wurden bis zur Vermessung im Beckman Coulter (G1) für mind. 1 h (Homogenate) bzw. 12 h (ganze Zellen) stehen gelassen.

3.6.5. Bestimmung der Radioaktivität (Flüssigszintillation)

In den Bindungsexperimenten wurde als radioaktive Sonde der β -Strahler [³H]NMS verwendet. Bei einem β -Zerfall zerfällt ein Neutron in ein Proton, ein β -Elektron und ein Antineutrino. Die Energie des emittierten β -Elektrons wurde mittels der Flüssigszintillationsmethode bestimmt. Die Grundlage dieser Methode ist die Umwandlung der β -Zerfallenergie in Lichtblitze, welche von einem Photomultiplier detektiert werden. Die Umwandlung der β -Zerfallenergie wird durch den Szintillationscocktail ermöglicht, welcher aus Lösungsmittel, Lösungsvermittler und gelösten Szintillatormolekülen (Fluorophore) besteht. Bei dem Lösungsmittel und den Szintillatoren handelt es sich um aromatische organische Verbindungen mit leicht anregbaren π -Elektronen. Die β -Zerfallenergie geht zuerst auf das Lösungsmittel (Pseudocumol) über und wird anschließend an die Szintillatoren abgegeben. Der primäre Szintillator (PPO = 2,5-Diphenyloxazol) gibt die aufgenommene Energie in Form von Licht mit einer Wellenlänge von 357 nm ab. Diese Wellenlänge ist vor allem für ältere Geräte aufgrund der kurzen Wellenlänge schlecht zu detektieren. Zur Steigerung der Detektionseffizienz befindet sich ein sekundärer Szintillator (POPOP = 1,4-Bis-(5-phenyloxazol-2-yl)-benzen) im Cocktail, welcher die Energie des primären Szintillators aufnimmt und mit einer Wellenlänge von 410 nm emittiert (*wavelength shifter*). Die emittierten Photonen werden vom Photomultiplier detektiert und in elektrische Impulse umgewandelt, welche proportional zur Energie des β -Elektrons sind.

3.7. Dynamische Massenumverteilung (DMR)

Die Bestimmung der G-Protein-Aktivierung durch muskarinerge und adrenerge Rezeptoren an lebenden Zellen erfolgte mit dem Epic[®]-Biosensor (G4). Die Messungen wurden mit der beta-Version unter kontrollierten Temperaturbedingungen bei 28°C im Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. Kostenis in der Pharmazeutischen Biologie der Universität Bonn durchgeführt. Der Epic[®] ermöglicht die indirekte Bestimmung der intrazellulären Massenumverteilung (DMR = *Dynamic Mass Redistribution*), welche z.B. durch die Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren induziert wird (Fang et al. 2007, Schröder et al. 2010).

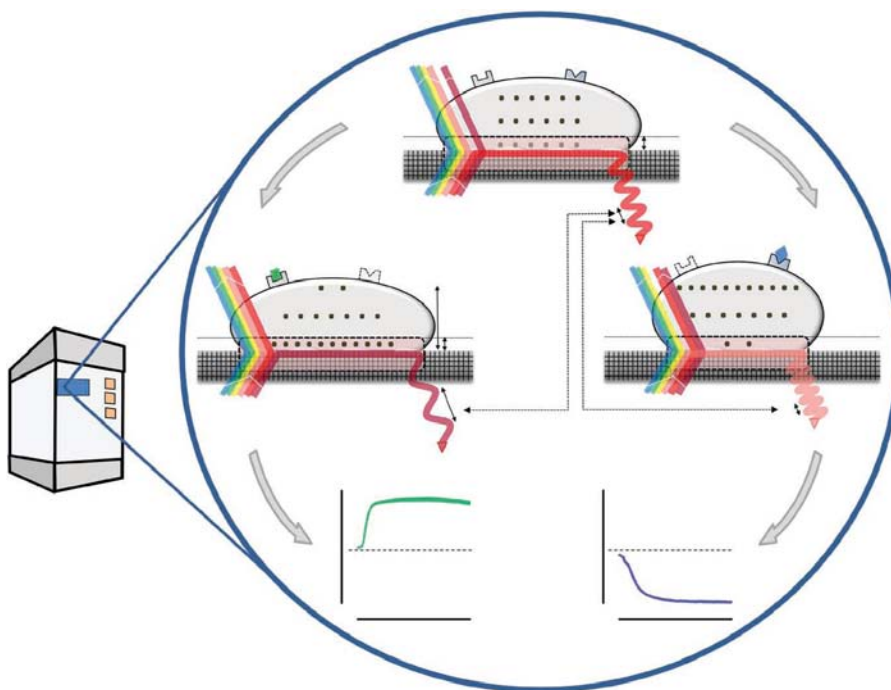


Abb.3.3 Messprinzip der dynamischen Massenumverteilung (DMR): Schematische Darstellung der DMR-Bestimmung mittels des Epic[®]-Biosensors; übernommen von Schröder et al. (2011)

Das Messsystem besteht aus einem Laser, einem Biosensor, welcher in einer 384-*well*-Messplatte integriert ist und einem Detektor. Ausgehend vom Laser trifft polarisiertes Breitbandlicht auf den Biosensor, durch den Licht einer definierten Wellenlänge ausgewählt und anschließend reflektiert wird. Die Auswahl der Wellenlänge ist abhängig von der optischen Dichte oberhalb des Biosensors (~ 150 nm). Je nach der verwendeten Zellart und der erreichten Zelldichte variiert demzufolge die ausgewählte Wellenlänge von Versuch zu Versuch. Circa alle 30 Sekunden erfolgt die Aufnahme eines Messpunktes, welcher einen Mittelwert aus 5

Einzelmessungen darstellt. Der Wert des ersten Messpunktes wird gleich Null gesetzt, folglich stellen alle weiteren Messpunkte Differenzwerte zum ersten Messpunkt dar und werden in der Einheit Δpm angegeben. Nachdem über einen Zeitraum von 300 Sekunden der sogenannte „*baseline read*“ aufgenommen wurde, erfolgt die Substanzzugabe. Eine Pipettierstation, welche vor jedem Versuch mit einem frischen Spitzensatz (V6) bestückt wurde, ermöglicht die simultane Zugabe der Testsubstanzen. Je nachdem, ob die optische Dichte im Detektionsbereich über dem Biosensor durch intrazelluläre Massenumverteilung erhöht oder erniedrigt wird, resultiert ein positiv bzw. negativ ausgerichtetes Signal (Lee et al. 2008), welches in Echtzeit aufgenommen wird. Hervorzuheben ist die Tatsache, dass zur Durchführung der Experimente weder die Zellen bzw. die Rezeptoren, noch die verwendeten Substanzen markiert werden müssen.

3.7.1. Versuchsdurchführung

Die Versuchsdurchführung erfolgte nach der Methode von Schröder et al. (2011). Am Tag vor der Messung wurden die Zellen in einer Dichte von 12 500 Zellen/*well* in die Testplatten ausgesät. Für die humanen Lungenfibroblasten wurden Fibronectin-beschichtete Platten (V10) verwendet, während bei den CHO-Zellen entweder Glasplatten (V8) oder ebenfalls Fibronectin-beschichtete Platten zum Einsatz kamen. Zur Entfernung von Luftblasen erfolgte nach der Aussaat ein Zentrifugationsschritt bei 140 x *g* für 10 Sekunden (RT). Anschließend wurden die Zellen für 20 - 24 h kultiviert (37°C, 5% CO₂ und 95%iger Luftfeuchte). In der Regel erfolgte die Aussaat der Zellen á 40 μl , im Fall einer PTX-Vorbehandlung wurde dagegen in 30 μl ausgesät und ca. 6 Stunden später das PTX á 10 μl zugegeben, so dass eine PTX-Endkonzentration von 100 ng/ml im '*well*' erreicht wurde. 20 - 24 h nach der Aussaat hatte sich ein dichter Zellrasen gebildet und das Medium wurde gegen HBSS-Puffer (L7) ausgetauscht. Dazu wurde das Medium mit einem 16-Kanal-Sauger entfernt und jedes '*well*' 2 x mit jeweils 50 μl HBSS-Puffer (37°C) gewaschen. Anschließend wurden die '*wells*' auf ein Endvolumen von 30 μl aufgefüllt und erneut einem Zentrifugationsschritt bei 140 x *g* für 10 Sekunden (RT) unterworfen. Für die simultane Substanzzugabe durch die Pipettierstation wurden die zu untersuchenden Testsubstanzen in eine zweite 384-*well*-Mikrotiterplatte ('*source plate*') (V9) á 20 μl vorgelegt. Die Testsubstanzen wurden dazu im Versuchspuffer gelöst und in der vierfachen Konzentration der gewünschten Endkonzentration hergestellt, da sie nach

der Zugabe in die Testplatte einer Verdünnung um den Faktor 4 unterlagen. Beide Platten wurden anschließend im Epic[®] bei 28°C für 2 h bis zu Beginn der Messung inkubiert.

Nach Abschluss des 'baseline reads' wurden alle verwendeten Testsubstanzen durch die Pipettierstation simultan in einem Volumen von 10 µl in die Testplatte abgegeben. Für CHO-Zellen wurde bereits in früheren Arbeiten gezeigt (Kebig A., 2010; Janßen N., 2011), dass Substanzen in Konzentrationen bis zu 100 µM eingesetzt werden konnten ohne unspezifische Effekte zu zeigen.

3.7.2. Auswertung

Mit Hilfe des Excel-Makros 'Microplate Analyzer v2.0' wurden die Daten in tabellarischer Form geöffnet. Anschließend wurden die Rohdaten in GraphPad Prism überführt und in Form von Originalregistrierungen dargestellt (Abb.3.4). Von allen Originalregistrierungen wurden die Signale des Puffers abgezogen, um den reinen Effekt der getesteten Substanz darzustellen ('baseline-corrected values'). Für die verschiedenen Zelllinien wurde jeweils ein charakteristischer Parameter des DMR-Signals für die weitere Auswertung verwendet. Im Falle der CHO-hM₂-Zellen handelte es sich um den initialen Peak, bei den CHO-hM₃-Zellen um den 2400 s-Wert und bei den MRC-5-Zellen um den Maximalwert innerhalb von 1800 s. An PTX-vorbehandelten CHO-hM₂-Zellen wurde dagegen der negative Maximaleffekt innerhalb von 1800s herangezogen.

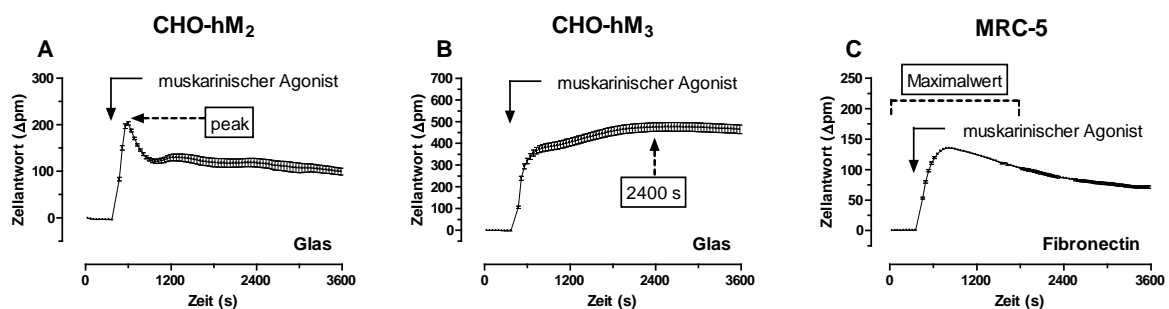


Abb.3.4 DMR-Signaturen in (A) CHO-hM₂, (B) CHO-hM₃ und (C) MRC-5: Dargestellt sind charakteristische DMR-Signale eines muskarinischen Agonisten in den genannten Zellsystemen. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Substanzzugabe. *Ordinate:* Zellantwort, welche einer Wellenlängenverschiebung in Picometern entspricht; *Abszisse:* Zeit in Sekunden; *Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler, Vierfachbestimmung

Die Daten wurden in Vierfachbestimmung erhoben und in Form von Konzentrations-Effekt-Kurven oder Balkendiagrammen dargestellt. Konzentrations-Effekt-Kurven wurden mit Hilfe der 4-Parameter-logistischen Gleichung (Gleichung 10) erstellt und die Steilheit auf einen von $n_H = 1$ abweichenden Hill-Koeffizienten getestet (F-Test, $p < 0,05$). Für die Zusammenfassung der einzelnen Versuchstage wurden die Konzentration-Effekt-Kurven entweder auf ihr jeweiliges oberes und unteres Plateau normiert oder auf den Effekt des orthosterischen Vollagonisten Oxotremorin M.

Im Fall biphasischer Konzentrations-Effekt-Kurven erfolgte die Anpassung der Datenpunkte mit der 'bell-shaped'-Funktion (Motulsky und Christophoulos, 2004), welche sich aus zwei Funktionen zusammensetzt. Mit dieser Funktion ist die Bestimmung der Wirksamkeit des stimulierenden und inhibierenden Effektes einer Substanz bestimmbar, sofern beide Effekte in dem Versuchsansatz sichtbar sind.

$$Y = \text{Dip} + \frac{(\text{Plateau}_1 - \text{Dip})}{1 + 10^{(\log EC_{50} 1 - \log [A]) n_H 1}} + \frac{(\text{Plateau}_2 - \text{Dip})}{1 + 10^{(\log [A] - \log EC_{50} 2) n_H 2}} \quad \text{Gleichung 17}$$

Y:	Zellantwort
Dip:	maximale bzw. minimale Zellantwort
Plateau ₁ :	Plateau bei niedrigen Agonistkonzentrationen
Plateau ₂ :	Plateau bei hohen Agonistkonzentrationen
EC ₅₀ 1:	1. Wendepunkt
EC ₅₀ 2:	2. Wendepunkt
n _H 1 und n _H 2:	Kurvensteilheiten
[A]:	Agonistkonzentration

3.8. Bestimmung von intrazellulärem cAMP

Die Bestimmung des sekundären Botenstoffes cAMP erfolgte mit dem kommerziell erhältlichen cAMP dynamic 2-*kit* der Firma Cisbio (Art.Nr.: 62AM4PEC). Es handelt sich dabei um einen kompetitiven Immunoassay, dessen Messprinzip auf dem Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) beruht. Von der Zelle produziertes endogenes cAMP konkurriert mit d2-markiertem cAMP um die Bindung an einen monoklonalen Antikörper (Mab anti-cAMP). Dieser Antikörper ist mit Europium markiert und fungiert als Donor, welcher nach Anregung bei 337 nm seine Energie an den Akzeptor überträgt. Die vom Akzeptor (d2-cAMP) aufgenommene Energie wird anschließend in Form von Strahlung wieder abgegeben und bei 665 nm detektiert. Demgegenüber dienen die gemessenen Emissionen des Donors bei 620 nm als interner Standard. Zelluläres cAMP konkurriert mit dem markierten d2-cAMP um die Bindung an den Antikörper und beeinflusst somit die Intensität des resultierenden FRET-Signals. Befindet sich in der Zelle beispielsweise viel endogenes cAMP, so bindet verhältnismäßig wenig d2-cAMP an den Antikörper und das FRET-Signal ist folglich klein.

3.8.1. Versuchsdurchführung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Versuche mit adhärennten Zellen und mit Suspensionszellen durchgeführt. Die Versuche mit adhärennten Zellen wurden analog der Herstelleranweisung in Gegenwart des unspezifischen Phosphodiesterase-Inhibitors IBMX (1 mM) durchgeführt. Die Versuche mit Suspensionszellen wurden dagegen in Abwesenheit von IBMX durchgeführt, um den absoluten intrazellulären cAMP-Gehalt zu bestimmen, ohne dass dieser durch die Phosphodiesterase-Hemmung künstlich angehoben wird. Alle Versuche wurden im HBSS-Puffer (L7) durchgeführt.

3.8.1.1. Versuche mit adhärennten Zellen

Die Zellen wurden in der entsprechenden Zellzahl 18 - 24 h bzw. 40 - 48 h vor ihrer Messung in 384 *well*-Zellkulturplatten (V14) ausgesät (Tab. 3.6). Es handelte sich um Zellen der Zelllinien CHO-hM₂ und MRC-5, sowie um primäre Zellen aus atrialem Gewebe muriner Embryonen (E 14,5 – 16,5; Mausstamm CD1). Im Fall der MRC-5 Zellen wurden die Platten 12 Stunden vor der Zellaussaat mit einer Fibronectin-haltigen 0,02 %igen Gelatinelösung (L4) beschichtet, weil die MRC-5-Zellen nur

schlecht in den Zellkulturplatten anwachsen. Nach einer Inkubation von 12 Stunden bei 37°C wurde die Beschichtung abgesaugt und für eine Stunde unter laminarem Luftstrom getrocknet.

Da nur der cAMP-stimulierende Effekt über den M₂-Rezeptor detektiert werden sollte, wurden alle Messungen mit PTX-behandelten Zellen durchgeführt. Vor der Versuchsdurchführung wurde das Medium mit einer Kanüle (V20) abgesaugt und die Zellen einmal mit 20 µl IBMX-haltigem Puffer gewaschen. Anschließend wurde der Versuch nach dem 2-Schritt-Protokoll laut Herstelleranweisung durchgeführt.

Zelllinie	Zellzahl	PTX	Kultivierung
CHO-hM ₂	7500 Zellen/well	100 ng/ml > 12 h	18-24 h
MRC-5	1000 Zellen/well	100 ng/ml > 12 h	18-24 h
Primäre Zellen	7500 Zellen/well	1000 ng/ml > 24 h	40-48 h

Tab. 3.6 Zellzahl, PTX-Behandlung und Kultivierungszeit adhärenter Zellen: Schema für die Aussaat und Kultivierung der verwendeten Zellen für die cAMP-Messungen.

3.8.1.2. Versuche mit Suspensionszellen

Suspensionsversuche wurden zur Bestimmung des absoluten cAMP-Gehalts der Zellen durchgeführt. Die Versuche wurden in IBMX-freiem HBSS-Puffer (L7) durchgeführt. Die CHO-hM₂- und MRC-5-Zellen wurden in Dichten von 2500-100000 Zellen/5 µl in die Messplatten (V13) pipettiert und der Versuch nach dem 2-Schritt-Protokoll laut Herstelleranweisung durchgeführt.

Zelllinie	Zellzahl (Zellen/well)			
CHO-hM ₂	10 000	25 000	50 000	100 000
MRC-5	2 500	5 000	10 000	25 000

Tab. 3.7 Zellzahlen für die cAMP-Messungen an Suspensionszellen

3.8.2. Auswertung

Die Messwerte wurden mit dem Mithras LG 960 (G12) erhoben und stellen den Quotienten aus den gemessenen Emissionen bei 665 nm (Emission Akzeptor) und 620 nm (Emission Donor = interner Standard) dar, welcher anschließend mit Faktor 10^4 multipliziert wurde. Durch die Messung bei zwei verschiedenen Wellenlängen reduziert sich die Variabilität zwischen den einzelnen 'wells' und der Versuch ist weniger anfällig gegenüber möglicher Fluoreszenzlöschung. Der Multiplikationsfaktor diente dagegen nur dem Erhalt von ganzen Zahlen.

$$\text{ratio} = \frac{A_{665\text{nm}}}{A_{620\text{nm}}} \times 10^4$$

Gleichung 18

Nach dem Abzug der Negativkontrolle (= Alleiniger Einsatz des Donors) erhielt man den Wert ΔR , welcher in den absoluten cAMP-Gehalt umgerechnet werden konnte. Die Daten wurden in Dreifachbestimmung erhoben und in Form von Balkendiagrammen oder Konzentrations-Effekt-Kurven dargestellt. Die Konzentrations-Effekt-Kurven wurden mit der 4-Parameter-logistischen Gleichung (Gleichung 10) angepasst und die Steilheit auf einen von $n_H = 1$ abweichenden Hill-Koeffizienten getestet (F-Test, $p < 0,05$). Für die Zusammenfassung der einzelnen Versuchstage wurden entweder die ΔR -Werte auf den Forskolineffekt normiert oder die gemittelten absoluten cAMP-Gehalte pro mg Protein angegeben.

3.9. Frequenzuntersuchungen an embryonalen atrialen Kardiomyozyten

Der Einfluss muskarinischer Agonisten auf die spontane Schlagfrequenz embryonaler atrialer Kardiomyozyten wurde videomikroskopisch in einer Temperaturkontrollierten Messkammer untersucht. Neben den Untersuchungen unter Kontrollbedingungen wurden ebenfalls Messungen nach Ausschaltung inhibitorischer G-Proteine, sowie unter erhöhten intrazellulären cAMP-Gehältern durchgeführt. Für die Ausschaltung der inhibitorischen G-Proteine wurden die Zellen 18-24 Stunden vor der Frequenzmessung mit PTX (1000 ng/ml) behandelt. Zur Erhöhung des intrazellulären cAMP-Gehalts wurden die Zellen während der Messung mit dem β -Agonisten Isoprenalin (100 nM) und dem unspezifischen Phosphodiesterase-Inhibitor IBMX (100 μ M) superfundiert.

3.9.1. Versuchsdurchführung

Für die Versuchsdurchführung wurden die mit Kardiomyozyten bewachsenen Deckgläser in die entsprechende Messkammer eingespannt und in den Messstand überführt (Abb.3.5).

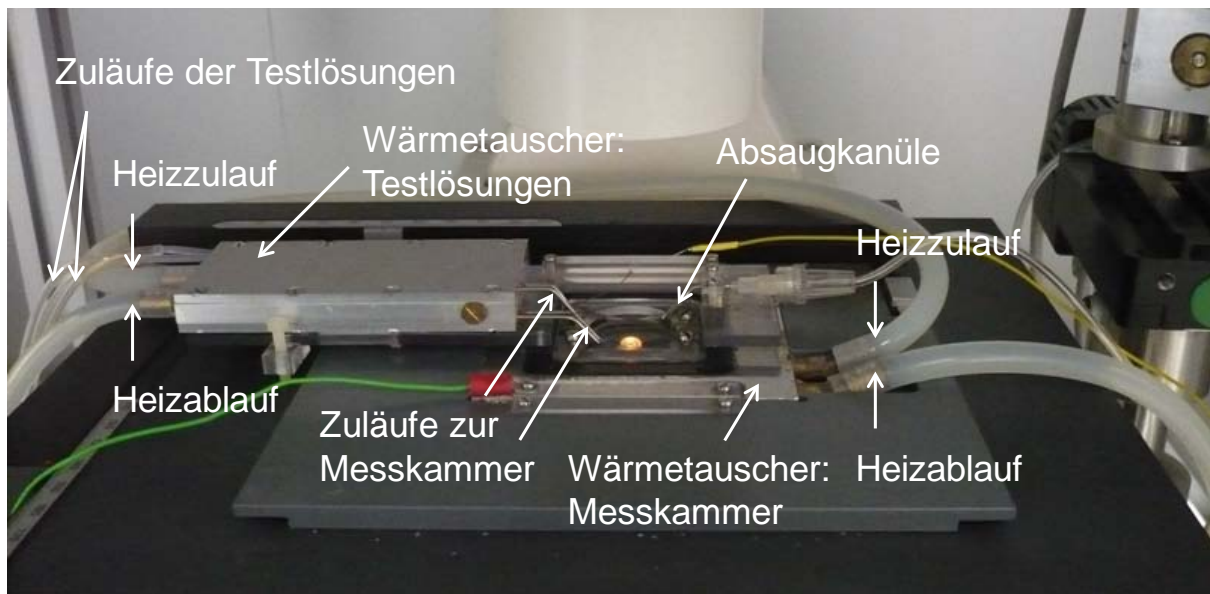


Abb.3.5 Messstand zur Frequenzmessung isolierter atrialer Kardiomyozyten: Dargestellt ist die im Mikroskop eingespannte Messkammer sowie der Wärmetauschereinheiten und dem Superfusionssystem.

Zur Schaffung geeigneter Umgebungsbedingungen ist die Messkammer von einer Wärmetauschereinheit umgeben und die Zellen wurden mit einer physiologischen Pufferlösung von 37°C superfundiert. Als Reservoir für verwendete Lösungen dienten die Kolben von 50 ml Perfusorspritzen (V15), welche oberhalb der Messkammer in einer Lochleiste befestigt waren. Aufgrund des hydrostatischen Drucks flossen die Lösungen nach der Passage einer Wärmetauschereinheit, die von einem 37°C warmen Wasserbad gespeist wurde, in die Messkammer. Zur Kontrolle der Fließgeschwindigkeit der verwendeten Lösungen dienten Tropfenzähler (V11), welche auf 250 Tropfen/Minute eingestellt waren. Dadurch wurde ein gleichmäßiger und ausreichend schneller Flüssigkeitsaustausch in der Messkammer gewährleistet. Die Absaugung der Lösung aus der Messkammer erfolgte über eine Absaugkapillare, die an eine Auffangflasche angeschlossen war, in der ein durch eine Pumpe erzeugtes Vakuum herrschte.

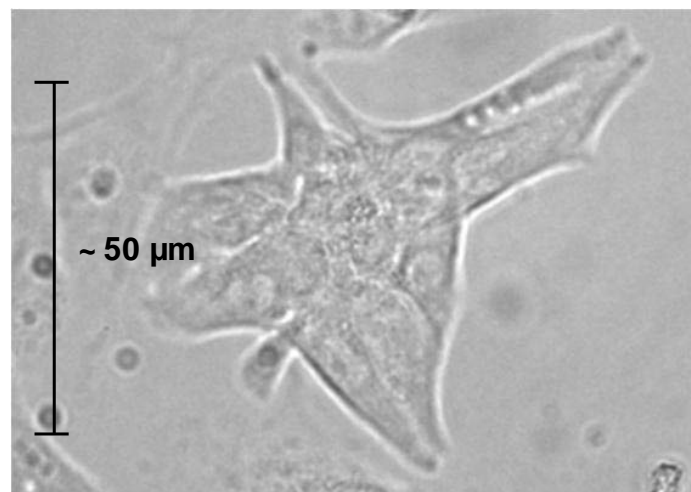


Abb.3.6 **Isolierter muriner embryonaler atrialer Kardiomyozyt (eCM):** Dargestellt ist eine Momentaufnahme einer spontan schlagenden Zelle zwei Tage nach der enzymatischen Isolation

Durch eine am inversen Mikroskop (G11) montierte Kamera (G9) wurde die spontane Schlagfrequenz der Kardiomyozyten über eine Änderung der Anzahl der Bildpunkte detektiert. Die Bildwechselfrequenz der Kamera betrug 30 Bilder pro Sekunde. Änderte sich bei einem Bildwechsel die Anzahl der detektierten Bildpunkte (*pixel/units*) über einen vorher definierten Schwellenwert, wurde diese Änderung als Schlag detektiert. Die detektierten Schläge wurden über einen Zeitraum von 10 s gemittelt, um die mittlere Schlagfrequenz zu erhalten, welche für die weitere Auswertung der Daten verwendet wurde. Die für die Messung ausgewählten

Kardiomyozyten sollten bevorzugt nicht in Kontakt zu anderen Kardiomyozyten stehen und eine konstante Schlagfrequenz aufweisen. Die Messung der Basalfrequenz erfolgte über drei Minuten, anschließend wurde auf substanzhaltige Lösungen umgeschaltet. Die Kardiomyozyten wurden mit jeder Lösung solange superfundiert, bis der Effekt der getesteten Substanz stabil war. Zeigte sich kein Substanzeffekt, wurde frühestens nach drei Minuten Superfusion die Lösung gewechselt.

3.9.2. Auswertung

Die Rohdaten wurden mit Excel in tabellarischer Form dargestellt und anschließend in GraphPad Prism überführt. Die detektierte mittlere Schlagfrequenz der letzten 30 Sekunden vor Umschaltung auf eine andere Lösung, wurde gemittelt und dieser Wert auf die Basalfrequenz der Zelle normiert. Die normierten Daten wurden in Form von Balkendiagrammen oder Konzentrations-Effekt-Kurven nach Anwendung der 4-Parameter-logistischen Gleichung (Gleichung 10) dargestellt. Die Steilheit der Kurven wurde durch Anwendung eines F-Tests auf einen von $n_H = -1$ abweichenden Hill-Koeffizienten getestet.

Test auf Parallelverschiebung

Beim Test auf Parallelverschiebung werden Konzentrations-Effekt-kurven in Gegenwart eines Antagonisten/inversen Agonisten aufgenommen. Für diese Versuche wurde der M_2 -prävalente allosterische Modulator W84 (Lüllmann et al., 1969) eingesetzt, welcher sich wie ein inverser Agonist verhält (Hilf und Jacobs, 1992). Der Einsatz erfolgte in einer Konzentration von 3 μ M, welche erfahrungsgemäß zu einer sichtbaren Rechtsverschiebung Agonist-induzierter Konzentrations-Effekt-Kurven um den Faktor 10 führt (Lüllmann et al., 1969; Schmalenbach C., 2005; Kellershohn K., 2007). Zur Quantifizierung erfolgte die Berechnung des Verschiebefaktors ('*dose ratio*' = DR), welcher sich aus dem Quotienten der Wendepunkte (EC_{50}) des Agonisten in An- und Abwesenheit von W84 ergibt:

$$DR = \frac{EC_{50_W84}}{EC_{50_Kontrolle}}$$

Gleichung 19

Der dekadische Logarithmus von "DR-1" wurde anschließend gegen den dekadischen Logarithmus der W84-Konzentration aufgetragen. Da der berechnete Verschiebefaktor bei der W84-Konzentration von 3 µM erfahrungsgemäß noch keinem Maximalwert entgegenstrebt, erfolgte die Auswertung nach Arunlakshana und Schild (1959):

$$\log(\text{DR} - 1) = \text{pK}_A + s \times \log[\text{A}] \quad \text{Gleichung 20}$$

pK_A : negativ dekadischer Logarithmus der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten des Antagonisten

s: Steigung der Regressionsgeraden

[A]: Antagonistkonzentration

Das Kriterium für die Anwendung dieser Gleichung ist eine parallele Rechtsverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurve mit gleichem Hill-Koeffizienten (Steilheit) und identischem Maximaleffekt. Da nur eine Allosterkonzentration getestet wurde, musste für die Anwendung der Gleichung die Steilheit der Regressionsgeraden mit 1 festgesetzt werden. Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der x-Achse (pA_2) entspricht dem negativen dekadischen Logarithmus der W84-Konzentration, welche zu einer Verschiebung des Wendepunktes der Konzentrations-Effekt-Kurve um den Faktor 2 führt. Der pA_2 -Wert ist bei einem kompetitiven Antagonismus, bei dem die Steilheit der Regressionsgeraden 1 ist, mit der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten (pK_A) identisch.

3.10. Bestimmung der Sarkomerverkürzung an adulten ventrikulären Kardiomyozyten

Zur Bestimmung des Effekts muskarinischer Substanzen auf murine adulte ventrikuläre Kardiomyozyten wurde die Sarkomerlänge videomikroskopisch in einer Temperatur-kontrollierten Messkammer untersucht. Da der Einfluss muskarinischer Agonisten auf adulte ventrikuläre Kardiomyozyten schlecht detektierbar ist (Harvey und Belevych, 2003), wurden die Versuche in Gegenwart des adrenergen Agonisten Isoprenalin (1 μM) durchgeführt. Durch die Aktivierung von G_s -gekoppelten adrenergen Rezeptoren wurde der intrazelluläre cAMP-Gehalt erhöht und der Effekt muskarinischer Agonisten sichtbar.

3.10.1. Versuchsdurchführung

Die adulten Kardiomyozyten wurden vor Versuchsbeginn in eine runde Versuchskammer aus Acrylglas ausgesät. Durch den Glasboden der Versuchskammer konnten die Zellen über ein Invertmikroskop beobachtet werden. Damit die Zellen auf dem Glasboden hafteten, wurde dieser zuvor mit Laminin (0,8 $\mu\text{g/ml}$) für ca. 5 Minuten beschichtet. Anschließend wurde die Lösung entfernt und einige Tropfen der Zellsuspension in die Messkammer gegeben. Nach weiteren 5 Minuten wurde die Superfusion der Zellen mit der Messlösung (L13) gestartet und der in die Messkammer gefräste Wasserdurchlauf geöffnet, welcher die Messkammer beheizt. Die Messlösung und weitere Testlösungen flossen aufgrund des hydrostatischen Drucks aus ihren Reservoirs (V15), welche sich oberhalb der Messkammer in einer Lochleiste befanden, in die Messkammer. Die Fließgeschwindigkeit der Lösungen wurde über einen zwischengeschalteten Tropfenzähler reguliert. Die Einstellung auf 70 Tropfen/Minute ermöglichte noch einen ausreichenden Flüssigkeitsaustausch in der Messkammer, ohne dass die Zellen weggeschwemmt wurden. Die Absaugung der Flüssigkeit erfolgte über eine Kanüle, die an eine Auffangflasche angeschlossen war, in der ein durch eine Pumpe aufgebauter Unterdruck herrschte. Während der Messung wurde eine Temperatur von 36°C angestrebt, welche durch den in die Messkammer integrierten Temperaturfühler ständig kontrolliert wurde. Die Einhaltung der Temperatur wurde zum einen über die Erwärmung der Testlösungen nach der Passage durch eine Wärmetauscherkammer erreicht, sowie über den Wasserdurchlauf in der

Messkammer. Wärmetauscher und Wasserdurchlauf wurden beide von einem Umwälzthermostaten gespeist.

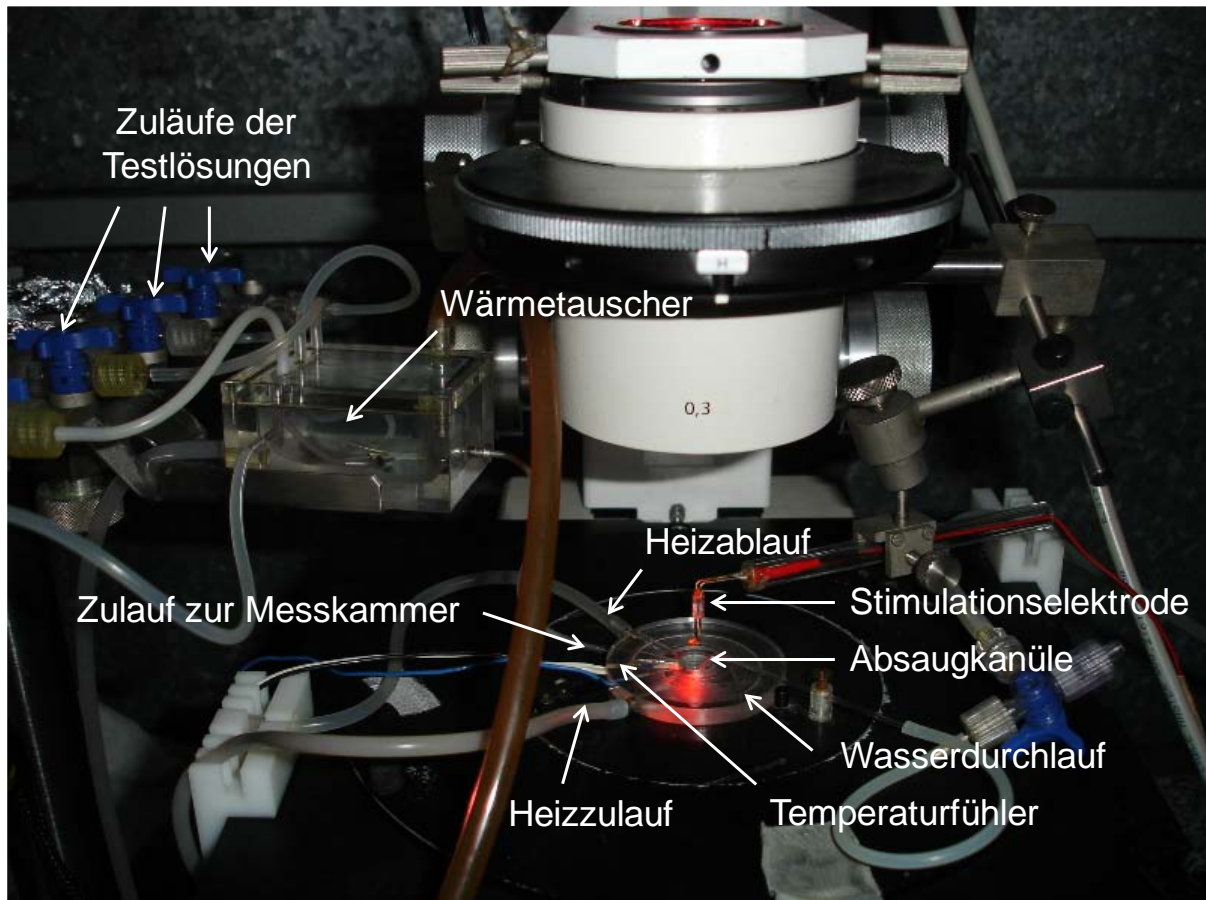


Abb.3.7 Messstand zur Messung der Sarkomerverkürzung isolierter ventrikulärer Kardiomyozyten: Dargestellt ist die im Mikroskop eingespannte Messkammer inklusive der Wärmetauschereinheiten und dem Superfusionsystem.

Die für die Messung verwendeten Kardiomyozyten sollten von backsteinförmiger Struktur sein und eine ausgeprägte Querstreifung aufweisen. Desweiteren war es wichtig, dass die Zellen keine spontanen Kontraktionen aufwiesen, da dies ein Zeichen für den baldigen Tod der Zelle war. Für die optische Messung der Sarkomerlänge dienten die hellen und dunklen Bereiche des Kardiomyozyten, welche für die charakteristische Querstreifung verantwortlich sind und auch als isotrope und anisotrope Bereiche bezeichnet werden. War eine entsprechende Zelle gefunden, wurde die bewegliche Kamera so positioniert, dass die Zelle ganz im Bild zu sehen war und die Querstreifung senkrecht dargestellt wurde. Es wurde ein Bereich auf der Muskelzelle markiert, der als *'region of interest'* definiert wird. In diesem Bereich erfasst die Kamera die Abstände zwischen den isotropen und anisotropen Banden. Die Abstände wurden als eine sinusförmige Schwingungskurve

abgebildet, in der eine Periode der Sinuskurve die Länge eines Sarkomers repräsentiert. Da die Wellenlänge dieser Schwingungskurve jedoch einer gewissen Streuung unterliegt, wurde über eine Fourier-Analyse das Ergebnis als 'Powerspektrum' dargestellt. Mittels der Fourier-Analyse wird die Schwingungskurve in Einzelschwingungen von unterschiedlichen Frequenzen zerlegt. Die Lage des Gipfels vom 'Powerspektrum' stellt die am häufigsten vorkommende Frequenz dar und wird als repräsentative Sarkomerlänge angesehen. Eine Verkürzung der absoluten Sarkomerlänge führte zu einer Verschiebung des Maximums vom 'Powerspektrum'.

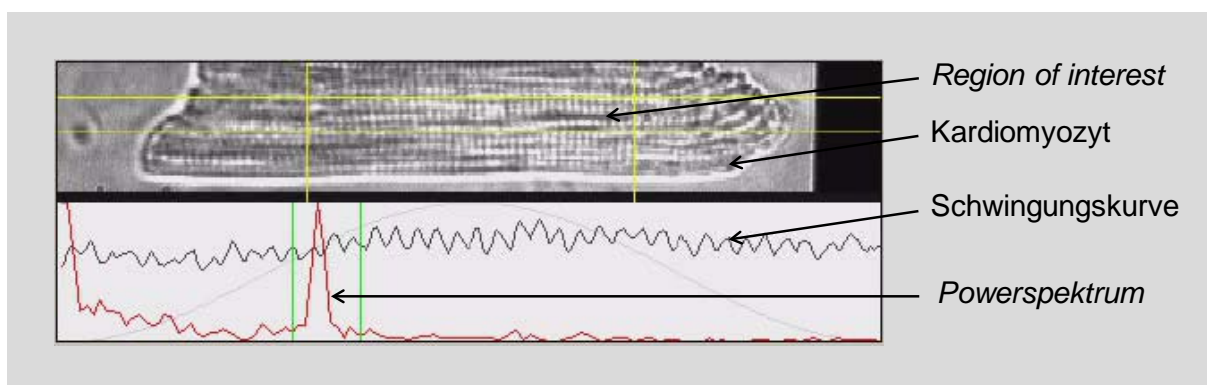


Abb.3.8 Videobild einer isolierten adulten Ventrikelzelle: Dargestellt ist der adulte Kardiomyozyt mit seiner charakteristischen Querstreifung inklusive der Errechnung des 'Powerspektrums'.

Die elektrische Stimulation des Kardiomyozyten erfolgte über eine Reizelektrode, die aus zwei parallel angeordneten Golddrähten (0,8 mm) bestand. Über einen Mikromanipulator war die Elektrode in der Kammer beweglich. Die Drähte wurden so positioniert, dass sich die zu messende Zelle zwischen ihnen befand. Über ein an die Elektrode angeschlossenes Reizgerät (Grass SD 9, Quincy, USA) wurden die Zellen kontinuierlich mit einer Frequenz von 2 Hz gereizt. Die angelegte Spannung betrug 30 V und jeder Reiz dauerte 0,4 ms.

Jede Zelle wurde bis zum Erreichen des 'steady-states' beobachtet. Erst wenn keine Veränderung der Sarkomerverkürzung mehr detektierbar war, wurde auf die nächste Testlösung umgeschaltet.

3.10.2. Auswertung

Die Signale der Sarkomerverkürzungsmessungen wurden mit Hilfe des Programms '*IonWizard sarcomere length*' (IonOptix, Milton, MA, USA) aufgezeichnet und ausgewertet. Mit Hilfe des Programms wurden die Ruhesarkomerlänge und die Verkürzungsamplitude berechnet. Die von IonWizard erfassten Daten wurden mit Hilfe des Programms IGOR in Excel[®] übertragen. Zur weiteren Auswertung und graphischen Darstellung wurde anschließend GraphPad Prism[®] verwendet. Der Effekt der muskarinischen Agonisten auf die Verkürzungsamplitude war bei der Durchführung der Versuche von besonderem Interesse. Der Mittelwert der letzten fünf Verkürzungen im '*steady-state*' wurde für die weitere Auswertung der Daten verwendet. Das Ausmaß der Verkürzung wurde für die Zusammenfassung der Daten jeweils auf den Ausmaß der Sarkomerverkürzung unter Isoprenalin (1 μ M) normiert und in Form von Balkendiagrammen dargestellt.

3.11. Berechnung des Kopplungsparameters (τ)

Die Auswertung funktioneller Daten mittels der 4-Parameter-logistischen Gleichung führt zu Konzentrations-Effekt-Kurven, welche eine Aussage über die Wirksamkeit (pEC_{50}) und die intrinsische Aktivität (E_{max}) von Agonisten in einem funktionellen System ermöglichen. Die Beschreibung funktioneller Daten mit Hilfe dieser beiden Parameter kann jedoch in einigen Fällen unzureichend sein. Besteht beispielsweise in einem funktionellen System eine sogenannte Rezeptorreserve, so muss nur ein Bruchteil der vorhandenen Rezeptoren aktiviert werden, um den maximalen Effekt auszulösen. In einem solchen Fall sind Voll- und Partialagonisten hinsichtlich ihrer intrinsischen Aktivität nicht mehr zu unterscheiden. Zusätzlich zu ihrem Einfluss auf die intrinsische Aktivität hat die Rezeptorreserve jedoch auch einen Einfluss auf die Wirksamkeit von Liganden (Kenakin 2007, Rajagopal et al. 2011). Die Wirksamkeit stellt eine Größe dar, in die sowohl die Affinität des Liganden zum Rezeptor als auch seine Fähigkeit, den Rezeptor zu aktivieren, einfließen. Folglich kann ein Ligand, der gut an den Rezeptor bindet, ihn aber schlecht aktiviert, die gleiche Konzentrations-Effekt-Kurve mit demselben Wendepunkt (pEC_{50}) aufweisen wie ein Ligand, der schlecht am Rezeptor bindet, ihn aber gut aktiviert (Motulsky und Christopoulos, 2004).

Um die Eigenschaften von Agonisten besser beschreiben zu können, entwickelten Black und Leff (1983) das '*operational model of agonism*', welches den Zusammenhang zwischen der eingesetzten Agonist-Konzentration und dem pharmakologischen Effekt unter Zuhilfenahme der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten beschreibt.

$$E = \frac{E_{max} \times \tau \times [A]}{(K_i + [A]) + \tau \times [A]} \quad \text{Gleichung 21}$$

- E: Effekt
- E_{max} : maximal induzierbarer Effekt des Systems
- τ : Kopplungsparameter
- [A]: Agonistkonzentration
- K_i : Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Agonist-Bindung

Ist die Steilheit einer Konzentrations-Effekt-Kurve nicht 1, so kann die Gleichung um den Faktor der Steilheit (n) erweitert werden, wenn angenommen werden kann, dass die Bindung von Agonist und Rezeptor weiterhin dem Massenwirkungsgesetz folgt.

$$E = \frac{E_{\max} \times \tau^n \times [A]^n}{(K_1 + [A])^n + \tau^n \times [A]^n} \quad \text{Gleichung 22}$$

Der Kopplungsparameter tau (τ) berechnet sich aus der im System vorhandenen Anzahl an Rezeptoren und der Menge an Agonist-Rezeptor-Komplexen, welche für die Induktion eines halbmaximalen Effekts benötigt werden. Der Tauwert entspricht somit dem Kehrwert der Rezeptorfraktion, welche mit einem Agonisten besetzt sein muss, um einen halbmaximalen Effekt auszulösen.

$$\tau = \frac{B_{\max}}{K_E} \quad \text{Gleichung 23}$$

B_{\max} : vorhanden Rezeptorzahl

K_E : Agonist-Rezeptor-Komplexe für einen halbmaximalen Systemeffekt

3.12. Statistik

Die Bestimmung der statistischen Lage- und Streuungsparameter sowie die Durchführung der statistischen Tests wurde unter der Annahme durchgeführt, dass die Daten einer Normalverteilung unterliegen.

3.12.1. Deskriptive Statistik

Als Lagemaß diente das arithmetische Mittel (\bar{x}). Zu dessen Ermittlung wurden alle Einzelwerte addiert und die erhaltene Summe durch die Anzahl der Werte dividiert:

$$\bar{x} = \frac{1}{n}(x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad \text{Gleichung 24}$$

n: Anzahl der Einzelversuche

x_i : Messwert des i-ten Einzelversuchs

Im Gegensatz zum Lagemaß dienen Streuungsmaße dazu, eine Aussage über die Verteilung der Einzelwerte um den Mittelwert zu ermöglichen. Die Varianz (s^2) ist das am häufigsten verwendete Streuungsmaß und stellt die Summe der Quadrate der Abweichungen der Einzelwerte vom Mittelwert dividiert durch die Anzahl der Freiheitsgrade dar:

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad \text{Gleichung 25}$$

s^2 : Varianz

n - 1: Anzahl der Freiheitsgrade ($f = n - 1$)

Die Anzahl der Freiheitsgrade (f) einer betrachteten statistischen Größe ist gleich der Differenz aus der Anzahl unabhängiger Variablen (Messwerte) und der von diesen Variablen abhängigen Parameter (Wätzig et al. 2008).

Die Quadratwurzel der Varianz ergibt die Standardabweichung (s), welche die gleiche Einheit besitzt wie die Messwerte der Beobachtungsreihe.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad \text{Gleichung 26}$$

Als weiteres Streuungsmaß ist der Standardfehler (SEM) zu nennen, welcher die Präzision des geschätzten Mittelwertes beschreibt.

$$\text{SEM} = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad \text{Gleichung 27}$$

3.12.2. Statistische Prüfverfahren

Mit Hilfe statistischer Prüfverfahren wird anhand der erhobenen Datensätze, welche jeweils einen Stichprobenbefund darstellen, eine Aussage über die betroffene Grundgesamtheit getroffen. Um zu einer Entscheidung zwischen zwei unterschiedlichen Annahmen zu kommen, wird ein Hypothesentest durchgeführt, der die aufgestellte Nullhypothese auf Annahme oder Nicht-Annahme hin überprüft. Die Nullhypothese besagt, dass der angegebene Erwartungswert zutrifft. Erst wenn die Nullhypothese verworfen wird, trifft die Alternativhypothese zu. Die Entscheidung darüber, welche Hypothese zutrifft, wird durch einen statistischen Test entschieden. Alle im Rahmen dieser Arbeit angewandten statistischen Tests wurden zweiseitig durchgeführt und es wurde ein Signifikanzniveau (α) von 5% vorgegeben. Gemeinsam ist allen Tests (F-Test, t-Test, ANOVA), dass die berechnete Prüfgröße (F-Wert, t-Wert) mit einem kritischen Tabellenwert verglichen wird. Die Gegenüberstellung beider Werte entscheidet schließlich über das Verwerfen oder die Annahme der Nullhypothese. Die verwendeten statistischen Software-Programme berechnen neben der Prüfgröße auch einen p -Wert, welcher zwischen 0 und 1 liegt. Der p -Wert steht in enger Beziehung zu dem Signifikanzniveau α und gibt unter Gültigkeit der Nullhypothese die Wahrscheinlichkeit an, das Ergebnis zu erhalten. Je kleiner der p -Wert ist, umso mehr spricht das Ergebnis folglich gegen die Nullhypothese. Bei einem p -Wert $< 0,05$, wurde die Nullhypothese mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% abgelehnt. (Wätzig et al. 2008)

3.12.2.1. Der F-Test

Der F-Test dient der Prüfung, ob zwischen zwei Varianzen ein signifikanter Unterschied besteht.

Nullhypothese (H_0): $s_1^2 = s_2^2$

Alternativhypothese (H_1): $s_1^2 \neq s_2^2$

Für die Berechnung der Prüfgröße ($F_{\text{Prüf}}$) wird der Quotient der Varianzen gebildet, so dass F immer ≥ 1 ist ($s_1 > s_2$). Ist die berechnete Prüfgröße kleiner als der Tabellenwert ($F_{\text{Prüf}} < F_{\text{Tab}}$), kann die Nullhypothese nicht verworfen werden (Wätzig et al. 2008).

$$F_{\text{Prüf}} = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

Gleichung 28

Der F-Test wurde angewandt, um die Steilheit (n_H) sigmoidaler Kurvenanpassung zu überprüfen. Es wurde getestet, ob die angepassten Kurven eine normale Steilheit aufweisen oder steiler bzw. flacher sind.

Nullhypothese (H_0): $n_H = 1$ bzw. -1

Alternativhypothese (H_1): $n_H \neq 1$ bzw. -1

Der F-Test berücksichtigt in diesem Fall die Anzahl der Freiheitsgrade (f) und die Summe der Abstandsquadrate ($ss = \text{'sum of squares'}$), welche die Güte der Kurvenanpassung beschreibt. Um die Summe der Abstandsquadrate zu bestimmen, wird der Abstand von jedem Datenpunkt zur angepassten Kurve quadriert und anschließend aufsummiert. Folglich minimiert sich die Summe der Abstandsquadrate, je besser die Datenpunkte mit dem gewählten Modell beschrieben werden (Motoulsky und Christopoulos, 2004).

$$F_{\text{Prüf}} = \frac{\frac{ss_1 - ss_2}{f_1 - f_2}}{\frac{ss_2}{f_2}}$$

Gleichung 29

ss_1 : Summe der Abstandsquadrate von Modell 1

ss_2 : Summe der Abstandsquadrate von Modell 2

f_1 : Anzahl der Freiheitsgrade von Modell 1

f_2 : Anzahl der Freiheitsgrade von Modell 2

3.12.2.2. Der t-Test

Mit dem t-Test wurde geprüft, ob Unterschiede zwischen zwei Mittelwerten zufällig auftreten oder wirklich vorhanden sind. In der Mehrzahl wurde der zweiseitige t-Test für unverbundene Stichproben mit gleichen Varianzen angewandt (Wätzig et al. 2009).

$$t_{\text{Prüf}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s_d} \times \sqrt{\frac{n_1 \times n_2}{n_1 + n_2}} \quad \text{Gleichung 30}$$

$$s_d = \sqrt{\frac{s_1^2 (n_1 - 1) + s_2^2 (n_2 - 1)}{n_1 + n_2 - 2}}$$

- s_d : Standardabweichung der Mittelwertdifferenzen
 \bar{x}_1, \bar{x}_2 : Mittelwerte der beiden Grundgesamtheiten
 n_1, n_2 : Anzahl der Einzelwerte der beiden Grundgesamtheiten
 $n_1 + n_2 - 2$: Freiheitsgrade zur Ermittlung des Tabellenwertes t_{Tab}

Wurden zwei Messungen an derselben Zelle durchgeführt (vorher/nachher), so wurde der t-Test für verbundene Stichproben durchgeführt (Wätzig et al. 2008).

$$t_{\text{Prüf}} = \frac{\frac{\sum d_i}{n}}{\sqrt{\frac{\sum d_i^2 - \frac{(\sum d_i)^2}{n}}{n \times (n - 1)}}} \quad \text{Gleichung 31}$$

- d_i : Differenz der Werte für die verbundenen Stichproben x_i und y_i ;
 $d_i = x_i - y_i$
 n : Anzahl der Paare
 $n - 1$: Freiheitsgrade zur Ermittlung des Tabellenwertes t_{Tab}

Die Beurteilung der Signifikanz kann aufgrund des Vergleichs des berechneten t-Werts mit dem entsprechenden Tabellenwert (t_{Tab}) vorgenommen werden oder über den vom Computerprogramm berechneten p -Wert.

