

# **Untersuchung der präferentiellen und alternativen Signalwegsaktivierung muskarinischer M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>- Rezeptoren mithilfe von molekularen Testsonden**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Justine Karoline Etscheid, geb. Grzeska**

aus

Kattowitz/Polen

Bonn 2017



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

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

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

Tag der mündlichen Prüfung: 2. August 2017

Erscheinungsjahr: 2018



<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	Überblick zu muskarinischen Acetylcholinrezeptoren .....	1
1.2	G-Proteinaktivierung und intrazelluläre Signalwege .....	2
1.3	Rezeptortheorien.....	4
1.4	Promiskuitive Signalwegsaktivierung und <i>ligand bias</i> .....	5
1.5	Iperoxo und dualsterische Liganden zur Untersuchung von mACh-Rezeptoren.....	6
1.6	Fragestellung .....	8
<b>2</b>	<b>METHODEN UND MATERIAL.....</b>	<b>9</b>
2.1	<b>Methoden.....</b>	<b>9</b>
2.1.1	<b>Zellbiologisches Arbeiten.....</b>	<b>9</b>
2.1.1.1	Zellbiologisches Arbeiten.....	9
2.1.1.2	Herstellung von Zellmembranhomogenaten.....	10
2.1.1.3	Proteinbestimmung nach Lowry.....	11
2.1.2	<b>Funktionelle Experimente.....</b>	<b>12</b>
2.1.2.1	[ <sup>35</sup> S]GTPγS-Bindungsexperimente zur Messung der G <sub>i</sub> -Proteinaktivierung.....	12
2.1.2.2	Messung der cAMP-Bildung nach PTX-Vorbehandlung als Maß für die G <sub>s</sub> -Proteinaktivierung ..	14
2.1.2.3	Gleichzeitige Messung der G <sub>i</sub> - und G <sub>s</sub> -Proteinaktivierung im cAMP-Assay .....	16
2.1.2.4	Einsatz von N-Ethylmaleimid zur G <sub>i</sub> -Inhibition im cAMP-Assay .....	18
2.1.3	<b>Radioligand-Bindungsstudien mit [<sup>3</sup>H]NMS .....</b>	<b>20</b>
2.1.3.1	Theoretische Grundlagen von Radioligand-Bindungsstudien.....	20
2.1.3.2	Bestimmung der Radioligand-Konzentration.....	21
2.1.3.3	Homologe Kompetitionsexperimente mit Zellmembranhomogenaten zur Berechnung von K <sub>D</sub> und B <sub>max</sub> .....	22
2.1.3.4	Homologe Kompetitionsexperimente mit lebenden Zellen zur Bestimmung der Rezeptorexpression .....	25
2.1.3.5	Heterologe Kompetitionsexperimente mit [ <sup>3</sup> H]NMS und Agonisten .....	26
2.1.3.6	Bestimmung der Dissoziationshalbwertszeit des Radioliganden .....	28
2.1.3.7	Zwei-Punkt-kinetische Experimente .....	29
2.1.4	<b>Ex-vivo Untersuchungen (Superfusion).....</b>	<b>32</b>
2.1.4.1	Versuchstiere .....	32
2.1.4.2	Superfusionsmethode zur Erfassung der Acetylcholin-Freisetzung bei Stimulation von inhibitorischen Autorezeptoren .....	32
2.1.4.3	Einsatz von N-Ethylmaleimid zur Hemmung der G <sub>i</sub> -Kopplung.....	35
2.1.5	<b>Nichtlineare Regressionsanalyse funktioneller Experimente und Modelle zur Bias-Berechnung ...</b>	<b>36</b>
2.1.5.1	Vier-Parameter-logistische Gleichung bei einfachen Konzentrations-Effekt-Beziehungen.....	36
2.1.5.2	Glockenförmige Konzentrations-Effekt-Beziehungen .....	37
2.1.5.3	Operational Model.....	37
2.1.5.4	Anwendung des Operational Modells zur Berechnung von Bias-Faktoren .....	40
2.1.5.5	Berechnung des Bias-Faktors β <sub>lig</sub> .....	41
2.1.5.6	Berechnung des Bias-Faktors ΔΔlog(τ/K <sub>A</sub> ) .....	42
2.1.5.7	Berechnung des Bias-Faktors ΔΔlog(RA <sub>i</sub> ) .....	44

<b>2.1.6</b>	<b>Statistische Methoden</b> .....	<b>46</b>
2.1.6.1	Deskriptive Statistik .....	46
2.1.6.2	Fehlerfortpflanzung .....	46
2.1.6.3	F-Test .....	47
2.1.6.4	t-Test.....	47
2.1.6.5	ANOVA und Dunnett-post-Test .....	48
<b>2.2</b>	<b>Material</b> .....	<b>49</b>
2.2.1	Radioaktiv markierte Substanzen .....	49
2.2.2	Orthosterische mAChR-Liganden .....	50
2.2.3	Molekulare Sonden (Testsubstanzen).....	51
2.2.4	Chemikalien und Reagenzien.....	52
2.2.5	Lösungen .....	53
2.2.6	Kommerzielle Analysesets („Assaykits“).....	55
2.2.7	Verbrauchsmaterialien .....	55
2.2.8	Geräte .....	55
2.2.9	Computerprogramme.....	56
2.2.10	Herstellerverzeichnis .....	56
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>58</b>
3.1	Funktionelle Charakterisierung der molekularen Testsonden .....	58
3.1.1	Aktivierung des präferentiellen Signalwegs (G <sub>i</sub> ) durch den M <sub>4</sub> -Rezeptor .....	58
3.1.1.1	Auswahl von Iperoxo als Referenzsubstanz.....	59
3.1.1.2	Die Verlängerung des n-Alkylsubstituenten beeinflusste die Kenngrößen Wirkung und Maximaleffekt.....	60
3.1.2	Vergleich der [ <sup>35</sup> S]GTPγS-Bindung an M <sub>2</sub> - und M <sub>4</sub> -Membranhomogenaten .....	62
3.1.2.1	Die N-Alkylderivate zeigten eine höhere Wirksamkeit am M <sub>2</sub> -Rezeptor.....	62
3.1.2.2	Die Verlängerung des Alkyl-Substituenten hat keinen Einfluss auf die intrinsische Aktivität am M <sub>2</sub> -Rezeptor.....	63
3.1.3	Aktivierung des alternativen Signalwegs (G <sub>s</sub> ) durch M <sub>2</sub> - und M <sub>4</sub> -Rezeptoren .....	64
3.1.3.1	Iperoxo zeigte eine stärkere Wirksamkeit am M <sub>4</sub> -Rezeptor.....	65
3.1.3.2	Der M <sub>2</sub> -Rezeptor reagierte sensibler auf die Verlängerung des Alkylsubstituenten .....	66
3.1.3.3	Längerkettige Alkyl-Substituenten induzierten unspezifische Effekte .....	67
3.2	Charakterisierung der Bindungseigenschaften der molekularen Testsonden .....	70
3.2.1	Messung der Affinität zum aktiven und inaktiven Rezeptor .....	70
3.2.1.1	Acetylcholin und Iperoxo zeigten höhere Affinität zum M <sub>2</sub> - als zum M <sub>4</sub> -Rezeptor.....	70
3.2.1.2	Eine Verlängerung des Alkyl-Substituenten bis -C <sub>5</sub> am Iperoxo-Grundgerüst ließ die Bindungsaffinität sinken .....	72
3.2.1.3	Eine weitere Alkyl-Kettenverlängerung von -C <sub>6</sub> bis -C <sub>10</sub> führte zum Wiederanstieg der Affinität	73
3.2.1.4	Die Alkyl-Substituenten hatten Einfluss auf die hochaffine Rezeptorpopulation am M <sub>4</sub> - jedoch nicht an M <sub>2</sub> -Rezeptor.....	75
3.2.2	Messung der Bindungsaffinität zur allosterischen Bindungsstelle.....	76
3.2.2.1	IP-C <sub>9</sub> und IP-C <sub>10</sub> zeigten eine Affinität zur allosterischen Bindungsstelle .....	76

<b>3.3</b>	<b>Berechnung von Bias-Faktoren .....</b>	<b>78</b>
<b>3.3.1</b>	<b>Berechnung des Bias-Faktors <math>\Delta\Delta\log(\tau/K_A)</math> .....</b>	<b>78</b>
3.3.1.1	Transduktionskoeffizienten der Referenzsubstanz Iperoxo .....	78
3.3.1.2	Transduktionskoeffizienten der Alkyl-Derivate im $G_i$ -Signalweg .....	79
3.3.1.3	Transduktionskoeffizienten der Alkyl-Derivate im $G_s$ -Signalweg.....	81
3.3.1.4	Der Bias-Faktor $\Delta\Delta\log(\tau/K_A)$ : $G_i$ -Signalwegelektivität einiger Derivate am $M_2$ -Rezeptor .....	82
<b>3.3.2</b>	<b>Berechnung des Bias-Faktors <math>\Delta\Delta\log(RA_i)</math> .....</b>	<b>84</b>
3.3.2.1	Anhand der Bias-Faktoren $\Delta\Delta\log(RA_i)$ konnte keine signifikante Signalwegelektivität festgestellt werden.....	84
<b>3.3.3</b>	<b>Berechnung des Bias-Faktors <math>\beta_{lig}</math>.....</b>	<b>85</b>
3.3.3.1	Die Kopplungseffizienz der Referenzsubstanz Iperoxo war abhängig vom Rezeptor-Subtyp und dem betrachteten Signalweg.....	85
3.3.3.2	Kopplungseffizienz und effektive $G_i$ -Signalwegaktivierung der Iperoxo-Derivate.....	86
3.3.3.3	Kopplungseffizienz und effektive $G_s$ -Signalwegaktivierung der Iperoxo-Derivate .....	88
3.3.3.4	Bias-Faktor $\beta_{lig}$ .....	89
<b>3.4</b>	<b>Gleichzeitige Untersuchung der <math>G_i</math>- und <math>G_s</math>-Stimulation in einem Testsystem.....</b>	<b>91</b>
<b>3.4.1</b>	<b>Evaluierung des Testsystems .....</b>	<b>91</b>
3.4.1.1	Acetylcholin induzierte einen biphasischen Verlauf der cAMP-Bildung .....	92
3.4.1.2	Acetylcholin und Iperoxo stimulierten die cAMP-Bildung ohne Forskolin-Zusatz.....	93
3.4.1.3	NEM inaktivierte die $G_i$ -stimulierten Effekte .....	94
<b>3.4.2</b>	<b>Untersuchung von Iperoxo und ausgewählten Derivaten .....</b>	<b>95</b>
3.4.2.1	Die Verlängerung des Alkyl-Substituenten drosselte die Stimulation der cAMP-Bildung stärker am $M_2$ - als am $M_4$ -Rezeptor.....	96
3.4.2.2	Maximale cAMP-Akkumulation der Iperoxo-Derivate ohne Forskolin .....	98
3.4.2.3	Getrennte Auswertung der inhibitorischen und stimulatorischen Effekte am Beispiel der Referenzsubstanz Iperoxo .....	98
3.4.2.4	Getrennte Auswertung der Testsubstanz-induzierten inhibitorischen und stimulatorischen Effekte.....	100
3.4.2.5	Berechnung der Bias-Faktors $\Delta\Delta\log(RA_i)$ .....	101
<b>3.5</b>	<b><i>Ex-vivo</i> Untersuchungen mit Iperoxo in einem <math>M_2</math>- und <math>M_4</math>-Rezeptor-Modell .....</b>	<b>103</b>
<b>3.5.1</b>	<b>Evaluierung des Testsystems .....</b>	<b>103</b>
3.5.1.1	Iperoxo hemmte die Neurotransmitter-Freisetzung mit hoher Wirksamkeit in drei Mausstämmen .....	103
3.5.1.2	Die Hemmung der Neurotransmitter-Freisetzung war Rezeptor-vermittelt .....	105
3.5.1.3	Erhöhung der Iperoxo-Konzentration zeigte einen geringeren Hemmeffekt im $M_4$ -Modell.....	106
<b>3.5.2</b>	<b>Einfluss einer <math>G_i</math>-Inhibition auf die Hemmung der Neurotransmitter-Freisetzung durch Iperoxo .</b>	<b>107</b>
3.5.2.1	Im $M_2$ -Modell schwächte die NEM-Behandlung die Wirkung von Iperoxo ab .....	107
3.5.2.2	Im $M_4$ -Modell wurde der Einfluss der $G_i$ -Inhibition mit Iperoxo-Konzentrationen über 0,1 $\mu$ M deutlich .....	108

<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>111</b>
4.1	Versuche an transfizierten FlpIn <sup>TM</sup> -CHO-Zellen als Testsystem.....	112
4.1.1	Rezeptorexpression .....	112
4.1.2	Aktivierung der präferentiellen G <sub>i</sub> -Proteine.....	112
4.1.3	Aktivierung des alternativen G <sub>s</sub> -Signalweges.....	115
4.1.4	Welche Bereiche sind verantwortlich für die G-Protein-Kopplung? .....	117
4.2	Bias-Faktoren .....	120
4.2.1	Der Parameter $\tau$ .....	120
4.2.2	$\beta_{lig}$ versus $\Delta\Delta\log(\tau/K_A)$ .....	122
4.3	Untersuchung zweier Signalwege im cAMP-Testsystem.....	126
4.3.1	Der Einfluss von Forskolin im Testsystem .....	126
4.3.2	Einsatz von NEM zur Unterbindung G <sub>i</sub> -vermittelter Effekte .....	127
4.3.3	Die Ausprägung von Bias-Faktoren ist abhängig von den gewählten Messmethoden.....	128
4.4	Superfusionsexperimente .....	130
4.4.1	Iperoxo induzierte keine nachweisbare Aktivierung alternativer Signalwege .....	131
4.4.2	Die G <sub>i/o</sub> -Reduktion zeigte unterschiedliche Auswirkungen im M <sub>2</sub> - und M <sub>4</sub> -Modell.....	132
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>134</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>136</b>
6.1	Charakterisierung der verwendeten Zellmembranhomogenate.....	136
6.2	B <sub>max</sub> -Bestimmung an lebenden Zellen .....	137
6.3	Kinetische Experimente mit [ <sup>3</sup> H]NMS.....	138
6.3.1	Bestimmung der Halbwertszeit von [ <sup>3</sup> H]NMS .....	138
6.3.2	Zwei-Punkt-kinetische Experimente .....	138
6.4	[ <sup>35</sup> S]GTPγS-Bindungsversuche .....	139
6.4.1	Vergleich der maximal-induzierbaren [ <sup>35</sup> S]GTPγS-Bindung zwischen M <sub>2</sub> und M <sub>4</sub> .....	139
6.4.2	[ <sup>35</sup> S]GTPγS-Bindungsversuche an M <sub>2</sub> für die Bias-Berechnung .....	139
6.5	Vorversuche zur Messung cAMP-Generierung an transfizierten FlpIn <sup>TM</sup> -CHO-Zellen.....	141
6.5.1	cAMP-Standardkurve .....	141
6.5.2	Zellzahloptimierung für Versuche mit PTX-Vorbehandlung .....	141
6.5.3	Forskolin-induzierte cAMP-Bildung .....	142
6.5.4	Zellzahloptimierung für Versuche ohne PTX-Vorbehandlung.....	142
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>144</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 Überblick zu muskarinischen Acetylcholinrezeptoren

Acetylcholin kann als endogener Neurotransmitter Reize durch Bindung an nikotinische sowie an muskarinische Acetylcholinrezeptoren übertragen. Während erstere ligandgesteuerte Ionenkanäle sind, gehören die muskarinischen Acetylcholinrezeptoren (mAChR) zur Superfamilie der 7-Transmembranrezeptoren (7TMR), welche sich durch eine typische Struktur auszeichnet (Caulfield & Birdsall 1998, Wess et al., 2007). 7TM-Rezeptoren bestehen aus einem einzigen Polypeptidstrang, der sich siebenmal unter Ausbildung einer  $\alpha$ -Helix durch die Plasmamembran windet. Diese Bereiche werden ausgehend vom extrazellulär gelegenen N-Terminus als transmembranäre Domänen 1 bis 7 (TM1-TM7) bezeichnet. Die Verbindungen zwischen den Domänen werden gemäß ihrer Lokalisation als intra- bzw. extrazelluläre Schleifen (engl. *loops*) bezeichnet und ebenfalls vom N-Terminus ausgehend nummeriert (IL1-3 bzw. EL1-3).

7TM-Rezeptoren sind metabotrope Rezeptoren. Da viele Vertreter dieser Gruppe im Zellinneren mit Effektormolekülen der G-Proteinfamilie interagieren, werden sie allgemein auch als G-Protein gekoppelte Rezeptoren (engl. *GPCR*) bezeichnet. Die weitere Kategorisierung der 7TMR ordnet die mACh-Rezeptoren aufgrund ihrer Sequenzhomologie der Rhodopsin-Familie, auch als Klasse A bezeichnet, zu.

Für Säugetiere sind fünf Subtypen der mACh-Rezeptoren bekannt (Wess, 1996). Diese lassen sich anhand ihrer Kopplungsneigung in zwei Gruppen einteilen. Die Subtypen  $M_1$ ,  $M_3$  und  $M_5$  induzieren intrazelluläre Signale über  $G_{q/11}$ -Proteine, während  $M_2$ - und  $M_4$ -Rezeptoren an Vertreter der inhibitorischen G-Proteine ( $G_{i/o}$ ) koppeln.

Acetylcholin bindet im Bereich der TM-Domänen an ein in allen fünf Subtypen hochkonserviertes Areal, welches als orthosterische Bindungsstelle (von griechisch *orthós* „gerade, aufrecht, richtig“ und *stereós* „Ort“) bezeichnet wird. Hier bindet auch das namensgebende Fliegenpilzgift Muscarin. Darüber hinaus wurden bisher zwei allosterische Bindungsstellen (von griechisch *allos* „anders“ d.h. „am anderen Ort“) auf der dem Extrazellulärraum zugewandten Seite der mACh-Rezeptoren identifiziert, für die jedoch bisher nur exogene Liganden bekannt sind (Wess et al., 2007).

Muskarinische Acetylcholinrezeptoren werden zum einen in der Körperperipherie exprimiert und übertragen parasymphatische Reize auf die Erfolgsorgane. Zum anderen dienen sie auch im zentralen Nervensystem der cholinergen Neurotransmission. Da Liganden mit ausreichender Subtypselektivität bis heute noch fehlen, konnten genauere Rückschlüsse, welche Subtypen im menschlichen Organismus für einzelne physiologische Funktionen maßgeblich sind, erst anhand von gentechnisch veränderten Mäusen, die einen oder mehrere mAChR-Subtypen nicht exprimierten, genauer abgeleitet werden (Übersicht dazu in Wess, 2004). In Abb. 1.1. sind diese aufgeführt.

Durch das breitgefächerte Vorkommen der mACh-Rezeptoren dienen sie als Zielstruktur für die medikamentöse Therapie. So wird zum Beispiel der mAChR-Agonist Pilocarpin bei Glaukom eingesetzt. Die Blockade von mACh-Rezeptoren mit Tiotropium hingegen hat sich bei chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) zur Erreichung einer Bronchodilatation bewährt. Die Gemeinsamkeit dieser Wirkstoffbeispiele ist ihre lokale Anwendung an Auge bzw. Lunge, wodurch mangelnde Subtyp- und Gewebeselektivität teilweise wett gemacht werden können. Allerdings werden mAChR-Antagonisten auch systemisch verwendet. So wird etwa Atropin zur Narkose-Prämedikation, bei bradykarden Herzrhythmusstörungen und als Antidot bei Vergiftungen mit

mAChR-Agonisten (Parasympathomimetika) eingesetzt. Des Weiteren spielen mACh-Rezeptoren auch bei Krankheiten eine Rolle, die auf pathophysiologische Vorgänge im ZNS zurückzuführen sind. So können derzeit nicht-selektive mAChR-Antagonisten in der Therapie des Morbus Parkinson nach einer Risiko-Nutzen-Abwägung gegen auftretenden Ruhetremor eingesetzt werden (Leitlinie der Dt. Gesellschaft für Neurologie, 2016). Studien an *Knock-out*-Mäusen haben jedoch gezeigt, dass  $M_4$ -Rezeptoren dabei die wesentliche Rolle spielen (Wess et al., 2007). Selektive  $M_4$ -Antagonisten wären demnach besser geeignet, um den positiven Effekt mit geringeren Nebenwirkungen zu erreichen. Auch analgetische Effekte können über zentrale  $M_2$ - und  $M_4$ -Rezeptoren vermittelt werden. Hier könnten selektive, ZNS-gängige  $M_4$ -Agonisten Anwendung finden, da aufgrund des Expressionsmusters im menschlichen Organismus im Vergleich zu  $M_2$ -Agonisten nicht mit peripheren Nebenwirkungen gerechnet werden müsste (Wess et al, 2007).

	zentral	Expression	peripher
<b><math>G_{q/11}</math>-gekoppelt</b>			
$M_1$	- Vorderhirn z.B. Kortex, Hippocampus, Stiatum - Beitrag zu Lern- und Gedächtnisfunktion, motorische Aktivität		- div. Organe - Salivation, Sekretion aus Magen
$M_3$	- div. Hirnregionen z.B. Hypothalamus - möglicherweise Appetitregulierung		- div. Organe, glatte Muskulatur, Drüsen - Kontraktion glatter Muskulatur z.B. Bronchien, Salivation, Insulinsekretion aus $\beta$ -Zellen
$M_5$	- Mittelhirn z.B. Substantia nigra, Hippocampus - Modulation der Dopamin-Transmission		- wenig bekannt, möglicherweise Ziliarkörper, Speicheldrüsen -
<b><math>G_{i/o}</math>-gekoppelt</b>			
$M_2$	- weit verbreitet z.B. Hippocampus, Kortex - Motorik, Regulation der Körpertemp., Beitrag zu kognitiven Funktionen, Antinozizeption, inhibitorische Auto- und Heterorezeptoren		- glatte Muskulatur z.B. Blutgefäße, Herz - Kontraktion glatter Muskulatur, Regulierung der Herzfrequenz
$M_4$	- Vorderhirn z. B. Striatum - Antinozizeption, Modulation der Dopamin-Freisetzung im Striatum, inhibitorische Auto- und Heterorezeptoren, motorische Aktivität		- keine Expression bzw. wenig bekannt -

Abb. 1.1 Expression und physiologische Funktionen muskarinischer Acetylcholin-Rezeptoren. Modifiziert nach Wess, 2004.

## 1.2 G-Proteinaktivierung und intrazelluläre Signalwege

Interagieren 7TM-Rezeptoren mit G-Proteinen, wird eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst. Im Vordergrund stehen dabei die heterotrimeren Guaninnukleotid-bindenden Proteine, welche aus den drei Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  zusammengesetzt sind. Die  $\alpha$ -Untereinheit besitzt neben der Bindungsstelle für GDP und GTP auch eine intrinsische GTPase-Aktivität. Weiterhin werden die  $G\alpha$ -Proteine aufgrund ihrer Sequenzhomologie in vier Gruppen eingeteilt, die verschiedene Funktionen aufweisen (Milligan & Kostenis, 2006). Stimulatorische  $\alpha$ -Untereinheiten ( $G\alpha_s$ ) aktivieren das Enzym Adenylatcyclase (AC) und fördern somit die Generierung von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) als sekundären Botenstoff, während inhibitorische  $\alpha$ -Untereinheiten ( $G\alpha_{i/o}$ ) das Enzym hemmen und somit zur Senkung des cAMP-Spiegels führen.  $G\alpha_{q/11}$ -Proteine aktivieren hingegen

Phospholipase C (PLC), was zur Bildung von Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) führt. Die Mitglieder der vierten Gruppe, G $\alpha_{12}$  und G $\alpha_{13}$ , aktivieren monomere G-Proteine der Rho-Familie (vgl. Kosaza et al., 2011).

Die Bindung eines Agonisten an einen GPCR hat eine Konformationsänderung des Rezeptors zur Folge, sodass die Interaktion mit einem heterotrimeren G-Protein auf der intrazellulären Seite gefördert wird. Durch die Bindung an den Rezeptor kann an der G $\alpha$ -Untereinheit GDP gegen GTP ausgetauscht werden, was zu der Aktivierung des G-Proteins führt. Die GTP-gebundene  $\alpha$ -Untereinheit dissoziiert von der G $\beta\gamma$ -Untereinheit ab und wirkt - wie oben beschrieben - auf ein entsprechendes Effektormolekül (siehe Abb. 1.2).

Die Auswirkungen von stimulatorischen und inhibitorischen G-Proteinen auf die Aktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase A sind gegenläufig. Auch die G $\beta\gamma$ -Untereinheit bleibt nicht untätig. So kann sie zum Beispiel GIRK-Kanäle (*G protein coupled inwardly rectifying potassium channels*) öffnen.

Durch die intrinsische GTPase-Aktivität und Einwirkung von Faktoren wie den RGS-Proteinen (*regulators of G protein signaling*) wird das an der G $\alpha$ -Untereinheit gebundene GTP wieder in GDP überführt. Dadurch wird diese inaktiv und es kommt zur Zusammenlagerung mit der  $\beta\gamma$ -Untereinheit zum Heterotrimer. Dieses steht für einen neuen Aktivierungszyklus wieder zur Verfügung.

Unabhängig von der Aktivierung heterotrimerer G-Proteine können GPCR auch mit anderen Effektoren interagieren und intrazelluläre Signale auslösen (Heuss et al., 1999). Ein interessantes Beispiel ist  $\beta$ -Arrestin, das zum einen in der Desensibilisierung und Internalisierung von 7TM-Rezeptoren eine Rolle spielt, aber auch die Rekrutierung von Kinasen an Agonist-gebundene 7TM-Rezeptoren vermitteln und somit zelluläre Signale auslösen kann (Luttrell & Lefkowitz, 2002).

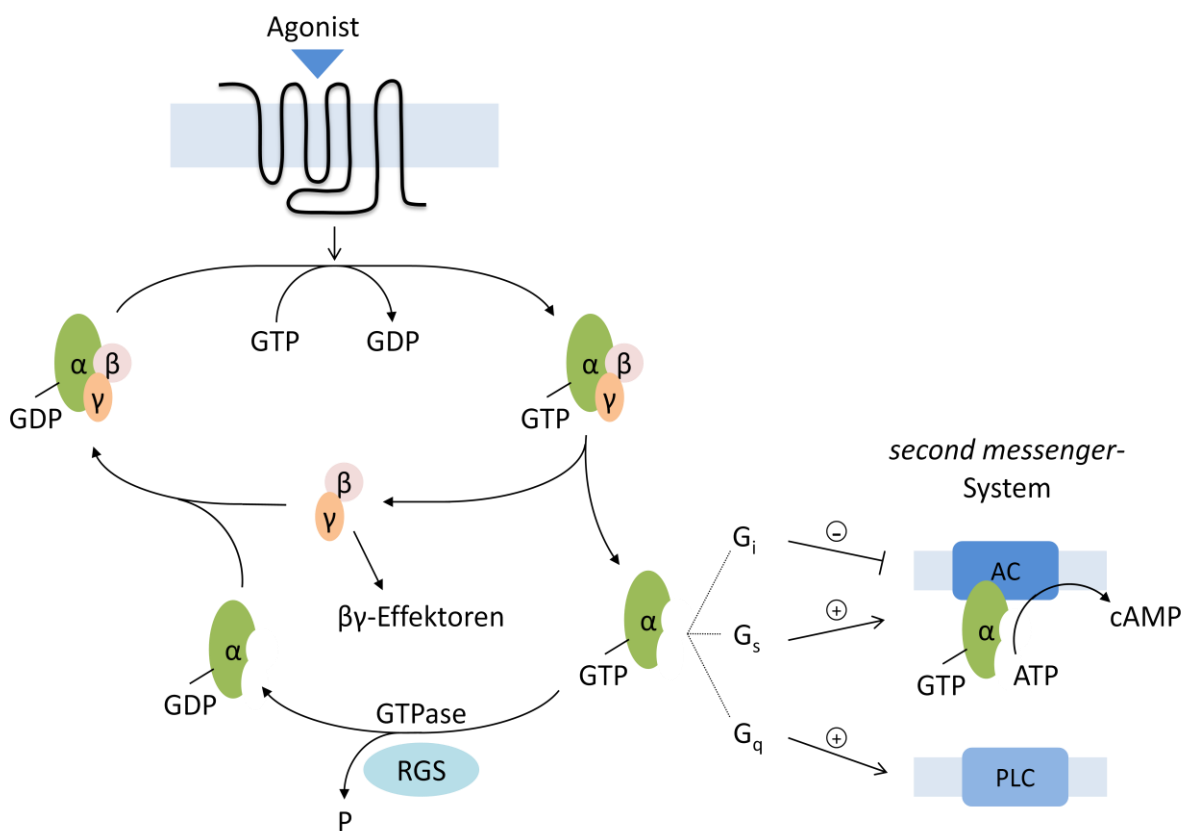
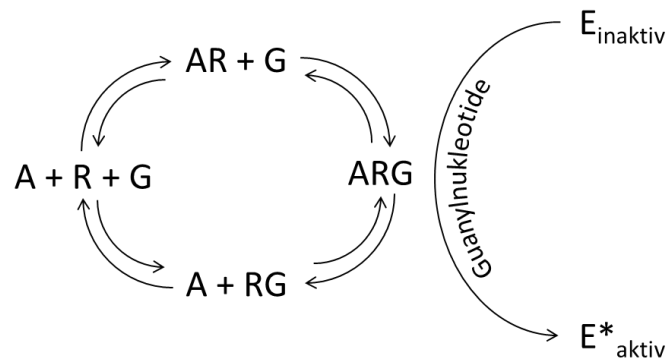


Abb. 1.2 G-Protein-Aktivierungszyklus. Erläuterungen siehe Text. Modifiziert nach Milligan & Kostenis, 2006.

### 1.3 Rezeptortheorien

Die Aufgabe von Rezeptoren ist es, äußere Reize ins Zellinnere weiterzugeben, sodass die Zelle entsprechend reagieren kann. Diese Betrachtung impliziert, dass ein Rezeptor zwei Zustände annehmen kann, nämlich einen abwartenden, inaktiven Zustand, der in einen aktiven übergeht sobald ein entsprechender Reiz z. B. in Form des endogenen Liganden auftaucht.

Es hat sich jedoch gezeigt, dass dieses einfache „On-Off“-Modell für GPCR nicht ausreichend ist. De Lean et al. konzipierten 1980 das ternäre Komplexmodell (*ternary complex model*), um die experimentelle Beobachtung von zwei Bindungsaffinitäten bei Agonisten in Radioligandbindungsuntersuchungen im Gleichgewicht zu erklären. Neben Rezeptor und Ligand berücksichtigt das Modell eine dritte Komponente, das G-Protein, welches maßgeblich an der Signaltransduktion beteiligt ist. Wie in Abb. 1.3 gezeigt, bindet ein Agonist mit niedriger Affinität an den freien, ungekoppelten Rezeptor, jedoch mit hoher Affinität, sobald das G-Protein ebenfalls mit dem Rezeptor interagiert. Erst dieser ternäre Komplex aus Agonist, Rezeptor und Signalmolekül (G-Protein) führt zur Aktivierung eines Effektormoleküls. Hierbei wird deutlich, dass der Rezeptor die Vermittlerrolle in einem allosterischen System einnimmt (Kenakin & Miller, 2010).



**Abb. 1.3 Ternäres Komplexmodell (modifiziert nach De Lean et al., 1980).** Ein Rezeptor (R) interagiert einerseits mit einem Agonisten (A) und andererseits mit einer weiteren, membrangebundenen Komponente, zumeist ein G-Protein (G). Durch die Bindung an diese Komponente geht der Rezeptor von einer Konformation mit niedrigerer Affinität in einen hochaffinen Zustand über. Erst im hochaffinen Zustand ist die Aktivierung von Effektorproteinen (E) bei Anwesenheit von Guanylnukleotiden möglich.

Theoretische Überlegungen führten zur Erweiterung des ternären Modells zum *extended ternary complex model* und dem *cubic ternary complex model*, die auch eine Spontanaktivität der GPCR in Abwesenheit von Agonisten beinhalten und somit zwischen sogenannten neutralen Antagonisten und inversen Agonisten unterscheiden (vgl. Kenakin, 2002; Maudsley et al., 2005). Ein neutraler Antagonist bindet an einen Rezeptor, besitzt jedoch keine intrinsische Aktivität und übt keinen Einfluss auf das bestehende Gleichgewicht zwischen der inaktiven und der sich spontan bildenden aktiven Rezeptorkonformation aus. Ein inverser Agonist besitzt hingegen eine höhere Affinität zur inaktiven Rezeptorkonformation, sodass das Gleichgewicht entsprechend zur dieser Konformation hin verschoben wird.

Eine zusätzliche Ebene bringt die genauere Berücksichtigung des G-Proteins mit sich. Demnach ist es ein quartärer Komplex aus Agonist, aktivem Rezeptor, aktivem G-Protein mit gebundenem GDP, der die Voraussetzung für die Signalweiterleitung darstellt (Ehlert & Rathun, 1990; Ehlert 2015).

Das ternäre Komplexmodell nach De Lean et al. (1980) diente in erster Linie dazu, Daten aus Bindungsexperimenten mit radioaktiv markierten Agonisten und Antagonisten mithilfe der Regressionsanalyse beschreiben zu können (mechanistische Betrachtung von Agonismus). Das *receptor-transducer model* nach Black und Leff entspricht diesem zwar mathematisch, wurde jedoch

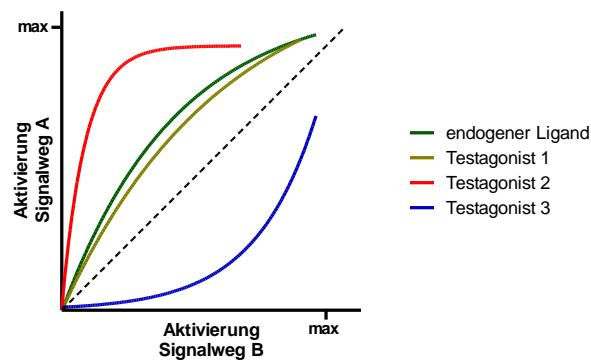
entwickelt, um eine allgemeingültige (chemische) Definition für die intrinsische Wirksamkeit (*intrinsic efficacy*) von Agonisten zu geben (qualitative Betrachtung) und diese durch messbare Parameter greifbar zu machen (Black & Leff, 1983). Dieses, weithin auch als *Operational Model (of Agonism)* bekannte Modell, dient als Grundlage zur Charakterisierung von Liganden hinsichtlich ihrer funktionellen Selektivität an G-Protein gekoppelten Rezeptoren und ist im Methodenabschnitt 2.1.5.3 im Detail beschrieben.

#### 1.4 Promiskuitive Signalwegsaktivierung und *ligand bias*

Viele Vertreter der GPCR zeigen die Fähigkeit, mehrere intrazelluläre Signalwege gleichzeitig zu aktivieren. Dies kann erklärt werden einerseits anhand der Quervernetzung der einzelnen Signalwege oder andererseits durch die Wirkung der  $\beta\gamma$ -Untereinheit des aktivierten G-Proteins auf weitere Effektoren (vgl. Abb. 1.2). Beispielsweise wurde der Acetylcholin-abhängige  $K^+$ -Kanal als ein Zielprotein der  $\beta\gamma$ -Untereinheit identifiziert (Logothetis et al., 1987). Andererseits muss die Kopplung eines Rezeptors nicht auf ein spezifisches heterotrimeres G-Protein beschränkt sein (Milligan, 1993) und Interaktionen mit „nicht-G-Proteinen“ sind ebenfalls möglich (Maudsley et al., 2005). Ein prominentes Beispiel dafür ist das  $\beta$ -Arrestin, welches mit dem Agonist-besetzten Rezeptor einen ternären Komplex bilden kann und zu seiner Internalisierung sowie zu einer G-Protein-unabhängigen Aktivierung von Signalwegen führen kann (Luttrell & Lefkowitz, 2002).

Diese promiskuitive Signalwegsaktivierung wird allgemein damit erklärt, dass nicht nur eine, sondern mehrere verschiedene aktive Konformationen existieren, die dem Rezeptor die Möglichkeit geben, mit den unterschiedlichen Effektormolekülen zu interagieren (vgl. Kenakin, 2013). Weiterhin wurde erkannt, dass das Ausmaß der Aktivierung der einzelnen Signalwege sich von Agonist zu Agonist unterscheiden kann, da in Abhängigkeit von der Struktur des Liganden bestimmte Rezeptorkonformationen bevorzugt werden können. Weist ein Agonist eine starke Aktivierung eines Signalwegs A im Vergleich zum Signalweg B auf, so spricht man von *signaling bias* bzw. *ligand bias*, wobei auch u.a. die Begriffe *stimulus trafficking* oder *functional selectivity* synonym verwendet werden (Kenakin & Christopoulos, 2013).

In Abb. 1.4 sind mögliche Ausprägungen des *ligand bias* verschiedener Testagonisten im Vergleich zum endogenen Liganden eines GPCR in einem sogenannten *bias plot* dargestellt. Darin ist für jede Konzentration der Agonisten die Höhe der Aktivierung des Signalwegs A gegen den Signalweg B aufgetragen. Anhand dieses Beispiels ist zu erkennen, dass ein endogener Ligand kein neutrales Verhalten zeigen muss, welches der gestrichelten Linie entsprechen würde, sondern einen Signalweg bevorzugt aktivieren kann. Testagonisten können ein ähnliches Verhalten wie der endogene Ligand oder eine deutliche Bevorzugung der Signalwege A bzw. B aufweisen.



**Abb. 1.4 Bias Plot.** Dargestellt ist die Stärke der Aktivierung des Signalwegs A im Vergleich zu Signalweg B durch die gleiche Konzentration des endogenen Liganden bzw. Testagonisten. Als Maximum (max) ist in beiden Signalwegen die jeweils maximale Aktivierung durch den endogenen Liganden definiert. Die gestrichelte Linie dient zum Vergleich mit einem theoretischen, neutralen Verhalten. Dient der endogene Ligand als Referenz für das Verhalten der Testagonisten, so zeigt Testagonist 1 keinen Bias, während Testagonist 2 einen Bias für Signalweg A aufweist. Testagonist 3 hingegen zeigt einen Bias für Signalweg B. Modifiziert nach Kenakin & Christopoulos (2013).

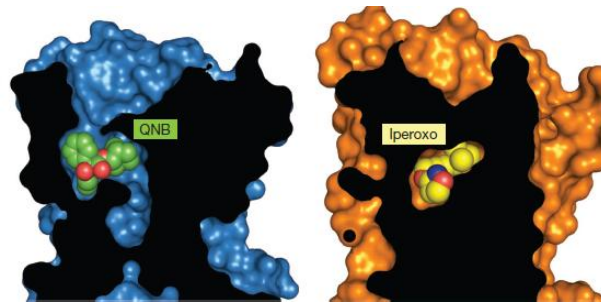
Wie sich die Fähigkeit zur Signalwegsaktivierung im *bias plot* darstellt, hängt jedoch von den gewählten Methoden zur Erfassung des jeweiligen Signalwegs ab, und dieser enthält daher Verzerrungen, die als *system* bzw. *observational bias* bezeichnet werden (Kenakin & Christopoulos, 2013). Um den reinen Bias von Agonisten zu quantifizieren, wurden Methoden entwickelt, die jeweils auf dem *Operational Model* beruhen und mit denen der Bias-Faktor von Testagonisten in Bezug zu einem Referenzagonisten bestimmt wird. Diese sind im Methodenteil (Abschnitte 2.1.5.4 bis 2.1.5.7) genauer erläutert.

Das Interesse an der Erforschung des *ligand bias* ist durch die Erkenntnis begründet, dass Nebenwirkungen von Arzneimitteln durch eine promiskuitive Signalwegsaktivierung entstehen können. Zum Beispiel konnte anhand von *Knock-out*-Mäusen, in denen das Gen für  $\beta$ -Arrestin 2 ausgeschaltet war, gezeigt werden, dass die schmerzstillende Wirkung von Morphin allein auf die Aktivierung von  $G_{i/o}$ -Proteinen zurückzuführen ist, die typischen Opiat-Nebenwirkungen wie Obstipation und Atemdepression jedoch durch den  $\beta$ -Arrestin-Signalweg vermittelt werden (Raehal et al., 2005). Seitdem konzentriert sich die Suche nach neuen Schmerzmitteln zunehmend auf  $\mu$ -Opioidrezeptor-Agonisten mit  $G_i$ -Bias und erste Erfolge im Maus-Modell wurden bereits erzielt (z.B. Manglik et al., 2016). Ein weiteres Beispiel ist die Substanz TRV027, ein Agonist am Angiotensin-II-Rezeptor vom Subtyp 1 ( $AT_1$ ). Durch ihren  $\beta$ -Arrestin-Bias wird die  $G_q$ -vermittelte Vasokonstriktion bei Aktivierung des  $AT_1$ -Rezeptors vermieden und die kardiale Kontraktilität hingegen gefördert (Violin et al., 2014). Im Gegensatz zum Tiermodell weisen jedoch erste Ergebnisse einer Phase-IIb-Studie mit TRV027 zur Behandlung einer akuten Herzinsuffizienz keinen Unterschied zu Placebo auf (Greenberg, 2016).

## 1.5 Iperoxo und dualsterische Liganden zur Untersuchung von mACh-Rezeptoren

Iperoxo ist eine Weiterentwicklung ausgehend vom mAChR-Agonisten Oxotremorin bzw. Oxotremorin M und zeigt an allen fünf muskarinischen Subtypen eine außergewöhnlich hohe Wirksamkeit (Dallanoce et al., 1999; Kaufel, Dissertationsschrift 2010). Es konnte gezeigt werden, dass Iperoxo am  $M_2$ -Rezeptor superagonistische Eigenschaften besitzt, da im Vergleich zum endogenen Liganden die Umsetzung der Rezeptorbindung in eine Zellantwort effektiver ist (Schrage

et al., 2013). Weiterhin ist es durch die Verwendung von Iperoxo erstmalig gelungen, einen muskarinischen Acetylcholin-rezeptor in aktiver Konformation zu kristallisieren (Kruse et al., 2013a). In der folgenden Abb. 1.5 ist die Kristallstruktur des inaktiven und des aktiven  $M_2$ -Rezeptors wiedergegeben.



**Abb. 1.5 Querschnitt durch den  $M_2$ -Rezeptor in inaktiver und aktiver Konformation (modifiziert nach Kruse et al., 2013a).** Die Schnittfläche ist in schwarz dargestellt. *Links:* QNB (3-Quinuclidinylbenzilat) ist ein orthosterisch-bindender, inverser Agonist und stabilisiert den Rezeptor in einer inaktiven Konformation. Dabei wird der Ligand teilweise vom Rezeptormolekül umschlossen. Es bleibt jedoch eine Verbindung zur darüber liegenden allosterischen Bindungsstelle sowie ein freier Raum unterhalb der orthosterischen. *Rechts:* Im Gegensatz dazu wird der Agonist Iperoxo komplett vom Rezeptor umschlossen, es findet also eine starke Kontraktion des Rezeptormoleküls im Bereich der orthosterischen und allosterischen Bindungsstellen statt, welche vor allem durch Bewegung der TM6 verursacht wird.

Durch die hochkonservierte Acetylcholin-Bindungsstelle der mAChR wurden bisher keine orthosterischen Agonisten mit hoher Selektivität für einen der fünf Subtypen gefunden und es erscheint wenig wahrscheinlich, dass dies in diesem Bindungsmodus tatsächlich möglich ist (Kruse et al., 2013b). Die allosterischen Areale dieser Rezeptoren bieten jedoch durch ihre Heterogenität eine bessere Angriffsfläche. Das Ergebnis eines rationalen Moleküldesigns sind sogenannte dualsterische Liganden, welche aus einem orthosterisch sowie allosterisch bindenden Teil bestehen, die durch einen Alkyl-Linker miteinander verbunden sind (Mohr et al., 2010). Solche Liganden mit Iperoxo als orthosterischem Baustein wiesen dabei im Gegensatz zu anderen Bausteinen die Fähigkeit zur Rezeptoraktivierung neben einer verbesserten Präferenz für den  $M_2$ -Rezeptor auf.

Interessanterweise zeigten diese Iperoxo-Derivate eine Selektivität für den  $G_i$ -Signalweg auf (Antony et al., 2009) und es konnte mit ihrer Hilfe demonstriert werden, dass durch die allosterischen Bereiche die Kopplung an intrazelluläre G-Proteine gesteuert wird (Bock et al., 2012).

Im Gegensatz zum  $M_2$ -Rezeptor wurde am nahverwandten  $M_4$ -Rezeptor keine Einschränkung der promiskuitiven Aktivierung von  $G_i$ - und  $G_s$ -Signalen bei Einsatz der gleichen dualsterischen Liganden beobachtet, was darauf schließen ließ, dass der  $M_4$ -Rezeptor leichter Rezeptorkonformationen eingeht, über die alternative Signalwege ausgelöst werden können (Janßen, Dissertationschrift 2011).

## 1.6 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Subtypen  $M_2$  und  $M_4$  der muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren untersucht. Ihr gemeinsames Merkmal stellt die Aktivierung von  $G_{i/o}$ -Proteinen dar. Vor allem, da beide Subtypen in einigen Geweben gemeinsam exprimiert werden, wurde die These aufgestellt, dass hier nur eine scheinbare funktionelle Redundanz vorliegt. Es wurde vermutet, dass über die präferentielle Aktivierung von inhibitorischen G-Proteinen hinaus unterschiedliche alternative Signalwege initialisiert werden können, die die Möglichkeiten einer Feinsteuerung intrazellulärer Prozesse erweitern.

Als alternativer Signalweg sollte hier die Aktivierung stimulatorischer G-Proteine ( $G_s$ ) untersucht werden, da dies auf Ebene des intrazellulären Botenstoffs cAMP dem Effekt der inhibitorischen G-Proteine direkt entgegenwirken kann.

Im Zuge einer vergleichenden Untersuchung der  $M_2$ - und  $M_4$ -Rezeptoren, dienten die Substanz Iperoxo und ihre Derivate mit schrittweise verlängertem  $n$ -Alkylrest am quartären Stickstoff als molekulare Testsonden. Die Auswirkung dieser sukzessiven Strukturveränderung auf

- a) die präferentielle und alternative Signalwegaktivierung sowie
- b) das Bindungsverhalten der molekularen Sonden

sollte an beiden Rezeptorsubtypen untersucht werden. Um das Potential zur Aktivierung des  $G_i$ - und  $G_s$ -Signalwegs im vollen Umfang zu sondieren, wurden beide Rezeptoren durch Anwendung rekombinanter Zellen isoliert betrachtet. Die Messung der Signalwegaktivierung sollte dabei möglichst „rezeptornah“ erfolgen, um eine eventuelle Fehlinterpretation durch starke Signalamplifikation zu vermeiden.

Unter dem Gesichtspunkt, dass ein Ligand mit dem Rezeptor sowie dem Effektorprotein ein System bildet, das gegenseitiger Beeinflussung unterliegt, sollten mit den Daten der funktionellen Experimente Bias-Faktoren berechnet werden, um die möglicherweise unterschiedlichen intrinsischen Eigenschaften der  $M_2$ - und  $M_4$ -Rezeptoren systemunabhängig darzustellen. Hierzu wurden zwei Methoden der Bias-Berechnung angewendet. Diese beruhen auf unterschiedlichen Interpretationen des *Operational Models* (Black & Leff, 1983) und wurden bisher noch nicht anhand der gleichen Datengrundlage direkt einander gegenübergestellt.

Des Weiteren sollte das Eintreten einer alternativen Signalwegaktivierung durch endogen exprimierte  $M_2$ - und  $M_4$ -Rezeptoren in murinem Hirngewebe *ex-vivo* untersucht werden. Im Raum stand die These, dass hohe Acetylcholin-Konzentrationen im synaptischen Spalt alternative Signalwege über präsynaptische  $M_2$ - und  $M_4$ -Rezeptoren induzieren können und somit eine unterschiedliche Autoregulation der Neurotransmitter-Freisetzung über die zwei Subtypen möglich sein könnte. Zu diesem Zweck wurde der hochpotente Agonist Iperoxo in supramaximalen Konzentrationen verwendet, um einen hohen synaptischen Acetylcholin-Spiegel zu imitieren.



## 2 Methoden und Material

### 2.1 Methoden

#### 2.1.1 Zellbiologisches Arbeiten

Zur Expression des humanen M<sub>2</sub>- bzw. M<sub>4</sub>-Acetylcholinrezeptors wurden Ovarialzellen des chinesischen Seidenhamsters (*Cricetulus griseus*) verwendet, welche ein sogenanntes Flp/FRT-System beinhalten (Flp-In<sup>TM</sup>-CHO-Zellen). Dieses erlaubt den gezielten und effektiven Einbau eines Expressionsvektors mit dem Gen, welches exprimiert werden soll, in das Genom der Wirtszelle durch Flippase-vermittelte Rekombination der DNA an der FRT-Schnittstelle (*flippase recognition target*). Für die funktionellen Experimente und Radioligandbindungsstudien der vorliegenden Arbeit konnte auf bereits vorhandene, stabil transfizierte Zell-Linien zurückgegriffen werden (siehe Tab. 2.1), dessen Generierung von N. Janßen (Dissertationsschrift 2011) bereits ausführlich beschrieben wurde. In den Flp-In<sup>TM</sup>hM<sub>2</sub>- bzw. -hM<sub>4</sub>-CHO-Zellen unterliegt die Expression der jeweiligen Rezeptoren einem CMV-Promotor (*strong CMV immediate early enhancer/promoter*), was zu einer hohen Rezeptordichte an der Zelloberfläche führt. Da CHO-Zellen keine endogene Expression von muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren aufweisen, sind die Messergebnisse somit auf die zwei untersuchten Subtypen M<sub>2</sub> und M<sub>4</sub> zurückzuführen.

Zell-Linie	Herstellung der Plasmid-DNA	Durchführung der stabilen Transfektion
FlpIn <sup>TM</sup> hM <sub>2</sub> -CHO	Dr. Marion Mohr-Andrä	Dr. Marion Mohr-Andrä
FlpIn <sup>TM</sup> hM <sub>4</sub> -CHO	Dr. Nicole Bick (geb. Janßen)	Dr. Nicole Bick (geb. Janßen)

**Tab. 2.1 In vorliegender Arbeit verwendete, stabil transfizierte Zell-Linien.** Die aufgeführten Personen waren zur Zeit der zellbiologischen Arbeiten Mitglieder der Arbeitsgruppe Pharmakologie und Toxikologie/Arbeitsgruppe AK Prof. Dr. K. Mohr am Pharmazeutischen Institut der Universität Bonn. Die Herstellung der Plasmid-DNA und Durchführung der stabilen Transfektion sind detailliert anderswo beschrieben worden (siehe Janßen, Dissertationsschrift 2011).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten nicht-transfizierten FlpIn<sup>TM</sup>-CHO-Zellen wurden von Prof. Dr. E. Kostenis (Pharmazeutische Biologie/Universität Bonn) zur Verfügung gestellt.

##### 2.1.1.1 Zellbiologisches Arbeiten

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Arbeitsschritte erfolgten an einer Sicherheitswerkbank mit laminarem Luftstrom (G) unter sterilen Bedingungen. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Reagenzien (R), Lösungen (L), Analyse-Kits (K), Verbrauchsmaterialien (V) und Geräte (G) sind in den Abschnitten 2.2.4 bis 2.2.8 näher beschrieben.

#### Zellkultivierung und Passagierung

Die FlpIn<sup>TM</sup>-CHO-Zell-Linien wurden in Zellkulturschalen (V1 oder V2) mit Nährmedium (L15) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchte bis zu einer Konfluenz von 70-100 % kultiviert (Inkubator Thermo Forma Series II Water Jacketed CO<sub>2</sub>-Inkubator, Firma ThermoForma). Eine Passagierung der adhären Zellen wurde in der Regel alle zwei bis drei Tage durchgeführt. Dazu wurde das Nährmedium abgesaugt und die Zellkulturschale mit ca. 10 ml DPBS-Puffer (R7) gewaschen. Je nach

Größe der verwendeten Kulturschale wurden 3 bzw. 1,5 ml Trypsin-Lösung (R44) auf die Zellen gegeben und bei Raumtemperatur für 2-3 Minuten inkubiert. Durch Klopfen an den äußeren Rand der Zellkulturschale wurden noch haftende Zellen vom Boden abgelöst. Durch Zugaben von 7 ml Nährmedium (L15) wurde das Enzym Trypsin inaktiviert. Von der somit erhaltenen Zellsuspension wurden 0,5 bis 1 ml (Passagierung im Verhältnis 1:20 bis 1:10) auf eine neue Zellkulturschale mit 18 ml Nährmedium überführt und wie beschrieben weiterkultiviert.

### **Kryokonservierung und Ansatz einer neuen Zellkultur**

Für eine längere Aufbewahrung wurden die verwendeten Zell-Linien eingefroren und über flüssigem Stickstoff (Gasphase N<sub>2</sub>-Tank ca. -155°C) gelagert. Dazu wurden die Zellen einer voll bewachsenen Kulturschale (V1) wie oben beschrieben abgelöst und in Nährmedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in ein verschließbares Kunststoffröhrchen (V3) überführt und bei 4°C zentrifugiert (G3 mit Rotor JS 4.3, 900 rpm [*rouds per minute*], 4 min). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 900 µl Nährmedium (L15) aufgenommen. 900µl dieser Zellsuspension wurden in ein Einfrierröhrchen(V3a) überführt, in das zuvor 100 µl DMSO (R5) vorgelegt worden waren. Dieses wurde fest verschlossen, mehrmals zur Mischung der Lösungen geschwenkt und anschließend in einem mit 100 %igen 2-Propanol gefüllten Einfriercontainer („Mr Frosty“ 5100 Cryo 1°C, Firma Nalgene) bei -80°C eingefroren. Durch den Einfriercontainer wurde ein langsames Einfrieren mit einem Temperaturabfall von 1°C pro Minute erreicht. Nach diesem Prozess wurde das Röhrchen in den Stickstofftank überführt.

Zum Ansatz einer neuen Zellkultur wurden Zellen mit einer niedrigen Passage-Zahl (<20) gewählt. Das Einfrierröhrchen wurde aus dem Stickstofftank entnommen und bei Raumtemperatur aufgetaut. Unmittelbar danach wurde der Inhalt in eine Zellkulturschale mit 37°C warmen Nährmedium (L15, 20 ml) gegeben und wie beschrieben über Nacht kultiviert. Am Folgetag wurde das Anwachsen der Zellen überprüft und ggf. ein Wechsel des Nährmediums durchgeführt.

#### *2.1.1.2 Herstellung von Zellmembranhomogenaten*

Für die Herstellung einer Zellmembranhomogenat-Charge wurden die Zellen der gewünschten Zell-Linie zunächst auf fünf und anschließend auf 40 Kulturschalen (V1) vermehrt (siehe Abschnitt 2.1.1.1). Bei Erreichen einer durchschnittlichen Konfluenz von 80 bis 90 % wurde das Nährmedium abgesaugt und durch 13 bis 15 ml Natriumbutyrat-Nährmedium (L16) ersetzt. In diesem wurden die Zellen für weitere 16 bis maximal 18 Stunden unter den gewohnten Bedingungen weiterkultiviert. Natriumbutyrat wurde eingesetzt, da es die Zellteilung herabsetzt, jedoch die Proteinbiosynthese und somit auch die Expression des humanen M<sub>2</sub>- bzw. M<sub>4</sub>-Rezeptors in den transfizierten Zellen fördert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Natriumbutyrat-Medium abgesaugt und auf jede Zellkulturplatte 2,4 ml eiskalter Homogenisationspuffer (L11) gegeben. Mit einem Zellschaber (V13) wurden die Zellen vom Boden gelöst und die Zellsuspension von fünf Kulturschalen in einem 50ml-Zentrifugenröhrchen aus Polycarbonat vereinigt, welches auf Eis gelagert wurde. Je fünf Kulturschalen wurden durch Überführen von 6 ml Homogenisationspuffer (L11) gewaschen und die Flüssigkeit wurde anschließend zur Zellsuspension hinzugefügt.

Die Zerkleinerung der Zellen erfolgte mit einem Homogenisator (G15) auf Stufe 6 zunächst für 25 Sekunden und nach kurzer Zwischenlagerung nochmals für 20 Sekunden. Anschließend wurde ein

erster Zentrifugationsschritt durchgeführt (G3, Rotor JA 25.5, 2°C, 10 min bei 40000g), um die festen Zellbestandteile zu gewinnen. Der Überstand wurde verworfen, jedes Pellet in 20 ml eiskaltem Zentrifugationspuffer (L21) durch kräftiges Schütteln resuspendiert und erneut unter den genannten Bedingungen zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde noch ein weiteres Mal wiederholt.

Die Pellets wurden in insgesamt 40 ml kaltem HEPES-Puffer 12,5 mM (L9) resuspendiert und vereinigt. Die erhaltene Suspension wurde Reaktionsgefäße (V9) zu aliquotiert und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

### *2.1.1.3 Proteinbestimmung nach Lowry*

Die Proteinkonzentration der hergestellten Zellmembranhomogenate wurde mit der Methode nach Lowry et al. (1951) bestimmt. Dabei erfolgt zunächst die Bildung von Komplexen aus Kupfer(II)-Ionen und den Peptidbindungen von Proteinen in der sogenannten Biuretreaktion. Im zweiten Schritt werden die zweiwertigen Kupferionen zu Cu(I) reduziert, welche das hinzugefügt Folin-Ciocalteus Phenolreagenz zu Molybdänblau reduzieren. Die Intensität der resultierenden Blaufärbung ist proportional zum Proteingehalt der Probe.

#### **Durchführung**

Für die Kalibriergerade wurden aus der frisch hergestellten Albumin-Stammlösung (L1) Lösungen mit den Konzentrationen 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 und 1,5 mg/ml in HEPES-Puffer 12,5 mM (L9) jeweils in doppelter Ausführung hergestellt. Die Stammlösung (L1) bzw. der Puffer (L9) wurden ebenfalls für die Kalibrierung genutzt.

Es wurden je zwei Verdünnungen im Verhältnis 1:2 und 1:4 aus der konzentrierten Suspension des Zellmembranhomogenats mit HEPES-Puffer 12,5 mM (L9) hergestellt. Das unverdünnte Homogenat wurde ebenfalls verwendet.

200 µl jeder Probe (Albumin-Lösungen sowie Membranhomogenat-Verdünnungen) wurden in Reagenzgläser überführt, mit 2,0 ml kupferhaltiger Arbeitslösung (L2) versetzt und für genau 10 Minuten inkubiert (Biuretreaktion). Danach erfolgte die Zugabe von 200 µl Folin-Ciocalteus Phenolreagenz (L4) unter Schütteln und eine 30 minütige Inkubation unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur. Anschließend wurde jeder Ansatz in eine Küvette (G16) überführt und die Absorption bei 500 nm (G20) gemessen.

#### **Auswertung**

Mithilfe des Computerprogramms Microsoft® Excel 2007 wurde die gemessene Absorption gegen die eingesetzte Albumin-Konzentration aufgetragen und die Kalibriergerade durch lineare Regression berechnet. Anhand dieser wurde der Proteingehalt der Membranhomogenat-Proben unter Einbeziehung des entsprechenden Verdünnungsfaktors (1; 2 bzw. 4) ermittelt und als Mittelwert mit Standardfehler angegeben.

## 2.1.2 Funktionelle Experimente

### 2.1.2.1 [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindungsexperimente zur Messung der G<sub>i</sub>-Proteinaktivierung

Mit dieser Methode kann der erste Schritt der G-Proteinaktivierung, welche durch den Austausch von GDP gegen GTP an der Gα-Untereinheit des Heterotrimeren definiert ist, gemessen werden. Dazu wird ein radioaktiv markiertes GTP-Analogon genutzt, bei dem ein γ-ständiger Sauerstoff gegen das Schwefelisotop <sup>35</sup>S ausgetauscht ist. Dieses [<sup>35</sup>S]GTPγS bindet ebenso wie GTP an die Gα-Untereinheit und führt zur Dissoziation des heterotrimeren G-Proteins. [<sup>35</sup>S]GTPγS ist jedoch hydrolysestabil gegenüber der GTPase-Aktivität des Gα-Proteins, sodass die Bindung irreversibel ist. Somit wird der G-Protein-Zyklus an dieser Stelle unterbrochen.

Da [<sup>35</sup>S]GTPγS nicht membrangängig ist, werden [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindungsexperimente an Zellmembranhomogenaten durchgeführt. Die Trennung des gelösten, ungebundenen [<sup>35</sup>S]GTPγS vom gebundenen kann durch Filtration erfolgen, da die Untereinheiten des G-Proteins ebenso wie der Rezeptor membranständige Proteine sind, sodass der Radioligand an den suspendierten Zellmembranstücken akkumuliert. Die Menge der Radioaktivität, die somit im Filtermaterial zurückbleibt, ist direkt proportional zu der Menge der aktivierten Gα-Untereinheiten und daher auch zur Rezeptoraktivierung.

Generell kann [<sup>35</sup>S]GTPγS an alle Klassen der Gα-Proteine (G<sub>i</sub>, G<sub>s</sub>, G<sub>q</sub>) binden. Die für die vorliegende Arbeit durchgeführten [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindungsexperimente spiegeln jedoch nur die Aktivierung der G<sub>i/o</sub>-Familie wieder, da diese den größten Anteil der in der Zellmembran vorhandenen Gα-Proteine stellen und im Vergleich eine hohe basale Guaninnukleotid-Austauschrate aufweisen (Milligan, 2003). Dadurch ist die Agonist-induzierte G<sub>i/o</sub>-Aktivierung sehr gut messbar, während keine bzw. kaum Unterschiede zwischen dem basalen und Agonist-induzierten G<sub>q</sub>- bzw. G<sub>s</sub>-Effekt detektierbar sind (Milligan, 2003). [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindungsexperimente spiegeln demnach das Ausmaß der G<sub>i/o</sub>α-Proteinaktivierung wieder, welche abhängig von der eingesetzten Agonist-Konzentration ist.

### Versuchsdurchführung

In eine 96er-Mikrotiterplatte (V5) wurden Aqua dest., Atropin, Testsubstanz in verschiedenen Konzentrationen, GDP, [<sup>35</sup>S]GTPγS und Puffer gemäß des Pipettierschemas in Tab. 2.2 vorgelegt. Auf jeder Mikrotiterplatte wurde ebenfalls die maximale G<sub>i/o</sub>-Aktivierung durch den Einsatz einer maximal wirksamen Konzentration des Vollagonisten Iperoxo (1 μM) gemessen. Des Weiteren diente die supramaximale Konzentration des inversen Agonisten Atropin der Detektion einer möglichen Spontanaktivität der Rezeptoren, welche sich u.U. störend auf die Versuchsergebnisse hätte auswirken können. Die Messung der basalen Guaninnukleotid-Bindung erfolgte in Abwesenheit eines pharmakologisch aktiven Rezeptor-Liganden. Der Zusatz von GDP erfolgte im Hinblick auf eine Sättigung leerer Bindungsstellen an Guaninnukleotid-bindenden Proteinen im Zellmembranhomogenat. Dadurch wurde die basale [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung in den Versuchsansätzen gesenkt, sodass ein besseres Messfenster erreicht wurde. In jedem Versuch wurde eine Vierfachbestimmung durchgeführt.

Die Membranhomogenate aus Flp-In<sup>TM</sup>hM<sub>2</sub>- bzw. -hM<sub>4</sub>-CHO-Zellen wurden mit HEPES-Puffer (L9) auf eine Proteinkonzentration von 200 μg/ml eingestellt, sodass eine Endkonzentration von 40 μg/ml in jedem Ansatz vorlag. Diese Proteinkonzentration hatte sich aus Erfahrung bewährt und gewährleistete ein gutes Messfenster zwischen basaler und maximaler Vollagonist-induzierter [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung. Durch Zugabe des Homogenats wurde die Reaktion gestartet. Die

Mikrotiterplatte wurde mit Parafilm® abgedeckt und mithilfe eines Rotationsmischers kurz durchmischt. Die Inkubation erfolgte über 60 Minuten im Schüttelwasserbad bei 30°C.

Komponenten (µl)	basale Bindung	Spontanaktivität	Agonist	Maximal-effekt	Konzentration im Ansatz
Aqua dest. (R1)	100	50	50	50	
Atropin 30 µM (in R1)		50			3 µM
Testsubstanz 10 <sup>x</sup> M (in R1)			50		10 <sup>x-1</sup> M
Iperoxo 10 µM (in R1)				50	1 µM
GDP 100 µM (in L9)	50	50	50	50	10 µM
[ <sup>35</sup> S]GTPγS 0,7 nM (in L9)	50	50	50	50	0,07 nM
HEPES-Puffer 12,5 mM (L9)	200	200	200	200	10 mM
Zellmembranhomogenat 200 µM/ml in Puffer (L9)	100	100	100	100	40 µg/ml
Gesamtvolumen (µl)	500	500	500	500	

**Tab. 2.2 Pipettierschema des [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindungsversuchs mit Zellmembranhomogenat.** Die Lösungen der Testsubstanz und von Atropin wurden mit Aqua dest. (R1) hergestellt. Alle anderen Komponenten wurden in HEPES-Puffer 12,5 mM (L9) gelöst bzw. suspendiert, sodass die Endkonzentration des HEPES-Puffers insgesamt 10 mM betrug. Es erfolgte stets eine Vierfachbestimmung.

Die Trennung des Zellmembran-gebundenen vom ungebundenen Radioliganden erfolgte durch manuell gesteuerte Vakuumfiltration am Tomtec®-Harvester (G11) durch einen Glasfaserfilter (V8), der zuvor mit Aqua dest. (R1) befeuchtet worden war. Anschließend wurden die Kavitäten der Mikrotiterplatte zweimal mit ca. 500 µl Aqua dest. (R1) gespült. Das Spülwasser wurde ebenfalls durch den Filter abgesaugt. Dieser wurde anschließend für ca. 3 Minuten in einer haushaltsüblichen Mikrowelle bei 400 Watt getrocknet. Anschließend wurde mithilfe eines Heizblocks (G8) ein Szintillationswachs (V4) bei ca. 70°C auf die Filtermatte aufgeschmolzen. Nach Erkalten wurde diese in eine transparente Folienhülle (V10) überführt und die enthaltene Radioaktivität mit einem Szintillationsmessgerät (G1) mit dem entsprechenden Programm für das Isotop <sup>35</sup>S in der Einheit cpm (*counts per minute*) gemessen.

## Versuchsauswertung

Die gemessene Radioaktivität wurde gegen die logarithmierte Testsubstanz-Konzentration aufgetragen und mithilfe des Computerprogramms GraphPad Prism® mit der Vier-Parameter-logistischen Gleichung (Gleichung 15 in Abschnitt 2.1.5.1) ausgewertet. Dabei wurde mittels F-Test auf einen von  $n_H=1$  abweichenden Hill-Koeffizienten getestet. Die basale [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung, theoretisch betrachtet als Radioligandbindung bei unendlich großer Verdünnung der Testsubstanz, wurde ebenso in die Konzentrations-Effekt-Beziehung einbezogen, indem ihr ein um zwei Dekaden kleinerer Wert als die kleinste tatsächlich verwendete Testsubstanz-Konzentration zugeordnet wurde.

Für jeden Versuchstag erfolgte eine Normierung der Konzentrations-Effekt-Kurve jeder getesteten Substanz auf den jeweils gemessenen Basalwert ([<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung ohne Ligand) als 0% und auf eine maximal wirksame Konzentration des Vollagonisten Iperoxo als 100% der [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung. Die Mittelwerte der normierten Einzelversuche wurden zusammengefasst und erneut einer nicht-linearen Regressionsanalyse nach Gleichung 15 unterzogen (mit F-Test bzgl.  $n_H=1$ ). Somit konnte die Fähigkeit jeder Testsubstanz, den G<sub>i</sub>-Signalweg zu aktivieren, durch die Kennwerte logEC<sub>50</sub> (Konzentration bei halbmaximaler G<sub>i</sub>-Aktivierung) und die im Vergleich zu Iperoxo erreichte Höhe der G<sub>i</sub>-Aktivierung (E<sub>max</sub>) charakterisiert werden.

### 2.1.2.2 Messung der cAMP-Bildung nach PTX-Vorbehandlung als Maß für die G<sub>s</sub>-Proteinaktivierung

Das cyclische Adenosinmonophosphat (cAMP) ist ein sekundärer Botenstoff, der intrazellulär nach Aktivierung des Enzyms Adenylatcyclase durch stimulatorische G-Proteine (G<sub>αs</sub>-Familie) gebildet wird. Daher ist die cAMP-Konzentration ein guter Surrogatparameter für das Ausmaß einer Rezeptor-vermittelten G<sub>s</sub>-Aktivierung durch einen Agonisten.

Zur Messung der cAMP-Konzentration wurde ein kommerziell erhältliches Analysekit (K1) verwendet, dessen Funktionsprinzip auf einem kompetitiven Immunoassay beruht und bei dem der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) als Messmethode genutzt wird.

Im Versuchsansatz konkurrieren endogen gebildetes cAMP und das hinzugefügte cAMP-d2-Konjugat um die Bindung an einen anti-cAMP-Antikörper. Dieser ist am Fc-Teil mit einem Kryptat verbunden, das ein Europium-Kation enthält (anti-cAMP-Kryptat). Das Kryptat fungiert als Donor und kann nach Anregung durch Licht mit einer Wellenlänge von 337 nm Energie an den Akzeptor (cAMP-d2-Konjugat) übertragen, wenn eine räumliche Nähe durch eine Antikörperbindung gegeben ist. Der Akzeptor strahlt dann Lichtenergie von 665 nm aus, welche detektiert wird. Als interner Standard dient die Emission des Donors bei 620 nm.

Der Quotient („Ratio“) der gemessenen Fluoreszenzen ( $(\text{Akzeptor}_{665\text{nm}}/\text{Donor}_{620\text{nm}}) \times 10^4$ ) wird somit kleiner, je höher die endogene cAMP-Konzentration ist, da weniger FRET vom Donor zum Akzeptor stattfindet. In einem cAMP-Konzentrationsbereich von ca. 1-100 nM ist die Änderung des Quotienten in Abhängigkeit von der cAMP-Menge am größten und bietet somit den optimalen Messbereich (vgl. Herstellerprotokoll).