3.12.2.3. Die Varianzanalyse (ANOVA)

Die einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA (= *'analysis of variance'*) wurde angewandt, um die Mittelwerte von mehr als zwei Gruppen auf Gleichheit zu testen. Das Prinzip der ANOVA beruht auf der Testung der Gleichheit der Mittelwerte, indem die Verbreiterung der Gesamtvarianz (= Varianz der vereinigten Stichproben) untersucht wird. Durch den Vergleich der Varianzen der Einzelstichproben und der Gesamtstichprobe mittels eines F-Tests wird letztendlich auf die Gleichheit der Mittelwerte der Einzelproben geschlossen. Die Nullhypothese für die ANOVA besagt, dass alle Probenmittelwerte gleich sind. Die Alternativhypothese besagt dagegen, dass zwischen mindestens zwei Mittelwerten ein Unterschied besteht. Der F-Wert berechnet sich aus dem Verhältnis des quadratischen Mittelwerts zwischen den Gruppen (MS_b) und dem quadratischen Mittelwert innerhalb der Gruppen (MS_w). Der quadratische Mittelwert ($MS = \text{'mean of squares'}$) ist definiert als die Varianz dividiert durch die Freiheitsgrade (Lohninger H., 2012).

$$F_{\text{Prüf}} = \frac{MS_b}{MS_w} = \frac{\frac{s_b^2}{f_b}}{\frac{s_w^2}{f_w}} = \frac{s_b^2}{s_w^2} \cdot \frac{f_w}{f_b} = \frac{s_b^2}{s_w^2} \cdot \frac{(n-k)}{(k-1)} \quad \text{Gleichung 32}$$

s_b^2 : Varianz zwischen den Gruppen

s_w^2 : Varianz innerhalb der Gruppen

f_b : Anzahl der Freiheitsgrade zwischen den Gruppen

f_w : Anzahl der Freiheitsgrade innerhalb der Gruppen

k : Anzahl der Testgruppen

n : Anzahl der Einzelversuche aus allen Testgruppen

Ist der berechnete F-Wert größer als der Tabellenwert ($F_{\text{Prüf}} > F_{\text{Tab}}$) bzw. ist der vom Computerprogramm berechnete p -Wert $< 0,05$, wird die Nullhypothese verworfen. Die ANOVA gibt jedoch nur an ob ein signifikanter Unterschied besteht, nicht jedoch welche Mittelwerte sich voneinander unterscheiden. Um dies herauszufinden wurde ein sogenannter *post*-Test durchgeführt. Dabei handelte es sich entweder um den Tukey-Test (beim Vergleich aller Gruppen untereinander) oder den Dunnet-Test (beim Vergleich gegen einen Kontrollwert).

4 Ergebnisse

Der Ergebnisteil gliedert sich in drei Abschnitte, in denen jeweils die Ergebnisse eines rekombinanten, eines nativen und eines primären Expressionssystems des muskarinischen M₂-Rezeptors dargestellt sind. Die Flp-InTM-CHO-Zelllinie, welche mit dem humanen M₂-Rezeptor stabil transfiziert wurde (Kebig A., 2010), stellt das rekombinante Expressionssystem dar (CHO-hM₂). Die humane Lungenfibroblastenzelllinie MRC-5 exprimiert den M₂-Rezeptor dagegen endogen und diente als natives Expressionssystem, während murine Kardiomyozyten das primäre Expressionssystem repräsentieren.

4.1. Das rekombinante Expressionssystem CHO-hM₂

CHO-Zellen besitzen keine Cholinesterase-Aktivität (Lazareno und Bridgall, 1995), weshalb der endogene Ligand Acetylcholin in diesem Zellsystem bedenkenlos eingesetzt werden kann. Da im Rahmen dieser Arbeit jedoch ebenfalls Zellen eingesetzt wurden, welche eine Cholinesterase-Aktivität aufweisen, erfolgte zunächst die Untersuchung eines Cholinesterase-stabilen muskarinischen Agonisten. Der gewählte Agonist sollte hinsichtlich seiner Fähigkeit den Rezeptor zu aktivieren dem endogenen Liganden Acetylcholin gleichen. Zudem sollte der Ligand die Fähigkeit zur promiskuitiven G-Proteinaktivierung besitzen, da diese gezielt im nativen und primären Expressionssystem untersucht werden sollte. Die Wahl fiel auf den muskarinischen Agonisten Oxotremorin M, welcher in früheren Arbeiten als Vollagonist beschrieben ist (Kellershohn K., 2007; Kebig A., 2010). Als funktioneller 'read-out' wurde vornehmlich das Ausmaß der Agonist-induzierten intrazellulären dynamischen Massenumverteilung (DMR) bestimmt, da mit dieser Methode die Wirkung von Acetylcholin auf CHO-hM₂ bereits ausführlich beschrieben ist (Antony et al., 2009; Kebig et al., 2010; Kebig A., 2010; Schröder et al., 2010; Janßen N., 2011; Schröder et al., 2011).

Anschließende Untersuchungen befassten sich mit der Signalwegsselektivität dualsterischer Liganden, welche dem Bauprinzip "1per-x-phth" entsprachen (siehe Abb. 1.8) und der Auswirkung erhöhter intrazellulärer cAMP-Gehalte auf das Ausmaß der Rezeptoraktivierung sowie der Bindungseigenschaften.

Die im Ergebnisteil aufgeführten Verweise auf frühere Arbeiten mag den Anschein erwecken, dass die vorgestellten Ergebnisse keine neuen Erkenntnisse liefern. Es ist jedoch anzumerken, dass mittlerweile gut untersuchte Befunde zum Zeitpunkt der Datenerhebung noch gänzlich unbekannt waren. Dies ist im vorgestellten Ergebnisteil unter Verwendung des artifiziellen Expressionssystems zu berücksichtigen.

4.1.1. Oxotremorin M aktiviert den M₂-Rezeptor in CHO-Zellen im selben Ausmaß wie Acetylcholin

Der muskarinische M₂-Rezeptor gehört zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR), welcher nach Agonistbindung vorzugsweise G_{i/o}-gekoppelte Signalwege aktiviert (Caulfield, 1993). Der orthosterische Agonist Oxotremorin M wurde hinsichtlich dieser Fähigkeit mit dem endogenen Liganden Acetylcholin verglichen. Mittlerweile existieren jedoch diverse Veröffentlichungen, welche die Aktivierung weitere G-Proteine wie G_s und G_{q/11} beschreiben (Michal et al., 2001; Mistry et al. 2005) (Michal et al., 2007). Die Versuche hinsichtlich der promiscuitiven Signalwegsaktivierung erfolgten nach Ausschaltung/Maskierung einzelner Signalwege. Es wurde die Methode der dynamischen Massenumverteilung (DMR) angewandt (siehe Kapitel 3.7), welche die Detektion verschiedener G-Protein-gekoppelter Signalwege ermöglicht (Schröder et al., 2010). In einigen Versuchen wurde der in CHO-Zellen stabil transfizierte M₃-Rezeptor (Janßen N., 2011) als Kontrolle für einen bevorzugt G_{q/11}-gekoppelten Rezeptor mitgeführt.

4.1.1.1. DMR-Messungen unter Kontrollbedingungen

Oxotremorin M induzierte in CHO-hM₂ und -hM₃ die für die Aktivierung von G_{i/o}- bzw. G_{q/11}-Proteinen charakteristischen DMR-Signale (Schröder et al. 2010, Scott und Peters, 2010), welche beide in den positiven DMR-Bereich ausgerichtet sind. Die in Abb. 4.1 dargestellten Originalregistrierungen zeigen für CHO-hM₂ ein schnell ansteigendes Signal, welches nach dem Erreichen des Maximalwertes wieder um ca. 30-50% abfällt und dadurch eine charakteristische Signalspitze aufweist (Abb. 4.1 A). Diese Signalspitze war bei hohen Agonistkonzentrationen (> EC₅₀) stärker ausgeprägt als bei niedrigen Konzentrationen (< EC₅₀). In CHO-hM₃ verlief die Signalzunahme dagegen langsamer, erreichte einen Maximalwert und mündete

anschließend in einem Plateau (Abb. 4.1 B). Die in beiden Zelllinien durch Oxotremorin M induzierten dynamischen Massenumverteilungen unterschieden sich weder hinsichtlich des Maximaleffektes noch bezüglich der Signalform vom endogenen Liganden Acetylcholin (Kebig A., 2010; Janßen N., 2011).

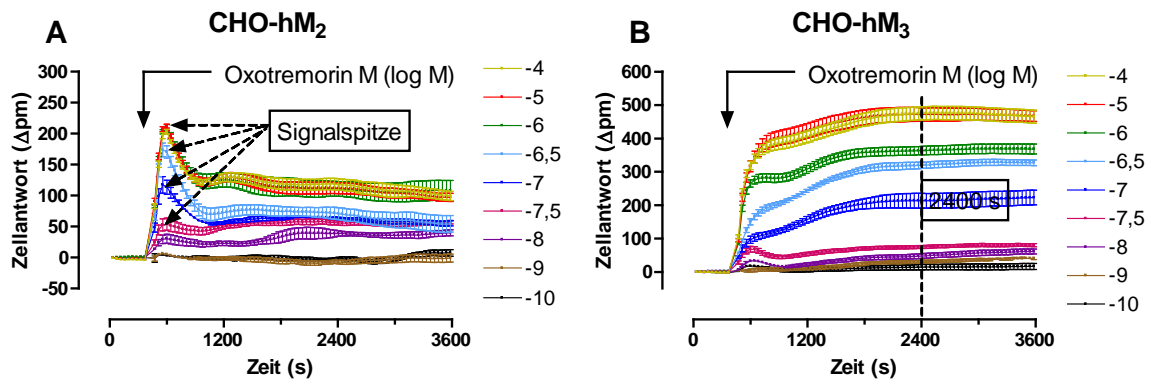


Abb. 4.1 Oxotremorin M-induzierte DMR-Signaturen in (A) CHO-hM₂ und (B) CHO-hM₃. Dargestellt sind repräsentative Originalregistrierungen nach Zusatz verschiedener Oxotremorin M-Konzentrationen. Der durchgezogene Pfeil markiert jeweils den Zeitpunkt der Substanzzugabe. *Ordinate:* Zellantwort in Picometer; *Abszisse:* Zeit in Sekunden; *Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler, Vierfachbestimmung

Oxotremorin M induzierte in beiden Zelllinien konzentrationsabhängige DMR-Signaturen und ermöglichte die Auftragung von Konzentrations-Effekt-Kurven (Abb. 4.2). Im Fall von CHO-hM₂ wurde als Ablesezeitpunkt die Agonist-induzierte Signalspitze verwendet und bei CHO-hM₃ der Messpunkt nach 2400 s (Schröder et al. 2011). Im Gegensatz zum M₂-Rezeptor konnte die dargestellte Mittelwertskurve des M₃-Rezeptors signifikant besser mit einer flachen Kurvensteilheit (F-Test, $p < 0,05$) angepasst werden. Da jedoch drei der vier durchgeführten Versuchstage eine normale Steilheit aufwiesen, wurde die Mittelwertskurve mit $n_H = 1$ festgesetzt. Oxotremorin M wies am M₂-Rezeptor eine um 0,7 Dekaden stärkere Wirksamkeit auf (unverbundener t-Test, $p < 0,01$). Dieser Unterschied zwischen M₂ und M₃ deckt sich mit früheren Beobachtungen unter Einsatz des endogenen Liganden Acetylcholin (pEC_{50} , M₂: 7,61; M₃: 6,95; Janßen N., 2011).

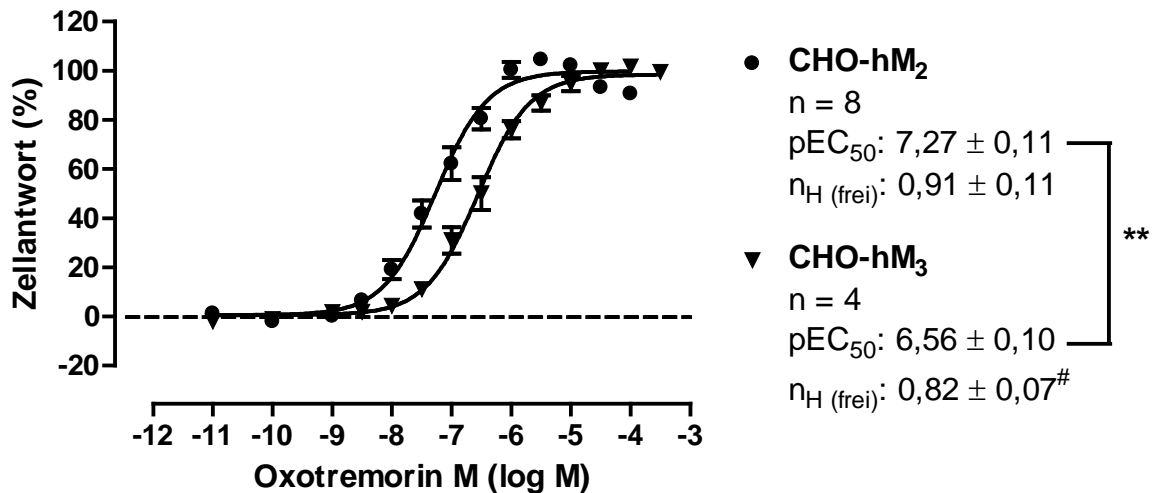


Abb. 4.2 Wirksamkeit von Oxotremorin M in CHO-hM₂- und CHO-hM₃-Zellen. *Ordinate*: Prozentuale Zellantwort; Die Konzentrations-Effekt-Kurven wurden auf ihr jeweiliges oberes und unteres Plateau normiert. *Abszisse*: Dekadischer Logarithmus der Oxotremorin M-Konzentration; *Kurvenanpassung*: Vier-Parameter-logistische Gleichung; *Datenpunkte*: Mittelwerte ± Standardfehler, n = 4 – 8, Vierfachbestimmung; *pEC₅₀*: Negativer dekadischer Logarithmus der molaren Oxotremorin M-Konzentration, welche eine halbmaximale Zellantwort hervorruft; *n_{H (frei)}*: Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit; # signifikant bessere Anpassung der Kurvensteilheit mit variablem Hill-Koeffizienten als mit einem konstanten von n_H = 1 (F-Test, p < 0,05); n: Anzahl unabhängiger Experimente; *Statistik*: Unverbundener t-Test (** p < 0,01)

4.1.1.2. DMR-Messungen nach Ausschaltung von G_{i/o}

Um die M₂-vermittelte Aktivierung weiterer G-Proteine neben G_{i/o} zu untersuchen wurden die Zellen mit Pertussis Toxin (PTX) vorbehandelt (100 ng/ml, > 12 h). PTX führt zu einer irreversiblen ADP-Ribosylierung der α-Untereinheit inhibitorischer G-Proteine, wodurch diese inaktiviert werden (Mangmool und Kurose, 2011). Supramaximale Oxotremorin M-Konzentrationen induzierten in PTX-behandelten CHO-hM₂-Zellen nun ein in den negativen Messbereich ausgerichtetes DMR-Signal, welches nach Erreichen eines negativen Maximalwertes wieder rückläufig war (Abb. 4.3 A). Dieses negativ ausgerichtete DMR-Signal konnte bereits eindeutig der M₂-vermittelten Aktivierung stimulatorischer G-Proteine zugeordnet werden (Kebig et al., 2009; Janßen N., 2011). Zur Bestimmung der Wirksamkeit wurde der negative Maximaleffekt innerhalb der ersten 1800 s verwendet. Gegenüber den Messungen unter Kontrollbedingungen ist der Wendepunkt um 1,4 Dekaden nach rechts verschoben (Abb. 4.3 C) und verdeutlicht die Prävalenz des M₂-Rezeptors an inhibitorische G-Proteine zu koppeln. Diese Wendepunktverschiebung zu höheren Konzentrationen an PTX-behandelten CHO-hM₂-Zellen ist ebenfalls für den endogenen Liganden Acetylcholin beschrieben (Janßen N., 2011).

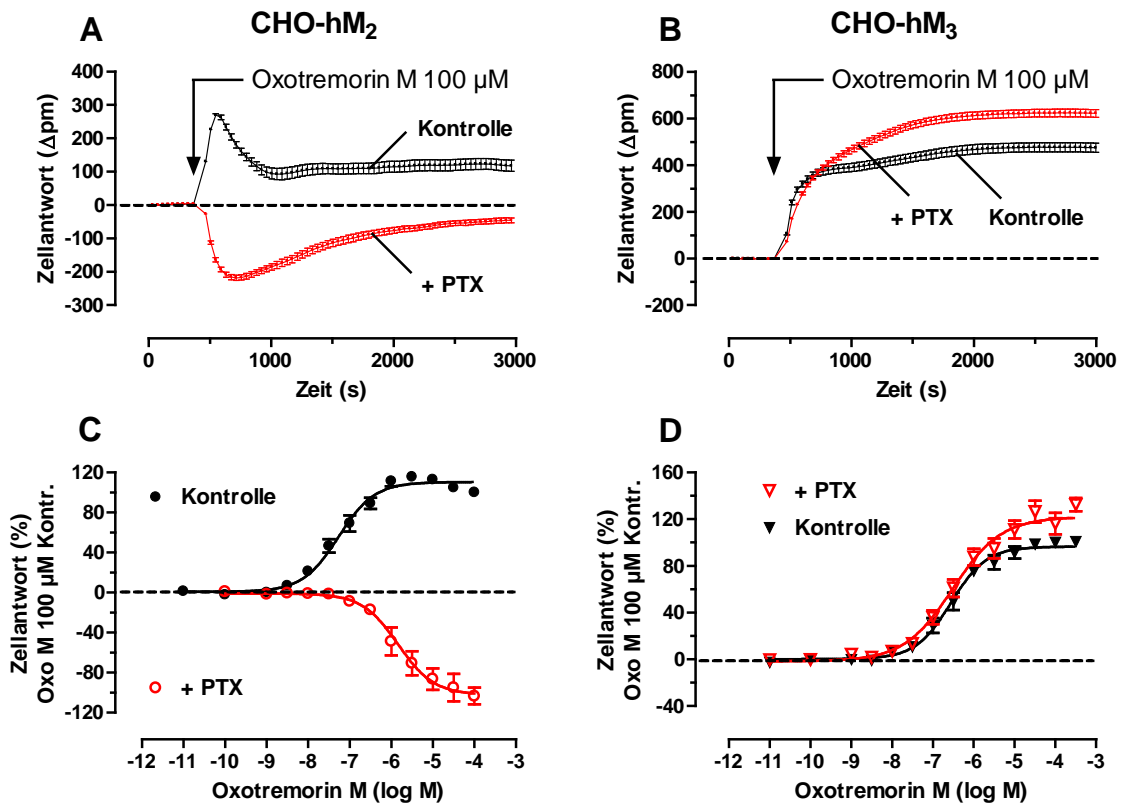


Abb. 4.3 Oxtremorin M-induzierte zelluläre dynamische Massenumverteilung (DMR) in CHO-hM₂ und CHO-hM₃ nach Ausschaltung inhibitorischer G-Proteine. (A, B): Dargestellt sind repräsentative Originalregistrierungen Oxtremorin M-induzierter DMR-Signaturen. Der Pfeil markiert jeweils den Zeitpunkt der Substanzzugabe. Die Nulllinie ist gestrichelt dargestellt. (C, D): Konzentrations-Effekt-Kurven; Die Kurven wurden auf den Effekt von Oxtremorin M 100 μM unter Kontrollbedingungen normiert. Das untere Plateau wurde auf Null festgesetzt. *Kurvenanpassung*: Vier-Parameter-logistische Gleichung; *Datenpunkte*: Mittelwerte ± Standardfehler, n = 4 - 8, Vierfachbestimmung

Interessanterweise war ebenfalls das in CHO-hM₃-Zellen induzierte DMR-Signal durch die PTX-Vorbehandlung beeinflusst, was sich in einer Erhöhung des maximal induzierbaren Signals und einer Veränderung der Signalform äußerte (Abb. 4.3 B). Das DMR-Signal wies einen gleichmäßiger ansteigenden Verlauf bis zum Erreichen des Maximaleffektes auf und verstärkte sich um ca. 20 % gegenüber dem Signal unter Kontrollbedingungen. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass der M₃-Rezeptor ebenfalls inhibitorische G-Proteine zu aktivieren vermag. Im Gegensatz dazu zeigten frühere Beobachtungen keine PTX-Sensitivität des M₃-vermittelten DMR-Signals (Schröder et al., 2010). Die Zunahme des DMR-Signals in CHO-hM₃ trotz Ausschaltung inhibitorischer G-Proteine, deren Aktivierung ebenfalls eine dynamische Massenumverteilung induziert, könnte von der Form des G_{i/o}-Signals herrühren. Nach Erreichen einer Signalspitze fällt das G_{i/o}-Signal stark ab und reduziert womöglich dadurch das Ausmaß des langsam ansteigenden G_{q/11}-Signals,

was heißt, dass das abfallende $G_{i/o}$ -Signal eventuell das $G_{q/11}$ -Signal "herunterzieht". Diese Beobachtung weicht von früheren Ergebnissen ab, die eine Signalzunahme des DMR-Signals in CHO-hM₃-Zellen beschreiben, wenn zusätzlich $G_{i/o}$ -Proteine aktiviert werden (Schröder et al., 2010). Es ist jedoch zu bedenken, dass die Zellen in jenen Experimenten mit Cholera toxin (CTX) vorbehandelt wurden, was eine ständige Aktivierung stimulatorischer G-Proteine bewirkt. Zudem kam bei den Untersuchungen von Schröder et al. (2010) nicht der von Nicole Janßen hergestellte Einzelklon zum Einsatz, welcher im Rahmen meiner Arbeit untersucht wurde. Beide experimentellen Abweichungen tragen möglicherweise zu den beobachteten Unterschieden bei. Im Gegensatz zum Maximaleffekt blieb dagegen die Wirksamkeit unbeeinflusst (unverbundener t-Test, $p > 0,05$). Die mit CHO-hM₃ erhobenen Konzentrations-Effekt-Kurven in beiden Fällen nicht mit einer normalen Steilheit angepasst werden (F-Test, $p < 0,05$). Im Gegensatz zu den PTX-behandelten Zellen konnten die Konzentrations-Effekt-Kurven unter Kontrollbedingungen jedes einzelnen Versuchstages jedoch mit einer normalen Steilheit angepasst werden. Folglich wurde die Steilheit der Mittelwertskurve unter Kontrollbedingungen auf $n_H = -1$ festgesetzt. Flache Kurvensteilheiten am M₃-Rezeptor wurden bereits in früheren Arbeiten beobachtet (Kellershohn K., 2007; Janßen N., 2011) und scheinen nicht direkt durch die PTX-Behandlung bedingt zu sein.

Oxotremorin M	CHO-hM ₂		CHO-hM ₃	
	Kontrolle	+ PTX	Kontrolle	+ PTX
pEC ₅₀	7,27 ± 0,11	5,84 ± 0,19****	6,56 ± 0,10	6,52 ± 0,04 ^{n.s.}
E _{max} (%)	111 ± 2	-102 ± 4****	97 ± 2	117 ± 3**
n _H	1	-1	1	0,73
n _{H (frei)}	0,91 ± 0,12	-0,90 ± 0,21	0,79 ± 0,09 [#]	0,73 ± 0,10 [#]
n	8	6	4	4

Tab. 4.1 Kenngrößen ± Standardfehler der Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abb. 4.3.
pEC₅₀: Negativ dekadischer Logarithmus der molaren Oxotremorin M-Konzentration, welche eine halbmaximale Zellantwort hervorruft. *E_{max}*: Maximale Zellantwort in Prozent, welche auf den Effekt von Oxotremorin M 100 µM unter Kontrollbedingungen normiert wurde. *n_H*: festgesetzter Hill-Koeffizient; *n_{H (frei)}*: Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit; [#] signifikant bessere Anpassung der Kurvensteilheit mit variablem Hill-Koeffizienten als mit einem konstanten von *n_H* = 1 (F-Test, *p* < 0,05); *n*: Anzahl unabhängiger Experimente; *Statistik*: Unverbundener t-Test (**** *p* < 0,0001; ** *p* < 0,01 n.s. = nicht signifikant); Der Test erfolgte gegen die jeweilige Kontrolle.

4.1.1.3. DMR-Messungen nach Ausschaltung von G_{q/11}

Neben der M₂-vermittelten Aktivierung stimulatorischer G-Proteine wurde bereits Ende der 80er ein Anstieg des intrazellulären Botenstoffes Inositolphosphat (IP) nach M₂-Aktivierung beobachtet (Ashkenazi et al., 1987). Dieser Anstieg konnte mittlerweile der Aktivierung von G_{q/11}-Proteinen zugeordnet werden (Michal et al., 2006). Von Andeas Bock durchgeführte DMR-Messungen mit CHO-hM₂ wiesen ebenfalls auf eine Acetylcholin-induzierte Aktivierung von G_{q/11}-Proteinen unter Kontrollbedingungen hin (Andeas Bock, mündliche Mitteilung). Zur Überprüfung, ob Oxotremorin M ebenfalls in der Lage ist eine M₂-vermittelte G_{q/11}-Aktivierung zu bewirken, wurden die Zellen mit dem G_{q/11}-Inhibitor MH-362-63-08 in einer Konzentration von 1 µM vorbehandelt. Diese Konzentration bewirkte am Cholecystokinin-Rezeptor eine komplette Hemmung der G_{q/11}-vermittelten Rezeptorantwort (Nesterov et al., 2010). CHO-hM₃ diente zur Überprüfung der Wirksamkeit des Inhibitors, da hier eine Hemmung von G_{q/11}-Proteinen deutlich detektierbar sein sollte.

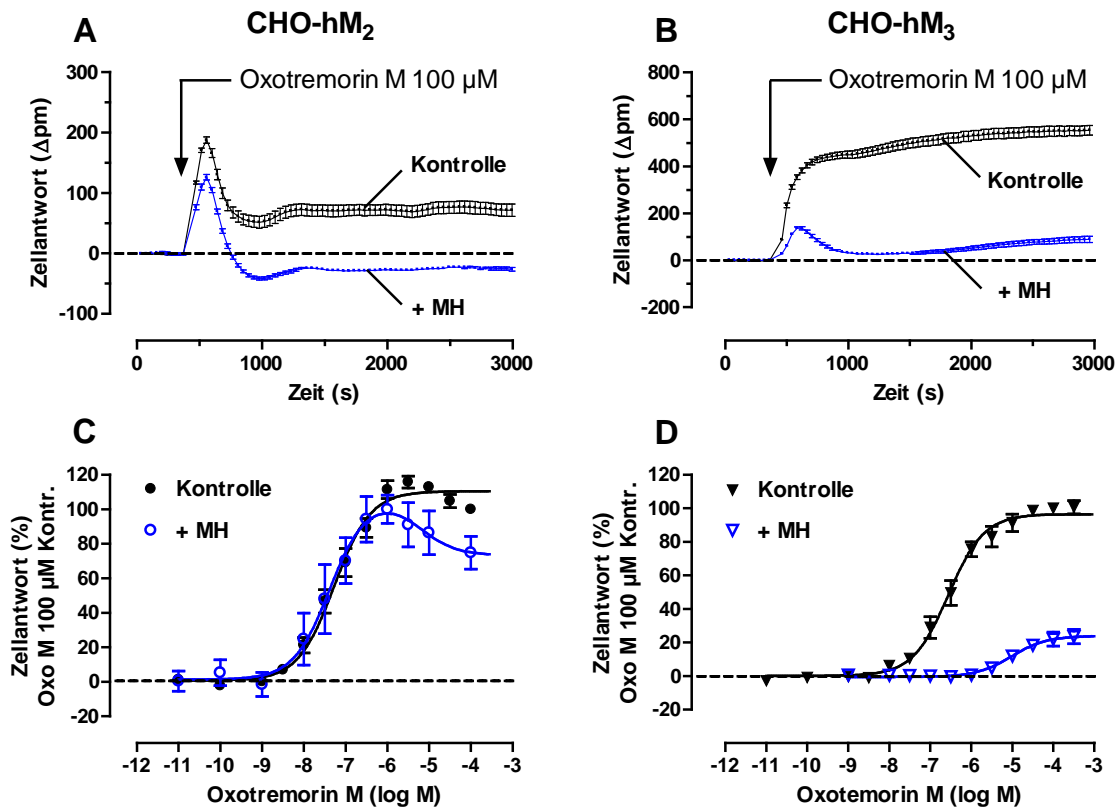


Abb. 4.4 Oxtremorin M-induzierte zelluläre dynamische Massenumverteilung (DMR) in CHO-hM₂ und CHO-hM₃ nach Ausschaltung von G_{q/11}-Proteinen. (A, B): Dargestellt sind repräsentative Originalregistrierungen Oxtremorin M-induzierter DMR-Signaturen. Der Pfeil markiert jeweils den Zeitpunkt der Substanzzugabe. Die Nulllinie ist gestrichelt dargestellt. (C, D): Konzentrations-Effekt-Kurven; Die Kurven wurden jeweils auf den Effekt von Oxtremorin M 100 µM unter Kontrollbedingungen normiert. Das untere Plateau wurde auf Null festgesetzt. *Kurvenanpassung*: Vier-Parameter-logistische Gleichung bzw. 'bell-shaped curve'; *Datenpunkte*: Mittelwerte ± Standardfehler, n = 3 - 8, Vierfachbestimmung

In CHO-hM₂-Zellen erreichte das Oxtremorin M-Signal nach G_{q/11}-Hemmung nicht mehr das Niveau der Kontrollmessungen. Das DMR-Signal schwang nach dem Erreichen des Maximaleffektes zudem bis zur Nulllinie oder teilweise sogar in den negativen DMR-Bereich zurück (Abb. 4.3 A). Ansteigender Agonist-Konzentrationen resultierten in eine glockenförmige Konzentrations-Effekt-Kurve mit einem hoch- und einem niedrigaffinen Wendepunkt. Der hochaffine Wendepunkt des aufsteigenden Schenkels (pEC_{50_1}: 7,38 ± 0,22) unterschied sich dabei nicht von dem Wendepunkt unter Kontrollbedingungen (pEC₅₀: 7,27 ± 0,11). Der niedrigaffine Wendepunkt des absteigenden Schenkels (pEC_{50_2}: 5,23 ± 0,87) deckt sich interessanterweise mit der Wirksamkeit von Oxtremorin M an PTX-behandelten CHO-hM₂-Zellen (Tab. 4.1; pEC₅₀: 5,84 ± 0,19). Auffällig ist, dass im Fall von CHO-hM₂ auch unter Kontrollbedingungen eine glockenförmige Konzentrations-Effekt-Kurve zu erkennen ist (Abb. 4.4 C). Die Datenpunkte waren jedoch mit der 'bell-shaped curve' nicht gut

anzupassen. Nach anfänglicher Zunahme der Signalintensität bis zu einer Konzentration von 3 μM nahm das DMR-Signal unter Kontrollbedingungen anschließend wieder ab (Abb. 4.4 C). Dies deutet auf eine simultane Aktivierung von $G_{i/o}$ - und G_s -Proteinen hin. Da das DMR-Signal durch Aktivierung von G_s in den negativen DMR-Bereich ausgerichtet ist, reduziert dies folglich das $G_{i/o}$ -Signal, welches in den positiven DMR-Bereich ausgerichtet ist. Mittels der dynamischen Massenumverteilung ist es somit möglich, die Aktivierung von $G_{i/o}$ - und G_s -Proteinen simultan zu detektieren. Dies wurde umso deutlicher, nachdem ebenfalls $G_{q/11}$ -Proteine gehemmt wurden und konnte ebenfalls unter Einsatz des endogenen Liganden Acetylcholin beobachtet werden (Andreas Bock, mündliche Mitteilung).

Oxotremorin M	CHO-hM ₂		CHO-hM ₃	
	Kontrolle	+ MH	Kontrolle	+ MH
pEC _{50_1}	7,27 ± 0,11	7,38 ± 0,22 ^{n.s.}	6,56 ± 0,10	5,02 ± 0,09**
pEC _{50_2}	-	5,23 ± 0,87	-	-
E _{max} (%)	111 ± 2	-	97 ± 2	24 ± 1
n _H	1	1 bzw. -1	1	1
n _{H (frei)}	0,91 ± 0,12	-	0,80 ± 0,09	1,22 ± 0,37
n	8	3	4	3

Tab. 4.2 Kenngrößen ± Standardfehler der Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abb. 4.4. *pEC_{50_1}*: Negativer dekadischer Logarithmus der molaren Oxotremorin M-Konzentration, welche eine halbmaximale Zellantwort hervorruft. *pEC_{50_2}*: Negativer dekadischer Logarithmus der molaren Oxotremorin M-Konzentration, welche den Wendepunkt des abfallenden Astes der biphasischen Konzentrations-Effekt-Kurve beschreibt. *E_{max}*: Maximale Zellantwort in Prozent, welche auf den Effekt von Oxotremorin M 100 μM unter Kontrollbedingungen bezogen ist. *n_H*: festgesetzter Hill-Koeffizient; *n_{H (frei)}*: Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit; *n*: Anzahl unabhängiger Experimente; *Statistik*: Unverbundener t-Test (** $p < 0,01$, n.s. = nicht signifikant); Der Test erfolgte gegen die jeweilige Kontrolle.

Im Fall von CHO-hM₃ verschwand die charakteristische $G_{q/11}$ -Signal durch die Vorbehandlung mit MH-362-63-08 fast vollständig (Abb. 4.4 B) und demonstret die Wirksamkeit des eingesetzten $G_{q/11}$ -Inhibitors. Oxotremorin M vermochte nur noch ein Restsignal zu induzieren, welches sich durch eine Signalspitze auszeichnete und von der Form her dem $G_{i/o}$ -Signal des M₂-Rezeptors ähnelte. Folglich wurde zur Bestimmung der Wirksamkeit die Agonist-induzierte Signalspitze herangezogen. Gegenüber den Messungen unter Kontrollbedingungen ist der Wendepunkt

interessanterweise um 1,6 Dekaden signifikant nach rechts verschoben (unverbundener t-Test, $p < 0,01$). Neben der Aktivierung von $G_{q/11}$ -Proteinen scheint somit ebenfalls die Kopplung des M_3 -Rezeptors an $G_{i/o}$ -Proteine möglich zu sein, was bereits ebenfalls mit murinen Speicheldrüsenzellen gezeigt werden konnte (Dai et al., 1991). Im Epic[®] konnte die M_3 -vermittelte $G_{i/o}$ -Aktivierung jedoch bislang nur unter erhöhten intrazellulären cAMP-Gehalten nachgewiesen werden (Schröder et al., 2010).

4.1.1.4. DMR-Messungen nach Maskierung von G_s

Für die Untersuchung des Einflusses von G_s -Proteinen auf das DMR-Signal sind noch keine Substanzen bekannt, welche stimulatorische G-Proteine selektiv hemmen. Ihr Einfluss kann nur untersucht werden, indem ihre Aktivierung maskiert wird. Dazu müssen entweder die G_s -Proteine oder die nachgeschaltete Adenylylzyklase maximal stimuliert werden. Für die Maskierung wurde der Adenylylzyklase-Aktivator Forskolin in einer sättigenden Konzentration eingesetzt (Kebig A., 2010).

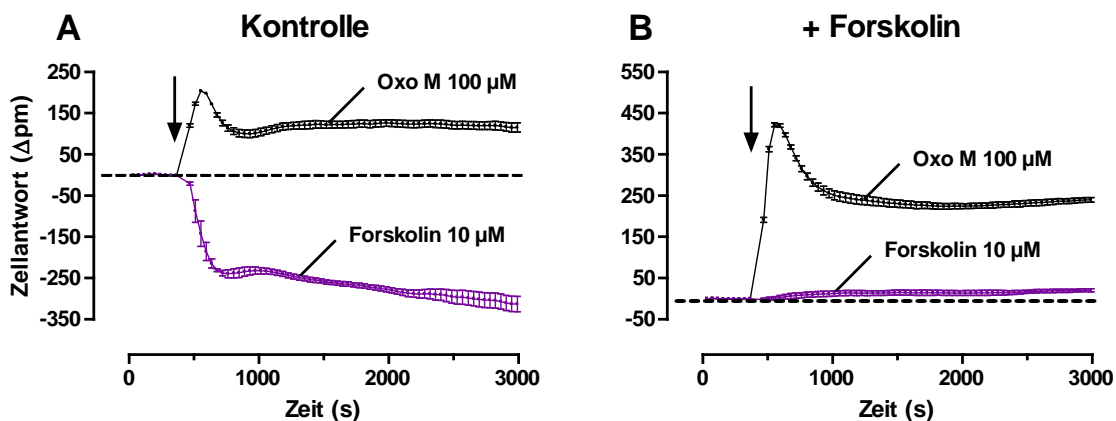


Abb. 4.5 **Forskolin-Effekt auf das Oxotremorin M-induzierte DMR-Signal von CHO-hM₂.** Dargestellt sind repräsentative Originalregistrierungen unter (A) Kontrollbedingungen und (B) nach Forskolin-Vorstimulation. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Substanzzugabe. Die Nulllinie ist gestrichelt dargestellt. *Ordinate*: Zellantwort in Picometer; *Abszisse*: Zeit in Sekunden; *Datenpunkte*: Mittelwerte \pm Standardfehler, Vierfachbestimmung

Forskolin selbst induzierte in CHO-hM₂ ein negatives DMR-Signal (Abb. 4.5 A). Wurden die Zellen mit Forskolin vorbehandelt (10 µM, 2 h), konnte durch eine erneute Gabe von Forskolin keine weitere Wellenlängenverschiebung in den negativen Bereich mehr detektiert werden (Abb. 4.5 B). Die Aktivierung von G_s war

somit maskiert. Das muskarinische DMR-Signal des Agonisten Oxotremorin M war unter diesen Bedingungen jedoch stark vergrößert, was auf eine verstärkte Aktivierung inhibitorischer G-Proteine unter erhöhten cAMP-Gehalten hinweist, was mit Untersuchungen unter Einsatz von Acetylcholin übereinstimmt (Kebig et al., 2010; Janßen N., 2011).

Während sich durch die Forskolin-Vorstimulation die maximal induzierbare Zellantwort (E_{max}) verdoppelte, blieb die Wirksamkeit (pEC_{50}) muskarinischer Agonisten unbeeinflusst (siehe Abb. 4.6). Diese Beobachtung zeigt, dass die unter Kontrollbedingungen erhobenen Wirksamkeiten nicht signifikant durch die alternative Aktivierung von G_s -Proteinen beeinflusst ist.

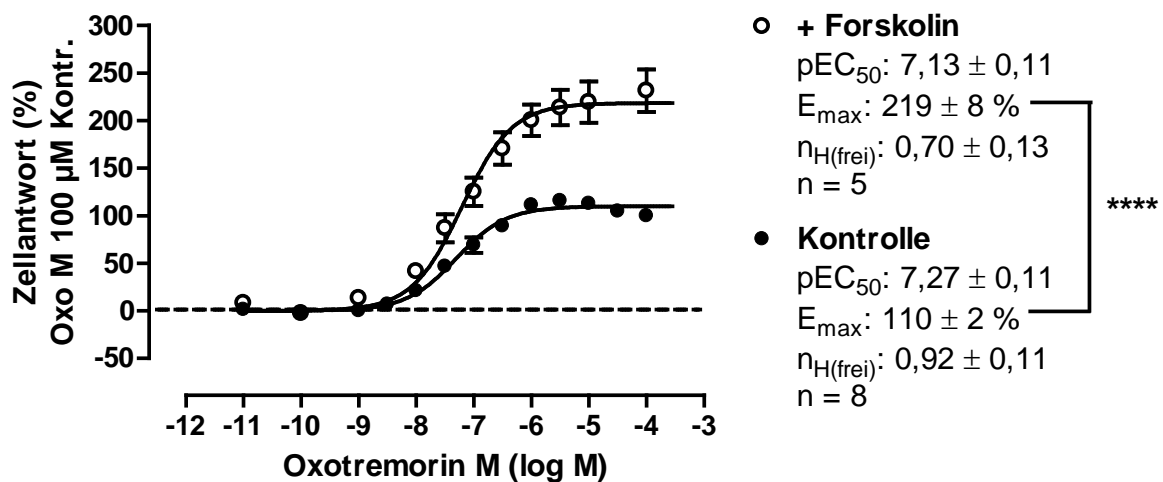


Abb. 4.6 Oxotremorin M-induzierte zelluläre dynamische Massenumverteilung (DMR) in CHO-hM₂ nach Maskierung von G_s-Proteinen. Dargestellt sind die Konzentrations-Effekt-Kurven von Oxotremorin M unter Kontrollbedingungen (●) und nach Forskolin-Vorstimulation (○; 10 μM, 2 h). *Ordinate:* Zellantwort in Prozent, welche auf den Effekt von Oxotremorin M 100 μM unter Kontrollbedingungen bezogen ist. Das untere Plateau der Kurven wurde auf Null festgesetzt. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Oxotremorin M-Konzentration; *Kurvenanpassung:* Vier-Parameter-logistische Gleichung; *Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler, n = 4 – 8, Vierfachbestimmung; *pEC₅₀:* Negativer dekadischer Logarithmus der molaren Oxotremorin M-Konzentration, welche eine halbmaximale Zellantwort hervorruft. *E_{max}:* Maximale Zellantwort in Prozent, welche auf den Effekt von Oxotremorin M 100 μM unter Kontrollbedingungen normiert wurde. *n_{H(frei)}:* Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit; *n:* Anzahl unabhängiger Experimente; *Statistik:* Unverbundener t-Test (****p < 0,0001)

4.1.2. Dualsterische Liganden besitzen Signalwegsselektivität

Wie im vorausgegangenen Abschnitt dargestellt besitzt der M_2 -Rezeptor im gewählten rekombinanten Expressionssystem die Fähigkeit neben inhibitorischen G-Proteinen noch weitere G-Proteine zu aktivieren. Diese Fähigkeit der promiscuitiven G-Proteinaktivierung wurde nachfolgend unter Einsatz der dualsterischen Liganden Iper-6-phth und Iper-8-phth untersucht. Diese wurde mit Hilfe der dynamischen Massenumverteilung (DMR) und der Detektion des sekundären Botenstoffs cAMP bestimmt. Alle Experimente wurden an PTX-behandelten CHO-h M_2 -Zellen durchgeführt (PTX: 100 ng/ml, > 12 h).

4.1.2.1 DMR-Messungen mit CHO-h M_2 -Zellen nach Ausschaltung inhibitorischer G-Proteine

In PTX-vorbehandelten CHO-h M_2 -Zellen induzieren die orthosterischen Agonisten Oxotremorin M und Iperoxo analog zu Forskolin ein negativ ausgerichtetes DMR-Signal (Abb. 4.7). Im Gegensatz zu Forskolin wiesen die negativ ausgerichteten DMR-Signaturen muskarinischer Agonisten nach dem Erreichen des Maximaleffektes einen Rückgang des Signals auf. Während jedoch Forskolin sein Signal über die direkte Aktivierung der Adenylylzyklase vermittelt, induzieren muskarinische Agonisten ihr DMR-Signal über die Aktivierung von Rezeptoren und G-Proteinen, was den Unterschied in der DMR-Signatur verursachen könnte. Der dualsterische Ligand Iper-8-phth wies ebenfalls ein negativ ausgerichtetes DMR-Signal auf, welches jedoch deutlich kleiner war als das von Oxotremorin M. In früheren Arbeiten induzierte Iper-8-phth dagegen keine dynamische Massenumverteilung (Michalski H., 2009; Kebig A., 2010; Janßen N., 2011). Iper-6-phth verhielt sich dagegen wie Pilocarpin. Beide Agonisten induzierten nur eine schwache Zellantwort. Die Hypothese einer unterschiedlich starken Gs-Aktivierung wurde nachfolgend durch Bestimmung des sekundären Botenstoffs cAMP genauer untersucht.

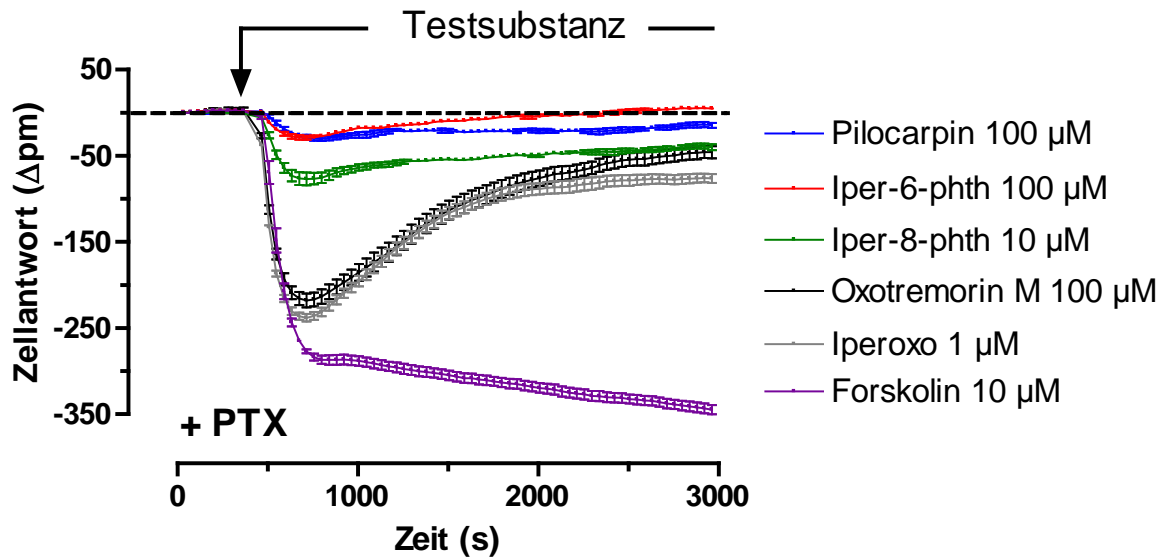


Abb. 4.7 Agonist-induzierte dynamische Massenumverteilung in CHO-hM₂ nach Ausschaltung inhibitorischer G-Proteine durch PTX-Vorbehandlung (100 ng/ml, > 12 h). Dargestellt sind repräsentative Originalregistrierungen der verwendeten Testsubstanzen. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Substanzzugabe. Die Nulllinie ist gestrichelt dargestellt. *Ordinate:* Zellantwort in Picometer; *Abszisse:* Zeit in Sekunden; *Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler, Vierfachbestimmung

4.1.2.2 cAMP-Messungen mit adhärennten CHO-hM₂-Zellen nach Ausschaltung inhibitorischer G-Proteine

Die Bestimmung des intrazellulären cAMP-Anstiegs erfolgte unter Verwendung des cAMP dynamic 2-*kit* der Firma Cisbio (Kapitel 3.8). Die Bestimmung des cAMP-Gehaltes wurde mit adhärennten CHO-hM₂-Zellen zur Quantifizierung des Agonist-vermittelten cAMP-Anstiegs durchgeführt, welcher auf den Maximaleffekt von Forskolin normiert wurde.

Oxotremorin M induzierte in CHO-hM₂ einen beträchtlichen cAMP-Anstieg, welcher 62 ± 2 % von Forskolin betrug. Iperoxo brachte es sogar auf ganze 72 ± 1 % und war somit signifikant stärker als Oxotremorin M (siehe Tab. 4.3). Eine cAMP-Zunahme von 22 ± 1 % konnte ebenfalls für den dualsterischen Agonisten Iper-8-phth nachgewiesen werden. Dieser Befund belegt die zuvor vermutete partialagonistische Wirkung von Iper-8-phth auf stimulatorische G-Proteine. Im Gegensatz zu Iper-8-phth war eine cAMP-Bildung durch Iper-6-phth selbst bei hohen Agonist-Konzentrationen nicht zu bestimmen. Da die Anpassung einer Kurve an die erhobenen Datenpunkte von Iper-6-phth nicht möglich war, entfiel die Bestimmung der Wirksamkeit. Pilocarpin wurde in den cAMP-Messungen nichteingesetzt, da in den zuvor

durchgeführten DMR-Messungen die DMR so gering war wie im Fall von Iper-6-phth. Mit Ausnahme von Iperoxo konnten alle Kurven mit einer normalen Kurvensteilheit beschrieben werden (siehe Tab. 4.3). Anzumerken ist die gute Übereinstimmung der cAMP-Daten mit der dynamischen zellulären Massenumverteilung in PTX-behandelten CHO-hM₂-Zellen, sowohl hinsichtlich der relativen Maximaleffekte als auch bezüglich der Wirksamkeit (z.B. pEC₅₀ Oxo M, DMR: 5,84 ± 0,19; cAMP: 5,70 ± 0,03).

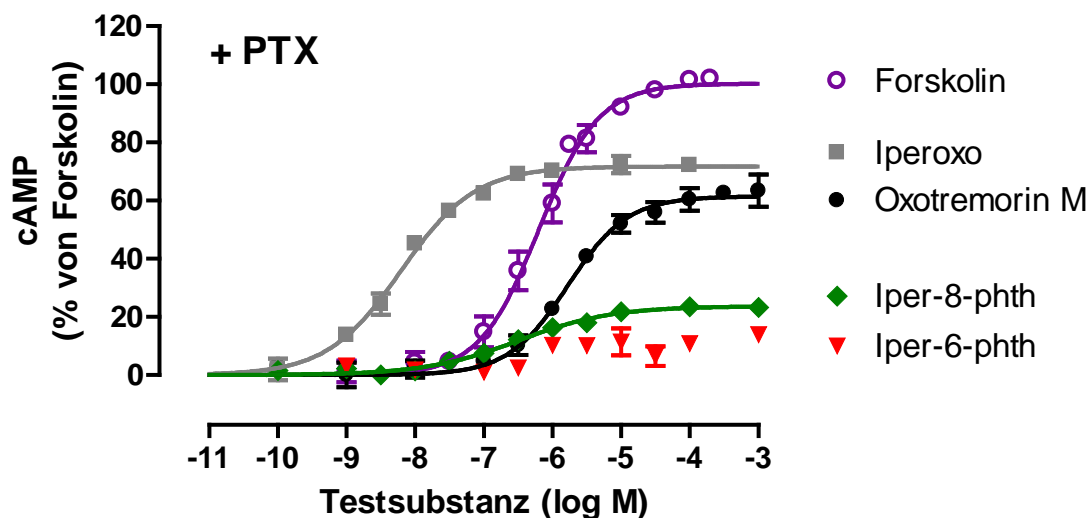


Abb. 4.8 Agonist-induzierte cAMP-Produktion in CHO-hM₂ nach PTX-Vorbehandlung. Ordinate: Prozentuale Agonist-induzierte cAMP-Produktion, welche auf den Effekt von Forskolin normiert wurde. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Testsubstanz-Konzentrationen; Kurvenanpassung: Vier-Parameter-logistische Gleichung; Datenpunkte: Mittelwerte ± Standardfehler, n = 3 – 5, Dreifachbestimmung

Testsubstanz	pEC ₅₀	E _{max} (%)	n _H	n _H (frei)	n
Forskolin	6,16 ± 0,11	100 ± 2**	1	0,89 ± 0,10	5
Oxotremorin M	5,70 ± 0,03	62 ± 2	1	0,95 ± 0,14	3
Iperoxo	8,20 ± 0,10	72 ± 1*	0,80	0,80 ± 0,09 [#]	3
Iper-6-phth	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3
Iper-8-phth	6,45 ± 0,12	22 ± 1**	1	0,71 ± 0,18	3

Tab. 4.3 Kenngrößen ± Standardfehler der Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abb. 4.8. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus der molaren Testsubstanz-Konzentration, welche eine halbmaximale Zellantwort hervorruft. E_{max}: Maximale Zellantwort in Prozent, welche auf Forskolin normiert ist. n_H: festgesetzter Hill-Koeffizient; n_H (frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit; [#] signifikant bessere Anpassung der Kurvensteilheit mit variablem Hill-Koeffizienten als mit einem konstanten von n_H = 1 (F-Test, p < 0,05); n: Anzahl unabhängiger Experimente; n.d.: not determined; Statistik: ANOVA, Dunnett's post-Test gegen Oxotremorin M (* p < 0,05, ** p < 0,01)

4.1.3. cAMP-Erhöpfung legt den Partialagonismus offen

Es stellte sich die Frage, ob die in Kapitel 4.1.2 detektierte eingeschränkte Fähigkeit stimulatorische G-Proteine zu aktivieren ebenfalls mit einer reduzierten Fähigkeit einhergeht inhibitorische G-Proteine zu aktivieren.

Der Einsatz supramaximaler Agonistkonzentrationen induzierte unter Kontrollbedingungen in allen Fällen die typischen $G_{i/o}$ -Signale, welche hinsichtlich ihrer Signalintensität alle in ähnlichen Bereichen um die 200 Δ pm lagen (siehe Abb. 4.9 A und Abb. 4.10 A). Auch Pilocarpin, welches in früheren Arbeiten als Partialagonist im Epic[®] beschrieben ist (Kebig A., 2010, Janßen N., 2011), erreichte in den durchgeführten Versuchen das Niveau von Oxotremorin M. Der dualsterische Ligand Iper-8-phth induzierte sogar stärkere Signale als Oxotremorin M. Da kein Unterschied hinsichtlich der intrinsischen Aktivität unter Kontrollbedingungen detektiert werden konnte, wurden die Zellen zur Aufweitung des Messfensters mit Forskolin vorbehandelt (10 μ M, 2 h). Die Forskolinvorstimulation führte zu einer Zunahme der Agonist-induzierten dynamischen Massenumverteilung und ebenso zu einer Auffächerung der DMR-Signaturen (siehe Abb. 4.9 B).