Die Versuche wurden an suspendierten, lebenden Flp-In<sup>TM</sup>hM<sub>2</sub>- bzw. -hM<sub>4</sub>-CHO-Zellen durchgeführt, die zuvor mit Pertussis toxin (PTX, R40) behandelt worden waren. PTX ist ein bakterielles Exotoxin aus *Bordetella pertussis*, welches der Erreger des Keuchhustens ist. Es ist ein Protein, das aus den Untereinheiten A1 und B5 aufgebaut ist. Während die B5-Untereinheit für die Bindung an Zellen und die Translokation in das Zellinnere verantwortlich ist, besitzt die A1-Untereinheit enzymatische Aktivität und führt zur ADP-Ribosylierung von G-Proteinen der G<sub>i/o</sub>α-Familie (vgl. z.B. Review von Simon et al., 2014). Die Modifizierung findet dabei an einem Cystein am C-Terminus des G<sub>i/o</sub>α-Proteins statt, wodurch die Interaktion des heterotrimeren G-Proteins mit dem Rezeptor blockiert wird (Hsia et al., 1985).

PTX führt somit zur Ausschaltung G<sub>i</sub>-vermittelter Signalwege. In der vorliegenden Arbeit wurde es angewendet, um das Ausmaß der alternativen G<sub>s</sub>-Aktivierung durch M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Rezeptoren zu untersuchen.

Die Versuche wurden in Anwesenheit des nicht-selektiven, kompetitiven Phosphodiesterase-Inhibitors 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX, R21) in einer maximal-wirksamen Konzentration von 1 mM durchgeführt (IC<sub>50</sub> für diverse PDE-Subtypen ≈ 2-50 μM, Beavo et al., 1970). Dadurch wurde der Abbau des endogen gebildeten cAMPs blockiert, sodass die Menge des während der Inkubationszeit intrazellulär akkumulierten Botenstoffs gemessen wurde.

Zur Positivkontrolle der Adenylatcyclase-Funktion wurde das Diterpen Forskolin verwendet, welches ein direkter Stimulator der meisten Isoformen dieses Enzyms ist. Forskolin bindet neben der ATP-Bindungstasche an die Adenylatcyclase und führt dadurch zu einer aktiven Konformation, wodurch eine G<sub>s</sub>-Protein-unabhängige cAMP-Bildung stimuliert wird (vgl. z.B. Tang & Hurley, 1998).

Das Mitführen einer hohen Konzentration des inversen Agonisten Atropin an jedem Versuchstag diente der Detektion einer möglichen Rezeptor-Spontanaktivität.

## Versuchsdurchführung

Zwei Tage vor dem geplanten cAMP-Versuch wurden ca.  $3 \times 10^6$  Zellen der Zell-Linien Flp-In<sup>TM</sup>hM<sub>2</sub>- bzw. -hM<sub>4</sub>-CHO auf kleine Zellkulturschalen (V2) in ca. 8ml Nährmedium (L15) ausgesät und wie in Abschnitt 2.1.1.1 beschrieben kultiviert. Diese Zellmenge hatte sich aus Erfahrung bewährt, damit am folgenden Tag ein zu 70-80% konfluenten Zellbewuchs in der Kulturschale erhalten werden kann.

16-18 Stunden vor Versuchsbeginn wurde das alte Nährmedium abgesaugt und durch 5 ml frisches ersetzt, welches PTX in einer Konzentration von 50 ng/ml enthielt. Dafür wurden zuvor 5,0 ml Nährmedium (L15) mit 1,25 µl der PTX-Stammlösung (L19) versetzt und vorsichtig gemischt. Die PTX-Inkubation erfolgte unter den in 2.1.1.1 beschriebenen Bedingungen im Brutschrank bei 37°C für 16-18 Stunden.

Das PTX-haltige Nährmedium wurde abgesaugt. Die Zellen wurden mit 1,5 ml Trypsin-EDTA-Lösung von der Zellkulturschale gelöst, in ca. 3,5 ml frischem Nährmedium (L15) aufgenommen und in ein Kunststoffgefäß (V3) überführt, in dem sie zentrifugiert wurden (G3 mit Rotor JS 4.3 mit 900 rpm bei 4°C für 4 min). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in ca. 12 ml HBSS/HEPES-Puffer (L7) aufgenommen. Die Zelldichte der Suspension wurde mithilfe der Neubauer-Zählkammer (G14) bestimmt. Anschließend wurde ein entsprechendes Volumen mit  $2 \times 10^6$  Zellen in ein neues Gefäß (V3) überführt und nochmals wie zuvor zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und die Zellen in 1 ml des IBMX-haltigen cAMP-Puffers (L3) aufgenommen (Zellsuspension mit 2.000 Zellen/µl). Für die Vorversuche zur Zellzahloptimierung wurden die beschriebenen Schritte zur Herstellung der Zellsuspension in cAMP-Puffer (L3) so angepasst, dass auch Zelldichten von  $10 \times 10^6$  bzw.  $5 \times 10^6$  Zellen/ml erreicht wurden.

Die Zellsuspension wurde in die Kavitäten einer 384er-Mikrotiterplatte (V6) pipettiert (siehe Tab. 2.3). Diese wurde anschließend bei 800 rpm (G3, Rotor JA 25.50, Raumtemperatur) für 10 Sekunden zentrifugiert und im Brutschrank bei 37°C für 30min vorinkubiert.

Die Zugabe der Test- und Kontrollsubstanzen, welche am Versuchstag ausgehend von ihren Stammlösungen frisch mit cAMP-Puffer (L3) hergestellt worden waren, erfolgte gemäß Tab. 2.3 (oberer Teil), wonach eine 30 minütige Inkubation im Brutschrank erfolgte.

Komponenten (µl)	Negativkontrolle	basales cAMP	Positivkontrolle	Agonist	Spontanaktivität	Konz. im Ansatz
Zellen 2.000/µl (in L3)	5	5	5	5	5	10.000/Kavität
cAMP-Puffer (L3)	5	5				
Forskolin 20 µM			5			10 µM
Testsubstanz $2 \times 10^x$ M bzw. Iperoxo 20 µM				5		$10^x$ M bzw. 10 µM
Atropin 200 µM					5	100 µM
C&L-Puffer (K1)	5					
cAMP-d2 in C&L-Puffer (K1)		5	5	5	5	
anti-cAMP-Kryptat in C&L-Puffer (K1)	5	5	5	5	5	
Gesamtvolumen (µl)	20	20	20	20	20	

**Tab. 2.3 Pipettierschema des cAMP-Versuchs an PTX-vorbehandelten Flp-In<sup>TM</sup>hM<sub>2</sub>- bzw. -hM<sub>4</sub>-CHO-Zellen in Suspension.** Nach Vorversuchen wurde die optimale Zellzahl auf 10.000 Zellen pro Messpunkt festgelegt, um ein optimales Messfenster zu gewährleisten. Die Zellsuspension und die Substanzlösungen wurden an jedem Tag frisch mit IBMX-haltigen cAMP-Puffer (L3) hergestellt. Iperoxo wurde in einer Konzentration von 10 µM an jedem Versuchstag mitgeführt. Die Lösungen des cAMP-d2-Konjugats und des anti-cAMP-Kryptats wurden ebenfalls frisch nach Bedarf mit dem im Analysekit (K1) enthaltenem Kryptat- und Lyse-Puffer (C&L-Puffer) hergestellt. Es erfolgte jeweils eine Zweifachbestimmung.

Die Zellstimulation wurde durch Zugabe von Kryptat- und Lyse-Puffer (C&L-Puffer) mit oder ohne cAMP-d2 gemäß Tab. 2.3 (unterer Teil) gestoppt. Dieser Puffer war Bestandteil des Analysesets (K1) und enthielt u.a. das Tensid Triton™ X-100, welches zur schnellen und vollständigen Lyse der eingesetzten Zellen führte. Danach wurde zu allen Versuchsansätzen der anti-cAMP-Kryptat-Antikörper hinzugegeben und die Platte für 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Während dieser Zeit stellte sich das Gleichgewicht der Antikörperbindung zwischen endogenem cAMP und hinzugefügtem cAMP-d2 aus, welches laut Herstellerangaben für 24 Stunden stabil blieb. Innerhalb dieses Zeitfensters erfolgte die Messung der Fluoreszenz (G3).

### Versuchsauswertung

Durch das computergestützte Messverfahren wurden die Messwerte als *Ratio* (s.o.) ausgegeben. Aus diesem wurde gemäß der Herstelleranweisung der Delta F-Wert in Prozent berechnet:

$$\text{Delta F(\%)} = \frac{\text{Ratio}_{\text{Messwert}} - \text{Ratio}_{\text{neg}}}{\text{Ratio}_{\text{neg}}} \times 100$$

$\text{Ratio}_{\text{Messwert}}$	Ratio des Basalwertes bzw. einer pharmakologisch aktiven Substanz
$\text{Ratio}_{\text{neg}}$	Mittelwert des Ratio der Negativkontrolle

Die Delta F-Werte wurden gegen die logarithmierte Konzentration der Testsubstanz aufgetragen und anhand der Vier-Parameter-logistischen Gleichung (Gleichung 15) ausgewertet. Hierbei wurde bei jedem Einzelversuch mittels F-Test untersucht, ob der Hill-Koeffizient signifikant vom Wert  $n_H = -1$  abwich. Die Werte der basalen cAMP-Bildung wurden in die Konzentrations-Effekt-Beziehung einbezogen, indem sie einer um zwei Dekaden kleineren Konzentration als die tatsächlich eingesetzte Testsubstanz-Konzentration zugeordnet wurde.

Für jeden Versuchstag erfolgte eine Normierung der Delta F-Werte auf die gemittelte basale cAMP-Bildung als 0% und eine maximal-wirksame Konzentration der Muttersubstanz Iperoxo von 10  $\mu\text{M}$ . Die Mittelwerte der normierten Einzelversuche wurden zusammengefasst und erneut einer nicht-linearen Regressionsanalyse nach Gleichung 15 mit F-Test auf signifikante Abweichung von  $n_H = 1$  unterzogen (durch Normierung änderte sich der Kurvenverlauf von negativ zu positiv).

Somit konnte die Fähigkeit jeder Testsubstanz, den  $G_s$ -Signalweg zu aktivieren, durch die Kennwerte  $\log EC_{50}$  (log-Konzentration bei halbmaximaler cAMP-Generierung) und die im Vergleich zu Iperoxo erreichte Höhe der cAMP-Bildung charakterisiert werden.

#### 2.1.2.3 Gleichzeitige Messung der $G_i$ - und $G_s$ -Proteinaktivierung im cAMP-Assay

Die Messung der  $G_i$ -Signalwegsaktivierung durch Bestimmung der Abnahme der intrazellulären cAMP-Konzentration ist ebenfalls möglich. Um eine Hemmung der Adenylatcyclase-Aktivität durch  $G_{i/\alpha}$ -Proteine bei Anwendung des cAMP-Analysesets (K1) messbar zu machen, muss das Enzym jedoch in Anwesenheit der Testsubstanz gleichzeitig mit Forskolin in fixer Konzentration stimuliert werden. Das generelle Funktionsprinzip des Analysesets (K1) wurde bereits im vorangehenden Abschnitt erläutert.

Für die Versuche wurden lebende Flp-In™hM<sub>2</sub>- bzw. -hM<sub>4</sub>-CHO-Zellen verwendet, die im Gegensatz zur Methode der alleinigen  $G_s$ -Aktivierung (siehe Abschnitt 2.1.2.2) nicht mit PTX vorbehandelt worden waren. Da die verwendeten Zellen eine hohe M<sub>2</sub>- bzw. M<sub>4</sub>-Expressionsrate besitzen, wurde



mit diesen Experimenten geprüft, ob eine der G<sub>i</sub>-Signalwegsaktivierung nachgeschaltete G<sub>s</sub>-Stimulation durch die Testsubstanzen an beiden Rezeptorsubtypen induziert.

### Versuchsdurchführung

Die Flp-In<sup>TM</sup>hM<sub>2</sub>- bzw. -hM<sub>4</sub>-CHO-Zellen einer 70-90% bewachsenen Zellkulturschale (V2) wurden verwendet, um wie in Abschnitt 2.1.2.2 beschrieben, eine Zellsuspension mit 2.000 Zellen/μl in cAMP-Puffer (L3) herzustellen. Für die Vorversuche zur Bestimmung der optimalen Zellzahl wurden die Schritte entsprechend angepasst um Zelldichten von 10.000 bzw. 5.000 Zellen/ μl zu erhalten.

Die Zellsuspension wurde gemäß des Schemas in Tab. 2.4 in die Kavitäten einer 384er-Mikrotiterplatte (V6) pipettiert und für 1 Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der Test- und Kontrollsubstanzen, welche am Versuchstag ausgehend von ihren Stammlösungen frisch mit Forskolin-haltigen cAMP-Puffer (2 bzw. 0,6 μM Forskolin) hergestellt worden waren. Zur Messung des basalen cAMP-Levels wurde cAMP-Puffer (L3) ohne Forskolin verwendet. Die Versuchsansätze wurden im Brutschrank für 30 Minuten inkubiert. Die Beendigung des Versuchs und die Messung erfolgten analog zu Abschnitt 2.1.2.2.

Analog zu diesem Versuch wurden Testsubstanzen auch ohne gleichzeitige Anwesenheit von Forskolin eingesetzt. Dazu wurden die entsprechenden Konzentrationen mit cAMP-Puffer (L3) hergestellt. Alle anderen Komponenten entsprachen dem Pipettierschema aus Tab. 2.4.

Komponenten (μl)	Negativkontrolle	basales cAMP	100% cAMP	Agonist	Spontanaktivität	Konz. im Ansatz
Zellen 2.000/μl (in L3)	5	5	5	5	5	10.000/Kavität
cAMP-Puffer (L3)	5	5				
cAMP-Puffer(L3) mit Forskolin 2 od. 0,6 μM			5			1 bzw. 0,3 μM Forskolin
Testsubstanz 2x10 <sup>x</sup> M (*)				5		10 <sup>x</sup> M
Atropin 200 μM (*)					5	100 μM
C&L-Puffer (K1)	5					
cAMP-d2 in C&L-Puffer (K1)		5	5	5	5	
anti-cAMP-Kryptat in C&L-Puffer (K1)	5	5	5	5	5	
Gesamtvolumen (μl)	20	20	20	20	20	

**Tab. 2.4 Pipettierschema des cAMP-Versuchs an Flp-In<sup>TM</sup>hM<sub>2</sub>- bzw. -hM<sub>4</sub>-CHO-Zellen in Suspension (ohne PTX-Vorbehandlung).** Nach Vorversuchen wurde die optimale Zellzahl auf 10.000 Zellen pro Messpunkt festgelegt, um ein optimales Messfenster zu gewährleisten. Die Zellsuspension wurde an jedem Tag frisch mit IBMX-haltigen cAMP-Puffer (L3) hergestellt. (\*) Zur Herstellung der eingesetzten Testsubstanz- und Atropin-Konzentrationen wurde ein 2 bzw. 0,6 μM Forskolin-haltiger cAMP-Puffer verwendet. Für Versuche ohne gleichzeitige Anwesenheit von Forskolin wurden die Substanzkonzentrationen mit cAMP-Puffer (L3) hergestellt. Die Lösungen des cAMP-d2-Konjugats und des anti-cAMP-Kryptats wurden ebenfalls frisch nach Bedarf mit dem im Analysekit (K1) enthaltenem Kryptat- und Lyse-Puffer (C&L-Puffer) hergestellt. Es erfolgte jeweils eine Zweifachbestimmung.

### Versuchsauswertung

Die Messwerte wurden, wie im vorangehenden Abschnitt 2.1.2.2 erläutert, in Delta F-Werte umgeformt und gegen die logarithmierte Testsubstanz-Konzentration aufgetragen. Die Auswertung erfolgte mithilfe des Computerprogramms GraphPad Prism®, indem berechnet wurde, ob die Daten besser durch die Vier-Parameter-logistische Gleichung monophasisch oder durch eine glockenförmige Konzentrations-Effekt-Beziehung biphasisch beschrieben werden konnten. Dazu

wurde ein F-Test durchgeführt, welcher auf Grundlage der Summe der kleinsten Abstandsquadrate der jeweiligen Regressionsanalyse über die Annahme der Nullhypothese ( $H_0$ : monophasisches Modell nach Gleichung 15 mit  $n_H=-1$ ) oder der Alternativhypothese ( $H_1$ : biphasisches Modell nach Gleichung 16 mit  $n_{H-1}=-1$  und  $n_{H-2}=1$ , siehe Abschnitt 2.1.5.2) entschied (*extra sum-of-squares F test*). Bei einem p-Wert über 0,05 ( $p>0,05$ ) wurde zu Gunsten des einfacheren, monophasischen Modells entschieden. Diese Methode zum Vergleich der zwei Modelle konnte gewählt werden, da beide miteinander verschachtelt sind, d.h. das monophasische Modell ist ein spezieller Fall des biphasischen Modells.

Es erfolgte eine Normierung auf den Basalwert der cAMP-Akkumulation ohne Forskolin als 0% und das durch 1 bzw. 0,3  $\mu\text{M}$  Forskolin stimulierte cAMP als 100%. Die Mittelwerte der normierten Einzelversuche wurden zusammengefasst und wie zuvor einer nicht-linearen Regressionsanalyse nach Gleichung 15 bzw. Gleichung 16 unterzogen. Bei Zutreffen des glockenförmigen Modells nach Gleichung 16 wurde die Hemmung der Adenylatcyclase-Aktivität durch den  $\log\text{IC}_{50}$ - bzw.  $\text{pIC}_{50}$ -Wert und die Stimulation des Enzyms durch den  $\log\text{EC}_{50}$ - bzw.  $\text{pEC}_{50}$ -Wert charakterisiert.

#### 2.1.2.4 Einsatz von N-Ethylmaleimid zur $G_i$ -Inhibition im cAMP-Assay

Die Substanz N-Ethylmaleimid (NEM) wurde eingesetzt, um die G-Proteine der  $G_{i/o}\alpha$ -Familie durch Alkylierung von Sulfhydrylgruppen zu hemmen. NEM reagiert mit der gleichen Aminosäure der  $G_{i/o}\alpha$ -Proteine, einem Cystein am C-Terminus, an der auch PTX angreift und unterbindet dadurch dessen Interaktion mit dem Rezeptor (Asano & Ogasawara, 1985; Hoshino et al., 1990). Unter milden Bedingungen läuft die Alkylierungsreaktion mit NEM selektiv an der genannten G-Proteinfamilie ab (Shinoda et al., 1990).

Die Versuche wurden parallel an unbehandelten (Kontrolle) und NEM-behandelten Flp-In<sup>TM</sup>hM<sub>2</sub>- bzw. -hM<sub>4</sub>-CHO-Zellen unter Forskolin-Stimulation durchgeführt. Für die Kontrolle wurde ein glockenförmiger Verlauf der Konzentrations-Effekt-Kurve nach Gleichung 16 erwartet (vgl. Versuche in Abschnitt 2.1.2.3), während durch die NEM-Behandlung die Ausschaltung der  $G_i$ -vermittelten Hemmung der cAMP-Akkumulation erwartet wurde, sodass die monophasische Auswertung nach der Vier-Parameter-logistischen Gleichung (Gleichung 15) vorgenommen werden konnte.

### Versuchsdurchführung

Von einer zu 70-90% bewachsenen Zellkulturschale (V1) wurden die Zellen mit 3 ml Trypsin abgelöst und in ca. 12 ml Nährmedium (L15) aufgenommen. Die Zelldichte dieser Suspension wurde mithilfe der Neubauer-Zählkammer (G14) bestimmt. In doppelter Ausführung pro Zell-Line wurde ein entsprechendes Volumen mit  $3 \times 10^6$  Zellen in ein Kunststoffgefäß (V3) überführt und anschließend zentrifugiert (G3 mit Rotor JS 4.3 mit 900 rpm bei 4°C für 4 min). Die Überstände wurden vorsichtig abgesaugt und die Zellpellets in jeweils 1 ml HBSS/HEPES-Puffer (L7) aufgenommen. Eine der Zellsuspensionen pro Zell-Line diente als Kontrolle (ohne Behandlung) während die andere mit 3,2  $\mu\text{l}$  der NEM-Stammlösung 10 mM (L17) versetzt wurde, sodass die NEM-Endkonzentration 32  $\mu\text{M}$  betrug. Beide Zellsuspensionen wurden für 20 Minuten im Wasserbad bei 37°C unter gelegentlichen, manuellen Schütteln inkubiert.

Aus der Kontroll- und NEM-Zellsuspension wurden anschließend jeweils 333  $\mu\text{l}$  verworfen. Es folgte ein Zentrifugationsschritt unter den oben genannten Bedingungen. Die Überstände wurden vorsichtig abgesaugt und die Zellen in jeweils 1 ml cAMP-Puffer (L3) aufgenommen (Zelldichte von

2.000 Zellen/ $\mu\text{l}$ ). Die Zellsuspensionen wurden in eine 384er-Mikrotiterplatte nach dem Schema in Tab. 2.5 pipettiert und für 1 Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der Test- und Kontrollsubstanzen, welche am Versuchstag ausgehend von ihren Stammlösungen frisch mit Forskolin-haltigen cAMP-Puffer (0,6  $\mu\text{M}$  Forskolin) hergestellt worden waren. Zur Messung des basalen cAMP-Levels wurde cAMP-Puffer (L3) ohne Forskolin verwendet. Die Versuchsansätze wurden im Brutschrank für 30 Minuten inkubiert. Die Beendigung des Versuchs und die Messung erfolgten analog zu Abschnitt 2.1.2.2.

Komponenten ( $\mu\text{l}$ )	basales cAMP	100% cAMP	Agonist	Spontanaktivität	Konz. im Ansatz
Zellen jeweils Kontrolle bzw. NEM-behandelt 2.000/ $\mu\text{l}$ (in L3)	5	5	5	5	10.000/Kavität
cAMP-Puffer (L3)	5				
cAMP-Puffer (L3) mit Forskolin 0,6 $\mu\text{M}$		5			0,3 $\mu\text{M}$ Forskolin
Acetylcholin $2 \times 10^x \text{ M}$ (*)			5		$10^x \text{ M}$
Atropin 200 $\mu\text{M}$ (*)				5	100 $\mu\text{M}$
C&L-Puffer (K1)					
cAMP-d2 in C&L-Puffer (K1)	5	5	5	5	
anti-cAMP-Kryptat in C&L-Puffer (K1)	5	5	5	5	
Gesamtvolumen ( $\mu\text{l}$ )	20	20	20	20	

**Tab. 2.5 Pipettierschema des cAMP-Versuchs an Flp-In<sup>TM</sup>hM<sub>2</sub>- bzw.-hM<sub>4</sub>-CHO-Zellen in Suspension mit und ohne NEM-Behandlung.** Nach Vorversuchen wurde die optimale Zellzahl auf 10.000 Zellen pro Messpunkt festgelegt, um ein optimales Messfenster zu gewährleisten. Die Zellsuspensionen (Kontrolle und NEM-behandelt) wurden an jedem Tag wie im Text beschrieben mit frischem IBMX-haltigen cAMP-Puffer (L3) hergestellt. (\*) Zur Herstellung der eingesetzten Acetylcholin- und Atropin-Konzentrationen wurde ein 0,6  $\mu\text{M}$  Forskolin-haltiger cAMP-Puffer verwendet. Die Lösungen des cAMP-d2-Konjugats und des anti-cAMP-Kryptats wurden ebenfalls frisch nach Bedarf mit dem im Analysekit (K1) enthaltenem Kryptat- und Lyse-Puffer (C&L-Puffer) hergestellt. Eine Negativkontrolle wurde mit jeder Zellsuspension analog zu Tab. 2.4 durchgeführt. Es erfolgte jeweils eine Zweifachbestimmung.

### Versuchsauswertung

Die Auswertung der Daten der Kontrolle und der NEM-behandelten Zellen wurde analog zu Abschnitt 2.1.2.3 durchgeführt.

Für die unbehandelten Zellen (Kontrolle) konnte bei Zutreffen des glockenförmigen Modells nach Gleichung 16 die Hemmung der Adenylatcyclase-Aktivität durch den  $\log\text{IC}_{50}$ - bzw.  $\text{pIC}_{50}$ -Wert und die Stimulation des Enzyms durch den  $\log\text{EC}_{50}$ - bzw.  $\text{pEC}_{50}$ -Wert charakterisiert werden. Nach Ausschalten der  $G_{i/o}\alpha$ -Proteine durch NEM-Behandlung konnte die isolierte  $G_s$ -Stimulation anhand Gleichung 15 ausgewertet und durch den  $\log\text{EC}_{50}$ - bzw.  $\text{pEC}_{50}$ -Wert beschrieben werden.

## 2.1.3 Radioligand-Bindungsstudien mit [<sup>3</sup>H]NMS

### 2.1.3.1 Theoretische Grundlagen von Radioligand-Bindungsstudien

Durch Zugabe eines Liganden zu einem Rezeptor laufen Assoziations- und Dissoziationsvorgänge gleichzeitig ab, die sich anhand des Massenwirkungsgesetzes beschreiben lassen, wenn die Grundvoraussetzung eines reversiblen Bindungsmodus erfüllt ist.

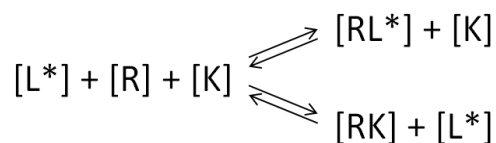


[L] bzw. [R] freie Konzentration des Liganden bzw. des unbesetzten Rezeptors  
[RL] Konzentration des Rezeptor-Ligand-Komplexes

Die Assoziations- und Dissoziationsreaktion sind jeweils durch Geschwindigkeitskonstanten  $k_{\text{Ass}}$  bzw.  $k_{\text{Dis}}$  charakterisiert. Im Gleichgewicht sind die Geschwindigkeiten beider Reaktionen gleich, sodass konstante Konzentrationen der drei Komponenten vorliegen. Der Quotient der Geschwindigkeitskonstanten ist in diesem Fall als Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D$  definiert und entspricht der Ligand-Konzentration, bei der die Hälfte des eingesetzten Liganden an Rezeptoren gebunden als RL-Komplex vorliegt. Der Kehrwert von  $K_D$  ist die Gleichgewichtsassoziationskonstante  $K_A$ :

$$K_D = \frac{k_{\text{Dis}}}{k_{\text{Ass}}} = \frac{[R][L]}{[RL]} = \frac{1}{K_A} \quad \text{Gleichung 2}$$

Grundsätzlich wird in Gleichgewichtsbindungsexperimenten die Rezeptorbindung einer festen Radioligand-Konzentration in Gegenwart steigender Konzentrationen einer nicht-radioaktiven Testsubstanz, auch Kompetitor genannt, nach Erreichen des Gleichgewichts bestimmt. Dabei unterscheidet man homologe von heterologen Kompetitionsexperimenten, je nachdem ob Radioligand und Kompetitor strukturidentisch sind oder verschieden. Radioligand und Kompetitor konkurrieren um eine Bindungsstelle am Rezeptor, sodass mit steigender Konzentration des Kompetitors die Menge der Rezeptor-Radioligand-Komplexe sinkt.



**Abb. 2.1 Bindungsvorgänge bei Kompetitionsexperimenten.** Radioligand [ $L^*$ ] und Kompetitor [K] binden reversibel an die gleiche Bindungsstelle des Rezeptors [R], es handelt sich jeweils um eine einfache bimolekulare Interaktion. Bei konstanter Konzentration von [ $L^*$ ] überwiegt mit steigender Zugabe von [K] die Bildung von Rezeptor-Kompetitor-Komplexen [RK], wodurch das rezeptorgebundene radioaktive Signal abnimmt.

Für die Einstellung der optimalen Versuchsbedingungen ist bei Kompetitionsexperimenten jedoch darauf zu achten, dass stets ein Überschuss des freien (Rezeptor-ungebundenen) Radioliganden zur Verfügung steht und somit die freie Radioligand-Konzentration als konstant gelten kann. In der vorliegenden Arbeit wurden alle Gleichgewichtsbindungsversuche mit dem Radioliganden [<sup>3</sup>H]N-Methylscopolamin ([<sup>3</sup>H]NMS) durchgeführt, welcher an die orthosterische Bindungsstelle der muskarinischen Acetylcholinrezeptoren bindet. Somit konnte die Bindungsaffinität der Testsubstanzen zur orthosterischen Bindungstasche des  $M_2$ - und  $M_4$ -Rezeptors charakterisiert werden.

Durch geeignete Verfahren, wie z. B. schnelle Filtration, können Ligand-besetzte und unbesetzte Rezeptoren von ungebundenen (gelösten) Liganden getrennt und somit die Menge der Rezeptor-Radioligand-Komplexe durch Messung der Radioaktivität bestimmt werden.

Für eine bimolekulare Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor gilt, dass die Anzahl der besetzten Bindungsstellen (B) der Anzahl der Rezeptor-Ligand-Komplexe [RL] entspricht. Diese kann auch als Differenz zwischen der Gesamtanzahl an verfügbaren Bindungsstellen im System ( $B_{\max}$ ) und der ungebundenen Rezeptorpopulation [R] dargestellt werden.

$$B = [RL] = B_{\max} - [R] \quad \text{Gleichung 3}$$

Diese Gleichung wird mit der freien Ligandkonzentration [L] multipliziert, wodurch nach entsprechender Umformung der mathematische Zusammenhang zwischen Rezeptorbindung und der eingesetzten Ligandkonzentration sowie der Gleichgewichtsdissoziationskonstante deutlich wird:

$$B \cdot [L] = B_{\max} \cdot [L] - [R] \cdot [L] \quad \text{mit Gleichung 2 und Gleichung 3 gilt}$$

$$\Leftrightarrow B \cdot [L] = B_{\max} \cdot [L] - K_D \cdot B \quad [R] \cdot [L] = K_D \cdot B$$

$$B \cdot ([L] + K_D) = B_{\max} \cdot [L]$$

$$B = \frac{B_{\max} \cdot [L]}{[L] + K_D} \quad \text{Gleichung 4}$$

Für die Auswertung wird die gemessene Radioaktivität gegen den Logarithmus der eingesetzten Kompetitor-Konzentration aufgetragen und der resultierende sigmoide Zusammenhang mittels Vier-Parameter-logistischer Gleichung (Gleichung 15) ausgewertet. Darauf und auf die Berechnung der Kenngrößen der Rezeptorbindung wird in den folgenden Abschnitten näher eingegangen.

### 2.1.3.2 Bestimmung der Radioligand-Konzentration

Durch Radioligand-Bindungsuntersuchungen werden unter anderem die Bindungsaffinitäten von Testsubstanzen zu einem Rezeptor berechnet. Dazu ist es nötig, die eingesetzte Konzentration des Radioliganden zu kennen.

Zu diesem Zweck wurden 50 µl der an dem Versuchstag hergestellten Radioligand-Stammlösung in einem Probenvial mit 5 ml Szintillationscocktail (R8) versetzt und nach halbstündiger Inkubationszeit vermessen. Die Radioligand-Konzentration [L\*] (in nmol/l) wurde anschließend mit folgender Formel berechnet:

$$[L^*] = \frac{A}{A_{\text{spez}} \cdot 2220 \cdot V} \quad \text{Gleichung 5}$$

A	gemessene Aktivität der Probe in dpm
$A_{\text{spez}}$	spezifische Aktivität des Radioliganden in Ci/mmol
V	eingesetztes Probevolumen in ml
2220	Faktor zur Umrechnung von Ci nach dpm mit der Einheit dpm/nCi (mit $1\text{Ci} = 3,7 \cdot 10^{10}\text{Bq}$ und $1\text{Bq} = 60\text{dpm}$ gilt $1\text{nCi} = 37\text{Bq} = 2220\text{dpm}$ )

Es erfolgte immer eine Doppelbestimmung der Radioligand-Konzentration, deren Mittelwert für die weitere Berechnung genutzt wurde. Die Hintergrundradioaktivität wurde ebenfalls in zweifacher Ausführung bestimmt, indem je 5 ml Szintillationscocktail im Probenvial vermessen wurden. Diese wurde durch das Messgerät automatisch von jedem Messwert abgezogen.

### 2.1.3.3 *Homologe Konkurrenzexperimente mit Zellmembranhomogenaten zur Berechnung von $K_D$ und $B_{max}$*

In homologen Konkurrenzexperimenten sind der eingesetzte Radioligand und der Kompetitor strukturell identisch. Diese Versuchsanordnung ermöglicht die Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D$  des Radioliganden, welche für die Berechnung der Bindungsaffinität strukturverschiedener Testsubstanzen (siehe Abschnitt 2.1.3.5) bekannt sein muss. Für jede verwendete Charge eines Zellmembranhomogenats wurde der  $K_D$ -Wert des verwendeten Radioliganden [ $^3\text{H}$ ]NMS berechnet und die Anzahl der vorhandenen Bindungsstellen  $B_{max}$  als weiteres Charakteristikum bestimmt.

#### **Versuchsdurchführung**

In einer Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten (V5) wurden steigende Konzentrationen des „kalten“ (nicht-radioaktiven) Kompetitors N-Methylscopolamin (NMS) vorgelegt (s. Pipettierschema Tab. Verweis). Für die Messung der unspezifischen Bindung wurde eine supramaximale Konzentration der strukturverwandten Substanz Atropin eingesetzt, welche die gleiche spezifische Bindungsstelle an muskarinischen Rezeptoren wie NMS besetzt. Die Messung der Gesamtbindung erfolgte in Abwesenheit eines Kompetitors. In jedem Versuch wurden die einzelnen Messwerte in Dreifachbestimmung durchgeführt.

Zu jedem Ansatz wurden [ $^3\text{H}$ ]NMS und 12,5 mM HEPES-Puffer (L9) hinzugefügt. Die Endkonzentration des Radioliganden sollte dabei 0,2 nM betragen, da sich diese Menge aus Erfahrung in Gleichgewichtsexperimenten gut bewährt hat. Die tatsächliche [ $^3\text{H}$ ]NMS-Konzentration wurde wie in Abschnitt 2.1.3.2 beschrieben bestimmt.

Das konzentrierte Membranhomogenat aus  $M_2$ - bzw.  $M_4$ -Rezeptor exprimierenden FlpIn<sup>TM</sup>-CHO-Zellen (siehe Abschnitt 2.1.1.2) wurde mit HEPES-Puffer (L9) so verdünnt, dass eine Gesamtbindung von 400-600 cpm zu erwarten war (meist 1:10 bis 1:20). Dieser Bereich wurde gewählt, um einerseits ein ausreichend großes Messfenster zu erreichen. Andererseits wurde sichergestellt, dass bei der angestrebten [ $^3\text{H}$ ]NMS-Konzentration von 0,2 nM im Versuchsansatz nur maximal 10% an Rezeptoren gebunden und somit stets ein Überschuss des Radioliganden für die Konkurrenz mit kalten NMS vorlag.

Der Start der Bindungsreaktion erfolgte durch Zugabe des Zellmembranhomogenats zu jedem Ansatz. Die Mikrotiterplatte wurde mit Parafilm abgedeckt, die Probenansätze mithilfe eines Rotationsmischers kurz gemischt und anschließend bei 30°C unter ständigem Schütteln im Wasserbad für 2 Stunden inkubiert. Diese Inkubationszeit war anhand von Erfahrungswerten ausreichend zur Erreichung eines Gleichgewichts am  $M_2$ - bzw.  $M_4$ -Rezeptor mit NMS.

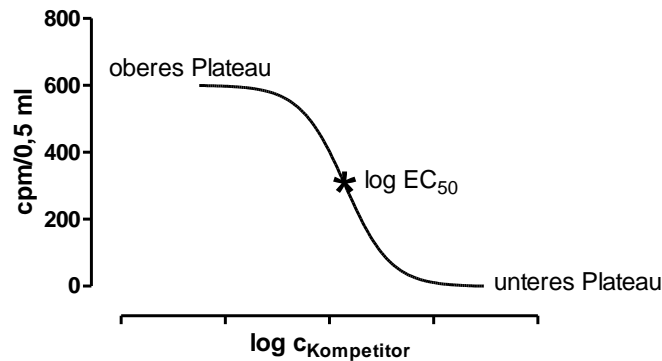
Komponenten (µl)	homologe Kompetition	unspezifische Bindung	Gesamt- bindung	Endkonzentration im Ansatz
NMS (10 <sup>x</sup> M)	50			10 <sup>x-1</sup> M
Atropin 30 µM		50		3 µM
Aqua dest.			50	
[ <sup>3</sup> H]NMS 2 nM	50	50	50	0,2 nM (Soll-Wert)
HEPES-Puffer 12,5 mM	300	300	300	10 mM
Zellmembranhomogenat in HEPES-Puffer	100	100	100	1:5 (Verdünnungsfaktor im Versuch)
Gesamtvolumen (µl)	500	500	500	

**Tab. 2.6 Pipettierschema zur homologen Kompetition mit [<sup>3</sup>H]NMS im Gleichgewicht an Zellmembranhomogenaten.** Die entsprechenden Lösungen des Kompetitors NMS, Atropin und des Radioliganden wurden jeweils mit Aqua dest. (R1) hergestellt.

Durch schnelle Vakuumfiltration am Tomtec®-Harvester (G10) wurde der Versuch beendet. Dabei wurden die Zellmembranfragmente durch eine Glasfaserfiltermatte (V8) zurückgehalten, welche zuvor für 2 min in eiskalter 0,1%iger PEI-Lösung (L18) zur Herabsetzung der unspezifischen Absorption eingelegt worden war. Das automatische Filtrationsprogramm beinhaltete das Absaugen der Versuchsansätze durch den Filter und zweimaliges Spülen jeder Kavität mit ca. 500 µl Aqua dest. (R1, gekühlt auf 2-8°C), wobei das Spülwasser ebenfalls durch den Filter abgesaugt wurde. Nach erfolgter Filtration wurde die Filtermatte für ca. 3 min bei 400 Watt in einer haushaltsüblichen Mikrowelle getrocknet. Anschließend wurde mit Hilfe eines Heizblocks (G8) ein Szintillationswachs (V4) bei ca. 70°C auf die Filtermatte aufgeschmolzen. Nach Erkalten wurde diese in eine transparente Folienhülle (V10) überführt und die enthaltene Radioaktivität mit einem Szintillationsmessgerät (G1) in der Einheit cpm (*counts per minute*) gemessen.

### Versuchsauswertung ( $K_D$ und $B_{max}$ )

Aus den gemessenen Werten der unspezifischen Bindung wurde der Mittelwert berechnet und dieser von jedem Messwert der Gesamtbindung und der Kompetition abgezogen, um die spezifische Bindung zu erhalten. Diese korrigierten Werte wurden anschließend gegen die logarithmierte Konzentration des Kompetitors aufgetragen. Die korrigierte Gesamtbindung, theoretisch betrachtet die spezifische Bindung des Radioliganden bei unendlich großer Verdünnung des Kompetitors, wurde ebenso einbezogen, indem ihr ein um zwei Dekaden kleinerer Wert als die kleinste tatsächlich verwendete Kompetitor-Konzentration zugeordnet wurde. Anschließend wurde eine nicht-lineare Regressionsanalyse mit Hilfe des Computerprogramms GraphPad Prism® durchgeführt, wobei die in der Software vorhandene Vier-Parameter-logistische Gleichung (siehe Gleichung 15) als Modell genutzt wurde. Dabei wurde stets mittels F-Test überprüft, ob ein von  $n_H = -1$  signifikant abweichender Hill-Koeffizient vorlag. Ein Wert von -1 wurde an dieser Stelle erwartet, da es sich bei diesem Gleichgewichtsbindungsversuch um eine 1:1-Interaktion zwischen den strukturidentischen Liganden und dem Rezeptor handelte. Eine abweichende Kurvensteilheit, z. B. eine flacher Kurvenverlauf mit  $0 > n_H > -1$ , hätte auf eine inhomogene Rezeptorpopulation hingedeutet und die Interpretation der Daten wäre anhand des dargestellten theoretischen Hintergrunds nicht sinnvoll gewesen. Die folgende Abbildung zeigt schematisch den Kurvenverlauf eines Kompetitionsexperiments mit  $n_H = -1$ .



**Abb. 2.2 Schematische Darstellung des Kurvenverlaufs eines homologen Konkurrenzexperiments mit [<sup>3</sup>H]NMS.** Ordinate: gemessene Radioaktivität korrigiert abzüglich der unspezifischen Bindung im Versuchsansatz. Abszisse: Logarithmus der eingesetzten Kompetitor-Konzentration. Kurvenanpassung: Vier-Parameter-logistische Gleichung (siehe Gleichung 15) mit einem Hill-Koeffizienten von  $n_H = -1$ . In Abweichung von Gleichung 15 werden hier das obere und untere Plateau der Kurve als *Top* und *Bottom* (statt  $E_{max}$  und Basal) bezeichnet, da es sich um kein funktionelles Experiment handelt.

Die Lage dieser „Bindungskurve“ ist durch den Wendepunkt charakterisiert, welcher vom verwendeten Computerprogramm als  $\log EC_{50}$  und in der entlogarithmierten Form als  $EC_{50}$ -Wert ausgegeben wird. Bei Radioligand-Bindungsexperimenten ist dieser abhängig von der eingesetzten Radioligand-Konzentration, jedoch lässt sich nach Cheng und Prusoff (1973) daraus die Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D$  des beim homologen Konkurrenzversuch verwendeten Radioliganden anhand der folgenden Gleichung berechnen:

$$K_D = EC_{50} - [L^*] \quad \text{Gleichung 6}$$

Weiterhin lässt sich anhand von homologen Konkurrenzversuchen die Rezeptordichte  $B_{max}$  (in mol/l) des verwendeten Zellmembranhomogenats nach DeBlasi et al. (1989) berechnen.

$$B_{max} = \frac{B \cdot EC_{50}}{[L^*]} \quad \text{Gleichung 7}$$

$$\text{mit } B = \frac{(\text{Top} - \text{Bottom}) \cdot 2,9}{2220 \cdot A_{spez} \cdot 0,5\text{ml}} \cdot F \cdot 10^{-9} \quad \text{Gleichung 8}$$

(Top-Bottom)	Spannhöhe der Konkurrenzkurve
2,9	Umrechnungsfaktor von cpm nach dpm
0,5ml	Volumen der Versuchsansätze
F	individueller Verdünnungsfaktor des Zellmembranhomogenats

Der  $K_D$ -Wert von [<sup>3</sup>H]NMS und die Rezeptordichte  $B_{max}$  wurde für jede verwendete Charge der Zellmembranhomogenate durch mindestens drei unabhängige Experimente bestimmt. Diese Kennwerte sind im Anhang (siehe 6.1) zusammengestellt. Dabei wurde die Rezeptordichte auf den Proteingehalt jedes Zellmembranhomogenats (siehe Abschnitt 2.1.1.3) bezogen, um die Chargen besser miteinander vergleichen zu können.



### 2.1.3.4 Homologe Konkurrenzexperimente mit lebenden Zellen zur Bestimmung der Rezeptorexpression

Analog zu Abschnitt 2.1.3.3 lassen sich homologe Konkurrenzexperimente auch an lebenden Zellen durchführen. Diese Versuche wurden durchgeführt, um die Rezeptorexpression der Zell-Linien Flp-In<sup>TM</sup>hM<sub>2</sub>-CHO und Flp-In<sup>TM</sup>hM<sub>4</sub>-CHO miteinander vergleichen zu können, welche bei funktionellen Experimenten zur Messung der G<sub>s</sub>-Proteinaktivierung (siehe Abschnitt 2.1.2.2) eingesetzt wurden.

#### Versuchsdurchführung

Hierzu wurden adhärenente Zellen, die ggf. wie in Abschnitt 2.1.2.2 beschrieben mit PTX vorbehandelt worden waren, enzymatisch von der Kulturschale abgelöst (vgl. Abschnitt 2.1.1.1) und in einem Polypropylenröhrchen (V3) zentrifugiert (G3, Rotor JS 4.3, 900 rpm, 4 min bei 4°C). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in ca. 12 ml HBSS/HEPES-Puffer (L7) aufgenommen und resuspendiert. Mithilfe einer Neubauer-Zählkammer (G14) wurde die Zellzahl pro Milliliter bestimmt und das Volumen mit entsprechender Zellzahl entnommen. Dieses wurde wie zuvor beschrieben zentrifugiert und das Zellpellet in einem entsprechenden Volumen HBSS/HEPES-Puffer (L7) aufgenommen, um die gewünschte Ausgangskonzentration von 500.000 Zellen/ml zu erhalten.

Tab. 2.7 zeigt die Zusammensetzung der Versuchsansätze, wobei eine Dreifachbestimmung durchgeführt wurde. Analog zu Abschnitt 2.1.3.3 wurden Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten (V5) verwendet. Nach Durchmischung der Platte auf dem Rotationsmischer wurden die Zellen bei 37°C im Wasserbad unter ständigem Schütteln für 2 Stunden inkubiert. Die nachfolgenden Schritte (Filtration bis einschließlich Messung) wurden wie in Abschnitt 2.1.3.3 beschrieben durchgeführt.

Komponenten (µl)	homologe Kompetition	unspezifische Bindung	Gesamt- bindung	Endkonzentration im Ansatz
NMS (10 <sup>x</sup> M) in Puffer	50			10 <sup>x-1</sup> M
Atropin 30 µM in Puffer		50		3 µM
[ <sup>3</sup> H]NMS 1,5 nM in Puffer	50	50	50	0,15 nM (Soll-Wert)
HBSS/HEPES-Puffer	300	300	<b>350</b>	
Zellsuspension mit 500.000 Zellen/ml in HBSS/HEPES-Puffer	100	100	100	100.000 Zellen/ml
Gesamtvolumen (µl)	500	500	500	

**Tab. 2.7 Pipettierschema zur homologen Konkurrenz mit [<sup>3</sup>H]NMS im Gleichgewicht an lebenden Zellen in Suspension.** Die entsprechenden Lösungen des Kompetitors NMS, Atropin und des Radioliganden wurden jeweils mit HBSS/HEPES-Puffer (L7) hergestellt.

#### Versuchsauswertung

Die Auswertung der Messwerte anhand der Vier-Parameter-logistischen Gleichung erfolgte analog zu Abschnitt 2.1.3.3. Ebenso wurde der K<sub>D</sub>-Wert des Radioliganden anhand Gleichung 6 berechnet. Die Gesamtanzahl der Bindungsstellen im Versuchsansatz (B<sub>max</sub>) wurde mit Gleichung 7 bestimmt wobei die Anzahl der besetzten Bindungsstellen (B) in folgender Weise errechnet wurde:

$$B = \frac{(\text{Top} - \text{Bottom}) \cdot 2,9}{2220 \cdot A_{\text{spez}} \cdot 0,5\text{ml}} \cdot 10^{-9} \quad \text{Gleichung 9}$$

Anschließend wurde B<sub>max</sub> auf die eingesetzte Zellzahl bezogen, um die molare Konzentration der Bindungsstellen pro Zelle zu erhalten. Durch anschließende Multiplikation mit der Avogadro-

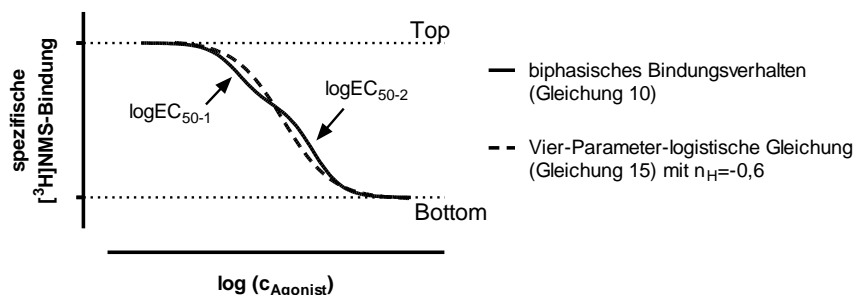
Konstante wurde die Bindungsstellenanzahl pro Zelle errechnet, welche der Rezeptorexpression entspricht.

### 2.1.3.5 Heterologe Konkurrenzexperimente mit [<sup>3</sup>H]NMS und Agonisten

Sind der eingesetzte Radioligand und Kompetitor in Radioligand-Bindungsexperimenten strukturell verschieden, so spricht man von heterologer Konkurrenz. Diese dient dazu, die Affinität einer Testsubstanz zum Rezeptor zu ermitteln. Dabei ist zu berücksichtigen, welche Bindungsstelle am Rezeptor von der Testsubstanz besetzt wird. Im Folgenden wird der Fall betrachtet, dass die gleiche Bindungsstelle, hier also die orthosterische, von Radioligand und Testsubstanz kompetitiv besetzt wird.

Analog zur homologen Konkurrenz, ist bei steigender Testsubstanzkonzentration ein Abfall der [<sup>3</sup>H]NMS-Bindung zu messen. Handelt es sich bei der Testsubstanz um einen Agonisten, so zeigt sich bei der Datenauswertung mittels Vier-Parameter-logistischer Gleichung (Gleichung 15) häufig ein flacher Kurvenverlauf mit einem vom Wert -1 abweichenden Hill-Koeffizient ( $0 > n_H > -1$ ). Dies ist damit zu erklären, dass die Rezeptorpopulation nicht homogen ist, da die Rezeptoren zumindest in zwei Zuständen (Konformationen) vorliegen können: in einem aktiven, G-Protein-gekoppelten Zustand und in einem entkoppelten (inaktiven) Zustand. Da Agonisten unterschiedliche Affinitäten zu diesen Rezeptorkonformationen aufweisen können (vgl. z.B. Hulme et al., 1990) während der eingesetzte Radioligand [<sup>3</sup>H]NMS als Antagonist gleiche Affinität zu beiden aufweist, können Daten aus Bindungsexperimenten an Zellmembranhomogenaten mit einem biphasischen Bindungsmodell nach Gleichung 10 ausgewertet werden. Dieses Modell beschreibt die Bindungsdaten anhand einer Kurve mit zwei Wendepunkten,  $\log EC_{50-1}$  und  $\log EC_{50-2}$ , welche die hochaffine Bindung des Agonisten an die aktive Rezeptorkonformation sowie die niedrigaffine an inaktive Rezeptoren widerspiegeln. Dazu wird die gesamte Rezeptorpopulation entsprechend in eine hochaffine und eine niedrigaffine Rezeptorfraction geteilt ( $F_1$  und  $F_2=1-F_1$ ). In Abb. 2.3 ist schematisch den Kurvenverlauf des biphasischen Modells im Vergleich zu einer flachen, monophasischen [<sup>3</sup>H]NMS-Bindungskurve dargestellt.

$$y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) \left[ \frac{F_1}{1 + 10^{x - \log EC_{50-1}}} + \frac{1 - F_1}{1 + 10^{x - \log EC_{50-2}}} \right] \quad \text{Gleichung 10}$$



**Abb. 2.3 Schematische Darstellung der Auswertung eines heterologen Konkurrenzexperiments mit [<sup>3</sup>H]NMS und einem Agonisten.** Ordinate: spezifische [<sup>3</sup>H]NMS-Bindung. Abszisse: Logarithmus der eingesetzten Agonist-Konzentration. Kurvenanpassung: biphasisches Modell nach Gleichung 10 mit einer hochaffinen Fraktion von 40% bzw. Vier-Parameter-logistische Gleichung (siehe Gleichung 15) mit einem Hill-Koeffizienten von  $n_H = -0,6$ . Die Pfeile deuten auf die beiden Wendepunkte der biphasischen Konkurrenzskurve.

## Versuchsdurchführung

Die Durchführung heterologer Konkurrenzexperimente entsprach den in Abschnitt 2.1.3.3 beschriebenen Schritten. Tab. 2.8 gibt das Pipettierschema dieser Versuche wieder. Die Bestimmung der Gesamtbindung erfolgte auf jeder Mikrotiterplatte (V5) in sechsfacher Ausführung, für alle anderen Werte wurde eine Dreifachbestimmung vorgenommen.

Komponenten (µl)	heterologe Konpetition	unspezifische Bindung	Gesamt- bindung	Endkonzentration im Ansatz
Agonist (10 <sup>x</sup> M)	50			10 <sup>x-1</sup> M
Atropin 30 µM		50		3 µM
Aqua dest.			50	
[ <sup>3</sup> H]NMS 2 nM	50	50	50	0,2 nM (Soll-Wert)
HEPES-Puffer 12,5 mM	300	300	300	10 mM
Zellmembranhomogenat in HEPES-Puffer	100	100	100	1:5 (Verdünnungsfaktor im Versuch)
Gesamtvolumen (µl)	500	500	500	

**Tab. 2.8 Pipettierschema zur heterologen Konkurrenz mit [<sup>3</sup>H]NMS im Gleichgewicht an Zellmembranhomogenaten.** Die entsprechenden Lösungen des Agonisten, Atropin und des Radioliganden wurden jeweils mit Aqua dest. (R1) hergestellt.

## Versuchsauswertung

Von jedem gemessenen Wert wurde zur Bestimmung der spezifische [<sup>3</sup>H]NMS-Bindung die gemittelte unspezifische Bindung abgezogen. Diese wurde gegen den Logarithmus der Agonistkonzentration aufgetragen. Mithilfe des Computerprogramms GraphPad Prism® wurde berechnet, ob die Daten besser durch das monophasische oder das biphasische Modell (Gleichung 15 bzw. Gleichung 10) beschrieben werden konnten. Dazu wurde ein F-Test durchgeführt, welcher auf Grundlage der Summe der kleinsten Abstandsquadrate der jeweiligen Regressionsanalyse über die Annahme der Nullhypothese (H<sub>0</sub>: monophasisches Modell nach Gleichung 15 mit n<sub>H</sub>=-1) oder der Alternativhypothese (H<sub>1</sub>: biphasisches Modell nach Gleichung 10) entschied (*extra sum-of-squares F test*). Bei einem p-Wert über 0,05 (p>0,05) wurde zu Gunsten des einfacheren, monophasischen Modells entschieden. Diese Methode zum Vergleich der zwei Modelle konnte gewählt werden, da beide miteinander verschachtelt sind, d.h. das monophasische Modell ist ein spezieller Fall des biphasischen Modells.

Durch Anwendung der Cheng-Prusoff-Korrektur (Cheng & Prusoff, 1973) konnten aus den Wendepunkten des biphasischen Modells die Gleichgewichtsdissoziationskonstanten des Testagonisten für die hoch- bzw. niedrigaffine Rezeptorpopulation (K<sub>i</sub>(hoch) bzw. K<sub>i</sub>(niedrig)) berechnet werden:

$$K_i(\text{hoch bzw. niedrig}) = \frac{EC_{50-1} \text{ bzw. } 2}{1 + \frac{[L]}{K_D}} \quad \text{Gleichung 11}$$

Bei Zutreffen des monophasischen Modells wurde die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K<sub>i</sub> analog mit dem ermittelten EC<sub>50</sub>-Wert berechnet. Die Affinitätswerte werden in vorliegender Arbeit bevorzugt als negativer, dekadischer Logarithmus (pK<sub>i</sub>) angegeben.

### 2.1.3.6 Bestimmung der Dissoziationshalbwertszeit des Radioliganden

Durch Bindungsexperimente im Ungleichgewicht ist es möglich, die Geschwindigkeit der Dissoziationsreaktion eines Radioliganden von einem Rezeptor zu bestimmen. Kenntnis über die Halbwertszeit des Rezeptor- $^3\text{H}$ NMS-Komplexes war nötig zur richtigen Durchführung der sogenannten Zwei-Punkt-kinetischen Experimente, welche im Anschluss in Abschnitt 2.1.3.7 beschrieben werden.

#### Versuchsdurchführung

Die Bestimmung der Halbwertszeit von  $^3\text{H}$ NMS erfolgte an Zellmembranhomogenaten aus Flp-In<sup>TM</sup>hM<sub>2</sub>-CHO- und Flp-In<sup>TM</sup>hM<sub>4</sub>-CHO-Zellen.

In einer Mikrotiterplatte (V5) wurde gemäß Tab. 2.9 Wasser (R1), Radioligand und Puffer (L9) vorgelegt. Das Zellmembranhomogenat wurde mit HEPES-Puffer (L9) auf einen Proteingehalt von 100 µg/ml eingestellt. Durch Zugabe des Zellmembranhomogenats in die Mikrotiterplatte wurde eine 60-minütige Vorinkubation bei 30°C im Schüttelwasserbad begonnen. Diese Vorinkubationszeit hatte sich bewährt, um eine ausreichend hohe Ausgangsmenge von Rezeptor- $^3\text{H}$ NMS-Komplexen zu erreichen. Es erfolgte anschließend eine Zugabe von Atropin im Überschuss. Damit wurde nach Dissoziation eines  $^3\text{H}$ NMS-Moleküls vom Rezeptor die Reassoziations mit dem Radioliganden gehemmt, denn die Wahrscheinlichkeit der Bindung eines Atropinmoleküls an die orthosterischen Bindungsstelle des muskarinischen Rezeptors überwog um ein Vielfaches.

In Dissoziationsexperimenten sinkt somit die rezeptorgebundene Radioaktivität im zeitlichen Verlauf exponentiell ab. Dies wurde gemessen, indem die Reaktion zu verschiedenen Zeitpunkten durch schnelle, automatische Filtration am Tomtec<sup>®</sup>-Harvester (G10) unterbrochen wurde. Dazu wurden die verwendeten Glasfaserfilter (V8) wie in Abschnitt 2.1.3.3 beschrieben vor- und nachbehandelt und die gebundene Radioaktivität mit einem Szintillationsmessgerät (G1) vermessen.

Komponenten (µl)	Dissoziation (t=x)	unspezifische Bindung	Gesamtbindung (t=0)	Endkonzentration im Ansatz
Aqua dest.	50	50	50	
$^3\text{H}$ NMS 20 nM	50	50	50	2 nM
HEPES-Puffer 12,5 mM	200	200	300	10 mM
Zellmembranhomogenat in Puffer (L9)	100	100	100	20-40 µg/ml
Atropin 100 µM in HEPES-Puffer	100	100 (vorher)		20 µM
Gesamtvolumen (µl)	500	500	500	

**Tab. 2.9 Pipettierschema zum Dissoziationsexperiment mit  $^3\text{H}$ NMS an Zellmembranhomogenaten.** Die Lösung des Radioliganden erfolgte in Aqua dest. (R1), während die Atropin-Lösung mit HEPES-Puffer (L9) hergestellt wurde. Zur Messung der unspezifischen Bindung wurde Atropin von Beginn an vorgelegt. Es erfolgte eine Dreifachbestimmung der unspezifischen Bindung und zu jedem gewählten Zeitpunkt. Die Gesamtbindung wurde in 6facher Ausführung bestimmt.

#### Versuchsauswertung

Von der Gesamtbindung und jedem Messwert wurde die gemittelte unspezifische Bindung abgezogen. Die so erhaltenen Werte der spezifischen Bindung wurden gegen die Dissoziationszeit (t) aufgetragen und mithilfe des Computerprogramms GraphPad Prism<sup>®</sup> anhand folgender Gleichung für einen monophasischen, exponentiellen Zerfall ausgewertet:

$$y = [\text{RL}]_0 \cdot e^{-k_{\text{Diss}} \cdot t} + \text{Plateau}$$

Gleichung 12

$[\text{RL}]_0$	Radioligandbindung zum Dissoziationszeitpunkt $t=0$ (d.h. ohne Atropin)
$k_{\text{Diss}}$	Dissoziationskonstante des Radioliganden
Plateau	Asymptote für $x \rightarrow \infty$

Es wurde weiterhin mittels F-Test überprüft, ob das Plateau der Kurve sich signifikant vom Wert Null unterscheidet. Dieser Grenzwert wurde erwartet, da durch den hohen Überschuss von Atropin nach unendlich langer Dissoziationszeit theoretisch keine  $^3\text{H}$ NMS-Bindung an die Rezeptoren vorliegen sollte.

Die durch das Computerprogramm berechnete Dissoziationskonstante des Radioliganden lässt sich wie folgt in die Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) umrechnen und wird in vorliegender Arbeit in Minuten angegeben.

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{\text{Diss}}}$$

Gleichung 13

### 2.1.3.7 Zwei-Punkt-kinetische Experimente

Diese Versuche dienen zur Untersuchung einer möglichen allosterischen Bindung der Testsubstanzen, wenn die orthosterische Bindungsstelle der muskarinischen Rezeptoren durch einen anderen Liganden besetzt ist. Das Versuchsprinzip basiert auf der Messung der Dissoziation eines orthosterisch bindenden Radioliganden von dieser Bindungstasche, wenn eine Substanz das darüber liegende allosterische Haftareal besetzt. Liegt eine allosterische Bindung der Testsubstanz vor, so verzögert sich die Dissoziation des Radioliganden konzentrationsabhängig. Dabei wird die Reassoziations des Radioliganden mit dem Rezeptor durch einen Überschuss eines ebenfalls orthosterisch bindenden Liganden blockiert (siehe Abschnitt 2.1.3.6).

Zur Bestimmung der Dissoziationsverzögerung durch eine gegebene Testsubstanz-Konzentration sind unter Voraussetzung eines monophasischen, exponentiellen Verlaufs nach Gleichung 12 nur zwei Messzeitpunkte nötig, nämlich die Höhe der Ausgangsbindung des Radioliganden zum Zeitpunkt  $t=0$  und die verbleibende Radioligandbindung nach Ablauf von ca. 1,5 Halbwertszeiten (vgl. Kostenis & Mohr, 1996). Durch Auftragung der gemessenen  $k_{\text{Diss}}$ -Werte gegen die eingesetzte Testsubstanz-Konzentration kann die Affinität dieser Testsubstanz zur allosterischen Bindungsstelle berechnet werden.

### Versuchsdurchführung

In einer 96er-Mikrotiterplatte (V5) wurden die Komponenten Wasser, Atropin sowie Testsubstanz (Alloster) in verschiedenen Konzentrationen gemäß Pipettierschema (Tab. 2.11) vorgelegt. Für die Gesamtbindung und unspezifische Bindung wurden ebenfalls Radioligand und Puffer in die Platte pipettiert.

Die Versuche wurden an Zellmembranhomogenaten aus Flp-In<sup>TM</sup>hM<sub>2</sub>-CHO- und Flp-In<sup>TM</sup>hM<sub>4</sub>-CHO-Zellen durchgeführt. Dazu wurden diese mit HEPES-Puffer (L9) jeweils so verdünnt, dass ein ausreichend großes Messfenster zu erwarten war. Die Proteinendkonzentration im Versuchsansatz betrug dafür 20-40 µg/ml. In einem Polypropylenröhrchen (V3) wurde die für die Anzahl der Messpunkte „Kontrolle“ und „Alloster“ nötige Menge an Radioligand und Puffer für den sogenannten Master-Mix vereint.

Das Zeitprotokoll des Versuchs (Tab. 2.10) startete mit Zugabe der entsprechenden Menge Zellmembranhomogenatverdünnung zum Master-Mix. Dieser wurde bei 30°C für 60 Minuten im Schüttelwasserbad vorinkubiert. Die Zugabe des Zellmembranhomogenats in die Mikrotiterplatte zum Start der Reaktion für die Gesamt- und unspezifische Bindung erfolgte nach Ablauf von 1,5 Halbwertszeiten des Radioliganden (Bestimmung wie in Abschnitt 2.1.3.6). Somit wurde eine 60-minütige Vorinkubation für alle Versuchsansätze zum Zeitpunkt der Filtration erreicht. Je 400 µl des Master-Mix wurden nach Ablauf der Vorinkubationszeit in die Kavitäten „Kontrolle“ und „Alloster“ hinzugegeben und bei 30°C im Schüttelbad bis zur Filtration inkubiert. Die Filtration und Messung erfolgte wie bereits im Abschnitt 2.1.3.3 beschrieben.

Zeit (min)	Dissoziationszeit (min)	Versuchsdurchführung
0		Zugabe des Zellmembranhomogenats zum Master-Mix
1,5 $t_{1/2}$	t=0	Zugabe Zellmembranhomogenat in die Mikrotiterplatte in die Kavitäten für Gesamtbindung und unspezifische Bindung
60	t=1,5 $t_{1/2}$	Zugabe des Master-Mix (je 400 µl) in die Mikrotiterplatte in die Kavitäten für Kontrolle und Alloster
60 + 1,5 $t_{1/2}$		Filtration am Tomtec®-Harvester (G10)

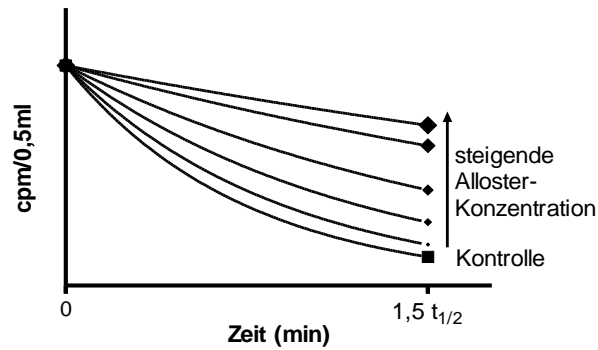
**Tab. 2.10 Allgemeines Zeitprotokoll zur Durchführung eines Zwei-Punkt-kinetischen Experiments.**  $t_{1/2}$ : Halbwertszeit des Radioliganden.

Komponenten (µl)	Gesamtbindung (t=0)	unspezifische Bindung	Kontrolle (t=1,5 $t_{1/2}$ )	Alloster (t=1,5 $t_{1/2}$ )	Endkonz.
Aqua dest.	50	50	50		
Testsubstanz (in R1)				50	10 <sup>-1</sup> M
Atropin 30 µM (in L9)		50	50	50	3 µM
[ <sup>3</sup> H]NMS 20 nM (in R1)	50	50	50	50	2 nM
HEPES-Puffer 12,5 mM	350	300	300	300	10 mM
Zellmembranhomogenat in Puffer (L9)	50	50	50	50	20-40 µg/ml
Gesamtvolumen (µl)	500	500	500	500	

**Tab. 2.11 Pipettierschema zum Zwei-Punkt-kinetischen Experiment.** Die Lösungen der Testsubstanz (Alloster) und des Radioliganden wurden mit Aqua dest (R1) hergestellt, die übrigen Komponenten wurden in HEPES-Puffer 12,5 mM (L9) gelöst bzw. suspendiert. Aus Radioligand, Zellmembranhomogenat und HEPES-Puffer wurde ein „Master-Mix“ für die Messung der [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation ohne Alloster (Kontrolle) und mit Testsubstanz (=Alloster) hergestellt (graue Markierung) und in einem Polypropylenröhrchen (V3) vorinkubiert. Die Bestimmung der Gesamtbindung erfolgte sechsfach, für alle anderen Messwerte wurde eine Dreifachbestimmung vorgenommen.

## Versuchsauswertung

Die gemittelte unspezifische Bindung wurde von jedem Messwert abgezogen. Die Höhe der spezifischen Bindung zum Zeitpunkt t=0 und nach Ablauf von 1,5 Halbwertszeiten wurde gegen die Zeit aufgetragen und mithilfe des Computerprogramms GraphPad Prism® durch Anwendung von Gleichung 12 für einen monophasischen, exponentiellen Zerfall ausgewertet. Dabei wurde für das Endplateau jeder Kurve ein Wert von Null festgelegt. Somit wurde für die eingesetzten Konzentrationen der Testsubstanz eine Kurvenschar erhalten (siehe Abb. 2.4).



**Abb. 2.4 Schematische Darstellung einer Kurvenschar aus den Rohdaten eines Zwei-Punkt-kinetischen Experiments.**  
*Ordinate:* spezifische Bindung des Radioliganden *in counts per minute* pro Versuchsansatz. *Abszisse:* Dissoziationszeit in Minuten. *Kurvenanpassung:* monophasischer, exponentieller Zerfall nach Gleichung 12 mit einem auf den Wert Null fixiertem Plateau.

Die einzelnen Dissoziationskonstanten ( $k_{\text{Diss}}$ ) wurden anschließend gegen die entsprechende logarithmierte Testsubstanz-Konzentration aufgetragen und mit der Vier-Parameter-logistischen Gleichung (Gleichung 15) ausgewertet. Dabei wurde das obere Kurvenplateau auf den  $k_{\text{Diss}}$ -Wert der Kontrolle (Dissoziation ohne Alloster) und das untere Plateau auf den Wert Null (theoretischer  $k_{\text{Diss}}$ -Wert bei vollständiger Dissoziationshemmung durch das Alloster) normiert. Die somit erhaltene sigmoide Kurve spiegelte zum einen das Ausmaß der Dissoziationsverzögerung durch die Testsubstanz wieder. Durch den Wendepunkt der Kurve, hier zur Unterscheidung von anderen Kennwerten  $EC_{50\text{Diss}}$  genannt, wurde zum anderen die Affinität der Testsubstanz zur allosterischen Bindungsstelle im [ $^3\text{H}$ ]NMS-besetzten Rezeptor wiedergegeben.

## 2.1.4 *Ex-vivo* Untersuchungen (Superfusion)

### 2.1.4.1 Versuchstiere

Männliche Mäuse der Zuchtlinie C57BL/6N (Wildtyp) wurden von Dr. A. Kilić (AG Pfeifer, Institut für Pharmakologie und Toxikologie/Universität Bonn) zur Verfügung gestellt. Acht Wochen alte, männliche Mäuse der Zuchtlinien NMRI und CD1 wurden über Charles River Laboratories (Sulzfeld/Deutschland) bezogen und bis zur Verwendung im Haus für Experimentelle Therapie (HET) des Universitätsklinikums Bonn gehalten.

Zum Zeitpunkt der Versuche betrug das Alter der Tiere 8-14 Wochen. Die Organentnahme erfolgte nach Dekapitation am jeweiligen Versuchstag.

### 2.1.4.2 *Superfusionsmethode zur Erfassung der Acetylcholin-Freisetzung bei Stimulation von inhibitorischen Autorezeptoren*

Durch das Superfusionsexperiment kann die Freisetzung von Neurotransmittern aus Gewebeproben untersucht werden. Dazu wird das Gewebe zunächst mit dem radioaktiv-markierten Neurotransmitter (bzw. mit einer Vorstufe) inkubiert, welcher durch selektive Transporter gezielt in entsprechende Neuronen aufgenommen und dort wie der endogen produzierte Transmitter gespeichert werden kann. Durch elektrische Impulse kann die Aktionspotential-gesteuerte, quasi-physiologische Neurotransmitter-Freisetzung in der Gewebeprobe stimuliert werden. Dazu wird diese in einer Superfusionskammer zwischen zwei Platinelektroden positioniert. Die Kammer wird dabei von unten nach oben mit einer Pufferlösung durchströmt, wodurch der freigesetzte Neurotransmitter ausgeschwemmt wird. Die Superfusionslösung wird in Fraktionen gesammelt und die darin enthaltene Radioaktivität als Maß für die Neurotransmitter-Freisetzung gemessen. Indem pharmakologisch aktive Substanzen der Superfusionslösung hinzugefügt werden, kann deren Einfluss auf die Neurotransmitter-Freisetzung untersucht werden. Der Effekt einer Testsubstanz wird dabei als  $S_2/S_1$ -Wert berechnet. Dieser gibt das Ausmaß der stimulierten Neurotransmitter-Freisetzung in Anwesenheit des Agonisten ( $S_2$ ) als Anteil der Freisetzung unter Kontrollbedingungen ( $S_1$ , ohne Agonist) an.