Die Forskolin-Vorbehandlung vergrößerte das DMR-Signal von Oxotremorin M und Iperoxo deutlich. Die dualsterischen Liganden Iper-6-ph und Iper-8-phth nahmen unter diesen Bedingungen in ihrer Signalintensität zwar ebenfalls zu, erreichten jedoch nicht mehr das Niveau von Oxotremorin M. Der Unterschied war im Fall von Iper-6-phth signifikant. Pilocarpin induzierte interessanterweise keine detektierbare Signalzunahme nach Forskolin-Vorstimulation und war nochmal wesentlich schwächer als Iper-6-phth. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Abb. 4.9 dargestellt und Tab. 4.4 aufgelistet.

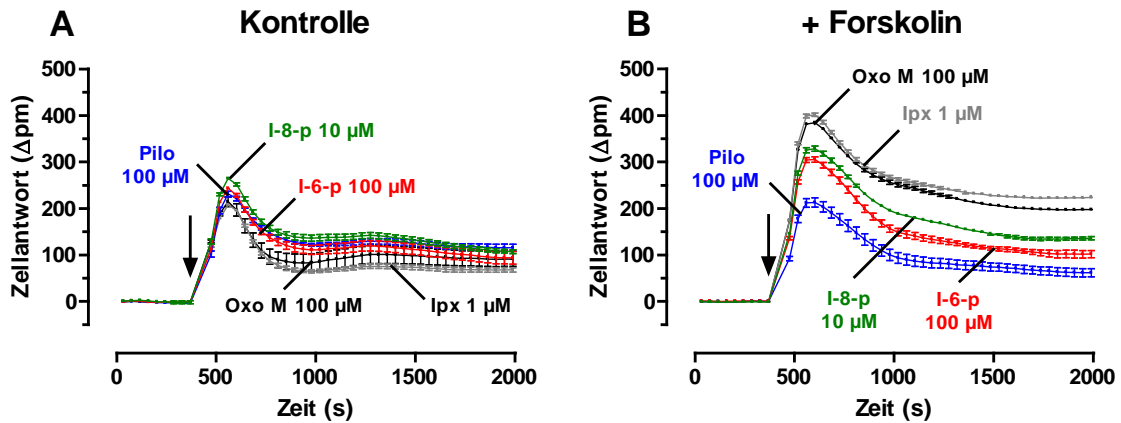


Abb. 4.9 Forskolin-Effekt auf die Agonist-induzierte DMR in CHO-hM₂. Dargestellt sind repräsentative Originalregistrierungen unter (A) Kontrollbedingungen (B) nach Forskolin-Vorstimulation (10 μM, 2 h); Der Pfeil markiert jeweils den Zeitpunkt der Substanzzugabe. Ordinate: Zellantwort in Picometer; Abszisse: Zeit in Sekunden; Datenpunkte: Mittelwerte ± Standardfehler, Vierfachbestimmung

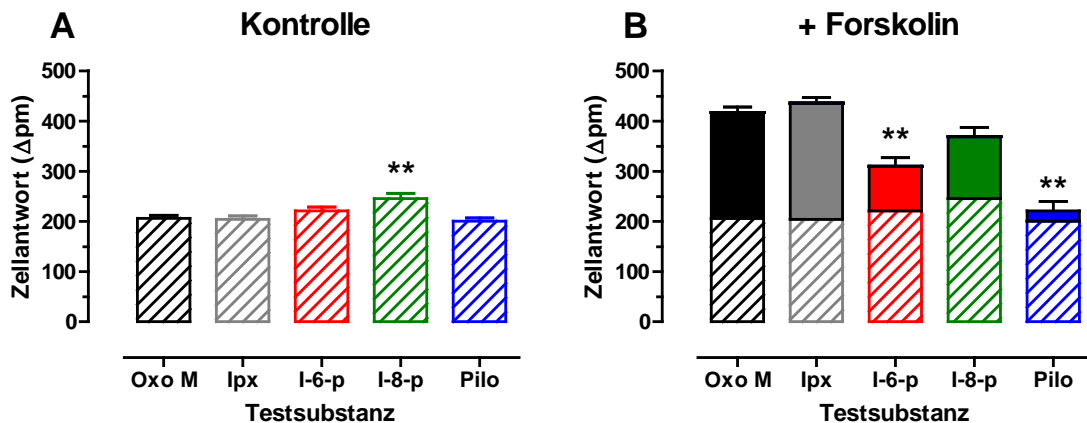


Abb. 4.10 Beeinflussung der Agonist-induzierten Maximaleffekte durch Forskolin. Dargestellt ist die maximal induzierbare intrazelluläre dynamische Massenumverteilung in CHO-hM₂. Unter (A) Kontrollbedingungen und (B) nach Forskolin-Vorstimulation (10 μM, 2 h); Ordinate: Maximale Zellantwort in Picometer; Datenpunkte: Mittelwerte ± Standardfehler, n = 7 – 20, Vierfachbestimmung; Statistik: ANOVA, Dunnett's post-Test gegen Oxo M (** p < 0,01)

Testsubstanz	Kontrolle		+ Forskolin		ΔE_{max} (Δpm)
	E_{max} (Δpm)	n	E_{max} (Δpm)	n	
Oxotremorin M 100 μM	206 \pm 6	20	417 \pm 11 ⁺	16	211
Iperoxo 1 μM	204 \pm 7	18	436 \pm 12 ⁺	15	232
Iper-6-phth 100 μM	221 \pm 7	15	310 \pm 17 ^{** +}	12	89
Iper-8-phth 10 μM	246 \pm 11 ^{**}	9	369 \pm 19 ⁺	7	123
Pilocarpin 100 μM	200 \pm 7	17	221 \pm 19 ^{**}	14	21

Tab. 4.4 Kenngrößen \pm Standardfehler der gemittelten Maximaleffekte aus Abb. 4.10. E_{max} : Maximale Zellantwort in Picometern; n : Anzahl unabhängiger Experimente; ΔE_{max} : Differenz der E_{max} -Werte unter Kontrollbedingungen und nach Forskolin-Vorstimulation; *Statistik*: ANOVA, Dunnett's post-Test gegen Oxo M (** $p < 0,01$); Unverbundener t-Test gegen die jeweilige Kontrolle (⁺ $p < 0,0001$)

Zur Kontrolle des Einsatzes supramaximaler Agonist-Konzentrationen unter den erhöhten intrazellulären cAMP-Gehalten nach Forskolin-Vorstimulation wurden im Anschluss Konzentrations-Effekt-Kurven erhoben. Für die Darstellung der Mittelwertskurven wurden die Konzentrations-Effekt-Kurven der einzelnen Versuchstage auf ihr jeweiliges oberes und unteres Plateau normiert und mit einer Steilheit von $n_H = 1$ festgesetzt, da jeder einzelne Versuch mit dieser Steilheit angepasst werden konnte (F-Test, $p > 0,05$) (siehe Abb. 4.11).

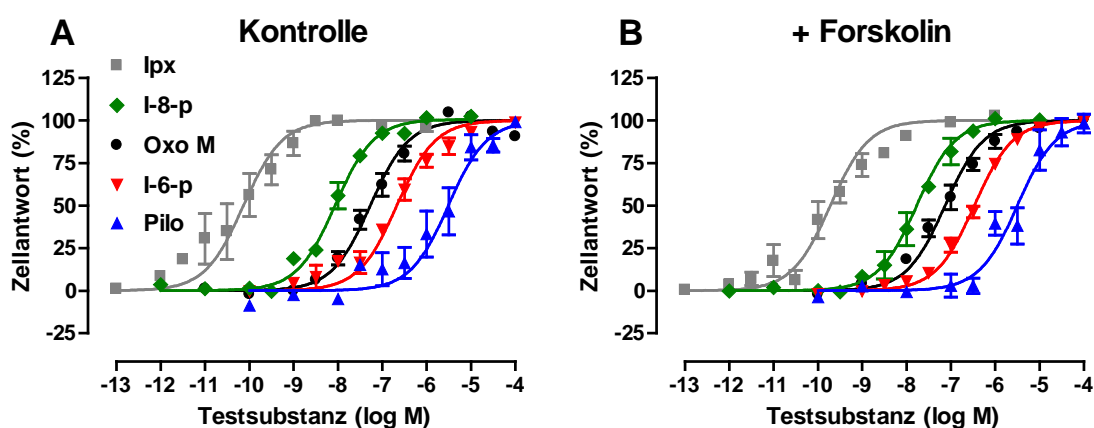


Abb. 4.11 Beeinflussung der Wirksamkeit muskarinischer Agonisten durch Forskolin-Vorstimulation. Dargestellt sind Konzentrations-Effekt-Kurven der eingesetzten muskarinischen Agonisten in CHO-hM₂ unter (A) Kontrollbedingungen und (B) nach Forskolin-Vorstimulation (10 μM , 2 h). *Ordinate*: Prozentuale Zellantwort; Die Konzentrations-Effekt-Kurven wurden auf ihr jeweiliges oberes und unteres Plateau normiert. *Abszisse*: Dekadischer Logarithmus der Testsubstanz-Konzentration; *Kurvenanpassung*: Vier-Parameter-logistische Gleichung; *Datenpunkte*: Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 3 - 8$, Vierfachbestimmung

Es konnte für keinen muskarinischen Agonisten eine Beeinflussung der Wirksamkeit durch die Forskolin-Vorstimulation detektiert werden (unverbundener t-Test, $p > 0,05$). Die reduzierten DMR-Signale beruhen somit eindeutig auf einer im Vergleich zu Oxotremorin M verringerten intrinsischen Aktivität unter erhöhten intrazellulären cAMP-Gehalten.

Agonist	Kontrolle		+ Forskolin	
	pEC ₅₀	n	pEC ₅₀	n
Oxotremorin M	7,27 ± 0,11	8	7,13 ± 0,11	5
Iperoxo	10,13 ± 0,26	5	9,72 ± 0,27	6
Iper-6-phth	6,67 ± 0,04	3	6,47 ± 0,07	3
Iper-8-phth	8,06 ± 0,07	4	7,77 ± 0,17	3
Pilocarpin	5,51 ± 0,17	4	5,50 ± 0,22	5

Tab. 4.5 Wirksamkeiten ± Standardfehler der Konzentrations-Effekt-Kurven Abb. 4.11. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus der molaren Testsubstanz-Konzentration, welche eine halbmaximale Zellantwort hervorruft; n: Anzahl unabhängiger Experimente; Statistik: Unverbundener t-Test gegen die jeweilige Kontrolle ($p > 0,05$)

4.1.4. Forskolin induziert Rezeptorinternalisierung

Die Auswirkung erhöhter intrazellulärer cAMP-Gehalte auf das Bindungsverhalten muskarinischer Liganden wurde mittels Radioligand-Bindungsversuche in An- und Abwesenheit von 10 μM Forskolin an lebenden CHO-hM₂-Zellen untersucht. Der Radioligand [³H]NMS wurde in einer Konzentration von 0,2 nM eingesetzt und die unspezifische Bindung mit dem inversen Agonisten Atropin bestimmt. Die detektierte Gesamtbindung bzw. spezifische Bindung des Radioliganden wurde gegen den Logarithmus der eingesetzten Konzentrationen des Inhibitors aufgetragen. Anschließend erfolgte die Kurvenanpassung unter Anwendung der Vier-Parameter-logistischen Gleichung (siehe Abb. 4.12 und Abb. 4.13)

4.1.4.1. Bindungsverhalten des Radioliganden [³H]NMS

Die Durchführung homologer Kompetitionsversuche zur Bestimmung der Bindungsaffinität (K_D) deutete auf kein verändertes Bindungsverhalten hin. Beide Bindungskurven wiesen eine normale Steilheit auf (F-Test, $p > 0,05$) und die ermittelten Affinitäten (pK_D) wichen nicht signifikant voneinander ab (siehe Tab. 4.6). Demgegenüber induzierte Forskolin eine Reduzierung der membranständigen Rezeptoren (B_{max}). Die Reduzierung der Rezeptorzahl konnte konstant an jedem Versuchstag detektiert werden, betrug im Mittel 15% und äußerte sich in einer Reduktion des oberen Plateaus der Bindungskurve auf $82 \pm 1\%$ im Gegensatz zu den Kontrollbedingungen (siehe Tab. 4.6). Aufgrund der tagesabhängigen starken Schwankungen bezüglich der Rezeptorexpression, war der Unterschied hinsichtlich der gemittelten absoluten Rezeptorzahl demgegenüber nicht signifikant.

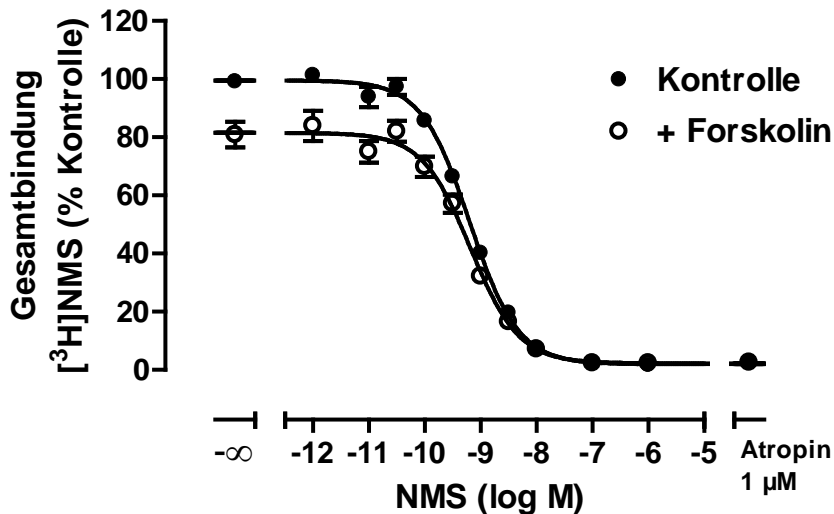


Abb. 4.12 Homologe Konkurrenzexperimente mit CHO-hM₂. Dargestellt sind Inhibitionsexperimente mit N-Methylscopolamin (NMS) unter Kontrollbedingungen (geschlossene Symbole) und in Gegenwart von 10 μM Forskolin (offene Symbole). *Ordinate:* Gesamtbindung von [³H]NMS in Prozent des Versuchs unter Kontrollbedingungen in Abwesenheit von nicht markiertem NMS. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der NMS-Konzentration; *Kurvenanpassung:* Vier-Parameter-logistische Gleichung; *Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler, n = 3–8, Doppelbestimmung; *Inkubationsbedingungen:* Die Inkubation erfolgte im HBSS-Puffer + 20 mM HEPES (pH 7,0) bei 28°C für 2 Stunden; [³H]NMS-Konzentration: 0,2 nM; Die Bestimmung der unspezifischen Bindung erfolgte mit 1 μM Atropin, welche 2% der Gesamtbindung betrug; Zellzahl: 150 000 Zellen/1,5 ml

CHO-hM ₂	Kontrolle	+ Forskolin
pK _D	9,36 ± 0,03	9,32 ± 0,03 ^{n.s.}
B _{max} (Rezeptoren/Zelle)	143 346 ± 17 476	119 360 ± 14 272 ^{n.s.}
B _{max} (%)	100	85 ± 3 ^{**}
Top (%)	100 ± 1	82 ± 1 ^{****}
Bottom (%)	2 ± 1	2 ± 1 ^{n.s.}
n _H (frei)	-0,97 ± 0,05	-1,03 ± 0,11
n	11	11

Tab. 4.6 Kenngrößen ± Standardfehler der Bindungskurven aus Abb. 4.12
pK_D: Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten der NMS-Bindung; *B_{max}:* Anzahl der Bindungsstellen in Rezeptoren pro Zelle bzw. in Prozent; *Top:* Oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve; entspricht der Gesamtbindung; *Bottom:* Unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven; entspricht der unspezifischen Bindung. *n_H (frei):* Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit; *n:* Anzahl unabhängiger Experimente; *Statistik:* Unverbundener t-Test gegen die jeweilige Kontrolle (** *p* < 0,01, **** *p* < 0,0001, n.s. = nicht signifikant)

4.1.4.2. Bindungsverhalten muskarinischer Agonisten

Die Untersuchung des Forskolineffektes auf die Bindung muskarinischer Agonisten ergab keine detektierbare Beeinflussung der Bindungsaffinitäten (K_i bzw. K_{app}). Auffällig war eine erneute Reduktion der Radioligandbindung in Gegenwart von Forskolin (siehe Abb. 4.13). Ungewöhnlich war zudem die flache Bindungskurve von Iperoxo (F-Test, $p < 0,05$), deren Ursache derzeit nicht erklärbar ist.

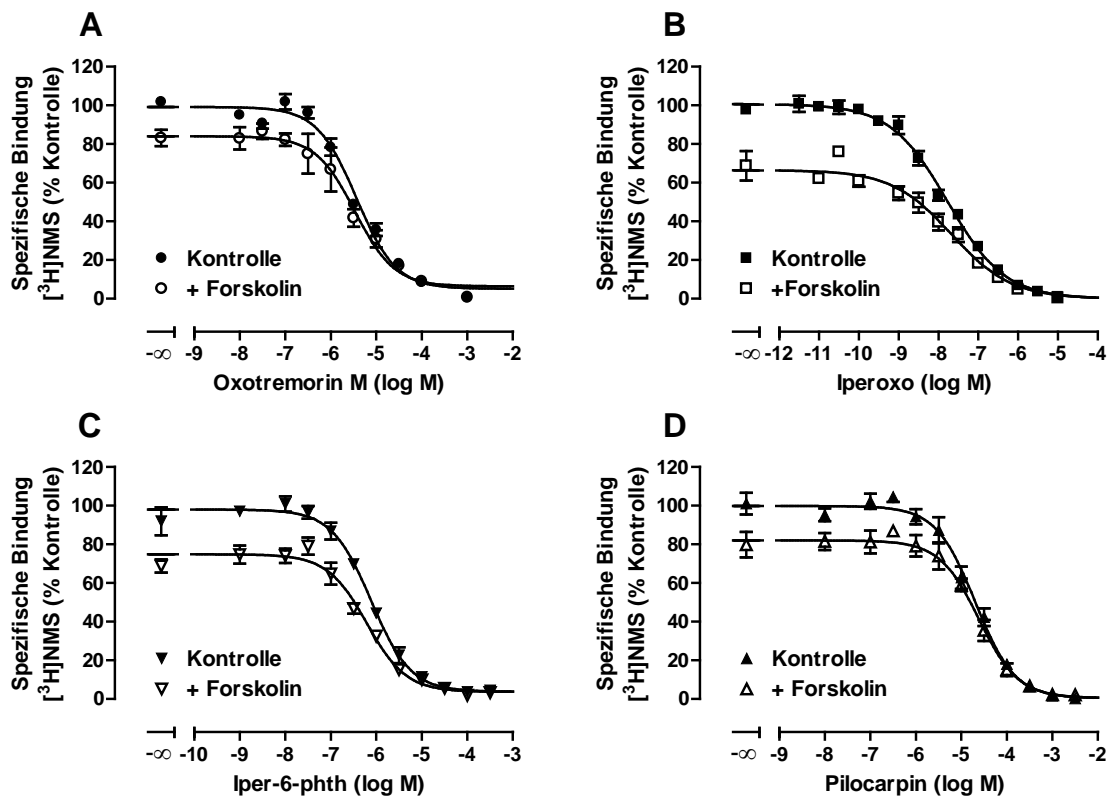


Abb. 4.13 Heterologe Kompetitionsexperimente an CHO-hM₂-Zellen. Dargestellt sind Inhibitionsexperimente mit muskarinischer Agonisten unter Kontrollbedingungen (geschlossene Symbole) und in Gegenwart von 10 μ M Forskolin (offene Symbole). *Ordinate:* Spezifische Bindung von [³H]NMS in Prozent des Versuchs unter Kontrollbedingungen in Abwesenheit von Inhibitor in Prozent; *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Inhibitor-Konzentration; *Kurvenanpassung:* Vier-Parameter-logistische Gleichung; *Datenpunkte:* Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 3 - 8$, Doppelbestimmung; *Inkubationsbedingungen:* Die Inkubation erfolgte im HBSS-Puffer + 20 mM HEPES (pH 7,0) bei 28°C für 2 Stunden; [³H]NMS-Konzentration: 0,2 nM; Die Bestimmung der unspezifischen Bindung erfolgte mit 1 μ M Atropin, welche 2% der Gesamtbindung betrug; Zellzahl: 150 000 Zellen/1,5 ml

Agonist	$pK_{I/app}$	n_H	n_H (frei)	n
Oxotremorin M (K)	5,65 ± 0,03	-1	-0,89 ± 0,09	8
Oxotremorin M (+ Fsk)	5,71 ± 0,15	-1	-0,79 ± 0,08	4
Iperoxo (K)	8,01 ± 0,08	-0,61	-0,61 ± 0,05 [#]	8
Iperoxo (+ Fsk)	7,84 ± 0,17	-0,58	-0,58 ± 0,10 [#]	3
Iper-6-phth (K)	6,31 ± 0,06	-1	-1,01 ± 0,11	4
Iper-6-phth (+ Fsk)	6,39 ± 0,08	-1	-1,01 ± 0,16	4
Pilocarpin (K)	4,89 ± 0,11	-1	-0,94 ± 0,12	6
Pilocarpin (+ Fsk)	4,77 ± 0,06	-1	-1,11 ± 0,19	4

Tab. 4.7 Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Bindungskurven aus Abb. 4.13 unter Kontrollbedingungen (K) und in Gegenwart von 10 µM Forskolin (+ Fsk). $pK_{I/app}$: Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten der Inhibitoren (pK_i) bzw. der apparenten Gleichgewichtsdissoziationskonstanten (pK_{app}); n_H : festgesetzter Hill-Koeffizient n_H (frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit; [#] signifikant bessere Anpassung der Kurvensteilheit mit variablem Hill-Koeffizienten als mit einem konstanten von $n_H = -1$ (F-Test, $p < 0,05$) n : Anzahl unabhängiger Experimente; *n.d.*: nicht bestimmt; *Statistik*: Unverbundener t-Test gegen die jeweilige Kontrolle ($p > 0,05$)

4.2. Untersuchungen an der nativen Zelllinie MRC-5

Bei der Zelllinie MRC-5 handelt es sich um humane Lungenfibroblasten, welche aus fötalem Gewebe isoliert wurden und erstmals in der Arbeit von Jacobs et al. (1970) beschrieben sind. Die MRC-5-Zellen exprimieren von den muskarinischen Rezeptorsubtypen vornehmlich die mRNA des $G_{i/o}$ -gekoppelten M_2 -Rezeptors (Matthiesen et al., 2006; Haag et al., 2008).

Primär erfolgte die Untersuchung der Fibroblasten auf funktioneller Ebene mittels der dynamischen Massenumverteilung (DMR). Diese Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals mit MRC-5 durchgeführt, weshalb die ersten Ergebnisse sich mit der Spezifität der Agonist-induzierten Zellantwort befassen. Im Anschluss folgt die Identifizierung des dominant exprimierten Rezeptorsubtyps auf Proteinebene.

Das native Expressionssystem wurde zur Überprüfung der M_2 -vermittelten promiskuitiven G-proteinaktivierung eingesetzt. Da für den M_2 -Rezeptor die Aktivierung weiterer G-Proteinklassen neben $G_{i/o}$ bislang nur in rekombinanten Expressionssystemen nachgewiesen werden konnte, sollen die Untersuchungen mit nativen Expressionssystemen die physiologische Relevanz dieser Befunde klären. Nachfolgende Ergebnisse befassen sich mit der Kontext-abhängigen Aktivierung des M_2 -Rezeptors durch die dualsterischen Hybridliganden Iper-6-phth und Iper-8-phth, welche erstmals an humanen Lungenfibroblasten untersucht wurde.

4.2.1. Die Agonist-induzierten DMR-Signaturen in MRC-5 sind rezeptorvermittelt.

Die Untersuchung der rezeptorvermittelten DMR-Signale in MRC-5 erfolgte unter Einsatz spezifischer Agonisten und Antagonisten. Zur Charakterisierung der erhobenen DMR-Signale wurden die muskarinischen Liganden Oxotremorin M und Atropin eingesetzt, sowie die adrenergen Liganden Orciprenalin und Propranolol. Die Agonisten Oxotremorin M und Orciprenalin induzierten beide reproduzierbare charakteristische DMR-Signale, von denen die muskarinischen in den positiven Messbereich ausgerichtet sind und die adrenergen in den negativen (Abb. 4.14). Das Messfenster des negativen DMR-Bereichs war dabei wesentlich geringer als das des positiven Bereichs. Atropin und Propranolol verhielten sich in den eingesetzten Konzentrationen antagonistisch und induzierten selbst keine dynamische

Massenumverteilung, was auf eine fehlende Spontanaktivität muskarinerner und adrenerger Rezeptoren in MRC-5 hinweist. Die Oxotremorin M- und Orciprenalin-induzierten DMR-Signale zeichnen sich durch einen Maximaleffekt aus, welcher innerhalb der ersten 1800 Sekunden erreicht wurde. Nach Erreichen der Maximaleffekte wiesen die Signale beider Agonisten einen leichten Rückgang der Signalintensität auf, welcher in beiden Fällen jedoch nicht so stark ausgeprägt ist, dass eine charakteristische Signalspitze zu erkennen ist wie sie beim $G_{i/o}$ -Signal in CHO-hM₂ auftritt.

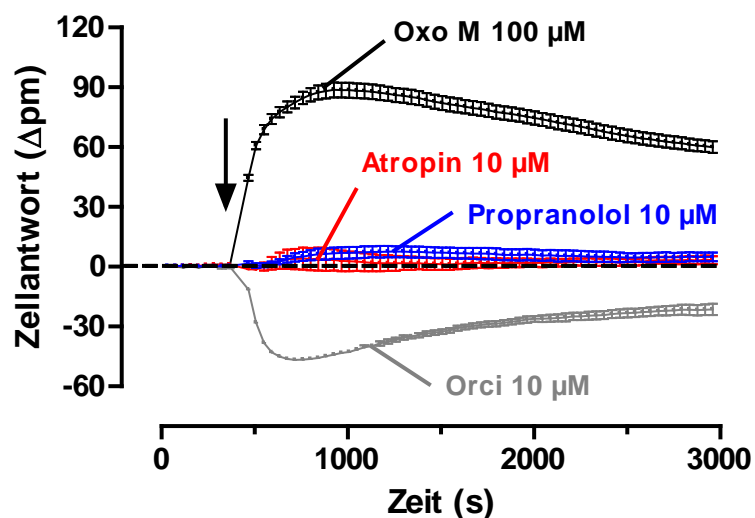


Abb. 4.14 Ligand-induzierte DMR-Signale in MRC-5. Dargestellt sind repräsentative DMR-Originalregistrierungen der Agonisten Oxotremorin M (Oxo M) und Orciprenalin (Orci) sowie von Atropin und Propranolol. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Substanzzugabe. Die Nulllinie ist gestrichelt dargestellt. *Ordinate:* Zellantwort in Picometer; *Abszisse:* Zeit in Sekunden; *Datenpunkte:* Mittelwerte \pm Standardfehler, Vierfachbestimmung

Zum Nachweis, dass die Agonist-induzierten DMR-Signaturen auf der Aktivierung von Rezeptoren beruhen und nicht unspezifischer Natur sind, wurden die Zellen vor Agonistzugabe mit den entsprechenden Antagonisten vorbehandelt (10 μ M, 2h). Die Rezeptorblockade durch Atropin führte erwartungsgemäß zu einer spezifischen Hemmung des Oxotremorin M-Signals führte und beeinflusste nicht die Aktivierung der β -Rezeptoren. Dagegen verhinderte Propranolol selektiv die Ausbildung des Orciprenalin-Signals (siehe Abb. 4.15) und wirkte sich nicht auf das Oxotremorin M-induzierte Signal aus. Die spezifische Hemmung Agonist-induzierter DMR-Signale durch den Einsatz von Antagonisten belegt somit eindeutig, dass die detektierte dynamische Massenumverteilung durch Oxotremorin M auf der Aktivierung muskarinischer Rezeptoren beruht. Das Orciprenalin-Signal wird dagegen über die

Aktivierung von β -Rezeptoren vermittelt. Die von mir durchgeführten tiefergehenden Untersuchungen bezüglich der β -Rezeptor vermittelten dynamischen Massenumverteilung in MRC-5 sind in der Publikation von Lamyel et al. (2011) aufgeführt.

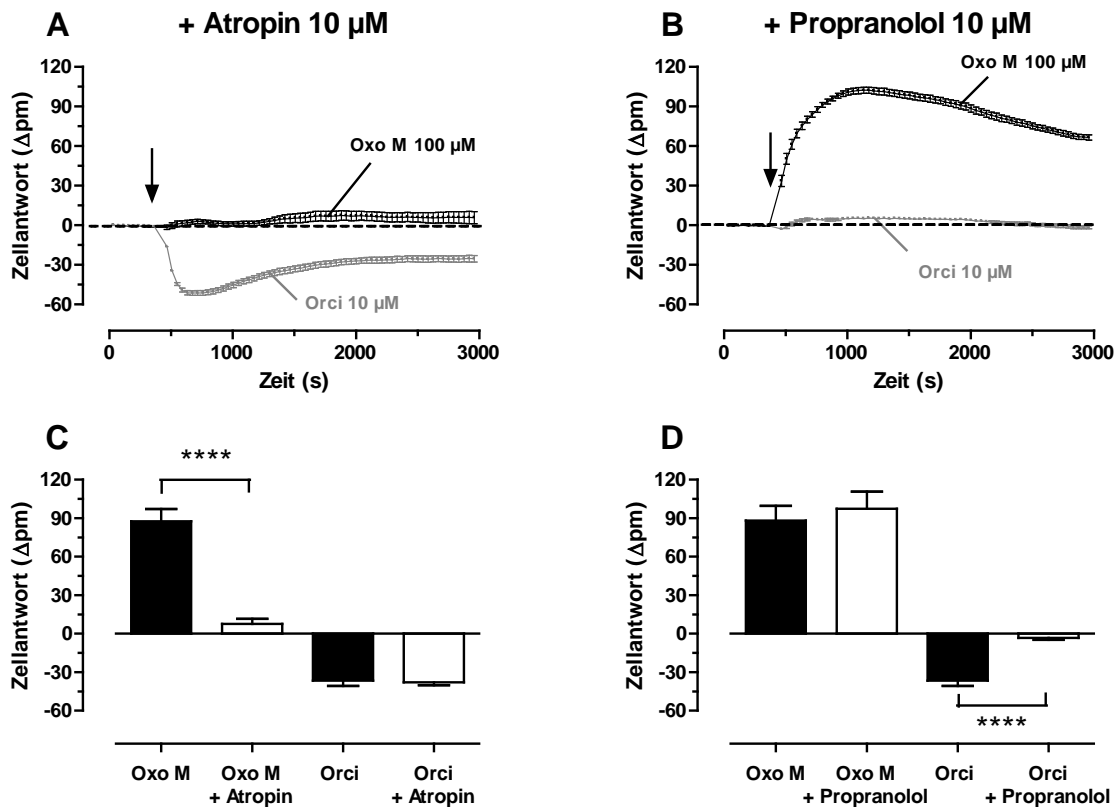


Abb. 4.15 Bestimmung der Spezifität des Agonist-induzierten DMR-Signals an MRC-5-Zellen. (A und B) Dargestellt sind repräsentative DMR-Originalregistrierungen von Oxotremorin M (Oxo M) und Orciprenalin (Orci) nach Vorbehandlung der Zellen mit (A) 10 μ M Atropin bzw. (B) 10 μ M Propranolol. Der Pfeil markiert jeweils den Zeitpunkt der Substanzzugabe. Die Nulllinie ist gestrichelt dargestellt. *Ordinate*: Zellantwort in Picometer; *Abszisse*: Zeit in Sekunden; *Datenpunkte*: Mittelwerte \pm Standardfehler, Vierfachbestimmung; (C und D): Darstellung des arithmetischen Mittels aus allen durchgeführten Versuchstagen in Form von Balkendiagrammen. *Ordinate*: Zellantwort in Picometer; *Balken*: Mittelwerte \pm Standardfehler, n = 5 – 7, Vierfachbestimmung; *Statistik*: Unverbundener t-Test gegen die jeweilige Kontrolle ($p < 0,0001$)

4.2.2. Der muskarinische M₂-Rezeptor wird dominant exprimiert.

MRC-5-Zellen exprimieren die mRNA für vier der fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen (M₂ > M₃ > M₄ >> M₅, kein M₁; Matthiesen et al., 2006). Die M₂- und M₃-Rezeptoren wurden zusätzlich auf Proteinebene mittels Wester-Blot-Analyse und dem Einsatz subtypspezifischer Antikörper nachgewiesen (Matthiesen et al., 2006). Da jedoch Berichte über eine mangelnde Subtypspezifität von muskarinischen Antikörpern existieren (Pradidarcheep W et al., 2008; Jositsch et al., 2009), sollte die Expression des dominanten muskarinischen Rezeptorsubtyps in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von Radioligand-Bindungsexperimenten genauer untersucht werden.

4.2.1.1 Bestimmung des Rezeptorsubtyps über die Kinetik der [³H]NMS-Dissoziation

Bereits Waelbroeck und Kollegen zeigten 1986, dass die Bestimmung der Dissoziationskinetik des orthosterischen Radioliganden [³H]NMS einen Hinweis auf homogene oder heterogene Rezeptorverteilungen liefert. Damals wurden erste Erkenntnisse hinsichtlich unterschiedlicher Rezeptorkinetiken verschiedener muskarinischer Subtypen mit Homogenaten erlangt, welche aus Geweben hergestellt wurden, die einen Rezeptorsubtyp dominant exprimieren (z.B. M₂: Herz, M₃: Unterkieferspeicheldrüse). Später ermöglichten rekombinante Expressionssysteme die genaue Zuordnung der Kinetiken zu den einzelnen Subtypen (Ellis et al., 1991; Flynn und Mash 1993; Kaufel D., 2010).

Zur Bestimmung des dominant exprimierten Rezeptorsubtyps in MRC-5 wurde die Kinetik der [³H]NMS-Dissoziation bestimmt und mit der des M₂- und M₃-Rezeptors verglichen. Die Experimente wurden mit Membranhomogenaten im 5 mM Na,K,PO₄-Puffer (pH 7,4) bei 23°C durchgeführt. Der Radioligand [³H]NMS wurde in einer Konzentration von 1 nM eingesetzt und die unspezifische Bindung mit dem inversen Agonisten Atropin (3 µM) bestimmt, mit dem ebenfalls die Radioliganddissoziation sichtbar gemacht wurde. Zur Darstellung der [³H]NMS-Dissoziation wurde die spezifische Bindung gegen die Zeit nach Atropinzugabe aufgetragen (siehe Abb. 4.16). Die Kurvenanpassung an die Datenpunkte war für alle Homogenate mit einer monophasischen statt mit einer biphasischen exponentiellen Zerfallsfunktion (F-Test, $p < 0,05$) möglich, was charakteristisch für eine homogene Rezeptorverteilung ist.

Die Expression eines Rezeptorsubtyps ist in MRC-5 folglich so dominant, dass keine weitere Fraktion detektierbar ist.

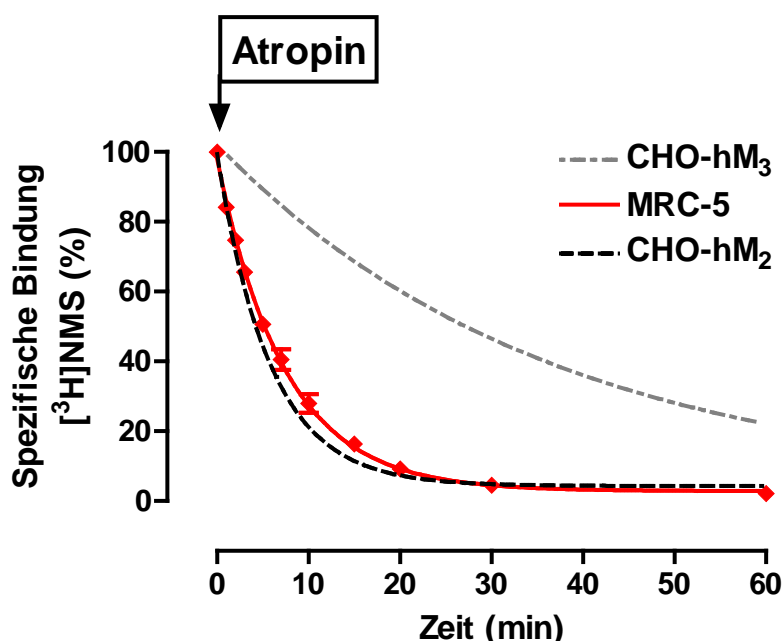


Abb. 4.16 Dissoziationskinetik des Radioliganden $[^3\text{H}]\text{NMS}$ an MRC-5. Eingesetzt wurden Membranhomogenate aus MRC-5, CHO-hM₂ und -hM₃. Dargestellt ist die prozentuale Abnahme der spezifischen Bindung des Radioliganden $[^3\text{H}]\text{NMS}$ nach Zugabe von Atropin (3 μM). *Ordinate:* Spezifische Bindung des Radioliganden $[^3\text{H}]\text{NMS}$ in Prozent, welche auf die Bindung vor Atropin-Zugabe normiert ist; *Abzisse:* Zeit in Minuten; *Kurvenanpassung:* Einphasige exponentielle Zerfallsfunktion; *Datenpunkte:* Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 4$, Vierfachbestimmung; *Inkubationsbedingungen:* Die Inkubation erfolgte im Na,K,P_i-Puffer (5 mM, pH 7,4) bei 23°C; $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Konzentration: 1 nM; Die Bestimmung der unspezifischen Bindung erfolgte mit 3 μM Atropin; Proteinkonzentration: 60 $\mu\text{g}/1,5$ ml (MRC-5), 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (CHO-hM₂ und -hM₃); Die kompletten Dissoziationsverläufe von CHO-hM₂ und -hM₃ wurden von Janine Holze und Corinna Jansen im Rahmen ihres Masterpraktikums unter meiner Betreuung durchgeführt.

Zelllinie	$t_{1/2\text{Diss}}$ (min)	k_{-1} (min ⁻¹)	Bottom (%)	n
MRC-5	5,2 \pm 0,35	0,1351 \pm 0,005	3 \pm 1	4
CHO-hM ₂	4,0	0,1725	4	1
CHO-hM ₃	25,3	0,0274	3	1

Tab. 4.8 Kenngrößen \pm Standardfehler der kompletten Dissoziation aus Abb. 4.16. $t_{1/2\text{Diss}}$: Dissoziationshalbwertszeit des Radioliganden $[^3\text{H}]\text{NMS}$ in Minuten. *Bottom:* Unteres Plateau der monoexponentiellen Zerfallsfunktion; *n:* Anzahl unabhängiger Experimente; *Statistik:* Da CHO-hM₂ und -hM₃ nur als einmalige Kontrolle mitgeführt wurden, entfiel die Durchführung eines statistischen Tests.

Im Fall von MRC-5 waren bereits nach 20 Minuten über 90% des Radioliganden vom Rezeptor abdissoziiert und die ermittelte Dissoziationshalbwertszeit von ca. 5 Minuten stimmt gut mit der für CHO-hM₂ überein, was gegen eine dominante Expression des M₃-Rezeptors in MRC-5 spricht, welcher eine wesentlich langsamere [³H]NMS-Dissoziationskinetik aufweist. Obwohl die komplette Dissoziation für den M₂- und den M₃-Rezeptor nur als einmalige Kontrolle mitgeführt wurde, stimmen die erhobenen Daten gut mit der Literatur überein (Ellis et al., 1991; Voigtländer et al., 2003; Huang und Ellis, 2007).

4.2.1.2 Bestimmung des Rezeptorsubtyps über die allosterische Bindungsstelle

Neben der Rezeptorkinetik unterscheiden sich die muskarinischen Rezeptorsubtypen zudem strukturell vornehmlich in den Regionen der extrazellulären Schleifen (Wess, 2005). Dort befindet sich die "typische" allosterische Bindungsstelle (*'common allosteric site'*, Ellis and Seidenberg 1992; Tränkle et al., 2005), welche im Gegensatz zur orthosterischen Bindungsstelle nicht so stark konserviert ist. Durch den Einsatz allosterischer Liganden sind die verschiedenen Subtypen folglich besser zu unterscheiden als durch orthosterische Liganden. Zur Identifizierung des dominant exprimierten Rezeptorsubtyps wurde der allosterische Modulator W84 verwendet, welcher sich durch eine M₂-Prävalenz auszeichnet (Lüllmann et al., 1969; Voigtländer et al., 2003; Huang und Ellis, 2007). Über die Affinität des Allosters zum [³H]NMS-besetzten Rezeptor, welche sich in einer Verzögerung der [³H]NMS-Dissoziation durch die Bildung ternärer Komplexe äußert, erfolgte die Unterscheidung der einzelnen Rezeptorsubtypen.

Die Versuche wurden an Membranhomogenaten im 5 mM Na,K,PO₄-Puffer durchgeführt, da die Verzögerung der [³H]NMS-Dissoziation durch W84 in diesem Puffer besonders ausgeprägt ist (Tränkle et al., 1996; Tränkle C., 2000; Straßmann V., 2007). Der Radioligand wurde in einer Konzentration von 1 nM eingesetzt. Mit Atropin wurde die unspezifische Bindung bestimmt und der Dissoziationsversuch gestartet. Die Verzögerung der [³H]NMS-Dissoziation in Anwesenheit ansteigender W84-Konzentrationen wurde mit der "2-Punkt-Kinetik" (Kapitel 3.6.3.2) bestimmt. Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten (k_{-1}) in Gegenwart ansteigender Konzentrationen von W84 wurden auf den Kontrollwert ohne Allosterzugabe normiert

und logarithmisch gegen die eingesetzten W84-Konzentrationen aufgetragen (siehe Abb. 4.17).

W84 besitzt an allen untersuchten rezeptorhaltigen Membranhomogenaten eine starke dissoziationsverzögernde Wirkung, welche in den höchsten eingesetzten Konzentrationen vollständig war. Alle Kurven konnten mit einem Steilheitsmaß von $n_H = -1$ angepasst werden (F-Test, $p < 0,05$), was charakteristisch für typische allosterische Modulatoren ist, zu denen ebenfalls W84 zählt (Tränkle und Mohr, 1996). Die für den M_2 - und M_3 -Rezeptor bestimmten Affinitäten (pEC_{50Diss}) unterschieden sich um 1,86 Dekaden und decken sich mit den bereits publizierten Daten von Huang und Ellis (2007) ($pEC_{50Diss} M_2: 7.70 \pm 0.03$, $M_3: 5.79 \pm 0.03$).

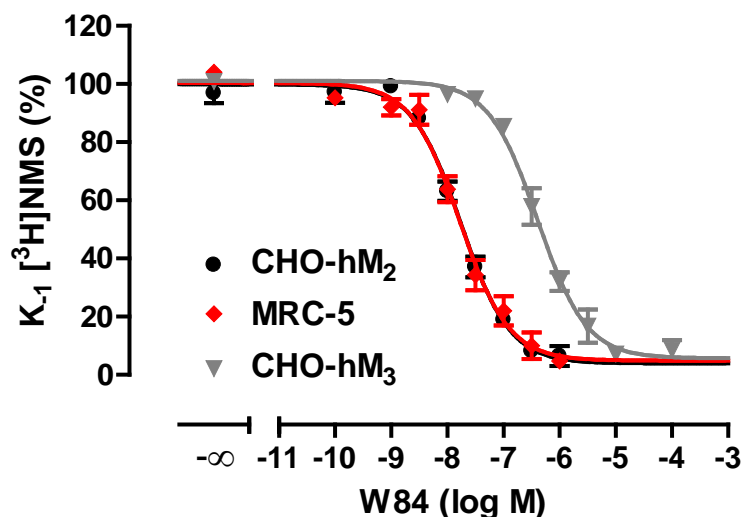


Abb. 4.17 Affinität des allosterischen Modulators W84 zum [³H]NMS-besetzten Rezeptor. Die Experimente wurden an Membranhomogenaten der Zelllinien MRC-5, CHO-hM₂ und CHO-hM₃ durchgeführt. *Ordinate:* Apparente Geschwindigkeitskonstante (k_{-1}) des Radioliganden [³H]NMS in Prozent, welche auf k_{-1} in Abwesenheit von W84 normiert ist; *Abzisse:* Eingesetzte Konzentration von W84; *Kurvenanpassung:* Vier-Parameter-logistische Gleichung; *Datenpunkte:* Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 4$, Doppelbestimmung *Inkubationsbedingungen:* Die Inkubation erfolgte im Na,K,P_i-Puffer (5 mM, pH 7,4) bei 23°C; [³H]NMS-Konzentration: 1 nM; Die Bestimmung der unspezifischen Bindung erfolgte mit 3 μ M Atropin; Proteinkonzentration: 60 μ g/1,5 ml (MRC-5), 30 μ g/ml (CHO-hM₂ und -hM₃); Alle dargestellten Kurven wurden von Janine Holze und Corinna Jansen im Rahmen ihres Masterpraktikums unter meiner Betreuung erhoben.

Die Ermittlung der [³H]NMS-Dissoziation in Abwesenheit von W84 unter Anwendung der "2-Punkt-Kinetik" bestätigten nochmals die Daten der in Kapitel 4.2.1.1 ermittelten Halbwertszeiten der "kompletten Dissoziation" Während sich MRC-5 hinsichtlich der [³H]NMS-Dissoziationshalbwertszeit nicht von CHO-hM₂ unterschied, war der Unterschied zu CHO-hM₃ sehr signifikant (ANOVA, $p < 0,01$). Im Gegensatz zur Aufnahme kompletter Dissoziationsverläufe verlangsamten sich die [³H]NMS-

Dissoziationskinetiken im Fall von MRC-5 und CHO-hM₂ unter Anwendung der "2-Punkt-Kinetik", stimmen jedoch mit der unter Verwendung der 2-Punkt-Kinetik erhobenen Literaturdaten überein (Antony J, 2007; Linsel NB, 2008). Die Abweichungen zwischen beiden Bestimmungsmethoden resultieren wahrscheinlich aus der Gegebenheit, dass die [³H]NMS-Dissoziation unter Anwendung der "2-Punkt-Kinetik" schlechter beschrieben ist. Folglich können gerade bei schnellen [³H]NMS-Dissoziationskinetiken eher Abweichungen auftreten.

Kenngröße	MRC-5	CHO-hM ₂	CHO-hM ₃
pEC _{50Dis}	7,77 ± 0,10	7,76 ± 0,05	5,90 ± 0,06**
n _H	-1	-1	-1
n _{H (frei)}	-1,16 ± 0,14	-1,18 ± 0,08	-1,19 ± 0,09
t _{1/2Dis} (min)	6,4 ± 0,24	5,9 ± 0,12	25,6 ± 0,85**
Unteres Plateau (%)	5 ± 3	4 ± 2	6 ± 2
n	4	4	4

Tab. 4.9 Kenngrößen ± Standardfehler der Bindungskurven aus Abb. 4.17.
pEC_{50Dis}: Negativer dekadischer Logarithmus der W84-Konzentration, welche eine halbmaximale Verzögerung der [³H]NMS-Dissoziation bewirkt. *t_{1/2Dis}*: Dissoziationshalbwertszeit des Radioliganden [³H]NMS in Minuten. *n_H*: festgesetzter Hill-Koeffizient; *n_{H (frei)}*: Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit; *n*: Anzahl unabhängiger Experimente; *Statistik*: ANOVA, Dunnett's post-Test gegen MRC-5 (** *p* < 0,01)

Da sich die muskarinischen Rezeptoren der MRC-5-Zellen sowohl hinsichtlich der Kinetik als auch bezüglich der allosterischen Bindungsstelle nicht vom humanen M₂-Rezeptor unterscheiden, kann von einer dominanten Expression des M₂-Rezeptor in humanen Lungenfibroblasten ausgegangen werden.

4.2.3. Der M₂-Rezeptor - ein selektiv G_{i/o}-gekoppelter Rezeptor?

Um die physiologische Relevanz der promiskuitiven Signalwegsaktivierung zu belegen, war es das Ziel, diese auch in nativen Zellen nachzuweisen. Die Experimente wurden mit MRC-5-Zellen nach Ausschaltung/Maskierung einzelner Signalwege durchgeführt und anschließend die Zellantwort nach Rezeptoraktivierung untersucht. Es erfolgten Messungen hinsichtlich Veränderungen in der dynamischen intrazellulären Massenumverteilung (DMR) und des intrazellulären cAMP-Gehaltes. Analog zu den Messungen mit CHO-hM₂ (Kapitel 4.1.1) wurde dafür der orthosterische Agonist Oxotremorin M eingesetzt.

4.2.3.1 DMR-Messungen nach Ausschaltung von G_{i/o}

Für die Ausschaltung der inhibitorischen G-Proteine wurden die Zellen mit PTX vorbehandelt (100 ng/ml, > 12 h) und anschließend das Ausmaß der dynamischen intrazellulären Massenumverteilung nach Rezeptoraktivierung untersucht (siehe Abb. 4.18).

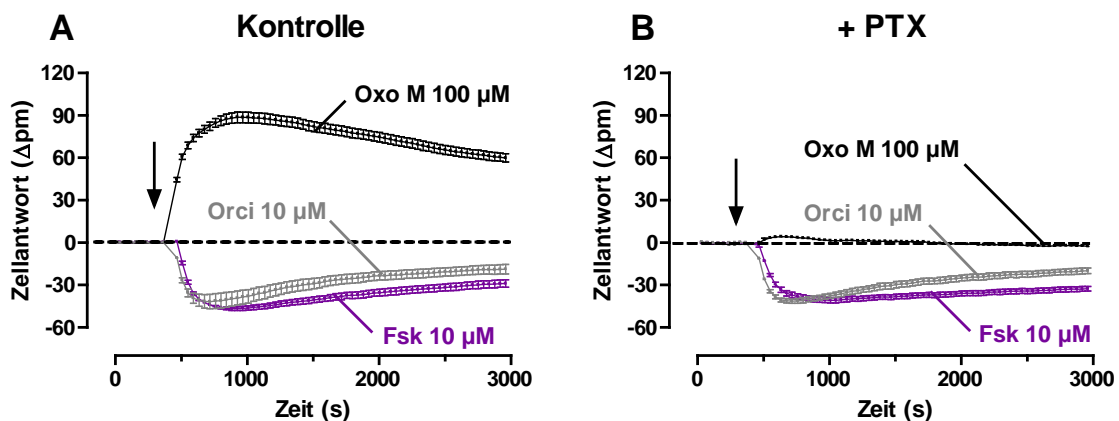


Abb. 4.18 DMR-Signaturen in MRC-5 nach PTX-Vorbehandlung. Dargestellt sind repräsentative Originalregistrierungen der DMR-Effekte von Oxotremorin M (Oxo M), Orciprenalin (Orci) und Forskolin (Fsk) unter (A) Kontrollbedingungen und (B) nach PTX-Vorbehandlung (100 ng/ml, > 12 h). Der Pfeil markiert jeweils den Zeitpunkt der Substanzzugabe. Die Nulllinie ist gestrichelt dargestellt. *Ordinate:* Zellantwort in Picometer; *Abszisse:* Zeit in Sekunden; *Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler, Vierfachbestimmung

Unter Einsatz von Oxotremorin M konnte nach Ausschaltung der inhibitorischen G-Proteine, keine Agonist-induzierte dynamische Massenumverteilung mehr detektiert werden. Folglich wurde ebenfalls die Vitalität der Zellen durch den Einsatz von

Orciprenalin und Forskolin überprüft. Sowohl die β -vermittelte Zellantwort als auch die direkte Aktivierung der Adenylyzyklase konnten jedoch weiterhin nachgewiesen werden. Die Messungen nach PTX-Vorbehandlung unterschieden sich dabei nicht zu den Messungen unter Kontrollbedingungen (siehe Tab. 4.10). Die fehlende Zellantwort auf Oxotremorin M kann somit nicht auf eine Schädigung der Zellen zurückgeführt werden, sondern resultiert aus der Hemmung inhibitorischer G-Proteine. Somit lässt die DMR-Messung keinen Hinweis auf eine G_s -Kopplung des M_2 -Rezeptors in MRC-5-Zellen erkennen.

Versuchs- bedingung	Oxo M 100 μ M		Fsk 10 μ M		Orci 10 μ M	
	E_{max} (Δ pm)	n	E_{max} (Δ pm)	n	E_{max} (Δ pm)	n
Kontrolle	108 \pm 8	11	-35 \pm 5	4	-37 \pm 5	5
+ PTX	5 \pm 1****	9	-36 \pm 5	4	-36 \pm 2	5

Tab. 4.10 Mittelwerte \pm Standardfehler aller unabhängiger Versuchstage nach Abb. 4.18. E_{max} : Maximal induzierbare Wellenlängenverschiebung in Picometer als Maß für die intrazelluläre dynamische Massenumverteilung. n : Anzahl unabhängiger Experimente; *Statistik*: Unverbundener t-Test gegen die jeweilige Kontrolle (**** $p < 0,0001$)

Aufgrund des kleinen Messfensters im negativen DMR-Bereich ist es jedoch vorstellbar, dass die Kopplung des M_2 -Rezeptors an G_s -Proteine mit dem optischen Biosensor nicht sichtbar ist, obwohl sie vorhanden ist. Aus diesem Grund wurden im Anschluss cAMP-Messungen durchgeführt.