In vorliegender Arbeit sollte die Inhibition der Acetylcholin-Freisetzung durch präsynaptische  $M_2$ - bzw.  $M_4$ -Autorezeptoren mit Iperoxo untersucht werden. Als  $M_2$ -Rezeptormodell diente dabei der Maus-Hippocampus, da in diesem Gewebe die inhibitorischen Autorezeptoren cholinergischer Neurone nahezu ausschließlich Rezeptoren vom  $M_2$ -Subtyp sind (Zhang et al., 2002). Im Striatum hingegen wird die Autoregulation weitestgehend über den  $M_4$ -Subtyp vermittelt (Zhang et al., 2002).

Die Gewebeproben wurden mit [ $^3$ H]Cholin inkubiert, das aus dem synaptischen Spalt über hochaffine Transporter in cholinerge Nervenzellen aufgenommen und intrazellulär mit endogenem Acetyl-Coenzym A zu [ $^3$ H]Acetylcholin umgesetzt wird. Zum Zweck der vollständigen Erfassung des freigesetzten Tritiums (Summe aus [ $^3$ H]Acetylcholin und durch Acetylcholinesterase-Spaltung entstandenes [ $^3$ H]Cholin), wurde die [ $^3$ H]Cholin-Wiederaufnahme während des Superfusionsversuchs durch Hemicholinium gehemmt.

### **Gewebepräparation**

Aus dem Mausgehirn wurden Hippocampus und Striatum isoliert und manuell Gewebeschnitte von ca. 0,3 mm Dicke präpariert (als Hilfsmittel diente dazu eine schmale Plexiglasscheibe mit 0,3 mm



tiefer Fräsung und in einer Halterung eingespannter Klingenbandstahl). Mit einer Stanze wurden daraus runde Gewebestücke von 2 mm Durchmesser gewonnen, die in 2-8 °C kalter Krebs-Henseleit-Lösung (KH) mit 1,3 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (L13a) bis zum Einsatz am gleichen Tag zwischengelagert wurden.

### **Versuchsdurchführung**

Je fünf bis sechs Gewebepreparate wurden in 1 ml KH-Lösung (L13a) mit 0,1  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]Cholin bei 37°C im Schüttelwasserbad unter Begasung mit Carbogen (R3) inkubiert. Danach wurden die Gewebestücke einzeln in den Kammern der Superfusionsanlage (G18) auf Polypropylnetzen platziert, sodass sie sich zwischen zwei Platinelektroden befanden.

Es erfolgte zunächst eine 35-minütige Spülphase, um einen stabilen basalen [ $^3\text{H}$ ]-Efflux zu erreichen. Als Superfusionsmedium wurde eine KH-Lösung mit 3,25 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (L13b) verwendet, die Hemicholinium in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  enthielt (1 ml der Stammlösung (L8) auf 1 l KH-Lösung). Die Superfusion erfolgte mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 1 ml /min bei 37°C unter ständiger Zufuhr von Carbogen (R3).

Ab Minute 35 wurde das Superfusat in 5-Minuten-Fractionen in Szintillationsvials (V7) gesammelt (G9). Die erste Stimulation ( $S_1$ ) durch Rechteckimpulse fand in Minute 40 für zwei Minuten mit einer Frequenz von 3 Hz, einer Amplitude von 200 mA und einer Impulsdauer von 2 ms statt (G17). Nach 60 Minuten erfolgte ggf. der Wechsel zu Superfusionsmedien mit unterschiedlicher Testsubstanz-Konzentration. Bei einigen Versuchen war neben der Testsubstanz auch der inverse Agonist Atropin in einer Konzentration von 30 nmol/l im Superfusionsmedium enthalten. Die zweite, 2-minütige Stimulation ( $S_2$ ) mit den oben genannten Parametern wurde nach 90 Minuten ausgelöst. Bei jedem Versuch erfolgte die  $S_2$ -Stimulation auch unter Kontrollbedingungen (ohne Testsubstanz) in Doppelbestimmung. Die Superfusion wurde nach insgesamt 110 Minuten beendet. In Tab. 2.12 ist der zeitliche Ablauf des Versuchs zusammengefasst und die Bedeutung der einzelnen Fractionen für die Datenauswertung kurz erläutert.

Die Gewebepreparate wurden in Szintillationsvials (V7) überführt und mit je 0,5 ml Soluene (R42) über Nacht aufgelöst. Nach vollständiger Auflösung wurden 7 ml eines selbst hergestellten Szintillationscocktails (L20) mit niedriger Wasseraufnahmekapazität hinzugefügt.

Von den gesammelten 5-Minuten-Fractionen wurden jeweils 1,8 ml verworfen bevor sie mit 3,55 ml Szintillationscocktail (R28) mit hoher Wasseraufnahmekapazität versetzt und kräftig geschüttelt wurden. Die Fractionen der Zeitabschnitte 60-70 und 75-85 Minuten wurden jedoch gänzlich verworfen, da sie für die Versuchsauswertung nicht relevant waren.

Die Messung der in den Gewebeschnitten und Fractionen enthaltenen Radioaktivität erfolgte in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (G6 oder G7).

Superfusionszeit (min)	Fraktion Nr.	Erläuterung
0-35	-	Spülphase zur Erreichung eines stabilen basalen [ <sup>3</sup> H]-Efflux
35-40	1	Berechnung des durchschnittlichen basalen [ <sup>3</sup> H]-Efflux während 40'-55' (zusammen mit Fraktion Nr. 5)
40-45	2	40'-42': S <sub>1</sub> unter Kontrollbedingungen ohne Testsubstanz, Berechnung der totalen, stimulierten [ <sup>3</sup> H]-Freisetzung durch S <sub>1</sub> aus der Summe der Fraktionen Nr. 2-4 (40'-55') abzüglich des durchschnittlichen basalen [ <sup>3</sup> H]-Efflux
45-50	3	
50-55	4	
55-60	5	Grundlage zur Berechnung des basalen [ <sup>3</sup> H]-Efflux B <sub>1</sub> und des durchschnittlichen basalen [ <sup>3</sup> H]-Efflux während 40'-55' (zusammen mit Fraktion Nr. 1)
60-70	-	ab hier Superfusion mit Testsubstanz, Superfusat wird verworfen
70-75	6	Durchschnittswert für basalen [ <sup>3</sup> H]-Efflux während Einschwemmphase der Testsubstanz
75-85	-	Superfusat wird verworfen
85-90	7	Grundlage zur Berechnung des basalen [ <sup>3</sup> H]-Efflux B <sub>2</sub> und des durchschnittlichen basalen [ <sup>3</sup> H]-Efflux während 90'-105' (zusammen mit Fraktion Nr. 11)
90-95	8	90'-92': S <sub>2</sub> in Anwesenheit der Testsubstanz, Berechnung der totalen, stimulierten [ <sup>3</sup> H]-Freisetzung durch S <sub>2</sub> aus der Summe der Fraktionen Nr. 8-10 (90'-105') abzüglich des durchschnittlichen basalen [ <sup>3</sup> H]-Efflux
95-100	9	
100-105	10	
105-110	11	Berechnung des durchschnittlichen basalen [ <sup>3</sup> H]-Efflux während 90'-105' (zusammen mit Fraktion Nr. 7)

**Tab. 2.12 Zeitprotokoll eines Superfusionsversuchs.** Die Sammlung des Superfusionsmediums erfolgte ab Minute 35 in 5-Minuten-Fractionen bei einer Durchflussrate von 1 ml/min. Ab Minute 60 erfolgte die Superfusion mit Testsubstanzhaltigen Medium (außer bei den Kontrollen). Die Stimulationen S<sub>1</sub> und S<sub>2</sub> erfolgten durch Rechteckimpulse mit den Parametern 3 Hz, 200 mA und 2 ms. Von jeder Fraktion wurden vor der Vermessung der enthaltenen Radioaktivität 1,8 ml verworfen.

### Datenauswertung

Die Messwerte wurden in eine vorgefertigte Microsoft® Excel-Datei (Programmierung der Tabellenkalkulation durch AG Prof. Schlicker) eingetragen und die Kennwerte der [<sup>3</sup>H]-Abgabe, wie in Tab. 2.13 angegeben, bestimmt. Die durch S<sub>1</sub> bzw. S<sub>2</sub> stimulierte [<sup>3</sup>H]-Freisetzung wurde berechnet als Differenz zwischen totaler und basaler [<sup>3</sup>H]-Freisetzung während der jeweiligen elektrischen Reizung und der nachfolgenden 13 Minuten. Dabei wurde für den basalen [<sup>3</sup>H]-Efflux ein linearer Abfall zwischen der Fraktion unmittelbar vor und 15-20 Minuten nach der Stimulation angenommen. Die stimulierte [<sup>3</sup>H]-Freisetzung wurde jeweils auf den [<sup>3</sup>H]-Gesamtgehalt der Probe zu Beginn der jeweiligen Stimulation bezogen. Aus diesen prozentualen Werten wurde anschließend der S<sub>2</sub>/S<sub>1</sub>-Wert gebildet. Die S<sub>2</sub>/S<sub>1</sub>-Werte wurden auf den Mittelwert der Kontrolle als 100 % und den Wert Null als 0 % (theoretischer Grenzwert bei voller Hemmung der S<sub>2</sub>-stimulierten [<sup>3</sup>H]-Freisetzung) normiert und gegen den Logarithmus der eingesetzten Testsubstanz-Konzentration aufgetragen. Anschließend erfolgte eine nicht-lineare Regression mittels Vier-Parameter-logistischer Gleichung (Gleichung 15), wobei eine Abweichung vom Hill-Koeffizienten n<sub>H</sub>=-1 mittels F-Test überprüft wurde.

Des Weiteren diente die Berechnung des Quotienten des basalen Efflux (B<sub>2</sub>/B<sub>1</sub>) zur Kontrolle des Versuchsverlaufs und der Erkennung von aufgetretenen Störfaktoren, wie z.B. mangelnde Vitalität der Gewebeprobe oder toxische Einflüsse eingesetzter (Test-)Substanzen.

Kennwert	Berechnung
[ <sup>3</sup> H]-Gesamtgehalt (dpm)	$F_1+F_2+\dots+F_5+5\cdot F_6+F_7+\dots+F_{11}+0,64\cdot GP$
[ <sup>3</sup> H]-Gesamtgehalt (fmol)	$[^3\text{H}]\text{-Gesamtgehalt (dpm)}/(2,22\cdot A_{\text{spez}})$
basaler Efflux B <sub>1</sub> (%/min)	$F_5\cdot 100/((F_5+\dots+F_{11}+0,64\cdot GP)\cdot 5)$
basaler Efflux B <sub>2</sub> (%/min)	$F_7\cdot 100/((F_7+\dots+F_{11}+0,64\cdot GP)\cdot 5)$
S <sub>1</sub> -stimulierte [ <sup>3</sup> H]-Freisetzung (S <sub>1</sub> in %)	$((F_2+F_3+F_4)-(((F_1+F_5)/2)\cdot 3))\cdot 100/(F_2+\dots+F_{11}+0,64\cdot GP)$
S <sub>2</sub> -stimulierte [ <sup>3</sup> H]-Freisetzung (S <sub>2</sub> in %)	$((F_8+F_9+F_{10})-(((F_7+F_{11})/2)\cdot 3))\cdot 100/(F_8+\dots+F_{11}+0,64\cdot GP)$

**Tab. 2.13 Berechnung der Kennwerte eines Superfusionsversuchs.**  $F_1$  bis  $F_{11}$ : gemessene Radioaktivität der Fraktionen Nr. 1 bis 11 in dpm.  $GP$ : gemessene Radioaktivität des Gewebepreparates nach Versuchsende in dpm korrigiert um den Faktor 0,64. Dieser entspricht der Restmenge jeder Fraktion nach Verwerfen von 1,8 ml von insgesamt 5 ml.  $A_{\text{spez}}$ : spezifische Aktivität der verwendeten [<sup>3</sup>H]Cholin-Charge. Faktor 2,22: Umrechnung von dpm nach fmol (vgl. Gleichung 5).

### 2.1.4.3 Einsatz von N-Ethylmaleimid zur Hemmung der G<sub>i</sub>-Kopplung

Der Einsatz von N-Ethylmaleimid (NEM) erfolgte zur teilweisen Unterbindung der Rezeptor-vermittelten G<sub>i</sub>-Aktivierung (vgl. Abschnitt 2.1.2.4).

#### Versuchsdurchführung

Die Alkylierung erfolgte im Anschluss an die Inkubation des Gewebes mit [<sup>3</sup>H]Cholin (siehe Abschnitt 2.1.4.2). Dadurch wurde einer möglichen Beeinträchtigung der selektiven Cholin-Aufnahme durch NEM vorgebeugt. Die Gewebepreparate (je 5-6 Stück) wurden in 1 ml einer 32 μM NEM-Lösung (3,2 μl der Stammlösung L17 mit 997 μl KH-Lösung L13a) bei 37°C für 45 min im Schüttelwasserbad unter ständiger Carbogen-Zufuhr (R3) inkubiert. Parallel wurden ebenso Kontroll-Gewebepreparate in KH-Lösung (L13a) ohne Alkylans mitgeführt.

Die Superfusion mit NEM-behandeltem und unbehandeltem Gewebe wurde wie in Abschnitt 2.1.4.2 beschrieben durchgeführt.

#### Datenauswertung

Die Berechnung der Kenngrößen und Normierung der S<sub>2</sub>/S<sub>1</sub>-Werte erfolgte wie im vorangehenden Abschnitt 2.1.4.2 erläutert.

Die normierten S<sub>2</sub>/S<sub>1</sub>-Werte wurden gegen die logarithmierte Testsubstanz-Konzentration aufgetragen. Mittels F-Test wurde überprüft, ob eine nicht-lineare Regressionsanalyse nach Vier-Parameter-logistischer Gleichung (Gleichung 15 mit festem n<sub>H</sub>=-1) oder ein glockenförmiger Kurvenverlauf nach Gleichung 16 (mit fest vorgegebenen n<sub>H-1</sub>=-1 und n<sub>H-2</sub>=1) geeigneter war.

## 2.1.5 Nichtlineare Regressionsanalyse funktioneller Experimente und Modelle zur Bias-Berechnung

### 2.1.5.1 Vier-Parameter-logistische Gleichung bei einfachen Konzentrations-Effekt-Beziehungen

Die Vier-Parameter-logistische Gleichung dient zur Analyse der Konzentrations-Effekt-Abhängigkeit von Daten aus funktionellen Experimenten. Des Weiteren wird sie auch zur Auswertung von Radioligand-Bindungsexperimenten angewendet, wo sie den Zusammenhang zwischen der Bindung des Radioliganden und der eingesetzten Kompetitor-Konzentration widerspiegelt (vgl. Abschnitt 2.1.3.3).

Analog zur Michaelis-Menten-Gleichung für die Beschreibung einer sättigbaren Enzymkinetik, gilt für eine Dosis-Wirkungsbeziehung der folgende Zusammenhang:

$$\text{Effekt} = \frac{E_{\max}[A]}{EC_{50} + [A]} \quad \text{Gleichung 14}$$

$E_{\max}$	maximaler Effekt des Agonisten
$[A]$	Konzentration des Agonisten
$EC_{50}$	Konzentration des Agonisten, die einen halbmaximalen Effekt auslöst

Wie bei einer Enzymkinetik resultiert bei Auftragung des Effektes gegen die Agonistkonzentration eine Hyperbel. Wird hingegen der Logarithmus der Konzentration aufgetragen, so erhält man eine sigmoide Kurve (vgl. Abb. 2.5, gestrichelte Kurve), die mit der Vier-Parameter-logistischen Gleichung beschrieben werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurden Daten aus funktionellen Experimenten einer nichtlinearen Regressionsanalyse mithilfe des Computerprogramms GraphPad Prism® unterzogen, welches die Variablen der Vier-Parameter-logistischen Gleichung folgendermaßen definiert:

$$y = \text{Basal} + \frac{E_{\max} - \text{Basal}}{1 + 10^{(\log EC_{50} - x)n_H}} \quad \text{Gleichung 15}$$

Basal	unteres Plateau der Kurve
$E_{\max}$	oberes Plateau der Kurve
$\log EC_{50}$	x-Wert, bei dem die Systemantwort y sich auf halber Höhe zwischen dem oberen und unteren Kurvenplateau befindet, Wendepunkt der Kurve
$n_H$	Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit
x	logarithmierte Konzentration der Testsubstanz (Agonist)

Die Konzentration des Agonisten, die einen halbmaximalen Effekt auslöst ( $EC_{50}$ ), lässt sich demnach leicht aus dem Wendepunkt der sigmoiden Dosis-Wirkungsbeziehung berechnen. Sie wird jedoch bevorzugt als negativer, dekadischer Logarithmus  $pEC_{50}$  angegeben.

Der Hill-Koeffizient, welcher die Kurvensteilheit beschreibt, hat in der standardisierten bzw. einfachsten Form den Wert  $n_H=1$  (bzw. -1). Ein davon stark abweichender Hill-Koeffizient ist hingegen schwieriger zu interpretieren und kann z. B. ein Hinweis darauf sein, dass keine 1:1-Interaktion zwischen der Testsubstanz und dem Rezeptor vorliegt. In der vorliegenden Arbeit wurde daher stets mittels F-Test (siehe Abschnitt 2.1.6.3) untersucht, ob bei freier Anpassung dieses Parameters ein signifikanter Unterschied zum vorgegebenen Hill-Koeffizienten  $n_H=1$  (bzw. -1) bestand.

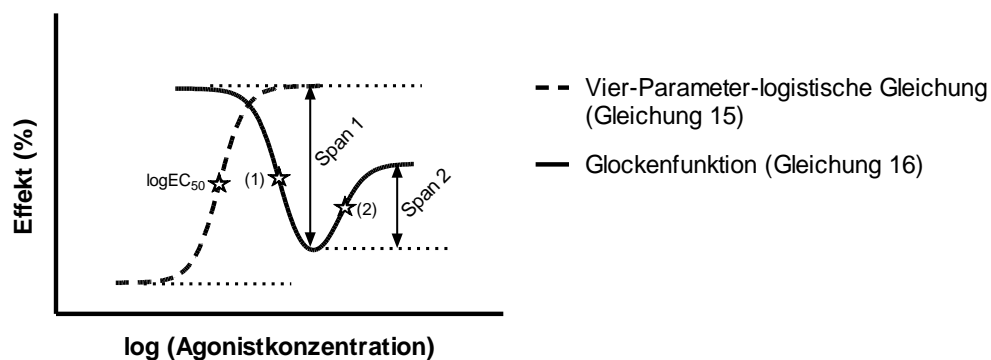
### 2.1.5.2 Glockenförmige Konzentrations-Effekt-Beziehungen

In einem funktionellen Experiment, z. B. bei der Messung der *Second Messenger*-Generierung kann es möglich sein, dass ein Agonist zwei Effekte, nämlich einen inhibitorischen bei niedrigen Konzentrationen und einen stimulatorischen bei höheren Konzentrationen (oder andersherum) zeigt. Die Daten können in diesem Fall mit einer glockenförmigen Funktion beschrieben werden, welche die Summe zweier Konzentrations-Effekt-Kurven darstellt (Gleichung 16). Darin steht *Dip* für den y-Wert des Plateaus in der Kurvenmitte.

$$y = \text{Dip} + \frac{\text{Span 1}}{1+10^{(\log EC_{50-1}-x)n_{H1}}} + \frac{\text{Span 2}}{1+10^{(\log EC_{50-2}-x)n_{H2}}} \quad \text{Gleichung 16}$$

mit  $\text{Span 1} = \text{Anfangsplateau} - \text{Dip}$   
 $\text{Span 2} = \text{Endplateau} - \text{Dip}$

Die folgende Abbildung veranschaulicht den Kurvenverlauf der glockenförmigen Konzentrations-Effekt-Beziehung mit den beiden Wendepunkten  $\log EC_{50-1}$  und  $\log EC_{50-2}$ . Eine einfache Konzentrations-Effekt-Kurve nach Gleichung 15 mit einem Hill-Koeffizienten von  $n_H=1$  ist ebenfalls dargestellt.



**Abb. 2.5 Schematische Verlauf von Konzentrations-Effekt-Kurven.** *Gestrichelte Kurve:* Vier-Parameter-logistische Gleichung (Gleichung 15) mit einem Hill-Koeffizienten von  $n_H=1$  bei einer einfachen Konzentrations-Effekt-Beziehung (Abschnitt 2.1.5.1). Der Wendepunkt als  $\log EC_{50}$ -Wert ist mit einem Stern gekennzeichnet. *Durchgezogene Kurve:* Verlauf einer glockenförmigen Funktion (Gleichung 16), wenn ein Agonist einen inhibitorischen Effekt bei niedrigen und einen stimulatorischen bei höheren Konzentrationen zeigt mit  $n_{H1}=-1$  und  $n_{H2}=1$ . Die beiden Wendepunkte sind durch Sterne gekennzeichnet, dabei steht (1) für  $\log EC_{50-1}$  und (2) für  $\log EC_{50-2}$ . Das Minimum dieser Kurve entspricht dem *Dip*-Wert.

### 2.1.5.3 Operational Model

Im Jahr 1983 veröffentlichten Black und Leff eine wissenschaftliche Arbeit mit dem Ziel, pharmakologischen Agonismus universell zu beschreiben. Die zuvor vorgeschlagenen Modelle zur Quantifizierung von Agonismus waren allesamt systemabhängig und hatten somit zur Folge, dass die Effekte von Agonisten in zwei unterschiedlichen Geweben nicht direkt miteinander vergleichbar waren (vgl. Kenakin, 2013). Generell ist der Eigenschaft von Agonisten, eine Gewebeantwort auszulösen, keine „chemische Identität“ (d.h. eine direkt messbare Größe) zuzuordnen (Black & Leff, 1983). Jedoch zeigten die beiden voran genannten Wissenschaftler, dass zur Beschreibung von Agonismus die drei Parameter  $K_A$ ,  $[R_0]$  und  $K_E$  (s.u.) nötig, aber auch hinreichend sind. Das folgende Schema zeigt den Ausgangspunkt des Modells:



**Abb. 2.6. Pharmakologischer Agonismus und das „Black Box“-Problem (modifiziert nach Black & Leff, 1983).** Ein Agonist (A) bindet an den Rezeptor (R). Der Agonist-Rezeptor-Komplex (AR) ist verantwortlich für die Auslösung des Effekts (E), jedoch folgt dieser Vorgang nicht mehr dem Massenwirkungsgesetz sondern stellt eine sogenannte „Black Box“-Funktion dar.

Ein Agonist bindet in einer einfachen bimolekularen Reaktion an den Rezeptor und formt den Agonist-Rezeptor-Komplex (AR). Diese Reaktion folgt dem Massenwirkungsgesetz und die Menge der gebildeten Komplexe lässt sich mit folgender Gleichung, auch *Occupancy Function* genannt, ausdrücken:

$$[AR] = \frac{[R_0][A]}{K_A + [A]} \quad \text{Gleichung 17}$$

[AR]	Konzentration des Agonist-Rezeptor-Komplexes
[A]	Konzentration des Agonisten
$K_A$	Gleichgewichtsdissoziationskonstante des Agonist-Rezeptor-Komplexes
$[R_0]$	totale Rezeptorkonzentration

Die AR-Komplexe sind verantwortlich für die Entstehung des Effekts, was unter Berücksichtigung von Gleichung 17 in der sogenannten *Transducer Function* wiedergegeben wird:

$$E = z * [AR]$$

$$E = z * \left[ \frac{[R_0][A]}{K_A + [A]} \right] \quad \text{Gleichung 18}$$

E	pharmakologischer Effekt
z	Proportionalitätsfaktor der <i>Transducer Function</i>

Nun sind zwei Arten der Beziehung (z) zwischen Effekt und AR-Komplex möglich. Zum einen kann sie linear sein, wenn es sich um ein System ohne Rezeptorreserve handelt bzw. wenn die Rezeptoranzahl experimentell manipuliert worden ist. Dieser Fall hat jedoch weniger Relevanz und soll daher hier zurückgestellt werden.

Die andere Möglichkeit ist eine hyperbolische Beziehung zwischen gebildeten AR-Komplexen und dem Effekt, die unter Einbeziehung der Maximalantwort des Systems analog zur Enzymkinetik beschrieben werden kann:

$$E = \frac{E_{\max}[AR]}{K_E + [AR]} \quad \text{Gleichung 19}$$

$E_{\max}$	maximal möglicher Effekt im System
$K_E$	Transduktionskonstante für die Umsetzung des AR-Komplexes in einen Effekt; beschreibt die Menge an AR-Komplexen, die für einen halbmaximalen Effekt nötig sind

Durch Ersatz von [AR] mit Gleichung 17 in Gleichung 19 wird der pharmakologische Effekt eines Agonisten durch nur drei Variable beschrieben ( $E_{\max}$  ist für ein gegebenes System konstant):

$$E = \frac{E_{\max}[R_0][A]}{K_A K_E + (R_0 + K_E)[A]} \quad \text{Gleichung 20}$$

Das *Operational Model* setzt sich demnach aus zwei Teilen, nämlich der *Occupancy Function* und der *Transducer Funktion* zusammen. Die ausschlaggebenden Parameter, welche den messbaren Effekt von Agonisten variieren lassen, sind die totale Rezeptorkonzentration  $[R_0]$  und die Transduktionskonstante  $K_E$ . Diese werden zusammengefasst in der Kopplungseffizienz  $\tau$  (*Transducer Ratio*, Gleichung 21), welche zur Vereinfachung von Gleichung 20 zu Gleichung 22 führt.

$$\tau = \frac{[R_0]}{K_E} \quad \text{Gleichung 21}$$

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

Gleichung 22 trifft zu, wenn die Beziehung zwischen Effekt und Agonistkonzentration ( $E \rightarrow [A]$ -Kurve) der Form einer gleichseitigen Hyperbel folgt, d.h. ihre Asymptoten stehen senkrecht zueinander. In diesem Fall nimmt der sogenannte *Transducer Slope n* als Maß für die Kurvensteilheit einen Wert von 1 an. Trifft dies nicht zu, da die Kurve steiler oder flacher verläuft, wird Gleichung 19 unter Berücksichtigung des *Transducer Slope n* erweitert (Gleichung 23) und der Gesamtzusammenhang zwischen Effekt und Agonistkonzentration durch Gleichung 24 beschrieben:

$$E = \frac{E_{\max}[AR]^n}{(K_E)^n + [AR]^n} \quad \text{Gleichung 23}$$

$$E = \frac{E_{\max}\tau^n[A]^n}{[A]^n\tau^n + ([A] + K_A)^n} \quad \text{Gleichung 24}$$

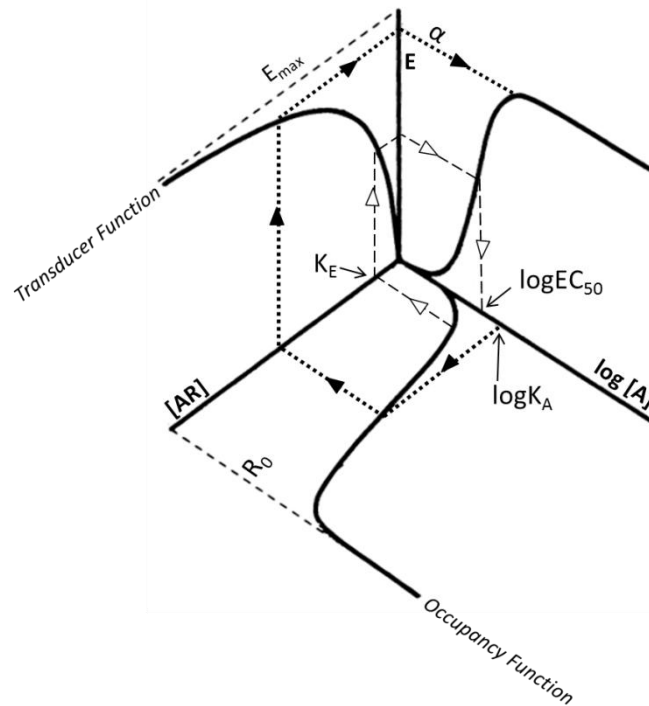
An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass der *Transducer Slope* nicht gleichzusetzen ist mit dem Hill-Koeffizienten  $n_H$  in der Vier-Parameter-logistischen-Gleichung (Gleichung 15), jedoch sind diese beiden Parameter verwandt (vgl. Kenakin et al., 2012). Somit kann ein *Transducer Slope* von  $n=1$  und damit die Gültigkeit von Gleichung 22 vorausgesetzt werden, wenn bei der nichtlinearen Regressionsanalyse von Konzentrations-Effekt-Beziehungen mittels Vier-Parameter-logistischer-Gleichung ein Hill-Koeffizient festgestellt wird, der nicht signifikant vom Wert  $n_H=1$  abweicht.

In Abb. 2.7 ist das *Operational Model* unter der Vorgabe der Parameter  $n=1$  und  $\tau=10$  in einem dreidimensionalen Koordinatensystem graphisch erläutert. Es handelt sich um ein System mit Rezeptorreserve, da für den halbmaximalen Effekt, gekennzeichnet durch den  $\log EC_{50}$ -Wert nur 10% der Rezeptoren durch den Agonisten besetzt sein müssen. Bei halbmaximaler Rezeptorbesetzung, gekennzeichnet durch  $\log K_A$ , liegt eine maximale Systemantwort vor, die durch die Asymptote  $\alpha$  der Konzentrations-Effektkurve ( $E \rightarrow \log[A]$ ) festgelegt wird. Generell gelten für die Kennwerte (Wendepunkt und Asymptote) folgende Definitionen:

Agonistkonzentration beim halbmaximalen Effekt (Wendepunkt)  $[A_{50}] = \frac{K_A}{1 + \tau}$  Gleichung 25

Asymptote der  $E(\log[A])$ -Kurve für  $[A] \rightarrow \infty$   $\alpha = \frac{E_{\max}\tau}{1 + \tau}$  Gleichung 26

Dadurch wird deutlich, dass bei Vorliegen einer Rezeptorreserve bzw. bei einem großen  $\tau$ -Wert die Agonistkonzentration  $[A_{50}]$  sehr viel kleiner als die Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_A$  ist und dass der maximal zu erreichende Effekt (E) sich dem theoretischen Wert  $E_{max}$  annähert.



**Abb. 2.7** Das *Operational Model* mit den Parametern  $n=1$  und  $\tau=10$  (modifiziert nach Black et al., 2010). Die gestrichelten Linien mit (▷) zeigen den Zusammenhang zwischen Agonistkonzentration beim halbmaximalen Effekt und der Rezeptorbesetzung von 10%. Die gepunkteten Linien mit (▷) verdeutlichen, dass bei halbmaximaler Rezeptorbesetzung die maximale Systemantwort (E) erreicht wird, welche gemäß Gleichung 26 ca. 91 % des  $E_{max}$ -Wertes annehmen.  $[A_{50}]$  beträgt  $\frac{1}{11}$  von  $K_A$ .

#### 2.1.5.4 Anwendung des Operational Modells zur Berechnung von Bias-Faktoren

Nachdem sich das Konzept der promiskuitiven G-Proteinaktivierung durch 7TM-Rezeptoren etabliert hatte, wurde auch festgestellt, dass nicht jeder Agonist in der Lage ist, den vollen Umfang der möglichen Signalwege in einer Zelle zu aktivieren. Dieser Sachverhalt wird als *Biased Signalling* oder *Biased Agonism* bezeichnet, wobei auch andere Begriffe wie z.B. *Functional Selectivity* genutzt werden (vgl. Kenakin & Christopoulos, 2013).

Um dieses Verhalten von Agonisten zu quantifizieren, wurden Methoden zur Berechnung von sogenannten Bias-Faktoren entwickelt, wodurch die ligandenspezifische Bevorzugung eines von zwei Signalwegen systemunabhängig ermittelt werden kann (reines *Ligand* oder *Agonist Bias*). Die Systemunabhängigkeit des Bias-Faktors wird dadurch erreicht, dass die Berechnung immer im Bezug zu einem definierten Referenzagonisten geschieht. Dieser Referenzagonist ist in der Regel ein Vollagonist. Häufig wird der endogene Ligand des betrachteten Rezeptors als Referenz gewählt, um Unterschiede zum normalen, physiologischen Vorgang aufzudecken. Es kann jedoch ebenso ein synthetischer Ligand als Referenzagonist dienen, wenn beispielsweise der Einfluss von Strukturveränderungen auf die Signalwegaktivierung untersucht werden soll.

In vorliegender Arbeit sollte die  $G_i$ - der  $G_s$ -Signalwegaktivierung gegenübergestellt werden. Dazu wurden  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsexperimente an Zellmembranhomogenaten zur Erfassung der  $G_i$ -



Protein-Aktivierung durchgeführt. Die Messung des stimulatorischen Signalwegs erfolgte anhand der Messung der cAMP-Produktion in PTX-vorbehandelten Zellen.

Ausgangspunkt zur Berechnung der Bias-Faktoren anhand dieser funktionellen Experimente war das *Operational Model*, welches aber wie im Folgenden dargestellt auf zwei Arten interpretiert werden kann. Als letztes wird noch eine einfache Methode der Bias-Berechnung vorgestellt, die unter bestimmten Voraussetzungen allgemeine Gültigkeit hat.

### 2.1.5.5 Berechnung des Bias-Faktors $\beta_{lig}$

Die Grundlage zur Berechnung des Bias-Faktors  $\beta_{lig}$  stellt die Kopplungseffizienz  $\tau$  dar, welche für die Referenz- und Testsubstanz jeweils für jeden der beiden Signalwege bestimmt werden muss. Dazu wurde die im Computerprogramm GraphPad Prism® vorhandene Anwendung des *Operational Models* genutzt, welche den Testagonisten in einem Signalweg im Vergleich zur Referenzsubstanz analysiert.

$$\text{Referenzagonist (Vollagonist)} \quad y = \text{Basal} + \frac{(E_{\max} - \text{Basal})}{1 + 10^{(\log EC_{50} - x)}} \quad \text{Gleichung 27}$$

$$\text{Testagonist (Voll- oder Partialagonist)} \quad y = \text{Basal} + \frac{(E_{\max} - \text{Basal})}{1 + \text{operate}} \quad \text{Gleichung 28}$$

$$\text{mit} \quad \text{operate} = \frac{10^{\log K_A} + 10^x}{10^{(\log \tau + x)}} \quad \text{Gleichung 29}$$

Gleichung 27 entspricht Gleichung 15 (Vier-Parameter-logistische Gleichung) mit einem Hill-Koeffizienten von  $n_H=1$ . Gleichung 28 und Gleichung 29 haben Gültigkeit bei einem *Transducer Slope* von  $n=1$ , welcher bei der Datenauswertung in vorliegender Arbeit immer mit diesem Wert vorgegeben und daher hier nicht explizit als Variable in den Gleichungen wiedergegeben wurde.

Um die Anzahl der unbekannt Parameter weiter einzugrenzen und somit eine präzisere Bestimmung der Kopplungseffizienz zu ermöglichen, wird nach dieser Methode von Rajagopal et al. (2011) für  $\log K_A$  bei jeder Testsubstanz ein entsprechender Wert vorgegeben. Da wie aus Abb. 2.7 hervorgeht, die Konstante  $K_A$  die Affinität des Agonisten zum Rezeptor beschreibt, entspricht sie der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten des Agonisten, die durch Radioligand-Bindungsstudien ermittelt werden kann. Es ist jedoch zu beachten, dass dabei Versuchsbedingungen eingehalten werden, die die Bildung von ternären Komplexen verhindern (Rajagopal, 2013), sodass die gefundene Gleichgewichtsdissoziationskonstante tatsächlich nur die Bildung des Agonist-Rezeptor-Komplexes ohne Einfluss eines Signalproteins widerspiegelt.

In der vorliegenden Arbeit wurden Bindungsstudien an Zellmembranhomogenaten mit dem Radioliganden [ $^3\text{H}$ ]NMS durchgeführt (siehe Abschnitt 2.1.3.5). Durch entsprechende Analyse der Daten anhand des biphasischen Bindungsmodells wurde die Affinität der Testagonisten zu einer hochaffinen sowie zu einer niedrigaffinen Rezeptorkonformation untersucht. Letztere stellt den G-Protein-entkoppelten Zustand des 7TM-Rezeptors dar und der zugehörige  $K_i$ -Wert wurde der Affinitätskonstanten  $K_A$  gleichgesetzt.

Die Kopplungseffizienz  $\tau$  der Referenzsubstanz, welche für die weitere Berechnung des Bias-Faktors  $\beta_{lig}$  nötig ist, wurde erhalten, indem die zusammengeführten und gemittelten Daten aus mehreren funktionellen Experimenten anhand Gleichung 27 analysiert wurden, während Gleichung 28 und

Gleichung 29 auf die Daten der Einzelversuche unter Vorgabe der Affinität der Referenzsubstanz angewendet wurden. Aus den somit erhaltenen  $\tau$ -Werten für jeden Einzelversuch wurde anschließend der Mittelwert mit Standardfehler errechnet und dieser für die weitere Berechnung genutzt.

Die Kopplungseffizienz  $\tau$ , welche auf diese Weise für den Testagonisten und die Referenzsubstanz ermittelt wurde, wird durch zwei Faktoren gebildet:

$$\tau = \tau^* \varepsilon \quad \text{Gleichung 30}$$

Dabei steht  $\tau^*$  für die Signalamplifikation, welche für jeden Signalweg intrinsisch ist und daher auch für alle Agonisten im gleichen Versuchssystem als konstant gilt. Mit  $\varepsilon$  wird die Fähigkeit des Agonisten beschrieben, eine Konformation des Agonist-Rezeptor-Komplexes hervorzurufen, die eine Signalwegaktivierung ermöglicht. Die System-abhängige Komponente der Kopplungseffizienz kürzt sich jedoch heraus, wenn die  $\tau$ -Werte des Testagonisten (lig) und der Referenzsubstanz (ref) eines Signalweges (S1) miteinander in Beziehung gesetzt werden.

$$\sigma_{\text{lig}}^{\text{S1}} = \log \left( \frac{\tau_{\text{lig}}^{\text{S1}}}{\tau_{\text{ref}}^{\text{S1}}} \right) = \log \left( \frac{\varepsilon_{\text{lig}}^{\text{S1}}}{\varepsilon_{\text{ref}}^{\text{S1}}} \right) \quad \text{Gleichung 31}$$

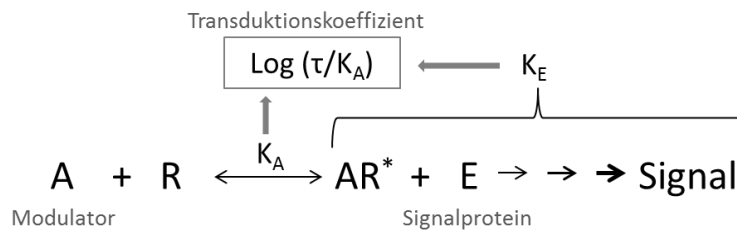
Die *effektive Signalwegaktivierung*  $\sigma_{\text{lig}}$  eines Testagonisten wird für jeden Signalweg getrennt berechnet. Anschließend kann mit den  $\sigma_{\text{lig}}$ -Werten zweier Signalwege (S1 und S2) der Bias-Faktor  $\beta_{\text{lig}}$  bestimmt werden:

$$\beta_{\text{lig}} = \frac{\sigma_{\text{lig}}^{\text{S1}} - \sigma_{\text{lig}}^{\text{S2}}}{\sqrt{2}} \quad \text{Gleichung 32}$$

Trägt man die effektive Signalwegaktivierung zweier Signalwege in einem Koordinatensystem gegeneinander auf, so liegen die Koordinaten von Agonisten ohne Bias ( $\beta_{\text{lig}}=0$ ) auf der Ursprungsgeraden mit der Steigung  $m=1$ . Handelt es sich jedoch um einen Agonisten, der einen der beiden Signalwege bevorzugt aktiviert, entspricht der Abstand zur Geraden dem Bias-Faktor  $\beta_{\text{lig}}$ .

#### 2.1.5.6 Berechnung des Bias-Faktors $\Delta \Delta \log(\tau/K_A)$

Ein 7TM-Rezeptor wird bei diesem Modell als ein allosterisches System betrachtet, da die Interaktion zwischen Rezeptor und Signalprotein durch die vorher stattgefundenene Bindung des Agonisten beeinflusst wird (Kenakin & Christopoulos, 2013). Der Agonist-Rezeptor-Komplex kann dabei eine bestimmte Konfiguration annehmen (AR\* in Abb. 2.8), die die weitere Bindung an das Signalprotein begünstigt. Dies wird durch die Konstante  $K_A$  wiedergegeben, welche hier für die *funktionelle Affinität* des Agonisten steht und somit nicht genau der Definition im *Operational Model* gleichzusetzen ist (vgl. Abschnitt 2.1.5.3, Gleichung 17) Für die Erzeugung eines Signals ist der Komplex aus Agonist, Rezeptor und Signalprotein als kleinste biologische Einheit nötig. Die Transduktionskonstante  $K_E$  entspricht daher der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten dieses *Signalkomplexes*. Die funktionelle Affinität  $K_A$  und die Transduktionskonstante  $K_E$  sind demnach bestimmend für die Generierung einer Zellantwort durch einen Agonisten.



**Abb. 2.8 Schema zur Veranschaulichung des Transduktionskoeffizienten  $\log(\tau/K_A)$  (modifiziert nach Kenakin et al., 2012).** Der Agonist (A) bindet an den Rezeptor (R) und wirkt dabei auf ihn wie ein allosterischer Modulator, der eine bestimmte Rezeptorkonformation (\*) stabilisiert. Bestimmend für diesen Prozess ist die funktionelle Affinität  $K_A$  des Agonisten. Der  $AR^*$ -Komplex kann mit verschiedenen Effektoren (E) interagieren, was zu verschiedenen Signalen führen kann. Das Ausmaß der Generierung eines messbaren Signals ist für jeden Effektor charakteristisch und gekennzeichnet durch die Transduktionskonstante  $K_E$ . Unter Berücksichtigung der Definition der Kopplungseffizienz  $\tau$  bilden die Konstanten  $K_A$  und  $K_E$  den Transduktionskoeffizienten  $\log(\tau/K_A)$  für die Aktivierung eines Signalweges.

Bei Anwendung des *Operational Models* nach Gleichung 22 bzw. Gleichung 24 zur Analyse funktioneller Experimente ist es jedoch möglich, dass mehrere Kombinationen der Parameter  $K_A$  und  $\tau$  existieren können. Um dieses Problem zu umgehen, wurde ein zusammengesetzter Transduktionskoeffizient  $\log(\tau/K_A)$  definiert, da das Verhältnis von Kopplungseffizienz  $\tau$  und funktioneller Affinität  $K_A$  über weite Strecken variierender Rezeptordichte ( $[R_0]$ ) konstant bleibt (Kenakin et al., 2012). Die folgende Gleichung ergibt sich aus Gleichung 22, wenn Zähler und Nenner durch  $K_A$  geteilt werden, und verdeutlicht die Stellung des Transduktionskoeffizienten auf mathematischer Ebene:

$$E = \frac{E_{\max} \frac{\tau}{K_A} [A]}{\frac{\tau}{K_A} [A] + \left(\frac{[A]}{K_A} + 1\right)} \quad \text{Gleichung 33}$$

Für jeden Signalweg, der durch einen Agonisten induziert werden kann, lässt sich mit dieser Methode ein Transduktionskoeffizient  $\log(\tau/K_A)$  durch Analyse der Daten aus funktionellen Experimenten ermitteln. Dabei werden für jeden Signalweg der Referenzagonist und der Testagonist zusammen analysiert:

Referenzagonist (Vollagonist) 
$$y = \text{Basal} + \frac{(E_{\max} - \text{Basal})}{1 + 10^{(\log EC_{50} - x)}} \quad \text{entspr. Gleichung 27}$$

Testagonist (Voll- oder Partialagonist) 
$$y = \text{Basal} + \frac{(E_{\max} - \text{Basal}) * 10^{\log(\frac{\tau}{K_A})} * 10^x}{\text{operate}} \quad \text{Gleichung 34}$$

mit 
$$\text{operate} = 10^{\log(\frac{\tau}{K_A})} * 10^x * \left(\frac{10^x}{10^{\log K_A}} + 1\right) \quad \text{Gleichung 35}$$

Für die weitere Errechnung des Bias-Faktors  $\Delta \log(\tau/K_A)$  muss auch der Transduktionskoeffizient  $\log(\tau/K_A)$  des Referenzagonisten für jeden Signalweg bekannt sein. Dieser wurde bestimmt, indem die zusammengeführten und gemittelten Daten aus mehreren funktionellen Experimenten anhand Gleichung 27 analysiert wurden, während Gleichung 34 und Gleichung 35 auf die Daten der Einzelversuche der Referenzsubstanz angewendet wurden. Aus den somit erhaltenen  $\log(\tau/K_A)$ -Werten für jeden Einzelversuch wurde anschließend der Mittelwert mit Standardfehler errechnet und dieser für die weitere Berechnung genutzt.

Der Transduktionskoeffizient  $\log(\tau/K_A)$  enthält noch Verzerrungen, die abhängig vom gewählten Testsystem sind und als *System Bias* und *Observational Bias* bezeichnet werden (Kenakin & Christopoulos, 2013). Damit ist die relative Leistungsfähigkeit eines Signalwegs im betrachteten Versuchsgewebe oder in einer ausgewählten Zell-Linie gemeint bzw. die relative Empfindlichkeit der angewendeten Methode zur Messung der Signalstärke. Um diese Einflüsse auf das reine *Agonist Bias* zu eliminieren, wird der normalisierte Transduktionskoeffizient  $\Delta\log(\tau/K_A)$  des Testagonisten (Test) für jeden Signalweg (S1 bzw. S2) mit Gleichung 36 berechnet:

$$\Delta\log(\tau/K_A)_{Test}^{S1} = \log(\tau/K_A)_{Test}^{S1} - \log(\tau/K_A)_{Ref}^{S1} \quad \text{Gleichung 36}$$

Auch für die Referenzsubstanz (Ref) wird nach dieser Gleichung  $\Delta\log(\tau/K_A)$  berechnet (in diesem Fall gilt Testagonist=Referenz), welcher für jeden Signalweg der Wert Null annimmt.

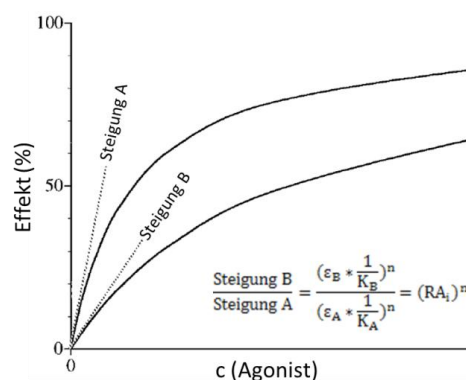
Anschließend kann aus den normalisierten Transduktionskoeffizienten zweier Signalwege der Bias-Faktor  $\Delta\Delta\log(\tau/K_A)$  der Testsubstanz berechnet werden. Der Bias-Faktor der Referenzsubstanz wird in analoger Weise bestimmt und hat daher definitionsgemäß immer einen Wert von Null.

$$\Delta\Delta\log(\tau/K_A)_{Test} = \Delta\log(\tau/K_A)_{Test}^{S1} - \Delta\log(\tau/K_A)_{Test}^{S2} \quad \text{Gleichung 37}$$

### 2.1.5.7 Berechnung des Bias-Faktors $\Delta\Delta\log(RA_i)$

Die Abkürzung  $RA_i$  steht für *Intrinsic Relative Activity* und ist definiert als Produkt aus Affinität und intrinsischer Wirksamkeit (*Intrinsic Efficacy*) eines Agonisten ausgedrückt in Bezug auf einen Referenzagonisten (Ehlert et al., 1999). Ursprünglich wurde diese Größe eingeführt, um die pharmakologische Aktivität eines Agonisten, die in verschiedenen Testsystemen (z.B. im nativen Gewebe und in transfizierten Zellen) untersucht wurde, zu vergleichen. In der zuvor zitierten Arbeit wurde anhand des muskarinischen  $M_3$ -Rezeptors gezeigt, dass der  $RA_i$ -Wert eines Agonisten unabhängig vom Testsystem ist.

Abb. 2.9 veranschaulicht, dass das Produkt aus Affinität ( $1/K_A$  bzw.  $1/K_B$ ) und intrinsischer Wirksamkeit ( $\epsilon_A$  bzw.  $\epsilon_B$ ) zweier Agonisten A und B mit den graphischen Kennwerten einer Konzentrations-Effekt-Beziehung (hier mit linearer Auftragung der Agonistkonzentration) assoziiert ist.



**Abb. 2.9 Zusammenhang zwischen  $RA_i$  und den Konzentrations-Effekt-Kurven zweier Agonisten (modifiziert nach Ehlert et al., 1999).** Der Agonist A stellt den Referenzagonisten dar, auf den die Aktivität des Testagonisten B bezogen wird.  $\epsilon_A$  und  $\epsilon_B$  beschreiben die intrinsischen Wirksamkeiten („*intrinsic efficacy*“) der Agonisten A bzw. B. Die Konstanten  $K_A$  und  $K_B$  sind die Gleichgewichtsdissoziationskonstanten der Agonisten A bzw. B, deren Kehrwert die jeweilige Affinität zum Rezeptor darstellt. Das Verhältnis der Anfangssteigungen der Konzentrations-Effekt-Kurven ist ein Maß für  $RA_i$ . Der Exponent  $n$  ist ein Maß für die Steilheit der Konzentrations-Effekt-Beziehung.

Durch Anwendung des *Operational Models* wurde gezeigt, dass das Verhältnis der Anfangssteigungen der Definition des  $RA_i$ -Wertes entspricht (Ehlert et al., 1999). Ein guter Näherungswert für  $RA_i$  lässt sich jedoch auch ohne Kenntnisse über die Parameter Affinität und intrinsische Wirksamkeit direkt aus den Kenngrößen sigmoider Konzentrations-Effekt-Kurven,  $EC_{50}$  und  $E_{max}$ , mit Gleichung 38 berechnen, wenn für den Hill-Koeffizienten nach Gleichung 15 (Vier-Parameter-logistische Gleichung)  $n_H=1$  gilt.

$$RA_i = \frac{E_{max-Test}EC_{50-Ref}}{E_{max-Ref}EC_{50-Test}} \quad \text{Gleichung 38}$$

Da das *Operational Model* die gemeinsame Grundlage darstellt, gilt zudem unter der genannten Voraussetzung ( $n_H=1$ ), dass der  $\log(RA_i)$ -Wert dem Transduktionskoeffizienten  $\log(\tau/K_A)$  gleichzusetzen ist (Kenakin & Christopoulos, 2013). Daher lässt sich ein Bias-Faktor  $\Delta\Delta\log(RA_i)$  für zwei Signalwege (S1 und S2) lediglich aus den Kenngrößen  $EC_{50}$  und  $E_{max}$  der Konzentrations-Effekt-Kurven der Referenzsubstanz und des Testagonisten anhand Gleichung 39 (vgl. Rajagopal et al., 2011) berechnen:

$$\Delta\Delta\log(RA_i) = \log\left(\left(\frac{E_{max-S1}EC_{50-S2}}{EC_{50-S1}E_{max-S2}}\right)_{Test} * \left(\frac{E_{max-S2}EC_{50-S1}}{EC_{50-S2}E_{max-S1}}\right)_{Ref}\right) \quad \text{Gleichung 39}$$

## 2.1.6 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte computergestützt mittels der in den Programmen Microsoft® Excel und GraphPad Prism® enthaltenen Anwendungen. Die Auswahl eines geeigneten statistischen Tests richtete sich nach den Empfehlungen im *Statistics Guide* (H.J. Motulsky, Prism 5 Statistics Guide, 2007, GraphPad Software Inc., San Diego CA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com).) unter Annahme einer Normalverteilung der Messdaten. Die Grundprinzipien dieser Methoden sollen hier nur kurz erläutert werden.

### 2.1.6.1 Deskriptive Statistik

#### Arithmetisches Mittel

Unter Annahme einer Normalverteilung der Daten einer Messreihe ( $x_1$  bis  $x_n$ ) wurde der arithmetische Mittelwert  $\bar{x}$  als Lagemaß berechnet:

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}$$

#### Streuungsmaße

Als Maß für die Streubreite eines Messwertes  $x_i$  vom erwarteten Wert  $\bar{x}$  wurde die korrigierte Stichprobenvarianz  $s^2$  berechnet:

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

Daraus wurde die Standardabweichung  $\sigma$  berechnet, welche das Streuungsmaß einer Stichprobe (Datenreihe) darstellt:

$$\sigma = \sqrt{s^2}$$

Durch Berechnung des Standardfehlers des Mittelwertes (in vorliegender Arbeit auch kurz als Standardfehler oder SEM für *standard error of the mean* bezeichnet) wurde angegeben, wie präzise der Mittelwert der erhobenen Daten den Mittelwert der Grundgesamtheit schätzt. Des Weiteren sind durch den Standardfehler die Streuungen zweier Datensätze mit unterschiedlichem Stichprobenumfang miteinander vergleichbar (siehe t-Test, Abschnitt 2.1.6.4).

$$\text{SEM} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

### 2.1.6.2 Fehlerfortpflanzung

Wurde eine neue Kenngröße aus anderen, primären Kenngrößen berechnet, so wurde ihr Standardfehler (SEM) aus den bekannten Standardfehlern (SEM) der Ausgangsparameter bestimmt (vgl. Gregory et al., 2012):

$$\text{vereinigter SEM} = \sqrt{(\text{SEM}_1)^2 + (\text{SEM}_2)^2}$$

### 2.1.6.3 F-Test

Mit diesem statistischen Test wurde überprüft, ob sich zwei Stichproben unterschiedlicher Grundgesamtheiten in ihren Varianzen ( $s_A^2$  und  $s_B^2$ ) unterscheiden. Dazu wurden zunächst zwei Hypothesen aufgestellt:

$$\begin{aligned} \text{Nullhypothese (H}_0\text{): } & s_A^2 = s_B^2 \\ \text{Alternativhypothese (H}_1\text{): } & s_A^2 \neq s_B^2 \text{ (wobei } s_B^2 > s_A^2 \text{ ist)} \end{aligned}$$

Für die Berechnung der Testgröße  $F_{\text{Test}}$  wurde der Quotient der Varianzen gebildet:

$$F_{\text{Test}} = \frac{s_B^2}{s_A^2}$$

War der Testwert größer als der Wert der F-Wert-Tabelle, so wurde die Nullhypothese verworfen. Darüber hinaus diente der F-Test bei der nicht-linearen Regressionsanalyse zur Überprüfung, ob ein Parameter der Kurvenfunktion signifikant von einem vorgegebenen Wert abwich.

$$\begin{aligned} \text{Nullhypothese (H}_0\text{): } & \text{Parameter} = \text{vorgegebener Wert} \\ \text{Alternativhypothese (H}_1\text{): } & \text{Parameter} \neq \text{vorgegebener Wert} \end{aligned}$$

Anhand der Zahl der Freiheitsgrade  $f$  und der Summe der kleinsten Abstandsquadrate  $ss$  (für *sum of squares*) der Kurvenanpassung mit vorgegebenem bzw. freilaufendem Wert des gewählten Parameters wurde die Testgröße berechnet und die Nullhypothese analog zu oben angenommen bzw. verworfen:

$$F_{\text{Test}} = \frac{\frac{SS_{H_0} - SS_{H_1}}{f_{H_0} - f_{H_1}}}{\frac{SS_{H_0}}{f_{H_0}}}$$

### 2.1.6.4 t-Test

Die Überprüfung, ob zwischen zwei Mittelwerten ein signifikanter Unterschied bestand, erfolgte in der vorliegenden Arbeit stets mit einem zweiseitigen t-Test für unverbundene Stichproben unter der Voraussetzung gleicher Varianzen (siehe Abschnitt 2.1.6.3). Es wurde stets ein 95 %iges Konfidenzintervall gewählt.

Sind die Mittelwerte  $x_A$  und  $x_B$  zweier Stichproben des Umfangs  $n_A$  und  $n_B$  mit der gleichen Varianz ( $s_A^2$  und  $s_B^2$ ) gegeben, so ist die gepoolte Stichprobenvarianz folgendermaßen definiert:

$$s_p^2 = \frac{(n_A - 1) \cdot s_A^2 + (n_B - 1) \cdot s_B^2}{n_A + n_B - 2}$$

Unter der Nullhypothese gleicher Mittelwerte ( $H_0: x_A = x_B$ ) wurde der Prüfwert folgendermaßen berechnet:

$$t_{\text{Test}} = \frac{\bar{x}_A - \bar{x}_B}{s_p \cdot \sqrt{\frac{1}{n_A} + \frac{1}{n_B}}}$$

### 2.1.6.5 ANOVA und Dunnett-post-Test

Um die Mittelwerte von mehr als zwei Gruppen auf signifikante Unterschiede zu testen, wurde die einfaktorische Varianzanalyse ANOVA (*analysis of variance*) genutzt, welche eine Verallgemeinerung des t-Tests darstellt. Die Nullhypothese dieses Tests nimmt die Gleichheit der Mittelwerte aller Testgruppen an, während die Alternativhypothese von mindestens einem Unterschied zwischen zwei Mittelwerten ausgeht. Mit der Prüfgröße  $F_{\text{Prüf}}$  wird getestet, ob die Varianz zwischen den Gruppen größer ist als die Varianz innerhalb der Gruppen.

$$F_{\text{Prüf}} = \frac{\frac{1}{k-1} QS_A}{\frac{1}{n-k} QS_E}$$

$QS_A$	Summe der Abweichungsquadrate der Mittelwerte vom Gesamtmittelwert
$QS_E$	Summe der Abweichungsquadrate der Mittelwerte innerhalb der Gruppen
$k$	Anzahl der Gruppen
$n$	Anzahl der Stichproben (Versuche) aller Gruppen

Ist  $F_{\text{Prüf}}$  größer als der Tabellenwert der F-Verteilung mit den Freiheitsgraden  $k-1$  und  $n-k$  bei einem Signifikanzniveau  $\alpha$  von 5 %, so ist die Nullhypothese abzulehnen. Da dadurch jedoch noch keine Aussage getroffen wurde, zwischen welchen Gruppenpaarungen ein Unterschied besteht, wurde ein multipler Mittelwertsvergleich als ein *post-Test* durchgeführt. In vorliegender Arbeit wurde dazu der Dunnett-*post-Test* gewählt, mit dem alle Testgruppen mit einer Kontrollgruppe verglichen werden können.

Grundsätzlich wird bei klassischen *post-Tests* ein kritischer Wert  $c_d$  berechnet und alle Mittelwertsdifferenzen, die diesen überschreiten, gelten als signifikant unterschiedlich. Dabei wird für alle vorgenommenen Vergleiche der über alle Gruppen gepoolte Schätzfehler zugrunde gelegt. Beim Dunnett-*post-Test* ist der kritische Wert folgendermaßen definiert:

$$c_d = t_{\alpha}(k, df_{\text{Fehler}}) \sqrt{\frac{2MS_{\text{Fehler}}}{n}}$$

Hierbei ist  $t_{\alpha}$  ein kritischer Wert aus der nach Dunnett modifizierten t-Verteilung mit einem in vorliegender Arbeit gewählten Signifikanzniveau von  $\alpha=5$  %, der Anzahl  $k$  der zu vergleichenden Mittelwerte und den Freiheitsgraden  $df$ .  $MS_{\text{Fehler}}$  ist die Fehlervarianz, welche anhand einer ANOVA-Tabelle bestimmt werden kann. Die Stichprobengröße  $n$  der einzelnen Gruppen kann dabei unterschiedlich sein, in diesem Fall wird hier ein Mittelwert gewählt.

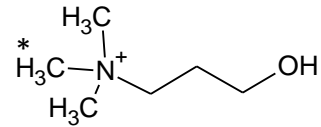


## 2.2 Material

### 2.2.1 Radioaktiv markierte Substanzen

#### [<sup>3</sup>H]Cholin

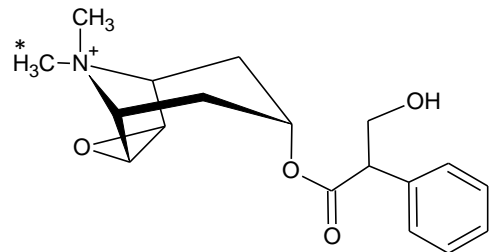
\* markiert die tritiierte Methylgruppe  
spez. Aktivität chargenabhängig ca. 75 Ci/mmol  
Lieferung als [<sup>3</sup>H]Cholinchlorid  
Artikelnummer/Hersteller:  
NET109001MC/PerkinElmer



Eigenschaften: Cholin ist Vorstufe und Abbauprodukt des Neurotransmitters Acetylcholin und kann durch Cholin-Transporter aktiv in cholinerge Nervenzellen aufgenommen werden.

#### [<sup>3</sup>H]N-Methylscopolamin ([<sup>3</sup>H]NMS)

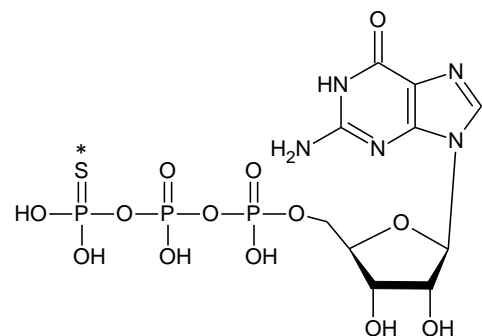
\* markiert die tritiierte Methylgruppe  
spez. Aktivität chargenabhängig ca. 85 Ci/mmol  
Lieferung als [<sup>3</sup>H]N-Methylscopolaminbromid  
Artikelnummer/Hersteller:  
NET636001MC/PerkinElmer



Eigenschaften: NMS ist ein inverser Agonist an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren.

#### [<sup>35</sup>S]GTPγS

\* markiert das radioaktive <sup>35</sup>S-Atom  
spez. Aktivität von 1250 Ci/mmol  
Artikelnummer/Hersteller:  
NEG030H250UC/PerkinElmer



Eigenschaften: Durch den Ersatz des Sauerstoffatoms durch ein Schwefelatom im dritten Phosphatrest des Guanosintriphosphats (GTP) entsteht ein Derivat, welches an G-Proteine binden kann, jedoch keiner Spaltung durch die GTPase-Aktivität unterliegt.

## 2.2.2 Orthosterische mAChR-Liganden

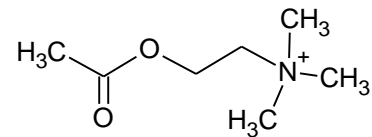
### Acetylcholin (ACh)

M=273,11 g/mol

Lieferung als Acetylcholiniodid

Artikelnummer/Hersteller:

A7000/Sigma



Eigenschaften: Acetylcholin ist der endogene Ligand muskarinischer sowie nicotinischer Acetylcholin-Rezeptoren.

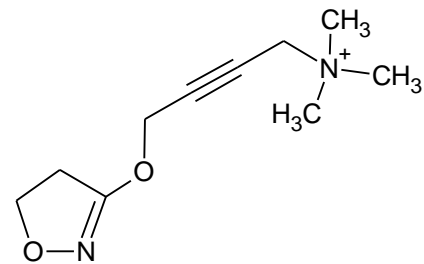
### Iperoxo (IPX)

M=324,16 g/mol

Lieferung als Iperoxoiodid

Hersteller:

AK Holzgrabe, Universität Würzburg, Deutschland  
(auch kommerziell erhältlich)



Eigenschaften: Iperoxo ist ein hochpotenter Agonist an muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren und ermöglichte z.B. die Kristallisierung des M<sub>2</sub>-Rezeptors in aktiver Konformation (Haga et al., 2012).

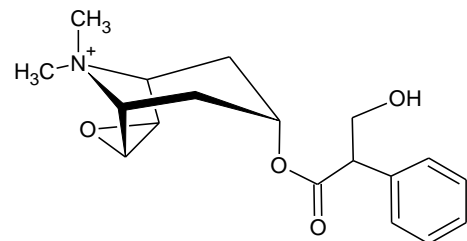
### N-Methylscopolamin (NMS)

M=398,3 g/mol

Lieferung als N-Methylscopolaminbromid

Artikelnummer/Hersteller:

S8502/Sigma



Eigenschaften: NMS ist ein inverser Agonist an muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren.

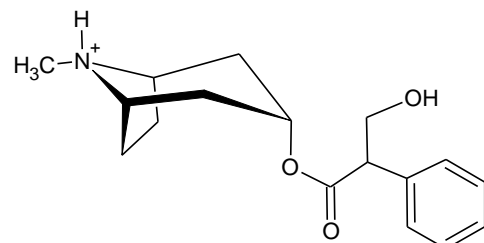
### Atropin (Atrp)

M=694,8 g/mol

Lieferung als Atropinsulfat

Artikelnummer/Hersteller:

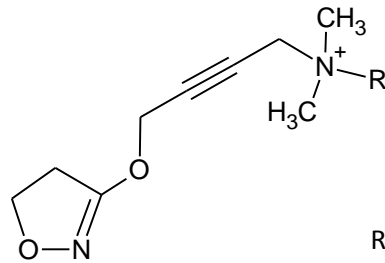
A0257/Sigma



Eigenschaften: Atropin ist ebenfalls ein inverser Agonist an muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren und wird medizinisch verwendet.

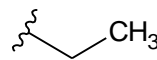
### 2.2.3 Molekulare Sonden (Testsubstanzen)

Ausgehend von der Muttersubstanz Iperoxo, wurden vom AK Prof. Holzgrabe (Universität Würzburg, Deutschland) n-Alkyl-Derivate synthetisiert und für vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt.



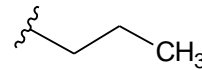
#### Ethyliperoxo (IP-C<sub>2</sub>)

M=291,18 g/mol (als Bromid)



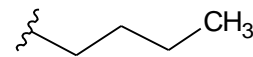
#### n-Propyliperoxo (IP-C<sub>3</sub>)

M=305,21 g/mol



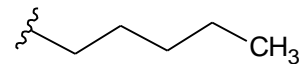
#### n-Butyliperoxo (IP-C<sub>4</sub>)

M=319,24 g/mol



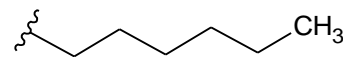
#### n-Pentyliperoxo (IP-C<sub>5</sub>)

M=333,26 g/mol



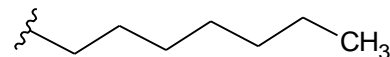
#### n-Hexyliperoxo (IP-C<sub>6</sub>)

M=347,29 g/mol



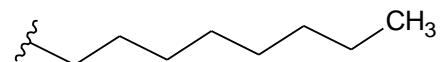
#### n-Heptyliperoxo (IP-C<sub>7</sub>)

M=361,32 g/mol



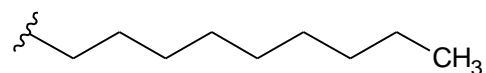
#### n-Octyliperoxo (IP-C<sub>8</sub>)

M=375,34 g/mol



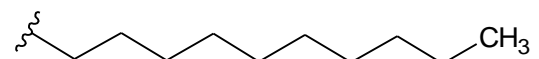
#### n-Nonyliperoxo (IP-C<sub>9</sub>)

M=389,17 g/mol



#### n-Decyliperoxo (IP-C<sub>10</sub>)

M=403,40 g/mol



## 2.2.4 Chemikalien und Reagenzien

	Bezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
R1	Aqua destillata aus Elix-Wasseraufbereitungsanlage		Millipore
R2	Calciumchlorid	125747	Grüssing
R3	Carbogen		Linde Gas
R4	D(+)-Glukose-Monohydrat	1083422500	Merck
R5	Dimethylsulfoxid (DMSO), steril	D2438	Sigma
R6	1,4-Bis-(5-phenyloxazol-2-yl)-benzol (POPOP)		Paesel
R6a	2,5-Diphenyloxazol (PPO)		Zinsser Analytik
R7	Dulbecos phosphatgepufferte Kochsalz-lösung (DPBS)	P04-36500	PAN
R8	Emulsifier Safe™	6013389	PerkinElmer
R9	Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumdihydrat (Na <sub>2</sub> EDTA)	E1644-100G	Merck
R10	Ethylendiamintetraessigsäure-Maßlösung 0,1 M	20271	Grüssing
R11	Fetales Kälberserum	P30-3702	PAN
R12	Folin-Ciocalteus Phenolreagenz	1.09001.0500	Merck
R13	Forskolin	F6886	Sigma
R14	Guanosin-5'-diphosphat-Natrium (GDP)	G7127	Sigma
R15	Hank's balanced salt solution (HBSS)	14025050	Life
R16	Hemicholinium-3	H108-500MG	Sigma
R17	HEPES-Natriumsalz	A10401,0100	AppliChem
R18	HEPES-Pufferlösung 1 M	15630056	Life
R19	HEPES-Säure (4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ylethansulfonsäure)	A1069,0250	AppliChem
R20	Humanes Serumalbumin	A1653	Sigma
R21	3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX)	I5879	Sigma
R22	Kaliumchlorid	6781.3	Carl Roth
R23	Kaliumdihydrogenphosphat	1048731000	Merck
R24	Kaliumnatriumtartrat-Tetrahydrat	379833	Sigma
R25	Kupfer(II)sulfat-Pentahydrat	102790	Merck
R26	L(+)-Ascorbinsäure	1004680100	Merck
R27	L-Glutamin-Lösung 200 mM	G7513	Sigma
R28	Lumagel® Safe		Lumac LSC
R29	Magnesiumsulfat-Heptahydrat	1058861000	Merck
R30	Magnesiumchlorid-Hexahydrat	M2760	Sigma
R31	Natriumbutyrat	A11079	Alfa Aesar
R32	Natriumcarbonat wasserfrei	A3900,0500	AppliChem
R33	Natriumchlorid	1.06404.1000	Merck
R34	Natriumhydrogencarbonat	1063291000	Merck
R35	Natronlauge 1 M	35256	Fluka
R36	Natronlauge 0,1 M	35263	Fluka
R37	N-Ethylmaleimid (NEM)	E3876-5G	Sigma
R38	Nutrient Mixture F-12 Ham	N4888	Sigma
R39	Penicillin-Streptomycin-Lösung (10.000 U/ml Penicillin; 10mg/ml Streptomycin)	P0781	Sigma

R40	Pertussistoxin (PTX) 50 µg	BP0372	Biotrend
R41	Polyethylenimin-Lösung 50% in Wasser (m/v)	P3143	Fluka
R42	Soluene®350	6003038	PerkinElmer
R43	Toluol	1083274000	Merck
R44	Trypsin-EDTA-Lösung	T3924	Sigma

### 2.2.5 Lösungen

- L1 Albumin-Lösung 2 mg/ml**  
12,0 mg humanes Serumalbumin (R20) wurden in 6,0 ml HEPES-Puffer (L9) gelöst und am gleichen Tag verbraucht.
- L2 Arbeitslösung für die Proteinbestimmung nach Lowry**  
Zu 100 ml einer 2%igen Natriumcarbonatlösung in 0,1 N Natronlauge (2 g R31 in 100 ml R34) wurden je 1ml einer 2%igen Kaliumnatriumtartratlösung (1 g R24 in 50 ml R1) und einer 1%igen Kupfersulfatlösung (0,5 g R25 in 50ml R1) hinzugegeben.
- L3 cAMP-Puffer**  
Für jeden Versuchstag wurde die benötigte Menge frisch hergestellt, indem zum HBSS/HEPES-Puffer (L7) IBMX-Stammlösung hinzugegeben wurde, sodass eine Lösung mit einer IBMX-Konzentration von 1 mM entstand.
- L4 Folin-Ciocalteus Phenolreagenz (Arbeitsverdünnung)**  
Ein Teil Phenolreagenz (R12) wurde mit drei Teilen Aqua dest. (R1) verdünnt und lichtgeschützt bei Raumtemperatur aufbewahrt.
- L5 Forskolin-Stammlösung  $4 \times 10^{-2}$  M**  
Forskolin (R13,  $M=410,5$  g/mol) wurde eingewogen und in einem entsprechenden Volumen DMSO (R5) aufgenommen, sodass eine Lösung mit 40 mM entstand. Es wurden Aliquote zu 10 µl hergestellt und bei -20°C gelagert.
- L6 GDP-Stammlösung 10 mM**  
Für 1 ml Stammlösung wurden 4,65 mg des Feststoffs GDP (R14,  $M=605,34$  g/mol) mit 1,0 ml Aqua dest. (R1) gelöst, zu je 50 µl aliquotiert und bei -20°C bis zur Verwendung aufbewahrt.
- L7 HBSS/HEPES-Puffer**  
Aus einer 500ml-Flasche Hank's Balanced Salt Solution (R15) wurden 10 ml verworfen und durch 10 ml HEPES-Pufferlösung 1 M (R18) ersetzt. Somit betrug die HEPES-Endkonzentration 20 mM.
- L8 Hemicholinium-Stammlösung 10 mM**  
Ca. 150 mg Hemicholinium (R16,  $M=574,35$  g/mol) wurden eingewogen und in einem entsprechendem Volumen Aqua dest. (R1) gelöst, sodass eine 10 mM-Lösung entstand. Die Lagerung erfolgte bei 2-8°C.
- L9 HEPES-Puffer 12,5 mM**  
Für ein Volumen von 1000 ml wurden folgende Bestandteile eingewogen:

1,085 g HEPES-Natriumsalz (R17); 1,986 g HEPES-Säure (R19); 2,541 g Magnesiumchlorid-Hexahydrat (R29); 7,305 g Natriumchlorid (R33). Die Lösung wurde mit Natronlauge (R35) auf pH 7,4 eingestellt und bei 2-8°C gelagert.

**L10 HEPES-Stammlösung 200 mM**

Für 1000 ml Stammlösung wurden folgende Bestandteile eingewogen:  
17,35 g HEPES-Natriumsalz (R17); 31,77 g HEPES-Säure (R19).  
Die Lösung wurde mit Natronlauge (R35) auf pH 7,4 eingestellt und bei 2-8°C gelagert.

**L11 Homogenisationspuffer**

Für ein Volumen von 500 ml wurden 50 ml HEPES-Stammlösung (L10) mit 50 ml Natrium-EDTA-Lösung (R12) und 400 ml Aqua dest. (R1) gemischt. Der Puffer wurde bei 2-8°C gelagert.

**L12 IBMX-Stammlösung 0,2 M**

5-10 mg des Feststoffs IBMX (R21, M=222,24 g/mol) wurden eingewogen und in einem entsprechenden Volumen DMSO (R5) gelöst, sodass die Endkonzentration 0,2 mol/l betrug. Die Lösung wurde bis zur Wiederverwendung bei -20°C aufbewahrt.

**L13a/b Krebs-Henseleit-Lösung (KH) mit (a) 1,3 bzw. (b) 3,25 mM Ca<sup>2+</sup>**

In einem Volumen von 2 Litern waren folgende Bestandteile enthalten (Konzentrationen in mM):

NaCl (R33)	118	NaHCO <sub>3</sub> (R34)	25
CaCl <sub>2</sub> (R2)	1,3 bzw. 3,25	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (R23)	1,2
Glukose-Monohydrat (R4)	10	Ascorbinsäure (R26)	0,06
KCl (R22)	4,8	MgSO <sub>4</sub> -Heptahydrat (R29)	1,2
Na <sub>2</sub> EDTA (R9)	0,03		

Jeder Ansatz wurde bis zur völligen Klarheit der Lösung mit Carbogen (95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>, R3) begast, um einen physiologischen pH-Wert einzustellen.

**L14 Natriumbutyrat-Stammlösung 100 mM**

Für 100 ml wurden 1,101 g Natriumbutyrat (R31, M=110,09 g/mol) eingewogen und in 100 ml Aqua dest. (R1) gelöst. Die Lösung wurde bei 2-8°C aufbewahrt.

**L15 Nährmedium für (transfizierte) FlpIn<sup>TM</sup>-CHO-Zellen**

Einer Flasche (500 ml) der Nährgrundlage Nutrient Mixture F12 Ham (R38) wurden 50 ml fetales Kälberserum (R11), 5 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung (R39) und 6 ml L-Glutamin-Lösung (R27) zugesetzt.

**L16 Nährmedium mit Natriumbutyrat 5 mM**

Wie L15 doch mit zusätzlich 28 ml Natriumbutyrat-Lösung (L14), welche zuvor mithilfe eines Filters (V12) sterilfiltriert wurde.

**L17 NEM-Stammlösung 10 mM**

5-6 mg NEM (R37, M=125,13 g/mol) wurden eingewogen und mit einem entsprechenden Volumen Aqua dest. (R1) versetzt, sodass eine 10 mM-Lösung entstand. Diese wurde an jedem Versuchstag frisch hergestellt und danach verworfen.

**L18 Polyethylenimin-Lösung 0,1%**

1 g der 50%igen PEI-Lösung (R41) wurden zu 500 ml mit Aqua dest. (R1) aufgefüllt und bei 2-8°C aufbewahrt.

- L19 **PTX-Stammlösung 200.000 ng/ml**  
In das gelieferte Gefäß mit 50 µg PTX (R40) wurden 250 µl Aqua dest. (R1) gegeben und vorsichtig geschüttelt. Die Lagerung erfolgte in einem kleinen Reaktionsgefäß (V9) bei 2-8°C.
- L20 **Szintillationscocktail für aufgelöste Gewebestücke**  
In 2 L Toluol (R43) wurden 12 mg PPO (R7) und 0,2 mg POPOP (R6) gelöst. Die Lösung wurde lichtgeschützt bei Raumtemperatur aufbewahrt.
- L21 **Zentrifugationspuffer**  
50 ml HEPES-Stammlösung (L10) wurden mit 0,5 ml Na<sub>2</sub>EDTA-Lösung (R10) versetzt und mit Aqua dest. (R1) zu 500 ml aufgefüllt. Die Lagerung erfolgte bei 2-8°C.

### 2.2.6 Kommerzielle Analysesets („Assaykits“)

	Bezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
K1	HTRF <sup>®</sup> -cAMP-dynamic 2	62AM4PEC	Cisbio

Die Bestandteile des Analysesets wurden gemäß der Herstelleranweisung für das „Zwei-Schritte-Protokoll“ mit Aqua dest. rekonstituiert, anschließend aliquotiert und bis zum Gebrauch bei -20°C aufbewahrt.

### 2.2.7 Verbrauchsmaterialien

	Bezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
V1	Cellstar <sup>®</sup> cell culture dish 145x20 mm	639160	Greiner
V2	Cellstar <sup>®</sup> cell culture dish 100x20 mm	664160	Greiner
V3	Cellstar <sup>®</sup> tube 50 ml	227261	Greiner
V3a	Cryogenic Tubes, 1ml	5000-1012	Nalgene
V4	MultiLex <sup>™</sup> A	1450-441	PerkinElmer
V5	Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten (1,2 ml)	12114172 AB-0564	Fisher
V6	Mikrotiterplatte mit 384 Kavitäten (25 µl]	784080	Greiner
V7	Pony Vial 6 ml	6000592	PerkinElmer
V8	Printed Filtermat A	1450-421	PerkinElmer
V9	Reaction Tubes 1,5 ml	616201	Greiner
V10	Sample Bag for MicroBeta <sup>™</sup>	1450-432	PerkinElmer
V11	Szintillationsvial 20ml	73.662.500	Sarstedt
V12	Wathman <sup>™</sup> Filter Unit 0,2 µm	10462200	GE Healthcare
V13	Zellschaber	83.1830	Sarstedt

### 2.2.8 Geräte

	Bezeichnung	Hersteller
G1	1450-Microbeta <sup>®</sup> Trilux Liquid Scintillation & Luminescence Counter	PerkinElmer

G2	Ø 390 pH/Temp/mV/ISE Meter 51123	Beckman
G3	Avanti® J-20 XP Ultrazentrifuge Rotortypen: JA 25.50, JS 4.3, JS 5.3	Beckman
G4	Axiovert 25 Mikroskop	Zeiss
G5	Beckman Coulter LS-6500 SC	Beckman
G6	Beckman LS-6000-TA SC	Beckman
G7	Beckman LS-5000-TA Liquid Scintillation Counter	Beckman
G8	Dri-Block®DB2A	Techne
G9	Fraktionsammler LKB 2111 Multirac	Bromma
G10	Harvester 96® Mach III M, Tomtec, Nummer 963589 (automatisierte Filtration)	PerkinElmer
G11	Harvester 96® Mach III M, Tomtec, Nummer 990607010 (manuelle Filtration)	PerkinElmer
G12	Inkubationswasserbad GFL 1083	GFL
G13	Mithras LB 960	Berthold
G14	Neubauer Zählkammer	VWR
G15	Polytron Homogenisator pT 10-35	Kinematica
G16	Präzisionsküvetten 100-QS	Hellma
G17	Stimulator Typ 215/II	Hugo Sachs
G18	Superfusionsanlage mit Rollerpumpe	Werkstatt des Pharmakologischen Instituts, Universität Bonn, Eigenbau
G19	Thermostat Typ MS	Lauda
G20	Ultrospec 3300 pro	Biochrom
G21	Werkbank Herasafe HS 15, Klasse II	Heraeus

### 2.2.9 Computerprogramme

Bezeichnung	Hersteller
ChemSketch®	ACD/Labs
GraphPad Prism® 5.01	GraphPad
Microsoft® Office Excel	Microsoft
Microsoft® Office PowerPoint	Microsoft

### 2.2.10 Herstellerverzeichnis

ACD/Labs	Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, Canada
Alfa Aesar	Alfa Aesar GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland
AppliChem	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Beckman	Beckman Coulter Incorporated, Fullerton, CA, USA
Berthold	Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Deutschland
Biochrom	Biochrom Ltd., Cambridge, UK
Biotrend	Biotrend Chemicals AG, Wangen, Zürich
Carl Roth	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Cisbio	Cisbio Bioassays, Codolet, Frankreich
Fisher	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland



Fluka	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
GE Healthcare	GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK
GFL	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
GraphPad	GraphPad Software Incorporated, San Diego, CA, USA
Greiner	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Grüssing	Grüssing GmbH, Filsum, Deutschland
Hellma	Hellma GmbH & Co. KG, Mühlheim, Deutschland
Heraeus	Heraeus, Hilden, Deutschland
Hugo Sachs	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
Kinematica	Kinematica AG, Littau, Schweiz
Lauda	Messgeräte-Werk Lauda, Lauda-Königshofen, Deutschland
Life	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Linde Gas	Linde Gas Therapeutics, Unterschleißheim, Deutschland
Lumac LSC	Lumac LSC B.V., Groningen, Niederlande
Merck	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Microsoft	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Millipore	Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland
Nalgene	Thermo Scientific Nalgene und Nunc, Rochester/NY, USA
Paesel	Paesel, Frankfurt, Deutschland
PAN	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
PerkinElmer	PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau, Germany PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA
Sarstedt	Sarstedt AG Co., Nümbrecht, Deutschland
Sigma	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim und Taufkirchen, Deutschland
Techne	Techne AG, Jahnsdorf, Deutschland
VWR	VWR International, Langenfeld, Deutschland
Wathman	Wathman GmbH, Dassel, Deutschland
Zeiss	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland
Zinsser	Zinsser Analytic, Frankfurt, Deutschland

### 3 Ergebnisse

Der Ergebnisteil gliedert sich in fünf Abschnitte. Zunächst erfolgt die funktionelle Charakterisierung der Testsonden anhand eines rekombinanten Zellsystems (Kapitel 3.1). Anschließend werden die Bindungseigenschaften der Substanzen behandelt (3.2). Die Daten dieser beiden Ergebnisteile dienen im dritten Abschnitt zur Berechnung von Bias-Faktoren (3.3). Als Viertes werden die Bias-Faktoren ausgewählter Testsubstanzen auf Grundlage eines alternativen Testsystems berechnet (3.4). Im letzten Teil wird das Verhalten der Muttersubstanz Iperoxo in einem *ex-vivo* Model näher untersucht (3.5).

#### 3.1 Funktionelle Charakterisierung der molekularen Testsonden

Die grundlegende Frage dieser Arbeit war, ob die zwei  $G_{i/o}$ -gekoppelten muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren,  $M_2$  und  $M_4$ , sich hinsichtlich der Aktivierung eines alternativen Signalweges unterscheiden. Im Organismus würde dies die Möglichkeit eröffnen, im gleichen Gewebe teilweise unterschiedliche oder auch gegenläufige Signale zu induzieren. Da der Organismus sehr komplex ist, sollten mögliche Unterschiede hinsichtlich der Signalwegsaktivierung zunächst in einfacheren Systemen auf funktioneller Ebene untersucht werden.

Um sicher zu gehen, dass gemessene Signale ausschließlich auf einen Rezeptorsubtyp zurückzuführen sind, wurden FlpIn<sup>TM</sup>-CHO-Zellen zur Expression von  $M_2$  bzw.  $M_4$  gewählt, da diese endogen keine muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren exprimieren (siehe Abschnitt 2.1.1.1). Neben der präferentiellen Aktivierung von  $G_{i/o}$ -Proteinen, wurde auch die Stimulation von  $G_s$ -Proteinen untersucht, da dadurch gegenläufige Mechanismen am Effektorenzym Adenylatcyclase ausgelöst werden.

##### 3.1.1 Aktivierung des präferentiellen Signalwegs ( $G_i$ ) durch den $M_4$ -Rezeptor

Zunächst sollten die als molekulare Sonden dienenden Testsubstanzen, Iperoxo und seine *N*-alkylierten Derivate, auf Aktivierung des  $M_4$ -Rezeptors hin untersucht und anhand von Daten, die zu dem Zeitpunkt bereits vorhanden waren, mit dem  $M_2$ -Rezeptor verglichen werden.

Die Aktivierung von G-Proteinen ist die direkte Folge einer Rezeptoraktivierung durch einen agonistisch wirkenden Liganden und kann anhand der Messung der [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung an die  $G\alpha$ -Untereinheit bestimmt werden. Wie im Methodenteil erläutert (Abschnitt 2.1.2.1), wird unter den hier gewählten Versuchsbedingungen ausschließlich die Aktivierung von  $G_{i/o}\alpha$ -Proteinen erfasst.

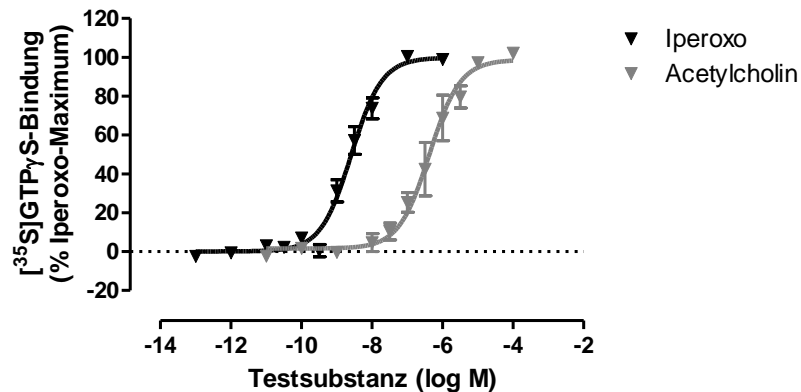
Für diese funktionelle Untersuchung wurden Membranhomogenate aus Flp-In<sup>TM</sup> $M_4$ -CHO-Zellen verwendet, deren Charakteristika ( $K_D$  und  $B_{max}$ ) in Tab. 6.1 im Anhang aufgeführt sind. Eine hohe Konzentration des inversen Agonisten Atropin diente an jedem Versuchstag der Identifizierung einer möglichen Spontanaktivität der Rezeptoren.

Im Folgenden beruht die graphische Darstellung der Ergebnisse auf den normierten und zusammengeführten Mittelwerten der Einzelexperimente. Die Kenngrößen der [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung, Wirksamkeit und Maximaleffekt, sind tabellarisch mit Standardfehler dargestellt.

### 3.1.1.1 Auswahl von Iperoxo als Referenzsubstanz

Zu Beginn wurde Iperoxo, als Ausgangsverbindung zur Generierung der molekularen Testsonden, mit Acetylcholin, dem endogenen Liganden muskarinischer Rezeptoren, verglichen. Dies diente zum einen der Überprüfung des eigenen experimentellen Arbeitens sowie der Etablierung der Ausgangsverbindung Iperoxo als Referenzsubstanz für die vorliegende Arbeit.

Endogene Liganden werden allgemein als Vollagonisten definiert. Substanzen, die unter den gleichen Bedingungen eine gleichhohe Signalantwort wie Acetylcholin hervorrufen, sind ebenfalls Vollagonisten am entsprechenden Rezeptor.



**Abb. 3.1** Vollagonist-induzierte [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung an Flp-In<sup>TM</sup>hM<sub>4</sub>-CHO-Membranhomogenat. Ordinate: Prozentuale [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung normiert auf den Basalwert und das obere Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve von Iperoxo. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Agonist-Konzentration. Kurvenanpassung: Vier-Parameter-logistische Gleichung (Gleichung 15) mit konstantem Hill-Koeffizient n<sub>H</sub>=1, da die freilaufende Kurvensteilheit nicht signifikant von 1 abwich (F-Test, p>0,05). Datenpunkte: Mittelwerte ± Standardfehler aus je 3 Experimenten, jeweils in Vierfachbestimmung. Eine konstitutive Rezeptoraktivität wurde an keinem Versuchstag detektiert.

Testsubstanz an M <sub>4</sub>	pEC <sub>50</sub>	E <sub>max</sub> (% IPX)	n
Iperoxo	***8,58 ± 0,06	100 ± 3	3
Acetylcholin	6,37 ± 0,10	99 ± 4	3

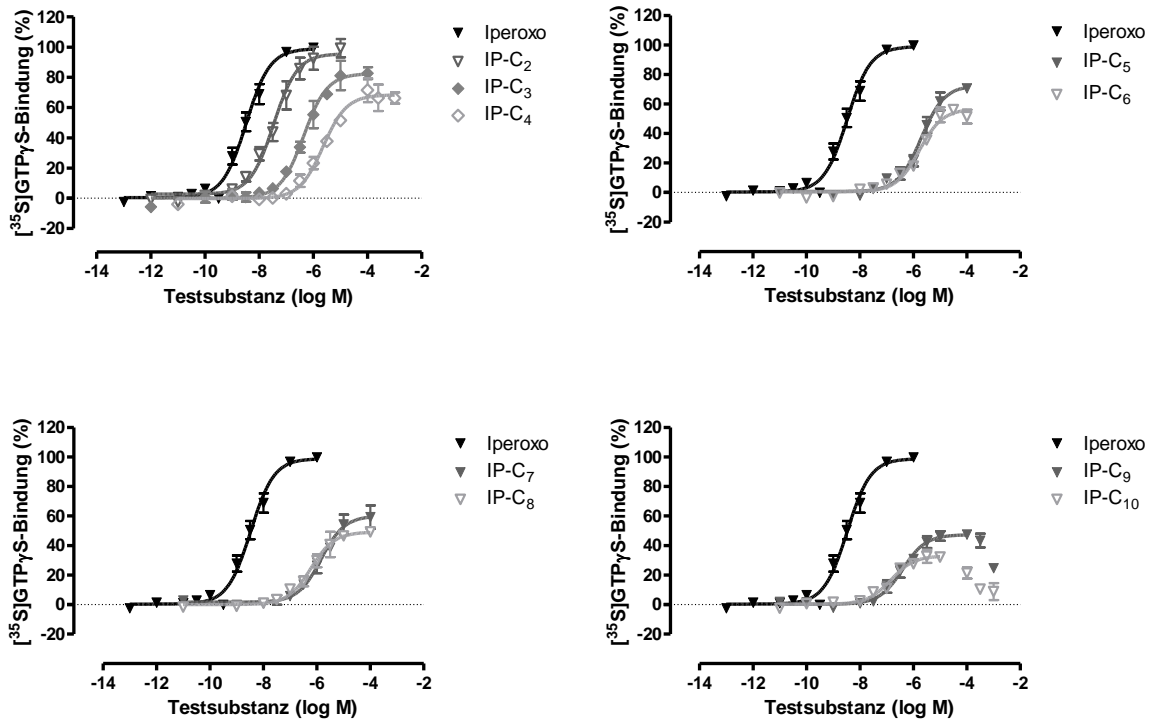
**Tab. 3.1** Kenngrößen ± Standardfehler der Agonist-induzierten [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung an Flp-In<sup>TM</sup>hM<sub>4</sub>-CHO-Membranhomogenat. pEC<sub>50</sub>: negativer dekadischer Logarithmus der molaren Testsubstanz-Konzentration beim halbmaximalen Effekt. E<sub>max</sub>: Maximaleffekt der Testsubstanz entsprechend dem oberem Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve von Iperoxo (IPX). n: Anzahl der Einzelexperimente. In jedem Einzelexperiment war der Hill-Koeffizient n<sub>H</sub> nicht signifikant verschieden von 1 (F-Test, p>0,05). \*\*\* signifikant unterschiedlich zu Acetylcholin (t-Test, p<0,0001).

Die jeweils parallel durchgeführten Versuche zeigten eine identische maximale [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung für Acetylcholin und Iperoxo, was ebenso durch N. Janßen (Dissertationsschrift 2011) beschrieben worden war. Die um 2,21 Dekaden signifikant höhere Wirksamkeit von Iperoxo gegenüber Acetylcholin liegt im Bereich der in vorgenannter Dissertationsschrift gefundenen Linksverschiebung der Konzentration-Effekt-Kurve von Iperoxo um 2,09 Dekaden. Eine um 2,40 Dekaden höhere Wirksamkeit von Iperoxo im Vergleich zu Acetylcholin bei gleichem Maximaleffekt ist ebenfalls für den M<sub>2</sub>-Rezeptor bekannt (Schrage et al., 2013).

Eine Iperoxo-Konzentration von 1 μM induzierte somit eine maximale [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung am M<sub>4</sub>-Rezeptor. Diese Konzentration wurde im Folgenden zur Normierung auf die maximal mögliche Systemantwort verwendet.

### 3.1.1.2 Die Verlängerung des n-Alkylsubstituenten beeinflusste die Kenngrößen Wirkung und Maximaleffekt

Die funktionelle Charakterisierung der molekularen Testsonden erfolgte mit 1  $\mu\text{M}$  Iperoxo als Referenzwert für die maximal-induzierbare [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma\text{S}$ -Bindung. Die Konzentrations-Effekt-Kurve für Iperoxo ist zum besseren visuellen Vergleich in jedem Graphen dargestellt.



**Abb. 3.2 Iperoxo-induzierte [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma\text{S}$ -Bindung im Vergleich zu seinen N-alkylierten Derivaten an Flp-In<sup>TM</sup>hM<sub>4</sub>-CHO-Membranhomogenat.** Ordinate: Prozentuale [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma\text{S}$ -Bindung normiert auf den Maximaleffekt von Iperoxo (1  $\mu\text{M}$ ) als 100% und die basale [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma\text{S}$ -Bindung ohne Ligand als 0%. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. Kurvenanpassung: Vier-Parameter-logistische Gleichung (Gleichung 15) mit konstantem Hill-Koeffizient  $n_H=1$ , da die freilaufende Kurvensteilheit nicht signifikant von 1 abwich (F-Test,  $p>0,05$ ). Supramaximale Konzentrationen der Substanzen IP-C<sub>9</sub> ( $\log M > -4$ ) und IP-C<sub>10</sub> ( $\log M > -5$ ) wurden dabei von der Datenanalyse ausgeschlossen. Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 3-5 unabhängigen Experimenten, jeweils in Vierfachbestimmung. Eine konstitutive Rezeptoraktivität wurde an keinem Versuchstag detektiert.

Testsubstanz an M <sub>4</sub>	pEC <sub>50</sub>	E <sub>max</sub> (% IPX 1 μM)	n
Iperoxo	8,65 ± 0,05	99 ± 3	10
IP-C <sub>2</sub>	7,46 ± 0,08	96 ± 4	5
IP-C <sub>3</sub>	6,35 ± 0,07	*83 ± 3	4
IP-C <sub>4</sub>	5,64 ± 0,08	*68 ± 3	5
IP-C <sub>5</sub>	5,71 ± 0,08	*73 ± 3	3
IP-C <sub>6</sub>	5,77 ± 0,08	*57 ± 2	3
IP-C <sub>7</sub>	5,84 ± 0,12	*60 ± 3	5
IP-C <sub>8</sub>	6,22 ± 0,09	*49 ± 2	5
IP-C <sub>9</sub>	6,41 ± 0,09	*47 ± 2	3
IP-C <sub>10</sub>	6,84 ± 0,13	*33 ± 2	3

**Tab. 3.2 Kenngrößen ± Standardfehler der [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung an Flp-In<sup>TM</sup> hM<sub>4</sub>-CHO-Membranhomogenat.** pEC<sub>50</sub>: negativer dekadischer Logarithmus der molaren Testsubstanz-Konzentration beim halbmaximalen Effekt. E<sub>max</sub>: Maximal-effekt der Testsubstanz normiert auf eine maximal-wirksame Konzentration von Iperoxo (IPX) von 1 μM als 100% und die basale [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung ohne Ligand als 0%. n: Anzahl der unabhängigen Einzelerperimente. Im jedem Einzelerperiment war der Hill-Koeffizient n<sub>H</sub> nicht signifikant verschieden von 1 (F-Test, p>0,05). \* signifikant unterschiedlich zu Iperoxo (ANOVA mit p<0,0001, Dunnett-post-Test mit p<0,05).

Eine Verlängerung der Alkylkette am quartären Stickstoff von Iperoxo hatte eine Abnahme der Wirksamkeit (pEC<sub>50</sub>) zur Folge. Mit einem Wirksamkeitsverlust von ca. drei Dekaden gegenüber Iperoxo war Butylperoxo (IP-C<sub>4</sub>) das am schwächsten wirksame Derivat innerhalb der Substanzreihe. Des Weiteren führte die Verlängerung des Alkyl-Substituenten ab -C<sub>3</sub> zu signifikant kleineren Maximaleffekten im Vergleich zur Ausgangssubstanz Iperoxo (ANOVA mit p<0,0001, Dunnett-post-Test mit p<0,05), sodass diese Derivate für die hier untersuchte G<sub>i/o</sub>-Proteinaktivierung als Partialagonisten zu bezeichnen sind.

Durch supramaximale Konzentrationen der Substanzen Nonylperoxo (IP-C<sub>9</sub>) und Decylperoxo (IP-C<sub>10</sub>) zeigte sich eine wieder absinkende [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung. Dies könnte durch einen unspezifischen, d.h. Rezeptor-unabhängigen Effekt, z.B. aufgrund der physikochemischen Eigenschaften dieser Testsubstanzen, verursacht worden sein, auf die in Abschnitt 3.1.3.3 nochmals näher eingegangen wird. Die entsprechenden Datenpunkte wurden bei der nicht-linearen Regressionsanalyse ausgeschlossen, um eine Verzerrung des maximal-induzierbaren Effektes zu umgehen.

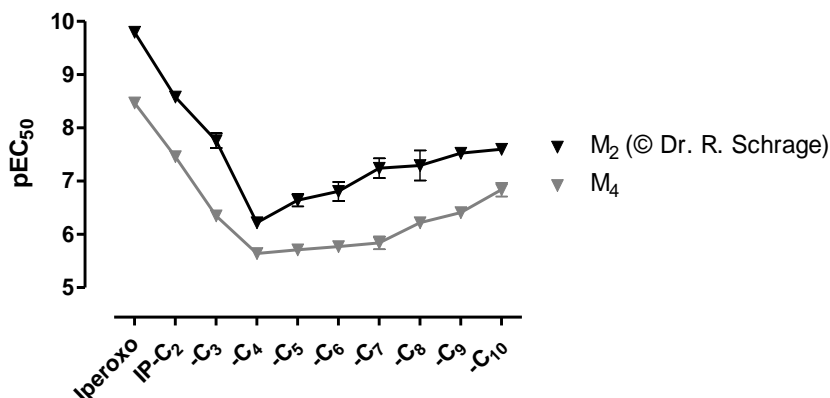
### 3.1.2 Vergleich der [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung an M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Membranhomogenaten

In diesem Abschnitt wird die zuvor dargestellte G<sub>i/o</sub>-Proteinaktivierung der molekularen Testsonden am M<sub>4</sub>-Rezeptor mit dem ebenfalls präferentiell G<sub>i</sub>-gekoppelten M<sub>2</sub>-Rezeptor verglichen. Die Messung der [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung an Membranhomogenaten aus Flp-In<sup>TM</sup>hM<sub>2</sub>-CHO-Zellen wurde von Dr. R. Schrage im Jahr 2011 (Arbeitskreis Prof. Mohr), wie im Methodenteil beschrieben, durchgeführt. Die Kenngrößen der [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung, pEC<sub>50</sub> und E<sub>max</sub>, wurden für den folgenden Vergleich zu Verfügung gestellt. Die auf den M<sub>2</sub>-Rezeptor bezogenen Daten für Iperoxo und seine Derivate IP-C<sub>3</sub> bzw. -C<sub>5</sub> wurden bereits veröffentlicht (Schrage et al., 2013).

An dieser Stelle sei noch darauf hingewiesen, dass für die Berechnung der Bias-Faktoren (siehe Kapitel 3.3) eigene [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindungsexperimente an Flp-In<sup>TM</sup>hM<sub>2</sub>-CHO-Membranhomogenaten mit Iperoxo und seinen *N*-Alkylderivaten bis -C<sub>8</sub> durchgeführt wurden. Da dies als Reproduktion der bereits vorhandenen Daten anzusehen ist (es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Kenngrößen der Konzentrations-Effekt-Kurven), sind die entsprechenden Ergebnisse im Anhang dieser Arbeit (Kapitel 6.4) zu finden.

#### 3.1.2.1 Die *N*-Alkylderivate zeigten eine höhere Wirksamkeit am M<sub>2</sub>-Rezeptor

In Abb. 3.3 sind die Wirksamkeiten der molekularen Testsonden im [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindungsexperiment gegen die Alkylkettenlänge am Iperoxo-Grundgerüst aufgetragen.



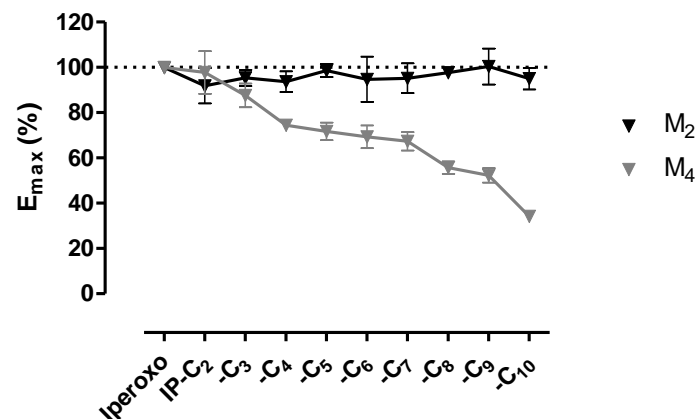
**Abb. 3.3 Vergleich der [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung am M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Rezeptor.** Verwendet wurden jeweils Membranhomogenate aus Flp-In<sup>TM</sup>-hM<sub>2</sub>- bzw. hM<sub>4</sub>-CHO-Zellen. Daten für den M<sub>2</sub>-Rezeptor wurden von Dr. R. Schrage erhoben (Schrage et al., 2013 und unveröffentlichte Daten Arbeitskreis Prof. Mohr, erhoben im Jahr 2011) und zur Verfügung gestellt. Daten für den M<sub>4</sub>-Rezeptor sind aus Tab. 3.2 entnommen. *Ordinate*: negativer dekadischer Logarithmus der molaren Testsubstanz-Konzentration beim halbmaximalen Effekt. *Abszisse*: Alkylkettenverlängerung am quartären Stickstoff des Iperoxo-Grundgerüsts. *Datenpunkte*: Mittelwerte ± Standardfehler aus 3-12 (M<sub>2</sub>) bzw. 3-6 (M<sub>4</sub>) Versuchen.

Die systematische Verlängerung der *n*-Alkylkette am Iperoxo-Grundbaustein hatte an beiden Rezeptorsubtypen einen gleichartigen Einfluss auf die Veränderung der Wirksamkeit. Im Durchschnitt wiesen die molekularen Sonden jedoch eine um 1,06 Dekaden geringere Wirksamkeit am M<sub>4</sub>-Rezeptor auf. Für Butyliperoxo (IP-C<sub>4</sub>) wurde mit 0,58 Dekaden der kleinste Wirksamkeitsunterschied zwischen M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Rezeptoren festgestellt, welcher jedoch statistisch signifikant war (6,22 ± 0,10 vs. 5,64 ± 0,08; t-Test, p<0,01).

### 3.1.2.2 Die Verlängerung des Alkyl-Substituenten hat keinen Einfluss auf die intrinsische Aktivität am M<sub>2</sub>-Rezeptor

Ein Vergleich der auf Iperoxo normierten Maximaleffekte der molekularen Testsonden zeigte eine starke Diskrepanz zwischen M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Rezeptor. Während, wie in Tab. 3.2 aufgeführt, die Maximaleffekte am M<sub>4</sub>-Subtyp mit Verlängerung des Alkyl-Substituenten abnahmen, so zeigten die durch Dr. R. Schrage am M<sub>2</sub>-Subtyp gewonnenen Daten (Schrage et al., 2013 und unveröffentlichte Daten Arbeitskreis Prof. Mohr, erhoben im Jahr 2011) eine gleichbleibende maximale [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung auf Iperoxo-Niveau (siehe Abb. 6.6 im Anhang).

Um diesen Tatbestand unter gleichen Versuchsbedingungen zu überprüfen und dabei eine Zersetzung der Substanzen auszuschließen, wurde die maximale [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung jeder molekularen Testsonde parallel an Membranhomogenaten aus Flp-In<sup>TM</sup>-hM<sub>2</sub>- bzw. -hM<sub>4</sub>-CHO-Zellen gemessen. Dafür wurde für jede Substanz eine Konzentration aus dem oberen Plateau der [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindungskurven (vgl. Abb. 3.2) eingesetzt und anschließend der gemessene Effekt auf die maximal-effektive Iperoxo-Konzentration von 1 μM am jeweiligen Rezeptorsubtyp normiert. Zur Kontrolle der maximalen Systemantwort wurde ebenso der endogene Agonist Acetylcholin mitgeführt. Der inverse Agonist Atropin diente dem Erkennen einer konstitutiven Rezeptoraktivität. Diese konnte für jeden Einzelversuch ausgeschlossen werden, da kein Unterschied zum Basalwert bestand (t-Test, p>0,05). In Abb. 3.4 und Tab. 3.3 sind die Ergebnisse aus je vier unabhängigen Experimenten zusammengefasst.



**Abb. 3.4** Maximal-induzierte [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung an M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Rezeptoren. Verwendet wurden jeweils Membranhomogenate aus Flp-In<sup>TM</sup>-hM<sub>2</sub>- bzw. hM<sub>4</sub>-CHO-Zellen. *Ordinate*: maximal induzierte [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung normiert auf die basale [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung ohne Ligand als 0% und die maximal-effektive Iperoxo-Konzentration von 1 μM als 100%. *Abszisse*: Alkylkettenverlängerung am Iperoxo-Grundgerüst. *Datenpunkte*: Mittelwerte ± Standardfehler aus vier unabhängigen Experimenten. Eine konstitutive Rezeptoraktivität lag nicht vor.

Testsubstanz	$E_{max}$ (% IPX 1 $\mu$ M)		eingesetzte Konzentration ( $\mu$ M)
	$M_2$	$M_4$	
Acetylcholin	99 $\pm$ 9	96 $\pm$ 5	100
Iperoxo	100	100	1
IP-C2	92 $\pm$ 8	98 $\pm$ 9	10
IP-C3	95 $\pm$ 4	88 $\pm$ 5	100
IP-C4	94 $\pm$ 5	*74 $\pm$ 3	100
IP-C5	99 $\pm$ 3	*72 $\pm$ 4	100
IP-C6	95 $\pm$ 10	*69 $\pm$ 5	100
IP-C7	95 $\pm$ 7	*67 $\pm$ 4	100
IP-C8	98 $\pm$ 2	*56 $\pm$ 3	100
IP-C9	100 $\pm$ 8	*52 $\pm$ 3	100
IP-C10	95 $\pm$ 5	*34 $\pm$ 1	100

**Tab. 3.3** Maximal-induzierte [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S-Bindung  $\pm$  Standardfehler aus **Abb. 3.4**.  $E_{max}$ : maximal induzierte [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S-Bindung normiert auf basale [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S-Bindung ohne Ligand als 0% und die maximal-effektive Iperoxo-Konzentration (IPX) von 1  $\mu$ M als 100%. Die jeweils getestete Konzentration lag im oberen Plateau der [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S-Bindungskurve der Testsubstanz am  $M_4$ -Rezeptor und induzierte somit an beiden Rezeptorsubtypen einen maximalen Effekt. \* signifikant unterschiedlich zu Iperoxo (ANOVA mit  $p < 0,0001$ , Dunnett-*post*-Test mit  $p < 0,05$ ) sowie signifikant unterschiedlich zum jeweiligen  $E_{max}$ -Wert am  $M_2$ -Rezeptor (t-Test,  $p < 0,05$ ).

Wie im vorab durchgeführten Vergleich induzierten die molekularen Testsonden unter den gewählten Bedingungen am  $M_2$ -Rezeptor gleichhohe Maximaleffekte wie die Referenzsubstanz Iperoxo, während die Strukturveränderungen am Iperoxo-Grundgerüst zu einer deutlichen Abnahme der maximalen [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S-Bindung am  $M_4$ -Membranhomogenat führten. Wie erwartet zeigte auch die durch den endogenen Liganden Acetylcholin induzierte maximale [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S-Bindung an beiden Rezeptoren keinen signifikanten Unterschied zum Maximaleffekt von Iperoxo (siehe Tab. 3.3, t-Test,  $p > 0,05$ ).

Die hier anhand einer Konzentration gemessenen Maximaleffekte am  $M_2$ -Rezeptor unterschieden sich nicht signifikant von den durch Dr. R. Schrage (Arbeitskreis Prof. Mohr) bestimmten Werten (t-Test,  $p > 0,05$ ). Wie in Abschnitt 3.1.1.2 zeigten alle Iperoxo-Derivate ab einer Alkylkettenlänge von -C<sub>4</sub> am  $M_4$ -Rezeptor eine signifikant kleinere maximale [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S-Bindung in Vergleich zu Iperoxo (ANOVA mit  $p < 0,0001$ , anschließend Dunnett-*post*-Test mit  $p < 0,05$ ). Für diese Versuche wurden Membranhomogenate mit gleicher Rezeptordichte ( $B_{max}$ , Bestimmung mittels homologer Konkurrenz siehe Methode 2.1.3.3) verwendet ( $M_2$  mit  $2931 \pm 187$  vs.  $M_4$  mit  $3404 \pm 294$  fmol/mg nicht signifikant unterschiedlich; t-Test,  $p > 0,05$ ).

### 3.1.3 Aktivierung des alternativen Signalwegs ( $G_s$ ) durch $M_2$ - und $M_4$ -Rezeptoren

Zur Erfassung der alternativen  $G_s$ -Signalwegsaktivierung wurden stabil transfizierte Flp-In<sup>TM</sup>-h $M_2$ - bzw. -h $M_4$ -CHO-Zellen zunächst mit Pertussistoxin (PTX) vorbehandelt, um G-Proteine der  $G_{i/o}$ -Familie auszuschalten. Anschließend wurde das Ausmaß der Testsubstanz-induzierten  $G_s$ -Aktivierung anhand Messung des sekundären Botenstoffes cAMP bestimmt (siehe Methode 2.1.2.2). Die Versuchsdurchführung erfolgte stets parallel an Flp-In<sup>TM</sup>-h $M_2$  und -h $M_4$ -CHO-Zellen.

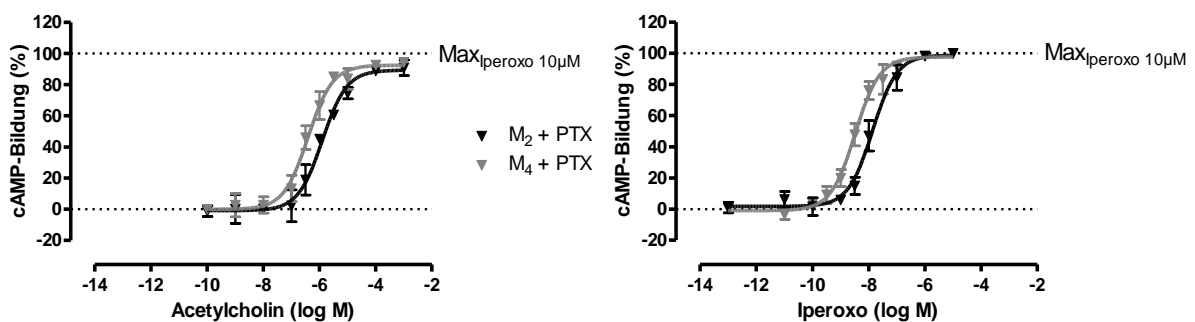
An jedem Versuchstag wurde der inverse Agonist Atropin in supramaximaler Konzentration mitgeführt, um eine konstitutive Rezeptoraktivität und eventuelle Auswirkungen auf die



Versuchsergebnisse zu detektieren. Des Weiteren wurde zur Positivkontrolle der Zellfunktion Forskolin als direkter Stimulator der Adenylatcyclase in einer Konzentration von 10  $\mu$ M eingesetzt. Im Folgenden beruht die graphische Darstellung der Ergebnisse auf den normierten und zusammengeführten Mittelwerten der Einzelexperimente. Die Kenngrößen der cAMP-Bildung, Wirksamkeit und Maximaleffekt, sind tabellarisch mit Standardfehler wiedergegeben.

### 3.1.3.1 Iperoxo zeigte eine stärkere Wirksamkeit am $M_4$ -Rezeptor

Analog zur funktionellen Untersuchung des präferentiellen  $G_{i/o}$ -Signalwegs, wurden zunächst die Konzentrations-Effekt-Beziehung des endogenen Liganden Acetylcholin und der Referenzsubstanz Iperoxo parallel untersucht.



**Abb. 3.5** Vollagonist-induzierte cAMP-Produktion in  $hM_2$ - bzw.  $hM_4$ -exprimierenden Flp-In<sup>TM</sup>-CHO-Zellen nach PTX-Vorbehandlung. Ordinate: prozentuale cAMP-Bildung normiert auf den Effekt von 10  $\mu$ M Iperoxo als 100% und den Basalwert ohne Agonist als 0%. Abszisse: dekadischer Logarithmus der molaren Testsubstanzkonzentration. Kurvenanpassung: Vier-Parameter-logistische Gleichung (Gleichung 15) mit konstantem Hill-Koeffizient  $n_H=1$ , da die freilaufende Kurvensteilheit nicht signifikant von 1 abwich (F-Test,  $p>0,05$ ). Datenpunkte: Mittelwert  $\pm$  Standardfehler aus 3-7 unabhängigen Experimenten, jeweils in Zweifachbestimmung. Das Ausmaß der Rezeptorspontanaktivität unterschied sich nicht zwischen den beiden Zell-Linien.

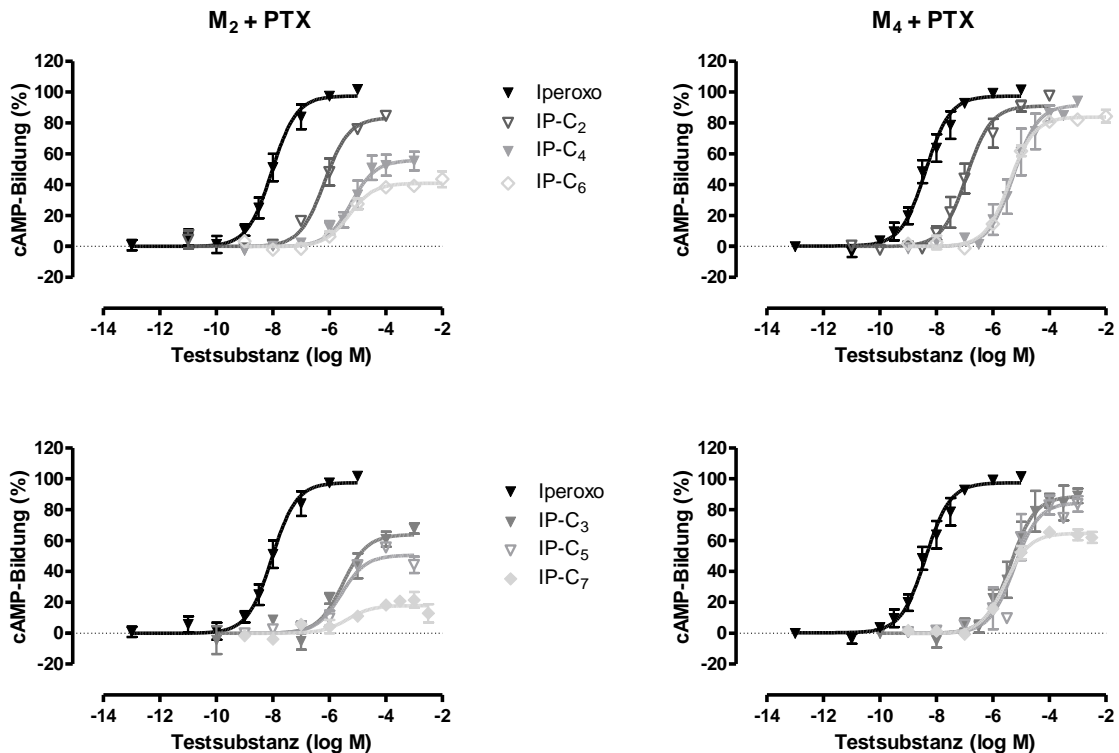
Zell-Linie + PTX	Acetylcholin			Iperoxo		
	pEC <sub>50</sub>	E <sub>max</sub> (% IPX 10 $\mu$ M)	n	pEC <sub>50</sub>	E <sub>max</sub> (% IPX 10 $\mu$ M)	n
M <sub>2</sub>	5,90 $\pm$ 0,13	89 $\pm$ 3	3	7,86 $\pm$ 0,10	99 $\pm$ 4	7
M <sub>4</sub>	*6,41 $\pm$ 0,09	92 $\pm$ 3	3	***8,48 $\pm$ 0,06	98 $\pm$ 2	7

**Tab. 3.4** Kenngrößen  $\pm$  Standardfehler der Vollagonist-induzierten cAMP-Bildung in  $hM_2$ - bzw.  $hM_4$ -exprimierenden Flp-In<sup>TM</sup>-CHO-Zellen nach PTX-Vorbehandlung. Die Angaben beruhen auf den Mittelwertskurven aus Abb. 3.5. pEC<sub>50</sub>: negativer dekadischer Logarithmus der molaren Testsubstanz-Konzentration beim halbmaximalen Effekt. E<sub>max</sub>: Maximaleffekt der Testsubstanz entsprechend dem oberen Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve nach Normierung auf 10  $\mu$ M Iperoxo als 100% und den jeweiligen Basalwert ohne Agonist als 0%. n: Anzahl der Einzelexperimente. \* bzw. \*\*\*signifikant unterschiedlich zum jeweiligem Wert in den M<sub>2</sub>-Zellen (t-Test,  $p<0,05$  bzw.  $p<0,001$ )

Beide Vollagonisten zeigten eine um 0,5-0,6 Dekaden höhere Wirksamkeit am  $M_4$ -Subtyp, welche jeweils signifikant unterschiedlich zur Wirksamkeit am  $M_2$ -Rezeptor war (t-Test,  $p<0,05$ ). Eine um 0,59 Dekaden höhere Wirksamkeit von Acetylcholin wurde auch von N. Janßen (Dissertationsschrift, 2011) beobachtet (M<sub>2</sub> mit 5,80  $\pm$  0,11 vs. M<sub>4</sub> mit 6,39  $\pm$  0,10). Die durch Acetylcholin maximal induzierbare cAMP-Bildung unterschied sich nicht vom Maximaleffekt der Referenzsubstanz Iperoxo (t-Test,  $p>0,05$ ).

### 3.1.3.2 Der $M_2$ -Rezeptor reagierte sensibler auf die Verlängerung des Alkylsubstituenten

In diesem Abschnitt werden die Iperoxo-Derivate mit einer Alkylkettenlänge bis -C<sub>7</sub> betrachtet. Die Konzentrations-Effekt-Kurven der molekularen Testsonden wurden jeweils auf den durch 10  $\mu$ M Iperoxo induzierten Maximaleffekt normiert.



**Abb. 3.6** Testsubstanz-induzierte cAMP-Produktion in  $hM_2$ - bzw.  $hM_4$ -exprimierenden Flp-In<sup>TM</sup>-CHO-Zellen nach PTX-Vorbehandlung. *Ordinate*: prozentuale cAMP-Bildung normiert auf den Effekt von 10  $\mu$ M Iperoxo als 100% und den Basalwert als 0%. *Abszisse*: dekadischer Logarithmus der molaren Testsubstanz-Konzentration. *Kurvenanpassung*: Vier-Parameter-logistische Gleichung (Gleichung 15) mit konstantem Hill-Koeffizient  $n_H=1$ , da die freilaufende Kurvensteilheit nicht signifikant von 1 abwich (F-Test,  $p>0,05$ ). *Datenpunkte*: Mittelwert  $\pm$  Standardfehler aus 3-8 unabhängigen Experimenten, jeweils in Zweifachbestimmung. Das Ausmaß der Rezeptorspontanaktivität war in den Einzelversuchen in beiden Zell-Linien nicht unterschiedlich.

Test-substanz	M <sub>2</sub> + PTX			M <sub>4</sub> + PTX		
	pEC <sub>50</sub>	E <sub>max</sub> (% IPX 10 μM)	n	pEC <sub>50</sub>	E <sub>max</sub> (% IPX 10 μM)	n
Iperoxo	7,99 ± 0,10	98 ± 4	7	**8,38 ± 0,08	97 ± 3	8
IP-C <sub>2</sub>	6,17 ± 0,10	83 ± 4	3	**6,93 ± 0,10	91 ± 3	5
IP-C <sub>3</sub>	5,53 ± 0,17	#64 ± 4	3	5,38 ± 0,10	89 ± 4	6
IP-C <sub>4</sub>	5,23 ± 0,14	#56 ± 4	5	5,27 ± 0,11	92 ± 5	6
IP-C <sub>5</sub>	5,58 ± 0,14	#51 ± 3	3	5,25 ± 0,15	85 ± 5	4
IP-C <sub>6</sub>	5,30 ± 0,11	#41 ± 2	3	5,40 ± 0,06	84 ± 2	3
IP-C <sub>7</sub>	5,36 ± 0,34	#18 ± 2	4	5,56 ± 0,09	#65 ± 2	3

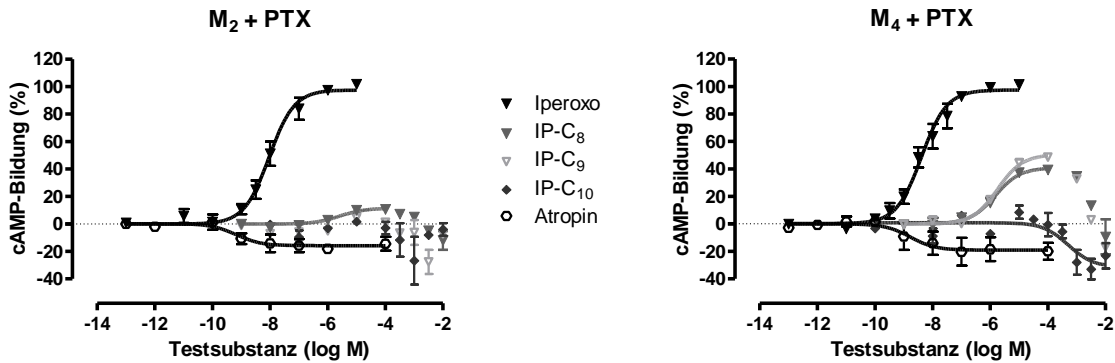
**Tab. 3.5** Kenngrößen ± Standardfehler der Testsubstanz-induzierten cAMP-Bildung in hM<sub>2</sub>- bzw. hM<sub>4</sub>-exprimierenden Flp-In<sup>TM</sup>-CHO-Zellen nach PTX-Vorbehandlung. Die Angaben beruhen auf den Mittelwertskurven aus Abb. 3.6. pEC<sub>50</sub>: negativer dekadischer Logarithmus der molaren Testsubstanz-Konzentration beim halbmaximalen Effekt. E<sub>max</sub>: Maximaleffekt der Testsubstanz entsprechend dem oberen Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve nach Normierung auf 10 μM Iperoxo (IPX) als 100% und den jeweiligen Basalwert als 0%. n: Anzahl unabhängiger Experimente. In jedem Einzelexperiment war der Hill-Koeffizient nicht signifikant verschieden von 1 (F-Test, p>0,05). \*\* signifikant unterschiedlich zum jeweiligen Wert der M<sub>2</sub>-Zell-Linie (t-Test, p<0,01) # signifikant unterschiedlich zu Iperoxo an der gleichen Zell-Linie (ANOVA mit p<0,0001 bei M<sub>2</sub> und p<0,001 bei M<sub>4</sub> und anschließendem Dunnett-post-Test mit p<0,05).

Ebenso wie die Ausgangssubstanz Iperoxo zeigte auch Ethyliperoxo (IP-C<sub>2</sub>) eine stärkere Wirksamkeit am M<sub>4</sub>-Rezeptor im Vergleich zu M<sub>2</sub> (t-Test, p<0,01). Die Verlängerung des Alkyl-Substituenten führte insgesamt jedoch zu einem Wirksamkeitsverlust an beiden Rezeptorsubtypen. Die Wirksamkeiten der Derivate mit C<sub>3</sub>- bis -C<sub>7</sub>-Rest stagnierten um den pEC<sub>50</sub>-Wert von 5,4 und zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Rezeptorsubtypen (t-Test, p>0,05).

Augenfällig ist jedoch die fortschreitende Abnahme der maximalen cAMP-Bildung in den M<sub>2</sub>-Zellen bei Verlängerung der Alkylkette (ab -C<sub>3</sub> statistisch signifikant, ANOVA mit p<0,0001 mit anschließendem Dunnett-post-Test mit p<0,05). Eine statistisch signifikante Abnahme des Maximaleffektes war am M<sub>4</sub>-Rezeptor hingegen erst mit dem n-Heptyl-Substituenten zu erkennen (ANOVA mit p<0,001 und Dunnett-post-Test, p<0,05).

### 3.1.3.3 Längerkettige Alkyl-Substituenten induzierten unspezifische Effekte

In diesem Abschnitt werden die Iperoxo-Derivate mit längerem Alkyl-Substituent (-C<sub>8</sub> bis -C<sub>10</sub>) behandelt. Diese Testsubstanzen wiesen eine spürbare „Seifenartigkeit“ in wässrigen Lösungen vor allem bei Konzentrationen über 10<sup>-3</sup> mol/L auf. Um einen möglichen Einfluss der physikochemischen Eigenschaften auf die cAMP-Bildung zu erfassen, wurden analog zu den [<sup>35</sup>S]GTPγS-Versuchen supramaximale Testsubstanzkonzentrationen eingesetzt. Zum Vergleich ist im Folgenden ebenfalls die Konzentrations-Effekt-Kurve von Iperoxo aus Abb. 3.6 dargestellt. Zusätzlich ist hier das Ausmaß der konstitutiven Rezeptoraktivität durch die Konzentrations-Effekt-Beziehung des inversen Agonisten Atropin wiedergegeben.



**Abb. 3.7** Testsubstanz-induzierte cAMP-Produktion in hM<sub>2</sub>- bzw. hM<sub>4</sub>-exprimierenden Flp-In<sup>TM</sup>-CHO-Zellen nach PTX-Vorbehandlung. *Ordinate*: prozentuale cAMP-Bildung normiert auf den Effekt von 10 µM Iperoxo als 100% und den Basalwert als 0%. *Abszisse*: dekadischer Logarithmus der molaren Testsubstanzkonzentration. *Kurvenanpassung*: Vier-Parameter-logistische Gleichung (Gleichung 15) mit konstantem Hill-Koeffizient  $n_H=1$  bei positiver bzw.  $n_H=-1$  bei rückläufiger cAMP-Bildung (Atropin und IP-C<sub>10</sub> an M<sub>4</sub>), da die freilaufende Kurvensteilheit nicht signifikant vom jeweiligen Wert abwich (F-Test,  $p>0,05$ ). Für die Datenauswertung der positiv gerichteten cAMP-Bildung wurden nur Konzentrationen bis  $10^{-4}$  M berücksichtigt. Am M<sub>2</sub>-Rezeptor konnte kein Einzelversuch mit *n*-Nonyl- und *n*-Decyliperoxo anhand Gleichung 15 analysiert werden. *Datenpunkte*: Mittelwert  $\pm$  Standardfehler aus 3-8 unabhängigen Experimenten, jeweils in Zweifachbestimmung.

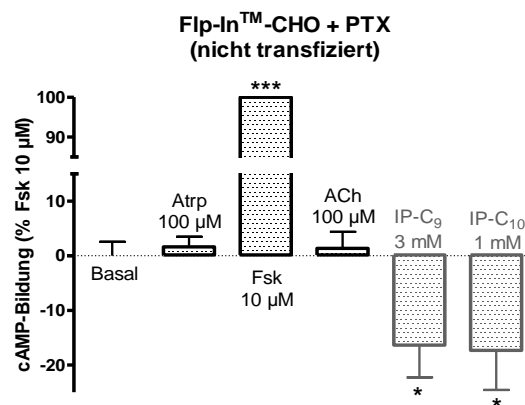
Test-substanz	M <sub>2</sub>			M <sub>4</sub>		
	pEC <sub>50</sub>	E <sub>max</sub> (% IPX 10 µM)	n	pEC <sub>50</sub>	E <sub>max</sub> (% IPX 10 µM)	n
Iperoxo	7,99 $\pm$ 0,10	98 $\pm$ 4	7	8,38 $\pm$ 0,08	97 $\pm$ 3	8
IP-C <sub>8</sub>	5,58 $\pm$ 0,34	12 $\pm$ 2	4	5,83 $\pm$ 0,12	41 $\pm$ 2	3
IP-C <sub>9</sub>		k. A.	3	5,75 $\pm$ 0,09	51 $\pm$ 2	3
IP-C <sub>10</sub>		k. A.	3	3,30 $\pm$ 0,43	-31 $\pm$ 7	4/5
Atropin	9,17 $\pm$ 0,48	-16 $\pm$ 2	4	8,77 $\pm$ 0,64	-19 $\pm$ 4	4/7

**Tab. 3.6** Kenngrößen  $\pm$  Standardfehler der Testsubstanz-induzierten cAMP-Bildung in hM<sub>2</sub>- bzw. hM<sub>4</sub>-exprimierenden Flp-In<sup>TM</sup>-CHO-Zellen nach PTX-Vorbehandlung. Die Angaben beruhen auf den Mittelwertskurven aus Abb. 3.7 pEC<sub>50</sub>: negativer dekadischer Logarithmus der molaren Testsubstanz-Konzentration beim halbmaximalen Effekt. E<sub>max</sub>: Maximaleffekt der Testsubstanz nach Normierung auf 10 µM Iperoxo (IPX) als 100% und den jeweiligen Basalwert als 0%. n: Anzahl unabhängiger Experimente. An der M<sub>4</sub>-Zell-Linie wurden für die Substanzen IP-C<sub>10</sub> und Atropin je 4 von 5 bzw. 7 Versuchen berücksichtigt, da eine Datenauswertung anhand der Vier-Parameter-logistischen Gleichung (Gleichung 15) mit  $n_H=-1$  nicht immer möglich war (Fehlen einer konstitutiven Rezeptoraktivität). k.A.: keine Angabe möglich, da kein Einzelversuch anhand der Vier-Parameter-logistischen Gleichung auswertbar war.

Durch *n*-Octyliperoxo konnte über den M<sub>2</sub>-Rezeptor noch eine schwache cAMP-Bildung induziert werden, welche bei einer Konzentration von  $10^{-4}$  mol/l ein Maximum erreichte, bei höheren Konzentrationen jedoch wieder absank. Ein deutlich höherer Maximaleffekt dieser Testsubstanz wurde an den M<sub>4</sub>-exprimierenden Zellen gemessen, doch auch hier wirkten sich Konzentrationen über  $10^{-4}$  Mol/L negativ aus. Für die Datenanalyse mit der Vier-Parameter-Logistischen Gleichung (Gleichung 15) wurden diese Messpunkte deshalb nicht berücksichtigt. Gleiches gilt für die Testsubstanz *n*-Nonyliperoxo, die sich am M<sub>4</sub>-Subtyp analog zu *n*-Octyliperoxo verhielt, während keine eindeutigen Daten am M<sub>2</sub>-Rezeptor gewonnen werden konnten, da keine Kurvenanpassung zu den Daten der Einzelerperimente anhand der Vier-Parameter-logistischen Gleichung möglich war. *N*-Decyliperoxo führte in Konzentrationen über  $10^{-4}$  Mol/L zu einer Unterschreitung der basalen cAMP-Bildung (Null-Linie), welche in den M<sub>4</sub>-exprimierenden Zellen in vier von fünf Einzelexperimenten durch Anwendung der Vier-Parameter-logistischen Gleichung mit festgelegtem Hill-Koeffizient ( $n_H=-1$ ) analysiert werden konnten. Die so erhaltenen Kenngrößen wiesen jedoch große Schwankungen auf (pEC<sub>50</sub> zwischen 6,22 bis 3,01; E<sub>max</sub> zwischen -37,1% bis -13,4%).

Um in diesem Zusammenhang zu überprüfen, ob eine Rezeptor-vermittelte, konzentrationsabhängige Hemmung der basalen cAMP-Bildung unter den gewählten Versuchsbedingungen grundsätzlich messbar ist, wurde der inverse Agonist Atropin in beiden Zell-Linien eingesetzt. Wie in Abb. 3.7 zu sehen, war eine konzentrationsabhängige Hemmung der Spontanaktivität durch Atropin in dem Versuchssystem messbar. Jedoch schien die konstitutive Rezeptoraktivität zu gering beziehungsweise nicht konstant gegeben zu sein, da nur in vier von sieben Versuchen an Flp-In<sup>TM</sup>-hM<sub>4</sub>-CHO-Zellen eine Datenanalyse möglich war. Zudem wiesen die Kenngrößen erhebliche Schwankungen zwischen den Einzelversuchen auf. Die pEC<sub>50</sub>-Werte der Mittelwertskurven aus Abb. 3.7 lagen hingegen in einem Konzentrationsbereich, der mit der Bindungsaffinität von Atropin an beide Rezeptorsubtypen korreliert (Angabe laut Datenbank IUPHAR: pK<sub>i</sub>(M<sub>2</sub>) = 7,8-9,2 und pK<sub>i</sub>(M<sub>4</sub>) = 8,7-9,5).

Trotz der scheinbar konzentrationsabhängigen Hemmung der cAMP-Produktion durch *n*-Decylperoxo in PTX-vorbehandelten Flp-In<sup>TM</sup>-hM<sub>4</sub>-CHO-Zellen, muss dies als unspezifischer Effekt gewertet werden, da auch in nicht-transfizierten Flp-In<sup>TM</sup>-CHO-Zellen eine rückläufige cAMP-Bildung bei Einsatz einer hohen Substanzkonzentration gemessen wurde, welche sich signifikant vom Basalwert unterschied (t-Test, p<0,05). Dies ist in folgender Abb. 3.8 dargestellt.



**Abb. 3.8 Testsubstanz-induzierte cAMP-Produktion in nicht-transfizierten Flp-In<sup>TM</sup>-CHO-Zellen nach PTX-Vorbehandlung.**  
*Ordinate:* cAMP-Bildung normiert auf den Effekt von 10 µM Forskolin als 100% und den Basalwert ohne Ligand als 0%.  
*Daten:* Mittelwert ± Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten, jeweils in Zweifachbestimmung. \* bzw. \*\*\* signifikant unterschiedlich zum Basalwert (t-Test, p<0,5 bzw. p<0,0001).

Zieht man einen toxischen Effekt der Substanzen mit längerem Alkyl-Substituenten in Betracht, so kann die Abnahme der basalen cAMP-Bildung damit begründet werden, dass die Funktionsfähigkeit der eingesetzten Zellen während der Inkubation mit der Testsubstanz eingeschränkt wurde und somit weniger cAMP durch spontane Rezeptor- bzw. Adenylatcyclase-Aktivität generiert werden konnte. Dies spiegelte sich in den Messdaten als scheinbar konzentrationsabhängiger Hemmeffekt von Decylperoxo (IP-C<sub>10</sub>) an Flp-In<sup>TM</sup>-hM<sub>4</sub>-CHO-Zellen wider.

## 3.2 Charakterisierung der Bindungseigenschaften der molekularen Testsonden

In diesem Abschnitt werden die Bindungseigenschaften der molekularen Sonden an Membranhomogenaten aus hM<sub>2</sub>- bzw. hM<sub>4</sub>-exprimierenden Flp-In<sup>TM</sup>-CHO-Zellen (kurz M<sub>2</sub>- bzw. M<sub>4</sub>-Membranhomogenat) anhand von Radioligand-Bindungsstudien beschrieben. Als Radioligand diente der muskarinische Antagonist [<sup>3</sup>H]N-Methylscopolamin ([<sup>3</sup>H]NMS).

Zunächst wurde die orthosterische Bindung von Iperoxo und der *n*-Alkyl-Derivate untersucht. Eine mögliche Bindung an die allosterische Bindungsstelle wurde mit zwei ausgewählten Derivaten getestet.

### 3.2.1 Messung der Affinität zum aktiven und inaktiven Rezeptor

Durch funktionelle Untersuchungen des präferentiellen Signalwegs war zuvor festgestellt worden, dass eine Verlängerung des *n*-Alkyl-Substituenten am Iperoxo-Grundgerüst zu einer Erniedrigung des Maximaleffekts am M<sub>4</sub>-Subtyp führte, während ein gleichbleibender Maximaleffekt auf Iperoxo-Niveau am M<sub>2</sub>-Rezeptor zu sehen war (siehe Abschnitt 3.1.1.2). Es stellte sich daher die Frage, ob das unterschiedliche Verhalten der molekularen Sonden mit dem Bindungsverhalten korreliert.

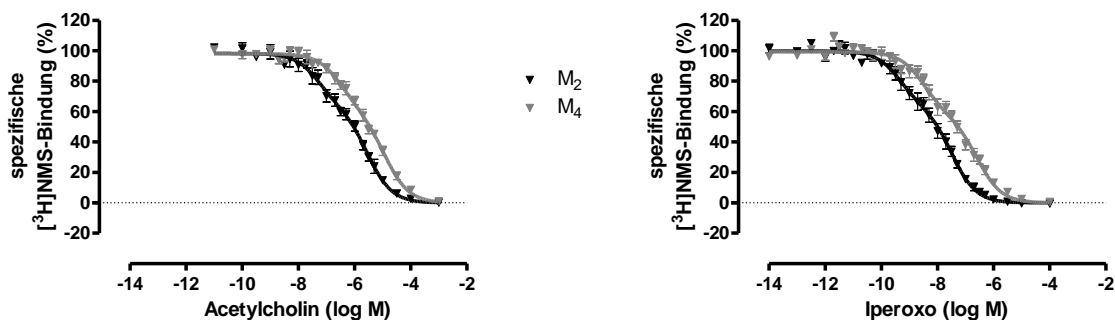
Da alle molekularen Sonden als Agonisten den G<sub>i/o</sub>-Signalweg aktivierten, wurde erwartet, dass sich die Datenpunkte aus heterologen Kompetitionsexperimenten mit [<sup>3</sup>H]NMS (Methode 2.1.3.5) anhand von Gleichung 10 biphasisch auswerten lassen würden. Diese Datenanalyse erlaubt es, die Affinität einer Testsubstanz an eine hochaffine Bindungsstelle, welche den Rezeptor in der aktiven Konformation mit gekoppelten G-Protein widerspiegelt, sowie an eine niedrigaffine Bindungsstelle (inaktive Rezeptorkonformation ohne Interaktion mit G-Protein) zu berechnen. Des Weiteren ermöglicht dieses Modell die Bestimmung der Fraktionsgröße der Rezeptoren im hoch- bzw. niedrigaffinen Zustand.

Im Folgenden wurde für jeden Einzelversuch mittels F-Test untersucht, ob eine biphasische oder monophasische Kurve nach Gleichungen 10 bzw. 15 zur Beschreibung der Daten besser geeignet war (siehe auch Erläuterung im Methodenabschnitt 2.1.3.5).

Die folgenden graphischen Darstellungen der Ergebnisse basieren auf den normierten und zusammengeführten Mittelwerten der Einzelerperimente. Die Mittelwerte der Bindungsparameter (pK<sub>i</sub>(hoch) und pK<sub>i</sub>(niedrig)) sowie der hochaffinen Fraktionsgrößen aus den Einzelerperimenten werden mit Standardfehler tabellarisch wiedergegeben.