4.2.3.2 cAMP-Messungen nach Ausschaltung von $G_{i/o}$

Der intrazelluläre cAMP-Gehalt wurde an PTX-behandelten MRC-5-Zellen (100 ng/ml, > 12 h) nach Agonistzugabe bestimmt. Zur Quantifizierung Agonist-vermittelter cAMP-Anstiege wurden diese auf den Maximaleffekt von Forskolin normiert (siehe Abb. 4.19). Oxotremorin führte an keinem Messtag zu einem detektierbaren cAMP-Anstieg, was gegen eine M_2 -vermittelte G_s -Aktivierung spricht. Diese Resultate bestätigen die zuvor durchgeführten DMR-Messungen, mit denen nur eine Aktivierung inhibitorischer G-Proteine nachgewiesen werden konnte.

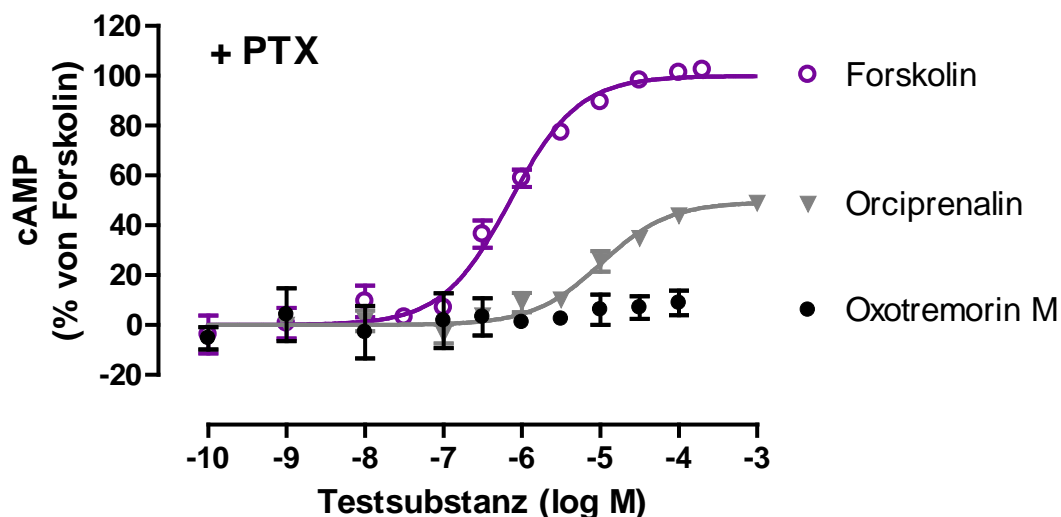


Abb. 4.19 Agonist-induzierte cAMP-Produktion in MRC-5 nach PTX-Vorbehandlung. Ordinate: Agonist-induzierte cAMP-Bildung in Prozent, welche auf Forskolin normiert ist; Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Testsubstanz-Konzentrationen; Kurvenanpassung: Vier-Parameterlogistische Gleichung; Datenpunkte: Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 3 - 5$, Dreifachbestimmung

Orciprenalin wurde zur Überprüfung der rezeptorvermittelten Zellantwort mitgeführt. Der detektierbare cAMP-Anstieg durch Orciprenalin war nur halb so stark wie der über die direkte Aktivierung der Adenylylzyklase durch Forskolin. Dieser Unterschied konnte mittels DMR-Messungen nicht detektiert werden und demonstriert das limitierte Messfenster im Epic[®] für die Detektion der G_s-Aktivierung in MRC-5. Auffällig ist zudem die um eine Dekade schwächere Wirksamkeit von Orciprenalin im Vergleich zum Epic[®]-Experiment (siehe Kapitel 9.1.4.2). Diese Beobachtung wurde jedoch bereits ebenso in CHO- β_2 -Zellen gemacht (Schröder et al., 2010), wo die stärkere Wirksamkeit im Epic[®] der Amplifikation des G_s-Signals zugeschrieben wird.

Testsubstanz	pEC ₅₀	E _{max} (%)	n _H	n _{H (frei)}	n
Forskolin	6,15 \pm 0,06	100 \pm 2	1	0,87 \pm 0,11	3
Orciprenalin	4,98 \pm 0,15**	49 \pm 2****	1	0,80 \pm 0,15	3
Oxotremorin M	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3

Tab. 4.11 Kenngrößen \pm Standardfehler der Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abb. 4.19. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus der molaren Testsubstanz-Konzentration, welche eine halbmaximale Zellantwort hervorruft. E_{max}: Maximale Zellantwort in Prozent, welche auf den Effekt von Forskolin normiert wurde. n_H: festgesetzter Hill-Koeffizient; n_{H (frei)}: Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit; n: Anzahl unabhängiger Experimente; n.d.: not determined = nicht bestimmt; Statistik: Unverbundener t-Test gegen Forskolin (** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$)

4.2.3.3 DMR-Messungen nach Ausschaltung von $G_{q/11}$

Zur Detektion des Einflusses der $G_{q/11}$ -Aktivierung auf das DMR-Signal wurden die Zellen mit dem $G_{q/11}$ -Inhibitor MH 362-63-08 vorinkubiert (1 μ M, 2 h), welcher selbst keine dynamische Massenumverteilung in einem relevanten Ausmaß zu induzieren vermag (Abb. 4.20 A). Überraschenderweise war das Oxotremorin M-Signal nach der Vorbehandlung mit MH 362-63-08 hinsichtlich seiner Intensität in einem signifikanten Ausmaß reduziert (Abb. 4.20 B) und erreichte nur noch 63% des DMR-Signals unter Kontrollbedingungen.

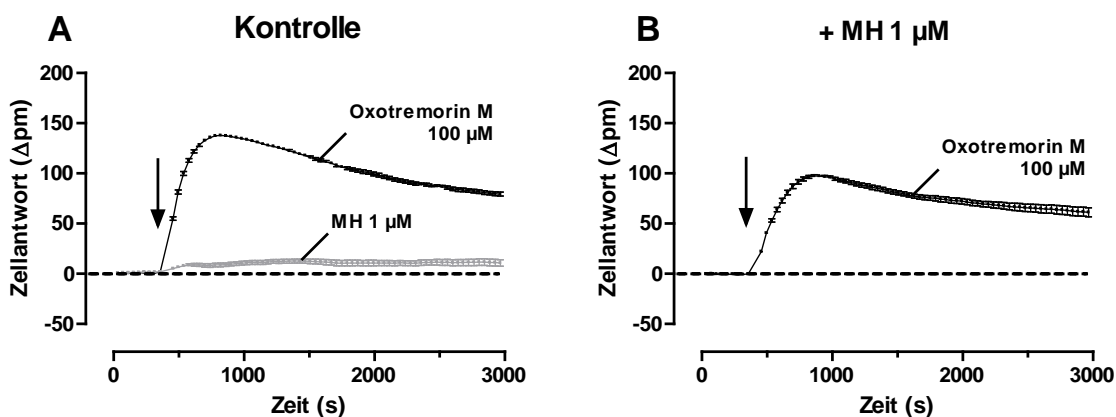


Abb. 4.20 DMR-Signaturen in MRC-5 nach $G_{q/11}$ -Inhibition. Dargestellt sind repräsentative Originalregistrierungen von Oxotremorin M (Oxo M) und MH-362-63-08 (MH) unter (A) Kontrollbedingungen und (B) nach MH-Vorbehandlung (1 μ g/ml, 2 h). Der Pfeil markiert jeweils den Zeitpunkt der Substanzzugabe. Die Nulllinie ist gestrichelt dargestellt. *Ordinate:* Zellantwort in Picometer. *Abszisse:* Zeit in Sekunden; *Datenpunkte:* Mittelwerte \pm Standardfehler, Vierfachbestimmung

Durch die Aufnahme von Konzentrations-Effekt-Kurven konnte gezeigt werden, dass die Wirksamkeit im Gegensatz zur intrinsischen Aktivität unbeeinflusst blieb (Abb. 4.21). Die Reduktion des Oxotremorin M-induzierten DMR-Signals könnte einerseits durch eine MH362-63-08-Beeinflussung der Aktivierung von $G_{i/o}$ -Proteinen verursacht sein oder andererseits auf eine $G_{i/o}$ -abhängige $G_{q/11}$ -Aktivierung hinweisen. Letzteres würde bedeuten, dass $G_{q/11}$ -Proteinen nur aktiviert werden können, wenn gleichzeitig die Aktivierung inhibitorischer G-Proteine möglich ist.

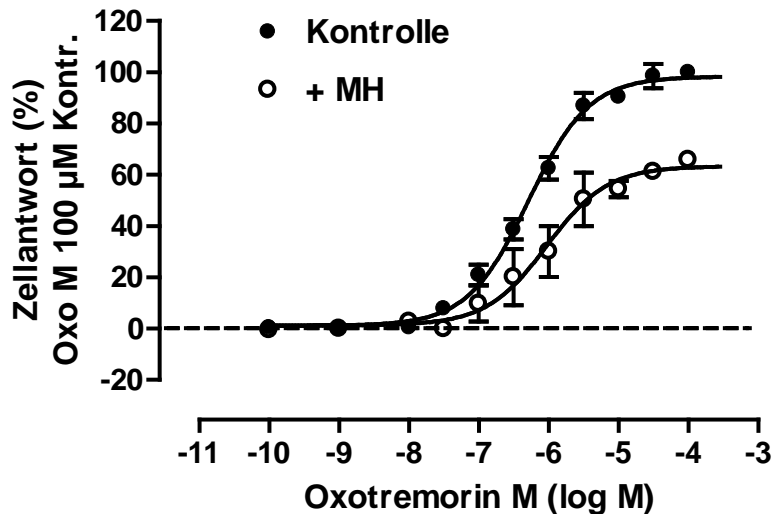


Abb. 4.21 Bestimmung der Wirksamkeit von Oxotremorin M in MRC-5 nach $G_{q/11}$ -Inhibition. Die Konzentrations-Effekt-Kurven wurden unter Kontrollbedingungen sowie nach Vorbehandlung mit MH-362-63-08 (1 μ M, 2 h) aufgenommen. *Ordinate:* Oxotremorin M-induzierte intrazelluläre Massenumverteilung in Prozent, welche auf den Effekt von 100 μ M unter Kontrollbedingungen normiert ist; *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Oxotremorin M-Konzentration; *Kurvenanpassung:* Vier-Parameter-logistische Gleichung; *Datenpunkte:* Mittelwerte \pm Standard-fehler, $n = 3 - 9$, Vierfachbestimmung

Oxotremorin M	Kontrolle	+ MH
pEC_{50}	$6,29 \pm 0,09$	$6,03 \pm 0,37$
E_{max} (%)	98 ± 2	$63 \pm 4^{****}$
n_H (frei)	$0,86 \pm 0,08$	$0,76 \pm 0,23$
n_H	1	1
n	9	3

Tab. 4.12 Kenngrößen \pm Standardfehler der Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abb. 4.21. pEC_{50} : Negativer dekadischer Logarithmus der molaren Oxotremorin M-Konzentration, welche eine halbmaximale Zellantwort hervorruft. E_{max} : Maximal induzierbare Wellenlängenverschiebung in Prozent, welche auf Oxotremorin M 100 μ M unter Kontrollbedingungen normiert wurde. n_H : festgesetzter Hill-Koeffizient; n_H (frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit; n : Anzahl unabhängiger Experimente; *Statistik:* Unverbundener t-Test (**** $p < 0,0001$)

4.2.3.4 DMR-Messungen nach Maskierung von G_s

Für die Maskierung des G_s -Signalwegs wurde analog zu CHO-hM₂ (Kapitel 4.1.1.4) Forskolin in einer Konzentration von 10 μ M verwendet. Nach Forskolin-Vorstimulation (10 μ M, 2 h) konnte weder durch Orciprenalin noch durch erneute Zugabe von Forskolin eine weitere dynamische intrazelluläre Massenumverteilung mehr induziert werden, während das Oxotremorin M-induzierte Signal unbeeinflusst blieb (siehe Abb. 4.22).

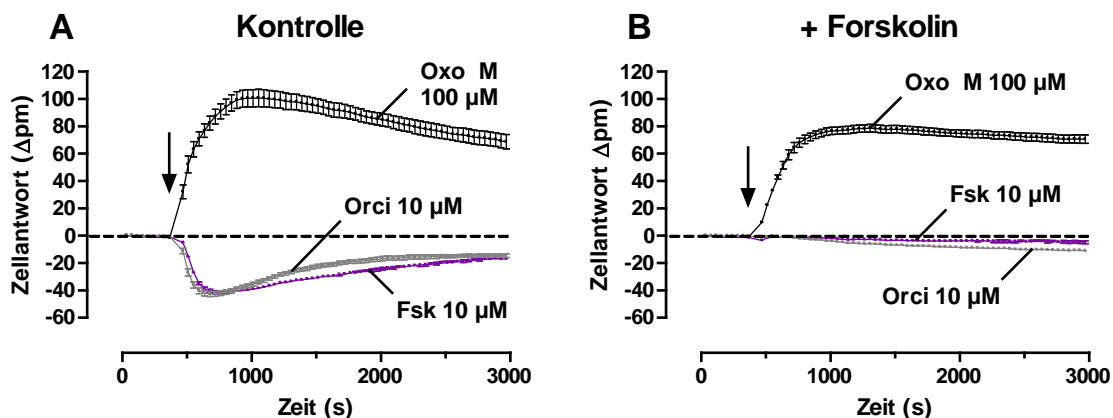


Abb. 4.22 DMR-Signaturen in MRC-5 nach Forskolin-Vorstimulation. Dargestellt sind repräsentative Originalregistrierungen von Oxotremorin M (Oxo M), Orciprenalin (Orci) und Forskolin (Fsk) unter (A) Kontrollbedingungen und (B) nach Forskolin-Vorstimulation (10 μ M, 2 h). Der Pfeil markiert jeweils den Zeitpunkt der Substanzzugabe. Die Nulllinie ist gestrichelt dargestellt. *Ordinate:* Zellantwort in Picometer. *Abszisse:* Zeit in Sekunden; *Datenpunkte:* Mittelwerte \pm Standardfehler, Vierfachbestimmung

Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Ergebnissen mit CHO-hM₂, in denen das detektierbare $G_{i/o}$ -Signal nach Forskolin-Vorstimulation zunimmt (Kapitel 4.1.1.4). Das Ausbleiben der $G_{i/o}$ -Signalzunahme in MRC-5 könnte darauf hinweisen, dass unter den Kontrollbedingungen bereits die inhibitorischen G-Proteine bereits maximal aktiviert werden. Aufgrund der Gegebenheit, dass nach Forskolin-Vorstimulation kein Effekt auf das durch Oxotremorin M-induzierte DMR-Signal detektiert werden konnte (siehe Tab. 4.13), entfiel die Untersuchung der Wirksamkeit.

Versuchs- bedingung	Oxo M 100 μ M		Fsk10 μ M		Orci 10 μ M	
	E_{max} (Δ pm)	n	E_{max} (Δ pm)	n	E_{max} (Δ pm)	n
Kontrolle	83 \pm 10	4	-37 \pm 7	3	-42 \pm 2	4
+ Fsk	75 \pm 6	4	-3 \pm 2**	4	-2 \pm 1****	3

Tab. 4.13 Mittelwerte \pm Standardfehler aller unabhängiger Versuchstage nach Abb. 4.22
E_{max}: Maximal induzierbare Wellenlängenverschiebung in Picometer als Maß für die intrazelluläre dynamische Massenumverteilung. *n*: Anzahl unabhängiger Experimente; *Statistik*: Unverbundener t-Test gegen die jeweilige Kontrolle (**** $p < 0,0001$, ** $p < 0,01$)

4.2.4. MRC-5-Zellen besitzt einen hohen intrazellulären cAMP-Gehalt

Die Bestimmung des intrazellulären cAMP-Gehaltes erfolgte mit Suspensionszellen der Zelllinien CHO-hM₂ und MRC-5. Im Rahmen dieser Versuche wurde auf den Einsatz des unspezifischen Phosphodiesterase-Inhibitors IBMX verzichtet, der den basalen cAMP-Gehalt der Zellen künstlich angehoben hätte. Zunächst wurde der basale cAMP-Gehalt verschiedener Zellzahlen bestimmt und anschließend in mol/mg Protein umgerechnet.

Bereits die Auftragung der molaren cAMP-Konzentration pro Zellzahl demonstriert den im Vergleich zu CHO-Zellen höheren cAMP-Gehalt der Fibroblasten (Abb. 4.23 A). Da die Fibroblasten jedoch wesentlich größer sind als CHO-Zellen, wurde der cAMP-Gehalt in mol/mg Protein bestimmt. Dieser betrug in den Fibroblasten 79 ± 14 pmol/mg Protein und war somit um den Faktor 13 größer als in CHO-hM₂, welcher dort 6 ± 2 pmol/mg Protein betrug (Mittelwerte \pm Standardfehler, n = 4 -5).

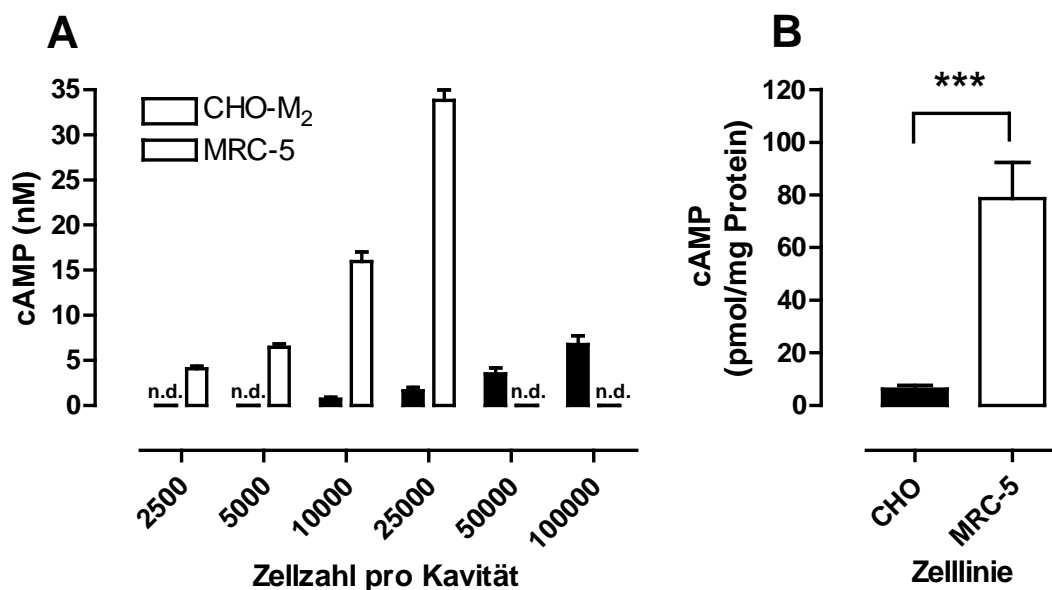


Abb. 4.23 Basaler cAMP-Gehalt der Zelllinien CHO-M₂ und MRC-5. Dargestellt ist der cAMP-Gehalt in (A) Nanomol pro Kavität, sowie in (B) Picomol pro Milligramm Protein. *Balken:* Mittelwerte \pm Standardfehler, n = 4 - 5, Dreifachbestimmung; *Statistik:* Unverbundener t-Test (***) $p < 0,001$)

4.2.5. Dualsterische Liganden sind Partialagonisten

Aufgrund der Gegebenheit, dass MRC-5-Zellen neben der dominanten Expression des M₂-Rezeptors (Kapitel 4.2.2) zudem einen hohen intrazellären cAMP-Gehalt aufwiesen (Kapitel 0), waren sie für die Untersuchung der dualsterischen Liganden von großem Interesse. Analog zu den in CHO-hM₂-Zellen durchgeführten Versuchen wurden zunächst postulierte supramaximale Agonistkonzentrationen getestet (siehe Abb. 4.24).

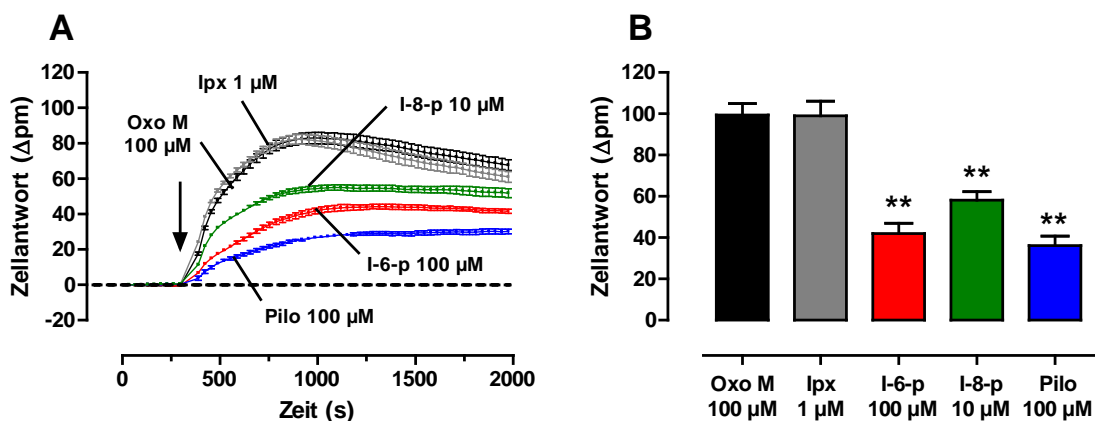


Abb. 4.24 Agonist-induzierte zelluläre dynamische Massenumverteilung in MRC-5. (A) Repräsentative DMR-Originalregistrierungen; Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Substanzzugabe. Die Nulllinie ist gestrichelt dargestellt. (B) Agonist-induzierte maximale Zellantworten in Picometer. *Balken*: Mittelwerte ± Standardfehler, n = 11 – 17, Vierfachbestimmung; *Statistik*: ANOVA, Dunnett's post-Test gegen Oxo M 100 μM (** p < 0,01)

MRC-5	Oxo M 100 μM	lpx 1 μM	I-6-p 100 μM	I-8-p 10 μM	Pilo 100 μM
E _{max} (Δpm)	99 ± 6	99 ± 7	42 ± 5**	58 ± 4**	36 ± 5**
n	18	13	13	14	12

Tab. 4.14 Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Maximaleffekte aus Abb. 4.24B. E_{max}: Maximale Zellantwort in Picometer; n: Anzahl unabhängiger Experimente; *Statistik*: ANOVA, Dunnett's post-Test gegen Oxo M 100 μM (** p < 0,01)

Die im Epic[®] untersuchten muskarinischen Agonisten zeigten an den Fibroblasten interessanterweise unterschiedlich ausgeprägte Signalstärken. Iper-6-phth und Pilocarpin erreichten weniger als 50% des Oxotremorin M-induzierten DMR-Signals und sogar Iper-8-phth erreicht nur noch 63%. Die partialagonistisch wirksamen Liganden wiesen zudem keinen Signalabfall nach dem Erreichen des Maximalwertes auf. Iperoxo unterschied sich hinsichtlich der DMR-Signalintensität und der DMR-Signalfom dagegen nicht von Oxotremorin M. Da die Möglichkeit bestand, dass Konzentrationen verwendet wurden, welche nicht supramaximal waren, wurden nachfolgend komplette Konzentrations-Effekt-Kurven zur Bestimmung der Wirksamkeit aufgenommen. Zu diesem Zweck wurde das maximal induzierbare DMR-Signal innerhalb von 1800 s für die Auswertung der Daten herangezogen und auf den Wert von Oxotremorin 100 μ M normiert (siehe Abb. 4.25).

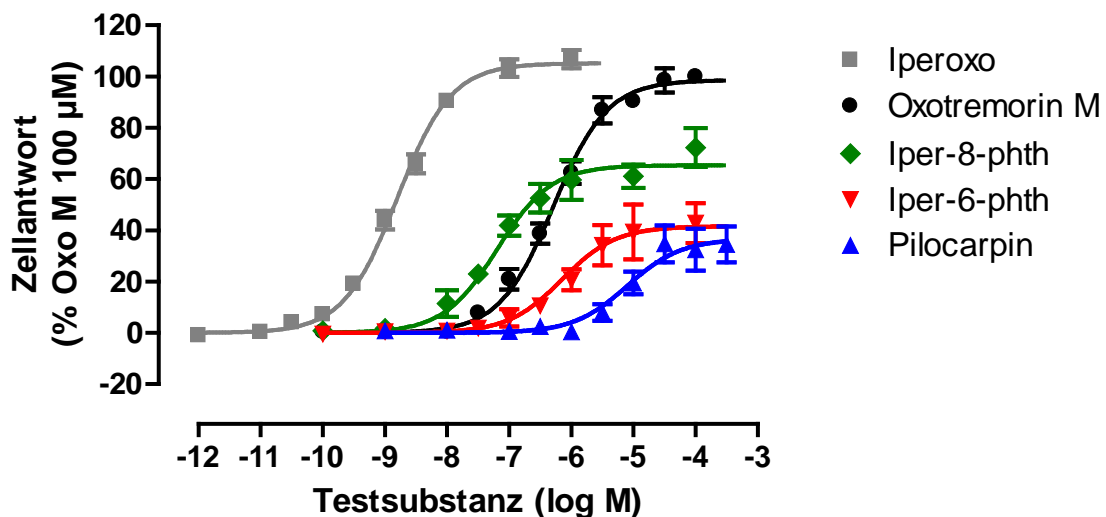


Abb. 4.25 Bestimmung der Wirksamkeiten muskarinischer Agonisten in MRC-5.
Ordinate: Agonist-induzierte intrazelluläre Massenumverteilung in Prozent, welche auf den Effekt von Oxotremorin M 100 μ M normiert ist; *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentrationen; *Kurvenanpassung:* Vier-Parameter-logistische Gleichung; *Datenpunkte:* Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 3 - 9$, Vierfachbestimmung

Anhand der Konzentrations-Effekt-Kurven konnte nachgewiesen werden, dass die in Abb. 4.24 eingesetzten Konzentrationen supramaximal waren. Die bestimmten Wirksamkeiten der Substanzen waren zwar schwächer als in CHO-hM₂ (siehe Tab. 4.5), jedoch waren sie alle in einem ähnlichen Ausmaß zu höheren Konzentrationen verschoben. Der Wirksamkeitsunterschied zwischen MRC-5 und CHO-hM₂ war bei Iperoxo am stärksten und bei Pilocarpin am schwächsten ausgeprägt. Alle

Konzentrations-Effekt-Kurven konnten mit einer normalen Steilheit beschrieben werden (F-Test, $p > 0,05$).

Testsubstanz	pEC_{50}	E_{max} (%)	n_H	n_H (frei)	n
Iperoxo	$8,80 \pm 0,03$	105 ± 1	1	$0,88 \pm 0,07$	4
Oxotremorin M	$6,29 \pm 0,09$	99 ± 2	1	$0,86 \pm 0,08$	9
Iper-8-phth	$7,19 \pm 0,11$	$65 \pm 2^{**}$	1	$0,83 \pm 0,20$	4
Iper-6-phth	$6,15 \pm 0,14$	$42 \pm 3^{**}$	1	$0,97 \pm 0,40$	4
Pilocarpin	$5,10 \pm 0,03$	$37 \pm 2^{**}$	1	$1,80 \pm 0,84$	3

Tab. 4.15 Kenngrößen \pm Standardfehler der Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abb. 4.25.
 pEC_{50} : Negativ dekadischer Logarithmus der molaren Agonist-Konzentration, welche eine halbmaximale Zellantwort hervorruft. E_{max} : Oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve = Maximale Zellantwort in Prozent; n_H : festgesetzter Hill-Koeffizient; n_H (frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit; n : Anzahl unabhängiger Experimente; *Statistik*: ANOVA, Dunnett's post-Test gegen Oxotremorin M (** $p < 0,01$)

4.2.6. Bindungsaffinitäten sind unabhängig vom Expressionssystem

In MRC-5 unterschieden sich die getesteten muskarinischen Agonisten hinsichtlich ihrer intrinsischen Aktivität und besaßen im Vergleich zu CHO-hM₂ eine schwächere Wirksamkeit. Um auszuschließen, dass diese Unterschiede durch ein verändertes Bindungsverhalten bedingt sind, wurden Radioligand-Bindungsexperimente durchgeführt. Die Versuche wurden im HBSS-Puffer (L7) bei 28°C an lebenden Zellen durchgeführt. [³H]NMS wurde in einer Konzentration von 0,2 nM eingesetzt und die unspezifische Bindung mit dem inversen Agonisten Atropin bestimmt, welche 6% der Gesamtbindung ausmachte. Zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten wurde die detektierte Gesamtbindung bzw. die spezifische Bindung gegen die logarithmische Konzentration des eingesetzten unmarkierten Liganden aufgetragen und die Datenpunkte mit der 4-Parameter-logistischen Gleichung angepasst. Aus den Wendepunkten der Kurven (EC_{50}) wurden anschließend die Bindungsaffinitäten (K_D bzw. $K_{I/app}$) berechnet.

4.2.6.1 Bindungsverhalten des Radioliganden [³H]NMS

Zu Beginn wurde die Bindungsaffinität des Radioliganden [³H]NMS (K_D) bestimmt, sowie die Anzahl der Bindungsstellen (B_{max}).

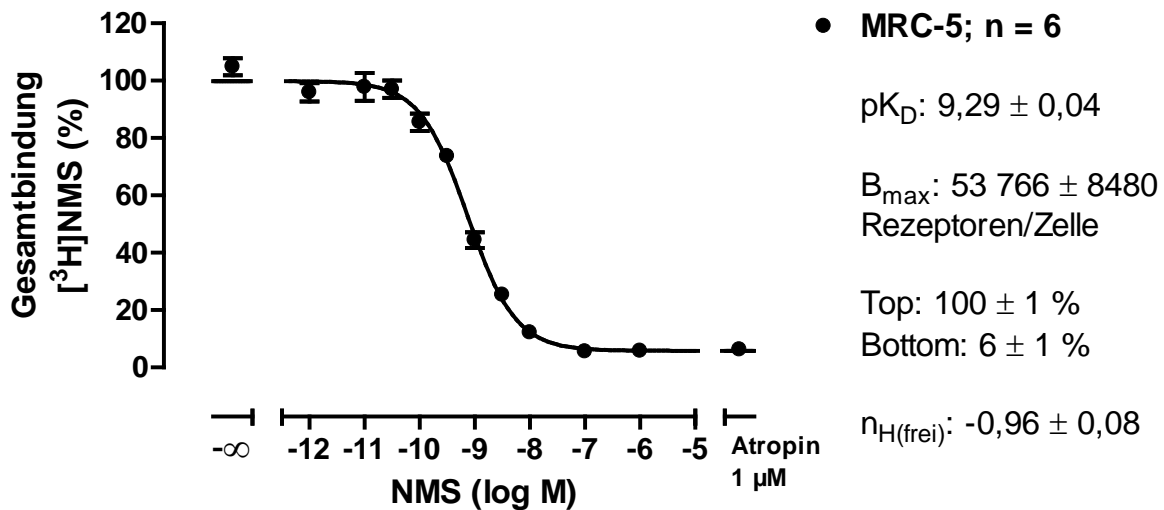


Abb. 4.26 Homologe Konkurrenz mit MRC-5. Die Versuche wurden an ganzen Zellen durchgeführt. *Ordinate*: Gesamtbindung des Radioliganden [³H]NMS in Prozent; Das obere Plateau wurde auf die Gesamtbindung in Abwesenheit von NMS normiert. *Abszisse*: Dekadischer Logarithmus der NMS-Konzentrationen; *Kurvenanpassung*: Vier-Parameter-logistische Gleichung; pK_D : Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten; B_{max} : Anzahl der Bindungsstellen in Rezeptoren pro Zelle; *Top*: Oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve in Prozent; *Pottom*: Unteres Plateau der Konzentrations-Effekt.Kurve in Prozent; $n_{H(frei)}$: Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit; n : Anzahl unabhängiger Experimente; *Datenpunkte*: Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 6$, Doppelbestimmung; *Inkubationsbedingungen*: Die Inkubation erfolgte im HBSS-Puffer + 20 mM HEPES (pH 7,0) bei 28°C für 2 Stunden; [³H]NMS-Konzentration: 0,2 nM; Zellzahl: 150 000/1,5 ml

Die Bindungskurven konnten alle mit einer normalen Steilheit angepasst werden (F-Test, $p > 0,05$) und die Affinität des Radioliganden (K_D) unterschied sich nicht signifikant zu CHO-hM₂ (4.1.4.1) (ANOVA, $p > 0,05$). Die Anzahl der Bindungsstellen pro Zelle (B_{max}) war jedoch im Vergleich zum artifiziellen Expressionssystem deutlich reduziert, und betrug nur 38% von CHO-hM₂ bzw. 45% von CHO-hM₂ in Gegenwart von Forskolin (siehe Kapitel 4.1.4.1).

4.2.6.2 Bindungsverhalten muskarinischer Agonisten

Die berechneten Bindungsaffinitäten der untersuchten muskarinischen Agonisten (K_i bzw. K_{app}) unterschieden sich nicht signifikant von den für CHO-hM₂ (Tab. 4.7) bestimmten Daten (ANOVA, $p < 0,05$; Tukey *post-test*). Das Bindungsverhalten muskarinischer Agonisten ist folglich ebenfalls unabhängig vom Expressionssystem des humanen M₂-Rezeptors. Obwohl die Mittelwertskurven einiger Agonisten besser mit einer flachen Steilheit beschrieben werden konnten (F-Test, $p < 0,05$), wurden alle Kurven mit einer Steilheit von $n_H = -1$ angepasst, da alle einzelnen Versuchstage diese Steilheit aufwiesen.

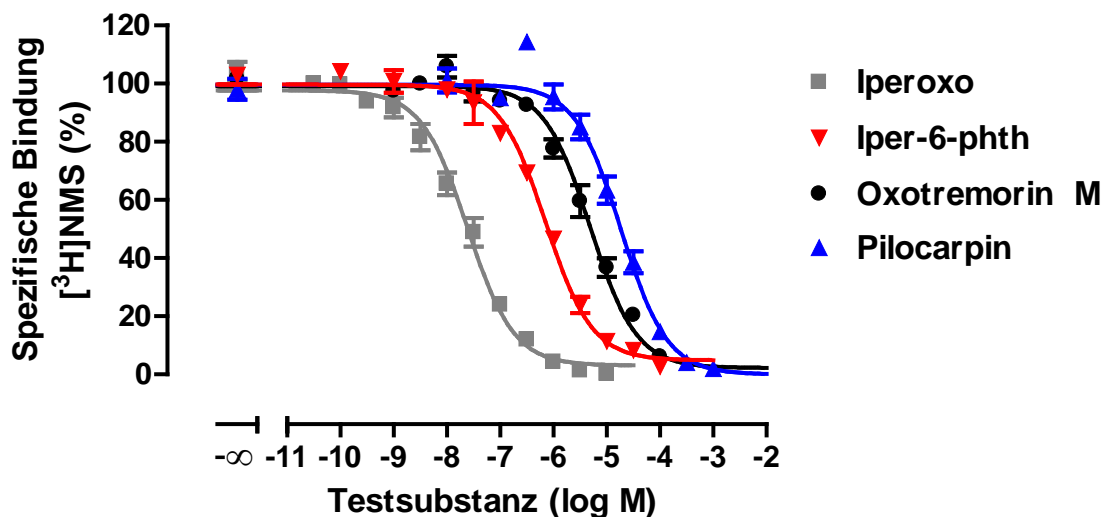


Abb. 4.27 Heterologe Konkurrenzexperimente mit MRC-5. Die Versuche wurden an ganzen Zellen durchgeführt. *Ordinate:* Spezifische Bindung des Radioliganden [³H]NMS in Prozent; Das obere Plateau wurde auf die Gesamtbindung in Abwesenheit von Agonist normiert. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentrationen; *Kurvenanpassung:* Vier-Parameterlogistische Gleichung; *Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler, n = 4 – 5, Doppelbestimmung; *Inkubationsbedingungen:* Die Inkubation erfolgte im HBSS-Puffer + 20 mM HEPES (pH 7,0) bei 28°C für 2 Stunden; [³H]NMS-Konzentration: 0,2 nM; Die Bestimmung der unspezifischen Bindung erfolgte mit 1 µM Atropin; Zellzahl: 150 000/1,5 ml

Testsubstanz	$pK_{i/app}$	n_H	$n_H (frei)$	Bottom (%)	n
Oxotremorin M	$5,47 \pm 0,09$	-1	$-0,79 \pm 0,07^\#$	2 ± 2	6
Iperoxo	$7,82 \pm 0,09$	-1	$-0,73 \pm 0,07^\#$	3 ± 2	5
Iper-6-phth	$6,29 \pm 0,05$	-1	$-0,79 \pm 0,08^\#$	5 ± 2	4
Pilocarpin	$4,90 \pm 0,07$	-1	$-1,01 \pm 0,11$	0 ± 2	4

Tab. 4.16 Kenngrößen \pm Standardfehler der Bindungskurven aus Abb. 4.27.
 $pK_{i/app}$: Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante bzw. der apparenten Gleichgewichtsdissoziationskonstanten des Inhibitors; n_H : festgesetzter Hill-Koeffizient
 $n_H (frei)$: Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit; # signifikant bessere Anpassung der Kurvensteilheit mit variablem Hill-Koeffizienten als mit einem konstanten von $n_H = 1$ (F-test, $p < 0,05$)
n: Anzahl unabhängiger Experimente

4.3. Untersuchungen an primären murinen Kardiomyozyten

Als primäres Expressionssystem wurden murine atriale und ventrikuläre Kardiomyozyten gewählt, die von den fünf muskarinischen Subtypen (M_1 - M_5) vornehmlich den M_2 -Rezeptor exprimieren (Dhein et al., 2001; Kitazawa et al., 2009). Es wurden die Wildtyp-Mausstämme CD1 und C57BL/6 verwendet.

Das primäre Expressionssystem diente der Überprüfung der M_2 -vermittelten Aktivierung stimulatorischer G-Proteine. Da bereits für den adrenergen cardialen β_2 -Rezeptor die Aktivierung von $G_{i/o}$ - und G_s -Proteinen nachgewiesen werden konnte (Xiao et al., 1999; Liu et al 2009), war die Untersuchung der M_2 -vermittelten promiskuitiven G-Proteinaktivierung an Kardiomyozyten von besonderem Interesse. Zudem erfolgte die Untersuchung der dualsterischen Hybridliganden Iper-6-phth und Iper-8-phth auf die spontane Schlagfrequenz, sowie die Auswirkung erhöhter cardialer cAMP-Spiegel auf den negativ chronotropen und negativ inotropen Effekt des dualsterischen muskarinischen Agonisten Iper-6-phth.

4.3.1. Bindungseigenschaften des M_2 -Rezeptors sind unabhängig von der Spezies

Vor der Durchführung funktioneller Experimente wurde der murine M_2 -Rezeptor in Radioligandbindungs-Experimenten untersucht, um speziesabhängige Unterschiede (human – murin – porcin) hinsichtlich der orthosterischen und allosterischen Bindungsstelle auszuschließen. Die Bindungseigenschaften wurden an Rezeptorhomogenaten aus adulten Herzen von *mus musculus* (= Hausmaus; Mausstämme CD1 und C57BL/6) und *sus scrofa domestica* (= Hausschwein) untersucht. Die Experimente wurden im 5 mM Na,K,PO₄-Puffer bei 23°C durchgeführt. Zum Vergleich mit dem humanen M_2 -Rezeptor wird in den entsprechenden Abschnitten auf Experimente mit Membranhomogenaten aus CHO-h M_2 verwiesen.

4.3.1.1. Charakterisierung der orthosterischen Bindungsstelle

Zur Charakterisierung der Acetylcholin-Bindungsstelle wurden die orthosterischen Liganden N-Methylscopolamin (NMS) und Oxotremorin M (Oxo M) eingesetzt. Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit von Mäuseherzgewebe wurde der Versuchsansatz miniaturisiert und mit einem kleineren Messfenster von 500 bis 1000 dpm gearbeitet (Abb. 4.28). Ein verdünntes Schweineherzhomogenat wurde folglich zum Vergleich mitgeführt.

4.3.1.1.1. Inhibition mit N-Methylscopolamin

Hinsichtlich der orthosterischen Bindungsstelle konnte mit dem inversen Agonisten NMS kein speziesabhängiger Unterschied detektiert werden. Die Affinität von NMS (K_D) unterschied sich innerhalb der Homogenate des kleinen Messfensters von 500 bis 1000 dpm statistisch nicht voneinander (ANOVA, $p < 0,05$). Jedoch wiesen diese Homogenate teilweise einen signifikanten Unterschied zum "konventionellen" Schweineherzhomogenat nach Tränkle et al. (1996) auf, welches in einer höheren Proteinkonzentration eingesetzt wurde (siehe Tab. 4.17). Dieser Unterschied ist jedoch nicht als relevant anzusehen, da sich aufgrund der geringen Streuung auch die beiden Schweineherzhomogenate voneinander unterschieden, welche aus dem gleichen Herz hergestellt wurden. Darüber hinaus stimmen die für *mus musculus* erhobenen Affinitäten mit denen des humanen M_2 -Rezeptors früherer Arbeiten überein (Linsel N., 2008; Schrage R., 2009). Mit Ausnahme des Mäuseherzhomogenates aus C57BL/6 wiesen alle Mittelwertskurven eine normale Kurvensteilheit auf (F-Test, $p < 0,05$). Da bei C57BL/6 aber jeder einzelne Versuchstag mit einer normalen Steilheit angepasst werden konnte, wurde die Mittelwertskurve mit $n_H = -1$ festgesetzt.

Die Anzahl der detektierbaren Bindungsstellen (B_{max}) der Mäuseherzhomogenate war im Vergleich zum Schweineherz um ca. die Hälfte reduziert (siehe Tab. 4.17). Es ist anzumerken, dass die Mäuseherzen bei der Homogenatherstellung sehr leicht zu verreiben waren. Nicht-rezeptorhaltige Membranfragmente könnten somit evtl. schlechter abgetrennt worden sein, was auch den hohen Proteingehalt der Homogenate erklären würde (siehe Tab. 3.1). Der Unterschied in B_{max} ist folglich nicht eindeutig auf eine geringere Rezeptorexpression muriner Kardiomyozyten zurückzuführen, sondern ist wahrscheinlich durch den Herstellungsprozess bedingt.

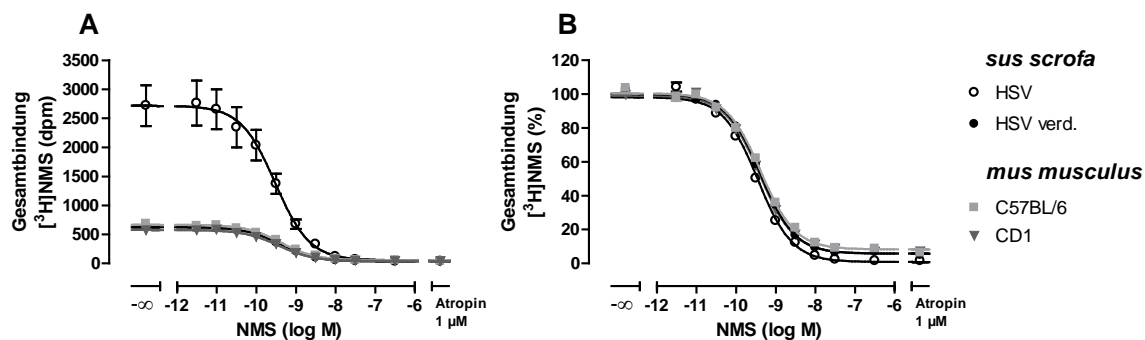


Abb. 4.28 Homologe Konkurrenz mit NMS an kardialen Gewebehomogenaten. Ordinate: Gesamtbindung des Radioliganden [³H]NMS in (A) Zerfällen pro Minute (dpm) und (B) in Prozent; das obere Plateau wurde auf die Gesamtbindung in Abwesenheit von NMS normiert. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der NMS-Konzentration; Kurvenanpassung: Vier-Parameterlogistische Gleichung; Datenpunkte: Mittelwerte ± Standardfehler, n = 6 – 9, Doppelbestimmung; Inkubationsbedingungen: Die Inkubation erfolgte im Na,K,P_i-Puffer (5 mM, pH 7,4) bei 23°C für 2 Stunden; [³H]NMS-Konzentration: 0,2 nM; Proteinkonzentrationen: 293 μg/1,5 ml (HSV); 105 μg/1,5 ml (HSV verd.); 266 μg/1,5 ml (C57BL/6); 134 μg/1,5 ml (CD1)

Homogenat	pK _D	B _{max} (fmol/mg Protein)	n _H	n _H (frei)	n
HSV	9,98 ± 0,04	100 ± 4	-1	-0,97 ± 0,05	9
HSV verd.	9,65 ± 0,08***	78 ± 2	-1	-0,95 ± 0,05	7
C57BL/6	9,60 ± 0,05***	35 ± 3	-1	-0,87 ± 0,04 [#]	6
CD1	9,78 ± 0,04	45 ± 4	-1	-0,97 ± 0,07	6

Tab. 4.17 Kenngrößen ± Standardfehler der Bindungskurven aus Abb. 4.28. pK_D: Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten von [³H]NMS; B_{max}: Anzahl der Bindungsstellen in fmol pro mg Protein; n_H: festgesetzter Hill-Koeffizient; n_H (frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit [#]signifikant bessere Anpassung der Kurvensteilheit mit variablem Hill-Koeffizienten als mit einem konstanten von n_H = -1 (F-Test, p < 0,05); n: Anzahl unabhängiger Experimente; Statistik: ANOVA, Tukey's post-Test, (***) p < 0,001) signifikant verschieden zu HSV

4.3.1.1.2. Inhibition mit Oxotremorin M

Inhibitionsversuche mit dem orthosterischen Agonisten Oxotremorin M ergaben Kurven mit einer signifikant flacheren Steilheit als $n_H = -1$ (F-Test, $p < 0,05$). Dieses Bindungsverhalten von Agonisten ist jedoch für Membranhomogenate bereits wohl bekannt (De Lean et al. 1980; Christopoulos et al., 2000; Kaufel D., 2010; Schrage et al., 2012). Die flache Kurvensteilheit ergibt sich aus der unterschiedlichen Affinität von Agonisten zum G-Protein-gekoppelten oder -entkoppelten Rezeptor. Folglich versteckt sich hinter der flachen Bindungskurve eine biphasische Kurve mit einem hoch- und einem niedrigaffinen Wendepunkt. Da die Bindungskurven bei den gewählten Konzentrationsschritten von 0,5 Dekaden jedoch schlecht mit einer biphasischen Funktion angepasst werden konnten, erfolgte eine monophasische Kurvenanpassung und die Berechnung der apparenten Gleichgewichtsdissoziationskonstanten von oxotremorin M (K_{app}). Diese Affinitäten unterschieden sich innerhalb der untersuchten Homogenate nicht voneinander (ANOVA, $p < 0,05$) und stimmen mit den Ergebnissen unter Einsatz des humanen M_2 -Rezeptors überein (Antony J., 2008). Basierend auf den durchgeführten Bindungsexperimenten konnte mit Oxotremorin M somit ebenfalls kein speziesabhängiger Unterschied hinsichtlich der orthosterischen Bindungsstelle detektiert werden.

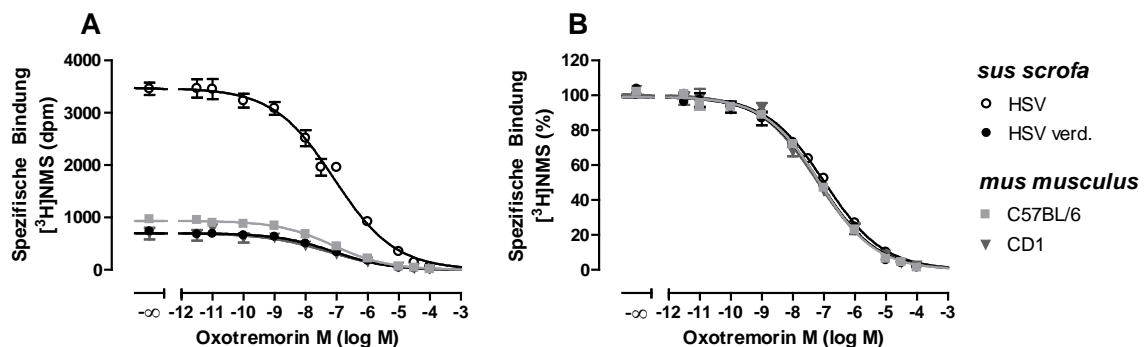


Abb. 4.29 Heterologe Konkurrenz mit Oxotremorin M an kardialen Gewebekomplexen.

Ordinate: Spezifische Bindung des Radioliganden [³H]NMS in (A) Zerfällen pro Minute (dpm) und (B) in Prozent; das obere Plateau wurde auf die spezifische Bindung in Abwesenheit von Oxotremorin M normiert. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Oxotremorin M-Konzentration; *Kurvenanpassung:* Vier-Parameter-logistische Gleichung; *Datenpunkte:* Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 5 - 6$, Doppelbestimmung; *Inkubationsbedingungen:* Die Inkubation erfolgte im Na,K,P_i-Puffer (5 mM, pH 7,4) bei 23°C für 2 Stunden; [³H]NMS-Konzentration: 0,2 nM; Die Bestimmung der unspezifischen Bindung erfolgte mit 1 μ M Atropin; Proteinkonzentrationen: 293 μ g/1,5 ml (HSV), 105 μ g/1,5 ml (HSV verd.), 266 μ g/1,5 ml (C57BL/6), 134 μ g/1,5 ml (CD1)

Homogenat	pK_{app}	n_H	n_H (frei)	n
HSV	$7,43 \pm 0,06$	-0,46	$-0,46 \pm 0,04^\#$	6
HSV verd.	$7,42 \pm 0,08$	-0,49	$-0,49 \pm 0,04^\#$	5
C57BL/6	$7,39 \pm 0,05$	-0,47	$-0,47 \pm 0,05^\#$	5
CD1	$7,49 \pm 0,05$	-0,46	$-0,46 \pm 0,05^\#$	5

Tab. 4.18 Kenngrößen \pm Standardfehler der Bindungskurven aus Abb. 4.29.
 pK_{app} : Negativer dekadischer Logarithmus der apparenten Gleichgewichtsdissoziationskonstanten von Oxotremorin M; n_H : festgesetzter Hill-Koeffizient; n_H (frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit; n : Anzahl unabhängiger Experimente [#] signifikant bessere Anpassung der Kurvensteilheit mit variablem Hill-Koeffizienten als mit einem konstanten von $n_H = 1$ (F-test, $p < 0,05$); Statistik: ANOVA ($p > 0,05$)

4.3.1.2. Charakterisierung der allosterischen Bindungsstelle

Für die Untersuchung der dualsterischen Liganden Iper-6-phth und Iper-8-phth war neben der orthosterischen Bindungsstelle die Existenz der allosterischen Bindungsstelle von großer Bedeutung, da die dualsterischen Liganden mit beiden Bindungsstellen interagieren (Antony et al., 2009; Bock et al. 2012). Zum Nachweis der allosterischen Bindungsstelle am murinen M_2 -Rezeptors ('*common allosteric site*', Tränkle et al., 2003), wurde der M_2 -prävalente allosterische Modulator W84 eingesetzt (Lüllmann et al., 1969). Im Gegensatz zum konventionellen Schweineherzhomogenat (HSV) wurde bei den restlichen Homogenaten aufgrund der geringeren Bindung eine höhere Radioligandkonzentration von 1 nM eingesetzt (Abb. 4.30). Die Bestimmung der Affinität von W84 zum [3 H]NMS besetzten Rezeptor (pEC_{50Dis}) erfolgte mit der "2-Punkt-Kinetik" nach Kostenis und Mohr (1996).

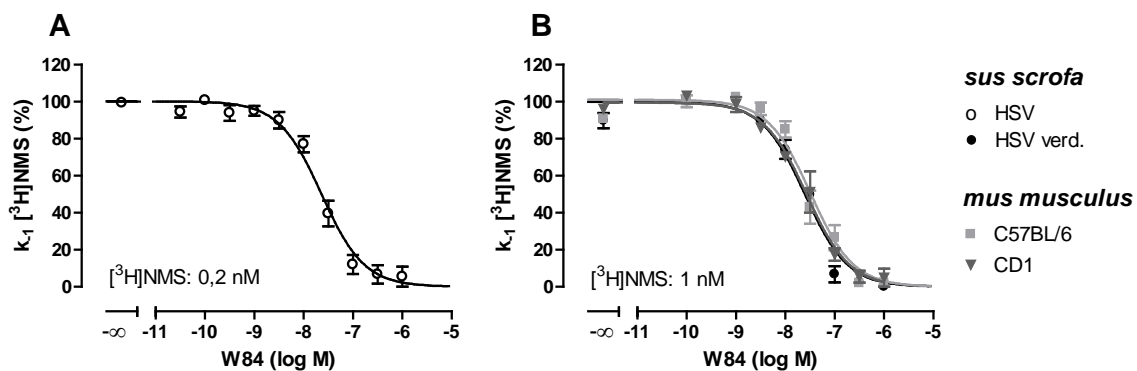


Abb. 4.30 Affinität des allosterischen Modulators W84 zum [3 H]NMS-besetzten Rezeptor. Die Experimente wurden an kardialen Gewebhomogenaten von *sus scrofa* und *mus musculus* durchgeführt. *Ordinate*: Apparente Geschwindigkeitskonstante (k_1) des Radioliganden [3 H]NMS in Prozent, welche auf k_1 in Abwesenheit von W84 normiert ist; *Abzisse*: Dekadischer Logarithmus der eingesetzten W84-Konzentrationen; *Kurvenanpassung*: Vier-Parameter-logistische Gleichung; *Datenpunkte*: Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 3 - 8$, Doppelbestimmung; *Inkubationsbedingungen*: Die Inkubation erfolgte im Na,K,P_i-Puffer (5 mM, pH 7,4) bei 23°C; [3 H]NMS-Konzentration: (A) 0,2 nM (B) 1 nM; Die Bestimmung der unspezifischen Bindung erfolgte mit Atropin (A) 1 μ M bzw. (B) 3 μ M; Proteinkonzentrationen: 293 μ g/1,5 ml (HSV), 105 μ g/1,5 ml (HSV verd.), 266 μ g/1,5 ml (C57BL/6), 134 μ g/1,5 ml (CD1)

W84 wirkte auf [3 H]NMS bei allen Homogenaten stark dissoziationsverzögernd. Das Ausmaß der [3 H]NMS-Dissoziationsverzögerung am murinen M_2 -Rezeptor stimmte mit der des porcinen und des humanen M_2 -Rezeptors überein (ANOVA, $p > 0,05$). Basierend auf den durchgeführten Experimenten konnten folglich keine speziesabhängigen Unterschiede hinsichtlich der allosterischen Bindungsstelle detektiert werden.