#### 3.2.1.1 Acetylcholin und Iperoxo zeigten höhere Affinität zum M<sub>2</sub>- als zum M<sub>4</sub>-Rezeptor

Die Affinitäten des endogenen Liganden Acetylcholin und des Vollagonisten Iperoxo wurden jeweils parallel an M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Membranhomogenaten getestet. Bei allen durchgeführten Versuchen wurden die Datenpunkte besser durch das biphasische Modell (Gleichung 10) beschrieben.



**Abb. 3.9 Heterologe Konkurrenz zwischen  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  0,2nM und Acetylcholin bzw. Iperoxo an  $\text{M}_2$ - und  $\text{M}_4$ -Membranhomogenaten.** Ordinate: spezifische Bindung des Radioliganden  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  in Prozent nach Normierung auf die spezifische Radioligand-Bindung ohne Kompetitor als 100% und den theoretischen Wert Null als 0% (keine spezifische Bindung). Abszisse: dekadischer Logarithmus der molaren Kompetitor-Konzentration. Kurvenanpassung: biphasisches Bindungsmodell (Gleichung 10). Datenpunkte: Mittelwert  $\pm$  Standardfehler aus je sieben unabhängigen Experimenten, jeweils in Dreifachbestimmung.

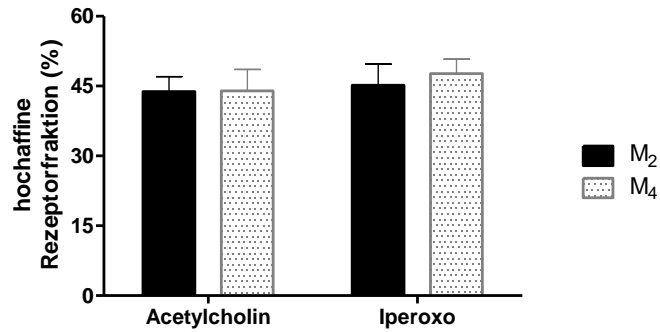
Test-substanz	$\text{M}_2$			$\text{M}_4$		
	$\text{pK}_i(\text{hoch})$	$\text{pK}_i(\text{niedrig})$	bi/mo	$\text{pK}_i(\text{hoch})$	$\text{pK}_i(\text{niedrig})$	bi/mo
Acetylchol.	$7,45 \pm 0,26$	$5,74 \pm 0,05$	7/0	$*6,74 \pm 0,13$	$***5,23 \pm 0,08$	7/0
Iperoxo	$9,50 \pm 0,17$	$7,58 \pm 0,06$	7/0	$*8,91 \pm 0,15$	$***6,89 \pm 0,11$	7/0

**Tab. 3.7 Bindungscharakteristika  $\pm$  Standardfehler von Acetylcholin und Iperoxo an  $\text{M}_2$ - und  $\text{M}_4$ -Membranhomogenat.**  $\text{pK}_i(\text{hoch})$  bzw.  $\text{pK}_i(\text{niedrig})$ : negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten zur hochaffinen bzw. niedrigaffinen Rezeptorfraktion. bi/mo: Anzahl der Einzelversuche, die sich laut F-Test mit  $p < 0,05$  besser anhand des biphasischen Modells (Gleichung 10) auswerten ließen im Vergleich zum monophasischen Modell (Vier-Parameterlogistische Gleichung mit  $n_H = -1$ , Gleichung 15). \* bzw. \*\*\* signifikant unterschiedlich zum entsprechendem Wert am  $\text{M}_2$ -Membranhomogenat (t-Test,  $p < 0,05$  bzw. 0,001).

Sowohl Acetylcholin als auch Iperoxo zeigten signifikant höhere Affinitäten ( $\text{pK}_i(\text{hoch})$  bzw. (niedrig)) zum  $\text{M}_2$ -Rezeptor im Vergleich zu  $\text{M}_4$  (t-Test,  $p < 0,05$ ). Die Affinitätsunterschiede lagen im Bereich von 0,5 bis 0,7 Dekaden und fielen somit geringer aus als durch D. Kaufel (Dissertationsschrift 2010) für Iperoxo angegeben ( $\Delta\text{pK}_{\text{app}}(\text{M}_2\text{-M}_4)$  von ca. 2,5 und 2,0 für die hoch- bzw. niedrigaffine Bindung). Allerdings konnten die Daten in der zitierten Dissertation trotz gleicher Versuchsbedingungen wie in vorliegender Arbeit überwiegend anhand des monophasischen Modells (Gleichung 15) beschrieben werden, wodurch sich die Unterschiede erklären ließen.

Ab beiden Subtypen wies Iperoxo im Vergleich zum endogenen Liganden eine um ca. 2 Dekaden höhere Affinität zur hochaffinen Rezeptorkonformation auf. Dies stimmt mit den Angaben zum  $\text{M}_2$ -Rezeptor von D. Kaufel (Dissertationsschrift 2010) überein.

Für die eingesetzten  $\text{M}_2$ - und  $\text{M}_4$ -Membranhomogenate konnten in vorliegender Arbeit gleichgroße hochaffine Rezeptorfraktionen von circa 45 % der Gesamtpopulation durch den Einsatz der beiden Vollagonisten festgestellt werden, wie in Abb. 3.10 dargestellt.

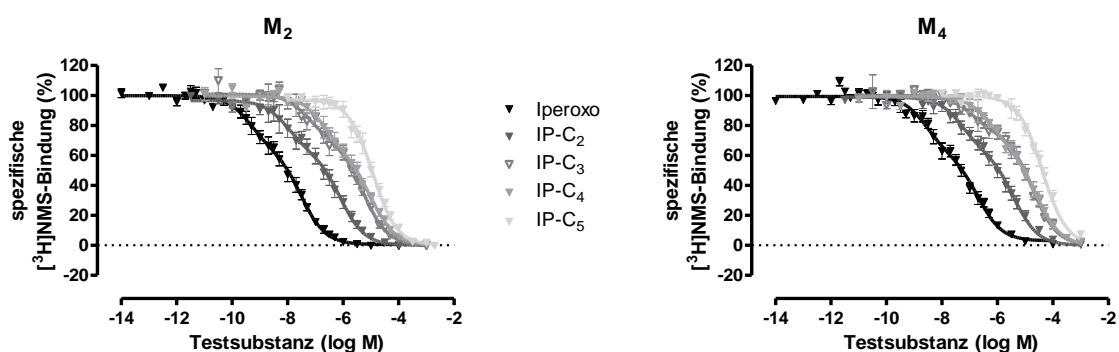


**Abb. 3.10** Größe der hochaffinen Rezeptorfraktion in M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Membranhomogenaten bei Einsatz der Vollagonisten Acetylcholin und Iperoxo. Ordinate: Anteil der Rezeptoren im hochaffinen Zustand an der Rezeptor-Gesamtpopulation. Die Angaben beruhen auf den heterologen Wettbewerbsversuchen aus Abb. 3.9. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler aus je sieben unabhängigen Einzelversuchen, die mit dem biphasischen Modell (Gleichung 10) ausgewertet wurden.

### 3.2.1.2 Eine Verlängerung des Alkyl-Substituenten bis -C<sub>5</sub> am Iperoxo-Grundgerüst ließ die Bindungsaffinität sinken

Radioligand-Bindungsstudien mit den molekularen Testsonden wurden parallel an M<sub>2</sub> und M<sub>4</sub>-Membranhomogenaten durchgeführt. Die erhaltenen Daten ließen sich mithilfe des biphasischen Bindungsmodells (Gleichung 10) auswerten. Jedoch wurden auch vereinzelt Datensätze erhalten, die sich nur durch einen monophasischen Kurvenverlauf (Gleichung 15) mit einem Hill-Koeffizienten von  $n_H = -1$  beschreiben ließen (siehe Angaben in Tab. 3.8). Diese Datensätze wurden jedoch von der folgenden Darstellung in Abb. 3.11 und der Berechnung der Kenngrößen ausgeschlossen, um eine Verzerrung der Ergebnisse zu vermeiden. Eine Ausnahme stellte das Derivat *n*-Pentyliperoxo dar, da keiner der Versuche mit dieser Substanz anhand des biphasischen Modells ausgewertet werden konnte.

Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Daten der Ausgangssubstanz Iperoxo aus Abb. 3.9 hier nochmal dargestellt.



**Abb. 3.11** Heterologe Konkurrenz zwischen [<sup>3</sup>H]NMS 0,2nM und den molekularen Testsonden (IP-C<sub>2</sub> bis IP-C<sub>5</sub>) an M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Membranhomogenaten. Ordinate: spezifische Bindung des Radioliganden [<sup>3</sup>H]NMS in Prozent nach Normierung auf die spezifische Bindung ohne Kompetitor als 100% und den theoretischen Wert Null als 0% (keine spezifische Bindung). Abszisse: dekadischer Logarithmus der molaren Kompetitor-Konzentration. Kurvenanpassung: biphasisches Bindungsmodell (Gleichung 10) mit Ausnahme von IP-C<sub>5</sub>, hier erfolgte die Datenanalyse mit der Vier-Parameter-logistischen Gleichung (Gleichung 15) mit einer Steilheit von  $n_H = -1$ . Datenpunkte: Mittelwert ± Standardfehler aus 4 bis 7 unabhängigen Experimenten, jeweils in Dreifachbestimmung.



Test-substanz	M <sub>2</sub>			M <sub>4</sub>		
	pK <sub>i</sub> (hoch)	pK <sub>i</sub> (niedrig)	bi/mo	pK <sub>i</sub> (hoch)	pK <sub>i</sub> (niedrig)	bi/mo
Iperoxo	9,50 ± 0,17	7,58 ± 0,06	7/0	*8,91 ± 0,15	***6,89 ± 0,11	7/0
IP-C <sub>2</sub>	8,62 ± 0,28	6,36 ± 0,11	5/0	*7,58 ± 0,25	**5,67 ± 0,15	6/0
IP-C <sub>3</sub>	7,39 ± 0,28	5,37 ± 0,05	5/0	6,89 ± 0,31	**4,88 ± 0,11	5/1
IP-C <sub>4</sub>	6,68 ± 0,19	5,11 ± 0,05	6/1	6,36 ± 0,05	*4,81 ± 0,10	5/1
IP-C <sub>5</sub>	5,05 ± 0,06		0/4	*4,77 ± 0,10		0/4

**Tab. 3.8 Bindungscharakteristika ± Standardfehler der molekularen Testsonden (IP-C<sub>2</sub> bis IP-C<sub>5</sub>) an M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Membranhomogenat.** pK<sub>i</sub>(hoch) bzw. pK<sub>i</sub>(niedrig): negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten der Testsubstanz zur hochaffinen bzw. niedrigaffinen Rezeptorfraction. bi/mo: Anzahl der Einzelversuche, die sich laut F-Test mit p<0,05 besser anhand des biphasischen Modells (Gleichung 10) auswerten ließen im Vergleich zum monophasischen Modell (Gleichung 15 mit n<sub>H</sub>=-1). Monophasische Datensätze wurden für die Berechnung der Kenngrößen ausgeschlossen, mit Ausnahme von IP-C<sub>5</sub>, für das daher nur ein Affinitätswert (pK<sub>i</sub>) nach monophasischer Kurvenanpassung angegeben werden kann. \*, \*\* bzw. \*\*\*: statistisch signifikanter Unterschied zum entsprechendem Affinitätswert am M<sub>2</sub>-Rezeptor (t-Test, p<0,05, p<0,01 bzw. p<0,001).

Die Verlängerung des Alkyl-Substituenten führte zu einer stetigen Rechtsverschiebung der Radioligand-Bindungskurven im Vergleich zu Iperoxo. Dabei schien sich die Strukturveränderung weniger stark auf die Affinität zur inaktiven Rezeptorkonformation auszuwirken als zur aktiven (siehe dazu auch nächster Abschnitt).

Wie Iperoxo zeigte auch Ethylperoxo höhere Bindungsaffinitäten zum M<sub>2</sub>-Rezeptor im Vergleich zu M<sub>4</sub> (t-Test, p<0,05). Ein signifikanter Unterschied zwischen M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Subtyp konnte für *n*-Propyl- und *n*-Butylperoxo nur bezüglich der Affinität zur inaktiven Rezeptorkonformation festgestellt werden (t-Test, p<0,05)

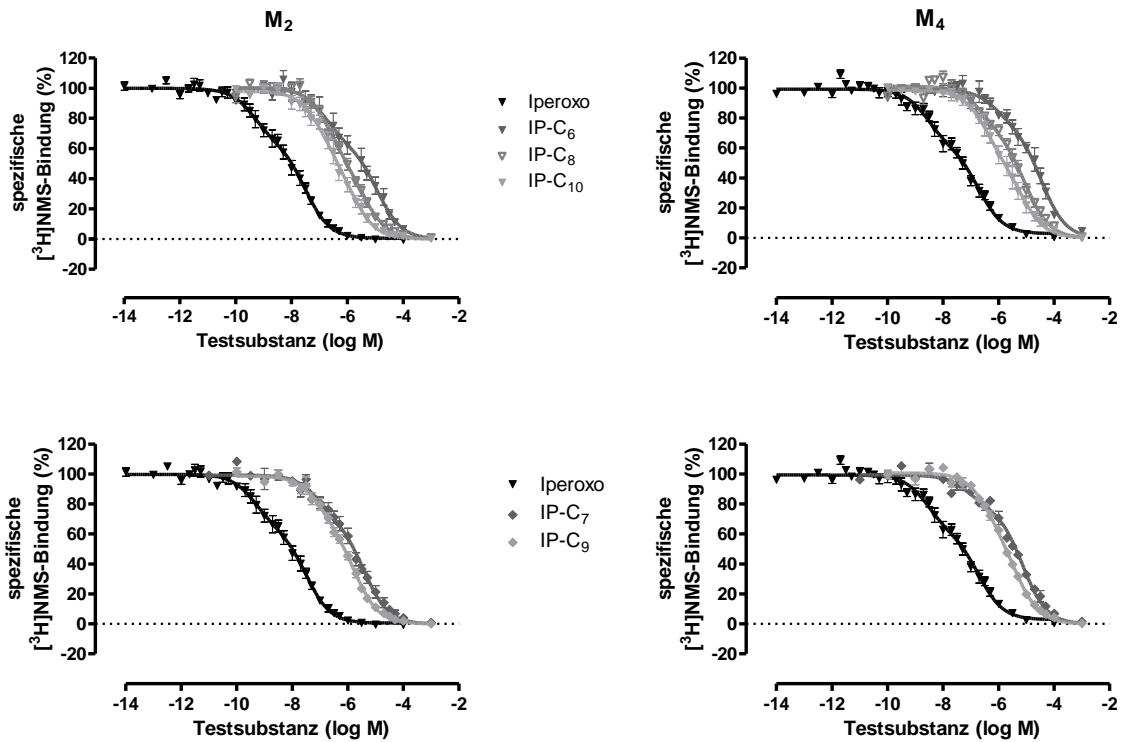
Es ist nicht auszuschließen, dass *n*-Pentylperoxo ebenfalls unterschiedliche Bindungsaffinitäten zur aktiven und inaktiven Rezeptorpopulation aufweist. Diese liegen jedoch vermutlich in einem schmalen Konzentrationsbereich, was sich experimentell nicht erfassen ließ und sich daher in einem scheinbar monophasischen Verlauf der Konzentrations-Bindungs-Kurve widerspiegelte. Auch hier zeigte sich eine signifikant höhere Bindungsaffinität der Substanz zum M<sub>2</sub>-Rezeptor im Vergleich zu M<sub>4</sub> (t-Test, p<0,05).

Die Fraktionsgrößen der hochaffinen Rezeptorpopulation werden aus Gründen der Übersichtlichkeit für alle Testsubstanzen separat im übernächsten Abschnitt 3.2.1.4 behandelt.

### 3.2.1.3 Eine weitere Alkyl-Kettenverlängerung von -C<sub>6</sub> bis -C<sub>10</sub> führte zum Wiederanstieg der Affinität

Die Daten der am M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Membranhomogenat durchgeführten Konkurrenzexperimente mit den länger-kettigen Iperoxo-Derivaten konnten überwiegend mit dem biphasischen Bindungsmodell nach Gleichung 10 ausgewertet werden. Daten von einzelnen Versuchen, die keine Auswertung nach dem biphasischen Modell zuließen, wurden von der folgenden Darstellung in Abb. 3.12 sowie von der Berechnung der Kenngrößen (Tab. 3.9) ausgeschlossen, um eine Verzerrung der Ergebnisse zu vermeiden.

Im Folgenden wurden die Daten der Ausgangssubstanz Iperoxo aus Abb. 3.9 zum Vergleich nochmals aufgetragen.



**Abb. 3.12 Heterologe Konkurrenz zwischen  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  0,2nM und den molekularen Testsonden (IP-C<sub>6</sub> bis IP-C<sub>10</sub>) an M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Membranhomogenaten.** Ordinate: spezifische Bindung des Radioliganden  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  in Prozent nach Normierung auf die spezifische Bindung ohne Kompetitor als 100% und den theoretischen Wert Null als 0% (keine spezifische Bindung). Abszisse: dekadischer Logarithmus der molaren Kompetitor-Konzentration. Kurvenanpassung: biphasisches Modell (Gleichung 10). Datenpunkte: Mittelwert  $\pm$  Standardfehler aus 3 bis 7 unabhängigen Experimenten, jeweils in Dreifachbestimmung.

Test-substanz	M <sub>2</sub>			M <sub>4</sub>		
	pK <sub>i</sub> (hoch)	pK <sub>i</sub> (niedrig)	bi/mo	pK <sub>i</sub> (hoch)	pK <sub>i</sub> (niedrig)	bi/mo
Iperoxo	9,50 $\pm$ 0,17	7,58 $\pm$ 0,06	7/0	*8,91 $\pm$ 0,15	***6,89 $\pm$ 0,11	7/0
IP-C <sub>6</sub>	6,36 $\pm$ 0,36	5,16 $\pm$ 0,12	4/0	6,11 $\pm$ 0,22	*4,70 $\pm$ 0,14	5/0
IP-C <sub>7</sub>	7,34 $\pm$ 0,15	5,67 $\pm$ 0,06	4/1	7,15 $\pm$ 0,18	*5,42 $\pm$ 0,02	3/2
IP-C <sub>8</sub>	6,87 $\pm$ 0,21	5,60 $\pm$ 0,14	4/1	6,86 $\pm$ 0,20	5,36 $\pm$ 0,11	4/1
IP-C <sub>9</sub>	7,26 $\pm$ 0,24	5,95 $\pm$ 0,03	4/1	6,88 $\pm$ 0,13	**5,64 $\pm$ 0,05	4/1
IP-C <sub>10</sub>	7,61 $\pm$ 0,29	6,10 $\pm$ 0,16	5/1	7,35 $\pm$ 0,21	5,76 $\pm$ 0,16	5/1

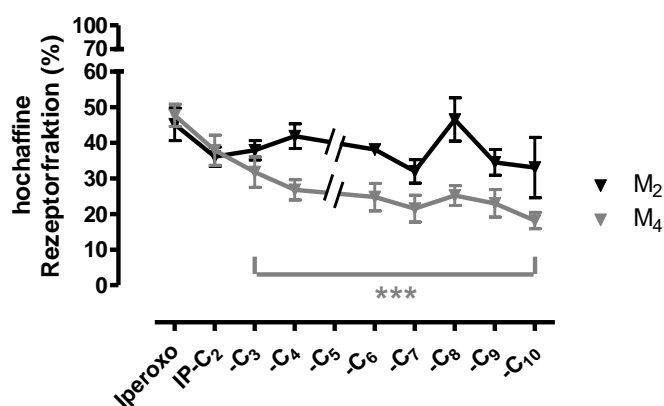
**Tab. 3.9 Bindungscharakteristika  $\pm$  Standardfehler der molekularen Testsonden (IP-C<sub>6</sub> bis IP-C<sub>10</sub>) an M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Membranhomogenaten.** pK<sub>i</sub>(hoch) bzw. pK<sub>i</sub>(niedrig): negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten zur hochaffinen bzw. niedrigaffinen Rezeptorfraction. bi/mo: Anzahl der Einzelversuche, die sich laut F-Test mit p<0,05 besser anhand des biphasischen Modells (Gleichung 10) auswerten ließen im Vergleich zum monophasischen Modell (Gleichung 15 mit n<sub>H</sub>=-1). Monophasische Datensätze wurden für die Berechnung der Kenngrößen ausgeschlossen. \*, \*\* bzw. \*\*\*: statistisch signifikanter Unterschied zum entsprechendem Affinitätswert am M<sub>2</sub>-Rezeptor (t-Test, p<0,05, p<0,01 bzw. p<0,001).

Durch weitere Verlängerung des Alkyl-Substituenten am Iperoxo-Molekül kam es zu einem Wiederanstieg der Testsubstanzaffinität zu beiden Rezeptoren. Die Affinität von *n*-Hexyliperoxo zur inaktiven Rezeptorkonformation lag im Bereich des für *n*-Pentyliperoxo gefundenen Wertes (pK<sub>i</sub>(mono)= 5,05 bzw. 4,77 siehe Tab. 3.8). Somit wurde durch den *n*-Pentyl-Substituenten ein Affinitätsminimum innerhalb der betrachteten Substanzreihe erreicht.

Auch hier wiesen die Testsonden eine tendenziell höhere Affinität zum M<sub>2</sub>-Rezeptor auf. Der Unterscheid lag jedoch im Bereich von 0,3 Dekaden und war daher zumeist nicht statistisch signifikant.

### 3.2.1.4 Die Alkyl-Substituenten hatten Einfluss auf die hochaffine Rezeptorpopulation am M<sub>4</sub>- jedoch nicht an M<sub>2</sub>-Rezeptor

Die Auftragung der Größe der hochaffinen Rezeptorfractionen, welche mit den molekularen Testsonden am M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Membranhomogant durch Analyse mittels biphasischen Bindungsmodell nach Gleichung 10 gefunden worden waren (siehe Abschnitte 3.2.1.1-3.2.1.3), ergab folgendes Gesamtbild:



**Abb. 3.13 Einfluss der Alkylkettenverlängerung der Iperoxo-Derivate auf die Größe der hochaffinen Rezeptorfraction in M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Membranhomogenaten.** Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler aus je 3 bis 7 unabhängigen Einzelversuchen, die mit dem biphasischen Modell (Gleichung 10) ausgewertet worden waren (s. Abschnitte 3.2.1.2 und 3.2.1.3). \*\*\*: signifikant unterschiedlich zu der mit Iperoxo beobachteten hochaffinen Rezeptorfraction an M<sub>4</sub>-Membranhomogenat (ANOVA mit p<0,0001 und anschließendem Dunnett-post-Test mit p<0,05). Die hochaffinen Rezeptorfractionen des M<sub>2</sub>-Membranhomogenats unterscheiden sich nicht im Vergleich zu Iperoxo (ANOVA mit p>0,05).

Test-substanz	M <sub>2</sub> hochaffine Fraktion (%)	M <sub>4</sub> hochaffine Fraktion (%)
Iperoxo	45 ± 5	48 ± 3
IP-C <sub>2</sub>	36 ± 3	38 ± 4
IP-C <sub>3</sub>	38 ± 3	32 ± 4
IP-C <sub>4</sub>	42 ± 4	27 ± 3
IP-C <sub>5</sub>	keine Angabe möglich	keine Angabe möglich
IP-C <sub>6</sub>	38 ± 0,4	25 ± 4
IP-C <sub>7</sub>	32 ± 3	22 ± 4
IP-C <sub>8</sub>	47 ± 6	25 ± 3
IP-C <sub>9</sub>	35 ± 4	23 ± 4
IP-C <sub>10</sub>	33 ± 9	18 ± 2

**Tab. 3.10 Mittelwert ± Standardfehler der hochaffinen Rezeptorfractionen in M<sub>2</sub>-und M<sub>4</sub>-Membranhomogenaten aus Abb. 3.13.** Die Daten wurden anhand der Versuchsergebnisse aus den Abschnitten 3.2.1.2 bis 3.2.1.3 berechnet.

Die Verlängerung des Alkyl-Substituenten an der Muttersubstanz Iperoxo führte zu einer stetigen Verkleinerung der hochaffinen Rezeptorfraktion im M<sub>4</sub>-Membranhomogenat von 48 auf 18 %, welche ab dem Substituenten -C<sub>3</sub> signifikant kleiner im Vergleich zur Referenzsubstanz Iperoxo war (ANOVA mit p<0,0001, Dunnett-*post*-Test mit p<0,05). Am M<sub>2</sub>-Membranhomogenat zeigten die Derivate hingegen keinen statistisch signifikanten Unterschied gegenüber Iperoxo (ANOVA mit p>>0,05).

Diese gefundenen Unterschiede konnten nicht auf eine verschieden hohe Rezeptordichte in den verwendeten Zellmembranhomogenate zurückgeführt werden, da sich die durch homologe Konkurrenzexperimente (siehe Methode 2.1.3.3) bestimmte Anzahl an Bindungsstellen (B<sub>max</sub>) nicht statistisch signifikant unterschied (siehe Tab. 3.11, ANOVA mit p>>0,5).

	M <sub>2</sub>		M <sub>4</sub>	
	B <sub>max</sub> (fmol/mg)	n	B <sub>max</sub> (fmol/mg)	n
Charge 1	2824 ± 165	3	2383 ± 285	4
Charge 2	2249 ± 340	5	2591 ± 393	3

**Tab. 3.11 Expressionsdichte ± Standardfehler von muskarinischen Rezeptorsubtypen in den verwendeten Flp-In<sup>TM</sup>-hM<sub>2</sub> bzw. -hM<sub>4</sub>-CHO-Membranhomogenaten.** B<sub>max</sub>: Anzahl der Bindungsstellen bezogen auf den Proteingehalt des jeweiligen Membranhomogenats. n: Anzahl der durchgeführten homologen Konkurrenzexperimente (Methode 2.1.3.3) zu Bestimmung von B<sub>max</sub>. Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Membranhomogenaten (ANOVA mit p>>0,05).

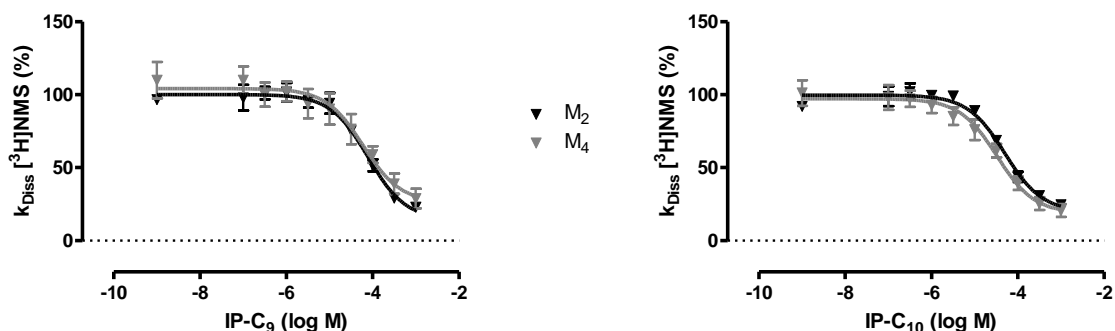
### 3.2.2 Messung der Bindungsaffinität zur allosterischen Bindungsstelle

Neben der orthosterischen Bindung sollte untersucht werden, ob die Testsubstanzen auch eine Affinität zu der allosterischen Bindungsstelle der beiden Rezeptorsubtypen besitzen.

Um dies zu testen, wurden Zwei-Punkt-kinetische Experimente mit dem Radioliganden [<sup>3</sup>H]NMS und längerkettigen *n*-Alkyl-Iperoxoderivaten an Membranhomogenaten aus Flp-In<sup>TM</sup>-hM<sub>2</sub>- bzw. -hM<sub>4</sub>-CHO-Zellen durchgeführt (Methode 2.1.3.7). Dieses Verfahren beruht auf der Verzögerung der Dissoziation des Radioliganden von der orthosterischen Bindungsstelle, wenn sich eine Testsubstanz allosterisch an den Rezeptor bindet. Zuvor wurde die Dissoziationsgeschwindigkeit von [<sup>3</sup>H]NMS an beiden Rezeptor-Subtypen bestimmt, um die Messzeitpunkte für die Durchführung der Zwei-Punkt-Kinetik festzulegen (Methode 2.1.3.6, Daten siehe Anhang).

#### 3.2.2.1 IP-C<sub>9</sub> und IP-C<sub>10</sub> zeigten eine Affinität zur allosterischen Bindungsstelle

Aus der Reihe der molekularen Testsonden wurden *n*-Nonylperoxo und *n*-Decylperoxo ausgewählt, um eine mögliche allosterische Bindung an M<sub>2</sub>- bzw. M<sub>4</sub>-Rezeptoren zu testen.



**Abb. 3.14 Verzögerung der  $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziationsgeschwindigkeit durch längerkettige  $n$ -Alkyl-Iperoxo-Derivate.** Ordinate: Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante des Radioliganden  $[^3\text{H}]$ NMS normiert auf die Dissoziationsgeschwindigkeit ohne Testsubstanz als 100% und den theoretischen Wert Null (komplette Blockade der Dissoziation) als 0%. Abszisse: dekadischer Logarithmus der Konzentration der allosterisch bindenden Testsubstanz. Kurvenanpassung: Vier-Parameter-logistische Gleichung (Gleichung 15) mit konstantem Hill-Koeffizienten  $n_H = -1$ . Das untere Plateau der dargestellten Kurven war jeweils signifikant unterschiedlich zum Wert Null (F-Test,  $p > 0,05$ ). Datenpunkte: Mittelwert  $\pm$  Standardfehler aus vier unabhängigen Experimenten, jeweils in Vierfachbestimmung.

Test-substanz	$pEC_{50Diss}$	$M_2$		n	$M_4$		n
		$pEC_{50Diss}$	unteres Plateau (%)		$pEC_{50Diss}$	unteres Plateau (%)	
IP-C <sub>9</sub>	4,11 $\pm$ 0,10		14 $\pm$ 5	4	4,22 $\pm$ 0,20	26 $\pm$ 8	4
IP-C <sub>10</sub>	4,30 $\pm$ 0,09		20 $\pm$ 4	4	4,48 $\pm$ 0,13	19 $\pm$ 5	4

**Tab. 3.12 Kenngrößen  $\pm$  Standardfehler der allosterischen Bindung der Iperoxo-Derivate aus Abb. 3.14.**  $pEC_{50Diss}$ : negativer dekadischer Logarithmus der Testsubstanz-Konzentration bei halbmaximaler Verzögerung der  $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziationsgeschwindigkeit. Dieser Wert entspricht der Affinität der Testsubstanz zur allosterischen Bindungsstelle im orthosterisch mit  $[^3\text{H}]$ NMS-besetzten Rezeptor. Unteres Plateau: prozentuale, maximal erreichbare Dissoziationsverzögerung von  $[^3\text{H}]$ NMS nach Normierung auf die Dissoziationsgeschwindigkeit ohne Testsubstanz als 100% und den theoretischen Wert Null als 0% (keine Dissoziation). n: Anzahl unabhängiger Versuche.

Für diese beiden Derivate konnte eine Dissoziationsverzögerung von  $[^3\text{H}]$ NMS an beiden Subtypen festgestellt werden, die jedoch unvollständig blieb (unteres Plateau bei ca. 20%, signifikant verschieden von Null-Linie laut F-Test mit  $p > 0,05$ ). Die  $pEC_{50Diss}$ -Werte, welche die Affinität der Testsubstanzen zur allosterischen Bindungsstelle im orthosterisch mit  $[^3\text{H}]$ NMS besetzten Rezeptor-Subtyp angeben, lagen im Bereich von 4,1 bis 4,5. Somit unterscheiden die beiden molekularen Testsonden bezüglich ihrer allosterischen Bindung nicht zwischen  $M_2$ - und  $M_4$ -Rezeptoren.

Eine Untersuchung der Substanzen  $n$ -Butyl-,  $n$ -Hexyl- und  $n$ -Decylperoxo an Membranhomogenaten aus Flp-In<sup>TM</sup>hM<sub>2</sub>-CHO-Zellen anhand Zwei-Punkt-kinetischer Experimente deutete auf eine Zunahme des allosterischen Bindungspotenzials mit wachsender  $n$ -Alkyl-Kettenlänge hin (S. Klaus, Bachelorarbeit 2013). Die Bindung von Iperoxo an die allosterische Tasche des  $M_2$ -Rezeptors konnte in der zitierten Arbeit ausgeschlossen werden.

### 3.3 Berechnung von Bias-Faktoren

Auf Grundlage der erhobenen Daten zur Aktivierung des präferentiellen G<sub>i</sub>- und des alternativen G<sub>s</sub>-Signalwegs durch den M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Rezeptor (siehe Kapitel 3.1 und 6.4.2) wurde eine Berechnung von Bias-Faktoren für die *n*-Alkyl-Iperoxoderivate mit Iperoxo als Referenzsubstanz durchgeführt, um die funktionelle Selektivität der molekularen Testsonden zu quantifizieren.

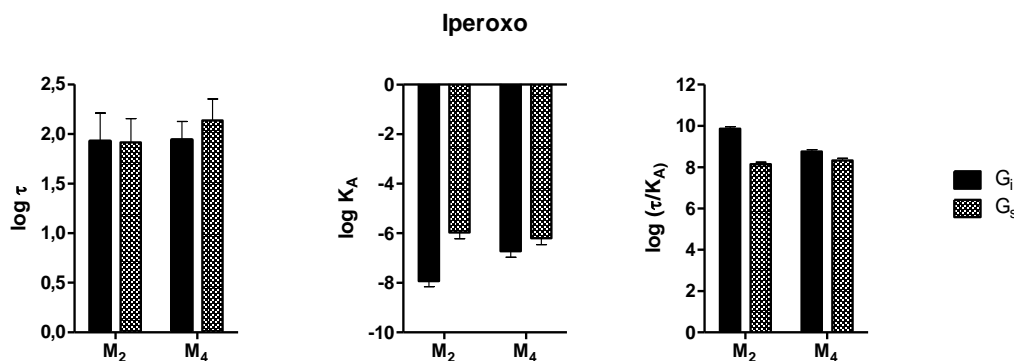
Im Folgenden werden nacheinander drei Varianten der Bias-Berechnung dargestellt, die auf dem *Operational Model* (Black & Leff, 1983) basieren und in der aktuellen pharmakologischen Forschung angewandt werden (siehe Methoden 2.1.5.3 bis 2.1.5.7). Bisher wurden sie jedoch noch nicht anhand derselben Datengrundlage direkt einander gegenübergestellt bzw. zum Vergleich der Aktivierungsspektren z.T. entgegengesetzter Signalwege zweier nahverwandter Rezeptoren genutzt.

#### 3.3.1 Berechnung des Bias-Faktors $\Delta\Delta\log(\tau/K_A)$

Die Methode (siehe 2.1.5.6) nach Kenakin und Christopoulos (2013) zeichnet sich dadurch aus, dass zur Berechnung des Bias-Faktors ausschließlich Daten aus funktionellen Experimenten nötig sind. Um einen Agonisten bezüglich der Aktivierung eines Signalweges zu charakterisieren, werden hier die Schlüsselparameter funktionelle Affinität ( $K_A$ ) und Kopplungseffizienz ( $\tau$ ) in dem Transduktionskoeffizienten  $\log(\tau/K_A)$  zusammengefasst, welcher im Vergleich zum gewählten Referenzagonisten nach Gleichung 34 bestimmt wird. Anschließend werden die Transduktionskoeffizienten jedes Signalwegs mithilfe des entsprechenden Transduktionskoeffizienten der Referenzsubstanz normalisiert und ergeben  $\Delta\log(\tau/K_A)$ . Schließlich wird aus diesem normalisierten Transduktionskoeffizienten der Bias-Faktor  $\Delta\Delta\log(\tau/K_A)$  des Agonisten gebildet.

##### 3.3.1.1 Transduktionskoeffizienten der Referenzsubstanz Iperoxo

Zunächst wurden durch Anwendung des *Operational Models* die einzelnen Parameter  $\log \tau$  und  $\log K_A$  für den Referenzagonisten Iperoxo in den untersuchten Signalwegen, wie im Methodenteil (siehe 2.1.5.6) beschrieben, bestimmt. Das obere Kurvenplateau ( $E_{max}$ ) wurde hierbei auf Werte zwischen 100 und 105 % fixiert (da die feste Vorgabe von 100% nicht für jeden Datensatz eine eindeutige Parameterbestimmung ermöglichte). Für jeden durchgeführten Versuch wurde aus den erhaltenen Werten für  $\log \tau$  und  $\log K_A$  ein Transduktionskoeffizient  $\log(\tau/K_A)$  berechnet. Die Mittelwerte, welche für die nachfolgende Bias-Faktorberechnung verwendet wurden, sind in Tab. 3.13 angegeben.



**Abb. 3.15 Kopplungseffizienz, funktionelle Affinität und Transduktionskoeffizienten der Referenzsubstanz Iperoxo im G<sub>i</sub>- und G<sub>s</sub>-Signalweg.** (Links)  $\log \tau$ : Logarithmus der Kopplungseffizienz bestimmt durch Anwendung des *Operational Models*. (Mitte)  $\log K_A$ : Logarithmus der funktionellen Affinität bestimmt durch Anwendung des *Operational Models* (Gleichung 27 bzw. Gleichung 34). Für die Datenanalyse wurden die Parameter  $n$  und Basal jeweils als konstant (1 bzw. 0) festgelegt. Der Maximaleffekt wurde auf den kleinsten Wert zwischen 100 und 105 % gesetzt, der eine eindeutige Analyse ermöglichte. (Rechts)  $\log \tau/K_A$ : Transduktionskoeffizient (nach Kenakin et al., 2012) berechnet aus den vorangegangenen Kenngrößen. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler für den M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Rezeptor aus fünf bis neun Versuchen.

Rezeptor-Subtyp	$\log (\tau / K_A)$			
	G <sub>i</sub>	n	G <sub>s</sub>	n
M <sub>2</sub>	9,86 ± 0,10	8	8,14 ± 0,11	5
M <sub>4</sub>	8,75 ± 0,09	9	8,32 ± 0,11	5

**Tab. 3.13 Transduktionskoeffizienten  $\pm$  Standardfehler der Referenzsubstanz Iperoxo im G<sub>i</sub>- und G<sub>s</sub>-Signalweg aus Abb. 3.15.**  $\log (\tau / K_A)$ : Transduktionskoeffizient (nach Kenakin et al., 2012) berechnet nach Bestimmung der einzelnen Parameter  $K_A$  und  $\tau$  durch Anwendung des *Operational Models* (Gleichung 27 bzw. Gleichung 34) zur Analyse der funktionellen Daten aus den Abschnitten 3.1 und 6.4.2.  $n$ : Anzahl der durchgeführten Einzelerperimente, für die jeweils ein Transduktionskoeffizient berechnet wurde.

Der Zusammenhang zwischen  $pEC_{50}$ -Wert eines Agonisten und den Parametern  $K_A$  und  $\tau$  im *Operational Model* stellt sich folgendermaßen dar (Black et al., 1985):

$$pEC_{50} = -\log \left[ \frac{K_A}{(2 + \tau^n)^{1/n} - 1} \right]$$

mit  $n=1$  ergibt sich somit

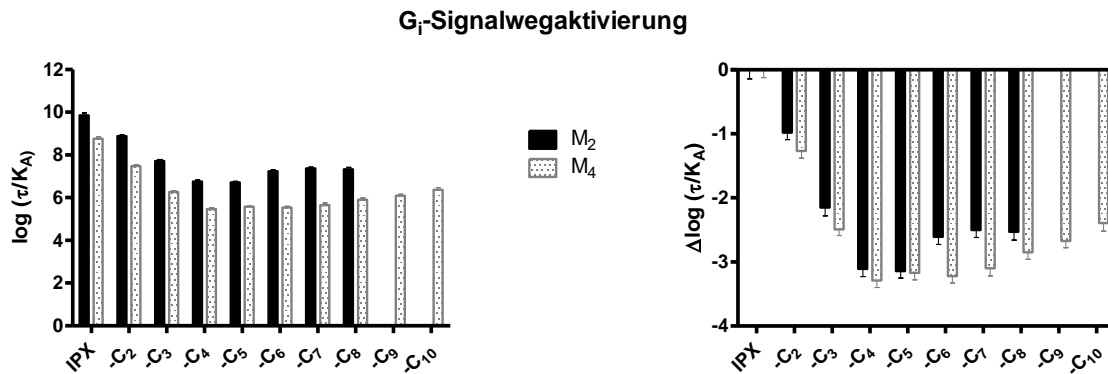
$$pEC_{50} = -\log \left[ \frac{K_A}{1 + \tau} \right] \approx -\log(K_A) + \log(\tau)$$

Der Einsatz der Werte für  $\log K_A$  und  $\log \tau$  aus Abb. 3.15 in diese Gleichung, lieferte für Iperoxo die  $pEC_{50}$ -Werte 9,86 bzw. 8,67 am M<sub>2</sub>- bzw. M<sub>4</sub>-Rezeptor im G<sub>i</sub>-Signalweg und 7,88 bzw. 8,34 im G<sub>s</sub>-Signalweg. Diese Werte entsprachen den jeweiligen  $pEC_{50}$ -Werten nach Auswertung der funktionellen Daten mit der Vier-Parameter-logistischen-Gleichung (vgl. Tab. 3.2, Tab. 3.5 und Tab. 6.2).

### 3.3.1.2 Transduktionskoeffizienten der Alkyl-Derivate im G<sub>i</sub>-Signalweg

Wie im Methodenteil (Abschnitt 2.1.5.6) beschrieben, wurden die Transduktionskoeffizienten der Derivate direkt durch Anwendung von Gleichung 34 im Vergleich zur Referenzsubstanz Iperoxo bestimmt. Dabei wurden das untere Kurvenplateau und die Steilheit  $n$  stets mit den Werten 0 bzw. 1

als konstant vorgegeben. Das obere Kurvenplateau ( $E_{\max}$ ) wurde für den  $M_2$ -Rezeptor auf 101 % und für den  $M_4$ -Rezeptor auf 100 % festgelegt, da somit für den jeweiligen Rezeptorsubtyp eine Analyse der gesamten Reihe der Derivate mit den gleichen Vorgaben möglich war. Anschließend wurde der normalisierte Transduktionsfaktor  $\Delta\log(\tau/K_A)$  gebildet (Gleichung 36). Nachfolgend sind die in Abschnitt 3.3.1.1 ermittelten Werte für die Referenzsubstanz Iperoxo nochmals zum Vergleich aufgetragen.



**Abb. 3.16** Transduktionskoeffizienten und normalisierte Transduktionskoeffizienten der Testsubstanzen im Vergleich zu Iperoxo ( $G_i$ -Signalweg). (Links)  $\log(\tau/K_A)$ : Transduktionskoeffizienten bestimmt durch Anwendung von Gleichung 34 für die Alkyl-Derivate IP-C<sub>2</sub> bis IP-C<sub>8</sub>/-C<sub>10</sub> im Vergleich zu Iperoxo. (Für die Derivate -C<sub>9</sub> und -C<sub>10</sub> wurden keine [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindungsdaten aufgenommen). Für die Datenanalyse wurden die Parameter n und Basal jeweils als konstant (1 bzw. 0) festgelegt. Der Parameter  $E_{\max}$  wurde auf 101 % für den  $M_2$ - und 100 % für den  $M_4$ -Rezeptor festgelegt. Die Werte für Iperoxo sind aus Abschnitt 3.3.1.1 entnommen. (Rechts)  $\Delta\log(\tau/K_A)$ : normalisierte Transduktionskoeffizienten berechnet nach Gleichung 36.

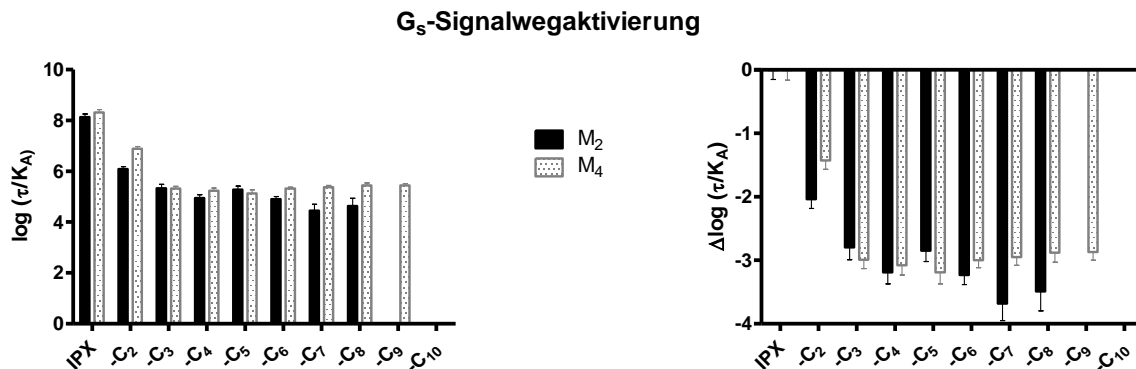
G <sub>i</sub> -Signalwegaktivierung			
M <sub>2</sub>	$\log(\tau/K_A)$	$\Delta\log(\tau/K_A)$	n <sub>Gi</sub>
Iperoxo	9,86 ± 0,10	0 ± 0,14	8
IP-C <sub>2</sub>	8,88 ± 0,05	-0,98 ± 0,11	3
IP-C <sub>3</sub>	7,71 ± 0,08	-2,15 ± 0,13	4
IP-C <sub>4</sub>	6,75 ± 0,07	-3,11 ± 0,12	6
IP-C <sub>5</sub>	6,72 ± 0,05	-3,14 ± 0,11	4
IP-C <sub>6</sub>	7,24 ± 0,06	-2,61 ± 0,12	3
IP-C <sub>7</sub>	7,36 ± 0,07	-2,50 ± 0,12	3
IP-C <sub>8</sub>	7,33 ± 0,09	-2,53 ± 0,13	3
IP-C <sub>9</sub>	wurden nicht untersucht		
IP-C <sub>10</sub>	wurden nicht untersucht		
M <sub>4</sub>	$\log(\tau/K_A)$	$\Delta\log(\tau/K_A)$	n <sub>Gi</sub>
Iperoxo	8,75 ± 0,09	0 ± 0,12	9
IP-C <sub>2</sub>	7,49 ± 0,06	-1,27 ± 0,11	5
IP-C <sub>3</sub>	6,27 ± 0,05	-2,49 ± 0,10	4
IP-C <sub>4</sub>	5,47 ± 0,07	-3,29 ± 0,11	5
IP-C <sub>5</sub>	5,58 ± 0,06	-3,17 ± 0,11	3
IP-C <sub>6</sub>	5,54 ± 0,06	-3,22 ± 0,11	3
IP-C <sub>7</sub>	5,66 ± 0,06	-3,10 ± 0,12	5
IP-C <sub>8</sub>	5,91 ± 0,07	-2,85 ± 0,11	5
IP-C <sub>9</sub>	6,09 ± 0,07	-2,67 ± 0,11	3
IP-C <sub>10</sub>	6,37 ± 0,09	-2,39 ± 0,13	3

**Tab. 3.14** Transduktionskoeffizienten  $\log(\tau/K_A)$  und normalisierte Transduktionskoeffizienten  $\Delta\log(\tau/K_A) \pm$  Standardfehler der Testsubstanzen im  $G_i$ -Signalweg aus Abb. 3.16. Für die Derivate IP-C<sub>9</sub> und IP-C<sub>10</sub> lagen keine eigenen [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindungsdaten als Grundlage für die Berechnung vor. Die Berechnung der Fehlerfortpflanzung für  $\Delta\log(\tau/K_A)$  erfolgte wie im Methodenabschnitt 2.1.6.2 beschrieben.



### 3.3.1.3 Transduktionskoeffizienten der Alkyl-Derivate im $G_s$ -Signalweg

Analog zum vorangehenden Abschnitt 3.3.1.2 wurden die Transduktionskoeffizienten der Iperoxo-Derivate für die  $G_s$ -Signalwegsaktivierung durch Anwendung von Gleichung 34 im Vergleich zur Referenzsubstanz Iperoxo bestimmt. Der Maximaleffekt wurde für beide Rezeptorsubtypen auf den Wert 100 % festgelegt. Da die Iperoxo-Derivate -C<sub>9</sub> und -C<sub>10</sub> keine agonistische Aktivität im  $G_s$ -Signalweg zeigten (siehe Abschnitt 3.1.3.3), war keine Datenanalyse möglich. Dies traf ebenfalls auf das Derivat -C<sub>10</sub> am M<sub>4</sub>-Rezeptor zu.



**Abb. 3.17** Transduktionskoeffizienten und normalisierte Transduktionskoeffizienten der Testsubstanzen im Vergleich zur Referenz Iperoxo ( $G_s$ -Signalweg). (Links)  $\log(\tau/K_A)$ : Transduktionskoeffizienten bestimmt durch Anwendung von Gleichung 34 für die Alkyl-Derivate -C<sub>2</sub> bis -C<sub>8</sub>/-C<sub>9</sub> im Vergleich zu Iperoxo. Bei den Derivaten -C<sub>9</sub> und -C<sub>10</sub> handelte es sich nicht um Agonisten am M<sub>2</sub>-Rezeptor, -C<sub>10</sub> war ebenfalls kein Agonist am M<sub>4</sub>-Subtyp (vgl. Abschnitt 3.1.3.3). Für die Datenanalyse wurden die Parameter  $n$  und Basal jeweils als konstant (1 bzw. 0) festgelegt. Der Parameter  $E_{max}$  wurde auf 100 % für beide Rezeptorsubtypen festgelegt. Die Werte für Iperoxo sind aus Abschnitt 3.3.1.1 entnommen. (Rechts)  $\Delta\log(\tau/K_A)$ : normalisierte Transduktionskoeffizienten berechnet nach Gleichung 36.

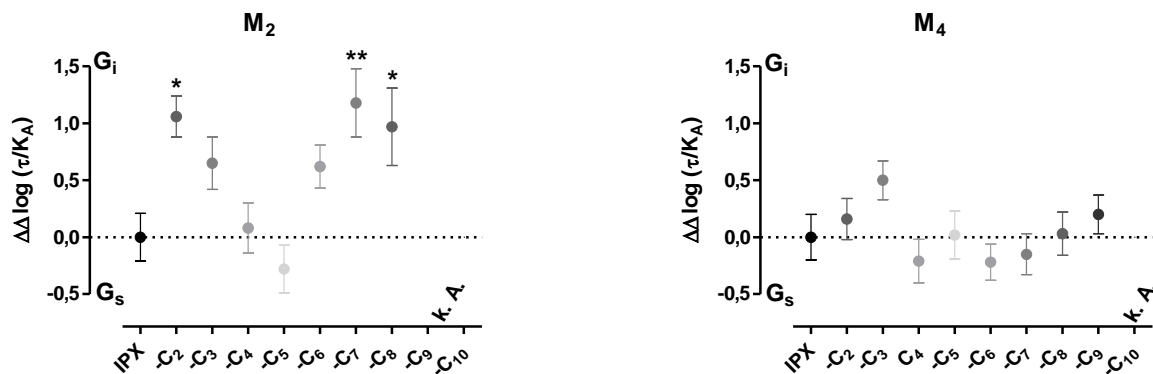
<b>G<sub>5</sub>-Signalwegaktivierung</b>			
<b>M<sub>2</sub></b>	<b>log (τ/K<sub>A</sub>)</b>	<b>Δlog (τ/K<sub>A</sub>)</b>	<b>n<sub>G<sub>5</sub></sub></b>
Iperoxo	8,14 ± 0,11	0 ± 0,15	5
IP-C <sub>2</sub>	6,09 ± 0,09	-2,04 ± 0,14	3
IP-C <sub>3</sub>	5,33 ± 0,16	-2,80 ± 0,19	3
IP-C <sub>4</sub>	4,94 ± 0,13	-3,19 ± 0,18	5
IP-C <sub>5</sub>	5,28 ± 0,14	-2,85 ± 0,17	4
IP-C <sub>6</sub>	4,91 ± 0,11	-3,23 ± 0,15	3
IP-C <sub>7</sub>	4,45 ± 0,25	-3,68 ± 0,27	4
IP-C <sub>8</sub>	4,64 ± 0,29	-3,49 ± 0,31	4
IP-C <sub>9</sub>	keine Auswertung möglich		
IP-C <sub>10</sub>			
<b>M<sub>4</sub></b>	<b>log (τ/K<sub>A</sub>)</b>	<b>Δlog (τ/K<sub>A</sub>)</b>	<b>n<sub>G<sub>5</sub></sub></b>
Iperoxo	8,32 ± 0,11	0 ± 0,16	5
IP-C <sub>2</sub>	6,89 ± 0,09	-1,43 ± 0,14	5
IP-C <sub>3</sub>	5,33 ± 0,10	-2,99 ± 0,14	6
IP-C <sub>4</sub>	5,24 ± 0,10	-3,08 ± 0,15	6
IP-C <sub>5</sub>	5,13 ± 0,14	-3,19 ± 0,18	4
IP-C <sub>6</sub>	5,32 ± 0,05	-3,00 ± 0,12	3
IP-C <sub>7</sub>	5,37 ± 0,07	-2,95 ± 0,13	3
IP-C <sub>8</sub>	5,44 ± 0,10	-2,88 ± 0,15	3
IP-C <sub>9</sub>	5,45 ± 0,07	-2,87 ± 0,13	3
IP-C <sub>10</sub>	keine Auswertung möglich		

**Tab. 3.15** Transduktionskoeffizienten  $\log(\tau/K_A)$  und normalisierte Transduktionskoeffizienten  $\Delta\log(\tau/K_A) \pm$  Standardfehler der Testsubstanzen im G<sub>5</sub>-Signalweg aus Abb. 3.17. Die Berechnung der Fehlerfortpflanzung für  $\Delta\log(\tau/K_A)$  erfolgte wie im Methodenabschnitt 2.1.6.2 beschrieben.

#### 3.3.1.4 Der Bias-Faktor $\Delta\Delta\log(\tau/K_A)$ : G<sub>7</sub>-Signalwegselektivität einiger Derivate am M<sub>2</sub>-Rezeptor

Aus den normalisierten Transduktionskoeffizienten jeder Testsubstanz wurde anhand Gleichung 37 der Bias-Faktor  $\Delta\Delta\log(\tau/K_A)$  berechnet und ermöglichte somit einen direkten Vergleich der einzelnen Testsubstanzen an einem Rezeptor sowie auch zwischen den beiden Rezeptorsubtypen.

Der Bias-Faktor  $\Delta\Delta\log(\tau/K_A)$  der Derivate IP-C<sub>2</sub>, -C<sub>7</sub> und -C<sub>8</sub> am M<sub>2</sub>-Rezeptor unterschied sich signifikant von dem der Referenzsubstanz Iperoxo (ANOVA mit  $p < 0,001$ , Dunnett-post-Test mit  $p < 0,05$ ) und zeigte durch die positiven Werte eine Bevorzugung der G<sub>i</sub>-Signalwegsaktivierung im Vergleich zum G<sub>5</sub>-Signalweg an. Die Analyse der Bias-Faktoren am M<sub>4</sub>-Rezeptor mittels einfaktorieller Varianzanalyse ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede der Testsubstanzen im Vergleich zu Iperoxo (ANOVA mit  $p > 0,05$ ). Somit zeigte im Gegensatz zum M<sub>2</sub>-Rezeptor keine der Testsubstanzen eine G<sub>7</sub>-Signalwegselektivität am M<sub>4</sub>-Rezeptor.



**Abb. 3.18** Bias-Faktoren  $\Delta\Delta\log(\tau/K_A)$  der Alkyl-Derivate im Vergleich zur Referenzsubstanz Iperoxo am  $M_2$ - bzw.  $M_4$ -Rezeptor. Die Berechnung von  $\Delta\Delta\log(\tau/K_A)$  erfolgte anhand der normalisierten Transduktionskoeffizienten (s. Tab. 3.14 und Tab. 3.15) nach Gleichung 37. Positive  $\Delta\Delta\log(\tau/K_A)$ -Werte zeigen eine  $G_i$ -Signalwegelektivität an, negative hingegen eine  $G_s$ -Selektivität. Die Referenzsubstanz Iperoxo definiert dabei den Nullwert, d.h. ein neutrales Verhalten bzgl. der Signalwegelektivität. \* bzw. \*\*: signifikant unterschiedlich zur Referenzsubstanz Iperoxo (ANOVA mit  $p < 0,001$  und anschließendem Dunnett-post-Test mit  $p < 0,05$ ). k. A.: keine Angaben.

Test-substanz	$\Delta\Delta\log(\tau/K_A)$			
	$M_2$	$n_{\text{gesamt}}$	$M_4$	$n_{\text{gesamt}}$
Iperoxo	$0 \pm 0,21$	13	$0 \pm 0,20$	14
IP-C <sub>2</sub>	* $1,06 \pm 0,18$	6	$0,16 \pm 0,18$	10
IP-C <sub>3</sub>	$0,65 \pm 0,23$	7	$0,50 \pm 0,17$	10
IP-C <sub>4</sub>	$0,08 \pm 0,22$	10	$-0,21 \pm 0,19$	11
IP-C <sub>5</sub>	$-0,28 \pm 0,21$	8	$0,02 \pm 0,21$	7
IP-C <sub>6</sub>	$0,62 \pm 0,19$	6	$-0,22 \pm 0,16$	6
IP-C <sub>7</sub>	** $1,18 \pm 0,30$	7	$-0,15 \pm 0,18$	8
IP-C <sub>8</sub>	* $0,97 \pm 0,34$	7	$0,03 \pm 0,19$	8
IP-C <sub>9</sub>	keine Angaben möglich		$0,20 \pm 0,17$	6
IP-C <sub>10</sub>	keine Angaben möglich		keine Angabe möglich	

**Tab. 3.16** Bias-Faktoren  $\Delta\Delta\log(\tau/K_A) \pm$  Standardfehler aus Abb. 3.18. \* bzw. \*\*: signifikant unterschiedlich zur Referenzsubstanz Iperoxo (ANOVA mit  $p < 0,001$  und anschließendem Dunnett-post-Test mit  $p < 0,05$ ). Die Berechnung der Fehlerfortpflanzung für  $\Delta\Delta\log(\tau/K_A)$  erfolgte wie im Methodenabschnitt 2.1.6.2 beschrieben.

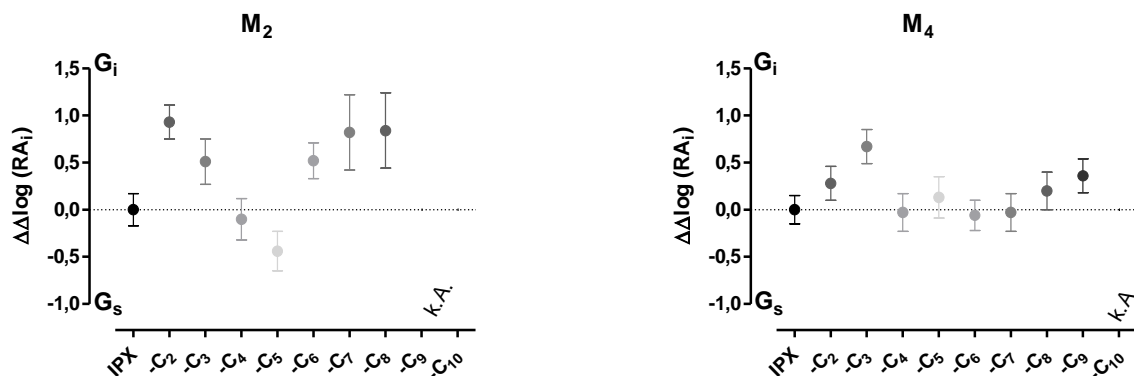
### 3.3.2 Berechnung des Bias-Faktors $\Delta\Delta\log(RA_i)$

Diese einfache Methode der Bias-Berechnung ist anwendbar bei Daten aus funktionellen Experimenten, wenn die zugrundeliegenden Konzentrations-Effektkurven keinen vom Wert 1 abweichende Kurvensteilheit (Hill-Koeffizient  $n_H$ ) aufweisen (Ehlert, 2008; Kenakin & Christopoulos, 2013). Ist diese Voraussetzung erfüllt, so sollte der  $\Delta\Delta\log(RA_i)$ -Wert einer Testsubstanz dem Bias-Faktor  $\Delta\Delta\log(\tau/K_A)$  entsprechen, wenn die gleiche Substanz als Referenzagonist gilt (Kenakin, 2014).

#### 3.3.2.1 Anhand der Bias-Faktoren $\Delta\Delta\log(RA_i)$ konnte keine signifikante Signalwegeselektivität festgestellt werden

Zur Berechnung der Bias-Faktoren  $\Delta\Delta\log(RA_i)$  gemäß Gleichung 39 wurden die  $pEC_{50}$ - und  $E_{max}$ -Werte aus Tab. 3.2, Tab. 3.5 und Tab. 3.6 sowie Tab. 6.2 verwendet. In Abb. 3.19 und Tab. 3.17 sind die Ergebnisse dieser Berechnung zusammengefasst. Es wurde eine einfaktorische Varianzanalyse durchgeführt, welche beim  $M_2$ -Rezeptor auf statistisch signifikante Unterschiede hinwies (ANOVA mit  $p < 0,05$  bei  $M_2$  und  $p > 0,05$  bei  $M_4$ ). Jedoch konnte mit dem Dunnett-post-Test keine Signifikanz zwischen der Referenzsubstanz und den einzelnen Iperoxo-Derivaten festgestellt werden (jede Paarung Referenz vs. Derivat mit  $p > 0,05$ ).

Die Werte der hier bestimmten Bias-Faktoren  $\Delta\Delta\log(RA_i)$  am  $M_2$ - und  $M_4$ -Subtyp wichen jedoch nicht von den korrespondierenden Werten für  $\Delta\Delta\log(\tau/K_A)$  aus Abschnitt 3.3.1.4 ab (t-Test jeweils mit  $p > 0,05$ ).



**Abb. 3.19** Bias-Faktoren  $\Delta\Delta\log(RA_i)$  der Alkyl-Derivate im Vergleich zur Referenzsubstanz Iperoxo am  $M_2$ - bzw.  $M_4$ -Rezeptor. Die Berechnung von  $\Delta\Delta\log(RA_i)$  erfolgte anhand Gleichung 39 mit den Kenngrößen  $E_{max}$  und  $pEC_{50}$  aus Tab. 3.2, Tab. 3.5 und Tab. 3.6 sowie Tab. 6.2. Positive  $\Delta\Delta\log(RA_i)$ -Werte deuten auf eine  $G_i$ -Signalwegeselektivität hin, negative auf eine  $G_s$ -Selektivität. Die Referenzsubstanz Iperoxo definiert dabei den Nullwert, d.h. ein neutrales Verhalten bzgl. der Signalwegeselektivität. Zur statistischen Testung der Ergebnisse mittels ANOVA siehe Text bzw. Tab. 3.17. k.A.: keine Angaben.

Test-substanz	$\Delta\Delta\log(\text{RA}_i)$			
	*M <sub>2</sub>	n <sub>gesamt</sub>	M <sub>4</sub>	n <sub>gesamt</sub>
Iperoxo	0 ± 0,17	13	0 ± 0,15	14
IP-C <sub>2</sub>	0,93 ± 0,18	6	0,28 ± 0,18	10
IP-C <sub>3</sub>	0,51 ± 0,24	7	0,67 ± 0,18	10
IP-C <sub>4</sub>	-0,10 ± 0,22	10	-0,03 ± 0,20	11
IP-C <sub>5</sub>	-0,44 ± 0,21	8	0,13 ± 0,22	7
IP-C <sub>6</sub>	0,52 ± 0,19	6	-0,06 ± 0,16	6
IP-C <sub>7</sub>	0,82 ± 0,40	7	-0,03 ± 0,20	8
IP-C <sub>8</sub>	0,84 ± 0,40	7	0,20 ± 0,20	8
IP-C <sub>9</sub>	keine Angabe möglich		0,36 ± 0,18	6
IP-C <sub>10</sub>	keine Angaben möglich			

**Tab. 3.17 Bias-Faktoren  $\Delta\Delta\log(\text{RA}_i) \pm$  Standardfehler aus Abb. 3.19.** \*: Die Testung auf statistisch signifikante Unterschiede der Mittelwerte mittels ANOVA ergab einen p-Wert <0,05, jedoch konnte durch den anschließenden Dunnett-post-Test kein signifikanter Unterschied zwischen der Referenzsubstanz und den einzelnen Iperoxo-Derivaten festgestellt werden (p>0,05).

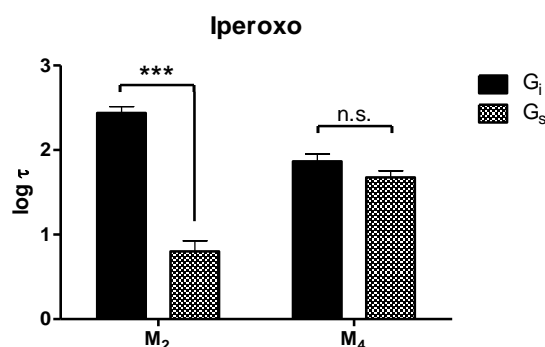
### 3.3.3 Berechnung des Bias-Faktors $\beta_{\text{lig}}$

Als Grundlage zur Berechnung des Bias-Faktors  $\beta_{\text{lig}}$  nach Rajagopal et al. (2011) dient die Kopplungseffizienz, ausgedrückt als  $\log \tau$ , welche für die Referenzsubstanz und jeden untersuchten Agonisten jeweils für beide Signalwege durch Anwendung des *Operational Models* bestimmt werden muss. Dazu wurden analog zu den Abschnitten 3.3.1 und 3.3.2 die Daten der funktionellen Experimente zur G<sub>i</sub>- und G<sub>s</sub>-Signalwegaktivierung (Kapitel 3.1 und 6.4.2) verwendet. Des Weiteren dienten die Daten aus Radioligand-Bindungsstudien (Abschnitt 3.2.1) dazu, dem Affinitätsparameter K<sub>A</sub> für jeden Agonisten einen festen Wert vorzugeben und somit die Anzahl der Freiheitsgrade bei der nichtlinearen Regressionsanalyse mit dem *Operational Model* zu verringern. Dabei war zu beachten, dass dieser Wert die Affinität des Agonisten zum Rezeptor darstellte, der nicht Teil eines ternären Komplexes ist (Rajagopal, 2013). Da die Werte für die niedrigaffine Bindung der Testsubstanzen (pK<sub>i</sub>(niedrig)) aus Abschnitt 3.2.1 die Bindung an die inaktive, G-Protein-freie Rezeptorkonformation widerspiegeln, konnte somit für jede Testsubstanz der Affinitätsparameter mit  $\log K_A = -pK_i(\text{niedrig})$  im *Operational Model* festgelegt werden.

#### 3.3.3.1 Die Kopplungseffizienz der Referenzsubstanz Iperoxo war abhängig vom Rezeptor-Subtyp und dem betrachteten Signalweg

Zunächst wurde durch Anwendung des *Operational Models* der Parameter  $\log \tau$  für den Referenzagonisten Iperoxo in den untersuchten Signalwegen, wie im Methodenabschnitt 2.1.5.5 beschrieben, bestimmt. Dabei wurden das untere und obere Kurvenplateau stets auf die Werte 0 bzw. 100 festgesetzt. Ebenso wurde die Steilheit n mit dem Wert 1 als konstant vorgegeben. Wie aus Tab. 3.8 zu entnehmen ist, wurde der Parameter  $\log K_A$  beim M<sub>2</sub>-Rezeptor auf -7,58 und bei M<sub>4</sub> auf -6,89 festgelegt. Die so erhaltenen Werte für die Kopplungseffizienz  $\log \tau$  sind in Abb. 3.20 und Tab. 3.18 zusammengefasst.

Die Kopplungseffizienz von Iperoxo war am M<sub>2</sub>-Rezeptor im G<sub>i</sub>-Signalweg signifikant höher als im G<sub>s</sub>-Signalweg (t-Test, p<0,001), während am M<sub>4</sub>-Rezeptor kein Unterschied bestand (t-Test, p>0,05). Vergleicht man die Kopplungseffizienz der Referenzsubstanz bezüglich eines Signalwegs zwischen den beiden Rezeptorsubtypen, so fällt auf, dass Iperoxo eine signifikant höhere Kopplungseffizienz im G<sub>i</sub>-Signalweg am M<sub>2</sub>-Rezeptor aufwies (t-Test, p<0,001). Im G<sub>s</sub>-Signalweg zeigte Iperoxo jedoch am M<sub>4</sub>-Rezeptor eine signifikant höhere Kopplungseffizienz (t-Test, p<0,001, siehe Tab. 3.18).



**Abb. 3.20 Kopplungseffizienz  $\log \tau$  der Referenzsubstanz Iperoxo an M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Rezeptoren im untersuchten G<sub>i</sub>- und G<sub>s</sub>-Signalweg.**  $\log \tau$ : Logarithmus der Kopplungseffizienz  $\tau$  bestimmt durch Analyse der funktionellen Daten aus Kapitel 3.1 und 6.4.2 anhand des *Operational Models* (Gleichung 27 und Gleichung 28) mit den stets fest vorgegebenen Parametern  $n=1$ , Basal=0,  $E_{\max}=100$ . Für den M<sub>2</sub>-Rezeptor wurde  $K_A$  gemäß der Bindungsaffinität zum G-Protein-freien Rezeptor auf -7,58 und für den M<sub>4</sub>-Rezeptor auf -6,89 fixiert (vgl. Tab. 3.8). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus fünf bis neun Versuchen. \*\*\*: signifikanter Unterschied (t-Test, p<0,001). n.s.: kein signifikanter Unterschied (t-Test, p>0,05).

Rezeptor-Subtyp	$\log \tau$			
	G <sub>i</sub>	n <sub>Gi</sub>	G <sub>s</sub>	n <sub>Gs</sub>
M <sub>2</sub>	2,44 $\pm$ 0,08	7	***0,80 $\pm$ 0,13	5
M <sub>4</sub>	###1,87 $\pm$ 0,09	9	###1,68 $\pm$ 0,08	5

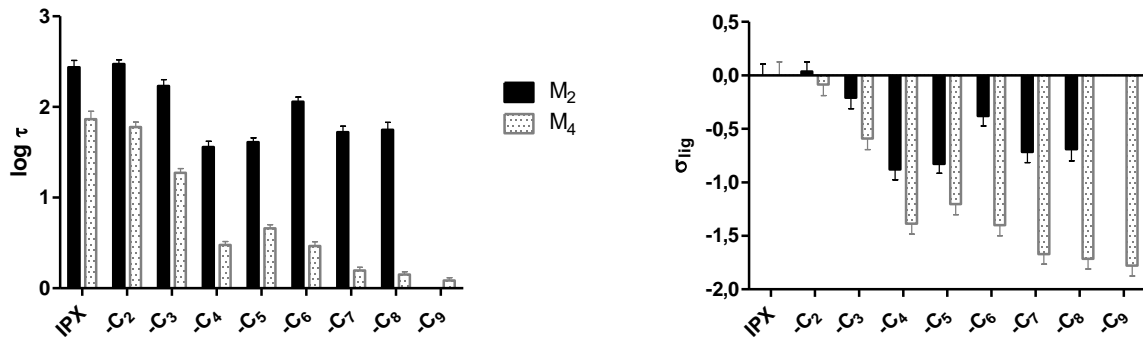
**Tab. 3.18 Kopplungseffizienz  $\log \tau \pm$  Standardfehler der Referenzsubstanz im G<sub>i</sub>- und G<sub>s</sub>-Signalweg aus Abb. 3.20.**  $n$ : Anzahl durchgeführter Versuche. \*\*\*: signifikanter Unterschied zwischen G<sub>i</sub> und G<sub>s</sub> (t-Test horizontal, p<0,001). ###: signifikanter Unterschied zwischen M<sub>2</sub> und M<sub>4</sub> im gleichen Signalweg (t-Test vertikal, p<0,001).

### 3.3.3.2 Kopplungseffizienz und effektive G<sub>i</sub>-Signalwegaktivierung der Iperoxo-Derivate

Die Kopplungseffizienz jedes Derivats im G<sub>i</sub>-Signalweg wurde anhand der Daten aus Abschnitt 3.1.1 und 6.4.2 durch Anwendung des *Operational Models* nach Gleichung 28 im Vergleich zur Referenzsubstanz Iperoxo bestimmt. Analog zum vorangehenden Abschnitt wurden dabei das untere und obere Kurvenplateau stets auf die Werte 0 bzw. 100 % festgesetzt sowie die Steilheit  $n$  mit dem Wert 1 als konstant vorgegeben. Die jeweiligen Werte für den Parameter  $K_A$  wurden aus den Tab. 3.8 und Tab. 3.9 entnommen ( $\log K_A = -pK_i$  (niedrig)). Anschließend wurden mit den Kopplungseffizienzen der Testsubstanz und der Referenzsubstanz Iperoxo die effektive Signalwegaktivierung  $\sigma_{ig}$  anhand Gleichung 31 berechnet. In Abb. 3.21 und Tab. 3.19 ist die Kopplungseffizienz der Referenzsubstanz aus Abschnitt 3.3.3.1 nochmals wiedergegeben.

Ebenso wie bei der Referenzsubstanz Iperoxo zeigten die Derivate stets eine signifikant kleinere Kopplungseffizienz am M<sub>4</sub>-Rezeptor im Vergleich zu M<sub>2</sub> (t-Test, p<0,001, aus Gründen der Übersichtlichkeit ist dies in Abb. 3.21 nicht durch Sternchen gekennzeichnet). Am M<sub>4</sub>-Rezeptor führte die Verlängerung des Alkyl-Substituenten der Testsubstanzen zu einem nahezu stetigen Abfall der Kopplungseffizienz ausgedrückt als  $\log \tau$ .

### G<sub>i</sub>-Signalwegaktivierung



**Abb. 3.21 Kopplungseffizienzen und effektive G<sub>i</sub>-Signalwegaktivierung der Testsubstanzen am M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Rezeptor.** (Links)  $\log \tau$ : Logarithmus der Kopplungseffizienz  $\tau$  durch Analyse der funktionellen Daten aus Kapitel 3.1.1 und 6.4.2 anhand des *Operational Models* (Gleichung 28) mit den stets fest vorgegebenen Parametern  $n=1$ ,  $Basal=0$ ,  $E_{max}=100$ . Der Parameter  $K_A$  wurde für jede Substanz auf den entsprechenden Wert aus Tab. 3.8 und Tab. 3.9 festgelegt, wobei gilt  $\log K_A = -pK_i$  (niedrig). Der Unterschied der Kopplungseffizienz zwischen M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Rezeptor ist bei jeder Testsubstanz signifikant (t-Test,  $p < 0,001$ ). (Rechts)  $\sigma_{lig}$ : effektive Signalwegaktivierung berechnet anhand der Kopplungseffizienzen der Testsubstanz und der Referenz Iperoxo gemäß Gleichung 31. Für die Substanz IP-C<sub>9</sub> lagen keine Daten für den M<sub>2</sub>-Rezeptor vor. IP-C<sub>10</sub> wurde nicht berücksichtigt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler.

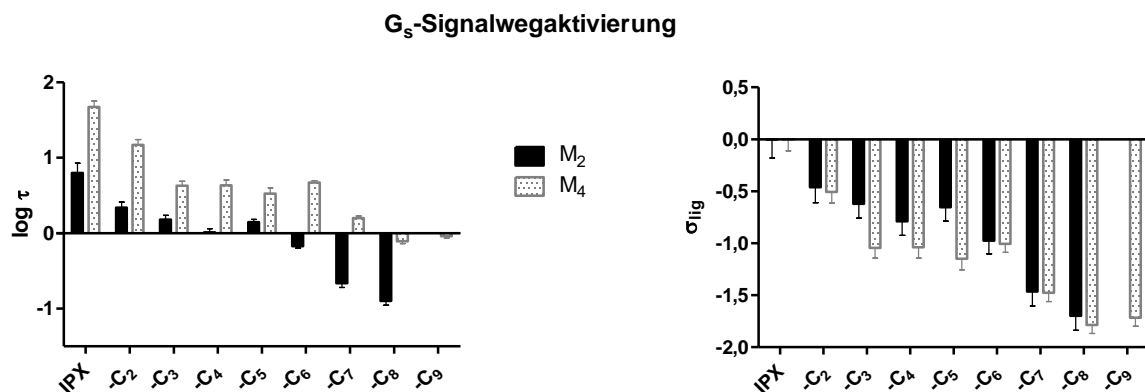
G <sub>i</sub> -Signalwegaktivierung			
M <sub>2</sub>	$\log \tau$	$\sigma_{lig}$	n <sub>Gi</sub>
IPX	2,44 $\pm$ 0,08	0 $\pm$ 0,11	7
IP-C <sub>2</sub>	2,48 $\pm$ 0,05	0,04 $\pm$ 0,09	3
IP-C <sub>3</sub>	2,23 $\pm$ 0,07	-0,21 $\pm$ 0,10	4
IP-C <sub>4</sub>	1,56 $\pm$ 0,06	-0,88 $\pm$ 0,10	6
IP-C <sub>5</sub>	1,61 $\pm$ 0,05	-0,83 $\pm$ 0,09	4
IP-C <sub>6</sub>	2,06 $\pm$ 0,05	-0,38 $\pm$ 0,09	3
IP-C <sub>7</sub>	1,72 $\pm$ 0,07	-0,72 $\pm$ 0,10	3
IP-C <sub>8</sub>	1,75 $\pm$ 0,08	-0,69 $\pm$ 0,11	3
IP-C <sub>9</sub>	wurde nicht untersucht		
M <sub>4</sub>	$\log \tau$	$\sigma_{lig}$	n <sub>Gi</sub>
IPX	1,87 $\pm$ 0,09	0 $\pm$ 0,13	9
IP-C <sub>2</sub>	1,78 $\pm$ 0,05	-0,09 $\pm$ 0,10	5
IP-C <sub>3</sub>	1,27 $\pm$ 0,05	-0,59 $\pm$ 0,10	4
IP-C <sub>4</sub>	0,48 $\pm$ 0,04	-1,39 $\pm$ 0,10	5
IP-C <sub>5</sub>	0,66 $\pm$ 0,04	-1,20 $\pm$ 0,10	3
IP-C <sub>6</sub>	0,47 $\pm$ 0,05	-1,40 $\pm$ 0,10	3
IP-C <sub>7</sub>	0,20 $\pm$ 0,04	-1,67 $\pm$ 0,10	5
IP-C <sub>8</sub>	0,15 $\pm$ 0,03	-1,71 $\pm$ 0,10	5
IP-C <sub>9</sub>	0,09 $\pm$ 0,03	-1,78 $\pm$ 0,09	3

**Tab. 3.19 Kopplungseffizienzen  $\log \tau$  und effektive Signalwegaktivierung  $\sigma_{lig} \pm$  Standardfehler der Testsubstanzen im G<sub>i</sub>-Signalweg aus Abb. 3.21.**  $n$ : Versuchsanzahl der funktionellen Experimente.

### 3.3.3.3 Kopplungseffizienz und effektive $G_s$ -Signalwegaktivierung der Iperoxo-Derivate

Die Bestimmung der Kopplungseffizienz und Berechnung der effektiven Signalwegaktivierung jedes Derivats im  $G_s$ -Signalweg erfolgte anhand der Daten aus Abschnitt 3.1.3. Die Vorgabe einzelner Parameter wurde analog zum vorangehenden Abschnitt 3.3.3.2 vorgenommen. Die Kopplungseffizienz der Referenzsubstanz Iperoxo aus Abschnitt 3.3.3.1 ist in der nachfolgenden Abbildung und Tabelle nochmals wiedergegeben.

Wie die Referenzsubstanz Iperoxo besaßen auch die Derivate eine jeweils signifikant größere Kopplungseffizienz am  $M_4$ -Rezeptor im  $G_s$ -Signalweg im Vergleich zu  $M_2$  (t-Test,  $p < 0,01$ ). Die Verlängerung des Alkyl-Substituenten ging an beiden Rezeptorsubtypen mit einer stetigen Verminderung der Kopplungseffizienz  $\log \tau$  einher.



**Abb. 3.22 Kopplungseffizienzen und effektive  $G_s$ -Signalwegaktivierung der Testsubstanzen am  $M_2$ - und  $M_4$ -Rezeptor.** (Links)  $\log \tau$ : Logarithmus der Kopplungseffizienz  $\tau$  durch Analyse der funktionellen Daten aus Kapitel 3.1.3 anhand des *Operational Models* (Gleichung 28) mit den stets fest vorgegebenen Parametern  $n=1$ ,  $Basal=0$ ,  $E_{max}=100$ . Der Parameter  $K_A$  wurde für jede Substanz auf den entsprechenden Wert aus Tab. 3.8 und Tab. 3.9 festgelegt, wobei gilt  $\log K_A = -pK_i$  (niedrig). Der Unterschied der Kopplungseffizienz zwischen  $M_2$ - und  $M_4$ -Rezeptor ist bei jeder Testsubstanz signifikant (t-Test,  $p < 0,01$ ). (Rechts)  $\sigma_{lig}$ : effektive Signalwegaktivierung berechnet anhand der Kopplungseffizienzen der Testsubstanz und der Referenz Iperoxo gemäß Gleichung 31. Am  $M_2$ -Rezeptor verhielt sich das Derivat IP-C<sub>9</sub> nicht wie ein Agonist und konnte somit nicht berücksichtigt werden, gleiches gilt für IP-C<sub>10</sub> an beiden Rezeptorsubtypen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler.



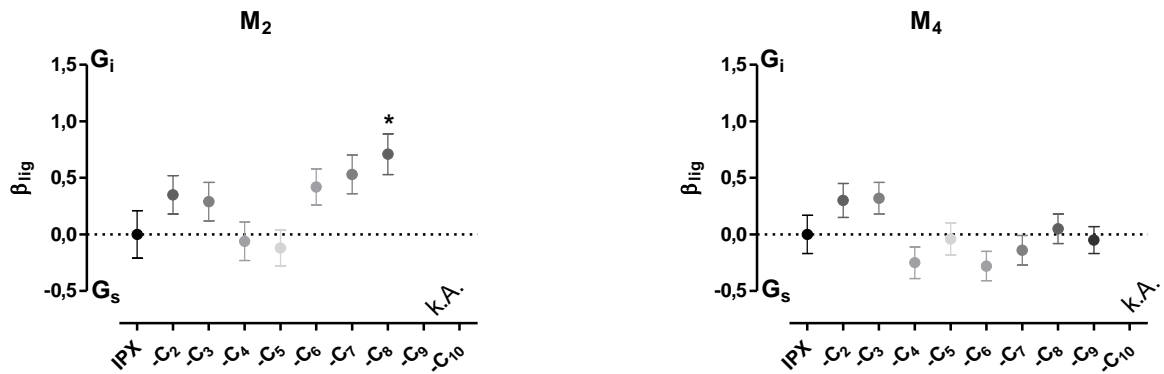
<b>G<sub>s</sub>-Signalwegaktivierung</b>			
<b>M<sub>2</sub></b>	<b>log τ</b>	<b>σ<sub>lig</sub></b>	<b>n<sub>G<sub>s</sub></sub></b>
IPX	0,80 ± 0,13	0 ± 0,18	5
IP-C <sub>2</sub>	0,34 ± 0,07	-0,46 ± 0,15	3
IP-C <sub>3</sub>	0,18 ± 0,05	-0,62 ± 0,14	3
IP-C <sub>4</sub>	0,01 ± 0,05	-0,79 ± 0,14	5
IP-C <sub>5</sub>	0,15 ± 0,04	-0,65 ± 0,13	4
IP-C <sub>6</sub>	-0,17 ± 0,02	-0,97 ± 0,13	3
IP-C <sub>7</sub>	-0,66 ± 0,06	-1,46 ± 0,14	4
IP-C <sub>8</sub>	-0,90 ± 0,06	-1,70 ± 0,14	4
IP-C <sub>9</sub>	wurde nicht untersucht		
<b>M<sub>4</sub></b>	<b>log τ</b>	<b>σ<sub>lig</sub></b>	<b>n<sub>G<sub>s</sub></sub></b>
IPX	1,68 ± 0,08	0 ± 0,11	5
IP-C <sub>2</sub>	1,17 ± 0,07	-0,51 ± 0,11	5
IP-C <sub>3</sub>	0,63 ± 0,06	-1,05 ± 0,10	6
IP-C <sub>4</sub>	0,64 ± 0,07	-1,04 ± 0,10	6
IP-C <sub>5</sub>	0,53 ± 0,07	-1,15 ± 0,11	4
IP-C <sub>6</sub>	0,67 ± 0,03	-1,01 ± 0,08	3
IP-C <sub>7</sub>	0,20 ± 0,03	-1,48 ± 0,08	3
IP-C <sub>8</sub>	-0,11 ± 0,03	-1,78 ± 0,08	3
IP-C <sub>9</sub>	-0,04 ± 0,03	-1,72 ± 0,08	3

Tab. 3.20 Kopplungseffizienzen  $\log \tau$  und effektive Signalwegaktivierung  $\sigma_{\text{lig}} \pm$  Standardfehler der Testsubstanzen im G<sub>s</sub>-Signalweg aus Abb. 3.22. *n*: Versuchsanzahl der funktionellen Experimente.

### 3.3.3.4 Bias-Faktor $\beta_{\text{lig}}$

Mit den Werten der effektiven Signalwegaktivierung  $\sigma_{\text{lig}}(G_i)$  und  $\sigma_{\text{lig}}(G_s)$  wurde anhand Gleichung 32 der Bias-Faktor  $\beta_{\text{lig}}$  jeder Testsubstanz für den M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Rezeptor berechnet. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.23 und Tab. 3.21 dargestellt.

Im Gegensatz zum M<sub>4</sub>-Rezeptor zeigten die längerkettigen *n*-Alkyl-Derivate an M<sub>2</sub> eine Tendenz zur bevorzugten G<sub>i</sub>-Signalwegaktivierung. Ein signifikanter Unterschied zur Referenz-substanz Iperoxo konnte jedoch nur für das Derivat IP-C<sub>8</sub> am M<sub>2</sub>-Rezeptor festgestellt werden (ANOVA mit  $p < 0,05$  und anschließendem Dunnett-post-Test mit  $p < 0,05$ ). Am M<sub>4</sub>-Rezeptor bestand kein Unterschied zwischen den Bias-Faktoren der Referenz und den Derivaten (ANOVA mit  $p > 0,05$ ).



**Abb. 3.23 Bias-Faktoren  $\beta_{lig}$  der *n*-Alkyl-Derivate im Vergleich zur Referenzsubstanz Iperoxo am  $M_2$ - bzw.  $M_4$ -Rezeptor.** Die Berechnung von  $\beta_{lig}$  erfolgte anhand der effektiven  $G_I$ - und  $G_S$ -Signalwegaktivierung (s. Tab. 3.19 und Tab. 3.20) nach Gleichung 32. Positive  $\beta_{lig}$ -Werte zeigen eine  $G_I$ -Signalwegselektivität an, negative hingegen eine Bevorzugung des  $G_S$ -Signalwegs. Die Referenzsubstanz Iperoxo definiert dabei den Nullwert, d.h. ein neutrales Verhalten bzgl. der Signalwegselektivität. \*: signifikant unterschiedlich zur Referenzsubstanz Iperoxo (ANOVA mit  $p < 0,05$  und anschließendem Dunnett-post-Test mit  $p < 0,05$ ). k.A.: keine Angaben.

Test-substanz	$\beta_{lig}$			
	$M_2$	n	$M_4$	$n_{gesamt}$
IPX	$0 \pm 0,21$	12	$0 \pm 0,17$	14
IP-C <sub>2</sub>	$0,35 \pm 0,17$	6	$0,30 \pm 0,15$	10
IP-C <sub>3</sub>	$0,29 \pm 0,17$	7	$0,32 \pm 0,14$	10
IP-C <sub>4</sub>	$-0,06 \pm 0,17$	10	$-0,25 \pm 0,14$	11
IP-C <sub>5</sub>	$-0,12 \pm 0,16$	8	$0,04 \pm 0,14$	7
IP-C <sub>6</sub>	$0,42 \pm 0,16$	6	$-0,28 \pm 0,13$	6
IP-C <sub>7</sub>	$0,53 \pm 0,17$	7	$-0,14 \pm 0,13$	8
IP-C <sub>8</sub>	$*0,71 \pm 0,18$	7	$0,05 \pm 0,13$	8
IP-C <sub>9</sub>	wurde nicht untersucht		$-0,05 \pm 0,12$	6

**Tab. 3.21 Bias-Faktor  $\beta_{lig} \pm$  Standardfehler aus Abb. 3.23.** \*: signifikant unterschiedlich zur Referenzsubstanz Iperoxo (ANOVA mit  $p < 0,05$  und anschließendem Dunnett-post-Test mit  $p < 0,05$ ).

### 3.4 Gleichzeitige Untersuchung der G<sub>i</sub>- und G<sub>s</sub>-Stimulation in einem Testsystem

Der Wechsel von inhibitorischen zu stimulatorischen Effekten bezüglich der cAMP-Bildung in CHO-Zellen mit steigender Konzentration des Agonisten Carbachol ist für M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Rezeptoren beschrieben worden (z.B. Vogel et al., 1995; Jakubik et al., 1996). Ebenso gilt für das Auftreten dieser biphasischen Effekte bei beiden Subtypen eine Abhängigkeit von der Rezeptordichte der Zellen (Dittman et al., 1994; Michal et al., 2001).

Im Folgenden sollte zunächst festgestellt werden, ob die Hemmung und Aktivierung der cAMP-Produktion in den beiden hM<sub>2</sub>- bzw. hM<sub>4</sub>-exprimierenden FlpIn<sup>TM</sup>-CHO-Zelllinien bei Anwendung des kommerziellen cAMP-Analysesets (K1) innerhalb eines Experiments untersucht werden kann. Anschließend sollten Iperoxo und ausgewählte *n*-Alkyl-Derivate von Iperoxo mit dem Testsystem evaluiert werden. Anhand dieser Datengrundlage wurde anschließend ein Bias-Faktor berechnet.

#### 3.4.1 Evaluierung des Testsystems

Die Versuche erfolgten stets parallel an suspendierten Flp-In<sup>TM</sup>-hM<sub>2</sub>- bzw. -hM<sub>4</sub>-CHO-Zellen wie im Methodenabschnitt 2.1.2.3 beschrieben.

Im Vorfeld musste neben der optimalen Zellzahl zunächst eine geeignete Forskolin-Konzentration gewählt werden, um durch Stimulation der Adenylatcyclase die G<sub>i</sub>-vermittelte Hemmung der cAMP-Produktion messbar zu machen. In der Regel sind erste Anhaltspunkte dafür der EC<sub>50</sub>- und EC<sub>80</sub>-Wert der Konzentration-Effekt-Kurve von Forskolin, welche in den verwendeten Zellen bei ca. 5 bzw. 10 µM lagen (siehe Abschnitt 6.5.3 im Anhang). Es hat sich jedoch gezeigt, dass bei Einsatz von 10 µM Forskolin eine robuste Messung der G<sub>i</sub>-Aktivierung an FlpIn<sup>TM</sup>-hM<sub>2</sub>-CHO-Zellen mit dem cAMP-Analyseset (K1) nicht möglich war (mündliche Mitteilung T. Bödefeld und F. Krebs, Arbeitskreis Prof. Mohr). Anhand von Vorversuchen konnte festgestellt werden, dass die Messwerte, wie in den Herstellerangaben des cAMP-Analysesets (K1) gefordert, im unteren linearen Bereich der cAMP-Standardkurve lagen, wenn 10.000 Zellen pro Datenpunkt mit 1 µM Forskolin stimuliert wurden. Einige Versuche wurden mit einer kleineren Forskolin-Konzentration von 0,3 µM durchgeführt, um den Effekt der direkten Enzym-Stimulation zu minimieren. Unter ähnlichen Bedingungen wurden ebenfalls Forskolin-Konzentrationen zwischen 0,3 und 1 µM für Versuche an CHO K1-Zellen, die den 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor exprimierten, angegeben (Tecan Trading AG, 2007).

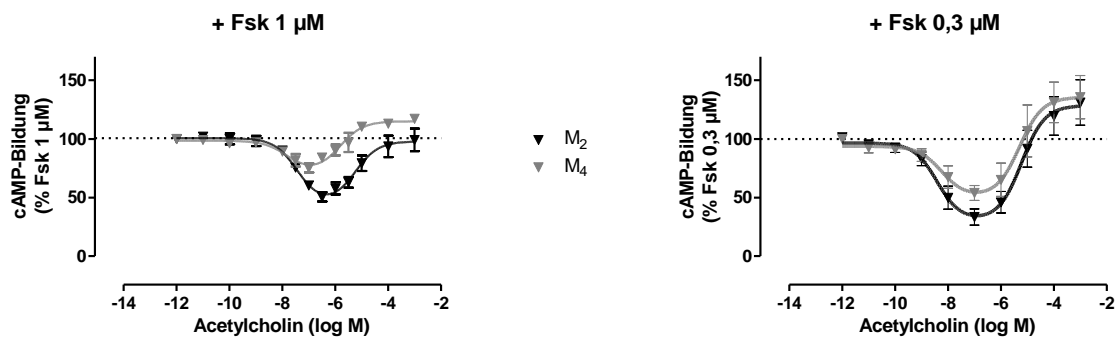
Des Weiteren erfolgte der Einsatz des inversen Agonisten Atropin in supramaximaler Konzentration an jedem Versuchstag zum Ausschluss einer spontanen Rezeptoraktivität, welche die Ergebnisse hätte beeinflussen können.

Für jeden Einzelversuch wurde untersucht, ob ein monophasischer (Gleichung 15) oder glockenförmiger (biphasischer) Kurvenverlauf nach Gleichung 16 besser zur Datenauswertung geeignet war. Im Folgenden beruht die graphische Darstellung der Ergebnisse auf den normierten und zusammengeführten Mittelwerten der Einzelerperimente. Die Kenngrößen der Hemmung und Stimulation der cAMP-Bildung, pIC<sub>50</sub> und pEC<sub>50</sub>, sowie die zugehörigen Maximaleffekte sind tabellarisch wiedergegeben.

### 3.4.1.1 Acetylcholin induzierte einen biphasischen Verlauf der cAMP-Bildung

Bei Einsatz des endogenen Liganden Acetylcholin zeigte sich ein biphasischer Verlauf der intrazellulären cAMP-Bildung, wenn 1 oder 0,3  $\mu\text{M}$  Forskolin (Fsk) zur Adenylatcyclase-Stimulation eingesetzt wurden. Es wurde auch mit der niedrigeren Forskolin-Konzentration kein kompletter Rückgang der cAMP-Bildung auf Basalniveau (0 % der Forskolin-induzierten cAMP-Bildung) erreicht, jedoch nahmen die  $\text{IC}_{50}$ -Werte um ca. 0,5 bzw. 1 Dekade ab. In der  $\text{M}_4$ -Zell-Linie zeigte sich ein kleinerer inhibitorischer Effekt im Vergleich zu  $\text{M}_2$ , welcher bei Messung mit 1  $\mu\text{M}$  Forskolin signifikant war (t-Test,  $p < 0,05$ ). Auch erschien Acetylcholin um 0,8 Dekaden wirksamer bezüglich der Stimulation der cAMP-Produktion (t-Test mit  $p < 0,05$ ) am  $\text{M}_4$ -Rezeptor und führte in Konzentrationen über 10  $\mu\text{M}$  zu höheren cAMP-Spiegeln als 1  $\mu\text{M}$  Forskolin alleine. Diese Unterschiede wurden jedoch bei Messung mit 0,3  $\mu\text{M}$  Forskolin eliminiert und in beiden Zell-Linien war eine cAMP-Produktion über das Anfangsniveau hinaus zu beobachten.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Inhibition und Stimulation der cAMP-Generierung in den verwendeten Zell-Linien konzentrationsabhängig messbar war, jedoch eine deutliche Abhängigkeit der Ergebnisse von der eingesetzten Forskolin-Konzentration bestand.



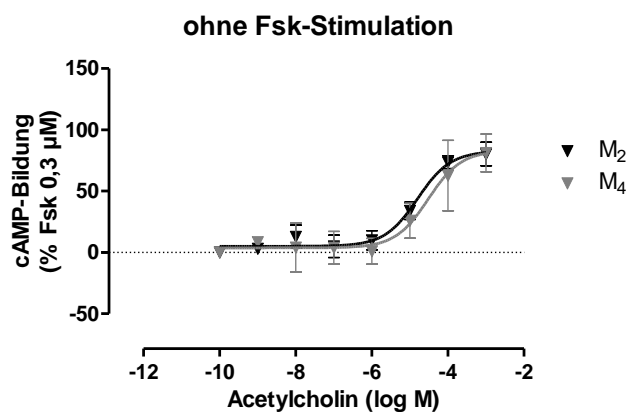
**Abb. 3.24 Acetylcholin-induzierte Hemmung und Stimulation der cAMP-Produktion in  $\text{hM}_2$ - bzw.  $\text{hM}_4$ -exprimierenden Flp-In<sup>TM</sup>-CHO-Zellen bei Einsatz von 1 bzw. 0,3  $\mu\text{M}$  Forskolin (Fsk).** Ordinate: prozentuale cAMP-Bildung normiert auf den Effekt von 1  $\mu\text{M}$  bzw. 0,3  $\mu\text{M}$  Forskolin als 100 % und den Basalwert (ohne Forskolin) als 0 %. Abszisse: dekadischer Logarithmus der molaren Testsubstanz-Konzentration. Kurvenanpassung: Glockenfunktion (Gleichung 16) mit vorgegebenen Hill-Koeffizienten  $n_{\text{H},1} = -1$  und  $n_{\text{H},2} = 1$ . Datenpunkte: Mittelwert  $\pm$  Standardfehler aus 3-8 unabhängigen Experimenten, jeweils in Zweifachbestimmung. In beiden Zell-Linien lag keine mittels Atropin messbare Rezeptorspontantaktivität vor.

Acetylcholin	Effekt (% Fsk 1 $\mu\text{M}$ )			$\text{pIC}_{50}$	$\text{pEC}_{50}$	n
	$\text{Plateau}_{\text{start}}$	Minimum	$\text{Plateau}_{\text{Ende}}$			
$\text{M}_2$	101 $\pm$ 7	53 $\pm$ 8	98 $\pm$ 4	7,43 $\pm$ 0,24	5,25 $\pm$ 0,24	8
$\text{M}_4$	98 $\pm$ 4	*78 $\pm$ 5	**114 $\pm$ 2	7,76 $\pm$ 0,36	5,83 $\pm$ 0,20	6
Acetylcholin	Effekt (% Fsk 0,3 $\mu\text{M}$ )			$\text{pIC}_{50}$	$\text{pEC}_{50}$	n
	$\text{Plateau}_{\text{start}}$	Minimum	$\text{Plateau}_{\text{Ende}}$			
$\text{M}_2$	97 $\pm$ 14	35 $\pm$ 18	129 $\pm$ 9	8,41 $\pm$ 0,38	5,22 $\pm$ 0,26	5
$\text{M}_4$	94 $\pm$ 14	55 $\pm$ 37	136 $\pm$ 9	8,24 $\pm$ 0,58	5,29 $\pm$ 0,34	3

**Tab. 3.22 Kenngrößen  $\pm$  Standardfehler der Acetylcholin-induzierten cAMP-Produktion aus Abb. 3.24.** Der Verlauf der Konzentrations-Effekt-Kurve ist durch das linke Anfangsplateau bei niedrigen Acetylcholin-Konzentrationen ( $\text{Plateau}_{\text{start}}$ ), das *Minimum* und das rechte Plateau bei hohen Konzentrationen ( $\text{Plateau}_{\text{Ende}}$ ) charakterisiert  $\text{pIC}_{50}$ : negativer dekadischer Logarithmus der molaren Acetylcholin-Konzentration beim halbmaximalen inhibitorischen Effekt.  $\text{pEC}_{50}$ : negativer dekadischer Logarithmus der molaren Acetylcholin-Konzentration beim halbmaximalen stimulatorischen Effekt. n: Anzahl unabhängiger Experimente. \* bzw. \*\*: signifikant unterschiedlich zum jeweiligen Wert der  $\text{M}_2$ -Zell-Linie (t-Test,  $p < 0,05$  bzw. 0,01).

### 3.4.1.2 Acetylcholin und Iperoxo stimulierten die cAMP-Bildung ohne Forskolin-Zusatz

Um zu überprüfen, ob in Abwesenheit von Forskolin eine Stimulation der cAMP-Bildung stattfindet, wurden die Vollagonisten Acetylcholin und Iperoxo eingesetzt. Die Messwerte wurden auf die basale cAMP-Akkumulation als 0 % und die durch 0,3  $\mu\text{M}$  Forskolin induzierte cAMP-Produktion normiert und anhand der Vier-Parameter-logistischen Gleichung (Gleichung 15) analysiert. Wie in Abb. 3.25 und Abb. 3.26 zu sehen ist, führten beide Agonisten zu einer konzentrationsabhängigen Stimulation der Botenstoffproduktion auf das durch 0,3  $\mu\text{M}$  Forskolin hervorgerufene Niveau. Die jeweiligen Wirksamkeiten unterschieden sich nicht in beiden Zell-Linien. Iperoxo zeigte jedoch eine um drei Dekaden höhere Wirksamkeit als der endogene Ligand. Durch Einsatz von 30 nM Atropin in Anwesenheit steigender Iperoxo-Konzentrationen verschoben sich die Konzentrations-Effekt-Kurven signifikant um ca. 1,5 Dekaden zu höheren Agonist-Konzentrationen (F-Test,  $p < 0,05$ , siehe Abb. 3.26).

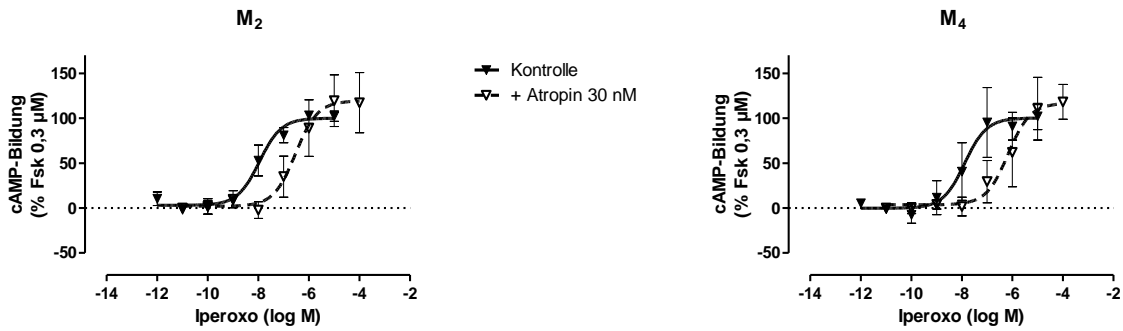


**Abb. 3.25 Acetylcholin-induzierte Stimulation der cAMP-Produktion in  $hM_2$ - bzw.  $hM_4$ -exprimierenden Flp-In<sup>TM</sup>-CHO-Zellen in Abwesenheit von Forskolin.** Ordinate: prozentuale cAMP-Bildung normiert auf den Effekt von 0,3  $\mu\text{M}$  Forskolin als 100 % und den Basalwert (ohne Forskolin und Agonist) als 0 %. Abszisse: dekadischer Logarithmus der molaren Testsubstanz-Konzentration. Kurvenanpassung: Vier-Parameter-logistische Gleichung (Gleichung 15) mit konstantem Hill-Koeffizient  $n_H=1$ , da die freilaufende Kurvensteilheit nicht signifikant von 1 abwich (F-Test,  $p > 0,05$ ). Datenpunkte: Mittelwert  $\pm$  Standardfehler aus je 3 unabhängigen Experimenten, jeweils in Zweifachbestimmung.

Acetylcholin	ohne Fsk-Stimulation		
	$pEC_{50}$	$E_{max}$ (% Fsk 0,3 $\mu\text{M}$ )	n
$M_2$	$4,79 \pm 0,18$	$83 \pm 6$	3
$M_4$	$4,52 \pm 0,42$	$83 \pm 12$	3

**Tab. 3.23 Kenngrößen  $\pm$  Standardfehler der Acetylcholin-induzierten cAMP-Bildung aus Abb. 3.25.**  $pEC_{50}$ : negativer dekadischer Logarithmus der molaren Acetylcholin-Konzentration beim halbmaximalen Effekt.  $E_{max}$ : Maximaleffekt entsprechend dem oberen Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve nach Normierung auf 0,3  $\mu\text{M}$  Forskolin als 100 % und den Basalwert als 0 %. n: Anzahl unabhängiger Experimente. In jedem Einzelexperiment war der Hill-Koeffizient nicht signifikant verschieden von 1 (F-Test,  $p > 0,05$ ).

ohne Fsk-Stimulation



**Abb. 3.26** Iperoxo-induzierte Stimulation der cAMP-Produktion in hM<sub>2</sub>- bzw. hM<sub>4</sub>-exprimierenden Flp-In<sup>TM</sup>-CHO-Zellen in Abwesenheit von Forskolin und Wechselwirkung mit Atropin. Ordinate: prozentuale cAMP-Bildung normiert auf den Effekt von 0,3 µM Forskolin als 100 % und den Basalwert (ohne Forskolin und Agonist) als 0 %. Abszisse: dekadischer Logarithmus der molaren Testsubstanz-Konzentration. Kurvenanpassung: Vier-Parameter-logistische Gleichung (Gleichung 15) mit konstantem Hill-Koeffizient n<sub>H</sub>=1, da die freilaufende Kurvensteilheit nicht signifikant von 1 abwich (F-Test, p>0,05). Datenpunkte: Mittelwert ± Standardfehler aus je 4 unabhängigen Experimenten, jeweils in Zweifachbestimmung.

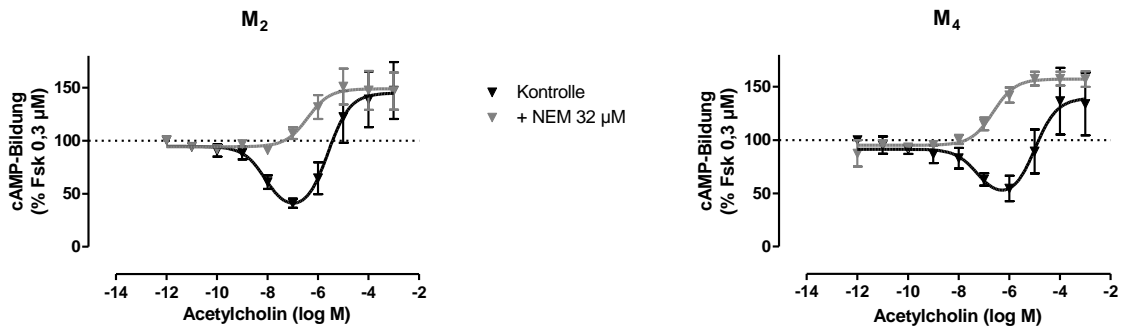
Iperoxo	M <sub>2</sub> ohne Fsk-Stimulation		M <sub>4</sub> ohne Fsk-Stimulation		n
	pEC <sub>50</sub>	E <sub>max</sub> (% Fsk 0,3 µM)	pEC <sub>50</sub>	E <sub>max</sub> (% Fsk 0,3 µM)	
Kontrolle	7,95 ± 0,16	100 ± 5	7,88 ± 0,39	100 ± 16	4
+ Atropin	6,52 ± 0,37	119 ± 15	6,16 ± 0,33	117 ± 16	4

**Tab. 3.24** Kenngrößen ± Standardfehler der Iperoxo-induzierten cAMP-Bildung mit und ohne Atropin aus Abb. 3.26. pEC<sub>50</sub>: negativer dekadischer Logarithmus der molaren Iperoxo-Konzentration beim halbmaximalen Effekt. E<sub>max</sub>: Maximaleffekt entsprechend dem oberen Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve nach Normierung auf 0,3 µM Forskolin als 100 % und den Basalwert als 0 %. n: Anzahl unabhängiger Experimente. In jedem Einzelexperiment war der Hill-Koeffizient nicht signifikant verschieden von 1 (F-Test, p>0,05).

### 3.4.1.3 NEM inaktivierte die G<sub>r</sub>-stimulierten Effekte

Das Alkylans N-Ethylmaleimid (NEM) wurde verwendet, um inhibitorische G-Proteine auszuschalten (siehe Methodenteil 2.1.2.4). Es greift an gleicher Stelle wie das Toxin PTX an, welches in vorliegender Arbeit zur isolierten Untersuchung des G<sub>s</sub>-Signalwegs genutzt wurde (vgl. Kapitel 3.1.3). An dieser Stelle erfolgte der Einsatz von NEM jedoch in Hinblick auf die *ex-vivo* Untersuchungen mittels Superfusionsmethode (Kapitel 3.5.2), in denen es als kostengünstigere und zeiteffiziente Alternative zu PTX genutzt wurde.

Wie in Abb. 3.27 zu sehen, entsprach die Wirkung von Acetylcholin in den Kontrollen den zuvor in Abschnitt 3.4.1.1 beschriebenen Werten bei Stimulation der cAMP-Generierung mit 0,3 µM Forskolin. Die Behandlung mit NEM führte in beiden Zell-Linien zum Verlust der inhibitorischen Komponente, sodass die Konzentrations-Effekt-Kurven einen monophasischen Verlauf gemäß Vier-Parameter-logistischer Gleichung (Gleichung 15) zeigten. Gegenüber der Kontrolle verschob sich dabei der pEC<sub>50</sub>-Wert der cAMP-Stimulation um 0,8 Dekaden in der M<sub>2</sub>-Zell-Linie, was jedoch nicht statistisch signifikant war (t-Test, p>0,05). In den M<sub>4</sub>-Zellen hingegen war eine signifikante Linksverschiebung von 1,6 Dekaden zu beobachten (t-Test, p<0,01). Die maximale Acetylcholin-induzierte cAMP-Bildung erreichte in den Kontrollen sowie den NEM-behandelten Zellen das gleiche Niveau.



**Abb. 3.27** Einfluss von N-Ethylmaleimid (NEM) auf die Acetylcholin-induzierten Hemmung und Stimulation der cAMP-Produktion in hM<sub>2</sub>- bzw. hM<sub>4</sub>-exprimierenden Flp-In<sup>TM</sup>-CHO-Zellen bei Einsatz von 0,3 μM Forskolin. Ordinate: prozentuale cAMP-Bildung normiert auf den Effekt von 0,3 μM Forskolin als 100 % und den Basalwert (ohne Forskolin) als 0 %. Abszisse: dekadischer Logarithmus der molaren Acetylcholin-Konzentration. Kurvenanpassung: Glockenfunktion (Gleichung 16) mit vorgegebenen Hill-Koeffizienten  $n_{H-1}=-1$  und  $n_{H-2}=1$  gilt für die Kontrolle während bei NEM-Behandlung die Vier-Parameter-logistische Gleichung (Gleichung 15) mit  $n_H=1$  besser geeignet war. Datenpunkte: Mittelwert ± Standardfehler aus 7 (M<sub>2</sub>) bzw. 6 (M<sub>4</sub>) Experimenten, jeweils in Zweifachbestimmung. In beiden Zell-Linien lag keine mittels Atropin messbare Rezeptorspontanktivität vor.

M <sub>2</sub>	Acetylcholin-Effekt (% Fsk 0,3 μM)			pIC <sub>50</sub>	pEC <sub>50</sub>	n
	Plateau <sub>start</sub>	Minimum	Plateau <sub>Ende</sub>			
Kontrolle	95 ± 18	41 ± 28	145 ± 11	8,08 ± 0,64	5,60 ± 0,38	7
+ NEM	94 ± 4	k. A.	149 ± 6	k. A.	6,40 ± 0,37	7
M <sub>4</sub>	Acetylcholin-Effekt (% Fsk 0,3 μM)			pIC <sub>50</sub>	pEC <sub>50</sub>	n
	Plateau <sub>start</sub>	Minimum	Plateau <sub>Ende</sub>			
Kontrolle	92 ± 18	53 ± 31	140 ± 14	7,24 ± 0,90	4,98 ± 0,45	6
+ NEM	95 ± 3	k. A.	157 ± 3	k. A.	**6,63 ± 0,16	6

**Tab. 3.25** Kenngrößen ± Standardfehler der Acetylcholin-induzierten cAMP-Bildung mit und ohne NEM-Behandlung aus Abb. 3.27. Der biphasische Verlauf der Konzentrations-Effekt-Kurve der Kontrollen ist durch das linke Anfangsplateau bei niedrigen Acetylcholin-Konzentrationen (Plateau<sub>start</sub>), das Minimum und das rechte Plateau bei hohen Konzentrationen (Plateau<sub>Ende</sub>) charakterisiert. Bei NEM-Behandlung ist der Kurvenverlauf monophasisch und daher nur durch das obere und untere Plateau sowie einen Wendepunkt gekennzeichnet. pIC<sub>50</sub>: negativer dekadischer Logarithmus der molaren Acetylcholin-Konzentration beim halbmaximalen inhibitorischen Effekt. pEC<sub>50</sub>: negativer dekadischer Logarithmus der molaren Acetylcholin-Konzentration beim halbmaximalen stimulatorischen Effekt. n: Anzahl unabhängiger Experimente. \*\*: signifikant unterschiedlich zum jeweiligen Kontroll-Wert (t-Test, p<0,01, Anmerkung: F-Test mit p<0,05).

### 3.4.2 Untersuchung von Iperoxo und ausgewählten Derivaten

Im vorangehenden Kapitel 3.4.1 wurde die Nutzbarkeit des Testsystems zur Messung der Inhibition und Stimulation der intrazellulären cAMP-Produktion festgestellt. Nun sollten Iperoxo und seine Derivate mit kurzem, mittlerem und langem Alkyl-Substituenten untersucht und mit den so gewonnenen Daten eine Bias-Berechnung vorgenommen werden. Auf Grundlage der bisher vorgestellten Ergebnisse, die in nachfolgender Tabelle kurz zusammengefasst sind, wurden Ethyl-, *n*-Butyl- und *n*-Heptylperoxo als Stellvertreter der Testsubstanzen ausgewählt.

	IP-C <sub>2</sub>	IP-C <sub>4</sub>	IP-C <sub>7</sub>
<b>Alkylkettenlänge</b>	kurz	mittel	lang
<b>G<sub>i</sub>-Signalweg</b>	geringster Wirksamkeitsverlust, Vollagonist an M <sub>2</sub> und M <sub>4</sub>	größter Wirksamkeitsverlust, Vollagonist an M <sub>2</sub> , Partialagonist an M <sub>4</sub>	Wirksamkeitsverlust, Vollagonist an M <sub>2</sub> , Partialagonist an M <sub>4</sub>
<b>G<sub>s</sub>-Signalweg</b>	geringster Wirksamkeitsverlust, Vollagonist an M <sub>2</sub> und M <sub>4</sub>	großer Wirksamkeitsverlust, Partialagonist an M <sub>2</sub> , Vollagonist an M <sub>4</sub>	Wirksamkeitsverlust, schwächerer Partialagonist an M <sub>2</sub> als an M <sub>4</sub>
<b>Bias-Faktor</b>	M <sub>2</sub> : eher G <sub>i</sub> -Bias M <sub>4</sub> : kein Bias	Kein Bias	M <sub>2</sub> : eher G <sub>i</sub> -Bias M <sub>4</sub> : kein Bias

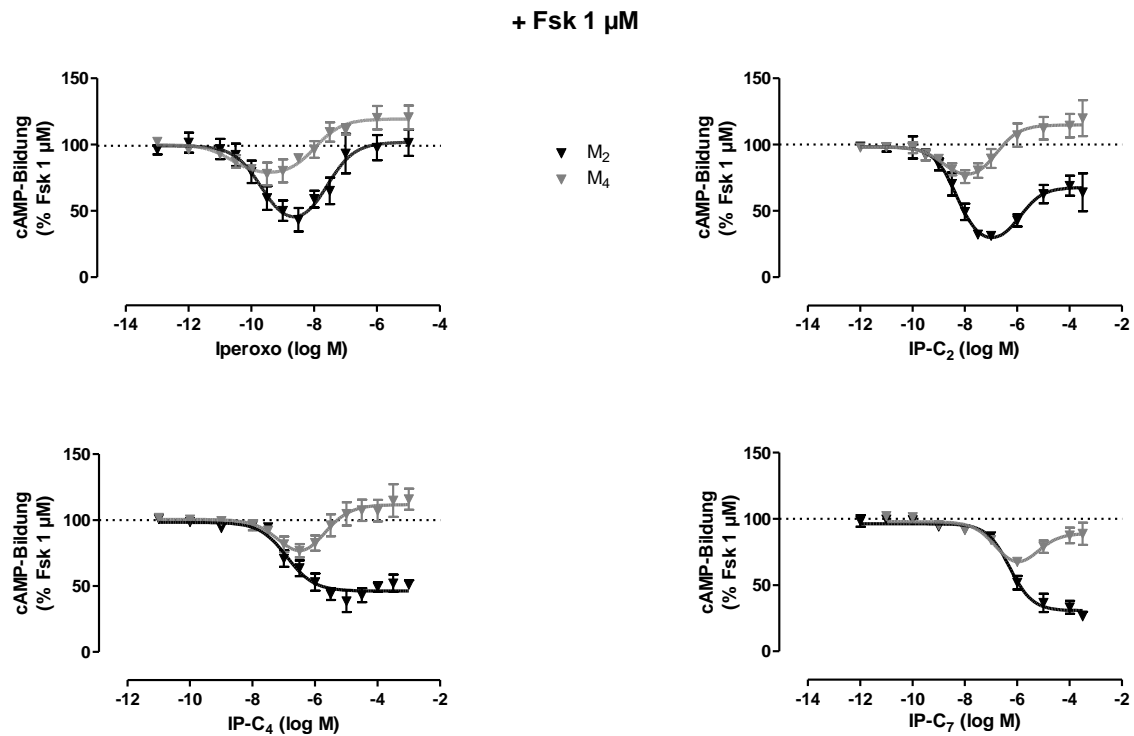
**Tab. 3.26** Charakteristika der ausgewählten Derivate im Vergleich zur Muttersubstanz Iperoxo. Die Angaben beruhen auf den Ergebnissen der Kapitel 3.1 (G<sub>i</sub>- und G<sub>s</sub>-Signalweg) und 3.3 (Bias-Faktoren) der vorliegenden Arbeit.

### 3.4.2.1 Die Verlängerung des Alkyl-Substituenten drosselte die Stimulation der cAMP-Bildung stärker am M<sub>2</sub>- als am M<sub>4</sub>-Rezeptor

Die in Anwesenheit von 1 µM Forskolin gewonnenen Daten der Muttersubstanz Iperoxo und der drei ausgewählten Testderivate sind in Abb. 3.28 zusammengestellt.

Wie bei Acetylcholin (vgl. Abschnitt 3.4.1.1) war die Hemmung der cAMP-Bildung durch Iperoxo in der M<sub>4</sub>-Zell-Linie schwächer ausgeprägt als bei den M<sub>2</sub>-exprimierenden Zellen. Ebenso wurde durch höhere Iperoxo-Konzentrationen ein höheres Niveau der cAMP-Stimulation erreicht (t-Test, p<0,05). Durch Verlängerung des Alkylrestes zu -C<sub>2</sub> wurden die Wirksamkeiten der inhibitorischen und stimulatorischen Komponente in beiden Zell-Linien jeweils um mehr als eine Dekade abgeschwächt. Während in den FlpIn<sup>TM</sup>hM<sub>4</sub>-CHO-Zellen mit IP-C<sub>2</sub> eine Stimulation der cAMP-Generierung auf Iperoxo-Niveau beobachtet werden konnte, wurde in der M<sub>2</sub>-Zell-Linie nicht mehr der Ausgangswert erreicht. Eine weitere Verlängerung der Alkylkette zu -C<sub>4</sub> führte nur noch zu sehr geringen stimulatorischen Effekten nach erfolgter Inhibition der Forskolin-induzierten cAMP-Bildung in den M<sub>2</sub>-Zellen, sodass keine Auswertung der Mittelwertskurve mittels Glockenfunktion (Gleichung 16) möglich war. Über M<sub>4</sub>-Rezeptoren wurde durch IP-C<sub>4</sub> hingegen das gleiche Minimum und Maximum der cAMP-Bildung wie bei Iperoxo erreicht. Ein verminderter stimulatorischer Effekt in den M<sub>4</sub>-Zellen zeigte sich bei IP-C<sub>7</sub> als Vertreter der länger-kettigen Alkyl-Derivate. In der M<sub>2</sub>-Zell-Linie war nur eine Inhibition der cAMP-Bildung detektierbar.





**Abb. 3.28** Testsubstanz-induzierte Hemmung und Stimulation der cAMP-Produktion in hM<sub>2</sub>- bzw. hM<sub>4</sub>-exprimierenden Flp-In<sup>TM</sup>-CHO-Zellen bei Einsatz von 1  $\mu$ M Forskolin. *Ordinate*: prozentuale cAMP-Bildung normiert auf den Effekt von 1  $\mu$ M Forskolin als 100 % und den Basalwert (ohne Forskolin) als 0 %. *Abszisse*: dekadischer Logarithmus der molaren Testsubstanz-Konzentration. *Kurvenanpassung*: Glockenfunktion (Gleichung 16) mit vorgegebenen Hill-Koeffizienten  $n_{H-1}=1$  und  $n_{H-2}=1$  bzw. bei monophasischen Verlauf mit Vier-Parameter-logistischer Gleichung (Gleichung 15) mit  $n_H=1$ . *Datenpunkte*: Mittelwert  $\pm$  Standardfehler aus 5-7 unabhängigen Experimenten, jeweils in Zweifachbestimmung. In beiden Zell-Linien lag keine mittels Atropin messbare Rezeptorspontantaktivität vor.

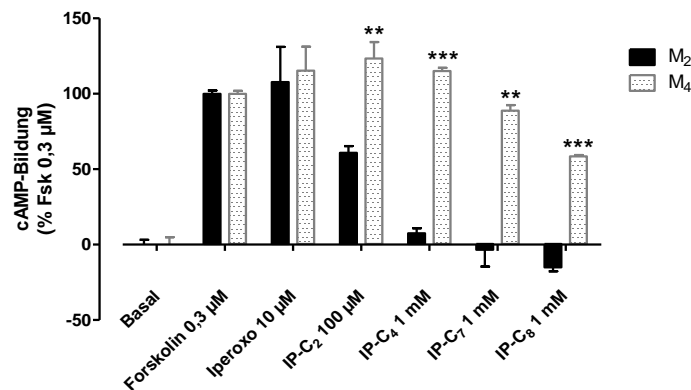
IPX	Effekt (% Fsk 1 $\mu$ M)			pIC <sub>50</sub>	pEC <sub>50</sub>	n
	Plateau <sub>Start</sub>	Minimum	Plateau <sub>Ende</sub>			
M <sub>2</sub>	99 $\pm$ 10	46 $\pm$ 14	102 $\pm$ 6	9,67 $\pm$ 0,32	7,59 $\pm$ 0,31	7
M <sub>4</sub>	100 $\pm$ 8	79 $\pm$ 7	*119 $\pm$ 4	10,6 $\pm$ 0,47	7,97 $\pm$ 0,26	7
<b>IP-C<sub>2</sub></b>						
M <sub>2</sub>	98 $\pm$ 6	30 $\pm$ 8	68 $\pm$ 4	8,30 $\pm$ 0,15	5,90 $\pm$ 0,28	6
M <sub>4</sub>	98 $\pm$ 8	**78 $\pm$ 10	***115 $\pm$ 4	8,79 $\pm$ 0,61	6,80 $\pm$ 0,42	5
<b>IP-C<sub>4</sub></b>						
M <sub>2</sub> <sup>#</sup>	98 $\pm$ 2	k. A.	46 $\pm$ 2	6,90 $\pm$ 0,13	k. A.	7
M <sub>4</sub>	101 $\pm$ 7	77 $\pm$ 9	112 $\pm$ 3	7,01 $\pm$ 0,56	5,81 $\pm$ 0,46	5
<b>IP-C<sub>7</sub></b>						
M <sub>2</sub> <sup>#</sup>	96 $\pm$ 2	k. A.	31 $\pm$ 2	6,29 $\pm$ 0,11	k. A.	5
M <sub>4</sub>	98 $\pm$ 4	68 $\pm$ 7	89 $\pm$ 3	6,76 $\pm$ 0,32	5,30 $\pm$ 0,48	6

**Tab. 3.27** Kenngrößen  $\pm$  Standardfehler der Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abb. 3.28. Biphasisch verlaufende Konzentrations-Effekt-Kurven sind durch das linke Anfangsplateau (Plateau<sub>start</sub>), das Minimum und das rechte (Plateau<sub>Ende</sub>) charakterisiert. Bei monophasischen Kurvenverlauf sind entsprechend nur das obere und untere Plateau sowie ein Wendepunkt angegeben. pIC<sub>50</sub>: negativer dekadischer Logarithmus der molaren Testsubstanz-Konzentration beim halbmaximalen inhibitorischen Effekt. pEC<sub>50</sub>: negativer dekadischer Logarithmus der molaren Testsubstanz-Konzentration beim halbmaximalen stimulatorischen Effekt. n: Anzahl unabhängiger Experimente. \*, \*\* bzw. \*\*\*: signifikant unterschiedlich zum jeweiligen M<sub>2</sub>-Wert (t-Test, p<0,05; 0,01 bzw. 0,001).

### 3.4.2.2 Maximale cAMP-Akkumulation der Iperoxo-Derivate ohne Forskolin

Anhand der Versuche aus Abb. 3.28 wurden die maximal-stimulatorisch wirksamen Konzentrationen von Iperoxo und der drei Testsubstanzen bestimmt. Zellen der Flp-In<sup>TM</sup>hM<sub>2</sub>- und -hM<sub>4</sub>-CHO-Linien wurden mit diesen Testsubstanzenkonzentrationen in Abwesenheit von Forskolin inkubiert. Zusätzlich wurde das Derivat IP-C<sub>8</sub> in hoher Konzentration getestet. Die somit ohne direkte Adenylatcyclase-Stimulation erfolgte cAMP-Produktion wurde auf den Basalwert und das durch 0,3 µM Forskolin induzierte cAMP-Niveau normiert.

Wie in Abschnitt 3.4.1.2 beschrieben, induzierte Iperoxo in beiden Zell-Linien eine gleichhohe cAMP-Bildung wie 0,3 µM Forskolin. Die Derivate zeigten ähnliche stimulatorische Maximaleffekte wie in Anwesenheit von 1 µM Forskolin (vgl. Abb. 3.28). So erreichte IP-C<sub>2</sub> ca. 60 % des Forskolin-Effektes in den M<sub>2</sub>-Zellen, während keine Veränderung gegenüber dem Iperoxo-Maximaleffekt in der M<sub>4</sub>-Linie bestand. Durch IP-C<sub>4</sub> wurde nur noch eine sehr schwache cAMP-Bildung von ca. 8 % in der M<sub>2</sub>-Linie induziert, welche sich jedoch nicht vom Basalniveau unterschied (t-Test, p>0,05). Hingegen konnten die langkettigen Derivate, IP-C<sub>7</sub> und IP-C<sub>8</sub>, noch einen M<sub>4</sub>-vermittelten stimulatorischen Effekt von 88 bzw. 58 % induzieren.



**Abb. 3.29** Testsubstanz-induzierte, maximale Stimulation der cAMP-Produktion in hM<sub>2</sub>- bzw. hM<sub>4</sub>-exprimierenden Flp-In<sup>TM</sup>-CHO-Zellen in Abwesenheit von Forskolin. Ordinate: prozentuale cAMP-Bildung normiert auf den Effekt von 0,3 µM Forskolin (Fsk) als 100 % und den Basalwert (ohne Forskolin und Agonist) als 0 %. Abszisse: untersuchte Testsubstanzen mit eingesetzter Konzentration Daten: Mittelwert ± Standardfehler aus je 3 unabhängigen Experimenten, jeweils in Zweifachbestimmung. \*\* bzw. \*\*\*: signifikant unterschiedlich zum jeweiligen Wert in der M<sub>2</sub>-Linie (t-Test mit p<0,01 bzw. 0,001).

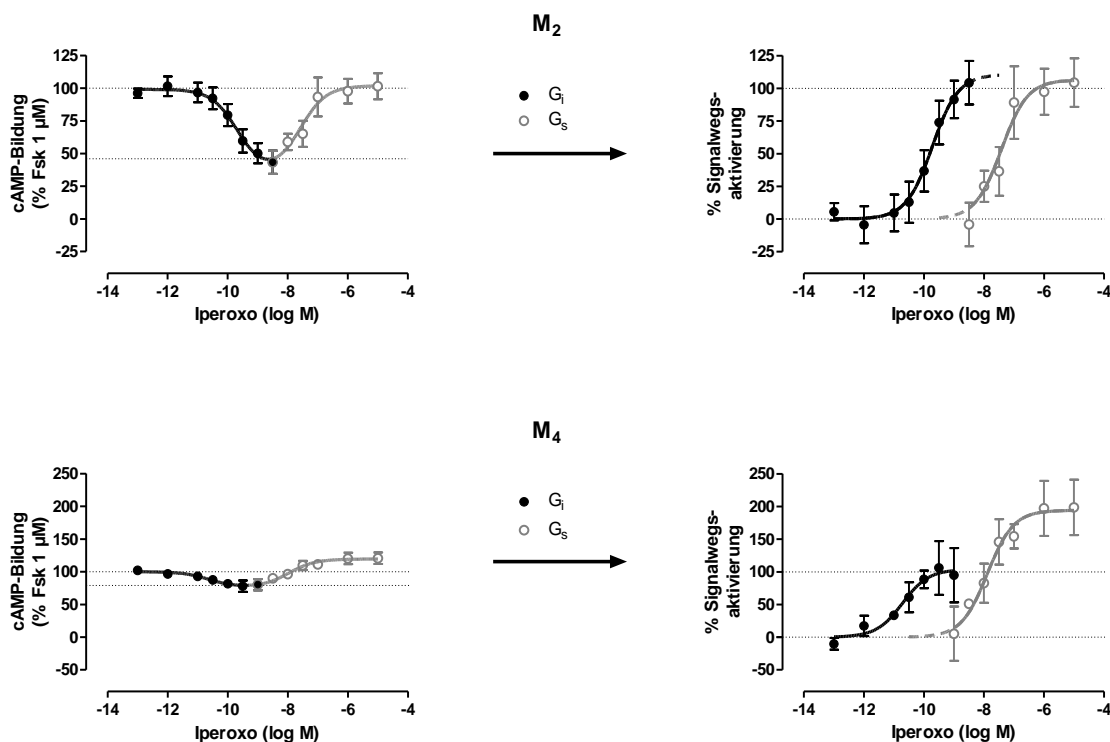
### 3.4.2.3 Getrennte Auswertung der inhibitorischen und stimulatorischen Effekte am Beispiel der Referenzsubstanz Iperoxo

Um anhand der in Abschnitt 3.4.2.1 dargestellten biphasischen Konzentrations-Effekt-Kurven der intrazellulären cAMP-Bildung den Bias-Faktor nach Gleichung 39 zu berechnen, wurden die inhibitorischen und stimulatorischen Effekte getrennt betrachtet und nach entsprechender Normierung jeweils monophasisch mit der Vier-Parameter-logistischen Gleichung (Gleichung 15) analysiert. Die somit gewonnenen Kennwerte E<sub>max</sub> und EC<sub>50</sub> dienten anschließend als Ausgangswerte zur Bestimmung von ΔΔlog(RA<sub>i</sub>). In diesem Abschnitt wird das Vorgehen zur Trennung und Umnormierung der Daten am Beispiel der Referenzsubstanz Iperoxo stellvertretend dargestellt.

Zunächst wurde entschieden, in welchem Konzentrationsbereich der Testsubstanz die Inhibition bzw. Stimulation der cAMP-Generierung stattfindet. Für den M<sub>2</sub>-Rezeptor wurde festgelegt, dass x-Werte

bis einschließlich -8,5 die  $G_i$ -Aktivierung widerspiegeln und höhere Werte als einschließlich -8,5 die  $G_s$ -Aktivität. Für den  $M_4$ -Rezeptor wurde als Grenze der x-Wert -9 festgelegt. Als Fixpunkte für die Umnormierung der Datenpunkte diente zum einen das Startplateau (99 % bei  $M_2$  und 100 % bei  $M_4$ , vgl. Tab. 3.27) und zum anderen das Minimum der Glockenfunktion von Iperoxo ( $M_2$ : 46 % und  $M_4$ : 79 %), welche in Abb. 3.30 durch gestrichelte Linien gekennzeichnet sind.

Die Daten des inhibitorischen Teils wurden auf das Startplateau als 0 % und das Minimum als 100 % der Signalwegsaktivierung normiert. Für den stimulatorischen Anteil erfolgte die Normierung in umgekehrter Weise. Bei der anschließenden Analyse der Daten mittels Vier-Parameter-logistischer Gleichung (Gleichung 15) wurden das untere Plateau auf null und der Hill-Koeffizient der  $G_i$ - und  $G_s$ -Signalwegsaktivierung auf den Wert 1 festgelegt. Die einzelnen Kennwerte dieser Auswertung sind in Tab. 3.28 zusammengefasst. Die  $pEC_{50}$ -Werte der  $G_i$ - und  $G_s$ -Signalwegsaktivierung unterscheiden sich nicht von den entsprechenden  $pIC_{50}$ - und  $EC_{50}$ -Werten bei Auswertung mittels Glockenfunktion (vgl. Tab. 3.27).



**Abb. 3.30 Veranschaulichung zum Vorgehen bei Neuauswertung der biphasischen Daten von Iperoxo an  $M_2$ - und  $M_4$ -Rezeptor.** Links: Glockenfunktionen der Referenzsubstanz Iperoxo aus Abb. 3.28 (Seite 97) mit Kennzeichnung der zur  $G_i$ - bzw.  $G_s$ -Stimulation gehörenden Datenpunkte. Der Datenpunkt für  $x=-8,5$  ( $M_2$ ) bzw.  $-9$  ( $M_4$ ) gehörte dabei sowohl zum inhibitorischen als auch zum stimulatorischen Anteil. Die Fixwerte für die Umnormierung, Startplateau und Minimum der Glockenfunktion, sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. Rechts: getrennt analysierte  $G_i$ - und  $G_s$ -Signalwegsaktivierung nach erfolgter Umnormierung. Die Kurvenanpassung erfolgte mittels Vier-Parameter-logistischer Gleichung (Gleichung 15) mit einem auf null festgelegtem unteren Plateau und den Hill-Koeffizienten  $n_H=1$ .

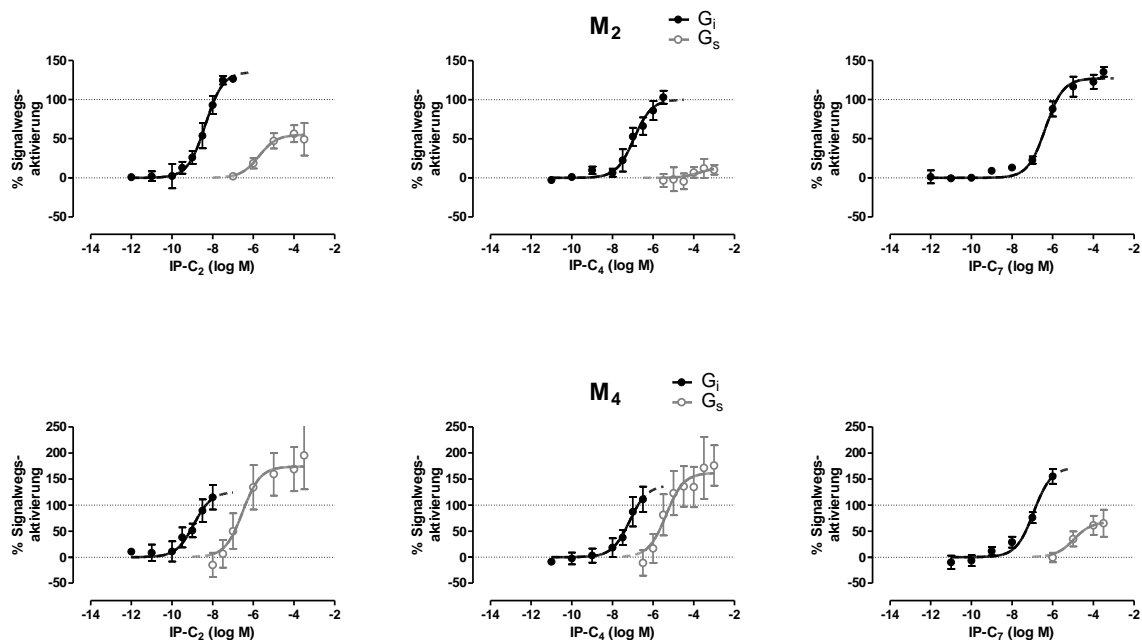
Rezeptor-subtyp	$G_i$		$G_s$	
	$E_{max}(\% \text{ IPX})$	$pIC_{50}$	$E_{max}(\% \text{ Fsk } 1 \mu\text{M})$	$pEC_{50}$
$M_2$	$111 \pm 14$	$9,72 \pm 0,20$	$106 \pm 15$	$7,42 \pm 0,27$
$M_4$	$104 \pm 19$	$10,7 \pm 0,40$	$194 \pm 22$	$7,88 \pm 0,26$

**Tab. 3.28 Kennwerte  $\pm$  Standardfehler der monophasischen Konzentrations-Effekt-Kurven von Iperoxo aus Abb. 3.30.**  $E_{max}$ : maximale Aktivierung der  $G_i$ - bzw.  $G_s$ -Signalwegs bezogen auf den jeweiligen Maximalwert der Referenzsubstanz Iperoxo bzw. Forskolin  $1 \mu\text{M}$ .  $pEC_{50}$ : negativer dekadischer Logarithmus der Iperoxo-Konzentration bei halbmaximaler Aktivierung des  $G_i$ - bzw.  $G_s$ -Signalwegs.

### 3.4.2.4 Getrennte Auswertung der Testsubstanz-induzierten inhibitorischen und stimulatorischen Effekte

In analoger Weise wie im vorangehenden Abschnitt beschrieben, wurden die Daten der Iperoxo-Derivate aus Abb. 3.28 in  $G_i$ - und  $G_s$ -vermittelte Anteile getrennt, normiert und mittels Vier-Parameter-logistischer Gleichung ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.31 und Tab. 3.30 zusammengestellt. Um die volle Höhe der  $G_s$ -Signalwegsaktivierung nicht zu unterschätzen, wurde bei den Derivaten IP-C<sub>2</sub> am M<sub>2</sub>-Rezeptor sowie IP-C<sub>7</sub> am M<sub>4</sub>-Rezeptor nicht das durch die Referenzsubstanz Iperoxo erreichte Minimum zur Normierung zugrunde gelegt, sondern abweichend davon das jeweils erreichte Minimum der Substanzen im Testsystem (30 % für IP-C<sub>2</sub> an M<sub>2</sub> und 68 % für IP-C<sub>7</sub> an M<sub>4</sub>, vgl. Tab. 3.27).

Die monophasische Analyse des  $G_i$ -vermittelten Anteils lieferte bei allen Derivaten gleiche Wendepunkte wie bei Auswertung mittels Glockenfunktion (vgl.  $G_i$ -pEC<sub>50</sub> aus Tab. 3.29 mit entsprechenden IC<sub>50</sub> in Tab. 3.27). Eine Stimulation der cAMP-Bildung war im M<sub>4</sub>-Testsystem mit allen drei Testsubstanzen messbar und die mittels Glockenfunktion bestimmten pEC<sub>50</sub>-Werte entsprachen den hier bei isolierter Betrachtung des  $G_s$ -Signalwegs gefundenen Wirksamkeiten. Am M<sub>2</sub>-Rezeptor hatte zuvor nur Ethylperoxo eine deutliche Stimulation der cAMP-Bildung gezeigt (vgl. Abb. 3.28) und durch die erneute Auswertung wurde der gleiche Wendepunkt erhalten. Nach Normierung höherer Konzentrationen ( $\geq 30 \mu\text{M}$ ) der Testsubstanz *n*-Butylperoxo und Analyse dieser Werte mittels Vier-Parameter-logistischer Gleichung konnte eine schwache, konzentrationsabhängige  $G_s$ -Signalwegsaktivierung mit einem pEC<sub>50</sub>-Wert von ca. 3,7 festgestellt werden. Hingegen lag keine M<sub>2</sub>-vermittelte  $G_s$ -Aktivierung für *n*-Heptylperoxo vor, sodass hier nur die Aktivierung des  $G_i$ -Signalwegs dargestellt werden konnte.