Die Mittelwertskurven von drei der vier Homogenate konnten besser mit einem steilen Hill-Koeffizienten angepasst werden ($n_H < -1$; F-Test, $p < 0,05$). Die Mehrzahl der Kurven aller Versuchstage wiesen jedoch eine normale Steilheit auf (HSV: 6 von 8; HSV verd.: 4 von 6; C57BL/6: 4 von 5), weshalb die Steilheiten aller Mittelwertskurven mit $n_H = -1$ festgesetzt wurden.

Homogenat	pEC_{50Diss}	n_H	n_H (frei)	$t_{1/2Diss}$ (min)	Unteres Plateau (%)	n
HSV	$7,64 \pm 0,09$	-1	$-1,45 \pm 0,25^\#$	$6,8 \pm 0,42$	0 ± 4	8
HSV verd.	$7,58 \pm 0,04$	-1	$-1,45 \pm 0,20^\#$	$7,6 \pm 0,77$	0 ± 3	6
C57BL/6	$7,45 \pm 0,11$	-1	$-1,32 \pm 0,23^\#$	$7,7 \pm 0,81$	0 ± 4	5
CD1	$7,56 \pm 0,10$	-1	$-1,02 \pm 0,20$	$6,2 \pm 0,40$	0 ± 4	3

Tab. 4.19 Kenngrößen \pm Standardfehler der Bindungskurven aus Abb. 4.30. pEC_{50Diss} : Negativer dekadischer Logarithmus der W84-Konzentration, welche eine halbmaximalen Verzögerung der [3 H]NMS-Dissoziation bewirkt. $t_{1/2Diss}$: Dissoziationshalbwertszeit des Radioliganden [3 H]NMS in Minuten; n_H : festgesetzter Hill-Koeffizient; n_H (frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit $^\#$ signifikant bessere Anpassung der Kurvensteilheit mit variablem Hill-Koeffizienten als mit einem konstanten von $n_H = 1$ (F-test, $p < 0,05$); n: Anzahl unabhängiger Experimente; Statistik: ANOVA ($p > 0,05$)

4.3.2. Muskarinische Agonisten wirken negativ chronotrop

Die Untersuchung des negativ chronotropen Effektes muskarinischer Agonisten erfolgte an primären atrialen Kardiomyozyten muriner Embryonen (Mausstamm CD1; E 14,5 – E 16,5). In diesem Stadium exprimieren diese Zellen bereits muskarinische M_2 -Rezeptoren (Fleischmann et al, 2004) und zeichnen sich durch eine spontane Schlagfrequenz aus. Nach einer Beobachtung von 2 bis 3 Minuten wurden die Zellen mit den muskarinischen Agonisten in ansteigenden Konzentrationen superfundiert.

Vor dem Einsatz der muskarinischen Testsubstanzen wurde der Effekt des endogenen Liganden Acetylcholin (ACh) untersucht, dessen frequenzsenkender Effekt auf die Herzfunktion bereits 1921 von Otto Loewi beschrieben wurde. Wie in der repräsentativen Originalregistrierung ersichtlich (Abb. 4.31), kann dieser Effekt ebenfalls an den isolierten atrialen Kardiomyozyten detektiert werden. Ansteigende Konzentrationen des Agonisten führten zu einer schrittweisen Reduzierung der Schlagfrequenz. Der Wechsel auf die nächsthöhere ACh-Konzentration erfolgte

jeweils nach dem Erreichen eines 'steady-state', was in der Regel spätestens nach drei Minuten der Fall war. In einer Konzentration von 1 μM führte ACh schließlich zu einem kompletten Erliegen der spontanen Kontraktionen. Nach Umschaltung auf Agonist-freie Pufferlösung war dieser Effekt reversibel und die Zelle begann erneut zu schlagen. Für die Darstellung aller Messpunkte in einem Streudiagramm wurde der negativ chronotrope Effekt der getesteten ACh-Konzentration auf die Ausgangsfrequenz der jeweils untersuchten Zelle in Abwesenheit von ACh normiert (siehe Abb. 4.31 B). Der Wendepunkt lag bei 44 nM (pEC_{50} : $7,36 \pm 0,11$; $n = 3$) und stimmte gut mit der für Acetylcholin publizierten Wirksamkeit am M_2 -Rezeptor überein (May et al. 2007, Antony et al., 2009; Bock et al. 2012).

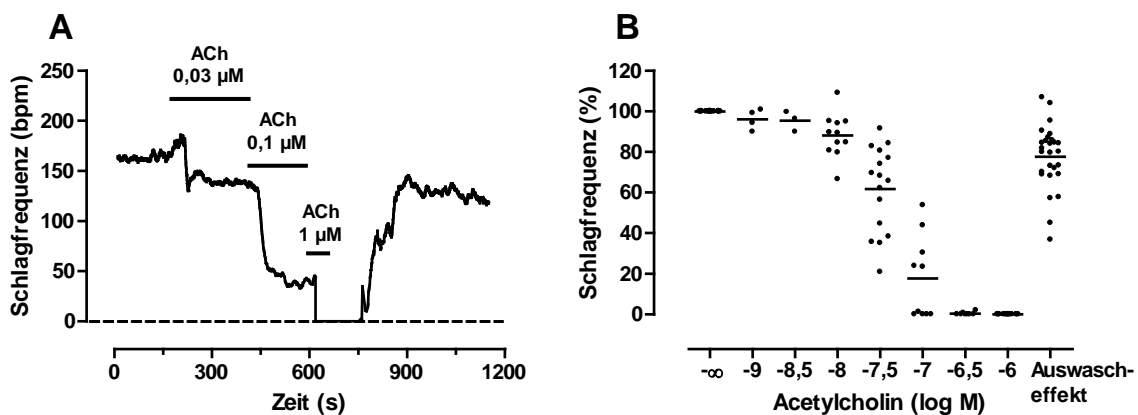


Abb. 4.31 ACh-Effekt auf die Schlagfrequenz atrialer Kardiomyozyten. (A) Dargestellt ist eine repräsentative Originalregistrierung mit ansteigenden ACh-Konzentrationen; *Ordinate*: Spontane Schlagfrequenz in Schlägen pro Minute (bpm); *Abszisse*: Zeit in Sekunden; Die Zugabe ansteigender ACh-Konzentrationen ist durch schwarze Balken gekennzeichnet. Die Nulllinie ist gestrichelt dargestellt. (B) Darstellung aller Messwerte in einem Streudiagramm. *Ordinate*: Auf die Ausgangsfrequenz normierte Schlagfrequenz in Prozent. *Abszisse*: Dekadischer Logarithmus der eingesetzten ACh-Konzentration

Aufgrund der guten Reproduzierbarkeit wurden im Anschluss weitere muskarinische Agonisten getestet und deren Wirksamkeiten bestimmt (pEC_{50} : Iperoxo > Iper-8-phth > Acetylcholin > Oxotremorin M, Iper-6-phth > Pilocarpin; siehe Abb. 4.32), welche gut mit denen in CHO-h M_2 übereinstimmen (siehe Kapitel 4.1.3). Fast alle Konzentrations-Effekt-Kurven verliefen sehr steil (F-Test, $p < 0,05$), was durch eine vorhandene Rezeptorreserve verursacht sein könnte. Während die Konzentrations-Effekt-Kurven der orthosterischen Agonisten Acetylcholin, Oxotremorin M und Iperoxo sehr steil verlaufen, sind die der dualsterischen Agonisten bereits flacher und die des Agonisten Pilocarpin weist eine normale Kurvensteilheit auf (F-Test, $p > 0,05$).

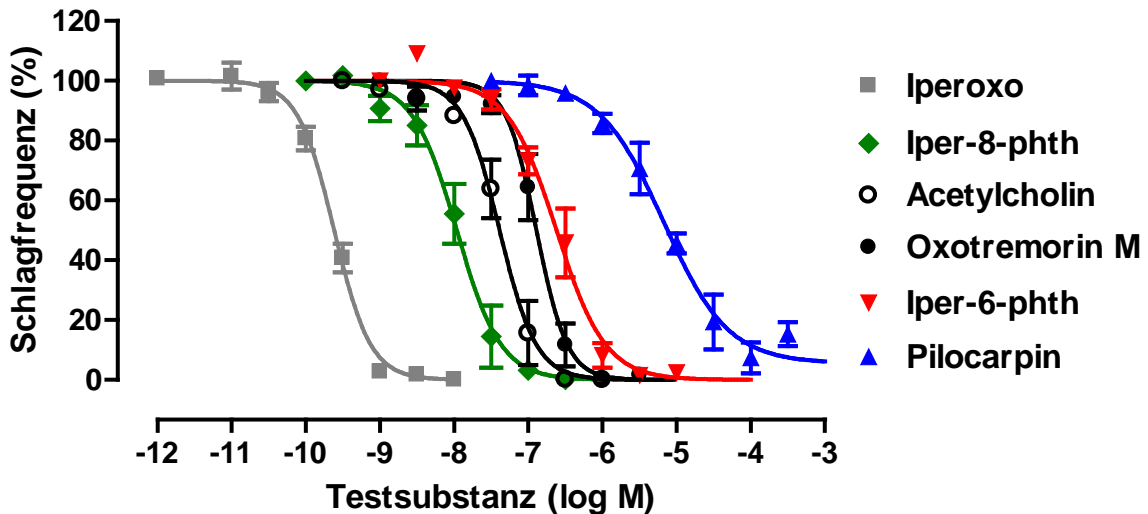


Abb. 4.32 Wirksamkeit muskarinischer Agonisten auf murine embryonale Vorhofzellen. Ordinate: Auf die Ausgangsfrequenz normierte Schlagfrequenz in Prozent. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Testsubstanz-Konzentration; Kurvenanpassung: Vier-Parameter-logistische Gleichung; Datenpunkte: Mittelwerte \pm Standardfehler, Ein- bis Achtfachbestimmung; $n = 2 - 4$

Alle eingesetzten Testsubstanzen wirkten auf die Kardiomyozyten stark negativ chronotrop. Im Gegensatz zu allen anderen Agonisten vermochte es Pilocarpin jedoch nicht die Schlagfrequenz einiger Zellen komplett auf Null abzusenken. Dagegen besaß Oxotremorin M in einer Konzentration von 1 μM an diesen Zellen immer einen maximalen Effekt, wenn es im Anschluss an Pilocarpin zur Kontrolle eingesetzt wurde.

Testsubstanz	pEC_{50}	n_H	n_H (frei)	Bottom (%)	n
Acetylcholin	$7,36 \pm 0,11$	-1,76	$-1,76 \pm 0,28^\#$	0	3
Oxotremorin M	$6,88 \pm 0,10$	-2,10	$-2,10 \pm 0,47^\#$	0	4
Iperoxo	$9,61 \pm 0,02$	-1,77	$-1,77 \pm 0,21^\#$	0	3
Iper-6-phth	$6,62 \pm 0,10$	-1,31	$-1,31 \pm 0,23^\#$	0	3
Iper-8-phth	$7,96 \pm 0,13$	-1,46	$-1,46 \pm 0,29^\#$	0	2
Pilocarpin	$5,21 \pm 0,12$	-1	$-1,03 \pm 0,18$	6 ± 4	4

Tab. 4.20 Kenngrößen \pm Standardfehler der Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abb. 4.32. pEC_{50} : Negativ dekadischer Logarithmus der molaren Testsubstanz-Konzentration, welche eine halbmaximale Zellantwort hervorruft. n_H : festgesetzter Hill-Koeffizient; n_H (frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit $^\#$ signifikant bessere Anpassung der Kurvensteilheit mit variablem Hill-Koeffizienten als mit einem konstanten von $n_H = 1$ (F-test, $p < 0,05$); Bottom: Unteres Plateau der dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven in Prozent; Die Normierung erfolgte auf die Ausgangsfrequenz der jeweils untersuchten Zelle; n: Anzahl unabhängiger Experimente

Tab. 4.21 zeigt die gemittelten Ausgangsfrequenzen aller Zellen, sowie die Auswascheffekte nach Gabe supramaximaler Agonistkonzentrationen. Nur Zellen, welche nach dem Wechsel auf Agonist-freie Lösung wieder spontan zu schlagen anfangen, wurden für die in Abb. 4.32 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven verwendet.

Testsubstanz	Ausgangsfrequenz	Auswascheffekt		n
	(bpm)	(bpm)	(%)	
Acetylcholin	140 ± 7	107 ± 6	78 ± 3	27
Oxotremorin M	145 ± 6	136 ± 6	94 ± 3	33
Iperoxo	142 ± 4	110 ± 5	78 ± 3	28
Iper-6-phth	140 ± 4	111 ± 5	80 ± 3	34
Iper-8-phth	140 ± 7	119 ± 8	85 ± 4	26
Pilocarpin	155 ± 5	100 ± 8	64 ± 4	38

Tab. 4.21 Ausgangsfrequenzen und Auswascheffekte. Aufgelistet sind die gemittelten spontanen Schlagfrequenzen ± Standardfehler aller untersuchten embryonalen atrialen Kardiomyozyten in Schlägen pro Minute (bpm). Der Auswascheffekt wurde zusätzlich auf die Ausgangsfrequenz normiert und in Prozent angegeben. *n*: Anzahl der vermessenen Zellen

4.3.3. Der negativ chronotrope Effekt ist M₂-vermittelt

An M₂-knockout-Mäusen konnte bereits eindeutig belegt werden, dass der negativ chronotrope Effekt auf das adulte Herz M₂-vermittelt ist (Gomez et al., 1999). Zur Überprüfung des M₂-vermittelten negativ chronotropen Effektes in embryonalen Kardiomyozyten (Mausstamm CD1; E 14,5 – 16,5) wurde dazu der allosterische Modulator W84 eingesetzt. Dieser verhält sich an muskarinischen Rezeptoren wie ein inverser Agonist (Hilf und Jakobs, 1992) und besitzt die höchste Affinität für den M₂-Rezeptor (Lüllmann et al., 1969; Voigtländer et al., 2003; Huang und Ellis, 2007). W84 wurde in einer Konzentration von 3 µM eingesetzt, welche am M₂-Rezeptor die Konzentrations-Effekt-Kurve muskarinischer Agonisten um den Faktor 10 nach rechts verschiebt (Lüllmann et al., 1969; Kellershohn K., 2008). Atriale Zellen mit einer konstanten Schlagfrequenz wurden für 3 Minuten mit W84 superfundiert und anschließend der Effekt des muskarinischen Agonisten Iperoxo in Gegenwart von W84 bestimmt. Nach Erreichen des Maximaleffektes, was sich in einem Erliegen der spontanen Kontraktionen äußerte, wurde der Auswascheffekt von Iperoxo überprüft.

W84 übte in einer Konzentration von 3 µM keinen Eigeneffekt auf die spontane Schlagfrequenz aus (verbundener t-Test; $p > 0,05$), was auf eine fehlende Spontanaktivität des M₂-Rezeptors in diesen Zellen hinweist. Die Gegenwart des allosterischen Modulators führte zu einer deutlichen Parallelverschiebung der Iperoxo-induzierten Konzentrations-Effekt-Kurve (pEC_{50} : $8,88 \pm 0,12$; $n = 3$), jedoch blieb das Ausmaß des induzierbaren Maximaleffektes unbeeinflusst (Abb. 4.33 B). Da sich W84 in der eingesetzten Konzentration wie ein kompetitiver Antagonist verhielt, erfolgte die Berechnung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten von W84 (K_A) nach Arunlakshana und Schild (1959). Die Steigung wurde auf eins festgesetzt und ein pK_A -Wert von $6,14 \pm 0,14$ ermittelt (Abb. 4.33 C).

Die Parallelverschiebung um 0,8 Dekaden und die berechnete Affinität von W84 (pK_A) lagen in den für den M₂-Rezeptor publizierten Bereichen (Lüllmann et al., 1969; Maaß et al., 1995; Schmalenbach C., 2005; Kellershohn K., 2007) und bestätigen den M₂-vermittelten negativ chronotropen Effekt in murinen embryonalen atrialen Kardiomyozyten.

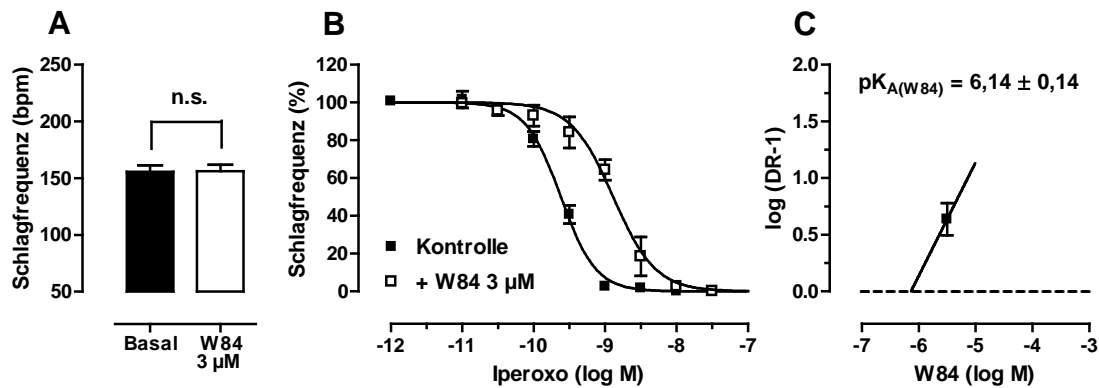


Abb. 4.33 W84-induzierte Parallelverschiebung. (A) Eigeneffekt von W84 auf die spontane Schlagfrequenz in Schlägen pro Minute (bpm). *Balken:* Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 26$; *Statistik:* Verbundener t-Test, $p > 0,05$; (B) Konzentrations-Effekt-Kurven von Iperoxo in An- und Abwesenheit von W84. *Ordinate:* Spontane Schlagfrequenz in Prozent; Der Agonist-vermittelte negativ chronotrope Effekt wurde auf die Ausgangsfrequenz der jeweils untersuchten Zelle normiert. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Iperoxo-Konzentrationen; *Kurvenanpassung:* Vier-Parameter-logistische Gleichung; *Datenpunkte:* Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 3$; (C) Darstellung der Parallelverschiebung nach Arunlakshana und Schild (1959). *Datenpunkte:* Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 3$

	pEC_{50}	n_H	n_H (frei)	n
Kontrolle	$9,61 \pm 0,02$	-1,77	$-1,77 \pm 0,21^\#$	3
+ W84 3 μ M	$8,88 \pm 0,12^{**}$	-1,47	$-1,47 \pm 0,22^\#$	3

Tab. 4.22 Kenngrößen \pm Standardfehler der Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abb. 4.33B. pEC_{50} : Negativ dekadischer Logarithmus der molaren Testsubstanz-Konzentration, welche eine halbmaximale Zellantwort hervorruft. n_H : festgesetzter Hill-Koeffizient; n_H (frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit $^\#$ signifikant bessere Anpassung der Kurvensteilheit mit variablem Hill-Koeffizienten als mit einem konstanten von $n_H = 1$ (F-test, $p < 0,05$); n : Anzahl unabhängiger Experimente; *Statistik:* Unverbundener t-Test gegen die Kontrolle (** $p < 0,01$)

4.3.4. Der kardiale M_2 -Rezeptor ist $G_{i/o}$ -gekoppelt.

Der vorzugsweise $G_{i/o}$ -gekoppelte M_2 -Rezeptor zeigte bereits im artifiziiellen Zellsystem die Fähigkeit zur promiskuitiven G-Proteinaktivierung und die alternative Kopplung an G_s -Proteine eindeutig detektierbar (Kapitel 4.1.1.2 und 4.1.2.1). In den nachfolgenden Experimenten wurde überprüft, ob der kardiale M_2 -Rezeptor in embryonalen Kardiomyozyten (Mausstamm CD1; E 14,5 – 16,5) ebenfalls zur Kopplung an stimulatorische G-Proteine fähig ist. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit Pertussis Toxin vorbehandelt (1000 ng/ml, > 16 h), um die dominante Kopplung an inhibitorische G-Proteine auszuschalten.

4.3.4.1. Beeinflussung der Frequenz

Zellen mit einer konstanten basalen Schlagfrequenz wurden nach einer Beobachtung von 3 Minuten mit Oxotremorin M (100 μM) superfundiert und für weitere 3 Minuten beobachtet. Der Mittelwert aus den letzten 30 Sekunden in Gegenwart des Agonisten wurde anschließend mit der Ausgangsfrequenz verglichen. Während die Frequenz einiger Zellen überhaupt nicht beeinflusst wurde, reagierten andere Zellen mit einem Anstieg der spontanen Schlagfrequenz, was durch die Aktivierung stimulatorischer G-Proteine verursacht sein könnte. Der Vergleich des arithmetischen Mittels aus allen Messwerten vor und nach Agonistzugabe unterschied sich hierbei signifikant voneinander (verbundener t -Test, $p < 0,05$) und zeigte sich in einer prozentualen Zunahme der Schlagfrequenz um 16%. Um die Reproduzierbarkeit dieses Ergebnisses zu überprüfen, wurden anschließend analoge Experimente mit dem orthosterischen Agonisten Iperoxo durchgeführt. Es wurde eine supramaximale Konzentration von 1 μM eingesetzt, mit der eine Frequenzerhöhung jedoch nicht nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 4.34).

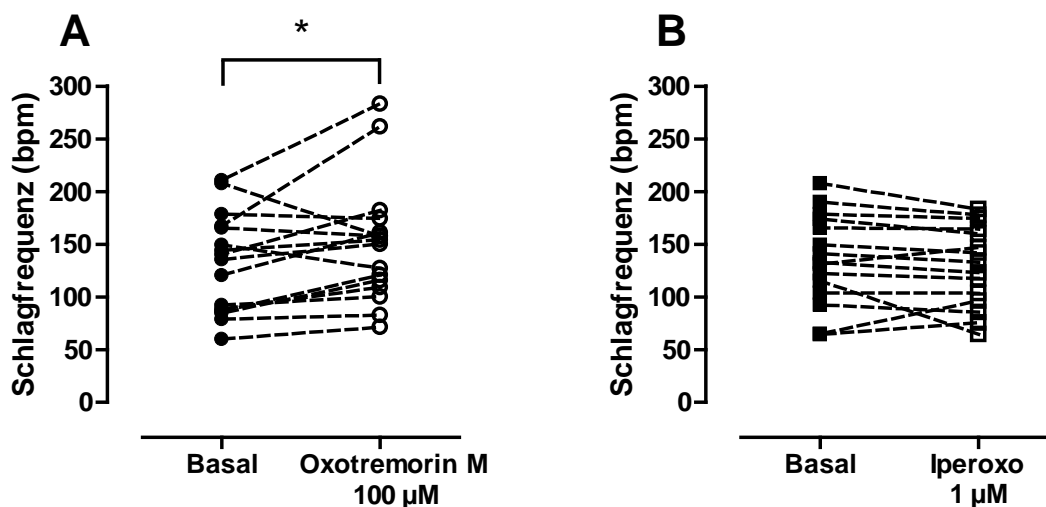


Abb. 4.34 Auswirkung muskarinischer Agonisten auf die Schlagfrequenz nach Ausschaltung von $G_{i/o}$ -Proteinen (+ PTX). Dargestellt ist die Schlagfrequenz embryonaler atrialer Kardiomyozyten (Mausstamm CD1; E 14,5 – 16,5) vor und nach Sperfusion der Zellen mit (A) Oxotremorin M (100 μM) und (B) Iperoxo (1 μM)

Der fehlende negativ chronotrope Effekt belegt, dass die Reduktion der spontanen Schlagfrequenz M_2 -vermittelt ist. Eine promiskuitive G-Proteinaktivierung des M_2 -Rezeptors konnte jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Testgruppe + PTX	Basale Schlagfrequenz	Schlagfrequenz nach Agonistzugabe		
	(bpm)	(bpm)	(% Basal)	n
Oxotremorin M 100 μ M	132 \pm 12	151 \pm 14*	116 \pm 5	16
Iperoxo 1 μ M	136 \pm 11	130 \pm 10	98 \pm 5	15

Tab. 4.23 Mittelwerte \pm Standardfehler der in Abb. 4.34 dargestellten Agonist-Effekte. Dargestellt ist die gemittelte Schlagfrequenz einer jeden untersuchten Gruppe vor und nach Agonistzugabe in Schlägen pro Minute (bpm). Der Agonisteffekt wurde zusätzlich jeweils auf die Ausgangsfrequenz vor Agonistzugabe normiert (% Basal). *n*: Anzahl der vermessenen Zellen aus drei unabhängigen Präparationen. *Statistik*: Verbundener t-Test (* $p < 0,05$)

4.3.4.2. Untersuchung des intrazellulären cAMP-Anstiegs

Zur weiteren Untersuchung der promiskuitiven Signalwegsaktivierung, wurden cAMP-Messungen durchgeführt. Die Messungen wurden wie in Kapitel 3.8 beschrieben an adhärennten Zellen durchgeführt. Der direkte Aktivator der Adenylylzyklase Forskolin und der β -Agonist Orciprenalin wurde zur Überprüfung der Zellvitalität mitgeführt. Zur Quantifizierung der cAMP-Anstiege wurden die Agonisteffekte auf den Maximaleffekt von Forskolin normiert.

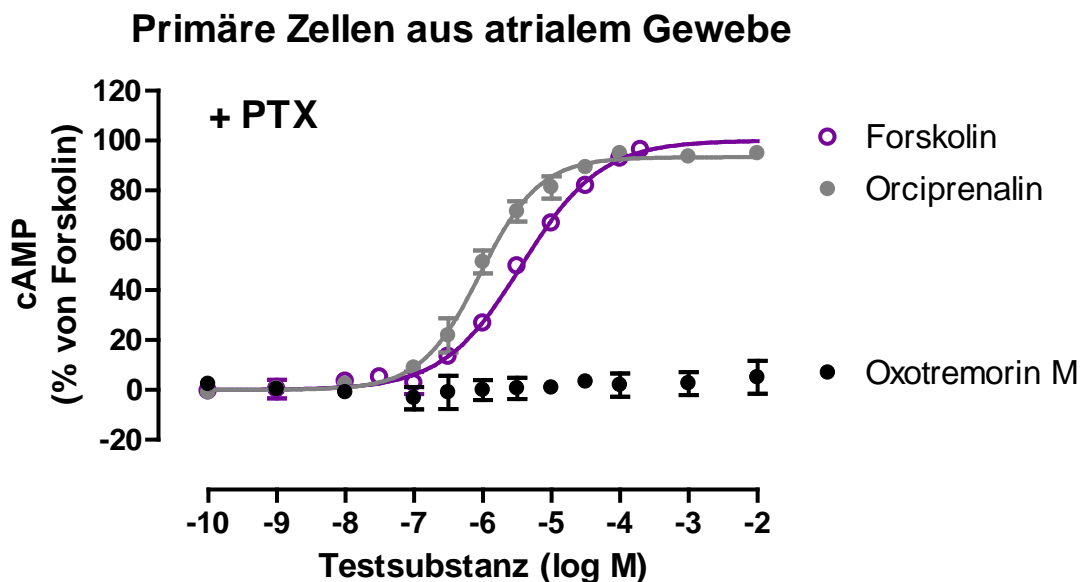


Abb. 4.35 Agonist-induzierte cAMP-Produktion adhärennten primärer Zellen aus embryonalem Vorhofgewebe. (Mausstamm CD1; E 14,5 – 16,5); PTX-Vorbehandlung: 1000 ng/ml, > 18 h; *Ordinate*: Prozentuale cAMP-Produktion im Vergleich zu Forskolin (%); *Abszisse*: Dekadischer Logarithmus der eingesetzten Testsubstanz-Konzentration; *Kurvenanpassung*: Vier-Parameter-logistische Gleichung; *Datenpunkte*: Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 3-4$, Dreifachbestimmung

Testsubstanz	pEC ₅₀	E _{max} (%)	n _H (frei)	n
Forskolin	5,42 ± 0,04	100 ± 3	0,75 ± 0,05 [#]	3
Orciprenalin	6,04 ± 0,07	94 ± 1	0,94 ± 0,07	3
Oxotremorin M	n.a.	n.a.	n.a.	4

Tab. 4.24 Kenngrößen ± Standardfehler der Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abb. 4.35.
pEC₅₀: Negativ dekadischer Logarithmus der molaren Testsubstanz-Konzentration, welche eine halbmaximale Zellantwort hervorruft. *E_{max}*: Maximale Zellantwort (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve) bezogen auf Forskolin. *n_H (frei)*: Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit [#] signifikant bessere Anpassung der Kurvensteilheit mit variablem Hill-Koeffizienten als mit einem konstanten von *n* = 1 (F-test, *p* < 0,05); *n*: Anzahl unabhängiger Experimente; *Statistik*: Unverbundener t-Test, (** *p* < 0,01)

Orciprenalin und Forskolin induzierten beide einen gut detektierbaren Anstieg des intrazellulären cAMP-Gehaltes. Auffällig war jedoch die schwächere Wirksamkeit von Forskolin an den atrialen Zellen im Vergleich zu den CHO-hM₂-Zellen (pEC₅₀: 6,16 ± 0,11; Kapitel 4.1.2.2) und den humanen Lungenfibroblasten (pEC₅₀: 6,15 ± 0,06; Kapitel 4.2.3.2). Dies könnte möglicherweise aus einer unterschiedlichen Ausstattung der Zellen mit verschiedenen Isoformen der Adenylylzyklase resultieren. Orciprenalin war zudem um den Faktor 10 stärker wirksam als in den β₂-exprimierenden humanen Lungenfibroblasten (pEC₅₀: 4,98 ± 0,15; Kapitel 4.2.3.2). Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den von O'Donnell (1970) erhobenen Wirksamkeiten an isolierten Meerschweinchenorganen (Trachea: β₂-Modell; Atrium: β₁-Modell), wo Orciprenalin an β₂-dominanten Geweben eine höhere Wirksamkeit aufwies.

Im Gegensatz zu Orciprenalin und Forskolin induzierte Oxotremorin M keinen detektierbaren cAMP-Anstieg, weshalb die Hypothese einer alternativen Kopplung an G_s-Proteine durch diese Versuche nicht bestätigt werden konnte.

4.3.5. Sympathikusaktivierung reduziert die intrinsische Wirksamkeit von Iper-6-phth in Kardiomyozyten

Bereits in CHO-hM₂-Zellen sowie humanen Lungenfibroblasten zeigten die dualsterischen Liganden Iper-6-phth und Iper-8-phtht eine reduzierte intrinsische Aktivität in Gegenwart erhöhter intrazellulärer cAMP-Gehalte. Folglich sollten Organe und Gewebe, welche sich durch einen hohen cAMP-Spiegel auszeichnen weniger empfindlich gegenüber die dualsterischen Agonisten sein als solche mit niedrigen cAMP-Gehalten. Um diese Hypothese an primären Zellen zu bestätigen, wurde nach simulierter Sympathikusaktivierung mittels Isoprenalin (ISO) einerseits die Reduktion der spontanen Schlagfrequenz in murinen embryonalen atrialen Kardiomyozyten untersucht (chronotroper Effekt) und andererseits das Ausmaß der Sarkomerverkürzung in adulten ventrikulären Kardiomyozyten (inotroper Effekt). Aufgrund des großen experimentellen Aufwands erfolgte die Durchführung nur mit dem dualsterischen Agonisten Iper-6-phth im Vergleich zum orthosterischen Agonisten Oxotremorin M.

4.3.5.1. Reduzierter negativ chronotroper Effekt

Die Simulierung der Sympathikusaktivierung erfolgte an murinen embryonalen atrialen Kardiomyozyten durch die Superfusion der Zellen mit ISO (100 nM) in Kombination mit dem Phosphodiesterase-Inhibitor IBMX (100 µM). Nach einer Applikationszeit von 3 Minuten wurde anschließend der dualsterische Agonist Iper-6-phth (I-6-p) in Gegenwart von ISO und IBMX getestet. Zur Überprüfung der maximalen Zellantwort wurde ebenfalls Oxotremorin M in einer Konzentration von 1 µM eingesetzt, welche die spontanen Kontraktionen zum Erliegen brachte. Dieser Effekt war nach Umschaltung auf Agonist-freie Lösung reversibel (siehe Abb. 4.36).

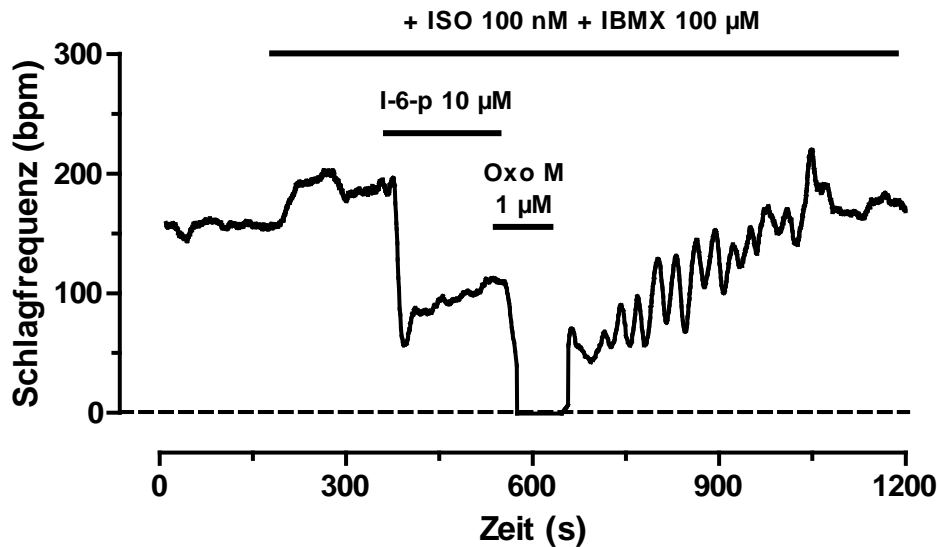


Abb. 4.36 Effekt von Iper-6-phth auf die Schlagfrequenz unter erhöhten intrazellulären cAMP-Gehalten. Repräsentative Originalregistrierung der spontanen Schlagfrequenz einer isolierten embryonalen Vorhofzelle (Mausstamm CD1; E 14,5 – 16,5). Dargestellt ist die spontane Schlagfrequenz in Schlägen pro Minute (bpm) über die Zeit in Sekunden. Die Zugabe der Testsubstanzen ist durch schwarze Balken gekennzeichnet. Die Nulllinie ist gestrichelt dargestellt.

Die Kombination aus der Aktivierung stimulatorischer G-Proteine und der Hemmung des cAMP-Abbaus führte zu einer Zunahme der spontanen Kontraktionen von 141 ± 5 auf 171 ± 7 Schlägen pro Minute (Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 34$) was einer Zunahme um 21% entspricht (verbundener t-Test, $p < 0,0001$). Die anschließende Superfusion mit dem dualsterischen Liganden Iper-6-phth induzierte noch immer einen starken negativ chronotropen Effekt, welcher jedoch nicht mehr so ausgeprägt war wie unter Kontrollbedingungen (siehe Abb. 4.37). Oxotremorin M induzierte dagegen weiterhin einen Maximaleffekt. Im Gegensatz zur intrinsischen Aktivität wurde die Wirksamkeit von Iper-6-phth dagegen nicht beeinflusst (unverbundener t-Test; $p > 0,05$).

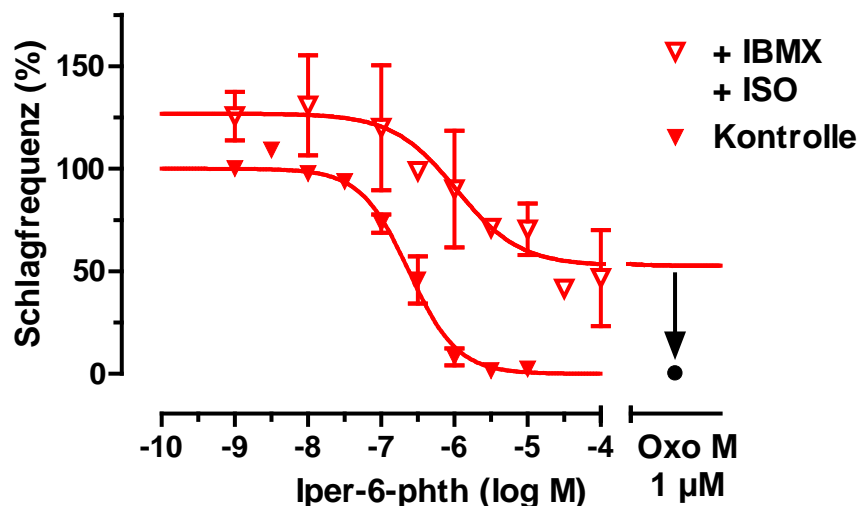


Abb. 4.37 Auswirkung erhöhter cAMP-Gehälter auf die Wirksamkeit von Iper-6-phth. Dargestellt ist der Effekt von Iper-6-phtht auf die spontane Schlagfrequenz embryonaler Vorhofzellen (Mausstamm CD1; E 14,5 – 16,5) unter Kontrollbedingungen (●) und unter erhöhten intrazellulären cAMP-Gehältern (○). Alle Substanzeffekte wurden auf die Ausgangsfrequenz in Abwesenheit von ISO+ IBMX normiert. *Kurvenanpassung*: Vier-Parameter-logistische Gleichung; *Datenpunkte*: Mittelwerte \pm Standardfehler, Ein- bis Vierfachbestimmung, $n = 3$

	Kontrolle	+ ISO / IBMX
pEC ₅₀	6,62 \pm 0,10	5,97 \pm 0,52
n _{H (frei)}	-1,31 \pm 0,23 [#]	-0,59 \pm 0,72
n _H	-1,31	-1
Top (%)	100	127 \pm 13
Bottom (%)	0	53 \pm 16
n	3	1

Tab. 4.25 Kenngrößen \pm Standardfehler der gemittelten Konzentrations-Effekt-Kurven aus **Abb. 4.37**. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus der molaren Testsubstanz-Konzentration, welche eine halbmaximale Zellantwort hervorruft. n_H: festgesetzter Hill-Koeffizient; n_{H (frei)}: Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit [#]signifikant bessere Anpassung der Kurvensteilheit mit variablem Hill-Koeffizienten als mit einem konstanten von n_H = -1 (F-test, $p < 0,05$); Top: Oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven, welches auf die basale Schlagfrequenz unter Kontrollbedingungen normiert wurde. Bottom: Unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven, welches auf die basale Schlagfrequenz unter Kontrollbedingungen normiert wurde. n: Anzahl unabhängiger Experimente

4.3.5.2. Reduzierter negativ inotroper Effekt

Zur Untersuchung des inotropen Effektes von Iper-6-phth und Oxotremorin M wurde die Sarkomerverkürzung adulter ventrikulärer Kardiomyozyten des Mausstamms C57BL/6 bestimmt. Die Kardiomyozyten wurden mit einer Frequenz von 2 Hz kontinuierlich gereizt und die Sarkomerverkürzung videomikroskopisch detektiert.

Nach einer Stabilisierungsphase von 1- 2 Minuten wurden die Zellen zur Simulierung des Sympathikuseffektes mit Isoprenalin-haltiger Pufferlösung (ISO; 1 μ M) superfundiert, was zu einer Verdopplung der Sarkomerverkürzung führte (Abb. 4.38). Die Vorbehandlung der Zellen mit ISO war notwendig, da muskarinische Agonisten sonst keinen Effekt an ventrikulären Kardiomyozyten aufweisen (Harvey RD and Belevych AE, 2003). Die anschließende Superfusion mit muskarinischer Agonisten (Oxotremorin M 10 μ M, Iper-6-phth 10 μ M) in Gegenwart von ISO resultierte in beiden Gruppen einen negativen inotropen Effekt, welcher sich in einer Reduzierung der Sarkomerverkürzung äußerte. Dieser Effekt war nach Umschaltung auf Agonist-freie Pufferlösung partiell reversibel. Oxotremorin M wies einen signifikant stärkeren negativ inotropen Effekt auf als Iper-6-phth (unverbundener t-Test, $p < 0,05$). Dies demonstriert den im Vergleich zu Oxotremorin M partialagonistischen Effekt von Iper-6-phth in Gegenwart eines simulierten Sympathikustonus somit auch auf der inotropen Ebene. Aufgrund des kleinen Messfensters entfiel die Aufnahme kompletter Konzentrations-Effekt-Kurven.

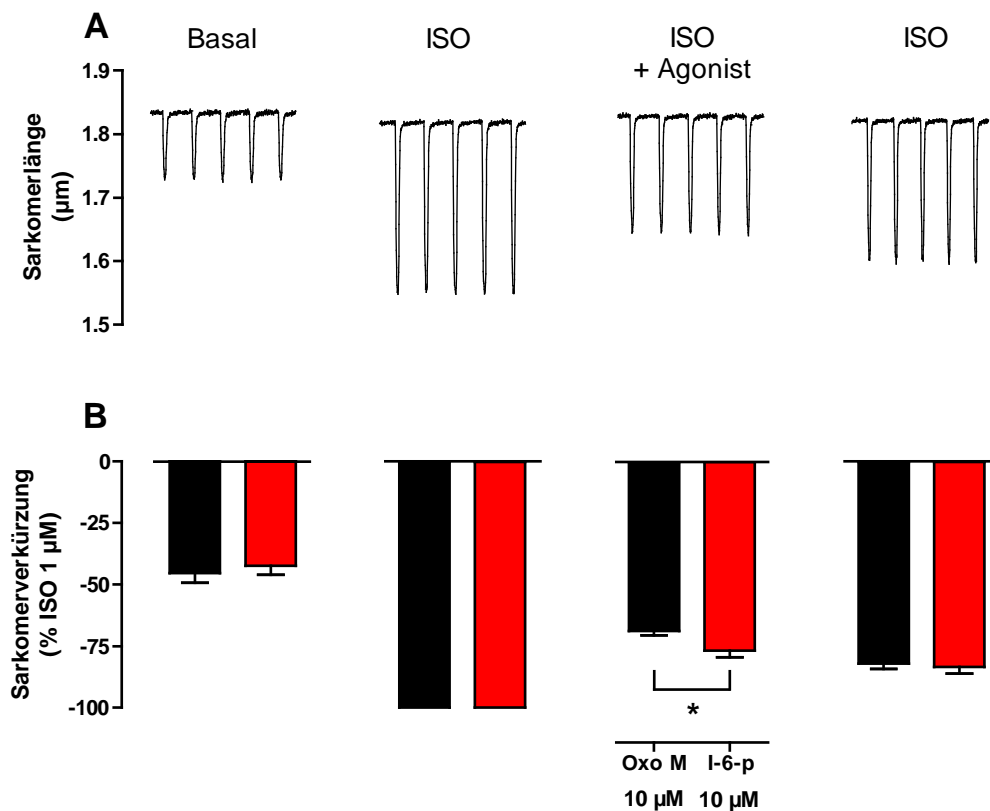


Abb. 4.38 Gegenüberstellung des negativ inotropen Effektes von Oxotremorin M und Iper-6-phth auf adulte ventrikuläre Kardiomyozyten. Dargestellt die Sarkomerverkürzung elektrisch stimulierter Kardiomyozyten (2 Hz, 36°C) unter Kontrollbedingungen (Basal), in Gegenwart von Isoprenalin (ISO) und nach Agonist-Zugabe (ISO + Agonist). **(A)** Repräsentative Originalregistrierungen von jeweils 5 Sarkomerverkürzungen im steady-state. **(B)** Sarkomerverkürzungen aller durchgeführten Versuche, welche auf die Verkürzung unter ISO normiert wurden. Oxotremorin M-Gruppe: schwarz, Iper-6-phth-Gruppe: rot; *Datenpunkte*: Mittelwerte \pm Standardfehler; $n = 17 - 21$; *Statistik*: Unverbundener t-Test, * $p < 0,05$

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass ebenfalls in primären Zellen nachgewiesen werden konnte, dass die intrinsische Aktivität des dualsterischen Liganden Iper-6-phth wesentlich vom intrazellulären cAMP-Gehalt abhängig ist.

5 Diskussion

5.1. Der muskarinische M₂-Rezeptor wird in allen Zellsystemen dominant exprimiert

Funktionelle Untersuchungen des muskarinischen M₂-Rezeptors wurden im Rahmen dieser Arbeit unter Verwendung verschiedener Expressionssysteme durchgeführt. Als rekombinantes Expressionssystem wurde die Flp-InTM-CHO-Zelllinie verwendet, die stabil mit dem humanen M₂-Rezeptor (CHO-hM₂) transfiziert wurde (Kebig A., 2010). Die humane Lungenfibroblasten-Zelllinie MRC-5 diente dagegen als natives Expressionssystem des M₂-Rezeptors. Isolierte Kardiomyozyten aus embryonalen (eCM) und adulten Mäuseherzen (aCM) stellten das primäre Expressionssystem dar. Die CHO-hM₂-Zellen exprimieren von den muskarinischen Rezeptoren ausschließlich den Subtyp M₂ (Peters L., 2010) und repräsentierten das reine M₂-Modell. Ob der M₂-Rezeptor ebenfalls in den gewählten nativen und primären Expressionssystemen dominant vertreten ist, wird im nachfolgenden Kapitel erörtert.

Humane Lungenfibroblasten (MRC-5)

MRC-5-Zellen exprimieren die mRNA für verschiedene muskarinische Rezeptorsubtypen (M₂ >> M₃ > M₄ >> M₅, kein M₁), die stärkste Expression zeigte jedoch der M₂-Rezeptor (Matthiesen et al., 2006; Haag et al., 2008). Die dominante Expression des M₂-Rezeptors auf Proteinebene wurde im Rahmen dieser Arbeit durch Bestimmung der Rezeptorkinetik und der allosterischen Bindungsstelle bestätigt (Kapitel 4.2.2).

Die Bestimmung der Dissoziationskinetik des orthosterischen Radioliganden [³H]NMS ergab einen monophasischen Dissoziationsverlauf mit einer Halbwertszeit von 5,2 ± 0,35 min, welche mit der des M₂-Rezeptors übereinstimmt (siehe Kapitel 4.2.2). Da im Gegensatz zum M₂-Rezeptor alle anderen muskarinischen Rezeptorsubtypen eine wesentlich langsamere Kinetik aufweisen (Ellis et al., 1991; Kaufel D, 2010), hätte die simultane Expression einer weiteren Rezeptorfraction in relevanter Menge einen biphasischen Dissoziationsverlauf bzw. bei monophasischer

Kurvenanpassung eine langsamere Halbwertszeit > 5 min ergeben müssen. Unter Einsatz des M_2 -prävalenten allosterischen Modulators W84 wurde die dominante Expression des M_2 -Rezeptors anschließend über die Affinität von W84 zur allosterischen Bindungsstelle des [3 H]NMS-besetzten Rezeptors bestätigt (siehe Kapitel 4.2.2). Die Affinität von W84 unterschied sich nicht zwischen MRC-5 und CHO-h M_2 , jedoch war sie zum M_3 -Rezeptor um den Faktor 100 geringer und demonstriert die dominante Expression des M_2 -Rezeptors in MRC-5. Dieser Affinitätsunterschied von W84 zwischen M_2 und M_3 wurde mittels Membranhomogenaten aus COS-7-Zellen bereits ebenso von Huang und Ellis (2007) detektiert.

Funktionelle Untersuchungen unter Verwendung des optischen Biosensors Epic[®] demonstrierten die Atropinsensitivität des Oxotremorin M-induzierten DMR-Signals, während der β -Blocker Propranolol das Signal nicht beeinflusste. Diese Ergebnisse bestätigten die Induzierung der dynamischen Massenumverteilung in MRC-5 durch die Aktivierung muskarinischer Rezeptoren (Kapitel 4.2.1). Nach Ausschaltung der inhibitorischen G-Proteine durch Vorbehandlung der Zellen mit PTX, konnte durch muskarinische Agonisten zudem keine Zellantwort mehr detektiert werden. Dieser Befund bestätigte die dominante Expression von $G_{i/o}$ -gekoppelten Rezeptoren (Kapitel 4.2.3.1).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass sich die von MRC-5 exprimierten Rezeptoren weder hinsichtlich der Rezeptorkinetik noch bezüglich der allosterischen Bindungsstelle zum muskarinischen M_2 -Rezeptor unterscheiden. Zudem resultiert das durch muskarinische Agonisten induzierte DMR-Signal einzig aus der Aktivierung inhibitorischer G-Proteine. Die Kombination funktioneller Experimente mit Radioligandbindungsuntersuchungen lässt folglich auf eine dominante Expression des M_2 -Rezeptors in MRC-5 schließen.

Murine Kardiomyozyten

Die Untersuchung des dominanten Rezeptorsubtyps erfolgte ebenfalls unter Einsatz des allosterischen Modulators W84, welcher zum M_2 -Rezeptor die höchste Affinität besitzt (Lüllmann et al., 1969). Die bestimmten Affinitäten von W84 zum [3 H]NMS-besetzten Rezeptor kardialer Membranhomogenate der Wildtyp-Mausstämme C57BL/6 und CD1 (Kapitel 4.3.1.2) unterschieden sich nicht signifikant von Membranhomogenaten aus CHO-h M_2 (Kapitel 4.2.1.2). Folglich kann auf eine dominante Expression des M_2 -Rezeptors in den Herzen der verwendeten Mausstämme geschlossen werden. Untersuchungen der mRNA mittels real-time RT-PCR zeigten bereits in der Vergangenheit, dass die Expression weiterer muskarinischer Subtypen in atrialem und ventrikulärem Gewebe von Wildtyp-Mäusen weniger als 1% der gesamten Rezeptorpopulation ausmacht (Kitazawa et al., 2009).

Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit von kardialem Gewebe muriner Embryonen, wurden keine Bindungsuntersuchungen mit embryonalem Gewebe durchgeführt. Die Identifikation des muskarinischen Rezeptorsubtyps, welcher den negativ chronotropen Effekt muskarinischer Agonisten vermittelt, erfolgte stattdessen unter Einsatz von W84. Eine Konzentration von 3 μ M führte zu einer Rechtsverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurve von Iperoxo um 0,8 Dekaden. Das Ausmaß der Wendepunktverschiebung und die daraus berechnete Affinität von W84 (pK_A) lag in den für den M_2 -Rezeptor publizierten Bereichen (Lüllmann et al., 1969; Maaß et al., 1995; Schmalenbach C., 2005; Kellershohn K., 2007). Diese Befunde bestätigten auf funktioneller Ebene den M_2 -vermittelten negativ chronotropen Effekt in murinen embryonalen atrialen Kardiomyozyten.

5.2. Die promiskuitive G-Proteinaktivierung des M₂-Rezeptors beschränkt sich auf das artifizielle Zellsystem

Neben der dominanten Aktivierung inhibitorische G-Proteine (Caulfield, 1993) besitzt der M₂-Rezeptor die Fähigkeit an weitere G-Proteine zu koppeln, was als promiskuitive G-Proteinaktivierung bezeichnet wird. Mit dem rekombinanten Expressionssystem (CHO-hM₂) wurde überprüft ob Oxotremorin M den M₂-Rezeptor in gleicher Weise zu aktivieren vermag wie der endogene Ligand Acetylcholin. Anschließend wurden Experimente unter Einsatz von Oxotremorin M mit den nativen (MRC-5) und primären Expressionssystemen (eCM und aCM) durchgeführt. Es sollte die Frage geklärt werden, ob sich die promiskuitive G-Proteinaktivierung allein auf artifizielle Zellsysteme beschränkt.

Flp-InTM-CHO-hM₂ (CHO-hM₂)

Der muskarinische Agonist Oxotremorin M induzierte in CHO-hM₂ unter Kontrollbedingungen ein positiv ausgerichtetes DMR-Signal mit einer charakteristischen Signalspitze (Abb. 4.1 A). Dieses DMR-Signal stellt in CHO-Zellen die Aktivierung inhibitorischer G-Proteine dar (Schröder et al., 2010). Die Wirksamkeit wurde weder durch die Maskierung des G_s-Signalwegs noch durch die Hemmung von G_{q/11}-Proteinen wesentlich beeinflusst (siehe Abb. 5.1). Dies bestätigt die M₂-vermittelte dominante Aktivierung inhibitorischer G-Proteine unter Kontrollbedingungen.

Nach Ausschaltung der inhibitorischen G-Proteine durch Pertussis Toxin (PTX) induzierte Oxotremorin M dagegen ein in den negativen Messbereich ausgerichtetes DMR-Signal, welches die Aktivierung stimulatorischer G-Proteine repräsentiert (Antony et al., 2009; Kebig A., 2010). Nach Hemmung der G_{i/o}-Proteine wies Oxotremorin M eine um den Faktor 30 geringere Wirksamkeit auf (Abb. 5.1 und Kapitel 4.1.1.2). Dieser Effekt auf die Wirksamkeit konnte bereits ebenso für andere muskarinische Agonisten beobachtet werden (Janßen N., 2012) und stimmt mit dem Wissen überein, dass der M₂-Rezeptor mit einer höheren Affinität an inhibitorische statt an stimulatorische G-Proteine koppelt (Michal et al., 2001; Mistry et al., 2005; Griffin et al., 2007). Der ausschlaggebende Nachweis für die M₂-vermittelte G_s-Aktivierung durch Oxotremorin M stellte jedoch die Zunahme des sekundären

Botenstoffs cAMP in PTX-behandelten Zellen dar (siehe Kapitel 4.1.2.2), welche eindeutig die M_2 -vermittelte Aktivierung stimulatorischer G-Proteine belegt. Die mittels cAMP-Messungen erhobene Wirksamkeit von Oxotremorin M ($pEC_{50\ cAMP}$: $5,70 \pm 0,03$) stimmte zudem gut mit den DMR-Messungen nach PTX-Vorbehandlung ($pEC_{50\ DMR}$: $5,84 \pm 0,19$) überein.

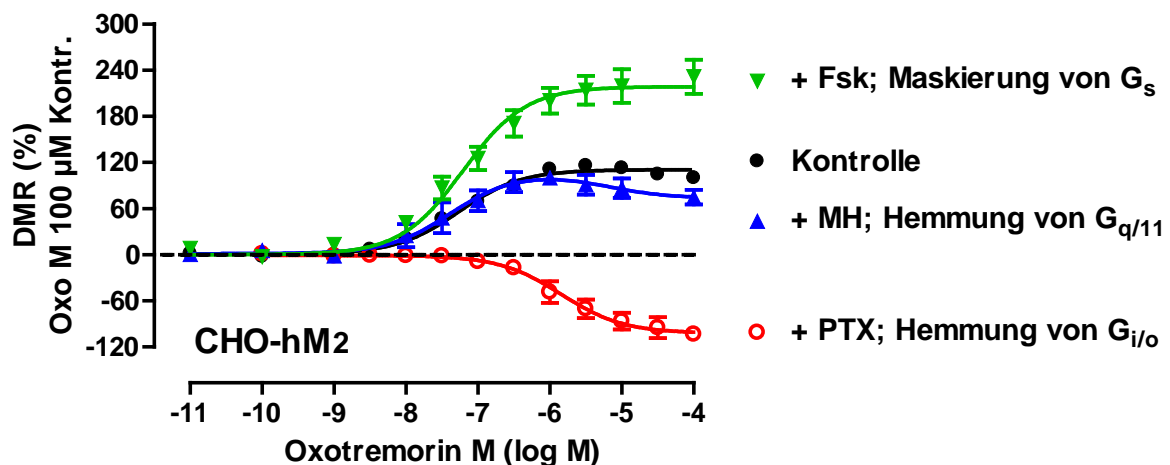


Abb. 5.1 Oxotremorin M-induzierte dynamische Massenumverteilung (DMR) in CHO-hM₂ nach Ausschaltung/Maskierung einzelner Signalwege. Die Konzentrations-Effekt-Kurven wurden jeweils auf den Effekt von Oxotremorin M 100 µM unter Kontrollbedingungen normiert und das untere Plateau wurde auf Null festgesetzt. *Datenpunkte:* Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 3 - 8$, Vierfachbestimmung; *Kurvenanpassung:* Vier-Parameter-logistische Gleichung bzw. 'bell-shaped curve'; Die Abbildung setzt sich zusammen aus Abb. 4.3 C, Abb. 4.4 C und Abb. 4.6.

Die Hemmung der $G_{q/11}$ -Proteine durch MH-362-63-08 (MH) reduzierte das Oxotremorin M-induzierte DMR-Signal bei Einsatz supramaximaler Konzentrationen (Abb. 4.4 A). Dies spricht für eine M_2 -vermittelte Aktivierung von $G_{q/11}$ -Proteinen unter Kontrollbedingungen in Gegenwart hoher Agonistkonzentrationen. MH induzierte selbst kein DMR-Signal in CHO-Zellen und ermöglichte zudem in CHO-hM₃ noch immer die Aktivierung inhibitorischer G-Proteine (Kapitel 4.1.1.3). Auf dem gegenwärtigen Erkenntnisstand kann folglich nicht davon ausgegangen werden, dass MH die Aktivierung von $G_{i/o}$ -Proteinen in CHO-Zellen beeinflusst. Interessant wäre die Untersuchung der Beeinflussung des DMR-Signals $G_{i/o}$ -selektiver Liganden, da deren Signalintensität in CHO-hM₂ nicht durch MH beeinflusst sein sollte. Nach MH-Vorbehandlung resultierte eine biphasische Konzentrations-Effekt-Kurve für Oxotremorin M (Abb. 5.1 und Kapitel 4.1.1.3). Der Wendepunkt des ansteigenden Schenkels (pEC_{50_1} : $7,38 \pm 0,22$) stimmte mit der Wirksamkeit von Oxotremorin M unter Kontrollbedingungen überein (pEC_{50} : $7,27 \pm 0,11$). Der Wendepunkt des abfallenden Schenkels (pEC_{50_2} : $5,23 \pm 0,87$) wies demgegenüber die gleiche

Wirksamkeit von Oxotremorin M nach PTX-Vorbehandlung auf (pEC_{50} : $5,84 \pm 0,19$). Während pEC_{50_1} vermutlich die Affinität zu $G_{i/o}$ -Proteinen darstellt, repräsentiert pEC_{50_2} höchswahrscheinlich die Affinität zu G_s -Proteinen. Anzumerken ist, dass in Abwesenheit von MH ebenfalls ein biphasischer Kurvenverlauf unter Kontrollbedingungen zu vermuten war, jedoch nicht mit einer biphasischen Funktion beschrieben werden konnte (siehe Kapitel 4.1.1.3). Die simultane Aktivierung von $G_{i/o}$ - und G_s -Proteinen durch hohe Agonistkonzentrationen wird folglich nicht durch die Hemmung von $G_{q/11}$ -Proteinen ermöglicht, sondern kann lediglich besser dargestellt werden. Dies resultiert aus der Gegebenheit, dass das positiv ausgerichtete $G_{q/11}$ -Signal entfällt und somit das negativ ausgerichtete G_s -Signal stärker hervortreten kann. Die simultane Aktivierung von $G_{i/o}$ - und G_s -Proteinen wird durch die Beobachtung bestätigt, dass nach Maskierung der G_s -Aktivierung kein bisphasier Kurvenverlauf der Konzentrations-Effektkurve mehr erkennbar ist (Abb. 4.6), wie es unter Kontrollbedingungen und nach $G_{q/11}$ -Hemmung der Fall war (Abb. 4.4 C).

Zur eindeutigen Überprüfung, ob der M_2 -Rezeptor ebenfalls in der Lage ist $G_{q/11}$ -Proteine zu aktivieren, ist die Bestimmung des sekundären Botenstoffes IP_3 bzw. dessen Abbauprodukt IP_1 geeignet. Die inhibitorischen G-Proteine sollten dafür jedoch ausgeschaltet sein, da über deren $\beta\gamma$ -Untereinheit ebenfalls die Phospholipase C aktiviert werden kann (Boyer et al., 1994; Exton, 1997). Diese Untersuchungen wurden im Arbeitskreis jedoch bereits durchgeführt und bestätigen die Möglichkeit der M_2 -vermittelten Aktivierung von $G_{q/11}$ -Proteinen in CHO-Zellen (Lena Vogel, mündliche Mitteilung).

Nach Maskierung des G_s -Signalweges durch Vorbehandlung der Zellen mit Forskolin verdoppelte sich die Intensität des Oxotremorin M-induzierten DMR-Signals, beeinflusste jedoch nicht die Wirksamkeit (siehe Abb. 5.1). Die Verdopplung des DMR-Signals könnte sich aus der Tatsache ergeben, dass das Forskolin-Signal in den negativen DMR-Bereich ausgerichtet ist und sich somit das Messfenster für das $G_{i/o}$ -Signal aufweitet. Es ist jedoch auch eine verstärkte Aktivierung inhibitorischer G-Proteine vorstellbar, welche von Bouvier und Kollegen unter erhöhten intrazellulären cAMP-Gehalten beschrieben ist (Stefan et al., 2011). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt kann nicht zweifelsfrei gesagt werden, welcher Effekt die Signalzunahme bestimmt oder ob evtl. beide Effekte gleichermaßen beteiligt sind.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der M_2 -Rezeptor in CHO-Zellen unter Kontrollbedingungen in Gegenwart hoher Agonistkonzentrationen simultan an mindestens drei verschiedene G-Proteinklassen ($G_{i/o}$, G_s und $G_{q/11}$) koppeln kann, jedoch die Aktivierung inhibitorischer G-Proteine dominiert. Oxotremorin M unterschied sich hinsichtlich der Fähigkeit den M_2 -Rezeptor zu aktivieren nicht von dem endogenen Liganden Acetylcholin und konnte folglich in allen Versuchen ohne Bedenken als Referenzligand eingesetzt werden.

Humane Lungenfibroblasten (MRC-5)

Zur Hemmung der inhibitorischen G-Proteine in humaner Lungenfibroblasten wurden die Zellen mit Pertussis-Toxin vorbehandelt. Anschließend konnte auch durch hohe Agonistkonzentrationen von Oxotremorin M (100 μ M) keine dynamische Massenumverteilung mehr induziert werden (siehe Abb. 5.2). cAMP-Messungen bestätigten die mittels DMR-Messung erhobenen Befunde und ließen auf einen rein $G_{i/o}$ -gekoppelten M_2 -Rezeptor in MRC-5 schließen (siehe Kapitel 4.2.3.2). Umso überraschender war die Reduzierung des Oxotremorin M-induzierten DMR-Signals nach Inhibition der $G_{q/11}$ -Proteine (siehe Abb. 5.2 und Kapitel 4.2.3.3). Da nach Hemmung der $G_{i/o}$ -Proteine kein DMR-Signal mehr ausgelöst werden konnte, ist im vorliegenden Fall eine $G_{i/o}$ -abhängige Aktivierung von $G_{q/11}$ -Proteinen vorstellbar. Dies würde bedeuten, dass $G_{q/11}$ -Proteine nur aktiviert werden können, wenn $G_{i/o}$ -Proteine ebenfalls aktivierbar sind. Interessanterweise konnte jedoch keine Wendepunktverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurve nach MH-Vorbehandlung detektiert werden (Oxo M; pEC_{50} Kontrolle: $6,29 \pm 0,09$, $pEC_{50} +MH$: $6,03 \pm 0,37$). Dies wäre zu erwarten gewesen, wenn $G_{i/o}$ - und $G_{q/11}$ -Proteine simultan aktiviert werden, da verschiedene G-Proteinklassen erfahrungsgemäß unterschiedliche Affinitäten zum M_2 -Rezeptor aufweisen ($G_{i/o} > G_s > G_{q/11}$; Michal et al., 2001; Griffin et al., 2002; Mistry et al., 2005; Nelson et al., 2006; Michal et al., 2007; Griffin et al., 2007).

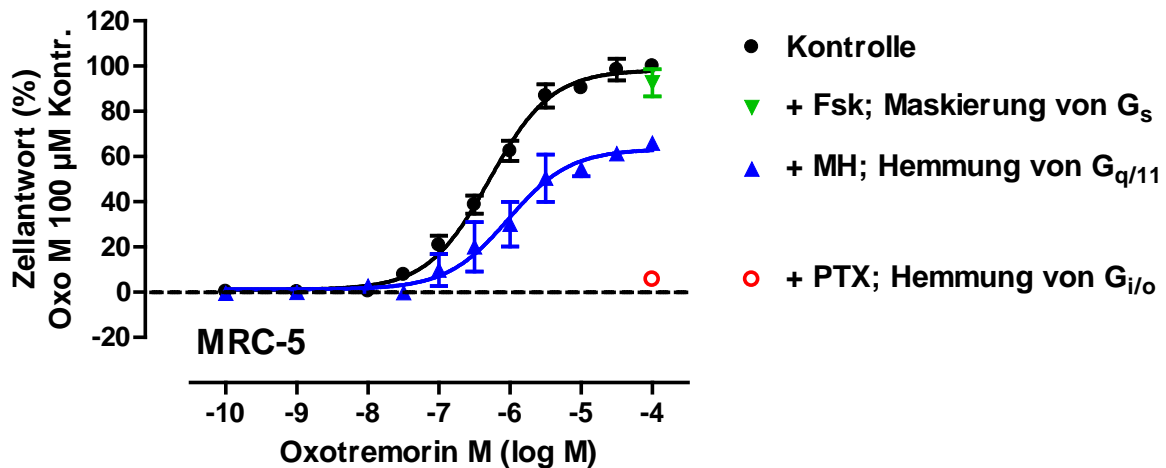


Abb. 5.2 Oxotremorin M-induzierte dynamische Massenumverteilung (DMR) in MRC-5 nach Ausschaltung/Maskierung einzelner Signalwege. Die Datenpunkte wurden jeweils auf den Effekt von Oxotremorin M 100 μ M unter Kontrollbedingungen normiert und das untere Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven wurde auf Null festgesetzt. *Kurvenanpassung:* Vier-Parameter-logistische Gleichung; *Datenpunkte:* Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 3 - 8$, Vierfachbestimmung

Die Aufklärung einer $G_{i/o}$ -abhängigen $G_{q/11}$ -Aktivierung über die Bestimmung sekundärer Botenstoffe des $G_{q/11}$ -Signalweges (IP_3 , DAG) könnte sich als problematisch erweisen, da ebenfalls über die $\beta\gamma$ -Untereinheit inhibitorischer G-Proteine die Phospholipase C aktiviert werden kann (Boyer et al., 1994; Exton, 1997). Erfolgversprechender könnten dagegen auf FRET und BRET basierende Messmethoden zur Detektion der G-Proteinaktivierung sein (Gales et al., 2006; Saulière et al., 2012). Eine weitere Erklärung für die erhobenen Befunde ist die Möglichkeit, dass MH nicht ausschließlich $G_{q/11}$ -Proteine hemmt, sondern ebenfalls G-Proteine der $G_{i/o}$ -Familie betroffen sind. Wären beispielsweise G_i -Proteine durch MH gehemmt, während G_o -Proteine noch aktivierbar sind, sollte sich dies nur auf die intrinsische Aktivität der Agonisten auswirken, nicht aber die Wirksamkeit beeinflussen (Uustare et al., 2004). Desweiteren könnte MH die Aktivierung des Rezeptors durch Interaktionen mit der orthosterischen Bindungsstelle beeinflussen oder auch Einfluss auf die Rezeptorexpression ausüben, was beispielsweise durch Radioligand-Bindungsexperimente weiter aufgeklärt werden könnte. Auffällig war ebenfalls der Befund, dass nach MH-Vorbehandlung kein DMR-Signal mehr durch den Partialagonisten Pilocarpin induzierbar war und weitere muskarinische Agonisten ebenfalls in ihrer Signalstärke reduziert waren (siehe Kapitel 9.1.5). Es hat den Anschein, dass sich das Messfenster durch MH verkleinert und schwache Agonistsignale nur noch schwer oder gar nicht mehr detektierbar sind. Da es möglich sein könnte, dass sich der beobachtete Effekt auf die Analyse mit dem optischen

Biosensor beschränkt, andere Methoden jedoch unbeeinflusst sind, wäre die Durchführung weiterer funktioneller Experimente in An- und Abwesenheit von MH von Interesse. So könnten [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimente, mit denen dominant die Aktivierung inhibitorischer G-Proteine detektiert wird (Milligan, 2003), möglicherweise aufdecken, ob eine Beeinflussung der M₂-vermittelten G_{i/o}-Aktivierung durch MH vorliegt. Es sind folglich noch weitere Untersuchungen zur Wirkungsweise des G_{q/11}-Inhibitors notwendig, um die an MRC-5-Zellen erhobenen Daten vollständig erklären zu können.

Interessanterweise führte die Maskierung des G_s-Signalweges durch Forskolin nicht zu einer Vergrößerung des Agonist-induzierten DMR-Signals (Kapitel 4.2.3.4) wie es bei CHO-hM₂ der Fall war. Die Bestimmung des basalen cAMP-Gehaltes ergab allerdings einen um den Faktor 13 höheren cAMP-Gehalt im Gegensatz zu CHO-hM₂ (79 ± 14 vs. 6 ± 2 pmol/mg Protein; Kapitel 4.2.4). Aufgrund des bereits hohen basalen cAMP-Gehaltes ist durch Forskolin vermutlich keine weitere Steigerung der G_{i/o}-vermittelten Zellantwort möglich. Der hohe cAMP-Gehalt der humanen Lungenfibroblasten ist zudem vermutlich für das kleine Messfenster des negativen DMR-Bereichs in diesen Zellen mit verantwortlich (siehe Abb. 4.14).

Darüber hinaus könnte der hohe basale cAMP-Gehalt eine Erklärung für die fehlende Aktivierung stimulatorischer G-Proteine sein. So zeigten beispielsweise im Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. E. Kostenis (Institut für Pharmazeutische Biologie, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Bonn) mit dem M₂-Rezeptor transfizierte COS-7-Zellen keine M₂-vermittelte G_s-Aktivierung nach PTX-Vorbehandlung. COS-7-Zellen wiesen ebenfalls wie MRC-5-Zellen einen hohen basalen cAMP-Gehalt auf (Frau Prof. Dr. E. Kostenis, mündliche Mitteilung), welcher der Aktivierung stimulatorischer G-Proteine trotz Rezeptorüberexpression in COS-7-Zellen vermutlich entgegenwirkt.

Murine Kardiomyozyten

Muskarinische Agonisten reduzierten die spontane Schlagfrequenz muriner embryonaler atrialer Kardiomyozyten (eCM), was bezeichnend für die Aktivierung $G_{i/o}$ -gekoppelter muskarinischer M_2 -Rezeptoren ist (Gomez et al., 1999). Zur Untersuchung der promiskuitiven G-Proteinaktivierung wurden die muskarinischen Agonisten Oxotremorin M und Iperoxo ausgewählt, deren Fähigkeit G_s -Proteine zu aktivieren zuvor in CHO-h M_2 geprüft wurde (siehe Kapitel 4.1.2). Beide Agonisten führten unter Kontrollbedingungen in eCM zu einem kompletten Erliegen der spontanen Schlagfrequenz (siehe Abb. 5.3). Die Reversibilität des negativ chronotropen Effektes nach Auswaschen zeigte, dass der Effekt einzig durch die muskarinischen Agonisten vermittelt wird (siehe Tab. 4.21).

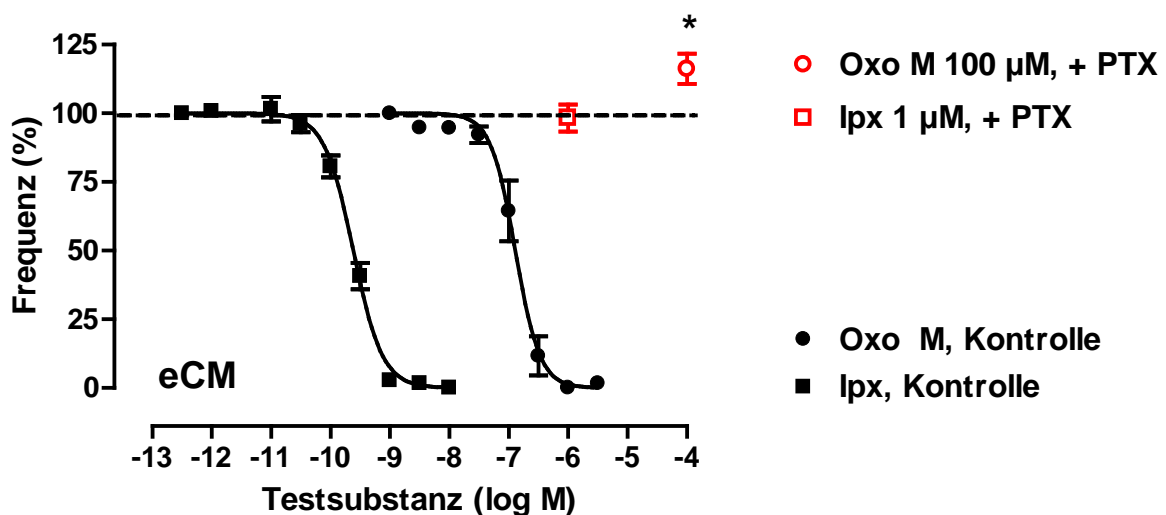


Abb. 5.3 Auswirkung von Oxotremorin M und Iperoxo auf die spontane Schlagfrequenz muriner atrialer Kardiomyozyten (eCM). Darstellung der Effekte unter Kontrollbedingungen und nach PTX-Vorbehandlung. Der Effekt der muskarinischen Agonisten wurde immer auf die Ausgangsfrequenz einer jeden untersuchten Zelle normiert. *Kurvenanpassung*: Vier-Parameter-logistische Gleichung; *Statistik*: Unverbundener t-Test (* $p < 0,05$)

Während die Aktivierung inhibitorischer G-Proteine unter Kontrollbedingungen zu einer Reduzierung der Schlagfrequenz führte, konnte nach PTX-Vorbehandlung im Fall von Oxotremorin M ein positiv chronotroper Effekt detektiert werden (siehe Abb. 5.3). Dieser Befund ließ anfänglich vermuten, dass der kardiale M_2 -Rezeptor nach Ausschaltung inhibitorischer G-Proteine in der Lage ist, stimulatorische G-Proteine zu aktivieren. Es konnte jedoch keine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Gehaltes detektiert werden (Kapitel 4.3.4.2). Zudem war der positiv chronotrope Effekt unter Einsatz von Iperoxo nicht reproduzierbar (siehe Abb. 5.3). Aufgrund der

Kompartimentierung von Kardiomyozyten (Iancu et al., 2008) könnte dennoch einen cAMP-Anstieg in "strategisch relevanten" Zellbereichen möglich sein. So ist es vorstellbar, dass sich der cAMP-Gehalt in einzelnen kleinen Kompartimenten verändert, der cAMP-Gehalt der gesamten Zelle jedoch nicht signifikant beeinflusst wird. Diese Theorie erklärt jedoch nicht den fehlenden positiv chronotropen Effekt bei den Messungen unter Einsatz von Iperoxo. Interessanterweise deuten Untersuchungen von Kitazawa et al. (2009) an isolierten Atrien PTX-behandelter Wildtyp-Mäuse in Gegenwart supramaximaler Carbacholkonzentrationen ebenfalls auf einen positiv chronotropen Effekt hin. Dieser Effekt war allerdings statistisch nicht signifikant. Der eventuell positiv chronotrope Effekt trat immer bei hohen molaren Stoffkonzentrationen ($\geq 30 \mu\text{M}$) auf und war ebenfalls bei M_2 -KO-Mäusen zu beobachten (Kitazawa et al., 2009). Dies legt nahe, dass es sich bei der beobachteten Frequenzerhöhung in unserem Fall um einen unspezifischen Effekt handeln könnte. Anzumerken ist zudem, dass das Messfenster in den positiven Frequenzbereich stark begrenzt ist. Selbst eine Kombination aus Isoprenalin und IBMX führte nur zu einer Frequenzsteigerung um 21% (siehe Kapitel 4.3.5.1). Aufgrund des kleinen Messfensters ist die Untersuchung einer M_2 -vermittelten G_s -Aktivierung in diesem System ohnehin schwer.

Die in CHO-h M_2 -Zellen nachgewiesene promiskuitive G-Proteinaktivierung konnte unter Einsatz physiologisch relevanter Zellen folglich nicht bestätigt werden, schließt diese Möglichkeit jedoch ebenfalls nicht aus.

5.3. Das Ausmaß der Kopplungseffizienz bestimmt die promiskuitive G-Proteinaktivierung in CHO-hM₂

Alle untersuchten muskarinischen Agonisten induzierten unter Kontrollbedingungen in CHO-hM₂ ein typisches G_{i/o}-vermitteltes DMR-Signal von ähnlicher Intensität. Nach Vorbehandlung der Zellen mit PTX induzierten Iperoxo und Oxotremorin M dagegen ein in den negativen DMR-Bereich ausgerichtetes Signal, während Pilocarpin und die dualsterischen Liganden keine bzw. nur eine reduzierte Zellantwort induzierten (siehe Abb. 5.4).

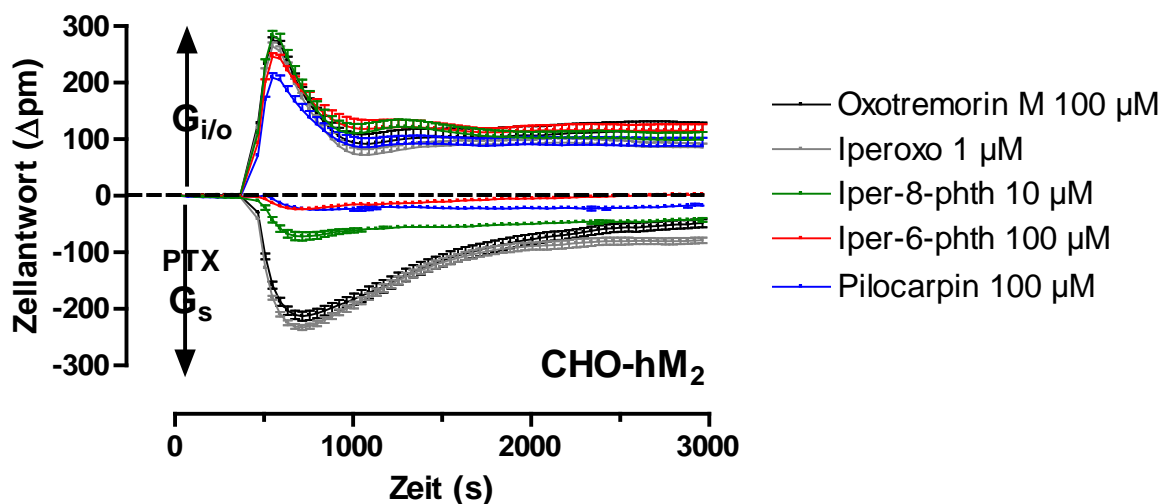


Abb. 5.4 Vergleich der G_{i/o}- und G_s-Aktivierung orthosterischer und dualsterischer muskarinischer Agonisten. Dargestellt sind repräsentative DMR-Originalregistrierungen unter Kontrollbedingungen und nach PTX-Vorbehandlung (100 ng/ml, > 12 h). Alle muskarinischen Agonisten induzieren unter Kontrollbedingungen in CHO-hM₂ positiv ausgerichtete DMR-Signale mit einer charakteristischen Signalspitze, welche die Aktivierung von G_{i/o}-Proteinen repräsentieren. Nach Ausschaltung der inhibitorischen G-Proteine resultierten negativ ausgerichtete DMR-Signale, welche charakteristisch für die Aktivierung von G_s-Proteinen sind. Die Abbildung setzt sich zusammen aus Abb. 4.7 und den entsprechenden Messungen unter Kontrollbedingungen. *Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler, Vierfachbestimmung

Das negativ ausgerichtete DMR-Signal stellt die Aktivierung stimulatorischer G-Proteine dar. Diese Beobachtung auf der Ebene der dynamischen Massenumverteilung wurde anschließend durch Bestimmung des sekundären Botenstoffs cAMP bestätigt (siehe Kapitel 4.1.2.2). Tiefergreifendere Untersuchungen von Bock et al. (2012) ergaben zudem, dass sich die reduzierte intrinsische Aktivität der dualsterischen Liganden nicht nur auf die Aktivierung stimulatorischer G-Proteine beschränkt, sondern ebenfalls weitere Signalwege wie die β -Arrestin-Rekrutierung und die Aktivierung von ERK1/2 betreffen.

Da die Detektion der dynamischen Massenumverteilung unter Kontrollbedingungen aufgrund der hohen Rezeptorreserve im System keine Unterscheidung hinsichtlich des Voll- und Partialagonismus erlaubte, wurden unter Anwendung des 'operational model of agonism' nach Black und Leff (1983) die Kopplungseffizienzen (τ , τ) der untersuchten Agonisten berechnet (siehe Kapitel 3.11). Die Kopplungseffizienz stellt den Kehrwert der Rezeptorzahl dar, welche benötigt wird, um einen halbmaximalen Effekt zu induzieren (Black und Leff, 1983). Im Fall eines τ -Wertes von 10 müssen folglich 1/10 der Rezeptoren besetzt werden, um einen halbmaximalen Effekt zu induzieren. Zusätzlich lässt sich das Ausmaß der Rezeptorreserve für die jeweiligen Agonisten bereits durch den Vergleich von Wirksamkeit (EC_{50}) und Affinität (K_i) einschätzen. Je mehr die Wirksamkeit die Bindungsaffinität übertrifft, umso stärker ist die vorhandene Rezeptorreserve für den untersuchten Agonisten (Katzung et al., 2011). Da sich Wirksamkeit und Affinität bei allen muskarinischen Agonisten signifikant voneinander unterscheiden (siehe Abb. 5.5), verfügen alle Liganden über eine Rezeptorreserve und müssen folglich nur einen Bruchteil der Rezeptoren zur Induktion eines vollagonistischen Effektes aktivieren.

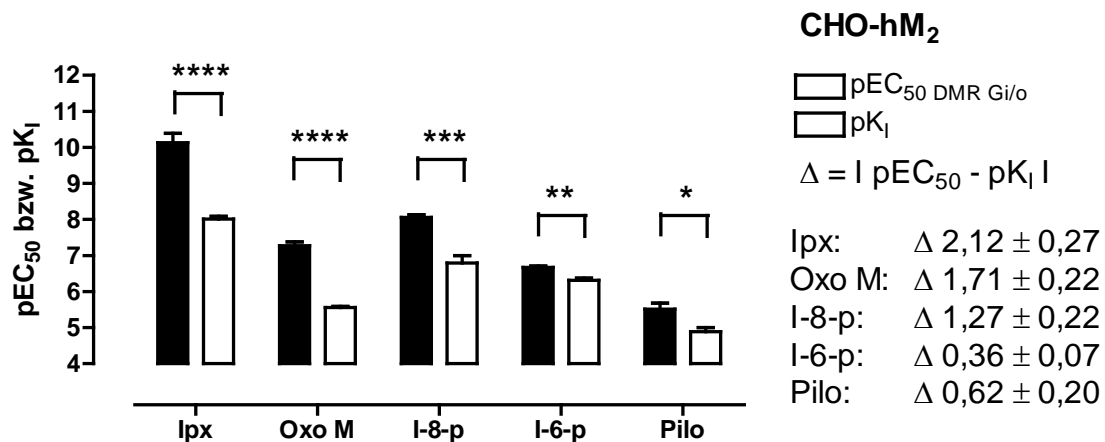


Abb. 5.5 Vergleich der Wirksamkeit (EC_{50}) und Affinität (K_i) eingesetzter muskarinischer Agonisten. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung; $n = 3 - 8$. pEC_{50} : Negativer dekadischer Logarithmus der Wirksamkeit; pK_i : Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten; Statistik: Unverbundener t-Test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). Der pK_i von I-8-p kommt von Bock et al. (2012).

Im Gegensatz zu Oxotremorin M, welcher eine vergleichbare Kopplungseffizienz wie der endogene Ligand Acetylcholin besitzt (Schrage et al., 2012), wiesen Pilocarpin und Iper-6-phth eine reduzierte Kopplungseffizienz auf (Tab. 5.1). Dies spiegelt sich ebenfalls in der geringen Differenz zwischen Affinität und Wirksamkeit im Fall von Pilocarpin und Iper-6-phth wieder (siehe Abb. 5.5). Die Verlängerung der

Kohlenwasserstoffkette des dualsterischen Liganden Iper-6-phth zu Iper-8-phth erhöhte schließlich die Kopplungseffizienz, welche jedoch noch immer geringer ist als die von Oxotremorin M (unverbundener t-Test; $p < 0,05$). Neben der erhöhten Aktivierbarkeit inhibitorischer G-Proteine ermöglichte der dualsterische Ligand Iper-8-phth zudem wieder die partielle Aktivierung stimulatorischer G-Proteine.

DMR	Iperoxo	Oxo M	Iper-8-phth	Iper-6-phth	Pilocarpin
Log τ ($G_{i/o}$)	2,15 \pm 0,12**	1,65 \pm 0,05	1,38 \pm 0,05	0,54 \pm 0,05**	0,67 \pm 0,08**

Tab. 5.1 Kopplungseffizienz muskarinischer Agonisten auf dem $G_{i/o}$ -Signalweg in CHO-hM₂. Aufgelistet sind die logarithmierten Kopplungseffizienzen zur Aktivierung inhibitorischer G-Proteine (log τ); Mittelwerte \pm Standardfehler; n = 3 – 8; *Statistik*: ANOVA, Dunett's post-Test gegen Oxotremorin M (Oxo M) (** $p < 0,01$).

Die Betrachtung der Kopplungseffizienzen muskarinischer Liganden unter Kontrollbedingungen (Ipx > Oxo M, ACh > I-8-p > I-6-p, Pilo) in Kombination mit ihrer Fähigkeit G_s -Proteine zu aktivieren verdeutlicht, dass ein Agonist ein bestimmtes Potential hinsichtlich der Aktivierung inhibitorischer G-Proteine aufbringen muss, bevor zusätzlich stimulatorische G-Proteine aktiviert werden.

5.4. Der zelluläre Kontext beeinflusst die intrinsische Aktivität (E_{max}) und die Wirksamkeit (EC_{50}) muskarinischer Agonisten

Der zelluläre Kontext übt einen starken Einfluss auf die intrinsische Aktivität und die Wirksamkeit muskarinischer Agonisten aus, während die Bindungseigenschaften dieser Liganden zum M_2 -Rezeptor unbeeinflusst bleiben. Dies konnte anhand der Untersuchung verschiedener M_2 -Expressionssysteme eindeutig dargestellt werden (siehe Kapitel 4.1.4 und 4.2.6).

Flp-InTM-CHO-hM₂ (CHO-hM₂)

Wie bereits in Kapitel 5.3 aufgeführt, induzierten alle muskarinische Agonisten unter Kontrollbedingungen in CHO-hM₂ ein DMR-Signal von gleicher Intensität, während sich die Wirksamkeiten der Liganden unterschieden (Ipx > I-8-p > Oxo M, I-6-p > Pilo; Tab. 4.5). Zur Aufweitung des Messfensters in CHO-hM₂ wurden die Zellen vor Agonistzugabe mit Forskolin vorstimuliert, was zu einer Zunahme der Agonist-induzierten DMR-Signale führte (siehe Kapitel 4.1.3). Es konnte zudem eine Auffächerung der Signale beobachtet werden. Während sich die DMR-Signalintensität für die orthosterischen Agonisten Oxotremorin M und Iperoxo verdoppelte, war die Signalzunahme bei den dualsterischen Liganden schwächer ausgeprägt und im Fall von Pilocarpin gar nicht vorhanden. Ein verändertes Bindungsverhalten konnte als Ursache des beobachteten Effektes ausgeschlossen werden, jedoch bewirkte die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Gehaltes eine Reduzierung membranständiger Rezeptoren (siehe Kapitel 4.1.4). Forskolin induzierte in CHO-hM₂ eine Rezeptorinternalisierung um ca. 15 %, wie es im gleichen Ausmaß bereits für den M_1 -Rezeptor beschrieben wurde (Moro et al., 1993). Das Ausmaß der Forskolin-induzierten Internalisierung war jedoch wesentlich geringer als es beispielsweise für die Agonist-induzierte Internalisierung über G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs) beschrieben ist, welche bis zu 80% betragen kann (Moro et al., 1993; Pals-Rylaarsdam and Hosey, 1997; May et al., 2004; Gregory et al., 2012). Die Ursache der detektierten Internalisierung könnte ein PKA-induzierter Effekt zu sein, da die PKA über die Forskolin-induzierte cAMP-Erhöhung aktiviert wird und an Desensibilisierungsprozessen beteiligt ist (Kohout and

Lefkowitz, 2002). Untersuchungen zufolge ist die PKA jedoch nicht relevant für die Internalisierung von Rezeptoren (Lohse, 1993; Moro et al., 1993). Demgegenüber existieren mittlerweile Berichte über eine PKA-induzierte Phosphorylierung von GRKs, wodurch ebenfalls die Rezeptorinternalisierung beeinflusst wird (Cong et al., 2001). Es wäre interessant zu überprüfen, ob es sich bei der detektierten Internalisierung des M_2 -Rezeptors um einen PKA-abhängigen Mechanismus handelt, was durch Vorbehandlung der Zellen mit einem PKA-Inhibitor überprüft werden könnte.

Die Auffächerung der DMR-Signale muskarinischer Agonisten hinsichtlich ihrer intrinsischen Aktivität (Kapitel 4.1.3) wird vermutlich durch eine Sensibilisierung und Verstärkung des $G_{i/o}$ -Aktivierung unter erhöhten cAMP-Gehalten verursacht, wie sie von Stefan et al. (2011) beschrieben ist. Die regulatorische Untereinheit der durch cAMP aktivierten PKA interagiert mit inhibitorischen G-Proteinen und führt sowohl zu einer Verstärkung der $G\alpha_i$ - wie auch der $\beta\gamma$ -vermittelten Signalwege. Dieser Effekt ist vermutlich bei muskarinischen Vollagonisten stärker ausgeprägt als beispielsweise im Fall von Pilocarpin und ermöglicht folglich eine Unterscheidung zwischen Voll- und Partialagonisten.

Es wäre ebenfalls denkbar, dass die Forskolin-induzierte Rezeptorinternalisierung die Rezeptorreserve im Fall von Pilocarpin und Iper-6-phth eliminiert, wodurch der Partialagonismus beider Liganden sichtbar wird. Diese Hypothese ist jedoch als unwahrscheinlich anzusehen, da trotz starker Schwankungen der membranständigen Rezeptorzahl (60 000 bis 200 000 Rezeptoren/Zelle), welche ein Ausmaß um 15% bei weitem überschritt, stets ein vollagonistischer Effekt aller muskarinischen Agonisten detektierbar war. Zwar ist es möglich den Partialagonismus über eine Reduzierung der vorhandenen Rezeptorreserve darzustellen, jedoch wäre dafür vermutlich eine Reduzierung um 15% nicht ausreichend. Um eine genauere Aussage treffen zu können, müssten jedoch funktionelle Experimente unter Einsatz irreversibler Rezeptoralkylantien durchgeführt werden, sowie die jeweilige Bestimmung der membranständigen Rezeptorzahl.

Humane Lungenfibroblasten (MRC-5)

In MRC-5 konnten deutliche Unterschiede hinsichtlich der intrinsischen Aktivität der muskarinischen Agonisten detektiert werden (Ipx, Oxo M > I-8-p > I-6-p, Pilo; Tab. 4.15), wie es ebenfalls in CHO-hM₂ nach Forskolin-Vorstimulation möglich war (siehe Kapitel 4.1.3). Diese Unterschiede könnten allein durch den hohen basalen intrazellulären cAMP-Gehalt der MRC-5-Zellen verursacht werden, welcher um den Faktor 13 höher war als in CHO-Zellen (siehe Kapitel 4.2.4). Neben der intrinsischen Aktivität war ebenfalls die Wirksamkeit der Liganden beeinflusst, welche im Vergleich zu CHO-hM₂ parallel zu höheren Konzentrationen verschoben sind (vergleiche Tab. 4.5 und Tab. 4.15). Die Parallelverschiebung war bei den orthosterischen Vollagonisten Oxotremorin M und Iperoxo sowie dem dualsterischen Agonisten Iper-8-phth am stärksten ausgeprägt und ergibt sich vermutlich aus der geringeren Rezeptorreserve in MRC-5 verglichen mit CHO-hM₂. Da im Fall der dualsterischen Agonisten (Iper-6-phth, Iper-8-phth) und Pilocarpin in MRC-5-Zellen die Wirksamkeit der Affinität entspricht ($pEC_{50} = pK_i$; siehe Abb. 5.6), kann davon ausgegangen werden, dass für diese Liganden in diesen Zellen keine Rezeptorreserve existiert. Der detektierte Maximaleffekt dieser Agonisten stellt somit allein deren intrinsische Aktivität dar, was sich ebenfalls in der Kopplungseffizienz widerspiegelt (siehe Kapitel 9.1.5). Diese lieferte jedoch aufgrund des sichtbaren Partialagonismus keine zusätzliche Information für die Dateninterpretation.

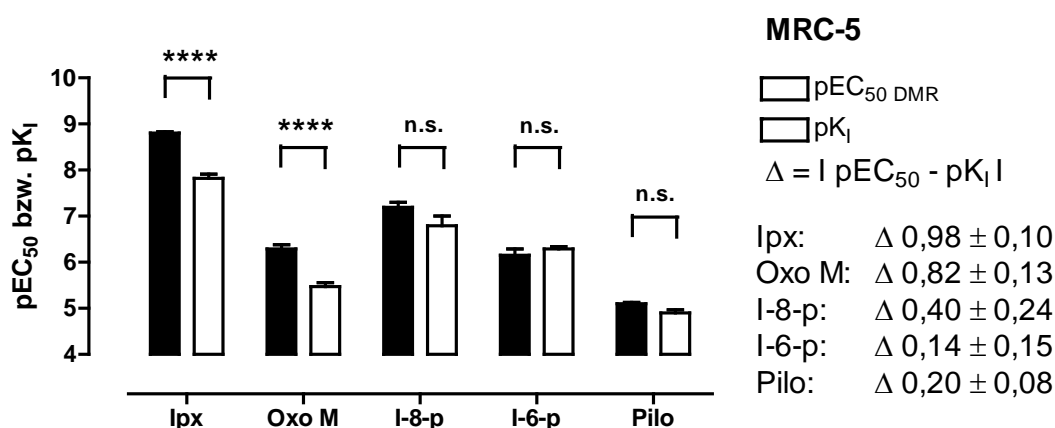


Abb. 5.6 Vergleich der Wirksamkeit (EC₅₀) und Affinität (K_i) eingesetzter muskarinischer Agonisten. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung; n = 3 - 9. pEC_{50} : Negativer dekadischer Logarithmus der Wirksamkeit; pK_i : Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten; *Statistik*: Unverbundener t-Test (**** $p < 0,0001$; n.s. $p > 0,05$); Der pK_i von I-8-p kommt von Bock et al. (2012).

Der beobachtete Unterschied in der intrinsischen Aktivität der Agonisten kann folglich aus der fehlenden Rezeptorreserve heraus resultieren sowie aus der Tatsache, dass der intrazelluläre cAMP-Gehalt erhöht ist. Wahrscheinlich spielen beide Effekte eine Rolle, und es kann momentan noch nicht gesagt werden, welcher Effekt dominiert. Es wäre interessant zu überprüfen, ob eine Verringerung des intrazellulären cAMP-Gehaltes zu einer relativen Zunahme der intrinsischen Aktivität von Pilocarpin und den dualsterischen Liganden führen würde. Phosphodiesterase-Aktivatoren sind jedoch nicht käuflich erwerblich und die Microinjektion aufgereinigter Phosphodiesterasen ist in unserem Fall jedoch praktisch nicht durchführbar. Möglich wäre jedoch evtl. der Einsatz eines Hemmers der Adenylyzyklase. Sofern der basale cAMP-Gehalt in MRC-5 in einem nennenswerten Ausmaß durch die Aktivität der Adenylyzyklase verursacht wird, sollte deren Hemmung einen Abfall des basalen cAMP-Gehaltes zur Folge haben.

Murine Kardiomyozyten

Die Testung der muskarinischen Agonisten hinsichtlich ihrer Wirksamkeit und der intrinsischen Aktivität erfolgte mit den spontan schlagenden atrialen Kardiomyozyten (eCM), welche aus murinen Embryonen gewonnen wurden (Mausstamm CD1; E 14,5 - 16,5). Ausgenommen von Pilocarpin wiesen alle muskarinische Agonisten eine volle intrinsische Aktivität auf und zeichneten sich durch steile Konzentrations-Effekt-Kurven aus ($n_H < -1$; siehe Abb. 4.32), was auf die Existenz einer Rezeptorreserve hinweist (Ehlert et al., 1999). Die Wirksamkeiten befanden sich in gleichen Konzentrationsbereichen wie im Fall von CHO-hM₂ (siehe Abb. 5.7).

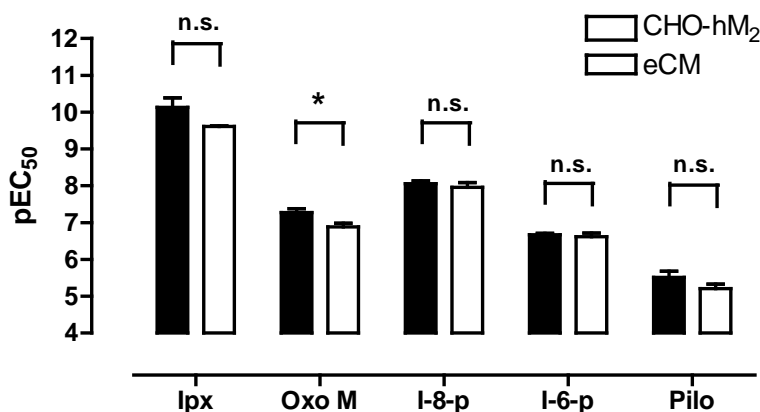


Abb. 5.7 Vergleich der Wirksamkeiten zwischen CHO-hM₂ und eCM. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n = 2 - 8$. pEC_{50} : Negativer dekadischer Logarithmus der Wirksamkeit; Statistik: Unverbundener t -Test (* $p = 0,048$; n.s. $p > 0,05$)

Zwar wurden nicht alle Liganden hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften zum murinen M₂-Rezeptor hin untersucht, jedoch wiesen die Bindungseigenschaft bislang keine Abhängigkeit vom Expressionssystem auf und auch speziesabhängige Unterschiede konnten nicht detektiert werden. Folglich ist davon auszugehen, dass die Differenz zwischen Wirksamkeit und Affinität im primären System ähnliche Ausmaße aufweist wie in CHO-hM₂. Die existierende Rezeptorreserve sollte in beiden Systemen folglich ähnlich sein und erklärt die starke intrinsische Aktivität der getesteten Agonisten im primären Expressionssystem.

5.5. Primäre hoch-cAMP-Systeme sind weniger empfindlich gegenüber dualsterischen Agonisten – Befunde aus *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten

Die dualsterischen Liganden wiesen im Vergleich zum orthosterischen Vollagonisten Oxotremorin M hinsichtlich ihrer intrinsischen Aktivität eine starke Abhängigkeit vom intrazellulären cAMP-Gehalt auf. Wurde der intrazelluläre cAMP-Gehalt in CHO-hM₂ erhöht, so äußerte sich dies in einem Partialagonismus der untersuchten dualsterischen Liganden (Kapitel 4.1.3). In der Lungenfibroblastenzelllinie MRC-5, welche einen hohen basalen cAMP-Gehalt aufwies (Kapitel 4.2.4), konnte ebenfalls nur eine partialagonistische Wirkung der dualsterischen Liganden detektiert werden (Kapitel 4.2.5). Aufgrund dieser Beobachtungen stellte sich die Frage, ob der Partialagonismus ebenfalls in primären Zellen auftritt, wenn der cAMP-Gehalt der Zellen erhöht wird. Hierzu wurden murine embryonale Kardiomyozyten (eCM) sowie adulte ventrikuläre Kardiomyozyten (aCM) untersucht.

In den nachfolgenden Versuchen wurde allein Iper-6-phth eingesetzt, da dieser dualsterische Ligand eine geringere intrinsische Aktivität unter erhöhten cAMP-Gehalten aufwies als Iper-8-phth (Kapitel 4.1.3 und 4.2.5). Folglich sollte die partialagonistische Wirkung von Iper-6-phth im Vergleich zu Oxotremorin M erwartungsgemäß einfacher darstellbar sein.

Die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Gehaltes in eCM erfolgte durch den Einsatz von Isoprenalin und dem Phosphodiesterase-Inhibitor IBMX. Diese Vorbehandlung

fürte zu einer Zunahme der basalen Schlagfrequenz um 21% (Kapitel 4.3.5.1). Die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Gehaltes äußerte sich in eCM funktionell somit wesentlich schwächer als in den adulten ventrikulären Kardiomyozyten, wo sich das Ausmaß der Sarkomerverkürzung in Gegenwart von Isoprenalin (1 μ M) verdoppelte (siehe Kapitel 4.3.5.2).

Nach Erhöhung des basalen cAMP-Gehaltes konnte für Iper-6-phth in beiden Systemen eine im Vergleich zu Oxotremorin M reduzierte intrinsische Aktivität detektiert werden (Kapitel 4.3.5), was mit den vorherigen Ergebnissen in CHO-hM₂ und MRC-5 übereinstimmt. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Zellen und Organe mit hohen basalen cAMP-Gehalten verhältnismäßig schwach auf die dualsterischen Liganden reagieren. Der dualsterische Ligand Iper-6-phth wurde jedoch bereits an isolierten Organen untersucht und zeigte in allen untersuchten Modellen (Vas deferens: M₁-Modell; Ileum: M₃-Modell; linker Vorhof: M₂-Modell) eine mit Bethanechol vergleichbare intrinsische Aktivität (Antony et al., 2009). Da es sich jedoch um denervierte Organe handelte, stellt sich die Frage inwieweit Sympathikus und Parasympathikus durch Veränderung des cAMP-Gehaltes die Wirkung *in vivo* beeinflussen.

Die Herzfunktionen werden *in vivo* von dem autonomen Nervensystem reguliert (Klinke et al., 2009). Die Gabe von β -Blockern sowie des inversen muskarinischen Agonisten Atropin führten in der Vergangenheit bei anästhetisierten Mäusen zu einer Beeinflussung der Herzfrequenz (Gehrmann et al., 2000; Rose et al., 2007). Interessanterweise war der Effekt der sympathischen Blockade dabei wesentlich stärker ausgeprägt als die Blockade des Parasympathikus. Der alleinige Effekt von Atropin auf das Herz war entweder nur schwach (Rose et al., 2007) bzw. gar nicht detektierbar (Gehrmann et al., 2000). β -Blocker wirken dagegen stärker auf die Herzfrequenz ein und führten in der Vergangenheit zu einer Reduktion von rund 150 Schlägen pro Minute (Rose et al., 2007). Basierend auf diesen Vorkenntnissen ist davon auszugehen, dass der sympathische Tonus auf das Mäuseherz dominant gegenüber dem parasympathischen Tonus ist.

Die *in vivo*-Untersuchungen der Herzfunktion wurden von Frau Dr. Daniela Wenzel (Institut für Physiologie 1, Medizinische Fakultät, Universität Bonn) an Wildtypmäusen (Mausstamm: CD1) mittels Linksherzkatheteruntersuchungen durchgeführt. Im Gegensatz zum orthosterischen Agonisten Oxotremorin M

(Zielkonzentration im Tier: 3 μM) induzierte der dualsterische Agonist Iper-6-phth (Zielkonzentration im Tier: 3 μM) erwartungsgemäß nur einen schwach kardiodepressiven Effekt. So vermochte Oxotremorin M die Herzfrequenz um ca. 60% zu reduzieren, während Iper-6-phth nur eine Reduktion um ca. 15% bewirkte (Dr. Daniela Wenzel, mündliche Mitteilung). Zehn Minuten nach der ersten Injektion erfolgte jeweils eine zweite Injektion mit der gleichen Dosis. Da keine weitere Verstärkung des beobachteten Effektes detektierbar war, ist davon auszugehen, dass die Konzentration der beiden eingesetzten Agonisten maximal war.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in primären Zellen die agonistische Wirkung dualsterischer Liganden, i.e. Iper-6-phth, ebenfalls stark vom intrazellulären cAMP-Gehalt abhängig ist. Diese Befunde konnten anhand isolierter embryonaler und adulter Kardiomyozyten *in vitro* sowie mittels Linksherzkatheteruntersuchungen *in vivo* erstmals bestätigt werden.

6 Zusammenfassung

Muskarinische Acetylcholinrezeptoren (M_1 - M_5) werden in vielen Organen und Geweben des menschlichen Körpers exprimiert und sind an der Regulation einer Vielzahl physiologischer Funktionen beteiligt. Der muskarinische M_2 -Rezeptor zählt zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs), welche vornehmlich inhibitorische G-Proteine ($G_{i/o}$) aktivieren. Seine Charakterisierung hinsichtlich Ligandbindung und Signalwegsaktivierung wird durch die Tatsache erschwert, dass in Organen und Geweben verschiedene muskarinische Rezeptorsubtypen häufig nebeneinander exprimiert werden. Rekombinante Expressionssysteme bieten dagegen die Möglichkeit einzelne Rezeptorsubtypen genauer zu untersuchen. Hierzu dienten in dieser Arbeit Ovarialzellen des chinesischen Hamsters, welche stabil mit dem humanen M_2 -Rezeptor transfiziert sind (CHO-h M_2). Da dieses Expressionssystem jedoch in der Kritik steht, keine große physiologische Relevanz zu besitzen, wurden ebenfalls Zellen untersucht, welche den M_2 -Rezeptor endogen exprimieren. Zu diesem Zweck wurden humane Lungenfibroblasten als natives Expressionssystem und isolierte murine Herzmuskelzellen als primäres Expressionssystem verwendet. Radioligand-Bindungsexperimente, mit denen die Untersuchung der Rezeptorkinetiken sowie der Bindungseigenschaften orthosterischer und allosterischer Liganden erfolgte, bestätigten die dominante Expression des muskarinischen M_2 -Rezeptors in diesen Zellen.