**Abb. 3.31** Getrennte Auswertung der  $G_i$ - und  $G_s$ -vermittelten Anteile der Glockenfunktionen aus Abb. 3.28. Bei IP-C<sub>2</sub> wurden Konzentrationen  $\leq 100 \text{ nM}$  (M<sub>2</sub>) bzw.  $10 \text{ nM}$  (M<sub>4</sub>) der  $G_i$ -Aktivierung zugeordnet, bei höheren Konzentrationen der  $G_s$ -Aktivierung. Bei IP-C<sub>4</sub> erfolgte die Trennung bei  $3$  bzw.  $0,3 \mu\text{M}$  (M<sub>2</sub> bzw. M<sub>4</sub>). Am M<sub>4</sub>-Rezeptor wurden bei IP-C<sub>7</sub> Konzentrationen  $\geq 1 \mu\text{M}$  dem stimulatorischen Anteil zugeordnet. Die Normierung erfolgte mit dem Startplateau der jeweiligen Glockenfunktion und dem durch Iperoxo induzierten Minimum als Fixpunkte. Abweichend davon wurde der  $G_s$ -vermittelte Anteil der Substanz IP-C<sub>2</sub> am M<sub>2</sub>-Rezeptor und IP-C<sub>7</sub> am M<sub>4</sub>-Subtyp auf das Minimum der jeweiligen Glockenfunktion normiert. Die Kurvenanpassung erfolgte mittels Vier-Parameter-logistischer Gleichung (Gleichung 15) mit einem auf null festgelegtem unteren Plateau und den Hill-Koeffizienten  $n_H=1$ .

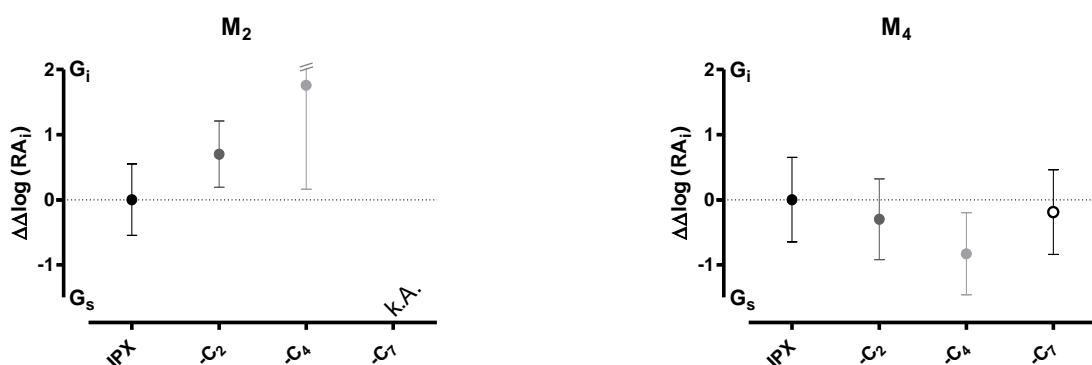
M <sub>2</sub>	G <sub>i</sub>		G <sub>s</sub>	
	E <sub>max</sub> (% IPX)	pEC <sub>50</sub>	E <sub>max</sub> (% Fsk 1 μM)	pEC <sub>50</sub>
IP-C <sub>2</sub>	136 ± 7	8,36 ± 0,10	55 ± 7	5,72 ± 0,29
IP-C <sub>4</sub>	100 ± 7	6,94 ± 0,14	14 ± 13	3,72 ± 1,23
IP-C <sub>7</sub>	127 ± 4	6,35 ± 0,10	keine Auswertung möglich	
M <sub>4</sub>	G <sub>i</sub>		G <sub>s</sub>	
	E <sub>max</sub> (% IPX)	pEC <sub>50</sub>	E <sub>max</sub> (% Fsk 1 μM)	pEC <sub>50</sub>
IP-C <sub>2</sub>	126 ± 21	8,92 ± 0,24	174 ± 22	6,52 ± 0,36
IP-C <sub>4</sub>	138 ± 32	7,16 ± 0,29	162 ± 21	5,36 ± 0,31
IP-C <sub>7</sub>	172 ± 15	6,93 ± 0,14	68 ± 15	4,96 ± 0,45

**Tab. 3.29 Kennwerte ± Standardfehler der monophasischen Konzentrations-Effekt-Kurven der Iperoxo-Derivate aus Abb. 3.31.** E<sub>max</sub>: maximale Aktivierung der G<sub>i</sub>- bzw. G<sub>s</sub>-Signalwegs bezogen auf den jeweiligen Maximalwert der Referenzsubstanz Iperoxo bzw. Forskolin 1 μM. pEC<sub>50</sub>: negativer dekadischer Logarithmus der Testsubstanz-Konzentration bei halbmaximaler Aktivierung des G<sub>i</sub>- bzw. G<sub>s</sub>-Signalwegs.

### 3.4.2.5 Berechnung der Bias-Faktors $\Delta\Delta\log(RA_i)$

Anhand der EC<sub>50</sub>- und E<sub>max</sub>-Werte aus den Tab. 3.28 und

Tab. 3.29 wurden mit Gleichung 39 die Bias-Faktoren  $\Delta\Delta\log(RA_i)$  für die ausgewählten Testsubstanzen mit Iperoxo als Referenzsubstanz berechnet. Aufgrund der fehlenden Aktivierung des zweiten Signalwegs konnte für *n*-Heptylperoxo kein Wert angegeben werden (Divisor ist Null). Unter theoretischer Betrachtung ist der Bias-Faktor dieser Substanz jedoch unendlich groß. Tendenziell zeigte sich mit Verlängerung des Alkyl-Substituenten der Iperoxo-Derivate am M<sub>2</sub>-Rezeptor eine zunehmende Betonung der G<sub>i</sub>-Proteinaktivierung. Eine statistische Auswertung der M<sub>2</sub>-Ergebnisse war jedoch aufgrund der unterschiedlichen Varianzen nicht möglich. Bezüglich des M<sub>4</sub>-Rezeptors zeigten die hier getesteten Derivate eine eher ausgeglichene Signalwegsaktivierung (ANOVA mit  $p > 0,05$ ).



**Abb. 3.32 Bias-Faktoren  $\Delta\Delta\log(RA_i)$  der ausgewählten Alkyl-Derivate im Vergleich zur Referenzsubstanz Iperoxo am M<sub>2</sub>- bzw. M<sub>4</sub>-Rezeptor.** Die Berechnung von  $\Delta\Delta\log(RA_i)$  erfolgte anhand Gleichung 39 mit den Kenngrößen E<sub>max</sub> und pEC<sub>50</sub> aus Tab. 3.28 und

Tab. 3.29. Positive  $\Delta\Delta\log(RA_i)$ -Werte deuten auf eine G<sub>i</sub>-Signalwege-selektivität hin, negative auf eine G<sub>s</sub>-Selektivität. Die Referenzsubstanz Iperoxo definiert dabei den Nullwert, d.h. ein neutrales Verhalten bzgl. der Signalwege-selektivität. Für die

Substanz IP-C<sub>7</sub> konnte kein Bias-Faktor angegeben werden aufgrund fehlender Aktivierung des alternativen Signalwegs, jedoch ist der theoretische  $\Delta\Delta\log(RA_i)$ -Wert unendlich groß.

Test-substanz	M <sub>2</sub>		M <sub>4</sub>	
	$\Delta\Delta\log(RA_i)$	n	$\Delta\Delta\log(RA_i)$	n
Iperoxo	0 ± 0,55	14	0 ± 0,65	14
IP-C <sub>2</sub>	0,70 ± 0,51	12	-0,30 ± 0,62	10
IP-C <sub>4</sub>	1,76 ± 1,60	14	-0,83 ± 0,63	10
IP-C <sub>7</sub>	+ ∞		-0,19 ± 0,65	12

Tab. 3.30 Bias-Faktoren  $\Delta\Delta\log(RA_i) \pm$  Standardfehler aus Abb. 3.32.

Die hier berechneten Bias-Faktoren wiesen vor allem durch die Schwankungen der Messwerte im stimulatorischen Bereich (vgl. Abb. 3.31) eine große Fehlerbehaftung auf. Jedoch ist die Tendenz der Mittelwerte am M<sub>2</sub>-Rezeptor zu positiven, zunehmenden Werten (G<sub>i</sub>-Bias) richtig (sie lässt sich aus Abb. 3.31 schon erahnen). Im Gegensatz dazu zeigte der Bias-Faktor von *n*-Butylperoxo am M<sub>4</sub>-Rezeptor eine Orientierung in den negativen Bereich (G<sub>s</sub>-Bias). Vernachlässigt man den Einfluss der Maximaleffekte in der Berechnung von  $\Delta\Delta\log(RA_i)$  (Gleichung 39), so lässt sich die gegensätzliche Ausrichtung der Bias-Faktoren der Derivate auch anhand eines Vergleichs der Wirksamkeiten in beiden Signalwegen mit der Referenzsubstanz ableiten: Zwischen halbmaximaler Inhibition und Stimulation zeigte Iperoxo einen Konzentrationsunterschied von 2,3 Dekaden am M<sub>2</sub>-Rezeptor und von 2,8 Dekaden an M<sub>4</sub> (pIC<sub>50</sub>-pEC<sub>50</sub>, vgl. Tab. 3.28). Diese Differenz nahm am M<sub>2</sub>-Rezeptor mit Verlängerung des Alkyl-Substituenten zu (2,6 bei IP-C<sub>2</sub> und 3,2 bei IP-C<sub>4</sub>), während sie am M<sub>4</sub>-Subtyp kleiner wurde (2,4 bzw. 1,8 und 2,0 bei IP-C<sub>7</sub>; vgl.

Tab. 3.29).

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass die Schere zwischen der Aktivierung der beiden betrachteten Signalwege am M<sub>2</sub>-Rezeptor für die getesteten Derivate weiter auseinander geht, am M<sub>4</sub>-Rezeptor jedoch das Gegenteil der Fall ist.

### 3.5 Ex-vivo Untersuchungen mit Iperoxo in einem M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Rezeptor-Modell

Das Potential der Muttersubstanz Iperoxo G<sub>i</sub>- und G<sub>s</sub>-Proteine zu aktivieren, sollte im nativen Gewebe näher untersucht werden. Da meist mehrere muskarinische Rezeptorsubtypen in einzelnen Geweben exprimiert werden, galt es zunächst ein geeignetes Testsystem zu finden, in dem die Rezeptor-induzierten Signale vorwiegend auf nur einen Subtypen zurückzuführen sind. In vorliegender Arbeit konnten dazu die inhibitorischen Autorezeptoren cholinergischer Neurone genutzt werden, welche im Maus-Hippocampus Rezeptoren vom M<sub>2</sub>-Typ sind; hingegen wird die Autoinhibition im Maus-Striatum über M<sub>4</sub>-Rezeptoren vermittelt (Zhang et al., 2002).

Das Gewebe wurde in Superfusionsexperimenten eingesetzt, in denen die Freisetzung des radioaktiv markierten Neurotransmitters nach elektrischer Stimulation gemessen wurde (siehe Methodenteil 2.1.4.2). Die über die inhibitorischen Autorezeptoren vom M<sub>2</sub>- bzw. M<sub>4</sub>-Subtyp vermittelte Hemmung der Neurotransmitter-Freisetzung bei Einsatz eines muskarinischen Agonisten galt dabei als Maß für die Aktivierung des präferentiellen G<sub>i</sub>-Signalwegs.

Durch diese Versuchsreihe sollte überprüft werden, ob durch hohe Iperoxo-Konzentrationen ein messbarer Wechsel vom präferentiellen zu alternativen Signalwegen auch im nativen Gewebe bei physiologischer Expressionsdichte der beiden Rezeptorsubtypen stattfindet.

#### 3.5.1 Evaluierung des Testsystems

Zunächst wurden Superfusionsversuche mit Iperoxo in Konzentrationen von 10<sup>-10</sup> bis 10<sup>-7</sup> M an Hippocampus und Striatum der drei Mausstämmen C57BL6N, NMRI und CD1 durchgeführt. Hierdurch sollte die Eignung der gewählten Testbedingungen geprüft und Aufschluss über die Variabilität der durch Iperoxo induzierten Effekte gewonnen werden. Aus den drei Tierstämmen sollte anschließend einer stellvertretend für weitere Versuche mit höheren Iperoxo-Konzentrationen über 10<sup>-7</sup> M ausgewählt werden.

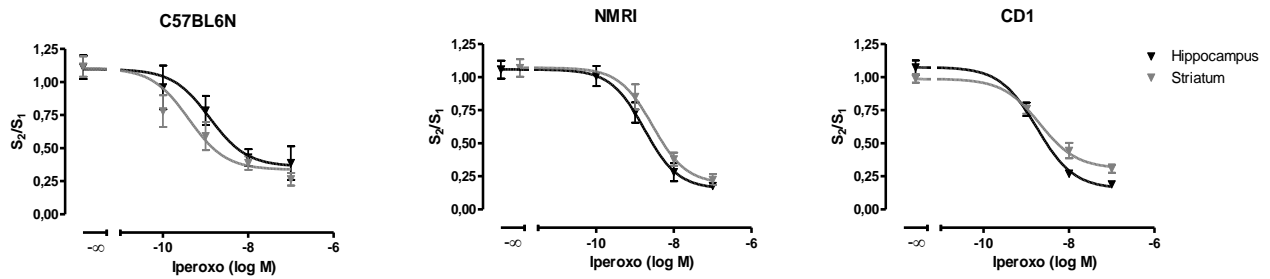
##### 3.5.1.1 Iperoxo hemmte die Neurotransmitter-Freisetzung mit hoher Wirksamkeit in drei Mausstämmen

Die S<sub>2</sub>/S<sub>1</sub>-Werte aus 10-14 Experimenten wurden zusammengeführt und gegen den dekadischen Logarithmus der Iperoxo-Konzentration aufgetragen. Dabei unterschieden sich die Werte der Kontrollen jeweils nicht vom theoretischen Wert 1, d.h. es wurde ein gleichhoher prozentualer [<sup>3</sup>H]-Efflux durch die elektrischen Stimulationen S<sub>1</sub> und S<sub>2</sub> in Abwesenheit von Iperoxo ausgelöst.

Die Datenauswertung mittels Vier-Parameter-logistischer Gleichung (Gleichung 15) ergab für je beide Rezeptor-Modelle einen Hill-Koeffizienten von n<sub>H</sub>=-1 (F-Test, p>0,05). Die maximale Hemmwirkung von Iperoxo wurde bei 10<sup>-7</sup> M erreicht, wie in weiteren Versuchen an NMRI-Gewebe gezeigt werden konnte (vgl. Abb. 3.35 in übernächsten Abschnitt). Die Wirksamkeit von Iperoxo, ausgedrückt als pIC<sub>50</sub>-Wert, lag in den beiden untersuchten Geweben der drei Mausstämmen im gleichen Bereich um 8,8.

Unterschiede zwischen den Geweben der Mausstämmen zeigten sich in der Höhe des Hemmeffektes bei 10<sup>-7</sup> M Iperoxo. Während in beiden Hirnarealen der C57BL6N-Mäuse der [<sup>3</sup>H]-Efflux durch Iperoxo auf ca. 32% der Ausgangswerte gesenkt wurde, war der Hemmeffekt im NMRI-Gewebe stärker

ausgeprägt (in etwa 16 % der Kontrollwerte). Im CD1-Hippocampus senkte Iperoxo die [<sup>3</sup>H]-Freisetzung auf 15 % des Kontrollwertes, im Striatum jedoch auf 31% (t-Test, p<0,01).



**Abb. 3.33 Iperoxo-induzierte Hemmung der elektrisch stimulierten Acetylcholin-Freisetzung in Hippocampus- und Striatumgewebe der Mausstämmen C57BL6N, NMRI und CD1.** Ordinate: Quotient der prozentualen [<sup>3</sup>H]-Freisetzung durch elektrische Stimulation in Abwesenheit ( $S_1$ ) und Anwesenheit ( $S_2$ ) von Iperoxo. Abszisse: dekadischer Logarithmus der molaren Iperoxo-Konzentration. Kurvenanpassung: Vier-Parameter-logistische Gleichung (Gleichung 15) mit einem Hill-Koeffizienten von  $n_H=-1$ , da sich dieser nicht signifikant von diesem Wert unterschied (F-Test,  $p<0,05$ ). Datenpunkte: Mittelwert  $\pm$  Standardfehler aus 10-14 Experimenten in Ein- bis-Zweifachbestimmung.

C57BL6N	$S_2/S_1$		$pIC_{50}$	n
	oberes Plateau	unteres Plateau		
Hippocampus	1,10 $\pm$ 0,07	0,36 $\pm$ 0,11	8,9 $\pm$ 0,3	14
Striatum	1,11 $\pm$ 0,06	0,34 $\pm$ 0,07	9,4 $\pm$ 0,3	14
<b>NMRI</b>				
Hippocampus	1,06 $\pm$ 0,05	0,15 $\pm$ 0,07	8,8 $\pm$ 0,2	10
Striatum	1,07 $\pm$ 0,06	0,19 $\pm$ 0,08	8,6 $\pm$ 0,2	10
<b>CD1</b>				
Hippocampus	1,08 $\pm$ 0,04	0,16 $\pm$ 0,05	8,8 $\pm$ 0,1	12
Striatum	0,99 $\pm$ 0,03	0,31 $\pm$ 0,04	8,7 $\pm$ 0,1	12

**Tab. 3.31 Kennwerte  $\pm$  Standardfehler der Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abb. 3.33.**  $S_2/S_1$ : Quotient der prozentualen [<sup>3</sup>H]-Freisetzung durch elektrische Stimulation in Abwesenheit ( $S_1$ ) und Anwesenheit ( $S_2$ ) von Iperoxo.  $pIC_{50}$ : negativer dekadischer Logarithmus der Iperoxo-Konzentration beim halbmaximalen Effekt. n: Anzahl durchgeführter Experimente.

Zur Entscheidung über die Auswahl eines Tierstammes für weitere Versuche wurden neben der konzentrationsabhängigen Hemmung der Neurotransmitter-Freisetzung durch Iperoxo auch die [<sup>3</sup>H]-Freisetzung unter Kontrollbedingungen ohne Iperoxo beurteilt. In Tab. 3.32 sind die Mittelwerte der prozentualen [<sup>3</sup>H]-Freisetzung durch die erste elektrische Stimulation ( $S_1$ ) sowie der basale [<sup>3</sup>H]-Efflux ( $B_1$ ) der Versuche aus Abb. 3.33 zusammengefasst.

In allen drei Mausstämmen lagen beide Werte im Striatum höher als im Hippocampus. Die Gewebe der NMRI- und CD1-Mäuse zeigten dabei jedoch höhere Freisetzungsraten nach elektrischer Stimulation und boten somit ein günstigeres Messfenster als der C57BL6N-Stamm. Da unklar war, wie die unterschiedlichen Effekte bei der Iperoxo-Konzentration von  $10^{-7}$ M im CD1-Gewebe zu bewerten sind, wurde entschieden, den NMRI-Mausstamm für weitere Versuche zu verwenden.



		C57BL6N	NMRI	CD1
Hippocampus	S <sub>1</sub> (%)	2,84 ± 0,20	4,84 ± 0,30	4,26 ± 0,25
	B <sub>1</sub> (%)	0,39 ± 0,02	0,34 ± 0,01	0,33 ± 0,01
Striatum	S <sub>1</sub> (%)	3,51 ± 0,26	5,03 ± 0,42	4,78 ± 0,35
	B <sub>1</sub> (%)	0,53 ± 0,02	0,44 ± 0,02	0,47 ± 0,01

Tab. 3.32 Kennwerte des [<sup>3</sup>H]-Efflux im Gewebe der Mausstämme C57BL6N, NMRI und CD1 unter Kontrollbedingungen. S<sub>1</sub> (%): prozentuale [<sup>3</sup>H]-Freisetzung durch Stimulation zum Zeitpunkt 40 min. B<sub>1</sub>: prozentualer basaler [<sup>3</sup>H]-Efflux zum Zeitpunkt 55 min.

### 3.5.1.2 Die Hemmung der Neurotransmitter-Freisetzung war Rezeptor-vermittelt

Der inverse Agonist Atropin wurde in einer Konzentration von 30 nM in Superfusionsexperimenten an NMRI-Gewebe eingesetzt. Abb. 3.34 zeigt die Ergebnisse dieser Versuche im Vergleich zu Konzentrations-Effekt-Kurven von Iperoxo ohne Atropin, jeweils normiert auf die elektrisch stimulierte [<sup>3</sup>H]-Freisetzung ohne Agonist als 100 %.

Durch die Anwesenheit von Atropin wurden die Konzentrations-Effekt-Kurven der Testsubstanz Iperoxo im M<sub>2</sub>- sowie M<sub>4</sub>-Rezeptormodell (Hippocampus bzw. Striatum) um ca. eine Dekade nach rechts verschoben. Somit konnten pA<sub>2</sub>-Werte von 8,8 am M<sub>2</sub>-Subtyp und 8,6 am M<sub>4</sub> berechnet werden, welche im Bereich der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten von Atropin liegen (vgl. Abschnitt 3.1.3.3).

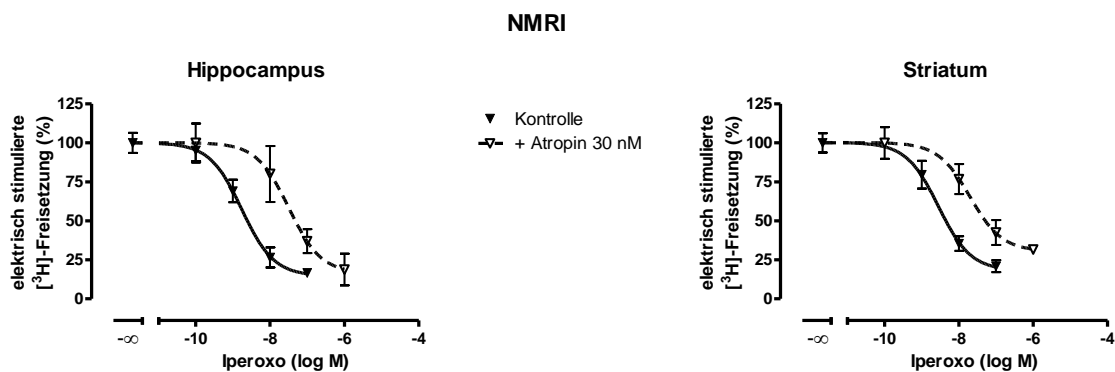


Abb. 3.34 Iperoxo-induzierte Hemmung der elektrisch stimulierten Acetylcholin-Freisetzung im NMRI-Hippocampus und Striatum in Ab- und Anwesenheit von 30 nM Atropin. Ordinate: elektrisch stimulierte [<sup>3</sup>H]-Freisetzung jeweils normiert auf die Freisetzung ohne Iperoxo als 100 % und den theoretischen Wert Null als 0 %. Abszisse: dekadischer Logarithmus der molaren Iperoxo-Konzentration. Kurvenanpassung: Vier-Parameter-logistische Gleichung (Gleichung 15) mit einem Hill-Koeffizienten von n<sub>H</sub>=-1, da sich dieser nicht signifikant von diesem Wert unterschied (F-Test, p<0,05). Datenpunkte: Mittelwert ± Standardfehler aus 4 Experimenten mit Atropin und 10 Experimenten ohne Atropin (vgl. Abschnitt 3.5.1.1) jeweils mit Ein- bis-Zweifachbestimmung.

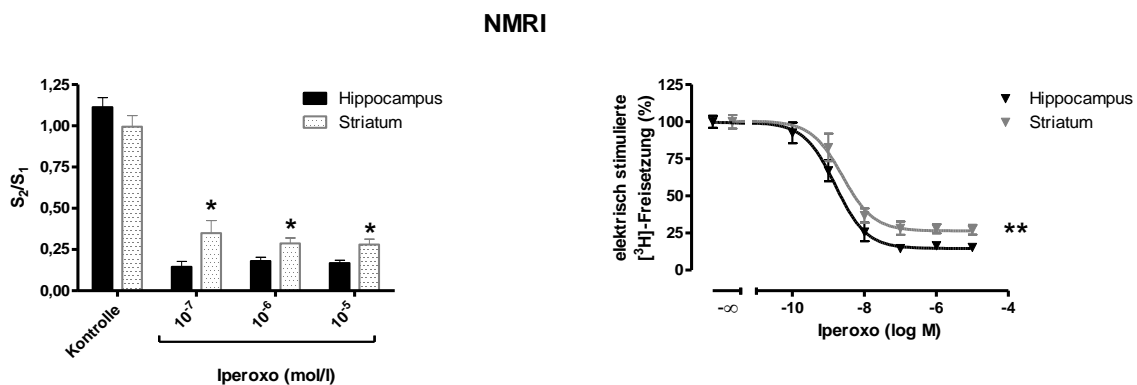
NMRI	S <sub>2</sub> /S <sub>1</sub> (% Kontrolle)		pIC <sub>50</sub>	ΔpIC <sub>50</sub>	n
	oberes Plateau	unteres Plateau			
Hippocampus	100 ± 10	16 ± 17	7,5 ± 0,4	1,27	4
Striatum	100 ± 7	31 ± 8	7,7 ± 0,3	0,85	4

Tab. 3.33 Kennwerte ± Standardfehler der Konzentrations-Effekt-Kurven in Anwesenheit von Atropin aus Abb. 3.34. S<sub>2</sub>/S<sub>1</sub> (% Kontrolle): elektrisch stimulierte Neurotransmitter-Freisetzung normiert auf die Freisetzung ohne Iperoxo als 100 % und den theoretischen Wert Null als 0 %. pIC<sub>50</sub>: negativer dekadischer Logarithmus der Iperoxo-Konzentration beim halbmaximalen Effekt in Anwesenheit von 30 nM Atropin. ΔpIC<sub>50</sub>: Rechtsverschiebung der Konzentrations-Effektkurve in Anwesenheit von Atropin gegenüber der Kontrollkurve ohne Atropin n: Anzahl durchgeführter Experimente.

### 3.5.1.3 Erhöhung der Iperoxo-Konzentration zeigte einen geringeren Hemmeffekt im $M_4$ -Modell

In einer zweiten Versuchsreihe wurde Iperoxo in Konzentrationen von 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  in Superfusionsexperimenten an Hippocampus und Striatum aus NMRI-Mäusen eingesetzt. Die elektrisch stimulierte [ $^3\text{H}$ ]-Freisetzung und der basale [ $^3\text{H}$ ]-Efflux unter Kontrollbedingungen ( $S_1$  und  $B_1$ ) fiel im Vergleich zur ersten Versuchsreihe etwas geringer aus ( $M_2$ :  $3,96 \pm 0,30$  und  $0,27 \pm 0,01$ ;  $M_4$ :  $4,42 \pm 0,28$  und  $0,42 \pm 0,01$  vgl. mit Tab. 3.32), gewährleisteten aber dennoch gute Messbedingungen. In Abb. 3.35 sind links die zusammengeführten  $S_2/S_1$ -Werte dieser Versuchsreihe dargestellt. In beiden Geweben lagen die Kontrollwerte ohne Iperoxo im Bereich von 1. Durch 0,1  $\mu\text{M}$  Iperoxo wurde die [ $^3\text{H}$ ]-Freisetzung gehemmt, jedoch signifikant stärker im Hippocampus als im Striatum ( $0,14 \pm 0,03$  vs.  $0,35 \pm 0,03$ ; t-Test mit  $p < 0,05$ ). Auch bei höheren Iperoxo-Konzentrationen blieb dieser Unterschied bestehen.

Die Daten der ersten und zweiten Versuchsreihe mit NMRI-Gewebe wurden zusammengeführt, auf den  $S_2/S_1$ -Wert der Kontrolle als 100 % normiert und gegen den dekadischen Logarithmus der Iperoxo-Konzentration aufgetragen. In Abb. 3.35 rechts ist die Auswertung dieser Daten mittels Vier-Parameter-logistischer Gleichung wiedergegeben. Die unteren Plateaus der Hippocampus- und Striatum-Kurve unterschieden sich signifikant (F-Test,  $p < 0,01$ ). Diese Unterschiede waren anhand der Vorversuche an NMRI-Gewebe noch nicht ersichtlich, entsprachen aber der Differenz, die auch zwischen Hippocampus und Striatum von CD1-Mäusen gefunden worden war (vgl. Abschnitt 3.5.1.1). Bei Einsatz von Iperoxo-Konzentrationen über 0,1  $\mu\text{M}$  blieb die Hemmung der Neurotransmitter-Freisetzung auf einem konstanten Niveau von 85 % im  $M_2$ - und 74 % im  $M_4$ -Modell.



**Abb. 3.35 Iperoxo-induzierte Hemmung der elektrisch stimulierten Acetylcholin-Freisetzung in NMRI-Hippocampus und -Striatum.** Links: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der  $S_2/S_1$ -Werte der zweiten Versuchsreihe mit NMRI-Gewebe ohne Iperoxo (Kontrolle) und bei Einsatz von hohen Iperoxo Konzentrationen von 0,1 bis 10  $\mu\text{M}$ . Es wurden 9 Versuche mit Ein- bis Zweifachbestimmung durchgeführt. Im Striatum lagen die Werte signifikant höher als im Hippocampus (\*, t-Test mit  $p < 0,05$ ). Rechts: Konzentrations-Effekt-Kurve von Iperoxo nach Zusammenführung der Daten aus der ersten und zweiten Versuchsreihe an NMRI-Gewebe. Ordinate: elektrisch stimulierte [ $^3\text{H}$ ]-Freisetzung normiert auf die Freisetzung ohne Iperoxo als 100 % und den Wert Null als 0 % (vollständige Hemmung). Abszisse: dekadischer Logarithmus der Iperoxo-Konzentration. Kurvenanpassung: Vier-Parameter-logistische Gleichung (Gleichung 15) mit einem Hill-Koeffizienten von  $n_H = -1$  wie bereits im Abschnitt 3.5.1.1 gefunden. Die unteren Plateaus der dargestellten Kurven waren signifikant verschieden (\*\*, F-Test,  $p < 0,01$ ).

Iperoxo	S <sub>2</sub> /S <sub>1</sub> (% Kontrolle)		pIC <sub>50</sub>	n
	oberes Plateau	unteres Plateau		
Hippocampus	100 ± 3	15 ± 3	8,8 ± 0,1	10+9
Striatum	101 ± 4	26 ± 3	8,6 ± 0,2	10+9

**Tab. 3.34 Kennwerte ± Standardfehler der Konzentrations-Effekt-Kurve aus Abb. 3.35 (rechts).** S<sub>2</sub>/S<sub>1</sub> (% Kontrolle): elektrisch stimulierte Neurotransmitter-Freisetzung normiert auf die Freisetzung ohne Iperoxo als 100 % und den theoretischen Wert Null als 0 %. pIC<sub>50</sub>: negativer dekadischer Logarithmus der Iperoxo-Konzentration beim halbmaximalen Effekt. n: Anzahl durchgeführter Experimente, dabei beruhen die Daten für Iperoxo-Konzentrationen bis einschließlich 10<sup>-7</sup> M auf 10 Versuchen, für Konzentrationen größer gleich 10<sup>-7</sup> M wurden 9 Versuche durchgeführt.

### 3.5.2 Einfluss einer G<sub>i</sub>-Inhibition auf die Hemmung der Neurotransmitter-Freisetzung durch Iperoxo

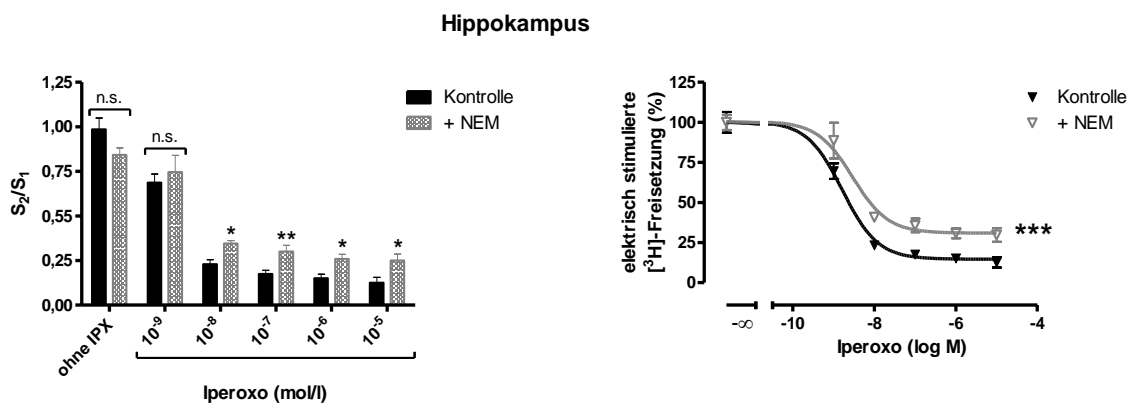
Die im Kapitel 3.5.1 dargestellten Versuche zeigten eine geringere Hemmung der Neurotransmitter-Freisetzung über M<sub>4</sub>-Rezeptoren im Vergleich zum M<sub>2</sub>. Durch Einsatz von supramaximalen Iperoxo-Konzentrationen (> 10<sup>-7</sup> M) wurde in beiden Rezeptor-Modellen keine Minderung des Hemmeffektes beobachtet (vgl. Abschnitt 3.5.1.3). Es stellte sich daher die Frage, ob mit der Superfusionsmethode eine verminderte Aktivierung des präferentiellen G<sub>i/o</sub>-Signalwegs zu Gunsten anderer Signalwege bei hohen Agonist-Konzentrationen grundsätzlich messbar ist. Dazu wurde mit dem Alkylans N-Ethylmaleimid (NEM) die in den Geweben natürlich vorkommende Menge der G<sub>i/o</sub>-Proteine verkleinert, um die gegebenenfalls stattfindende Aktivierung alternativer Signalwege stärker hervortreten zu lassen. NEM unterbindet in vergleichbarer Weise wie PTX die Rezeptor-vermittelte Aktivierung von G<sub>i/o</sub>-Proteinen (vgl. Methodenabschnitt 2.1.2.4). Das Gewebe wurde mit einer NEM-Konzentration von 32 µM für 45 min bei 37°C inkubiert, da dadurch ein vergleichbarer Effekt zu PTX (6,4 µg/ml über 18 h) erzeugt werden kann (vgl. Schlicker et al., 1993). Die Versuche erfolgten stets parallel an NEM-behandelten und -unbehandeltem Gewebe.

#### 3.5.2.1 Im M<sub>2</sub>-Modell schwächte die NEM-Behandlung die Wirkung von Iperoxo ab

Die [<sup>3</sup>H]-Freisetzung bei elektrischer Stimulation in Abwesenheit von Iperoxo (S<sub>1</sub> angegeben in %) fiel im NEM-behandeltem Hippocampus-Gewebe im Durchschnitt etwas geringer aus als im Kontrollgewebe, jedoch unterschieden sich die Werte nicht signifikant (3,70 ± 0,21 vs. 4,23 ± 0,26, t-Test mit p>0,05). Der basale [<sup>3</sup>H]-Efflux (B<sub>1</sub> in %) in Abwesenheit des Agonisten lag bei 0,19 ± 0,01 im Kontrollgewebe und signifikant höher bei 0,29 ± 0,01 nach NEM-Behandlung (t-Test, p<0,0001). Dies könnte auf einen Gewebe-schädigenden Effekt des Alkylans zurückzuführen sein. Allerdings lagen beide Werte unter bzw. im gleichen Bereich des basalen [<sup>3</sup>H]-Efflux anderer Versuchsreihen an NMRI Gewebe (0,34 ± 0,01 vgl. Abschnitt 3.5.1.1 und 0,27 ± 0,01 vgl. Abschnitt 3.5.1.3), sodass der festgestellte Unterschied als nicht ergebnisrelevant eingestuft wurde.

In Abb. 3.36 rechts ist die Neurotransmitter-Freisetzung anhand der gemittelten S<sub>2</sub>/S<sub>1</sub>-Werte wiedergegeben. Die Freisetzung in Abwesenheit von Iperoxo war im NEM-behandeltem Hippocampus geringer als der theoretische Wert von 1, jedoch nicht signifikant verschieden vom Mittelwert des Kontrollgewebes (t-Test, p>0,05). Durch Iperoxo in den Konzentrationen ≥ 10<sup>-8</sup> M wurde eine stärkere Hemmung der Neurotransmitter-Freisetzung im unbehandelten als im NEM-behandelten Gewebe erreicht (t-Test, p<0,05 bzw. 0,01).

Die  $S_2/S_1$ -Werte wurden auf den jeweiligen Kontrollwert als 100 % normiert und gegen die logarithmierte Iperoxo-Konzentration aufgetragen. Die Daten wurden mittels Vier-Parameter-logistischer Gleichung analysiert. Die Hemmung der  $G_{i/o}$ -Proteine durch NEM verursachte eine leichte Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurve von Iperoxo und ein signifikant höheres Endplateau (F-Test,  $p < 0,001$ ). Die Neurotransmitter-Freisetzung konnte nach NEM-Behandlung durch Iperoxo nur noch auf 31 % statt auf 15 % gesenkt werden. Jedoch blieb der Hemmeffekt auch nach NEM-Behandlung bei hohen Iperoxo-Konzentrationen auf einem konstanten Niveau.



**Abb. 3.36 Iperoxo-induzierte Hemmung der elektrisch stimulierten Acetylcholin-Freisetzung im NMRI-Hippocampus nach NEM-Behandlung.** Links: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der  $S_2/S_1$ -Werte im Kontrollgewebe und nach NEM-Behandlung mit und ohne Iperoxo (IPX) aus je 13 Experimenten. n.s.: Unterschied nicht signifikant (t-Test mit  $p > 0,05$ ). \* bzw. \*\*: signifikant unterschiedlich (t-Test mit  $p < 0,05$  bzw. 0,01). Rechts: Konzentrations-Effekt-Kurven von Iperoxo im Kontrollgewebe und nach NEM-Behandlung. Ordinate: elektrisch stimulierte [<sup>3</sup>H]-Freisetzung normiert auf die Freisetzung ohne Iperoxo als 100 % und den Wert Null als 0 % (vollständige Hemmung). Abszisse: dekadischer Logarithmus der Iperoxo-Konzentration. Kurvenanpassung: Vier-Parameter-logistische Gleichung (Gleichung 15) mit einem Hill-Koeffizienten von  $n_H = -1$ . Die unteren Plateaus der dargestellten Kurven waren signifikant verschieden (\*\*\*, F-Test,  $p < 0,0001$ ).

Hippocampus	$S_2/S_1$ (% ohne IPX)		$pIC_{50}$	n
	oberes Plateau	unteres Plateau		
Kontrolle	101 $\pm$ 4	15 $\pm$ 3	8,8 $\pm$ 0,2	13
+ NEM	101 $\pm$ 4	31 $\pm$ 3	8,5 $\pm$ 0,2	13

**Tab. 3.35 Kennwerte  $\pm$  Standardfehler der Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abb. 3.36 (rechts).**  $S_2/S_1$  (% ohne IPX): elektrisch stimulierte Neurotransmitter-Freisetzung normiert auf die Freisetzung ohne Iperoxo als 100 % und den theoretischen Wert Null als 0 %.  $pIC_{50}$ : negativer dekadischer Logarithmus der Iperoxo-Konzentration beim halbmaximalen Effekt. n: Anzahl durchgeführter Experimente.

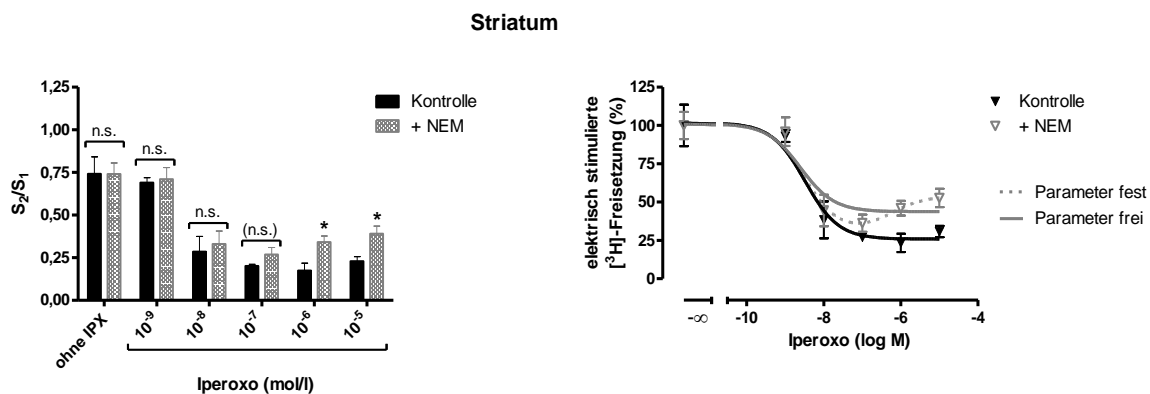
### 3.5.2.2 Im $M_4$ -Modell wurde der Einfluss der $G_i$ -Inhibition mit Iperoxo-Konzentrationen über 0,1 $\mu$ M deutlich

Im unbehandelten und NEM-behandelten Striatumgewebe lag die prozentuale [<sup>3</sup>H]-Freisetzung während  $S_1$  gleichhoch bei  $4,00 \pm 0,29$  und  $3,92 \pm 0,23$ . Jedoch wurde auch hier der basale [<sup>3</sup>H]-Efflux durch das Alkylans signifikant erhöht ( $0,57 \pm 0,02$  vs.  $0,42 \pm 0,02$ , Angaben in %, t-Test mit  $p < 0,0001$ ). Die Neurotransmitter-Freisetzung in Abwesenheit von Iperoxo war in der Kontrolle und im NEM-behandelten Striatum durch  $S_2/S_1$ -Werte unterhalb von 1 gekennzeichnet ( $0,74 \pm 0,10$  bzw.  $0,74 \pm 0,07$ ; vgl. Abb. 3.37 links), d.h. durch die zweite elektrische Reizung ( $S_2$ ) wurde ein geringerer Anteil der zu dem Zeitpunkt im Gewebe enthaltenen [<sup>3</sup>H]-Menge freigesetzt als durch den ersten Reiz ( $S_1$ ). Dies wurde darauf zurückgeführt, dass durch die zusätzliche Inkubationszeit von 45min die

ursprünglich vorhandene [<sup>3</sup>H]-Beladung im Kontroll- sowie NEM-Gewebe reduziert worden war. Der [<sup>3</sup>H]-Gehalt der Striatumpräparate betrug in den NEM-Versuchen  $285 \pm 22$  fmol in der Kontrolle sowie  $239 \pm 15$  fmol im NEM-behandelten Gewebe und war somit nicht signifikant unterschiedlich (t-Test,  $p > 0,05$ ). Daher wurde angenommen, dass die zum Zeitpunkt des zweiten Reizes ( $S_2$ ) noch vorhandene [<sup>3</sup>H]-Beladung der Striatumpräparate keine [<sup>3</sup>H]-Freisetzung im gleichen Umfang wie bei  $S_1$  zuließ. Da jedoch das Ausmaß dieser reduzierten Freisetzung durch  $S_2$  im Kontrollgewebe und im NEM-Gewebe gleich war (gleiche  $S_2/S_1$ -Werte ohne IPX), wurden die Ergebnisse dieser Versuchsreihe als valide eingestuft.

Durch eine Iperoxo-Konzentration von  $10^{-7}$  M wurde eine maximale Hemmung der Neurotransmitter-Freisetzung erreicht. Eine Steigerung der Iperoxo-Konzentration in den supramaximalen Bereich führte im Kontrollgewebe zu keiner weiteren Veränderung der  $S_2/S_1$ -Werte. Im NEM-Gewebe hingegen wurden signifikant höhere Werte im Vergleich zur Kontrolle festgestellt (t-Test,  $p < 0,05$ ).

Die  $S_2/S_1$ -Daten wurden auf den Wert ohne Iperoxo als 100 % normiert und gegen den dekadischen Logarithmus der Iperoxo-Konzentration aufgetragen. Die Datenpunkte der Kontrolle wurden mittels Vier-Parameter-logistischer Gleichung ausgewertet. Bei der Analyse der Daten des NEM-behandelten Gewebes wurde die Eignung des monophasischen Modells (Gleichung 15) gegenüber dem biphasischen nach Gleichung 16 mittels F-Test überprüft. Ohne Vorgabe von Parametern konnten die Daten mit dem monophasischen Modell ausgewertet werden (graue durchgezogene Kurve in Abb. 3.37 rechts), wobei sich der Hill-Koeffizient nicht signifikant von  $n_H = -1$  unterschied (F-Test,  $p > 0,05$ ). Eine Auswertung mittels Glockenfunktion (Gleichung 16) war hingegen nach Vorgabe des ersten Wendepunktes und des maximalen Hemmeffekts möglich (F-Test,  $p < 0,05$ ).



**Abb. 3.37 Iperoxo-induzierte Hemmung der elektrisch stimulierten Acetylcholin-Freisetzung im NMRI-Striatum nach NEM-Behandlung.** Links: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der  $S_2/S_1$ -Werte im Kontrollgewebe und nach NEM-Behandlung mit und ohne Iperoxo (IPX) aus je 13 Experimenten. n.s.: Unterschied nicht signifikant (t-Test mit  $p > 0,05$ ). \* bzw. \*\*: signifikant unterschiedlich (t-Test mit  $p < 0,05$  bzw.  $0,01$ ) Rechts: Konzentrations-Effekt-Kurven von Iperoxo im Kontrollgewebe und nach NEM-Behandlung. Ordinate: elektrisch stimulierte [<sup>3</sup>H]-Freisetzung normiert auf die Freisetzung ohne Iperoxo als 100 % und den Wert Null als 0 % (vollständige Hemmung). Abszisse: dekadischer Logarithmus der Iperoxo-Konzentration. Kurvenanpassung: Vier-Parameter-logistische Gleichung (Gleichung 15) mit einem Hill-Koeffizienten von  $n_H = -1$  (durchgezogene Kurven) bzw. Glockenfunktion (Gleichung 16) mit den festgelegten Parametern  $\log IC_{50} = -8,5$ ;  $n_{H-1} = -1$ ;  $n_{H-2} = 1$ ; unteres Plateau  $< 37$  % (gestrichelte Kurve). Unter diesen Bedingungen eignete sich das biphasische Modell besser zur Datenanalyse als das monophasische (F-Test,  $p < 0,05$ ).

monophas. Auswertung	S <sub>2</sub> /S <sub>1</sub> (% ohne IPX)		pIC <sub>50</sub>	n		
	oberes Plateau	unteres Plateau				
Kontrolle	102 ± 7	26 ± 5	8,5 ± 0,3	13		
+ NEM	101 ± 6	43 ± 5	8,6 ± 0,5	13		
biphasische Auswertung	S <sub>2</sub> /S <sub>1</sub> (% ohne IPX)			pIC <sub>50</sub>	pEC <sub>50</sub>	n
	oberes Plateau	unteres Plateau	Minimum			
+ NEM	101 ± 12	54 ± 12	35 ± 16	= 8,5	6,4 ± 1,2	13

**Tab. 3.36 Kennwerte ± Standardfehler der Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abb. 3.36 (rechts).** S<sub>2</sub>/S<sub>1</sub> (% ohne IPX): elektrisch stimulierte Neurotransmitter-Freisetzung normiert auf die Freisetzung ohne Iperoxo als 100 % und den theoretischen Wert Null als 0 %. pIC<sub>50</sub>: negativer dekadischer Logarithmus der Iperoxo-Konzentration beim halbmaximalen Hemmeffekt. pEC<sub>50</sub>: negativer dekadischer Logarithmus der Iperoxo-Konzentration beim halbmaximalen Effekt; dieser wurde bei der biphasischen Auswertung mit 8,5 vorgegeben. n: Anzahl durchgeführter Experimente.

Iperoxo zeigte mit einem pIC<sub>50</sub>-Wert von ca. 8,5 bei monophasischer Auswertung die gleiche Wirksamkeit bzgl. des Hemmeffektes im Kontroll- und NEM-Gewebe, welche ebenfalls in vorherigen NMRI-Versuchsreihen gefunden worden war (vgl. Kapitel 3.5.1). Die Neurotransmitter-Freisetzung wurde im Kontrollgewebe durch Iperoxo auf 26 % erniedrigt. Im NEM-behandelten Gewebe wurde die maximale Hemmung bei der Iperoxo-Konzentration von 10<sup>-7</sup> M gemessen (36% ± 6), was dem Minimum der biphasischen Auswertung entspricht (vgl. Tab. 3.36).

Es zeigte sich demnach, dass die Auswirkung der NEM-Behandlung im Striatum-Gewebe als M<sub>4</sub>-Modell insbesondere bei supramaximalen Iperoxo-Konzentrationen vom M<sub>2</sub>-Modell abweicht.

## 4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war eine vergleichende Untersuchung des M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Rezeptors hinsichtlich ihrer präferentiellen Kopplung an G<sub>1/0</sub>-Proteine gegenüber einer alternativen G<sub>s</sub>-Aktivierung. Hintergrund dafür war die Frage, warum es zwei muskarinische Rezeptorsubtypen gibt, obwohl sie den endogenen Liganden Acetylcholin mit ähnlicher Affinität binden sowie den gleichen Signalweg aktivieren und somit bezogen auf das präferentielle G<sub>1</sub>-Protein scheinbar eine funktionelle Redundanz vorliegt.

Ein Wechsel von der Inhibition zur Stimulation der cAMP-Produktion bei steigender Agonist-Konzentration wurde für den aviären M<sub>4</sub>- und den porzinen M<sub>2</sub>-Subtyp beschrieben (Dittman et al., 1994; Vogel et al., 1995). Dabei konnte die direkte Aktivierung von G<sub>s</sub>-Proteinen nachgewiesen werden, jedoch ist auch die indirekte Stimulation einiger Adenylatcyclase-Typen über Ca<sup>2+</sup>-Ionen oder ihre Modulation durch Gβγ-Untereinheiten möglich. Im Bulbus olfactorius der Ratte fand man hingegen einzig eine Stimulation der cAMP-Produktion bei Einsatz von muskarinischen Agonisten. Diese Stimulation wurde über den dort vorwiegend exprimierten M<sub>4</sub>-Rezeptor vermittelt, jedoch nicht unter Beteiligung von G<sub>s</sub>-Proteinen, da PTX-Behandlung das Signal ausschaltete (Olianas & Onali, 1991 (a und b); Onali & Olianas, 1995).

Ein gemeinsames Merkmal der zitierten Befunde, die für eine G<sub>s</sub>-Kopplung sprechen, ist ein relativ hohes Expressionsniveau des M<sub>2</sub>- bzw. M<sub>4</sub>-Rezeptors in transfizierten Zellen. Die Frage nach der physiologischen Relevanz steht daher im Raum. Durch Untersuchungen der M<sub>2</sub>-vermittelten Effekte an Primärzellen sowie im nativen und rekombinanten Zellsystem konnten nur im letzteren eine promiskuitive G<sub>i</sub>/G<sub>s</sub>-Aktivierung bei Stimulation mit dem Vollagonisten Oxotremorin M nachgewiesen werden (Seemann, Dissertationsschrift 2012). Untersuchungen zum physiologischen Vorkommen einer G<sub>s</sub>-Kopplung des M<sub>4</sub>-Rezeptors in ähnlichen Zellsystemen fehlen hingegen bisher. Mit dem endogenen Liganden Acetylcholin wurde jedoch festgestellt, dass der in Flp-In<sup>TM</sup>-CHO-Zellen exprimierte M<sub>4</sub>-Rezeptor im Gegensatz zu M<sub>2</sub> eine stärkere Tendenz zur Aktivierung von G<sub>s</sub>-Proteinen besitzt, welche unabhängig von der Expressionsrate ist (Janßen, Dissertationsschrift 2011). Dies zeigte sich noch verstärkt bei Aktivierung der beiden Subtypen mit sogenannten dualsterischen Hybrid-Substanzen (siehe Abschnitt 1.5), welche sich von der Substanz Iperoxo ableiten. Dass die Kopplung an verschiedene G-Proteine durch die allosterischen Bereiche kontrolliert werden kann, wurde ebenfalls mithilfe dieser Hybridverbindungen am M<sub>2</sub>-Rezeptor demonstriert (Bock et al., 2012). In Anbetracht der zuvor beschriebenen Befunde scheint jedoch die Rolle der allosterischen Bindungsareale im M<sub>4</sub>-Rezeptor weniger einflussreich auf die Qualität der G-Protein-Kopplung zu sein.

Es ist weithin akzeptiert, dass 7TM-Rezeptoren durch Bindung an strukturverschiedene Liganden unterschiedliche aktive (und inaktive) Konformationen einnehmen können und somit die Interaktion mit Effektorproteinen beeinflusst werden kann (vgl. Kenakin, 2013). In der vorliegenden Arbeit wurden Iperoxo-Derivate mit schrittweise verlängertem *n*-Alkyl-Substituenten am quartären Stickstoff verwendet. Es sollte untersucht werden, ob die Auswirkung dieser systematischen Strukturveränderung auf die präferentielle und alternative G-Protein-Aktivierung des M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Rezeptors gleich oder unterschiedlich ausfällt. Der Bindungsmodus der Ausgangssubstanz Iperoxo am M<sub>2</sub>-Rezeptor ist durch die Kristallstruktur bekannt (siehe dazu Abb. 1.5). Da die orthosterische Bindungsstelle in allen fünf muskarinischen Subtypen konserviert ist, kann man von der gleichen Orientierung der Substanz im M<sub>4</sub>-Rezeptor ausgehen. Wie beim endogenen Liganden Acetylcholin und anderen Agonisten ist der quartäre Stickstoff ausschlaggebend für die Bindung an den Rezeptor,

jedoch trägt der ungeladene Isoxazolin-Ring ebenfalls zur hohen Affinität von Iperoxo bei (Schrage et al., 2013).

## 4.1 Versuche an transfizierten FlpIn<sup>TM</sup>-CHO-Zellen als Testsystem

### 4.1.1 Rezeptorexpression

In der vorliegenden Arbeit wurde ein rekombinantes Expressionssystem ohne Acetylcholin-Esteraseaktivität zur Untersuchung des humanen M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Rezeptors genutzt. Die stabil transfizierten Zell-Linien FlpIn<sup>TM</sup>hM<sub>2</sub>- bzw. -hM<sub>4</sub>-CHO wiesen Expressionsraten von 113 000 ± 11 000 bzw. 129 000 ± 17 000 Bindungsstellen/Zelle auf (vgl. Abb. 6.3 links im Anhang). Diese Werte unterschieden sich nicht signifikant. Es sei angemerkt, dass die hier genutzte Methode zur Bestimmung der Expressionsrate anhand homologer Konkurrenzexperimente im Vergleich zum Sättigungsexperiment ungenauer ist, jedoch spielt die genaue Höhe der Rezeptorexpression hier keine wesentliche Rolle, was an entsprechender Stelle näher erläutert wird. Eine um 50% höhere Expression von M<sub>4</sub> im Vergleich zu M<sub>2</sub> in FlpIn<sup>TM</sup>-CHO-Zellen wurde von N. Janßen (Dissertationsschrift 2011) berichtet. Für die hier verwendeten Zell-Linien kann jedoch anhand der Messungen (vgl. Anhang 6.1 und 6.2) davon ausgegangen werden, dass die M<sub>2</sub>-Expression mindestens 70% der M<sub>4</sub>-Expression betrug.

Die Behandlung mit PTX senkte die Anzahl der Bindungsstellen in intakten Zellen in beiden Zell-Linien auf ca. 80 000/Zelle herab (vgl. Abb. 6.3 rechts im Anhang). PTX vermittelt neben der Hemmung von G<sub>i</sub>-Proteinen auch weitere Effekte und könnte für die Abnahme der Rezeptordichte verantwortlich sein (Mangmool & Kurose, 2011). Indirekt könnte die Abnahme funktionsfähiger G<sub>i</sub>-Proteine eine verminderte Expression präferentiell G<sub>i</sub>-gekoppelter Rezeptoren nach sich ziehen. Für die Untersuchung der alternativen G<sub>s</sub>-Aktivierung mittels cAMP-Assay war dies jedoch unerheblich, da die Versuche in einem optimalen Messbereich durchgeführt wurden (vgl. Abschnitt 6.5 im Anhang).

Die B<sub>max</sub>-Werte der verwendeten Membranhomogenate beider Zell-Linien lagen im Durchschnitt bei ca. 2500 fmol/mg Protein (vgl. Tab. 6.1 im Anhang) und spiegelten somit eine ähnlich hohe Anwesenheit von M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Rezeptoren an den Oberflächen der verwendeten Zell wider.

### 4.1.2 Aktivierung der präferentiellen G<sub>i</sub>-Proteine

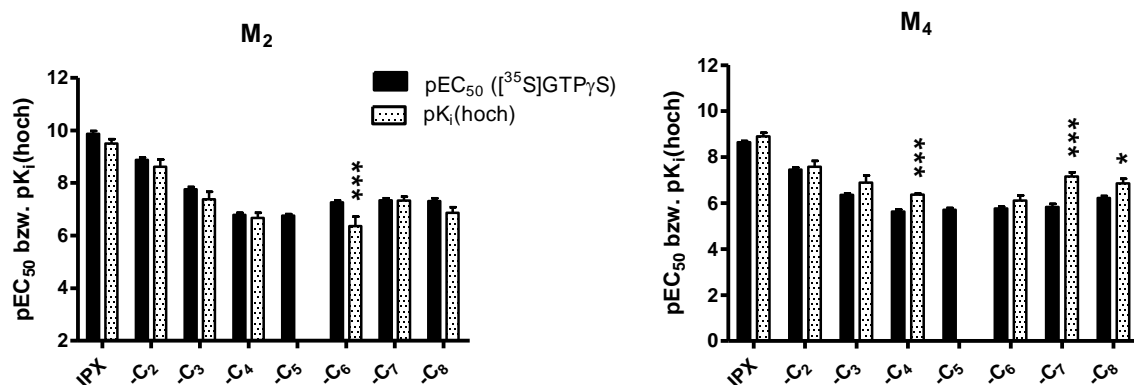
Die Ligand-vermittelte Aktivierung von G<sub>i</sub>-Proteinen durch den M<sub>2</sub>- bzw. M<sub>4</sub>-Rezeptor wurde direkt durch Messung der [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung an Membranhomogenaten untersucht. Die Änderung der Wirksamkeit (pEC<sub>50</sub>) durch die systematische Verlängerung des *n*-Alkyl-Substituenten am Iperoxo-Molekül war an beiden Subtypen gleich ausgeprägt (siehe Abb. 3.3). Die Affinität der Iperoxo-Derivate zum M<sub>2</sub>- bzw. M<sub>4</sub>-Rezeptor wurde ebenfalls an Membranhomogenaten unter gleichen Bedingungen wie im [<sup>35</sup>S]GTPγS-Experiment (Pufferzusammensetzung, Temperatur) gemessen. Die Anwendung des Antagonisten [<sup>3</sup>H]NMS als Radioligand erlaubte die Bestimmung von zwei Bindungsaffinitäten der Testsubstanzen, nämlich an eine hochaffine, G-Protein-gekoppelte Rezeptorkonformation und an eine niedrigaffine. Dass die hochaffine Bindung dabei tatsächlich die Affinität zum G<sub>i</sub>-gekoppelten Zustand der Rezeptoren widerspiegelt, wurde durch Bindungsstudien mit [<sup>3</sup>H]Iperoxo dargelegt (Schrage et al., 2014).



In Abb. 4.1 ist die jeweilige Wirksamkeit der  $G_i$ -Aktivierung und die hochaffine Bindung der Testsubstanz zum Rezeptor im  $G_i$ -Protein-gekoppelten Zustand zusammengestellt. Eine Ausnahme ist das Derivat IP-C<sub>5</sub>, für das kein eindeutiger Wert für die hochaffine Bindung gemessen werden konnte (vgl. Abschnitt 3.2.1.2). Daher ist in der folgenden Abbildung nur der  $pEC_{50}$ -Wert zu sehen.

Allgemein zeigt diese Gegenüberstellung, dass die Fähigkeit der Testsubstanzen zur Induktion der  $G_i$ -Aktivierung an beiden Rezeptoren mit der hochaffinen Bindung korreliert. Am  $M_2$ -Rezeptor stimmen (mit Ausnahme von IP-C<sub>6</sub>) die  $pEC_{50}$ - und  $pK_i$ -Werte der Testsubstanzen überein (t-Test,  $p > 0,05$ ). Dies soll aber nicht den Anschein erwecken, es bestehe hier ein Verhältnis von 1:1 zwischen der Bindung dieser Testsubstanzen an einen  $M_2$ -Rezeptor in aktiver Konformation und der Aktivierung eines  $G_i$ -Proteins (obwohl ein sich gebildeter Agonist-Rezeptor-G-Protein-Komplex mit gebundenem [<sup>35</sup>S]GTPγS bestehenbleibt, sodass das G-Protein eher nicht abdissoziiert (Strange, 2010)). Es wurde bereits demonstriert, dass ein Agonist-Rezeptor-Komplex zur Stimulation mehrerer  $G_i$ -Moleküle führen kann, sodass bereits auf dieser Rezeptor-nahen Ebene eine Signalamplifikation stattfindet (Burt et al., 1998). Wie groß das Verhältnis von G-Proteinstimulation zur Rezeptorbesetzung ist, kann von Rezeptor zu Rezeptor durchaus unterschiedlich sein, jedoch weist die gleiche Höhe von Wirksamkeit und hochaffiner Bindung eines Agonisten darauf hin, dass dieses intrinsische Verhältnis optimal ausgenutzt wird.

Unter diesem Gesichtspunkt fällt auf, dass im Gegensatz zum  $M_2$ -Rezeptor der  $pK_i$ -Wert am  $M_4$ -Rezeptor bei zunehmender Länge des *n*-Alkyl-Substituenten den jeweiligen  $pEC_{50}$ -Wert größer ausfiel (t-Test,  $p < 0,05$  bzw.  $0,001$ ). Dieser Unterschied betrug ca. 0,5 auch bei den in Abb. 4.1 nicht dargestellten Derivaten IP-C<sub>9</sub> und -C<sub>10</sub>, war jedoch für IP-C<sub>7</sub> mit 1,3 wesentlich höher. Das Verhältnis von Rezeptorbindung zur  $G_i$ -Aktivierung fällt demnach beim  $M_4$ -Rezeptor bedingt durch die Strukturveränderung ungünstiger aus.

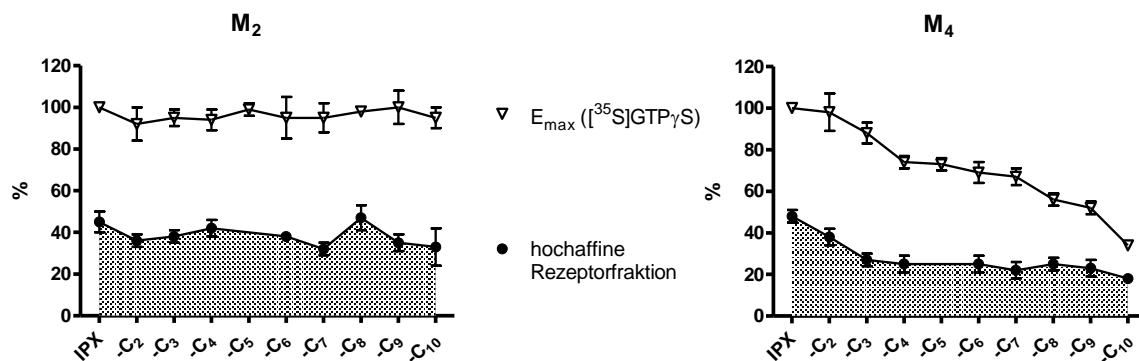


**Abb. 4.1 Vergleich der Wirksamkeit ( $pEC_{50}$ ) im  $G_i$ -Signalweg und der Affinität von Iperoxo und seinen *n*-Alkyl-Derivaten von IP-C<sub>2</sub> bis -C<sub>8</sub>.** Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler mit  $n = 3$  bis 10.  $pEC_{50}$ : negativer dekadischer Logarithmus der Testsubstanz-Konzentration beim halbmaximalen Effekt im [<sup>35</sup>S]GTPγS-Experiment an Membranhomogenaten.  $pK_i$  (hoch): negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten zur hochaffinen Bindungsstelle aus Wettbewerbsversuchen mit [<sup>3</sup>H]NMS an Membranhomogenaten. \* bzw. \*\*\*: statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Wertepaar (t-Test mit  $p < 0,05$  bzw.  $p < 0,001$ ). Für das Derivat IP-C<sub>5</sub> wurde auf die Angabe des Affinitätswertes verzichtet, da dieser nicht genau gemessen werden konnte (vgl. Abschnitt 3.2.1.2).

Welche Auswirkung die scheinbar kleine Diskrepanz zwischen Wirksamkeit und hochaffiner Bindung am  $M_4$ -Rezeptor hat, kann anhand des Derivats IP-C<sub>6</sub>, welches mit 0,34 den kleinsten Unterschied aufweist, verdeutlicht werden. Laut Gleichung 4 wären bei Einsatz einer halbmaximal-wirksamen Konzentration dieser Testsubstanz nach Einstellung des Gleichgewichts bereits ca. 70% der Rezeptoren in aktiver Konformation besetzt. Die Frage nach einer Gleichgewichtseinstellung geht

jedoch für den  $pEC_{50}$ -Wert der  $[^{35}S]GTP\gamma S$ -Bindung fehl, da diese Bindung irreversibel ist. Weiterhin ist die Bildung des Agonist-Rezeptor-G-Protein-Komplexes nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, sondern die Bindung von  $[^{35}S]GTP\gamma S$  an ebendiesen Komplex (Strange, 2010). Ob die Testsubstanzen unterschiedlich schnell an den Rezeptor binden bzw. wie schnell die G-Protein-Rekrutierung verläuft, ist demnach für die Lage des  $pEC_{50}$ -Wertes sowie für die maximal induzierbare  $[^{35}S]GTP\gamma S$ -Bindung nur von untergeordneter Bedeutung.

Tatsächlich zeigten die Derivate mit zunehmender Länge ihres Substituenten eine Abnahme der maximalen  $[^{35}S]GTP\gamma S$ -Bindung am  $M_4$ -Rezeptor bezogen auf den durch Iperoxo maximal-induzierbaren Wert. Am  $M_2$ -Rezeptor hingegen hatten die Strukturveränderungen keinen Einfluss. Nur anhand der mit der Substituent-Verlängerung einhergehenden abfallenden Affinität der Testsubstanzen lässt sich dies nicht begründen, da diese wie eingangs erwähnt an beiden Rezeptoren gleichermaßen ausgeprägt war. Es zeigte sich jedoch, dass im Gegensatz zum  $M_2$ -Rezeptor die Größe der hochaffinen  $M_4$ -Rezeptorpopulation mit länger werdenden  $n$ -Alkyl-Rest der Derivate abnahm. Abb. 4.2 fasst diese Ergebnisse zusammen.



**Abb. 4.2 Vergleich der maximalen  $G_i$ -Aktivierung ( $E_{max}$ ) mit der Größe der hochaffinen Rezeptorfraction bei Einsatz von Iperoxo und seinen  $n$ -Alkyl-Derivaten.** Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler mit  $n = 3$  bis 10.  $E_{max}$ : maximal-induzierte  $[^{35}S]GTP\gamma S$ -Bindung der Testsubstanz an Membranhomogenaten normiert auf den Maximaleffekt von Iperoxo als 100%. Die Größe der hochaffinen Rezeptorfraction wurde mit heterologer Konkurrenz mit  $[^3H]NMS$  an Membranhomogenaten bestimmt und gibt den Anteil der Rezeptoren in hochaffiner Konformation in der gesamten Rezeptorpopulation an. Da keine Unterscheidung zwischen der hoch- und niedrigaffinen Bindung von IP-C<sub>5</sub> gemessen werden konnte, fehlt der entsprechende Wert in der Darstellung (vgl. 3.2.1.2).

Mit Iperoxo zeigte sich an  $M_2$ - und  $M_4$ -Membranhomogenaten eine hochaffine Rezeptorpopulation von 45%, was ebenso auf den endogenen Liganden zutrifft (vgl. Abb. 3.10). Vergleichbare Werte wurden von D. Kaufel (Dissertationsschrift 2010) an  $M_2$ -Homogenaten gemessen (IPX =  $39 \pm 3$  bzw. ACh =  $40 \pm 2$ , nicht signifikant verschieden; t-Test,  $p > 0,05$ ). In der zitierten Dissertation wurde hingegen mit IP-C<sub>4</sub> eine kleinere hochaffine  $M_2$ -Rezeptorfraction von  $20 \pm 2$  beschrieben, welche sich signifikant von der in der vorliegenden Arbeit gefundenen unterscheidet ( $42 \pm 4$ ; t-Test,  $p < 0,0001$ ). Die Angabe der Fraktionsgröße in der zitierten Arbeit beruht jedoch auf Bindungsdaten, die besser mit dem monophasischen als mit dem biphasischen Modell ausgewertet werden konnten (3 von 4 Versuchen monophasisch), was mit einer Verzerrung zu kleineren Werten einherging.

Am  $M_4$ -Rezeptor hatte die Verlängerung des  $n$ -Alkyl-Substituenten bis -C<sub>3</sub> den stärksten Einfluss auf die Größe der hochaffinen Rezeptorfraction. Doch erst beim Derivat IP-C<sub>4</sub> unterschied sich die maximal-induzierbare  $[^{35}S]GTP\gamma S$ -Bindung sowie die hochaffine Rezeptorfraction signifikant von Iperoxo (vgl. Tab. 3.2 und Abb. 3.13). Ab dieser Substituent-Länge ist somit eine Grenze zu ziehen, bei der die Unterschiede zwischen  $M_2$ - und  $M_4$ -Rezeptor in der Fähigkeit zur Generierung der aktiven, zur  $G_i$ -Kopplung fähigen Konformation hervortreten.

Bisher wurde nur der M<sub>2</sub>-Rezeptor in einem inaktiven sowie im aktiven, Iperoxo-gebundenen Zustand kristallisiert (Haga et al., 2012; Kruse et al., 2013a). Für den M<sub>4</sub>-Rezeptor wurde hingegen nur die inaktive, Tiotropium-gebundene Struktur publiziert (Thal et al., 2016). Der Vergleich der Kristallstrukturen zeigte wie erwartet, dass sich die größten strukturellen Unterschiede zwischen den beiden Subtypen in den nicht-konservierten Bereichen der allosterischen Bindungsstelle befinden. In der orthosterischen Bindungstasche ist einzig die konservierte Aminosäure Asp<sup>3.32</sup> im M<sub>4</sub>-Rezeptor etwas anders orientiert als in den Subtypen M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> und M<sub>3</sub>, sodass die Ausbildung von zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindungen zu anderen Aminosäuren des M<sub>4</sub>-Rezeptors möglich ist (Thal et al., 2016). Da Asp<sup>3.32</sup> maßgeblich für die Interaktion mit der positiven Ladung von Liganden ist, ist es denkbar, dass die Strukturveränderungen am quartären Stickstoff von Iperoxo die Beweglichkeit und somit Interaktionsmöglichkeiten dieses wichtigen Areals behindern und somit der Übergang in die aktive Konformation erschwert ist.