M_2 -Rezeptoren besitzen neben der Aktivierung inhibitorischer G-Proteine die Fähigkeit zur Stimulation weiterer G-Proteine. Diese promiskuitive G-Proteinaktivierung ist bisher jedoch nur in rekombinanten Expressionssystemen eindeutig beschrieben und wird der Überexpression muskarinischer Rezeptoren zugeschrieben. Zur Klärung der physiologischen Relevanz promiskuitiver G-Proteinaktivierung erfolgten Untersuchungen mit humanen Lungenfibroblasten sowie mit murinen embryonalen Kardiomyozyten. In beiden Zellsystemen konnte jedoch allein die Aktivierung inhibitorischer G-Proteine eindeutig nachgewiesen werden. Daher kann die Hypothese nicht verworfen werden, dass sich die M_2 -vermittelte promiskuitive G-Proteinaktivierung auf artifizielle Expressionssysteme beschränkt.

Einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit stellte die Kontext-abhängige Untersuchung der Rezeptoraktivierung dualsterischer Hybridliganden dar, welche

aus einem orthosterischen Agonistbaustein und einem M_2 -subtypselektiven allosterischen Modulator bestehen. Die beiden untersuchten Agonisten Iper-6-phth und Iper-8-phth unterschieden sich einzig hinsichtlich der Länge ihrer Kohlenwasserstoffkette, welche beide Bausteine miteinander verbindet. Die Länge dieser Zwischenkette wirkte sich sowohl auf die Wirksamkeit wie auch auf die intrinsische Aktivität der Liganden aus, was im rekombinanten, im nativen und im primären Expressionssystem des M_2 -Rezeptors gezeigt werden konnte.

Bezüglich ihrer Fähigkeit den Rezeptor zu aktivieren wiesen die dualsterischen Hybridliganden zudem eine starke Abhängigkeit vom gewählten Expressionssystem auf. In Systemen mit einem niedrigen intrazellulären cAMP-Gehalt äußerte sich dies in einer starken intrinsischen Aktivität der Hybride, wie sie ebenfalls bei Oxotremorin M und dem endogenen Liganden Acetylcholin zu finden ist. In Systemen mit hohem cAMP-Gehalt war dagegen nur ein partialagonistischer Effekt detektierbar. Es war dabei unerheblich, ob es sich bei dem System um ein rekombinantes oder ein primäres Expressionssystem handelte, und konnte im Fall der murinen Kardiomyozyten erstmals sowohl *in vitro* wie auch *in vivo* gezeigt werden.

Dualsterische Liganden besitzen somit neben der bereits beschriebenen Subtyp- und Signalwegsselektivität zudem die Eigenschaft der Kontextabhängigkeit, welche sich im Vergleich zu konventionellen Vollagonisten in einer Organ- bzw. Gewebeselektivität äußert.

7 Literaturverzeichnis

Abi-Gerges N, Ji GJ, Lu ZJ, Fischmeister R, Hescheler J, Fleischmann BK (2000) Functional expression and regulation of the hyperpolarization activated non-selective cation current in embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *J Physiol* **523 Pt 2**: 377-389.

Akam EC, Challiss RA, Nahorski SR (2001) G(q/11) and G(i/o) activation profiles in CHO cells expressing human muscarinic acetylcholine receptors: dependence on agonist as well as receptor-subtype. *Br J Pharmacol* **132(4)**: 950-958.

Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2005) *Lehrbuch der molekularen Zellbiologie*. 3. Auflage WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA

Antony J (2007) Dissertationsschrift: Bindungstopografie allosterisch/orthosterischer Hybridagonisten an M₂-Acetylcholinrezeptoren, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.

Antony J, Kellershohn K, Mohr-Andrä M, Kebig A, Prilla S, Muth M, Heller E, Disingrini T, Dallanoce C, Bertoni S, Schrobang J, Tränkle C, Kostenis E, Christopoulos A, Höltje HD, Barocelli E, De Amici M, Holzgrabe U, Mohr K (2009) Dualsteric GPCR targeting: a novel route to binding and signaling pathway selectivity. *FASEB J* **23(2)**: 442-450.

Arunlakshana O, Schild HO (1959) Some quantitative uses of drug antagonists. *Br J Pharmacol Chemother* **14(1)**: 48-58.

Ashkenazi A, Winslow JW, Peralta EG, Peterson GL, Schimerlik MI, Capon DJ, Ramachandran J (1987) An M₂ muscarinic receptor subtype coupled to both adenylyl cyclase and phosphoinositide turnover. *Science* **238(4827)**: 672-675.

Barlow R, Blake JF (1989) Hill coefficients and the logistic equation. *Trends Pharmacol Sci* **10(11)**: 440-441.

Black JW, Leff P (1983) Operational models of pharmacological agonism. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **220(1219)**: 141-162.

Bock A, Merten N, Schrage R, Dallanoce C, Batz J, Klockner J, Schmitz J, Matera C, Simon K, Kebig A, Peters L, Müller A, Schrobang-Ley J, Tränkle C, Hoffmann C, De Amici M, Holzgrabe U, Kostenis E, Mohr K (2012) The allosteric vestibule of a seven transmembrane helical receptor controls G-protein coupling. *Nat Commun* **3**: 1044.

Bockaert J, Pin JP (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J* **18(7)**: 1723-1729.

Boyer J, Paterson A, Harden TK (1994) G-protein-mediated regulation of phospholipase C Involvement of betagamma subunits. *Trends Cardiovasc Med* **4(2)**: 88-95.

Caulfield MP (1993) Muscarinic receptors-characterization, coupling and function. *Pharmacol Ther* **58**(3): 319-379.

Caulfield MP, Birdsall NJ (1998) International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* **50**(2): 279-290.

Cheng Y, Prusoff WH (1973) Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* **22**(23): 3099-3108.

Christopoulos A, Grant MK, El-Fakahany EE (2000) Transducer abstraction: a novel approach to the detection of partial agonist efficacy in radioligand binding studies. *J Pharmacol Toxicol Methods* **43**(1): 55-67.

Cong M, Perry SJ, Lin FT, Fraser ID, Hu LA, Chen W, Pitcher JA, Scott JD, Lefkowitz RJ (2001) Regulation of membrane targeting of the G protein-coupled receptor kinase 2 by protein kinase A and its anchoring protein AKAP79. *J Biol Chem* **276**(18): 15192-15199.

Conn PJ, Christopoulos A, Lindsley CW (2009) Allosteric modulators of GPCRs: a novel approach for the treatment of CNS disorders. *Nat Rev Drug Discov* **8**(1): 41-54.

Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ (1997) Switching of the coupling of the beta₂-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* **390**(6655): 88-91.

Dai YS, Ambudkar IS, Horn VJ, Yeh CK, Kousvelari EE, Wall SJ, Li M, Yasuda RP, Wolfe BB, Baum BJ (1991) Evidence that M₃ muscarinic receptors in rat parotid gland couple to two second messenger systems. *Am J Physiol* **261**(6 Pt 1): C1063-1073.

De Lean A, Stadel JM, Lefkowitz RJ (1980) A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. *J Biol Chem* **255**(15): 7108-7117.

DeBlasi A, O'Reilly K, Motulsky HJ (1989) Calculating receptor number from binding experiments using same compound as radioligand and competitor. *Trends Pharmacol Sci* **10**(6): 227-229.

Dhein S, van Koppen CJ, Brodde OE (2001) Muscarinic receptors in the mammalian heart. *Pharmacol Res* **44**(3): 161-182.

DiFrancesco D (2010) The role of the funny current in pacemaker activity. *Circ Res* **106**(3): 434-446.

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**(1): 366-372.

Dittmann A (2003) Dissertationsschrift: Untersuchungen zur Topologie der Interaktion atypischer allosterischer Modulatoren mit dem M₂-Acetylcholin-Rezeptor, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.

Ehlert FJ, Griffin MT, Sawyer GW, Bailon R (1999) A simple method for estimation of agonist activity at receptor subtypes: comparison of native and cloned M₃ muscarinic receptors in guinea pig ileum and transfected cells. *J Pharmacol Exp Ther* **289**(2): 981-992.

Ellis J, Huyler J, Brann MR (1991) Allosteric regulation of cloned m1-m5 muscarinic receptor subtypes. *Biochem Pharmacol* **42**(10): 1927-1932.

Exton JH (1997) Cell signalling through guanine-nucleotide-binding regulatory proteins (G proteins) and phospholipases. *Eur J Biochem* **243**(1-2): 10-20.

Fang Y, Li G, Ferrie AM (2007) Non-invasive optical biosensor for assaying endogenous G protein-coupled receptors in adherent cells. *J Pharmacol Toxicol Methods* **55**(3): 314-322.

Fleischmann BK, Duan Y, Fan Y, Schoneberg T, Ehlich A, Lenka N, Viatchenko-Karpinski S, Pott L, Hescheler J, Fakler B (2004) Differential subunit composition of the G protein-activated inward-rectifier potassium channel during cardiac development. *J Clin Invest* **114**(7): 994-1001.

Flynn DD, Mash DC (1993) Distinct kinetic binding properties of N-[³H]-methylscopolamine afford differential labeling and localization of M₁, M₂, and M₃ muscarinic receptor subtypes in primate brain. *Synapse* **14**(4): 283-296.

Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, Schioth HB (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* **63**(6): 1256-1272.

Galés C, Van Durm JJ, Schaak S, Pontier S, Percherancier Y, Audet M, Paris H, Bouvier M (2006) Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. *Nat Struct Mol Biol* **13**(9): 778-786.

Gehrmann J, Hammer PE, Maguire CT, Wakimoto H, Tiedman JK, Berul CI (2000) Phenotypic screening for heart rate variability in the mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **279**(2): H733-740.

Gomez J, Shannon H, Kostenis E, Felder C, Zhang L, Brodtkin J, Grinberg A, Sheng H, Wess J (1999) Pronounced pharmacologic deficits in M₂ muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(4): 1692-1697.

Gregory KJ, Sexton PM, Tobin AB, Christopoulos A (2012) Stimulus Bias Provides Evidence for Conformational Constraints in the Structure of a G Protein-coupled Receptor. *J Biol Chem* **287**(44): 37066-37077.

Griffin MT, Figueroa KW, Liller S, Ehlert FJ (2007) Estimation of agonist activity at G protein-coupled receptors: analysis of M₂ muscarinic receptor signaling through G_{i/o}, G_s, and G₁₅. *J Pharmacol Exp Ther* **321**(3): 1193-1207.

Griffin MT, Hsu JC, Shehnaz D, Ehler FJ (2003) Comparison of the pharmacological antagonism of M₂ and M₃ muscarinic receptors expressed in isolation and in combination. *Biochem Pharmacol* **65**(8): 1227-1241.

Haag S, Matthiesen S, Juergens UR, Racké, K (2008) Muscarinic receptors mediate stimulation of collagen synthesis in human lung fibroblasts. *Eur Respir J* **32**(3): 555-562.

Haga K, Kruse AC, Asada H, Yurugi-Kobayashi T, Shiroishi M, Zhang C, Weis WI, Okada T, Kobilka BK, Haga T, Kobayashi T (2012) Structure of the human M₂ muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist. *Nature* **482**(7386): 547-551.

Harvey RD, Belevych AE (2003) Muscarinic regulation of cardiac ion channels. *Br J Pharmacol* **139**(6): 1074-1084.

Hermans E (2003) Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* **99**(1): 25-44.

Hescheler J, Fleischmann BK, Wartenberg M, Bloch W, Kolossov E, Ji G, Addicks K, Sauer H (1999) Establishment of ionic channels and signalling cascades in the embryonic stem cell-derived primitive endoderm and cardiovascular system. *Cells Tissues Organs* **165**(3-4): 153-164.

Hilf G, Jakobs KH (1992) Activation of solubilized G-proteins by muscarinic acetylcholine receptors. *Cell Signal* **4**(6): 787-794.

Huang XP, Ellis J (2007) Mutational disruption of a conserved disulfide bond in muscarinic acetylcholine receptors attenuates positive homotropic cooperativity between multiple allosteric sites and has subtype-dependent effects on the affinities of muscarinic allosteric ligands. *Mol Pharmacol* **71**(3): 759-768.

Hulme EC, Birdsall NJ, Buckley NJ (1990) Muscarinic receptor subtypes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **30**: 633-673.

Iancu RV, Ramamurthy G, Harvey RD (2008) Spatial and temporal aspects of cAMP signalling in cardiac myocytes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **35**(11): 1343-1348.

Jacobs JP, Jones CM, Baille JP (1970) Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature* **227**(5254): 168-170.

Jäger D, Schmalenbach C, Prilla S, Schrobang J, Kebig A, Sennwitz M, Heller E, Tränkle C, Holzgrabe U, Höltje HD, Mohr K (2007) Allosteric small molecules unveil a role of an extracellular E2/transmembrane helix 7 junction for G protein-coupled receptor activation. *J Biol Chem* **282**(48): 34968-34976.

Janßen N (2011) Dissertationsschrift: Zelluläre dynamische Massenumverteilung zur Erfassung der Signalwegsaktivierung 7-transmembranärer Rezeptoren unter besonderer Berücksichtigung des M₄-Acetylcholinrezeptors, Rheinische Friedrich-Wilhelms Universität, Bonn.

Jepsen K, Lüllmann H, Mohr K, Pfeffer J (1988) Allosteric stabilization of ³H-N-methylscopolamine binding in guinea-pig myocardium by an antidote against organophosphate intoxication. *Pharmacol Toxicol* **63**(3): 163-168.

Ji GJ, Fleischmann BK, Bloch W, Feelisch M, Andressen C, Addicks K, Hescheler J (1999) Regulation of the L-type Ca²⁺ channel during cardiomyogenesis: switch from NO to adenylyl cyclase-mediated inhibition. *FASEB J* **13**(2): 313-324.

Jin LQ, Wang HY, Friedman E (2001) Stimulated D(1) dopamine receptors couple to multiple Galpha proteins in different brain regions. *J Neurochem* **78**(5): 981-990.

Jositsch G, Papadakis T, Haberberger RV, Wolff M, Wess J, Kummer W (2009) Suitability of muscarinic acetylcholine receptor antibodies for immunohistochemistry evaluated on tissue sections of receptor gene-deficient mice. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **379**(4): 389-395.

Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ (2012) *Basic and Clinical Pharmacology*. 12. Auflage McGraw-Hill Professional Verlag

Kaufel D (2010) Dissertationsschrift: Interaktion orthosterisch/allosterischer Antagonist-Hybride mit muskarinischen M₂-Acetylcholinrezeptoren, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.

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**(3-4): 140-145.

Kebig AE (2010) Dissertationsschrift: Signalwegsaktivierung an muskarinischen M₂-Rezeptoren - Einfluss der allosterischen Bindungsstelle, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.

Kellershohn K (2007) Dissertationsschrift: Allosterisch/orthosterische Hybridliganden des muskarinischen Acetylcholinrezeptors: Rezeptorbindung und -aktivierung, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.

Kenakin T (2007) Functional selectivity through protean and biased agonism: who steers the ship? *Mol Pharmacol* **72**(6): 1393-1401.

Kilts JD, Gerhardt MA, Richardson MD, Sreeram G, Mackensen GB, Grocott HP, White WD, Davis RD, Newman MF, Reves JG, Schwinn DA, Kwatra MM (2000) Beta(2)-adrenergic and several other G protein-coupled receptors in human atrial membranes activate both G(s) and G(i). *Circ Res* **87**(8): 705-709.

Kitazawa T, Asakawa K, Nakamura T, Teraoka H, Unno T, Komori S, Yamada M, Wess J (2009) M₃ muscarinic receptors mediate positive inotropic responses in mouse atria: a study with muscarinic receptor knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther* **330**(2): 487-493.

Klabunde RE (2011) *Cardiovascular Physiology Concepts*. 2. Auflage Lippincott Williams & Wilki Verlag

Klinke R, Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S (2009) *Physiologie*. 6. Auflage Georg Thieme Verlag KG

Koch WJ, Hawes BE, Allen LF, Lefkowitz RJ (1994) Direct evidence that G_i-coupled receptor stimulation of mitogen-activated protein kinase is mediated by G beta gamma activation of p21ras. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(26): 12706-12710.

Kohout TA, Lefkowitz RJ (2003) Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization. *Mol Pharmacol* **63**(1): 9-18.

Kolossov E, Bostani T, Roell W, Breitbach M, Pillekamp F, Nygren JM, Sasse P, Rubenchik O, Fries JW, Wenzel D, Geisen C, Xia Y, Lu Z, Duan Y, Kettenhofen R, Jovinge S, Bloch W, Bohlen H, Welz A, Hescheler J, Jacobsen SE, Fleischmann BK (2006) Engraftment of engineered ES cell-derived cardiomyocytes but not BM cells restores contractile function to the infarcted myocardium. *J Exp Med* **203**(10): 2315-2327.

Kolossov E, Lu Z, Drobinskaya I, Gassanov N, Duan Y, Sauer H, Manzke O, Bloch W, Bohlen H, Hescheler J, Fleischmann BK (2005) Identification and characterization of embryonic stem cell-derived pacemaker and atrial cardiomyocytes. *FASEB J* **19**(6): 577-579.

Kostenis E, Mohr K (1996) Two-point kinetic experiments to quantify allosteric effects on radioligand dissociation. *Trends Pharmacol Sci* **17**(8): 280-283.

Kris M, Jbilo O, Bartels CF, Masson P, Rhode S, Lockridge O (1994) Endogenous butyrylcholinesterase in SV40 transformed cell lines: COS-1, COS-7, MRC-5 SV40, and WI-38 VA13. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **30A**(10): 680-689.

Kruse AC, Hu J, Pan AC, Arlow DH, Rosenbaum DM, Rosemond E, Green HF, Liu T, Chae PS, Dror RO, Shaw DE, Weis WI, Wess J, Kobilka BK (2012) Structure and dynamics of the M₃ muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* **482**(7386): 552-556.

Lang N, Reppel M, Hescheler J, Fleischmann BK (2007) NO underlies the muscarinic receptor-mediated inhibition of If in early embryonic heart cells. *Cell Physiol Biochem* **20**(5): 293-302.

Laugwitz KL, Allgeier A, Offermanns S, Spicher K, Van Sande J, Dumont JE, Schultz G (1996) The human thyrotropin receptor: a heptahelical receptor capable of stimulating members of all four G protein families. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(1): 116-120.

Lawler OA, Miggin SM, Kinsella BT (2001) Protein kinase A-mediated phosphorylation of serine 357 of the mouse prostacyclin receptor regulates its coupling to G(s)-, to G(i)-, and to G(q)-coupled effector signaling. *J Biol Chem* **276**(36): 33596-33607.

Leach K, Simms J, Sexton PM, Christopoulos A (2012) Structure-function studies of muscarinic acetylcholine receptors. *Handb Exp Pharmacol*(208): 29-48.

Lee PH, Gao A, van Staden C, Ly J, Salon J, Xu A, Fang Y, Verkleeren R (2008) Evaluation of dynamic mass redistribution technology for pharmacological studies of recombinant and endogenously expressed G protein-coupled receptors. *Assay Drug Dev Technol* **6**(1): 83-94.

Linsel, NB (2008) Dissertationsschrift: Einfluss von Rezeptorglykosylierung und Lipidmembranumgebung auf die Ligandbindung muskarinischer Acetylcholinrezeptoren unter besonderer Berücksichtigung der allosterischen Bindungsstelle, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.

Liu R, Ramani B, Soto D, De Arcangelis V, Xiang Y (2009) Agonist dose-dependent phosphorylation by protein kinase A and G protein-coupled receptor kinase regulates beta2 adrenoceptor coupling to G(i) proteins in cardiomyocytes. *J Biol Chem* **284**(47): 32279-32287.

Logothetis DE, Kurachi Y, Galper J, Neer EJ, Clapham DE (1987) The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart. *Nature* **325**(6102): 321-326.

Lohninger, H (2012) eBook: Grundlagen der Statistik. Letzte Aktualisierung 2012-10-08. Internetseite: http://www.statistics4u.info/fundstat_germ/index.html (11.12.2012)

Lohse MJ (1993) Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. *Biochim Biophys Acta* **1179**(2): 171-188.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**(1): 265-275.

Lüllmann H, Ohnesorge FK, Schauwecker GC, Wassermann O (1969) Inhibition of the actions of carbachol and DFP on guinea pig isolated atria by alkane-bis-ammonium compounds. *Eur J Pharmacol* **6**(3): 241-247.

Luo X, Zeng W, Xu X, Popov S, Davignon I, Wilkie TM, Mumby SM, Muallem S (1999) Alternate coupling of receptors to G_s and G_i in pancreatic and submandibular gland cells. *J Biol Chem* **274**(25): 17684-17690.

Maaß A, Kostenis E, Mohr K (1995) Potentiation by alcuronium of the antimuscarinic effect of N-methylscopolamine in guinea pig left atria. *Eur J Pharmacol* **272**(1): 103-106.

Malan D, Fleischmann BK (2012) Functional expression and modulation of the L-type Ca²⁺ current in embryonic heart cells. *Pediatr Cardiol* **33**(6): 907-915.

Mangmool S, Kurose H (2011) G(i/o) Protein-Dependent and -Independent Actions of Pertussis Toxin (PTX). *Toxins (Basel)* **3**(7): 884-899.

Matthiesen S, Bahulayan A, Kempkens S, Haag S, Fuhrmann M, Stichnote C, Juergens UR, Racké K (2006) Muscarinic receptors mediate stimulation of human lung fibroblast proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol* **35**(6): 621-627.

- Maudsley S, Martin B, Luttrell LM (2005) The origins of diversity and specificity in G protein-coupled receptor signaling. *J Pharmacol Exp Ther* **314**(2): 485-494.
- May LT, Lin Y, Sexton PM, Christopoulos A (2005) Regulation of M₂ muscarinic acetylcholine receptor expression and signaling by prolonged exposure to allosteric modulators. *J Pharmacol Exp Ther* **312**(1): 382-390.
- Michal P, El-Fakahany EE, Dolezal V (2007) Muscarinic M₂ receptors directly activate G_{q/11} and G_s G-proteins. *J Pharmacol Exp Ther* **320**(2): 607-614.
- Michal P, Lysikova M, Tucek S (2001) Dual effects of muscarinic M(2) acetylcholine receptors on the synthesis of cyclic AMP in CHO cells: dependence on time, receptor density and receptor agonists. *Br J Pharmacol* **132**(6): 1217-1228.
- Michalski H (2009) diploma thesis: Binding topology and functional properties of allosteric/orthosteric hybrid ligands at muscarinic M₂ receptors, Rheinische Friedrich-Wilhelms University, Bonn.
- Milligan G (1993) Mechanisms of multifunctional signalling by G protein-linked receptors. *Trends Pharmacol Sci* **14**(6): 239-244.
- Milligan G (2003) Principles: extending the utility of [³⁵S]GTP gamma S binding assays. *Trends Pharmacol Sci* **24**(2): 87-90.
- Milligan G, Kostenis E (2006) Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br J Pharmacol* **147 Suppl 1**: S46-55.
- Mistry R, Dowling MR, Challiss RA (2005) An investigation of whether agonist-selective receptor conformations occur with respect to M₂ and M₄ muscarinic acetylcholine receptor signalling via Gi/o and Gs proteins. *Br J Pharmacol* **144**(4): 566-575.
- Mohr K, Tränkle C, Kostenis E, Barocelli E, De Amici M, Holzgrabe U (2010) Rational design of dualsteric GPCR ligands: quests and promise. *Br J Pharmacol* **159**(5): 997-1008.
- Moro O, Lameh J, Sadee W (1993) Serine- and threonine-rich domain regulates internalization of muscarinic cholinergic receptors. *J Biol Chem* **268**(10): 6862-6865.
- Motulsky H, Christopoulos A (2004) *Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting* Oxford University Press.
- Müller CE, Schiedel AC, Baqi Y (2012) Allosteric modulators of rhodopsin-like G protein-coupled receptors: opportunities in drug development. *Pharmacol Ther* **135**(3): 292-315.
- Nahorski SR, Tobin AB, Willars GB (1997) Muscarinic M₃ receptor coupling and regulation. *Life Sci* **60**(13-14): 1039-1045.

Nelson CP, Nahorski SR, Challiss RA (2006) Constitutive activity and inverse agonism at the M₂ muscarinic acetylcholine receptor. *J Pharmacol Exp Ther* **316**(1): 279-288.

Nesterov A, Hong M, Hertel C, Jiao P, Brownell L, Cannon E (2010) Screening a plant extract library for inhibitors of cholecystokinin receptor CCK1 pathways. *J Biomol Screen* **15**(5): 518-527.

O'Donnell SR (1970) A selective beta-adrenoreceptor stimulant (Th1165a) related to orciprenaline. *Eur J Pharmacol* **12**(1): 35-43.

Pals-Rylaarsdam R, Hosey MM (1997) Two homologous phosphorylation domains differentially contribute to desensitization and internalization of the m2 muscarinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem* **272**(22): 14152-14158.

Peters, L (2010) Diplomarbeit: Identitätsprüfung von Muskarinrezeptorpräparationen und Charakterisierung der Rezeptor-kinetischen Eigenschaften unmarkierter Tiotropium-artiger Antagonisten an humanen M₃-Rezeptoren, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.

Pradidarcheep W, Labruyere WT, Dabhoiwala NF, Lamers WH (2008) Lack of specificity of commercially available antisera: better specifications needed. *J Histochem Cytochem* **56**(12): 1099-1111.

Reiter E, Lefkowitz RJ (2006) GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends Endocrinol Metab* **17**(4): 159-165.

Rose RA, Kabir MG, Backx PH (2007) Altered heart rate and sinoatrial node function in mice lacking the cAMP regulator phosphoinositide 3-kinase-gamma. *Circ Res* **101**(12): 1274-1282.

Samama P, Cotecchia S, Costa T, Lefkowitz RJ (1993) A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J Biol Chem* **268**(7): 4625-4636.

Saulière A, Bellot M, Paris H, Denis C, Finana F, Hansen JT, Altie MF, Seguelas MH, Pathak A, Hansen JL, Senard JM, Gales C (2012) Deciphering biased-agonism complexity reveals a new active AT1 receptor entity. *Nat Chem Biol* **8**(7): 622-630.

Schmalenbach C (2005) Dissertationsschrift: Allosterische Modulation der durch Acetylcholin und weitere Agonisten ausgelösten Aktivierung von muskarinischen M₂-Rezeptoren, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.

Schrage R (2008) diploma thesis: Influence of an altered sphingolipid composition on the function of the muscarinic M₂ receptor, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.

Schrage R, Seemann WK, Klöckner J, Dallanoce C, Racké K, Kostenis E, De Amici M, Holzgrave U, Mohr K (2012) Agonists with supraphysiological efficacy at the muscarinic M(2) acetylcholine receptor. *Br J Pharmacol*.

Schröder R, Janssen N, Schmidt J, Kebig A, Merten N, Hennen S, Müller A, Blättermann S, Mohr-Andrä M, Zahn S, Wenzel J, Smith NJ, Gomeza J, Drewke C, Milligan G, Mohr K, Kostenis E (2010) Deconvolution of complex G protein-coupled receptor signaling in live cells using dynamic mass redistribution measurements. *Nat Biotechnol* **28**(9): 943-949.

Schröder R, Schmidt J, Blättermann S, Peters L, Janssen N, Grundmann M, Seemann W, Kaufel D, Merten N, Drewke C, Gomeza J, Milligan G, Mohr K, Kostenis E (2011) Applying label-free dynamic mass redistribution technology to frame signaling of G protein-coupled receptors noninvasively in living cells. *Nat Protoc* **6**(11): 1748-1760.

Seasholtz TM, Majumdar M, Brown JH (1999) Rho as a mediator of G protein-coupled receptor signaling. *Mol Pharmacol* **55**(6): 949-956.

Smith NJ, Bennett KA, Milligan G (2011) When simple agonism is not enough: emerging modalities of GPCR ligands. *Mol Cell Endocrinol* **331**(2): 241-247.

Song GL, Tang M, Liu CJ, Luo HY, Liang HM, Hu XW, Xi JY, Gao LL, Fleischmann B, Hescheler J (2002) Developmental changes in functional expression and beta-adrenergic regulation of I(f) in the heart of mouse embryo. *Cell Res* **12**(5-6): 385-394.

Stefan E, Malleshaiah MK, Breton B, Ear PH, Bachmann V, Beyermann M, Bouvier M, Michnick SW (2011) PKA regulatory subunits mediate synergy among conserved G-protein-coupled receptor cascades. *Nat Commun* **2**: 598.

Steinfeld T, Mammen M, Smith JA, Wilson RD, Jasper JR (2007) A novel multivalent ligand that bridges the allosteric and orthosteric binding sites of the M₂ muscarinic receptor. *Mol Pharmacol* **72**(2): 291-302.

Straßmann V (2007) Dissertationsschrift: Rezeptorepitop-Abhängigkeit der Bindung muskarinischer allosterischer Modulatoren unter verschiedenen ionalen Bedingungen, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.

Thomas RL, Mistry R, Langmead CJ, Wood MD, Challiss RA (2008) G protein coupling and signaling pathway activation by m1 muscarinic acetylcholine receptor orthosteric and allosteric agonists. *J Pharmacol Exp Ther* **327**(2): 365-374.

Tiemann K, Weyer D, Djoufack PC, Ghanem A, Lewalter T, Dreiner U, Meyer R, Grohe C, Fink KB (2003) Increasing myocardial contraction and blood pressure in C57BL/6 mice during early postnatal development. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **284**(2): H464-474.

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**(2): 926-933.

Tränkle C, Weyand O, Voigtländer U, Mynett A, Lazareno S, Birdsall NJ, Mohr K (2003) Interactions of orthosteric and allosteric ligands with [³H]dimethyl-W84 at the common allosteric site of muscarinic M₂ receptors. *Mol Pharmacol* **64**(1): 180-190.

Uustare A, Nasman J, Akerman KE, Rincken A (2004) Characterization of M₂ muscarinic receptor activation of different G protein subtypes. *Neurochem Int* **44**(2): 119-124.

Valant C, Felder CC, Sexton PM, Christopoulos A (2012) Probe dependence in the allosteric modulation of a G protein-coupled receptor: implications for detection and validation of allosteric ligand effects. *Mol Pharmacol* **81**(1): 41-52.

Voigtländer U, Jöhren K, Mohr M, Raasch A, Tränkle C, Buller S, Ellis J, Höltje HD, Mohr K (2003) Allosteric site on muscarinic acetylcholine receptors: identification of two amino acids in the muscarinic M₂ receptor that account entirely for the M₂/M₅ subtype selectivities of some structurally diverse allosteric ligands in N-methylscopolamine-occupied receptors. *Mol Pharmacol* **64**(1): 21-31.

Wätzig H, Mehnert W, Bühler W (2008) *Mathematik und Statistik kompakt: Grundlagen und Anwendungen in Pharmazie und Medizin*. 1. Auflage Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart

Wess J (2004) Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice: novel phenotypes and clinical implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **44**: 423-450.

Wess J, Eglen RM, Gautam D (2007) Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. *Nat Rev Drug Discov* **6**(9): 721-733.

Xiao RP, Cheng H, Zhou YY, Kuschel M, Lakatta EG (1999) Recent advances in cardiac beta(2)-adrenergic signal transduction. *Circ Res* **85**(11): 1092-1100.

Yamada M, Inanobe A, Kurachi Y (1998) G protein regulation of potassium ion channels. *Pharmacol Rev* **50**(4): 723-760.

Zhong H, Neubig RR (2001) Regulator of G protein signaling proteins: novel multifunctional drug targets. *J Pharmacol Exp Ther* **297**(3): 837-845.

8 Abkürzungsverzeichnis

[³H]NMS:	[³ H]- <i>N</i> -Methylscopolamin
AC:	Adenylylzyklase
aCM:	Murine adulte ventriculäre Kardiomyzyten
B_{max}:	Rezeptorzahl
Bpm:	Schläge pro Minute (<i>beats per minute</i>)
BRET:	Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer
C57BL/6:	Wildtyp-Mausstamm (Inzuchtlinie)
cAMP:	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CD-1:	Wildtyp-Mausstamm (Auszuchtlinie)
cGMP:	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CHO-hM₂:	Ovarialzellen des chinesischen Hamsters, welche stabil mit dem humanen M ₂ -Rezeptor transfiziert sind.
CHO-hM₃:	Ovarialzellen des chinesischen Hamsters, welche stabil mit dem humanen M ₃ -Rezeptor transfiziert sind.
COS-7:	Fibroblastenzelllinie aus Nierengewebe der grünen Meerkatze
DMR:	Dynamische Massenumverteilung (<i>Dynamic Mass Redistribution</i>)
eCM:	Murine embryonale atriale Kardiomyzyten
eGFP:	<i>Enhanced Green Fluorescence Protein</i>
EBs:	<i>Embroid Bodies</i>
EGTA:	Ethylenglycol-tetra-Acetessigsäure
FRET:	Förster-Resonanzenergietransfer
Fsk:	Forskolin

GTP und GDP:	Guanosintriphosphat und Guanosindiphosphat
HBSS:	<i>Hank's Buffered Salt Solution</i>
HAS:	Humanes Serum Albumin
I-6-p:	Iper-6-phth
I-8-p:	Iper-8-phth
IBMX:	1-Methyl-3-Isobutylxanthin
IP3 und IP1:	Inositoltriphosphat und Inositolmonophosphat
Ipx:	Iperoxo
K_{app}:	Apparente Gleichgewichtsdissoziationskonstante
MH:	362-63-08, hemmt G _{q/11}
MRC-5:	Humane Lungenfibroblasten-Zelllinie
NOS:	NO-Synthetase (eNOS = endotheliale; iNOS = induzierbare)
Oxo M:	Oxotremorin M
PDE:	Phosphodiesterase
Pilo:	Pilocarpin
PKA und PKC:	Proteinkinase A und Proteinkinase C
PLC:	Phospholipase C
PTX:	Pertussis Toxin
RGS:	<i>Regulators of G protein signaling</i>
RT:	Raumtemperatur
U/min:	Umdrehungen/Minute
x g:	Das Vielfache der mittleren Erdschwerebeschleunigung
τ:	Kopplungseffizienz

9 Anhang

9.1 DMR-Messungen mit dem optischen Biosensor Epic[®]

Die Messung der intrazellulären dynamischen Massenumverteilung (DMR) an ganzen Zellen erfolgte mit dem optischen Biosensor Epic[®]. Nachfolgend sind Experimente aufgeführt, welche zur Validierung dieser Messmethode durchgeführt wurden.

9.1.1. Beeinflussung des DMR-Signals durch Beschichtung der Messplatten mit Fibronectin

Im Rahmen dieser Arbeit kamen einerseits unbeschichtete epic[®]-Platten aus Glas und andererseits Fibronectin-beschichtete Platten zum Einsatz. Der Einfluss von Fibronectin auf die Agonist-induzierten DMR-Signale wurde unter Verwendung von CHO-hM₂-Zellen und verschiedenen muskarinischen Agonisten genauer untersucht.

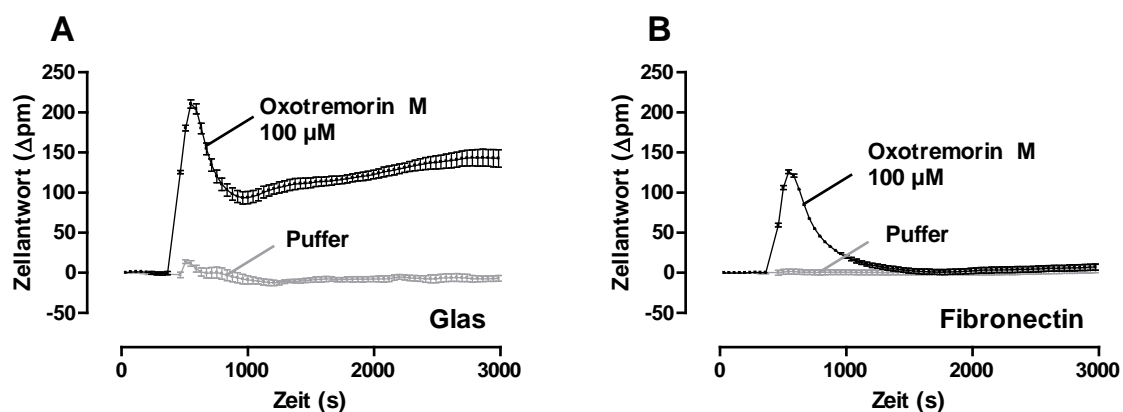


Abb. 9.1 Einfluss von Fibronectin auf das Oxotremorin M-induzierte DMR-Signal in CHO-hM₂. Dargestellt sind repräsentative DMR-Originalregistrierungen. (A) unbeschichtete Platten; (B) Fibronectin-beschichteten Platten. *Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler einer Vierfachbestimmung

Die Intensität des Oxotremorin M-induzierten DMR-Signals in CHO-hM₂ wurde durch die Fibronectinbeschichtung stark reduziert, wobei die Ausbildung der charakteristischen Signalspitze erhalten blieb (siehe Abb. 9.1). Die maximal induzierbare Wellenlängenverschiebung reduzierte sich von 226 ± 13 pm auf 121 ± 6 pm ($n = 8 - 5$), was einer Reduktion um 47% entspricht (Abb. 9.2 A). Zudem zeigte

sich durch die Fibronectinbeschichtung eine Verschiebung der Wirksamkeit um ca. 0,3 Dekaden zu höheren Agonistkonzentrationen (Abb. 9.2 B).

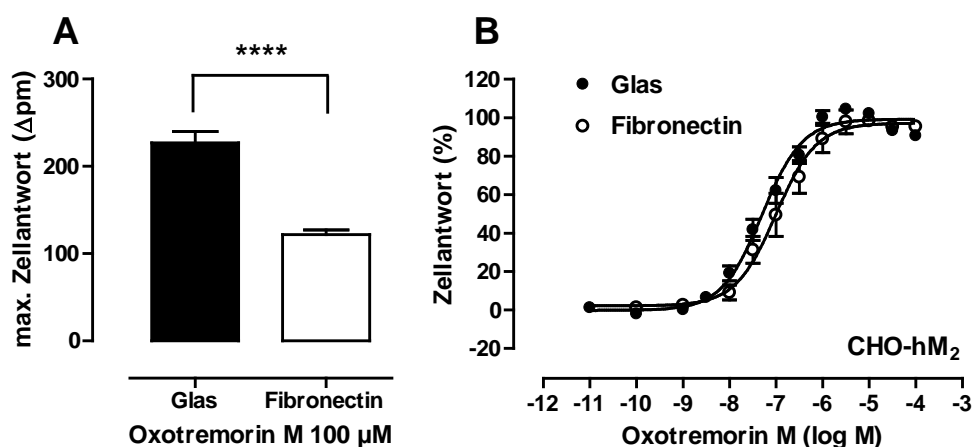


Abb. 9.2 Fibronectin-Einfluss auf die detektierbare Zellantwort und die Wirksamkeit. Einfluss der Oberflächenbeschichtung auf die maximal induzierbare Zellantwort (A) und die Wirksamkeit (B) des orthosterischen Agonisten Oxotremorin M in CHO-hM₂. Die erhobenen Konzentrations-Effekt-Kurven wurden jeweils auf ihr oberes und unteres Plateau normiert. *Datenpunkte*: Mittelwerte ± Standardfehler, n = 5 - 8, Vierfachbestimmung; *Statistik*: Unverbundener t-Test (**** p < 0,0001)

Alle weiteren muskarinischen Agonisten wiesen auf Fibronectin-beschichteten Platten ebenfalls eine schwächere Wirksamkeit auf (siehe Tab. 9.1). Abgesehen vom dualsterischen Liganden Iper-8-phth war dieser Effekt jedoch bei keinem der untersuchten Agonisten signifikant.

Testsubstanz	Glas		Fibronectin		Differenz
	pEC ₅₀	n	pEC ₅₀	n	ΔpEC ₅₀
Oxotremorin M	7,27 ± 0,11	8	6,97 ± 0,21	5	0,30
Iperoxo	10,13 ± 0,26	5	9,81 ± 0,13	3	0,32
Iper-6-phth	6,67 ± 0,04	3	6,51 ± 0,21	4	0,16
Iper-8-phth	8,06 ± 0,07	4	7,61 ± 0,10*	4	0,45
Pilocarpin	5,51 ± 0,17	4	5,21 ± 0,21	2	0,30

Tab. 9.1 Einfluss von Fibronectin auf die Wirksamkeit muskarinischer Agonisten. Vergleich der Wendepunkte muskarinischer Agonisten aus DMR-Experimenten an CHO-hM₂, welche auf Glasplatten oder Fibronectin-beschichteten Platten durchgeführt wurden. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus der molaren Testsubstanz-Konzentration, welche eine halbmaximale Zellantwort hervorruft. n: Anzahl unabhängiger Experimente; ΔpEC₅₀: Differenz der Wirksamkeiten zwischen Glas und Fibronectin; *Statistik*: Unverbundener t-Test (* p < 0,05)

9.1.2. Zellzahlbestimmung von MRC-5 für DMR-Messungen

Für die Messung der M_2 -vermittelten dynamischen intrazellulären Massenumverteilung (DMR) in MRC-5 wurde zunächst die optimale Zellzahl bestimmt. Dazu wurden verschiedene Zellzahlen (5000 bis 30000 Zellen/Kavität) in Fibronectin-beschichteten epic[®]-Platten ausgesät. Am Tag der Messung wurde der Effekt des endogenen Liganden Acetylcholin in einer Konzentration von 100 μM untersucht. Der Maximaleffekt innerhalb der ersten 1800 s wurde für die Zusammenfassung der verschiedenen Versuchstage verwendet und das arithmetische Mittel in Form von Balkendiagrammen aufgetragen (siehe Abb. 9.3). Die Erhöhung der Zellzahl führte zunächst zu einer Signalzunahme, während sie ab einer Dichte von 20000 Zellen/Kavität wieder langsam abnahm. Mit den ausgesäten Zellzahlen 12500 und 15000 konnten DMR-Signale mit der stärksten Intensität erhalten werden. Folglich wurde im Rahmen dieser Arbeit die Zellzahl 12500 pro Kavität verwendet.

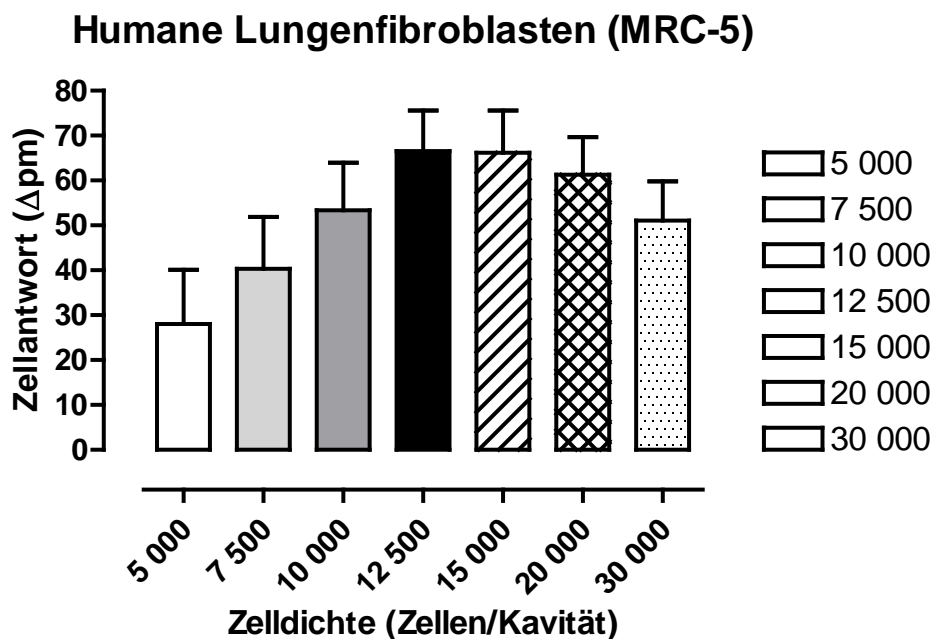


Abb. 9.3 Einfluss der Zellzahl auf das Acetylcholin-induzierte DMR-Signal in MRC-5. Dargestellt ist die durch Acetylcholin (100 μM) maximal induzierbare Zellantwort in Picomter. Für die Auswertung der Daten wurden die Maximaleffekte innerhalb von 1800 s verwendet. *Balken:* Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 4$, Achtfachbestimmung

Im Nachhinein erwies sich Acetylcholin aufgrund der Expression unspezifischer Cholinesterasen in MRC-5 (Kris et al. 1994) nicht als optimaler Agonist (siehe Kapitel 9.1.3).

9.1.3. Beeinflussung des Acetylcholin-induzierten DMR-Signals

Aufgrund der Expression unspezifischer Cholinesterasen in humanen Lungenfibroblasten (Kris et al. 1994), wurde die Beeinflussung des Acetylcholin-induzierten DMR-Signals mit dem Agonisten Oxotremorin M verglichen. Beide Agonisten wurden dafür in supramaximalen Konzentrationen von 100 μM untersucht. Die repräsentativen Originalregistrierungen in Abb. 9.4 A verdeutlichen den Unterschied des Acetylcholin-induzierten DMR-Signals im Vergleich zu Oxotremorin M. Acetylcholin induzierte ebenfalls ein in den positiv Messbereich ausgerichtetes DMR-Signal, jedoch wurde nach dem Erreichen des Maximaleffektes ein stärkerer Abfall der Signalintensität über die Zeit detektiert werden als im Fall von Oxotremorin M. Die Intensität des abfallenden DMR-Signals war an den verschiedenen Versuchstagen unterschiedlich stark ausgeprägt. Die Werte der Acetylcholin-induzierten Zellantworten wurden auf Oxotremorin M normiert und als maximal induzierbare Zellantwort innerhalb von 3600 s (MAX), sowie als Fläche unter der Kurve nach 3600 s (AUC = *area under the curve*) in einem Balkendiagramm aufgetragen (Abb. 9.4 B).

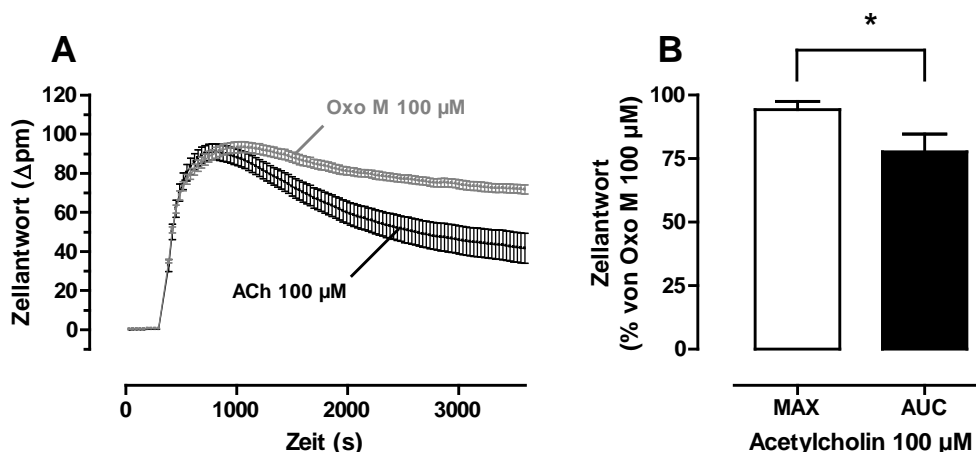


Abb. 9.4 Agonist-induzierte zelluläre dynamische Massenumverteilung in MRC-5: Dargestellt sind die Effekte von Acetylcholin (ACh) vs. Oxotremorin M (OxoM). (A) Repräsentative DMR-Originalregistrierungen; (B) Zusammenfassung aller unabhängigen Versuchstage in Form von Balkendiagrammen. Der ACh-Effekt wurde jeweils auf Oxo M normiert (MAX = Maximaleffekt innerhalb von 3600 s; AUC = Fläche unter der Kurve nach 3600 s). *Balken:* Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 7$, Vierfachbestimmung; *Statistik:* Unverbundener t-Test ($*p < 0,05$)

Während sich die durch Acetylcholin und Oxotremorin M induzierten Maximalwerte nicht voneinander unterscheiden, war der Unterschied bei der AUC signifikant (unverbundener t-Test, $p < 0,05$). Es ist vorstellbar, dass die Anwesenheit der

Cholinesterasen ebenfalls einen Einfluss auf die Wirksamkeit von Acetylcholin besitzt. Untersuchungen bezüglich der Wirksamkeitsbeeinflussung wurden im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht durchgeführt. Aufgrund der dargestellten Beeinflussung des DMR-Signals wurde der endogene Ligand nicht weiter bei Messungen mit humanen Lungenfibroblasten eingesetzt.

9.1.4. Vergleich unterschiedlicher Auswertungsmethoden zur Erhebung von Konzentrations-Effekt-Kurven in MRC-5

Die humane Lungenfibroblasten-Zelllinie MRC-5 wurde im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal mittels der dynamischen Massenumverteilung untersucht. Aufgrund des sich über die Messdauer hinweg verändernden DMR-Signals $G_{i/o}$ - und G_s -gekoppelter Rezeptoren, kamen zur Berechnung von Konzentrations-Effekt-Kurven unterschiedliche Messzeitpunkte sowie verschiedene Analyseverfahren in Frage. Analog zu den bereits von Frau Janßen durchgeführten Untersuchungen an CHO-Zellen (Janßen N., 2011; Schröder et al. 2011), wurde ebenfalls für die Fibroblasten die Auswirkungen unterschiedlicher Ablesezeitpunkte und Analyseverfahren auf die Konzentrations-Effekt-Kurven untersucht.

9.1.4.1. Untersuchung des $G_{i/o}$ -induzierten DMR-Signals

Da die humanen Lungenfibroblasten vornehmlich den muskarinischen M_2 -Rezeptor exprimieren (Kapitel 4.2.2), wurde für die Untersuchung des $G_{i/o}$ -vermittelten DMR-Signals der muskarinische Agonist Oxotremorin M eingesetzt. Oxotremorin M induzierte ein in den positiven DMR-Bereich ausgerichtetes Signal, welches nach Erreichen des Maximaleffektes wieder leicht zurückschwang (vornehmlich bei dem Einsatz hoher Agonist-Konzentrationen $> EC_{50}$). Als Ablesezeitpunkte wurde der Messwert nach 1200 s, 2400 s und 3600 s gewählt. Desweiteren wurde die Fläche unter dem DMR-Signal ($AUC = \textit{area under the curve}$) nach 1800 s und 3600 s ausgewertet, sowie der Maximaleffekt innerhalb von 188 und 3600 Sekunden ($MAX_{1800\ s}$ und $MAX_{3600\ s}$). Die Steilheit des ansteigenden DMR-Signals wurde mit einer Steigungstangente ermittelt, welche durch den letzten Messpunkt vor Substanzzugabe und den ersten vier Messpunkten nach Substanzzugabe verlief.

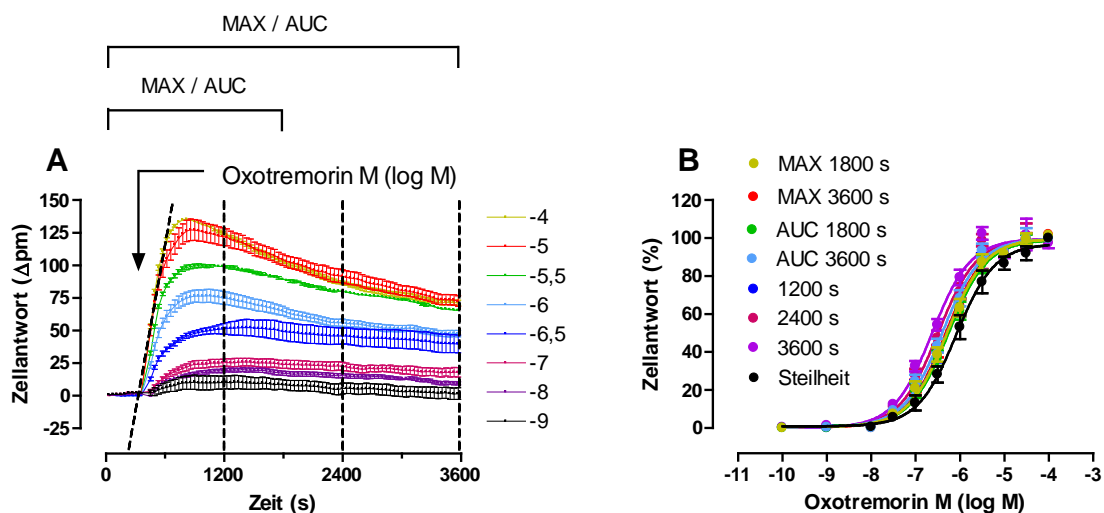


Abb. 9.5 Oxotremorin M-induzierte zelluläre dynamische Massenumverteilung in MRC-5. (A) Repräsentative Originalregistrierungen verschiedener Oxotremorin M-Konzentrationen; (B) Resultierende Konzentrations-Effekt-Kurven der verschiedenen Auswertungsmethoden aller unabhängiger Versuche. Für die Darstellung der Mittelwertskurven wurden die Kurven der einzelnen Versuchstage jeweils auf ihr oberes und unteres Plateau normiert. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Substanzzugabe. *Kurvenanpassung*: Vier-Parameter-logistische Gleichung; *Datenpunkte*: Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 9$, Vierfachbestimmung

Auswertungsmethode	pEC_{50}	n_H	n_H (frei)	n
MAX 1800 s	$6,29 \pm 0,09$	1	$0,86 \pm 0,08$	9
MAX 3600 s	$6,32 \pm 0,08$	1	$0,83 \pm 0,07^{\#}$	9
Messpunkt 1200 s	$6,29 \pm 0,09$	1	$0,88 \pm 0,08$	9
Messpunkt 2400 s	$6,49 \pm 0,07^{**}$	1	$0,94 \pm 0,09$	9
Messpunkt 3600 s	$6,61 \pm 0,06^{***}$	1	$1,01 \pm 0,10$	9
AUC 1800 s	$6,25 \pm 0,09$	1	$0,87 \pm 0,08$	9
AUC 3600 s	$6,40 \pm 0,08$	1	$0,91 \pm 0,08$	9
Steilheit	$6,03 \pm 0,12$	1	$0,86 \pm 0,10$	9

Tab. 9.2 Kenngrößen \pm Standardfehler der gemittelten Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abb. 9.5. pEC_{50} : Negativer dekadischer Logarithmus der molaren Oxotremorin M-Konzentration, welche eine halbmaximale Zellantwort hervorruft. n_H : festgesetzter Hill-Koeffizient; n_H (frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit; $\#$ signifikant bessere Anpassung der Kurvensteilheit mit variablem Hill-Koeffizienten als mit einem konstanten von $n_H = 1$ (F-Test, $p < 0,05$); n : Anzahl unabhängiger Experimente; *Statistik*: ANOVA, Tukey post-Test, ($** p < 0,01$, $*** p < 0,001$; signifikant verschieden zur Auswertungsmethode Steilheit)

Die Wirksamkeiten (pEC_{50}) der Konzentrations-Effekt-Kurven, die durch Anwendung unterschiedlicher Auswertungsmethoden erhoben wurden, unterschieden sich in den meisten Fällen nicht voneinander (siehe Tab. 9.2). Oxotremorin M wies bei der Auswertungsmethode Steilheit die schwächste Wirksamkeit auf, welche sich signifikant zu den Ablesezeitpunkten 2400 s und 3600 s unterschied (ANOVA; $p < 0,05$). Ausgenommen von dem Maximaleffekt innerhalb von 3600 s (MAX 3600 s) wiesen alle Konzentrations-Effekt-Kurven eine normale Steilheit auf (F-Test, $p > 0,05$). Es konnten jedoch auch die Datenpunkte der Auswertungsmethode MAX 3600 s an jedem einzelnen Versuchstag durch Kurven mit einer normalen Steilheit beschrieben werden. Folglich wurde die Mittelwertskurve mit einer Steilheit von $n_H = 1$ festgesetzt.

Die Beobachtung, dass nur kleine Unterschiede bei der Auswertung unterschiedlicher Ablesezeitpunkte bzw. Analysenmethoden auftraten, demonstriert die Robustheit der ermittelten Parameter (pEC_{50} , n_H) aus den Konzentrations-Effekt-Kurven. Mit Ausnahme der Steilheit und dem Messpunkt nach 3600 s, welche beide am stärksten vom arithmetischen Mittel aller Auswertungsmethoden abwichen, sind alle Auswertungsmethoden für zukünftige Messungen mit humanen Lungenfibroblasten zu empfehlen. Anzumerken ist jedoch, dass der Einsatz anderer Liganden sowie die Untersuchung anderer $G_{i/o}$ -gekoppelter Rezeptoren zu unterschiedlichen Ergebnissen führen können. Für die Dissertationsschrift wurde immer der Maximaleffekt innerhalb von 1800 s (MAX 1800 s) herangezogen.

9.1.4.2. Untersuchung des G_s -induzierten DMR-Signals

Von den adrenergen β -Rezeptoren wird in den humanen Lungenfibroblasten ausschließlich der β_2 -Rezeptor exprimiert (Lamyel et al., 2011), welcher zur Untersuchung des G_s -vermittelten DMR-Signals in MRC-5 diente. Als adrenerger Agonist wurde Orciprenalin verwendet, der ein in den negativen Messbereich ausgerichtetes DMR-Signal induzierte. Nach Erreichen des negativen Maximaleffektes, stieg das DMR-Signal wieder an (siehe Abb. 9.6 A). Aufgrund der Rückläufigkeit des DMR-Signals wurde auf die Auswertung nach fixen Zeitpunkten verzichtet und nur die AUC (= *area under the curve*) nach 1800 s, der innerhalb dieser Zeit auftretende Maximaleffekt (MAX 1800 s) und die Steilheit des DMR-Signals bestimmt. Die Steilheit wurde mittels einer Steigungstangente ermittelt, welche durch die ersten vierten Messpunkte nach Substanzzugabe verlief.

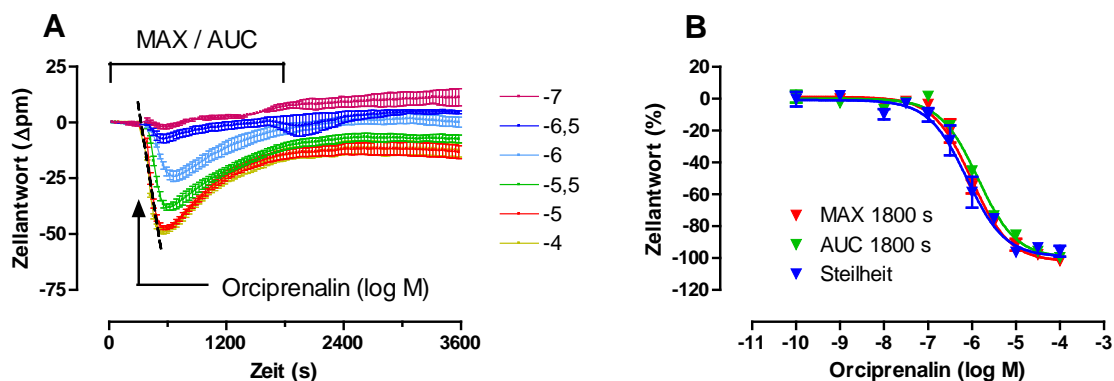


Abb. 9.6 Orciprenalin-induzierte DMR-Signale in MRC-5. (A) Repräsentative DMR-Originalregistrierungen verschiedener Orciprenalin-Konzentrationen; (B) Konzentrations-Effekt-Kurven der verschiedenen Auswertungsmethoden. Zur Darstellung der Mittelwertskurven wurden die Kurven der einzelnen Versuchstage jeweils auf ihr oberes und unteres Plateau normiert. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Substanzzugabe. *Kurvenanpassung:* Vier-Parameter-logistische Gleichung; *Datenpunkte:* Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 5$, Drei- bis Vierfachbestimmung

Auswertungsmethode	pEC_{50}	n_H	n_H (frei)	n
MAX 1800 s	$6,07 \pm 0,07$	-1	$-1,26 \pm 0,17$	5
AUC 1800 s	$5,86 \pm 0,01$	-1	$-1,20 \pm 0,14$	5
Steilheit	$6,18 \pm 0,13$	-1	$-1,21 \pm 0,26$	5

Tab. 9.3 Kenngrößen \pm Standardfehler der gemittelten Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abb. 9.6. pEC_{50} : Negativer dekadischer Logarithmus der molaren Orciprenalin-Konzentration, welche eine halbmaximale Zellantwort hervorruft. n_H : festgesetzter Hill-Koeffizient; n_H (frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit; n : Anzahl unabhängiger Experimente; *Statistik:* ANOVA, $p > 0,05$

Die mittels unterschiedlicher Auswertungsmethoden ermittelten Wirksamkeiten wichen nicht signifikant voneinander ab (ANOVA, $p > 0,05$). Die Kurvensteilheit zeigte ebenfalls keine Abhängigkeit von der Auswertungsmethode. Alle Kurven konnten mit einer normalen Steilheit ($n_H = -1$) angepasst werden (F-Test, $p > 0,05$). Hinsichtlich der gewählten Auswertungsmethoden waren alle untersuchten Methoden gleichwertig und können für zukünftige Messungen empfohlen werden. Für die Dissertationsschrift wurde immer der Maximaleffekt innerhalb von 1800 s herangezogen (MAX 1800 s).

9.1.5. Kopplungseffizienzen (τ) muskarinischer Agonisten

Um die Fähigkeiten der M_2 -Rezeptoraktivierung muskarinischer Agonisten besser beschreiben zu können, erfolgte die Berechnung des Kopplungsparameters (τ) nach dem von Black und Leff (1983) entwickelten 'operational model of agonism' (siehe Kapitel 3.11). Die dazu notwendigen funktionellen Untersuchungen wurden mittels der dynamischen Massenumverteilung durchgeführt.

Log τ ($G_{i/o}$)	CHO-hM ₂	CHO-hM ₂ + Fsk	MRC-5
Oxo M	1,65 ± 0,05	1,45 ± 0,05	0,91 ± 0,03
Iperoxo	2,15 ± 0,12**	1,89 ± 0,07**	1,10 ± 0,04*
Iper-8-phth	1,38 ± 0,05	0,83 ± 0,05**	0,26 ± 0,04**
Iper-6-phth	0,54 ± 0,05**	0,34 ± 0,03**	-0,10 ± 0,05**
Pilocarpin	0,67 ± 0,08**	0,11 ± 0,08**	-0,16 ± 0,08**

Tab. 9.4 Kopplungseffizienz muskarinischer Agonisten auf dem $G_{i/o}$ -Signalweg. Aufgelistet sind die logarithmierten Kopplungseffizienzen muskarinischer Agonisten zur Aktivierung inhibitorischer G-Proteine (log τ); Mittelwerte ± Standardfehler; n = 3 – 8; Statistik: ANOVA, Dunett's post-Test gegen Oxotremorin M (Oxo M) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

9.1.6. Beeinflussung des Agonist-induzierten DMR-Signals in MRC-5 nach Vorbehandlung mit MH 362-63-08

Der Effekt des $G_{q/11}$ -Inhibitors MH-362-63-08 (MH) auf das Agonist-induzierte DMR-Signal in MRC-5 wurde einmalig untersucht. Interessanterweise beeinflusste MH das DMR-Signal aller untersuchter muskarinischer Agonisten (Abb. 9.7), obwohl der Inhibitor selbst keine detektierbare Massenumverteilung zu induzieren vermag.

Im Fall von Pilocarpin und Iper-6-phth konnte nach MH-Vorbehandlung (1 μ M, 2 h) keine dynamische Massenumverteilung mehr detektiert werden (Abb. 9.7 B). Der Inhibitor scheint das muskarinisch vermittelte DMR-Signal aller Agonisten trotz fehlendem Eigeneffekt im Mittel um ca. 30-40 pm zu reduzieren. Die Ursache der reduzierten Signalintensität ist derzeit nicht erklärbar.

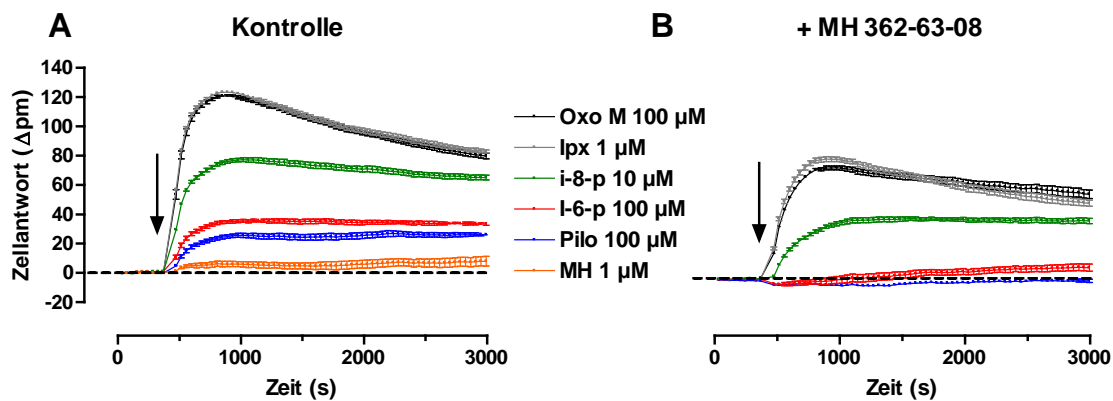


Abb. 9.7 Agonist-induzierte DMR-Signaturen in MRC-5 nach Ausschaltung von $G_{q/11}$ -Proteinen. Dargestellt sind DMR-Originalregistrierungen unter (A) Kontrollbedingungen und (B) nach MH-Vorbehandlung (1 μ g/ml, 2 h). Der Pfeil markiert jeweils den Zeitpunkt der Substanzzugabe. Die Nulllinie ist gestrichelt dargestellt. *Datenpunkte:* Mittelwerte \pm Standardfehler, Vierfachbestimmung

9.2 Stabilitätsuntersuchungen von kardialen Membranhomogenaten

Untersuchungen zur Stabilität kardialer Membranhomogenate erfolgten im 5 mM Na,K,PO₄-Puffer bei 23°C über einen Zeitraum von 48 Stunden. Für *mus musculus* wurde das Homogenat des Mausstamms CD1 verwendet und für *sus scrofa* das "konventionelle" Schweineherzhomogenat nach Tränkle et al. (1996) (HSV). Der Radioligand [³H]NMS wurde in einer Konzentration von 0,2 nM eingesetzt, die Gesamtbindung nach verschiedenen Inkubationszeiten bestimmt und jeweils auf den Wert der [³H]NMS-Bindung nach 2 Stunden Inkubation normiert. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurde Atropin in einer Konzentration von 1 µM eingesetzt.

Im Gegensatz zu *sus scrofa* wies *mus musculus* mit Zunahme der Inkubationszeit einen stärkeren Rückgang der Gesamtbindung auf. Überstieg die Inkubationszeit 24 Stunden war dagegen wieder eine Zunahme der Bindung detektierbar, welche jedoch ausschlich von unspezifischer Natur war (siehe Abb. 9.8 B).

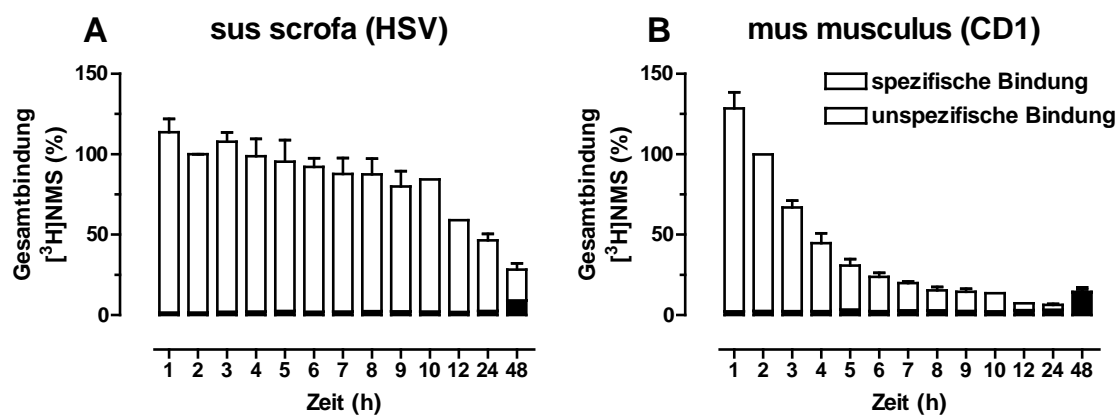


Abb. 9.8 Einfluss der Inkubationszeit auf die [³H]NMS-Bindung. Dargestellt ist die Gesamtbindung von [³H]NMS über einen Zeitraum von 48 Stunden. Die spezifischen Bindung ist in weiss, die unspezifischen in schwarz dargestellt. Die Bestimmung der unspezifischen Bindung erfolgte mit 1 µM Atropin. *Ordinate:* Prozentuale Gesamtbindung des Radioliganden [³H]NMS, welche auf den Wert nach 2 Stunden des jeweiligen Versuchstages normiert ist. *Abszisse:* Zeit in Stunden (h); *Balken:* Mittelwerte ± Standardfehler, n = 3, Doppelbestimmung; *Inkubationsbedingungen:* Na,K,P_i-Puffer (5 mM, pH 7,4) bei 23°C; [³H]NMS-Konzentration: 0,2 nM; Proteinkonzentrationen: 293 µg/1,5 ml (HSV), 536 µg/1,5 ml (CD1)

Die Berechnung der Halbwertszeit für die Abnahme der spezifischen Bindung betrug für das Schweineherzhomogenat $14,3 \pm 0,6$ h, während das Mäuseherzhomogenat eine Halbwertszeit von nur $1,9 \pm 0,1$ h aufwies (Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 3$).

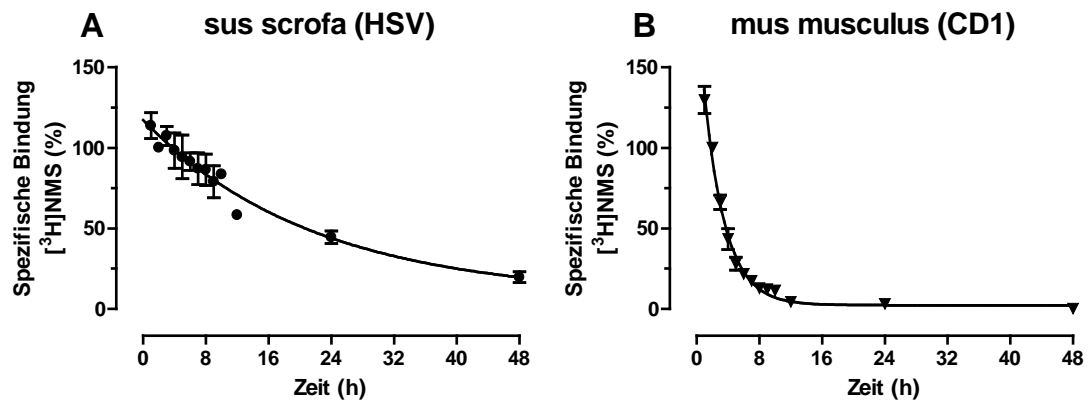


Abb. 9.9 Einfluss der Inkubationszeit auf die spezifische [³H]NMS-Bindung. Ordinate: Prozentuale spezifische Bindung des Radioliganden [³H]NMS, welche auf den Wert nach 2 Stunden des jeweiligen Versuchstages normiert ist. Abszisse: Zeit in Stunden (h); Kurvenanpassung: Einphasige exponentielle Zerfallsfunktion; Datenpunkte: Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 3$, Doppelbestimmung; Inkubationsbedingungen: Na,K,P_i-Puffer (5 mM, pH 7,4) bei 23°C; [³H]NMS-Konzentration: 0,2 nM; Proteinkonzentrationen: 293 μ g/1,5 ml (HSV), 536 μ g/1,5 ml (CS1)

Um den Einfluss der Inkubationszeit auf die Rezeptorzahl (B_{max}) und die Affinität des Radioliganden zum Rezeptor (K_D) zu erhalten, wurden homologe Wettbewerbsversuche nach 2 und 7 Stunden durchgeführt. Im Fall der Mäuseherzhomogenate führte die Verlängerung der Inkubationszeit zu einem starken Abfall der [³H]NMS-Bindung und äußerte sich in einer Reduzierung der Rezeptorzahl (B_{max}). Neben B_{max} war ebenfalls die Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_D) von [³H]NMS beeinflusst und äußerte sich in einer Reduzierung der Affinität des Radioliganden zum Rezeptor. B_{max} und K_D waren beim Mäuseherzhomogenat in beiden Fällen signifikant beeinflusst (unverbundener t-Test, $p < 0,05$). Demgegenüber wirkte sich die Inkubationszeit von 7 Stunden nicht auf das Schweineherzhomogenat aus, weder hinsichtlich der Anzahl der Bindungsstellen noch bezüglich der Affinität des Radioliganden zum Rezeptor. Alle Kurven konnten mit einer normalen Steilheit (F-Test, $p > 0,05$) angepasst werden, was für eine bestehende 1:1-Interaktion von Radioligand und Rezeptor spricht.

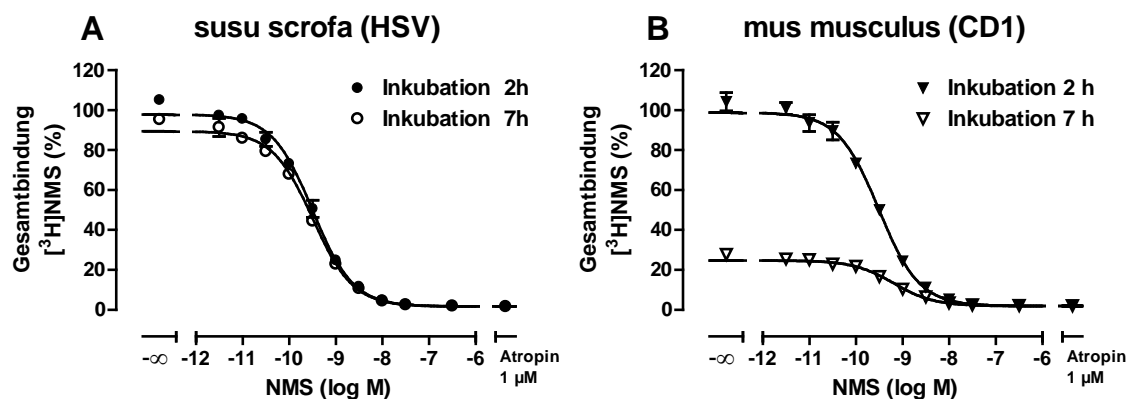


Abb. 9.10 Homologe Konkurrenz nach 2 und 7 Stunden. Ordinate: Prozentuale Gesamtbindung des Radioliganden [³H]NMS, welche auf das obere Plateau der Bindungskurve nach 2 Stunden normiert ist. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren NMS-Konzentrationen; Kurvenanpassung: Vier-Parameter-logistische Gleichung; Datenpunkte: Mittelwerte ± Standardfehler, n = 3, Doppelbestimmung; Inkubationsbedingungen: Na,K,P_i-Puffer (5 mM, pH 7,4) bei 23°C; [³H]NMS-Konzentration: 0,2 nM; Proteinkonzentrationen: 293 µg/1,5 ml (HSV), 536 µg/1,5 ml (CD1)

Homogenat	pK _D	B _{max} (fmol/mg Protein)	n _H (frei)	n
HSV (2 h)	10,02 ± 0,13	99 ± 2	-0,98 ± 0,04	3
HSV (7 h)	10,03 ± 0,12	90 ± 9	-0,97 ± 0,04	3
CD1 (2 h)	10,00 ± 0,10	55 ± 1	-0,99 ± 0,05	3
CD1 (7 h)	9,43 ± 0,07**	26 ± 2***	-0,92 ± 0,08	3

Tab. 9.5 Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Bindungs-Kurven aus Abb. 9.10. pK_D: Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten von [³H]NMS; B_{max}: Anzahl der Bindungsstellen in fmol pro mg Protein; n_H (frei): Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit; n: Anzahl unabhängiger Experimente; Statistik: Unverbundener t-Test (2 h vs. 7 h) (** p < 0,01, *** p < 0,001)

Die erhobenen Daten belegen, dass lange Inkubationszeiten mit Homogenaten aus Mäuseherzen ungünstig sind. Im Fall von längeren Inkubationszeiten ist folglich immer die Kontrolle der Radioligandaffinität zum Rezeptor zu überprüfen. Eine Ursache für die schlechte Stabilität der murinen Homogenate könnte durch eine erhöhte Anzahl von Enzymen (z.B. Proteasen) im Mäuseherzhomogenat bedingt sein, welche die Rezeptoren während der Inkubation schädigen.

9.3 Funktionelle Untersuchungen mit Kardiomyozyten aus ES-Zellen

Die Durchführbarkeit der funktionellen Untersuchung von Herzmuskelzellen mittels der dynamischen Massenumverteilung (DMR) erfolgte mit Kardiomyozyten aus embryonalen Stammzellen (ES-Zellen). Im Gegensatz zu primären Zellen aus kardialem Gewebe, welche präparationsbedingt neben Kardiomyozyten noch weitere Zellarten aufweisen (z.B. Fibroblasten, Endothelzellen, etc.), ermöglicht der Einsatz von Stammzellen den Erhalt einer reinen Kardiomyozytenpopulation.

Bei dem verwendeten ES-Klon handelte es sich um den α PIG-Klon, dessen Namensgebung durch die Einführung des in Abb. 9.11 abgebildeten bizistronischen Vektors in murine ES-Zellen bedingt ist (α PIG = α -MHC_Puromycin_IRES_GFP). Der α PIG-Klon weist eine Resistenz gegenüber dem Aminoglycosid Puromycin auf, welche unter Kontrolle des Kardiomyozyten-spezifischen Promotors α -MHC steht (*α -myosin heavy chain*). Alle Zellen, welche sich zu Kardiomyozyten entwickeln, besitzen folglich diese Antibiotikaresistenz, während alle Nicht-Kardiomyozyten durch die Gabe von Puromycin absterben. Das Gen für die Puromycinresistenz ist durch eine IRES-Sequenz (IRES = internal ribosome entry site) mit dem eGFP-Reportergen (*eGFP = enhanced green fluorescent protein*) verbunden, wodurch der optimale Zeitpunkt für die Puromycinbehandlung angezeigt wird. Durch die IRES-Sequenz werden Loop-Strukturen ausgebildet, welche das Ribosom nach Ende der Expression des ersten Gens an der mRNA halten. Dies ermöglicht die anschließende Expression des grünen Fluoreszenzproteins eGFP (*enhanced Green Fluorescence Protein*). Alle Zellen, welche eine Fluoreszenz aufwiesen, besaßen folglich auch die Antibiotikaresistenz.



Abb. 9.11 Schematische Darstellung des bizistronischen Vektors (Kolossoff et al., 2006).

9.3.1. Generierung von Kardiomyozyten aus ES-Zellen

Die Differenzierung zu Herzmuskelzellen aus ES-Zellen erfolgte über die Bildung von Zellaggregaten (embroid bodies = EB's) in Suspensionskultur (Kolossov et al., 2006). Erste eGFP-positive Zellen konnten 7 -9 Tage nach Überführung der ES-Zellen in Differenzierungsmedium identifiziert werden. Mit der Puromycinbehandlung (10 µg/ml) wurde an Tag 9 - 10 begonnen. Bereits zwei Tage nach Puromycingabe waren fast alle eGFP-negativen Zellen abgestorben (Abb. 9.12). Ein Mediumwechsel fand alle 2-3 Tage statt.

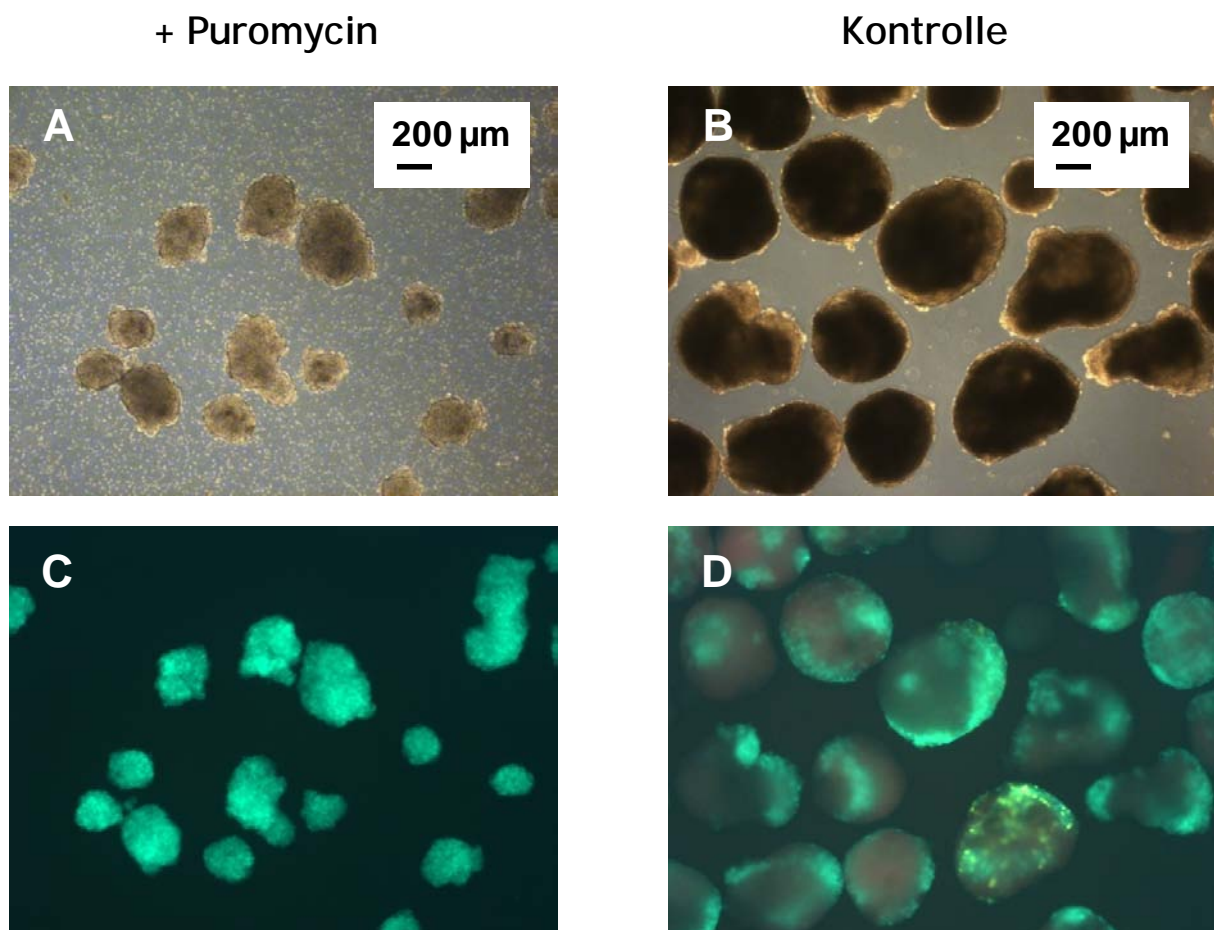


Abb. 9.12 *Embroid bodies* (EBs) an Tag 11 nach Überführung der Stammzellen in Differenzierungsmedium. Dargestellt sind Aufnahmen in An- und Abwesenheit von Puromycin (10 µg/ml, 2 d); (A und B) Durchlichtaufnahmen; (C und D) Fluoreszenzaufnahmen

Die enzymatische Dissoziation der EB's in Einzelzellen (Kolossov et al., 2006) erfolgte 3–4 Tage nach Beginn der Puromycinbehandlung. Je länger die Antibiotikabehandlung andauerte, umso fester wurde der Zellverband in den EB's und erschwerte die anschließende enzymatische Dissoziation in Einzelzellen. Nach der Dissoziation wurden die Zellen unter Zuhilfenahme von Tryphanblau in einer

Messkammer gezählt und auf auf Gelatine-beschichtete Glasplatten oder in Fibronectin-beschichteten epic[®]-Platten ausgesäht.

Differenzierungsmedium (100 ml)

77,9 ml	IMDM	(R28)
20 ml	Fötale Kälberserum (Invitrogen)	(R27)
1 ml	Penicillin/Streptomycin	(R33)
1 ml	Nicht-essentielle Aminosäuren (Invitrogen)	(R30)
100 µl	2-Mercaptoethanol-Stammlösung (100 mM)	(R25)

9.3.2. Untersuchung der Agonist-induzierten zellulären dynamischen Massenverschiebung (DMR)

Nach der Aussaat verschiedener Zellzahlen wurden die Zellen für weitere 48 h unter Puromycin in den epic[®]-Platten kultiviert. In einer Dichte von 10.000 Zellen/well bildete sich ein dichter Zellrasen mit eGFP-positiven Zellen (Abb. 9.13) und spontane Kontraktionen konnten visuell beobachtet werden. Aufgrund der geringen Zellausbeute wurden alle Messungen nur mit der Zellzahl 10.000 durchgeführt. Die Testung der Agonist-induzierten Zellantwort erfolgte mit dem endogenen Liganden Acetylcholin in einer Konzentration von 100 µM. Am Tag der Messung besaßen die Zellen ein Alter von 14 Tagen.

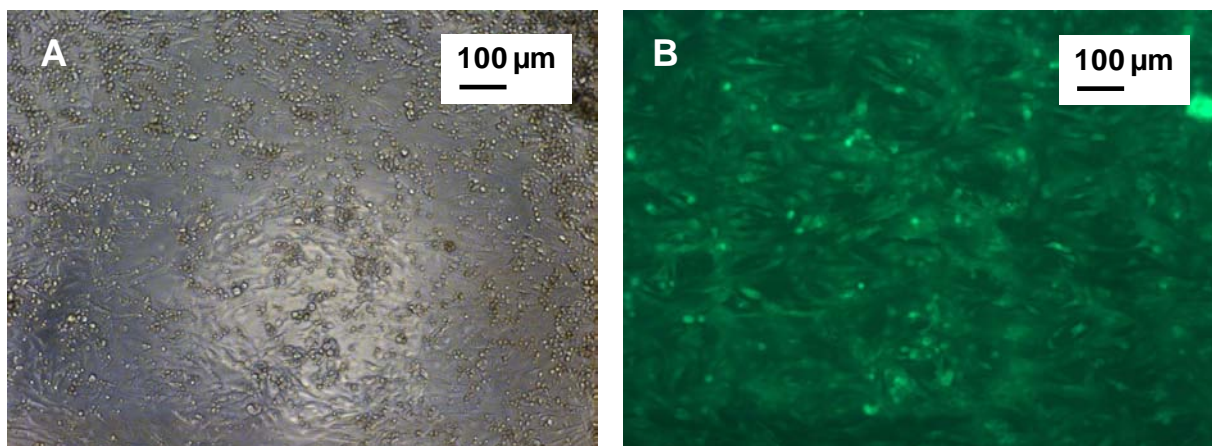


Abb. 9.13 In epic[®]-Platten ausplatierte ES-Zellen 2 Tage nach der enzymatischen Isolation. (A) Durchlichtaufnahmen; (B) Fluoreszenzaufnahmen; Die Plattierung der Zellen erfolgte auf Fibronectin-beschichteten epic[®]-Platten (10 000 Zellen pro Kavität).

Es konnte an keinem der drei unabhängigen Messtage eine Zellantwort detektiert werden. Eine einmalige Testung des direkten Aktivators der Adenylylzyklase Forskolin vermochte ebenfalls keine detektierbare dynamische Massenumverteilung zu induzieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen diese Kardiomyozyten nicht mit dem optischen Biosensor zu vermessen sind.

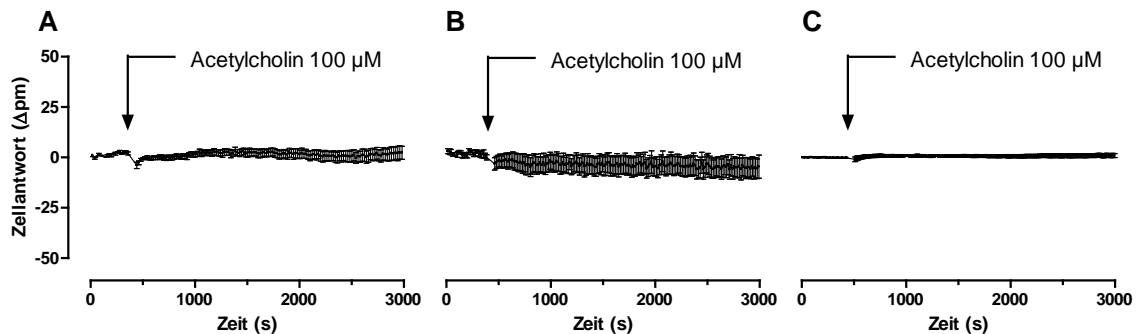


Abb. 9.14 Acetylcholin-induzierte DMR-Signaturen. Dargestellt sind repräsentative DMR-Originalregistrierungen von drei verschiedenen Präparationen (A - C). Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der ACh-Zugabe. *Ordinate:* Zellantwort in Picometer; *Abszisse:* Zeit in Sekunden; *Datenpunkte:* Mittelwerte \pm Standardfehler, Vier- bis Sechsfachbestimmung

Mitarbeiter der Firma Corning (Sylvie Bailly & Volker Eckelt; Epic® Application Center/Europe) berichteten in einer Telefonkonferenz ebenfalls über die Schwierigkeit der Vermessung von Kardiomyozyten, welche aus Stammzellen gewonnen wurden. Bei den von Ihnen verwendeten Zellen handelte es sich um die käuflich zu erwerbenden Cor.At®-Zellen. Diese zeigten im normalen Messpuffer (HBSS + 20 mM HEPES) ebenfalls kein detektierbares DMR-Signal (mündliche Mitteilung). Anschließende Messungen in Medium führten zwar zur Aufnahme von DMR-Signale, dessen Spezifität jedoch nicht nachgewiesen werden konnte.

9.3.3. Untersuchung des negativ chronotropen Effektes von Acetylcholin

Frequenzmessungen an Einzelzellen wurden ebenfalls durchgeführt, um die allgemeine Ansprechbarkeit der Zellen auf Acetylcholin zu überprüfen. Der Einfluss von Acetylcholin auf die spontane Schlagfrequenz der Zellen wurde an dissoziierten eGFP-positiven ES-Zellen (Tag 14) untersucht (Abb. 9.15), welche alle eine spontane Schlagfrequenz aufwiesen.

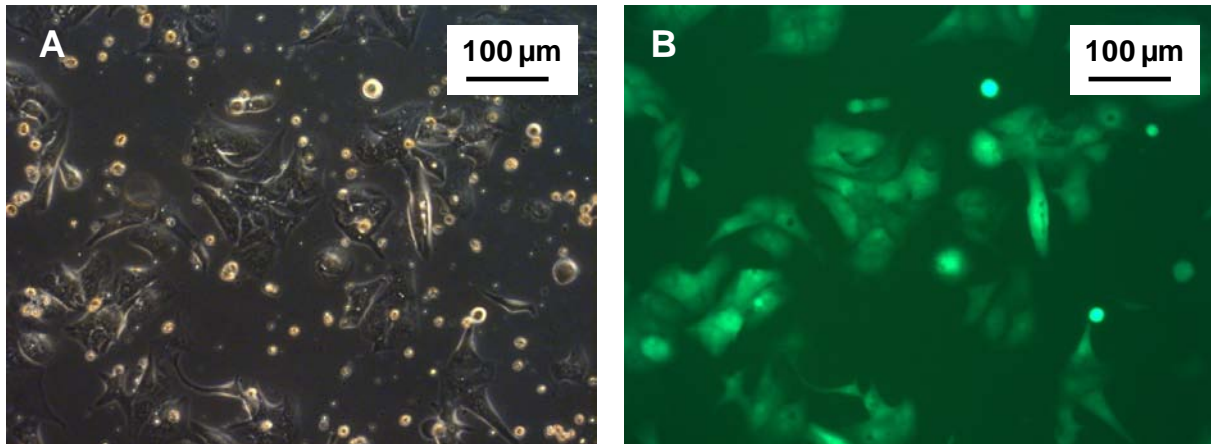


Abb. 9.15 Auf Gelatine-beschichteten Glasplatten ausplatierte Kardiomyozyten aus ES-Zellen 2 Tage nach der enzymatischen Isolation. (A) Durchlichtaufnahmen; (B) Fluoreszenzaufnahmen; Alle Zellen wiesen eine spontane Schlagfrequenz auf.

Nach Beobachtung der basalen Schlagfrequenz (*bpm* = *beats per minute*) für ca. 3 Minuten wurden die Zellen mit dem muskarinischen Agonisten Acetylcholin in einer Konzentration von 100 µM superfundiert (siehe Abb. 9.16). Alle Zellen reagierten auf Acetylcholin negativ chronotrop. Vier der fünf untersuchten Zellen hörten dabei gänzlich auf zu schlagen. Nach einer Superfusion von ca. 1 - 2 Minuten konnten jedoch überraschenderweise wieder spontane Kontraktionen detektiert werden. Dieser Gegenregulationseffekt (*'rebound'*) war so stark ausgeprägt, dass die spontane Schlagfrequenz wieder $71 \pm 3\%$ der Ausgangsfrequenz erreichte (Mittelwert \pm Standardfehler; $n = 5$).

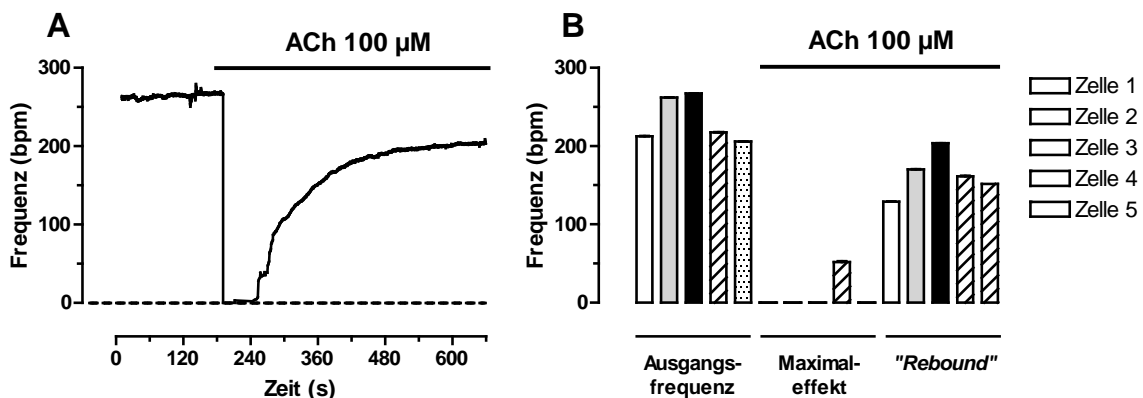


Abb. 9.16 ACh-Effekt auf die Schlagfrequenz isolierter Kardiomyozyten aus ES-Zellen. (A) Representative Originalregistrierung; Dargestellt ist die spontane Schlagfrequenz in Schlägen pro Minute über die Zeit in Sekunden. Die Zugabe von Acetylcholin 100 µM ist durch einen schwarzen Balken gekennzeichnet. Die Nulllinie ist gestrichelt dargestellt. (B) Auftragung der gemittelten Schlagfrequenz der vermessenen Zellen in Schlägen pro Minute. Dargestellt sind Ausgangsfrequenz vor Superfusion der Zellen mit ACh, der ACh-induzierte Maximaleffekt und der Gegenregulationseffekt in Gegenwart von ACh (*'rebound'*). *Datenpunkte:* Mittelwerte \pm Standardfehler

Da sich embryonale Kardiomyozyten im Lauf der Entwicklung hinsichtlich der Expression und Funktionsweise von Rezeptoren, Ionenkanälen und Enzymen deutlich von adulten Zellen unterscheiden (Heschler et al.; 1999, Malan und Fleischmann, 2012), könnte das Alter der untersuchten Zellen hinsichtlich der beobachteten Effekte in den Frequenzmessungen eine große Rolle spielen. Die aus ES-Zellen gewonnenen Kardiomyozyten entsprechen eher dem früh- bis mittleren embryonalen Entwicklungsstadium und könnten deshalb anders auf ACh ansprechen als spätembryonale Zellen.

Im adulten Herzen induziert die Aktivierung des muskarinischen M_2 -Rezeptors die Öffnung Acetylcholin-abhängiger Kaliumkanäle ($I_{K,ACh}$), die Reduktion der Schrittmacherströme (I_f) und hemmt den Calciumeinstrom (I_{Ca}), was in einer Reduzierung der Herzfrequenz resultiert (Klabunde RE, 2011). Zwar zeigen bereits frühembryonale Kardiomyozyten einen Carbachol-induzierten negativ chronotropen Effekt, jedoch ohne Beteiligung von $I_{K,ACh}$ (Heschler et al., 1999). Demgegenüber werden die cAMP-abhängigen Schrittmacherkanäle im frühembryonalen Stadium stark exprimiert (Abi-Gerges et al., 2000; Song et al., 2002; Kolossov et al., 2005). Ihre Aktivität wird im frühembryonalen Stadium über die M_2 -vermittelte Produktion von NO und der anschließender Aktivierung cGMP-PDE₂-vermittelter Signalwege gesteuert (Lang et al., 2007). Die Aktivierung des NO-cGMP-PDE₂-Signalwegs führt vermutlich über eine Reduzierung der Schrittmacherströme (I_f) und des Calciumeinstroms (I_{Ca}) zum detektierten negativ chronotropen Effekt (siehe Abb. 9.17). Eventuell unterliegt der Signalweg mit der Zeit einer Desensitisierung, was den beobachteten 'rebound'-Effekt erklären würde, welcher sich in einer Zunahme der spontanen Schlagfrequenz in Gegenwart von ACh äußerte.

Das Alter der verwendeten Kardiomyozyten aus ES-Zellen spielt wie in den Frequenzmessungen gezeigt eine große Rolle hinsichtlich der Ergebnisse und sollte vor Durchführung weiterer Versuche mit diesen Zellen bedacht werden.

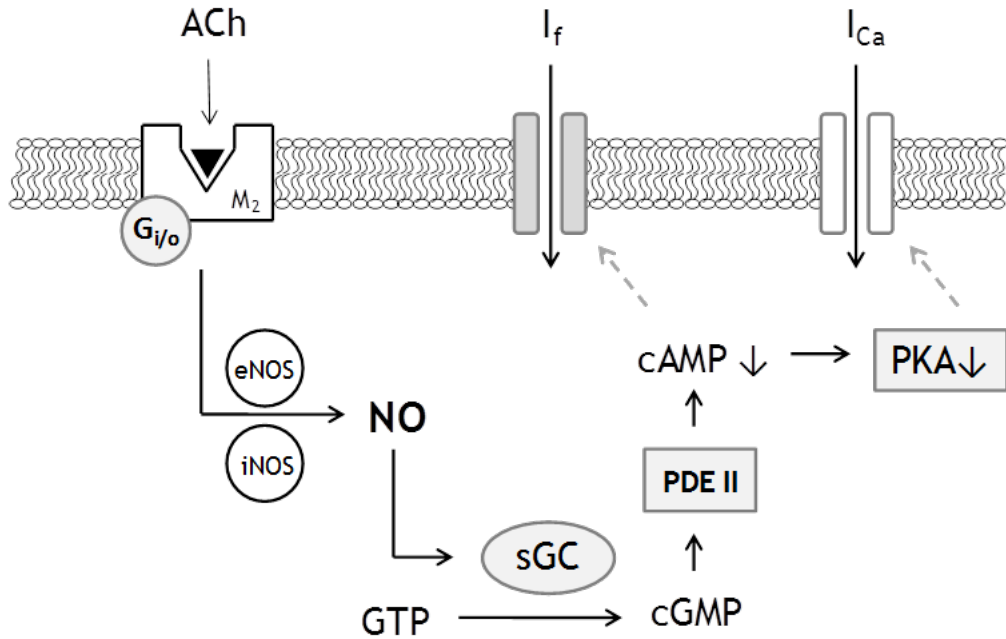


Abb. 9.17 NO-cGMP-PDE₂-Signalweg: Dargestellt ist der postulierte Mechanismus des M₂-vermittelten negativ chronotropen Effektes in Kardiomyozyten (Tag 14) aus ES-Zellen. *ACh*: Acetylcholin; *eNOS*: endotheliale NO-Synthase; *iNOS*: induzierbare NO-Synthase; *NO*: Stickstoffmonoxid; *GTP*: Guanosin triphosphat; *sGC*: lösliche Guanylylzyklase; *cGMP*: cyclisches Guanosinmonophosphat; *PDE II*: Phosphodiesterase II; *cAMP*: cyclisches Adenosinmonophosphat; *PKA*: Proteinkinase A; *I_f*: Schrittmacherstrom; *I_{Ca}*: Calciumstrom (modifiziert nach Ji et al., 1999)

10 Veröffentlichungen

10.1 Publikationen

Schröder R, Schmidt J, Blättermann S, Peters L, Janssen N, Grundmann M, **Seemann W**, Kaufel D, Merten N, Drewke C, Gomeza J, Milligan G, Mohr K, Kostenis E (2011) Applying label-free dynamic mass redistribution technology to frame signaling of G protein-coupled receptors noninvasively in living cells. *Nat Protoc* **6**(11): 1748-1760.

Lamyel F, Warnken-Uhlich M, **Seemann WK**, Mohr K, Kostenis E, Ahmedat AS, Smit M, Gosens R, Meurs H, Miller-Larsson A, Racké K (2011) The beta2-subtype of adrenoceptors mediates inhibition of pro-fibrotic events in human lung fibroblasts. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **384**(2): 133-145.

Ahmedat AS, Warnken M, **Seemann WK**, Mohr K, Kostenis E, Juergens UR, Racké K (2012) Pro-fibrotic processes in human lung fibroblasts are driven by an autocrine paracrine endothelinergic system. *Br J Pharmacol* [Epub ahead of print]

Schrage R, **Seemann WK**, Klöckner J, Dallanoce C, Racké K, Kostenis E, De Amici M, Holzgrave U, Mohr K (2012) Agonists with supraphysiological efficacy at the muscarinic M₂ acetylcholine receptor. *Br J Pharmacol* [Epub ahead of print]

10.2 Abstrakta / Kongressbeiträge

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Frankfurt: **Seemann W**, Wenzel D, Sasse P, Warnken M, Kostenis E, Racké K, Fleischmann B and Mohr K (2011) Dualsteric GPCR-targeting: whole cell response to M₂ receptor activation is cell type-dependent. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* **381** (Suppl 1): 17 (Poster)

Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG), Braunschweig: **Seemann W**, Wenzel D, Sasse P, Fleischmann B and Mohr K (2010) Promiscuous signaling pathway activation by oxotremorine M via the muscarinic M₂ acetylcholine receptor in primary cells. (Poster)

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Mainz: **Seemann W**, Wenzel D, Sasse P, Kebig A, Mohr-Andrä M, Fleischmann B and Mohr K (2010) Biased signaling of a dualsteric muscarinic agonist in spontaneously contracting atrial cardiomyocytes. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 381 (Suppl 1): 12 (Vortrag)

Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft (DPG), Gießen: **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 Physiol* 195 (Suppl 669): P165 (Poster)

11 Danksagung

Ich danke der NRW-Forschungsschule BIOTECH-PHARMA, welche mich im Rahmen meiner Promotionsarbeit finanziell sowie fachlich gefördert hat. Die Mitgliedschaft in der Forschungsschule ermöglichte es mir mich fachlich mit anderen Doktoranden auszutauschen sowie einen Einblick in andere Arbeitsgebiete zu erlangen.

Mein besonderer Dank gilt vor allem meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Klaus Mohr für die ausgezeichnete Betreuung während der Durchführung dieser Promotionsarbeit. Auf seine Bereitschaft sich fachlich mit mir auszutauschen konnte ich mich stets verlassen. Diese konstruktiven Gespräche sowie die angenehme Zusammenarbeit haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Christian Steinhäuser danke ich für die Co-Betreuung dieser Promotionsarbeit während meiner Zeit in der Forschungsschule BIOTECH-PHARMA und für die freundliche Übernahme der Position des Zweitgutachters.

Herrn Prof. Dr. Bernd Fleischmann danke ich für seine Mitwirkung in der Prüfungskommission und die Möglichkeit in seinem Labor tätig gewesen zu sein. Seine fachlich konstruktive Kritik und die intensive Unterstützung während meiner Promotion haben mich sehr beeindruckt.

Herrn Prof. Dr. Holger Fröhlich möchte ich für seine Mitwirkung in der Prüfungskommission danken.

Mein Dank gilt außerdem Frau Prof. Dr. Evi Kostenis für die schöne Zusammenarbeit und die aktive Unterstützung während meiner Promotionszeit. Ihre konstruktive Kritik hat mich stets angeregt tiefer über meine Arbeit nachzudenken.

Herrn Prof. Dr. Kurt Racké und Frau Dr. Mareille Warnken danke ich für die produktive Zusammenarbeit und die Unterstützung bei der Charakterisierung der human Lungenfibroblasten.

Ein großer Dank gilt zudem Herrn Prof. Dr. Rainer Meyer, der mich zu Beginn meiner Promotionszeit betreut und stets bei meinen Versuchen hilfreich unterstützt hat.

Außerdem danke ich Frau Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe und Herrn Prof. Dr. Marco De Amici sowie deren Mitarbeitern für die Synthese und die Bereitstellung der dualsterischen Liganden und des orthosterischen Agonisten Iperoxo.

Alle Arbeitskreise, in denen ich extern tätig gewesen bin haben mich immer freundlich aufgenommen und waren stets bereit mir hilfeich zur Seite zu stehen. Dafür möchte ich den Mitarbeitern der Arbeitskreise von Herrn Prof. Bernd Fleischmann, Frau Prof. Dr. Evi Kostenis, Herrn Prof. Dr. Kurt Racké und Herrn Prof. Dr. Rainer Meyer danken. Dies gilt besonders für Frau Dr. Daniela Wenzel, ohne deren Hilfe viele Erkenntnisse dieser Arbeit nicht zustande gekommen wären. Ihr Beitrag zum Gelingen meiner Arbeit war groß und dafür möchte ich mich herzlich bedanken.

Allen ehemaligen Kollegen der Abteilung Pharmakologie und Toxikologie danke ich für die gute Zusammenarbeit und die schöne Arbeitsatmosphäre. Besonders mit Frau Ramona Schrage verbindet mich eine tolle Zeit im gemeinsamen Büro mit vielen konstruktiven Gesprächen und schönen Erinnerungen.