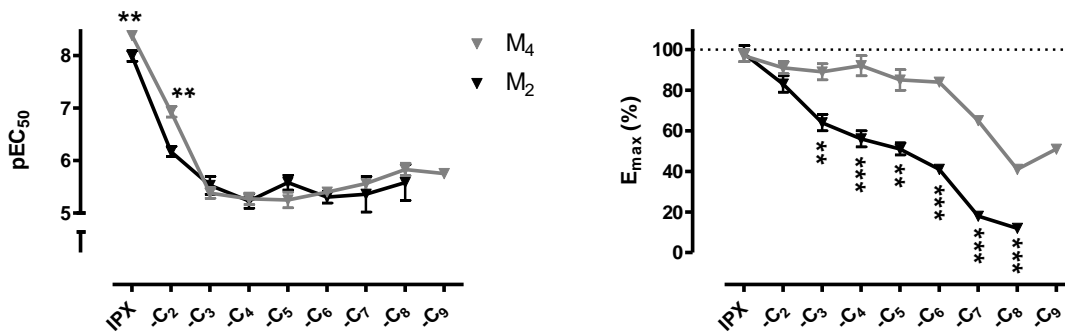
#### 4.1.3 Aktivierung des alternativen G<sub>s</sub>-Signalweges

Im Gegensatz zur Familie der G<sub>i/o</sub>-Proteine, lässt sich die Aktivierung von G<sub>s</sub>-Proteinen nicht direkt durch Erfassung des Nukleotid-Austauschs wie im [<sup>35</sup>S]GTPγS-Experiment messen, da durch die generell kleinere intrazelluläre G<sub>s</sub>-Konzentration kein Unterschied zwischen basaler G<sub>s</sub>-Aktivität und Agonist-induziertem Effekt erfasst werden kann (Milligan, 2003). Als nächster Schritt der Signalkaskade von G<sub>s</sub>-Proteinen kann jedoch die Aktivität des Effektorenzyms Adenylatcyclase durch Messung der cAMP-Bildung als Surrogatparameter erfasst werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Bildung von cAMP an ganzen, mit PTX vorbehandelten FlpIn<sup>TM</sup>hM<sub>2</sub>- bzw. -hM<sub>4</sub>-CHO-Zellen mit einem kompetitiven Immunoassay gemessen. Da die Adenylatcyclase mit der Zellmembran assoziiert ist, sind auch Methoden zur Erfassung ihrer Aktivität an Membranhomogenaten entwickelt worden. Die Hemmung der G<sub>i/o</sub>-Proteine mit PTX gestaltet sich an intakten Zellen aber einfacher, da keine weiteren für die Reaktion nötigen Substrate wegen ihres ohnehin intrazellulären Vorkommens hinzugegeben werden müssen.

Die Untersuchung des Potentials zur G<sub>s</sub>-Aktivierung nach Ausschaltung der inhibitorischen G-Proteine ergab das in Abb. 4.3 zusammengefasste Gesamtbild. Wie bei der Aktivierung des präferentiellen G<sub>i</sub>-Signalwegs zeigte Iperoxo die größte Wirksamkeit an beiden Rezeptoren, welche durch die Verlängerung des *n*-Alkyl-Substituenten kleiner wurde. Jedoch blieb der pEC<sub>50</sub>-Wert ab einer Kettenlänge von -C<sub>3</sub> in einem Bereich von ca. 5,5. Die Testsubstanzen induzierten ab der Substituentlänge -C<sub>3</sub> über den M<sub>4</sub>-Rezeptor jedoch stets einen höheren Maximaleffekt als über den M<sub>2</sub>-Rezeptor. An diesem Subtyp korrelierte jede Verlängerung des *n*-Alkyl-Substituenten um eine CH<sub>2</sub>-Gruppe linear mit einem Abfall des Maximaleffekts um 12 ± 1 Einheiten (R<sup>2</sup> = 0,98). Hingegen übte sich erst ein längerer Substituent (ab -C<sub>7</sub>) deutlich negativ auf die maximale M<sub>4</sub>-vermittelte cAMP-Generierung aus.

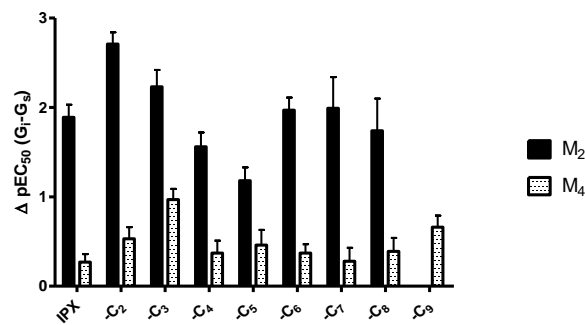
Ein direkter Vergleich der Wirksamkeit mit der Affinität der Testsubstanzen, wie sie für die Aktivierung der G<sub>i</sub>-Proteine im vorangehenden Abschnitt vorgenommen wurde, ist an dieser Stelle jedoch nicht möglich, wenn man nicht Äpfel mit Birnen vergleichen möchte. Im Unterschied zur [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung wurde die cAMP-Bildung an intakten Zellen gemessen. Zudem wurde ein anderer Puffer verwendet und die Versuchstemperatur lag bei 37°C statt 30°C. Die Affinität von Agonisten an GPCR intakter Zellen ist in der Regel niedriger als der an Membranhohogenaten gemessene Wert, die Bindungskurven verlaufen häufig flacher (n<sub>H</sub><-1) und weisen keine Biphasizität auf. Die Rezeptoren

von intakten Zellen liegen durch die relativ hohe intrazelluläre GTP-Konzentration ( $\approx 10\text{-}50 \mu\text{M}$ ) überwiegend im G-Protein-entkoppelten Zustand vor. PTX-Behandlung, welche die Interaktion zwischen Rezeptoren und  $G_{i/o}$ -Proteinen unterbindet, hat daher auch keinen Einfluss auf die Affinität von Iperoxo an den  $M_2$ -Rezeptor lebender CHO-Zellen (Bock et al., 2012; Schrage et al., 2013). Dass dies auch für die Iperoxo-Derivate zutrifft, erscheint logisch und kann an dieser Stelle mit Sicherheit vorausgesetzt werden.



**Abb. 4.3 Vergleich der Wirksamkeit und des Maximaleffekts der Testsubstanz-induzierten cAMP-Bildung in PTX-vorbehandelten Zellen.**  $pEC_{50}$ : Testsubstanz-Konzentration beim halbmaximalen Effekt.  $E_{max}$ : maximaler Effekt der Testsubstanz-induzierten cAMP-Bildung normiert auf den Maximaleffekt von Iperoxo als 100 %. Verwendet wurden Flp-In<sup>TM</sup>-hM<sub>2</sub>- bzw. hM<sub>4</sub>-CHO-Zellen, die zuvor für 16-18h mit PTX vorbehandelt worden waren. \*\* bzw. \*\*\*: signifikant unterschiedlich zwischen den Werten am  $M_2$ - und  $M_4$ -Rezeptor (t-Test,  $p < 0,001$  bzw.  $0,0001$ ). Die Substanzen IP-C<sub>9</sub> und IP-C<sub>10</sub> zeigten keine Rezeptor-vermittelten Effekte an den  $M_2$ -Zellen, gleiches gilt entsprechend für IP-C<sub>10</sub> an  $M_4$ , sodass hier keine Werte angegeben werden können.

Bei isolierter Betrachtung der Ergebnisse der cAMP-Experimente unter PTX-Behandlung erscheint es demnach, dass die *n*-Alkyl-Kettenverlängerung am Iperoxo-Grundgerüst die Wirksamkeit der  $G_s$ -Aktivierung an beiden Rezeptoren gleichermaßen beeinflusste. Die im Gegensatz zu  $M_4$  stetig fallenden Maximaleffekte der Testsubstanzen am  $M_2$ -Rezeptor deuten jedoch darauf hin, dass wesentliche Unterschiede bzgl. der Fähigkeit zur Kopplung an  $G_s$ -Proteine zwischen beiden Rezeptoren vorliegen müssen, die im direkten Zusammenhang mit der Substituent-Verlängerung stehen. Die Kristallstruktur des  $M_2$ -Rezeptors in aktiver Konformation mit Iperoxo zeigt, dass sich der Rezeptor komplett um den Liganden schließt (vgl. Abb. 1.5 in der Einleitung). Dass der länger werdende *n*-Alkyl-Substituent den Rezeptor an diesem Vorgang behindert, erscheint unwahrscheinlich, denn sonst wäre ein abfallender Maximaleffekt auch im  $G_i$ -Signalweg am  $M_2$ -Rezeptor zu erwarten gewesen. Ein Vergleich der Wirksamkeiten der zwei untersuchten Signalwege verdeutlicht weiterhin, dass eine Aktivierung des alternativen  $G_s$ -Signalwegs im Gegensatz zum präferentiellen  $G_i$ -Weg am  $M_2$ -Rezeptor mit einem Wirksamkeitsverlust von durchschnittlich 2 Dekaden einhergeht, während es am  $M_4$ -Subtyp (mit Ausnahme von IP-C<sub>3</sub>) nur ca. 0,5 Dekaden sind (siehe Abb. 4.4).



**Abb. 4.4 Wirksamkeitsverlust der Testsubstanzen vom G<sub>1</sub>- zum G<sub>s</sub>-Signalweg.**  $\Delta pEC_{50} (G_1-G_s)$ : Differenz zwischen der gemessenen Wirksamkeit ( $pEC_{50}$ ) im [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindungsexperiment und der Wirksamkeit im cAMP-Assay nach PTX-Behandlung. Die Fehlerfortpflanzung wurde wie in Abschnitt 2.1.6.2 angegeben berücksichtigt.

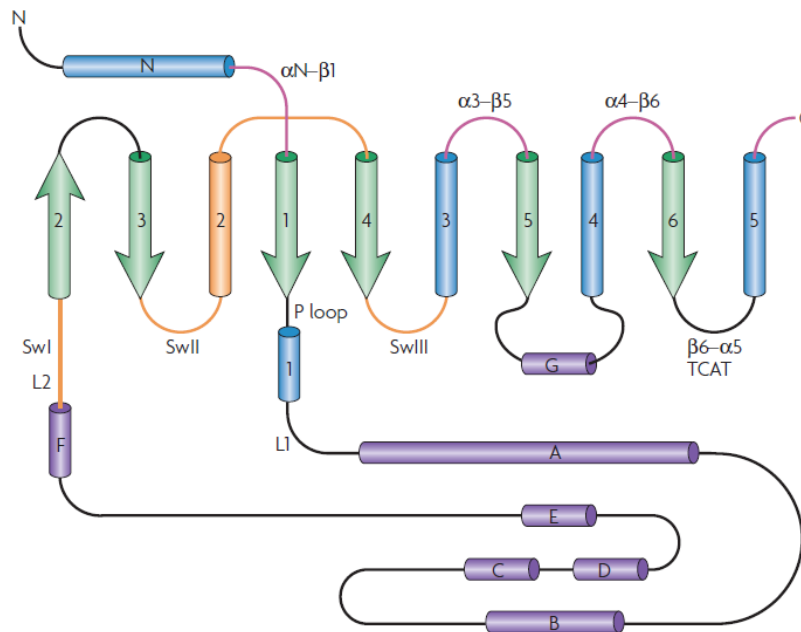
Dies zusammen mit dem reziproken Verhalten der Maximaleffekte der beiden Signalwege lässt darauf schließen, dass gravierende Unterschiede in der intrinsischen Fähigkeit zur Kopplung an G<sub>s</sub>-Proteine als eine mögliche Alternative zu den bevorzugten G<sub>i/o</sub>-Proteinen zwischen den beiden Rezeptoren bestehen. Es ist in dem Zusammenhang erstaunlich, dass diese Unterschiede bei den hier als relativ einfach zu wertenden Strukturveränderungen zu Tage treten. Die möglichen Wechselwirkungen eines Alkyl-Restes mit einem Protein beschränken sich nämlich auf schwache Van-der-Waals-Kräfte. Dies spiegelte sich auch in der niedrigen Bindungsaffinität der beiden getesteten Derivate IP-C<sub>9</sub> und -C<sub>10</sub> an die allosterische Bindungsstelle wider (vgl. Abschnitt 3.2.2.1). Eine unterschiedlich starke sterische Behinderung der Rezeptordynamik scheint daher die wesentlich wahrscheinlichere Ursache für die beobachteten Divergenzen zwischen M<sub>2</sub> und M<sub>4</sub> zu sein.

#### 4.1.4 Welche Bereiche sind verantwortlich für die G-Protein-Kopplung?

Die Fähigkeit der GPCR, an mehrere G-Proteine zu koppeln, ist schon seit Langem bekannt und es wurden bereits vielfach Interaktionsbereiche zwischen Rezeptor und Gα-Protein beschrieben. Eine wichtige Rolle spielt dabei der C-Terminus der Gα-Untereinheit (Hamm et al., 1988), welcher an eine dem Zytoplasma zugewandten Bindungstasche des 7TM-Rezeptors bindet. Für die Aktivierung inhibitorischer G-Proteine postulierten erstmals Okamoto und Nishimoto (1992) eine Sequenz von basischen Aminosäuren in Rezeptoren mit präferentieller G<sub>i</sub>-Kopplung. Sie zeigten, dass die intrazellulären Schleifen IL2 und IL3 des M<sub>4</sub>-Rezeptors für die Gα<sub>i</sub>- und Gα<sub>o</sub>-Aktivierung verantwortlich sind, jedoch auch die Fähigkeit zur Gα<sub>s</sub>-Aktivierung besitzen. Für den ebenfalls G<sub>i/o</sub>-gekoppelten α<sub>2</sub>-Adrenozeptor wurden zwei Bereiche in der dritten intrazellulären Schleife beschrieben, die jeweils die Gα<sub>i</sub>- bzw. Gα<sub>s</sub>-Aktivierung vermitteln (Wade et al., 1999). Eine duale Kopplung an G<sub>s</sub> und G<sub>i</sub> wurde dem Cannabinoid-Rezeptor 1 zugesprochen, welche hauptsächlich durch die Schleife IL2 vermittelt wird und in der die Aminosäure Leu-222 essentiell für die G<sub>s</sub>-Aktivierung ist (Chen et al., 2010). Die gleiche Aminosäure befindet sich auch an entsprechender Stelle im M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Rezeptor sowie in vielen präferentiell G<sub>s</sub>-gekoppelten Rezeptoren (siehe # in Abb. 4.6).

Durch die Kristallstruktur des β<sub>2</sub>-Adrenozeptors im Komplex mit Gα<sub>s</sub>β<sub>y</sub> zeigten sich drei Hauptinteraktionsbereiche der Gα<sub>s</sub>-Untereinheit, nämlich der C-Terminus, der αN-β1-Bereich und die α4-β6-Region (Rasmussen et al., 2011; siehe Abb. 4.5 zur Gα-Struktur). Durch biochemische und

biophysikalische Versuche sind jedoch noch weitere Bindungsbereiche zwischen  $\beta_2$ -Rezeptor und der  $G\alpha$ -Untereinheit identifiziert worden, die in der Kristallstruktur nicht zu erkennen sind, z.B. die  $\alpha 3$ - $\beta 5$ -Schleife. Dies spricht dafür, dass mehrere mögliche Konformationen eines Rezeptor-G-Proteinkomplexes existieren und diese von der Art des G-Proteins abhängig sind (Chung, 2013).



**Abb. 4.5 Konservierte Sekundärstruktur der  $G\alpha$ -Untereinheit.**  $\alpha$ -helicale Strukturen sind durch Zylinder und  $\beta$ -Faltblätter durch Pfeile schematisch dargestellt. Die sogenannte helicale Domäne von  $G\alpha$  besteht aus sieben mit Buchstaben benannten  $\alpha$ -Helices (I-IIa). Die Linker L1 und L2 verbinden die helicale Domäne mit der GTPase-Domäne. Diese enthält drei flexible Schleifen (SwI-SwIII, orange), die unterschiedliche Konformationen im GDP- und GTP-gebundenen Zustand aufweisen. Wichtige Bereiche, die eine Interaktion mit einem GPCR eingehen, sind  $\alpha N$ - $\beta 1$ ,  $\alpha 3$ - $\beta 5$ ,  $\alpha 4$ - $\beta 6$  und der C-Terminus (pink). Das TACT-Motif in der  $\beta 6$ - $\alpha 5$ -Schleife ist für die Bindung des Guanin-Ringes essentiell. Modifiziert nach Oldham & Hamm, 2008.

Die Frage, wie auch miteinander nahverwandte 7TM-Rezeptoren eine unterschiedliche, selektive Kopplung an G-Proteine erreichen, ist bisher noch nicht zufriedenstellend beantwortet worden. Daten aus Mutagenesestudien weisen jedoch darauf hin, dass auch wenn die gleichen Domänen der  $G\alpha$ -Untereinheiten von Rezeptoren erkannt werden, je nach Rezeptorsubtyp unterschiedliche Aminosäuren dieser Domänen an der Interaktion beteiligt zu sein scheinen (Slessareva et al., 2003). Einen interessanten Aspekt zeigt Abb. 4.6, welche aus Kling et al. (2013) entnommen wurde. Darin sind die Sequenzen der  $G_s$ -gekoppelten adrenergen Rezeptoren  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  und  $\beta_3$  (ADRB1-ADRB3), der  $G_i$ -gekoppelten Dopamin-Rezeptoren  $D_2$ ,  $D_3$  und  $D_4$  (DRD2-4) sowie der muskarinischen Subtypen  $M_2$  und  $M_4$  (ACM2 und ACM4) dargestellt. Durch Computersimulation der Moleküldynamik wurden die für die selektive  $G_s$ - bzw.  $G_i$ -Kopplung kritischen Aminosäuren charakterisiert (blau bzw. grün markiert). Ionische Bindungen spielen für die  $G_i$ -Kopplung die größte Rolle. Die beteiligten Aminosäuren (R und K) sind im  $D_2$ -Rezeptor im Übergang von IL2 zu TM4 und von TM5 zu IL3 lokalisiert. Der Sequenzvergleich mit dem  $M_2$ - und  $M_4$ -Rezeptor zeigt jedoch, dass diese an kritischen Stellen in IL3 und im weiteren Verlauf von TM6 größere Ähnlichkeit zum  $G_s$ -gekoppelten  $\beta_2$ -Rezeptor besitzen (siehe \* in Abb. 4.6).



## 4.2 Bias-Faktoren

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei Methoden der Bias-Faktor-Berechnung anhand der gleichen Datengrundlage durchgeführt, um das Verhalten der Testsubstanzen an beiden Rezeptoren systemunabhängig darzustellen. Die Methode nach Kenakin & Christopoulos (2013) greift dabei auf die Bildung des zusammengesetzten Parameters  $\log(\tau/K_A)$  zurück, während mit der Methode nach Rajagopal et al. (2011) der Parameter  $\tau$  unter Vorgabe von  $K_A$  als der Affinität zum G-Protein-ungekoppelten Rezeptor bestimmt wird. Eine vereinfachte Methode wurde von Ehlert et al. (1999) beschrieben, welche der Berechnung des Bias-Faktors  $\Delta\log(\tau/K_A)$  entspricht, jedoch nur dann angewendet werden kann, wenn der Hill-Slope der Konzentrations-Effekt-Beziehungen der Referenz- und Testsubstanz den Wert  $n_H=1$  hat (vgl. Methodenteil Abschnitte 2.1.5.4 bis 2.1.5.7).

### 4.2.1 Der Parameter $\tau$

Die Kopplungseffizienz  $\tau$  (*Transducer Ratio*) beschreibt das Verhältnis von Rezeptordichte  $[R_0]$  zur Transduktionskonstanten  $K_E$  gemäß Gleichung 21. Die Transduktionskonstante steht dabei für die Umsatzrate der gebildeten Agonist-Rezeptor-Komplexe in einen Effekt (vgl. Methodenabschnitt 2.1.5.4). Somit ist  $\tau$  ein Maß für den Rezeptoranteil, der zur Generierung einer Zellantwort besetzt sein muss. Je größer der  $\tau$ -Wert, desto kleiner ist der nötige Anteil der Agonist-besetzten Rezeptoren, was häufig gleichbedeutend auch als Rezeptorreserve bezeichnet wird.

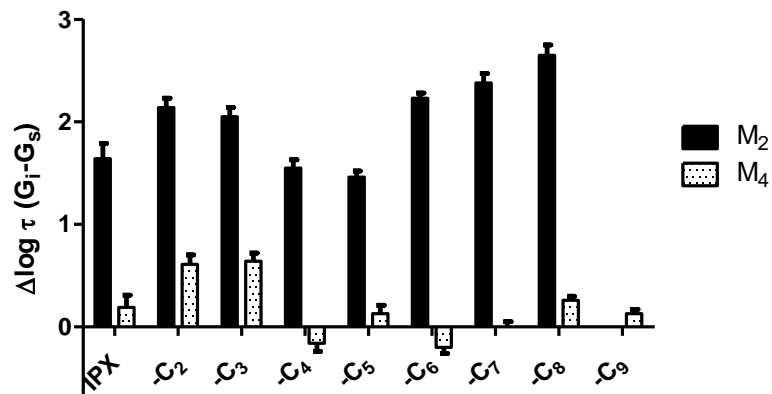
In der vorliegenden Arbeit wurde die Kopplungseffizienz  $\tau$  für alle Testsubstanzen im  $G_i$ - und  $G_s$ -Signalweg bestimmt. Dazu war es nötig, die Affinitäten der Testsubstanzen zum Rezeptor im G-Protein-ungekoppelten Zustand vorzugeben. Diese wurden aus heterologen Kompetitions-experimenten an Membranhomogenaten der Zell-Linien FlpIn<sup>TM</sup>hM<sub>2</sub>- bzw. -hM<sub>4</sub>-CHO entnommen. Dieses Vorgehen birgt die Gefahr, dass die vorgegebenen Affinitätswerte aus Experimenten an Membranen nicht den wahren Affinitäten der Testsubstanzen an den G-Protein-freien Zustand der Rezeptoren intakter Zellen entsprechen. Mit dem Radioliganden [<sup>3</sup>H]Iperoxo hat sich jedoch gezeigt, dass der an Zellen gemessene  $pK_D$ -Wert gut mit der Affinität an Membranhomogenaten unter GTP-Zusatz korrespondiert (Schrage et al., 2014). GTP entkoppelt die Rezeptoren in Membranhomogenaten von G-Proteinen. Dieser Zustand entspricht dem niedrigaffinen Rezeptorzustand, welcher in der vorliegenden durch die biphasischen Bindungskurven erfasst wurde. Geringfügig verschiedene Puffer und Messtemperaturen verursachen an dieser Stelle keine gravierenden Unterschiede. Wichtiger für die Gesamtbetrachtung sind ohnehin die relativen Affinitätsunterschiede der Testsubstanzen untereinander, welche sich weitestgehend unabhängig vom jeweiligen System (z.B. Membranhomogenat oder Zellen) bestimmen lassen.

Die Kopplungseffizienz, ausgedrückt als  $\log \tau$ -Wert, wurde für Iperoxo am M<sub>2</sub>-Rezeptor mit  $2,44 \pm 0,08$  im  $G_i$ -Signalweg bestimmt. Dieser Wert liegt in guter Übereinstimmung mit den Angaben in anderen Arbeiten, welche [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S-Bindung oder die Dynamische Massenumverteilung (DMR) als Messmethode verwendeten ( $2,33 \pm 0,07$  bzw.  $2,64 \pm 0,08$  (DMR) in Schrage et al., 2013 und  $2,15 \pm 0,12$  (DMR) in Seemann, Dissertationsschrift 2012). Unter PTX wurde für Iperoxo ein  $\log \tau$ -Wert von  $1,15 \pm 0,07$  anhand von DMR-Experimenten an FlpIn<sup>TM</sup>hM<sub>2</sub>-CHO-Zellen gefunden (Schrage et al., 2013), welcher etwas höher liegt als der in der vorliegenden Arbeit gefundene Wert von  $0,80 \pm 0,13$  (t-Test,  $p < 0,05$ ). Die Differenz zwischen der Kopplungseffizienz von Iperoxo im  $G_i$ - und  $G_s$ -Signalweg lag bei Messung mit der DMR-Methode (Schrage et al., 2013) jedoch im gleichen Bereich wie in der



vorliegenden Arbeit ( $\Delta \log \tau (G_i-G_s) \approx 1,5$  vs. 1,6). Auch der endogene Ligand Acetylcholin zeigte ein ähnliches Verhalten am  $M_2$ -Rezeptor ( $\Delta \log \tau (G_i-G_s) \approx 1,4$ ; Schrage et al., 2013).

Die folgende Abbildung fasst die Differenzen der Kopplungseffizienz der Testsubstanzen am  $M_2$ - und  $M_4$ -Rezeptor zusammen.



**Abb. 4.7** Differenz der Kopplungseffizienzen im  $G_i$ - und  $G_s$ -Signalweg ( $\Delta \log \tau (G_i-G_s)$ ) am  $M_2$ - und  $M_4$ -Rezeptor. Die Werte wurden anhand der Angaben aus Tab. 3.19 und 3.20 unter Berücksichtigung der Fehlerfortpflanzung berechnet. Für den  $M_2$ -Rezeptor wurden nur die Testsubstanzen bis IP-C<sub>8</sub> berücksichtigt, da keine  $G_s$ -Aktivierung mit IP-C<sub>9</sub> und -C<sub>10</sub> festgestellt wurde. Am  $M_4$ -Rezeptor war eine Berechnung wegen fehlender Aktivität im  $G_s$ -Signalweg nur mit der Testsubstanz IP-C<sub>10</sub> nicht möglich.

Generell nahmen mit steigender Länge des *n*-Alkyl-Substituenten die  $\log \tau$ -Werte an den Subtypen in beiden Signalwegen zwar ab (siehe Abb. 3.21 und Abb. 3.22) doch zeigte sich am  $M_2$ -Rezeptor durchgehend ein um 1,5 bis 2,5 größerer  $\log \tau$ -Wert im  $G_i$ -Signalweg, während kaum Unterschiede in der Kopplungseffizienz am  $M_4$ -Rezeptor vorhanden waren. Diese Tendenz deutete sich schon in Abb. 4.4 anhand der  $\Delta pEC_{50}$ -Werte an. Der  $\log \tau$ -Wert umfasst jedoch neben der Wirksamkeit noch den Effekt des jeweiligen Liganden im Bezug auf die maximale Systemantwort und liefert daher eine bessere Charakterisierung der Testsubstanzen für den Vergleich an beiden Rezeptoren.

Die Untersuchung des physiologischen Vorkommens einer  $M_2$ -vermittelten  $G_s$ -Aktivierung führte zu der These, dass ein Agonist einen Grenzwert für  $\log \tau$  im  $G_i$ -Signalweg überschreiten muss, bevor zusätzlich auch eine Aktivierung alternativer Signalwege stattfinden kann (Seemann, Dissertationschrift 2012). Durch die Testung der Vollagonisten Iperoxo und Oxotremorin M, der dualsterischen Liganden Iper-6-phth und Iper-8-phth sowie des Partialagonisten Pilocarpin in der zitierten Arbeit zeigte eine vollständige  $G_s$ -Aktivierung auf Iperoxo-Niveau ab einem  $\log \tau (G_i)$  von ca. 1,6 am  $M_2$ -Rezeptor. Der Vergleich zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zeigt jedoch folgendes:

1. Dieser Grenzwert mag auf die untersuchten dualsterischen Liganden am  $M_2$ -Rezeptor zutreffen, jedoch nicht auf die hier getestete Substanzreihe. Alle Testsubstanzen bis zur Substituent-Länge von -C<sub>8</sub> zeigten am  $M_2$ -Rezeptor im  $G_i$ -Weg einen  $\log \tau$  von mindestens 1,6. Trotzdem fiel die Fähigkeit zur  $G_s$ -Aktivierung ab einer Länge des *n*-Alkyl-Substituenten von -C<sub>3</sub> stetig ab (vgl. Tab. 3.5).
2. Der genannte Grenzwert für den  $M_2$ -Rezeptor ist ebenfalls nicht ohne weiteres auf den nahverwandten  $M_4$ -Rezeptor übertragbar. Hier zeigte sich vollumfängliche Aktivierung des alternativen Signalwegs auch bei sehr viel kleineren  $\log \tau$ -Werten im  $G_i$ -Weg. Ein Grenzwert für orthosterische Liganden am  $M_4$ -Rezeptor könnte aufgrund der vorliegenden Daten bei einem  $\log \tau (G_i)$  von ca. 0,5 liegen.

Zusammengenommen unterstützt dies die von N. Janßen (Dissertationsschrift 2010) formulierte These einer größeren Tendenz des M<sub>4</sub>-Subtyps zur Aktivierung des G<sub>s</sub>-Signalwegs im Gegensatz zu M<sub>2</sub>. Es bleibt aber zu betonen, dass ein alternativer Signalweg immer dem präferentiellen nachgeschaltet bleibt.

#### 4.2.2 $\beta_{lig}$ versus $\Delta\Delta\log(\tau/K_A)$

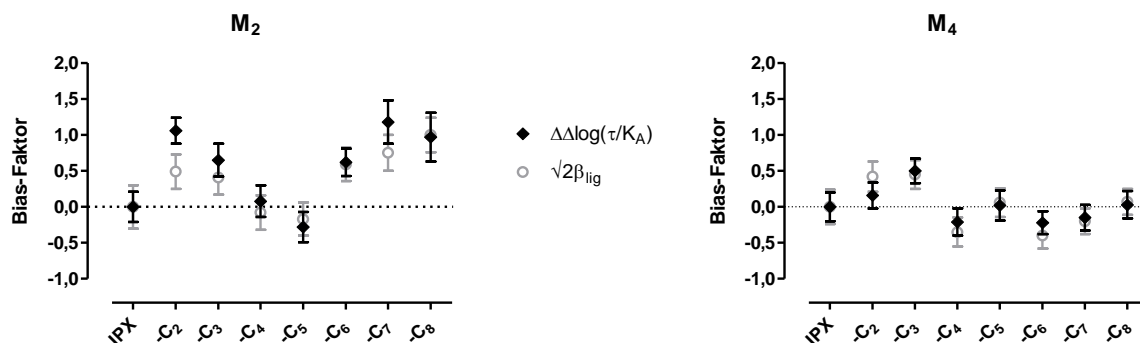
Wie in Ergbenisteil (Kapitel 3.3.2) bereits erwähnt, wurden die gleichen Werte bei der Berechnung der Bias-Faktoren  $\Delta\Delta\log(\tau/K_A)$  und  $\Delta\Delta\log(RA_i)$  erhalten. Dies wurde ebenso erwartet, da unter der hier gegebenen Voraussetzung eines Hill-Slopes von  $n_H=1$  der Bias-Faktor  $\Delta\Delta\log(RA_i)$  mathematisch vereinfacht mit der Berechnung von  $\Delta\Delta\log(\tau/K_A)$  gleichzusetzen ist (Kenakin & Christopoulos, 2013). Hingegen stellt sich die Beziehung zwischen den Bias-Faktoren  $\beta_{lig}$  und  $\Delta\Delta\log(\tau/K_A)$  folgendermaßen dar:

$$\sqrt{2}\beta_{lig} = \Delta\Delta\log(\tau/K_A) + \left(\log\left(\frac{K_{A_{ref}}}{K_{A_{lig}}}\right)\right)^{S2} - \left(\log\left(\frac{K_{A_{ref}}}{K_{A_{lig}}}\right)\right)^{S1}$$

Dabei sind  $K_{A_{ref}}$  und  $K_{A_{lig}}$  die  $K_A$ -Werte der Test- und Referenzsubstanz in den beiden Signalwegen S1 und S2. Falls diese funktionellen Affinitäten in den untersuchten Signalwegen jeweils gleich sind, so vereinfacht sich die Beziehung zu (Kenakin & Christopoulos, 2013):

$$\sqrt{2}\beta_{lig} = \Delta\Delta\log(\tau/K_A) \quad \text{Gleichung 40}$$

Daraus folgt, dass sich die Zahlenwerte bei Berechnung von  $\beta_{lig}$  im Vergleich  $\Delta\Delta\log(\tau/K_A)$  in einem schmaleren Bereich bewegen müssen, was an den jeweiligen Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit ebenfalls so zu sehen ist. Mit dieser Gleichung wurden die berechneten  $\beta_{lig}$ -Werte aus Abschnitt 3.3.3.4 umgeformt und mit den  $\Delta\Delta\log(\tau/K_A)$ -Werten aus Abschnitt 3.3.1.4 verglichen. Die folgende Abb. 4.8 zeigt die Gegenüberstellung der Werte für  $\sqrt{2}\beta_{lig}$  und  $\Delta\Delta\log(\tau/K_A)$ .



**Abb. 4.8 Vergleich des berechneten  $\sqrt{2}\beta_{lig}$ -Wertes mit dem Bias-Faktor  $\Delta\Delta\log(\tau/K_A)$ .** Dargestellt sind die (modifizierten) Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. Die Fehlerfortpflanzung wurde bei der Modifikation von  $\beta_{lig}$  berücksichtigt. Die Wertepaare zeigen keine signifikanten Unterschiede (t-Test mit  $p>0,05$ ).

Wie daran zu sehen ist, stimmen die Mittelwerte weitestgehend überein, die jeweiligen Wertepaare zeigen keine signifikanten Unterschiede (t-Test,  $p > 0,05$ ). Am  $M_2$ -Rezeptor liegen jedoch die Mittelwerte des modifizierten  $\beta_{lig}$ -Faktors und  $\Delta\log(\tau/K_A)$  der Substanz IP-C<sub>2</sub> um 0,56 voneinander entfernt. Bei der Substanz IP-C<sub>7</sub> beträgt der Unterschied 0,43. Angesichts des Wertebereichs, in dem sich Bias-Faktoren für gewöhnlich bewegen, ist dies trotz fehlender Signifikanz ein auffälliger Befund. Es könnte einerseits bedeuten, dass hier die Annahme einer gleichen funktionellen Affinität der Substanzen zum  $M_2$ -Rezeptor im  $G_i$ - und  $G_s$ -Signalweg nicht korrekt ist, wenn man von der Richtigkeit des Bias-Faktors  $\Delta\log(\tau/K_A)$  ausgeht. Die vereinfachte mathematische Beziehung der beiden Berechnungsarten von Bias-Faktoren könnte somit hier unzutreffend sein. Andererseits könnten die Bias-Faktoren der beiden Substanzen bei der Berechnung von  $\Delta\log(\tau/K_A)$  überschätzt worden sein.

Generell ist jedoch festzuhalten, dass durch beide Methoden der Bias-Berechnung ein sehr ähnliches Verteilungsmuster der Werte innerhalb der betrachteten Substanzreihe am  $M_4$ -Rezeptor erhalten wurde (vgl. Abb. 3.18 mit Abb. 3.23). Am  $M_2$ -Rezeptor zeigte sich hingegen bei beiden Methoden zumindest bei länger werdenden *n*-Alkyl-Resten die übereinstimmende Tendenz zum  $G_i$ -Bias, welcher angesichts der abnehmenden Maximaleffekte im  $G_s$ -Signalweg im Vergleich zum  $G_i$ -Vollagonismus der Substanzen schon zu erraten war. Die Substanz IP-C<sub>2</sub>, welche in beiden untersuchten Signalwegen am  $M_2$ -Rezeptor die volle Systemantwort erreichte, fällt in dieser Hinsicht aus dem Rahmen. Wegen ihres Vollagonismus, kann sich die Diskrepanz nur anhand der Wirksamkeits- bzw. Affinitätsunterschiede relativ zur Referenzsubstanz Iperoxo klären lassen.

Am  $M_2$ -Rezeptor folgte die Abnahme des  $G_i$ -Bias der Derivate mit kürzeren *n*-Alkyl-Substituenten von IP-C<sub>2</sub> zu IP-C<sub>5</sub> dem Abfall der Wirksamkeit im  $G_i$ -Signalweg (vgl. Abb. 3.18 mit Abb. 6.7 im Anhang). Die Wirksamkeit ( $pEC_{50}$ ) von IP-C<sub>2</sub> nahm im  $G_i$ -Weg gegenüber Iperoxo um 1,0 Dekaden am  $M_2$ -Rezeptor ab, während der Unterschied am  $M_4$ -Rezeptor bei 1,2 Dekaden lag. Hingegen zeigte sich hinsichtlich der  $G_s$ -Aktivierung ein kleinerer Wirksamkeitsverlust von 1,5 Dekaden am  $M_4$ -Rezeptor gegenüber von 1,8 an  $M_2$  (vgl. folgende Tab. 4.1).

$\Delta pEC_{50}(IPX - IP-C_2)$	$M_2$	$M_4$
$G_i$	1,0	1,2
$G_s$	1,8	1,5

**Tab. 4.1 Wirksamkeitsverlust von IP-C<sub>2</sub> gegenüber der Referenzsubstanz Iperoxo im  $G_i$ - und  $G_s$ -Signalweg.** Die Werte wurden anhand der gemessenen Wirksamkeiten in [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindungsexperimenten ( $G_i$ ) und der intrazellulären cAMP-Akkumulation in PTX-vorbehandelten Zellen ( $G_s$ ) berechnet.

Bei Berechnung von  $\Delta\log(\tau/K_A)$  hat somit die wesentlich größere Wirksamkeitsabnahme im  $G_s$ -Signalweg im Vergleich zu  $G_i$  am  $M_2$ -Rezeptor einen dominierenden Einfluss auf die Lage des Bias-Faktors. Am  $M_4$ -Rezeptor fielen die Unterschiede zwischen den beiden Signalwegen sehr viel geringer aus, sodass keine Tendenz zu einem  $G_i$ -Bias ersichtlich ist. Diese deutete sich an diesem Subtyp eher mit der in der Derivatenreihe nachfolgenden Substanz IP-C<sub>3</sub> an ( $\Delta\log(\tau/K_A)$  von  $0,50 \pm 0,17$ ) an, da hier die Wirksamkeitsunterschiede bei 2,3 und 3,0 Dekaden im  $G_i$ - bzw.  $G_s$ -Signalweg lagen.

Für die Berechnung des Bias-Faktors  $\beta_{lig}$  ist neben der Wirksamkeit der Referenzsubstanz im jeweiligen Signalweg, der  $K_A$ -Wert der Testsubstanz wichtig, welcher hier vorgegeben werden muss. Der Parameter  $K_A$  steht bei dieser Methode für die Affinität der Testsubstanz zum ungekoppelten Rezeptor und hat somit in beiden Signalwegen den gleichen Wert. Fehler, die durch die Vorgabe eines verfälschten  $K_A$ -wertes entstehen könnten, werden durch den Berechnungsvorgang von  $\beta_{lig}$  weitestgehend relativiert (Rajagopal, 2013). Die Größe des  $\tau$ -Parameters hängt nun bei einer vollagonistischen Testsubstanz vom Verhältnis von  $K_A$  zur Wirksamkeit der Referenzsubstanz ab. Im

Fall von IP-C<sub>2</sub> bedeutet dies, dass der  $\tau$ -Wert im G<sub>i</sub>-Signalweg an beiden Rezeptoren grundsätzlich größer war als im G<sub>s</sub>-Weg (vgl. Tab. 4.2), da Iperoxo hier eine höhere Wirksamkeit aufwies.

log $\tau$ (IP-C <sub>2</sub> )	M <sub>2</sub>	M <sub>4</sub>
G <sub>i</sub>	2,48 ± 0,05	1,78 ± 0,05
G <sub>s</sub>	0,34 ± 0,07	1,17 ± 0,07

Tab. 4.2 Vergleich der Parameter log  $\tau$  der Testsubstanz IP-C<sub>2</sub>. Die Werte wurden aus Tab. 3.19 und Tab. 3.20 entnommen.

Dass IP-C<sub>2</sub> über den M<sub>2</sub>-Rezeptor den G<sub>i</sub>-Signalweg im Vergleich zu G<sub>s</sub> wesentlich besser aktivieren kann, ist hier an den log  $\tau$ -Werten als Rohparameter deutlich zu erkennen. Am M<sub>4</sub>-Rezeptor scheint das Ausmaß jedoch nicht so gravierend zu sein, was daran liegt, dass die Referenzsubstanz Iperoxo im G<sub>s</sub>-Signalweg weniger an Wirksamkeit verlor als am M<sub>2</sub>-Rezeptor ( $\Delta pEC_{50}(G_i-G_s)$  von ca. 1,9 an M<sub>2</sub> und 0,3 an M<sub>4</sub>).

Für die Berechnung von  $\beta_{lig}$  wird jedoch das Verhältnis der log  $\tau$ -Werte der Test- und Referenzsubstanz des jeweiligen Signalwegs genutzt ( $\sigma_{lig}$  siehe Gleichung 31). Da log  $\tau$  von Iperoxo im G<sub>i</sub>-Signalweg jeweils in etwa dem Wert von IP-C<sub>2</sub> entsprach und im G<sub>s</sub>-Weg an beiden Rezeptoren um jeweils ca. 0,5 höher lag, ergaben sich Bias-Faktoren für die Substanz IP-C<sub>2</sub> mit sehr ähnlichen Werten am M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Rezeptor (0,35 ± 0,17 und 0,30 ± 0,15 vgl. Tab. 3.21). Diese unterscheiden sich nicht signifikant von der Referenzsubstanz (t-Test,  $p > 0,05$ ), sodass hier kein G<sub>i</sub>-Bias der Testsubstanz IP-C<sub>2</sub> am M<sub>2</sub>-Rezeptor abeleitet werden kann.

Welcher Bias-Faktor nun der richtige ist, kann durch diese Betrachtung jedoch nicht beurteilt werden. Für den  $\beta_{lig}$ -Faktor spricht die Tatsache, dass sich die Methode näher am ursprünglichen *Operational Model* orientiert und somit ein rein pharmakologisches Modell ist, in dem Affinität und Wirksamkeit (*efficacy*) getrennt einfließen. Die Bedeutung des Parameters  $\tau$  und der effektiven Signalwegsaktivierung  $\sigma_{lig}$  als Maß für den Agonismus eines Liganden ist hierbei auch leicht nachvollziehbar. Die Schwachstelle der Methode ist jedoch die richtige Bestimmung des Affinitätswertes  $K_A$ . Es können systematische Unterschiede in den experimentellen Bedingungen der Bindungsexperimente und der funktionellen Assays bestehen. Das erste Problem besteht darin, dies aufzudecken und das zweite darin, dass unklar ist, ab welcher Größenordnung sich diese Diskrepanzen deutlich auf den Bias-Faktor als Ergebnis auswirken.

Für die Berechnung von  $\Delta \log(\tau/K_A)$  wird hingegen das *Operational Model* als pharmakologisches Modell zu Grunde gelegt, jedoch erfolgt durch die Definition einer funktionellen Affinität, d.h. der Affinität zum Rezeptor mit gekoppeltem G-Protein als *Transducer*, eine Vermischung mit einem allosterischen Modell, welches die Bildung eines ternären Komplexes beschreibt. Die Zusammenfassung von einzelnen Parametern in den Term  $\tau/K_A$  als Transduktionskoeffizient kann zur Folge haben, dass bei der Regressionsanalyse der Daten die Parameter extreme Werte annehmen müssen (Rajagopal, 2013). Die  $\tau/K_A$ -Werte an sich haben im Vergleich zum Parameter  $\tau$  einen abstrakten Charakter und sind ohne abschließende Berechnung des Bias-Faktors ohne Aussagekraft, da sie wie aus Abb. 3.16 und Abb. 3.17 ersichtlich weitestgehend dem Verlauf der  $pEC_{50}$ -Werte innerhalb der Substanzreihe entsprechen. Im Gegensatz zur Methode der  $\beta_{lig}$ -Berechnung ist hier jedoch ein kleinerer Datensatz und somit ein geringerer experimenteller Aufwand nötig, was die Berechnung von  $\Delta \log(\tau/K_A)$  im Rahmen eines Screenings neuer Substanzen attraktiver macht.

Zusammenfassend lässt sich somit folgendes festhalten:

1. Wenn eine Testsubstanz zumindest in einem von zwei untersuchten Signalwegen einen Partialagonismus zeigt, tendieren beide Methoden der Bias-Berechnung unter Berücksichtigung von Gleichung 40 zu Bias-Faktoren im gleichen Wertebereich.

2. Da Unklarheit über die Richtigkeit der Bias-Faktoren  $\beta_{ig}$  und  $\Delta\Delta\log(\tau/K_A)$  besteht, kann hier der Bias-Faktor  $\Delta\Delta\log(RA_i)$  eine gute Orientierung bieten. Die  $\Delta\Delta\log(RA_i)$ -Bestimmung wird von den Verfechtern beider Methoden gleichermaßen als gute und unter den bereits genannten Voraussetzungen anwendbare Alternative beschrieben. Sind Referenz- und Testsubstanz Vollagonisten, so vereinfacht sich Gleichung 39 zu:

$$\Delta\Delta\log(RA_i) = \log\left(\left(\frac{EC_{50-S2}}{EC_{50-S1}}\right)_{Test} * \left(\frac{EC_{50-S1}}{EC_{50-S2}}\right)_{Ref}\right)$$

Damit kann für die Substanz IP-C<sub>2</sub> am M<sub>2</sub>-Rezeptor ein Bias-Faktor von  $0,82 \pm 0,20$  berechnet werden, der zwischen den Werten von  $\beta_{ig}$  und  $\Delta\Delta\log(\tau/K_A)$  dieser Arbeit liegt und sich signifikant von der Referenzsubstanz mit dem Wert  $0 \pm 0,20$  unterscheidet (t-Test,  $p < 0,05$ ).

### 4.3 Untersuchung zweier Signalwege im cAMP-Testsystem

Die oben diskutierten Bias-Faktoren beruhen auf getrennten Messungen der  $G_i$ -Aktivierung und Stimulation der cAMP-Generierung, welche ein unterschiedliches Maß an Signalamplifizierung aufweisen. Durch die Bezugnahme auf einen Referenzagonisten werden die Einflüsse des gewählten Messsystems auf den Bias-Faktor zwar eliminiert, jedoch bleibt die Frage, ob durch den Einsatz von PTX zur Ausschaltung von  $G_i$ -Proteinen die Aktivierung des alternativen  $G_s$ -Signalwegs möglicherweise überbewertet wurde. Um dies zu klären, wurde die präferentielle Inhibition sowie die darauffolgende Stimulation der intrazellulären Bildung von cAMP in den Zell-Linien FlpIn<sup>TM</sup>hM<sub>2</sub>- bzw. -hM<sub>4</sub>-CHO ohne Einsatz des Toxins gemessen. Dies war mit den genannten Zellen möglich, da sie eine hohe Rezeptorexpression aufwiesen, welche die Voraussetzung zur Messung eines biphasischen Verlaufs der cAMP-Produktion darstellt (vgl. z.B. Dittman et al., 1994). Der Bias-Faktor  $\Delta\Delta RA_i$  für ausgewählte Derivate der Testsubstanzreihe konnte somit anhand dieser alternativen Daten-grundlage berechnet werden.

#### 4.3.1 Der Einfluss von Forskolin im Testsystem

Ein biphasischer Verlauf der intrazellulären cAMP-Bildung konnte in beiden Zell-Linien zunächst mit dem endogenen Liganden Acetylcholin gemessen werden. Dabei wurde jedoch zum einen festgestellt, dass im Gegensatz zur Messung der [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung und der cAMP-Bildung unter PTX keine wesentlichen Wirksamkeitsunterschiede zwischen M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Rezeptor bestanden. Auch bei Messung der Acetylcholin-induzierten  $G_i$ - bzw.  $G_s$ -Aktivierung anhand der Dynamischen Massenumverteilung (DMR) wurden keine Unterschiede bzgl. der Wirksamkeit des endogenen Liganden gemessen (Janßen, Dissertationsschrift 2010).

Zum anderen zeigte sich, dass die gemessene Wirksamkeit im inhibitorischen Teil der Dosis-Wirkungsbeziehung von der eingesetzten Forskolin-Konzentration abhing. So war mit 0,3 μM Forskolin gegenüber 1 μM eine Linksverschiebung von 1 bzw. 0,5 Dekaden am M<sub>2</sub>- bzw. M<sub>4</sub>-Rezeptor zu sehen (vgl. Tab. 3.22). Des Weiteren hatte die eingesetzte Forskolin-Konzentration Einfluss auf das Minimum der biphasischen Kurve. Beide letztgenannten Fakten sind nachvollziehbar, denn Forskolin stimuliert die cAMP-Produktion konzentrationsabhängig (siehe Abb. 6.10 im Anhang), sodass sich bei kleineren intrazellulären cAMP-Spiegeln eine scheinbar größere Wirksamkeit und relative Effektivität bzgl. der  $G_i$ -vermittelten Hemmung der Adenylatcyclase zeigte.

Jedoch ist damit die Beobachtung, dass die M<sub>4</sub>-vermittelte Hemmung im direkten Vergleich nicht das Niveau der M<sub>2</sub>-Zellen erreichte, nicht erklärt. Hierbei könnte die Expressionsrate von Subtypen der  $G_{i/o}$ -Proteinfamilie in den FlpIn<sup>TM</sup>-CHO-Zellen, die vom M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Rezeptor mit unterschiedlicher Präferenz gekoppelt werden, eine Rolle spielen. Zum Beispiel konnte an JEG-3-Zellen gezeigt werden, dass vom M<sub>2</sub>-Rezeptor  $G_{\alpha_{i-1}}$ ,  $G_{\alpha_{i-2}}$ ,  $G_{\alpha_{i-3}}$  sowie  $G_{\alpha_0}$  gleichermaßen gekoppelt werden, während der M<sub>4</sub>-Rezeptor die Subtypen  $G_{\alpha_{i-2}}$  und  $G_{\alpha_0}$  bevorzugt (Migeon & Nathanson, 1994; Migeon et al., 1995). In CHO-K1-Zellen wurde die Bevorzugung von  $G_{\alpha_{i-3}}$  durch beide Rezeptoren beschrieben, jedoch war eine bessere Kopplung an  $G_{\alpha_{i-1}}$  sowie  $G_{\alpha_{i-2}}$  am M<sub>2</sub>-Rezeptor zu sehen (Akam et al., 2001). Eine relativ kleinere Expression der vom M<sub>4</sub>-Rezeptor bevorzugten  $G_{\alpha}$ -Subtypen könnte somit die beobachteten Unterschiede verursachen. Eine unterschiedlich hohe  $G_i$ -Spontanaktivität von M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub> wäre auch denkbar, jedoch wurde durch den Einsatz von Atropin im Überschuss keine Spontanaktivität während der Versuche detektiert.

Ohne Forskolinzugabe war bei Einsatz von Acetylcholin bzw. Iperoxo nur die Rezeptor-vermittelte, konzentrationsabhängige Stimulation der cAMP-Bildung zu sehen, welche ungefähr den Effekt von 0,3  $\mu\text{M}$  Forskolin erreichte. Die Wirksamkeit der Agonisten war jedoch geringer als in Anwesenheit von Forskolin, sodass bzgl. der  $G_s$ -Stimulation von einem synergistischen Effekt zwischen Agonist und Forskolin in den durchgeführten Experimenten ausgegangen werden kann. Ob das Ausmaß dieses Synergismus in den  $M_2$ - und  $M_4$ -exprimierenden Zellen gleich war, wurde nicht näher untersucht, da es für die Berechnung des Bias-Faktors nicht relevant war.

#### 4.3.2 Einsatz von NEM zur Unterbindung $G_i$ -vermittelter Effekte

Das Alkylans N-Ethylmaleimid (NEM) wurde als deutlich kostengünstigere Alternative zu PTX zur Hemmung von  $G_i$ -Proteinen genutzt. Bevor das Toxin ab der 1990er Jahre wegen seiner großen Spezifität zunehmend experimentelle Verwendung fand, war die Nutzung von alkylierenden Mitteln die einzige Möglichkeit zur Ausschaltung von Effektorproteinen. Unter milden Bedingungen, wie sie in der vorliegenden Arbeit vorherrschten, läuft die Alkylierung mit NEM an einem Cystein im C-Terminus von  $G_{i/o}$ -Proteinen ausreichend spezifisch ab (Shinoda et al., 1990). Es wurde zwar beschrieben, dass NEM auch die Aktivität des Enzyms Adenylatcyclase mindern kann, jedoch erst bei sehr viel höheren Konzentrationen als sie in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kamen (Duhe et al., 1994). Auch die Alkylierung von  $G_s$ -Proteinen wurde beschrieben, die aber nicht den C-Terminus, sondern eher Cysteine in der Switch II-Region des G-Proteins betreffen (Giusti et al., 2003). Somit scheint die Fähigkeit von  $G_s$  zur Kopplung an einen GPCR, welche wesentlich auf der Interaktion des C-Terminus mit dem Rezeptor beruht (siehe Abschnitt 4.1.4), dadurch nicht beeinträchtigt zu werden. Gegenüber PTX brachte die Anwendung von NEM hier den Vorteil mit sich, dass die Messung der Agonist-induzierten Effekte in NEM-behandelten und unbehandelten Zellen ausgehend von der gleichen Zellsuspension durchgeführt werden konnte. Dabei zeigte sich, dass die Inkubationszeit von 10 min in beiden Zell-Linien zur vollständigen Eliminierung der  $G_i$ -vermittelten Hemmung der cAMP-Bildung führte. Ob dies auf eine komplette oder nur unvollständige Alkylierung des  $G_{i/o}$ -Proteinpools innerhalb der Zellen zurückzuführen ist, bleibt offen. Wahrscheinlich ist eine partielle Alkylierung der inhibitorischen G-Proteine ausreichend, um keine Hemmung der Forskolin-induzierten cAMP-Bildung mehr im vorliegenden Testsystem beobachten zu können.

Durch die NEM-Behandlung verschob sich die Wirksamkeit zur Stimulation der cAMP-Generierung ( $pEC_{50}$ ) in beiden Zell-Linien im Vergleich zur Kontrolle nach links zu Werten in einen Bereich von ca. 6,5. In der  $M_4$ -Zell-Linie entsprach das der Wirksamkeit nach PTX-Behandlung, am  $M_2$ -Rezeptor wurde diese hingegen um 0,5 Dekaden übertroffen (vgl. Daten aus Abschnitt 3.4.1.3 mit Tab. 3.4.) Wie oben beschrieben, kann dies auf die gleichzeitige Anwesenheit von Forskolin und Agonist im Testsystem zurückzuführen sein. Die Wirksamkeit eines Agonisten nach NEM-Behandlung der Zellen ist somit nicht direkt mit der Wirksamkeit nach Einsatz von PTX vergleichbar. Die Tatsache aber, dass unter NEM im Gegensatz zu den cAMP-Experimenten nach PTX-Behandlung kein Wirksamkeitsunterschied von Acetylcholin zwischen  $M_2$ - und  $M_4$ -Rezeptor zu sehen war, spricht dafür, dass die  $M_2$ -vermittelte  $G_s$ -Aktivierung stärker vom Synergismus mit Forskolin am Effektorenzym profitiert als in den  $M_4$ -Zellen.

#### 4.3.3 Die Ausprägung von Bias-Faktoren ist abhängig von den gewählten Messmethoden

Die  $G_i$ - und  $G_s$ -vermittelten Effekte auf die cAMP-Bildung von Iperoxo und drei Vertretern der Derivate mit kurzen (IP-C<sub>2</sub>), mittleren (IP-C<sub>4</sub>) und langem *n*-Alkyl-Substituenten (IP-C<sub>7</sub>) wurden in Anwesenheit von 1  $\mu$ M Forskolin untersucht. Wie zuvor mit Acetylcholin, zeigte sich am M<sub>4</sub>-Rezeptor mit Iperoxo eine maximale cAMP-Bildung über das Niveau von 1  $\mu$ M Forskolin hinaus. Auf die Bias-Faktoren hat dieser Unterschied zwischen M<sub>2</sub> und M<sub>4</sub> jedoch keine Auswirkung, da durch den Bezug auf die Referenzsubstanz dieser Umstand mathematisch nivelliert wird.

Es zeigte sich, dass am M<sub>2</sub>-Rezeptor schon der kurze Substituent die Fähigkeit zur Aktivierung stimulatorischer G-Proteine negativ beeinflusste, während dies am M<sub>4</sub>-Rezeptor erst durch einen langen Alkyl-Rest zu beobachten war. Dies bestätigte auch die Messung der cAMP-Generierung durch maximal-wirksame Testsubstanzkonzentrationen in Abwesenheit von Forskolin (vgl. Abb. 3.29).

Die folgende Tabelle fasst die Wirksamkeitsverluste bzgl. der  $G_i$ -vermittelten Inhibition und der  $G_s$ -vermittelten Stimulation der cAMP-Bildung der Testsubstanzen gegenüber Iperoxo zusammen.

pEC <sub>50</sub> (IPX – IP-C <sub>x</sub> )	M <sub>2</sub>		M <sub>4</sub>	
	$\Delta G_i$	$\Delta G_s$	$\Delta G_i$	$\Delta G_s$
-C <sub>2</sub>	1,4	< 1,7 <sup>P</sup>	1,8	> 1,4
-C <sub>4</sub>	2,8	< 3,7 <sup>P</sup>	3,5	> 2,5
-C <sub>7</sub>	3,4	n.d.	3,8	> 3,0 <sup>P</sup>

Tab. 4.3 Wirksamkeitsverlust der *n*-Alkyl-Derivate gegenüber der Referenzsubstanz Iperoxo im cAMP-Experiment. Die Werte wurden anhand der Daten aus Tab. 3.28 und

Tab. 3.29 berechnet. Die Angabe <sup>P</sup> kennzeichnet einen Partialagonismus der Substanz im Vergleich zu Iperoxo. IP-C<sub>7</sub> zeigte keine detektierbare  $G_s$ -Aktivierung (n.d.).

Hieran ist zu sehen, dass die Abnahme der Wirksamkeit gegenüber Iperoxo an M<sub>2</sub> im  $G_i$ -Signalweg kleiner war als im  $G_s$ -Weg. Am M<sub>4</sub>-Rezeptor verhielten sich die Substanzen in umgekehrter Weise. Aufgründessen ergab sich ein größer werdender  $G_i$ -Bias ( $\Delta\Delta RA_i$ ) mit wachsender Länge des *n*-Alkyl-Substituenten am M<sub>2</sub>-Rezeptor. Am M<sub>4</sub>-Rezeptor zeigten die Substanzen IP-C<sub>2</sub> und IP-C<sub>7</sub> hingegen ein neutrales Verhalten, während IP-C<sub>4</sub> zu einem  $G_s$ -Bias tendierte (vgl. Abb. 3.32). Allerdings bedingte das relativ kleine Messfenster des cAMP-Testsystems bei der Umnormierung der biphasischen Konzentrations-Effekt-Kurven in zwei getrennte monophasische Kurven große Fehleraufweitung der Messwerte, sodass die Kennparameter pEC<sub>50</sub> und E<sub>max</sub> mit großen Standardfehlern behaftet waren. Diese setzten sich bei der Berechnung des Bias-Faktors fort, sodass für beide Rezeptorsubtypen trotz großer Mittelwertsdifferenzen für keine der untersuchten Testsubstanzen ein statistisch signifikanter Unterschied zur Referenzsubstanz feststellbar war.

Dessen ungeachtet zeigte die Substanz IP-C<sub>4</sub> im Gegensatz zu den bei isolierter Betrachtung beider Signalwege eher neutralen Bias-Faktoren hier ein gegensätzliches Verhalten am M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Rezeptor, wie die die folgende Tabelle zeigt:

$\Delta\Delta RA_i$ (IP-C <sub>4</sub> )	M <sub>2</sub>	M <sub>4</sub>
Signalwege isoliert	-0,10	-0,03
$G_i$ - und $G_s$ -Effekte aus cAMP	1,76	-0,83

Tab. 4.4  $\Delta\Delta RA_i$  von IP-C<sub>4</sub>. Es erfolgte eine Berechnung anhand der Daten bei isolierter Betrachtung des  $G_i$ - und  $G_s$ -Signalwegs (<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ -Bindung vs. cAMP-Bildung unter PTX) und bei verbundener Messung im cAMP-Testsystem bei Anwesenheit von Forskolin. Die Werte sind aus Tab. 3.17 und Tab. 3.30 entnommen.

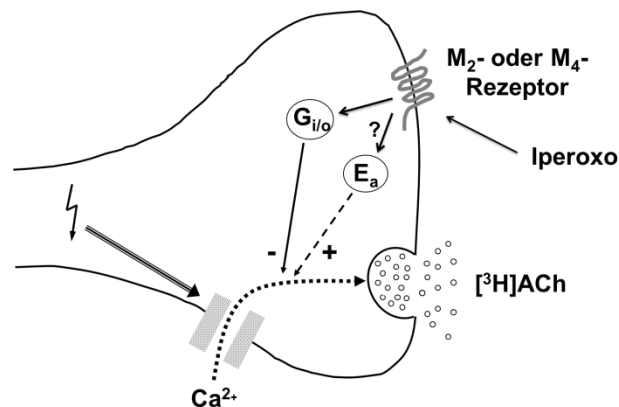
Dies zeigt, dass Bias-Faktoren neben der Festlegung des Referenzagonisten auch von den gewählten Methoden zur Messung der Signalwegsaktivierung abhängig sein können. Beispielsweise



konnten für den Dopamin-Rezeptor vom D<sub>2</sub>-Subtyp die unterschiedlichen Ergebnisse von Bias-Bestimmungen verschiedener Agonisten im Vergleich zum endogenen Liganden auf die Abhängigkeit vom kinetischen Kontext in funktionellen Experimenten zurückgeführt werden (Klein Herenbrink et al., 2016). Das Problem liegt auch darin, dass die Modelle zur Bias-Berechnung grundsätzlich von einem Gleichgewicht zwischen den beteiligten Komponenten ausgehen, welches jedoch in funktionellen Experimenten selten und unter physiologischen Bedingungen in Zellen eher überhaupt nicht gegeben ist. Funktionelle Experimente messen die Zellantwort zumeist in Form einer Endpunktbestimmung, so wie auch die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden, sodass der daraus berechnete Bias-Faktor durchaus als eine von mehreren möglichen Momentaufnahmen betrachtet werden kann.

## 4.4 Superfusionsexperimente

Anhand von Superfusionsexperimenten an Hippocampus- und Striatumgewebe war es möglich, die Muttersubstanz Iperoxo in einem *ex-vivo*  $M_2$ - sowie  $M_4$ -Modell (Zhang et al., 2012) zu untersuchen. Dabei wurde die Rezeptorsubtyp-vermittelte Hemmung der elektrisch stimulierten Acetylcholinausschüttung gemessen. Es sollte der Frage nachgegangen werden, ob durch supramaximale Iperoxo-Konzentrationen, welche die endogen vorkommenden hohen Acetylcholin-Konzentrationen im synaptischen Spalt imitieren sollten, alternative Signalwege über Effektorproteine aktiviert werden können, die der primär ausgelösten Inhibition möglicherweise entgegenwirken können.



**Abb. 4.9 Rationale der Superfusionsexperimente an Hippocampus ( $M_2$ ) und Striatum ( $M_4$ ) der Maus.** Durch Vorinkubation des Gewebes mit  $[^3H]$ Cholin wurde intrazellulär  $[^3H]$ Acetylcholin ( $[^3H]$ ACh) gebildet, welches bei der elektrischen Stimulation freigesetzt und in der Superfusionslösung gemessen wurde. Durch Iperoxo wurden die  $M_2$ - bzw.  $M_4$ -Autorezeptoren der Nervenendigungen aktiviert, sodass es zur G-Protein-vermittelten Hemmung der Neurotransmitter-Freisetzung kam. Es stellte sich die Frage, ob durch supramaximale Iperoxo-Konzentrationen, welche die endogen vorkommenden hohen Acetylcholin-Konzentrationen im synaptischen Spalt imitieren sollten, alternative Signalwege über Effektorproteine ( $E_a$ ) aktiviert werden können, die der primär ausgelösten Inhibition möglicherweise entgegenwirken können. Modifiziert nach Schulte et al., 2012.

Über die genauen Konzentrationen von Acetylcholin im synaptischen Spalt liegen noch keine genauen Kenntnisse vor, da sich dies kaum direkt messen lässt und von mehreren Faktoren, z.B. der Geometrie des synaptischen Spalts, abhängt. Für die neuromuskuläre Synapse wurden Konzentrationen von 300 mM als möglich betrachtet, welche im Wesentlichen durch die Aktivität der spezifischen Acetylcholin-Esterase sehr schnell reduziert werden, sodass nur ca. ein Fünftel der freigesetzten Moleküle die postsynaptische Membran durch Diffusion erreichen (vgl. z.B. Aidoo & Ward, 2006). Für neuronale Synapsen im ZNS wird angenommen, dass Neurotransmitter generell eine Konzentrationsspitze im millimolaren Bereich bei ihrer Freisetzung erreichen (vgl. Scimemi & Beato, 2009). Die Neurotransmitter-Konzentration ist am Freisetzungsort an der präsynaptischen Membran am höchsten, sodass die in der unmittelbaren Nähe befindlichen Autorezeptoren durchaus supramaximalen Konzentrationen des endogenen Liganden ausgesetzt sein können, was zur Aktivierung alternativer Effektorproteine führen könnte. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass durch alternative Signalwege die Hemmung der Neurotransmitterfreisetzung gebremst werden kann. Experimentell sind die lokal begrenzten Konzentrationsspitzen von Acetylcholin nicht simulierbar. Bei der Superfusionsmethode wird ein Ligand mit der Superfusionslösung in die gesamte Gewebeprobe eingeschwemmt. Die höchste, einsetzbare Konzentration einer Testsubstanz ist limitiert, da oberhalb von  $10^{-3}$  M unspezifische oder gar toxische Effekte am gesamten Gewebe zu erwarten sind. Durch den Einsatz von Iperoxo zur Simulation von Acetylcholin konnte zum einen der Abbau durch die

Esterase umgangen werden und zum anderen wurde aufgrund der hohen Wirksamkeit dieses Agonisten erwartet, dass mit  $10^{-5}$  M ein supramaximaler Konzentrationsbereich erreicht sein würde.

#### 4.4.1 Iperoxo induzierte keine nachweisbare Aktivierung alternativer Signalwege

Iperoxo wies an murinen  $M_2$ - und  $M_4$ -Autorezeptoren eine Wirksamkeit im einstelligen nanomolaren Bereich auf ( $pEC_{50} \approx 8,7$ ). Dabei zeigte sich, dass die Acetylcholin-Ausschüttung im  $M_2$ -Modell (Hippocampus) zu einem signifikant größeren Ausmaß gehemmt werden konnte als über  $M_4$ -Rezeptoren (ca. 85% vs. 70 %). Im gleichen Untersuchungssystem war die maximale Hemmung der nahverwandten Substanz Oxotremorin M im Hippocampus mit  $73 \pm 9\%$  etwas geringer, unterschied sich jedoch nicht signifikant von Iperoxo (Seemann et al., 2017).

Die maximal-induzierbare Autoinhibition könnte für jedes System intrinsisch sein. Dabei spielt die Expressionsdichte der inhibitorischen Autorezeptoren eine Rolle. Diese ist für die verwendeten Gewebe im vorliegenden Fall nicht bekannt. Um diese z.B. mit Radioligand-Bindungsuntersuchungen zu erfassen, müssten die synaptischen Endigungen aus dem Gewebepräparaten herausisoliert werden (vgl. Schulte et al., 2012), um die postsynaptischen Rezeptoren, welche sich aus den Subtypen  $M_1$ ,  $M_2$  und  $M_4$  zusammensetzen können, aus der Bestimmung auszuschließen. Für die vorliegende Arbeit ist die Kenntnis der Rezeptordichte der verwendeten Gewebe jedoch nicht weiter relevant. Eine andere Ursache dafür, dass die maximale Inhibition in Hippocampus und Striatum sich unterschied, könnte ein unterschiedliches Expressionsmuster der G-Proteine sein. Zum Beispiel wurde gezeigt, dass im Striatum im Vergleich zu anderen Hirnregionen  $G\alpha_s$  eher weniger exprimiert wird und stattdessen die Isoform  $G\alpha_{olf}$  vermehrt vorkommt, welche unabdingbar für die Funktion der  $D_1$ - und  $A_{2A}$ -Rezeptoren in diesem Gewebe ist (vgl. Hervé, 2011).

Durch den Einsatz der supramaximalen Iperoxo-Konzentrationen von  $10^{-6}$  und  $10^{-5}$  M an NMRI-Gewebe konnte eine Aktivierung von alternativen Signalwegen, welche der Inhibition der Acetylcholinfreisetzung entgegenwirken, nicht abgeleitet werden, da der maximal-induzierbare Effekt im  $M_2$ - und  $M_4$ -Modell auf einem gleichbleibenden Niveau blieb (vgl. Abb. 3.35). Dies schließt jedoch nicht aus, dass die Rezeptoren über die Kopplung an  $G_{i/o}$ -Proteine hinaus an andere Effektorproteine koppeln konnten und somit weitere Signalkaskaden anstießen, die jedoch keinen Einfluss auf die messbare Iperoxo-vermittelte Autoinhibition nahmen.

Die dualsterische, von Iperoxo abgeleitete Substanz Iper-6-Phth (auch „Hybrid 1“) zeigte in Superfusionsexperimenten unter gleichen Bedingungen wie in der vorliegenden Arbeit im Hippocampus nur eine schwache Hemmung der Acetylcholin-Freisetzung von  $23 \pm 5\%$  (Seemann et al., 2017). Ein Vergleich zum  $M_4$ -Rezeptor wäre interessant, da in rekombinanten Zellsystemen (FlpIn<sup>TM</sup>-CHO) diese Substanz klare Unterschiede bzgl. der alternativen Kopplung an  $G_s$ -Proteine zeigte (Janßen, Dissertationsschrift 2011). Andererseits wäre es angesichts des intrinsisch kleineren Hemmeffektes im Striatum als  $M_4$ -Modell nicht verwunderlich, wenn nahezu kein Effekt dieser Substanz messbar wäre. Die Testung einiger *n*-Alkyl-Iperoxo-Derivate, z. B. IP-C<sub>2</sub>, -C<sub>4</sub> und -C<sub>6</sub>, an Hippocampus und Striatum mit der Superfusionsmethode könnte Aufschluss darüber liefern, welchen Beitrag der *n*-Alkyl-Linker selbst in den dualsterischen Hybridsubstanzen über seine primäre Funktion als „Abstandshalter“ zwischen orthosterisch und allosterisch bindenden Molekülteil hinaus leistet.

#### 4.4.2 Die $G_{i/o}$ -Reduktion zeigte unterschiedliche Auswirkungen im $M_2$ - und $M_4$ -Modell

Wie zuvor an FlpIn<sup>TM</sup>-CHO-Zellen wurde das Alkylans N-Ethylmaleimid (NEM) zur Hemmung von  $G_{i/o}$ -Proteinen im Hippocampus- und Striatumgewebe genutzt. Die in Abschnitt 4.3.2 aufgeführten Überlegungen bezüglich der Spezifität der Reaktion sind auch auf die Superfusionsexperimente übertragbar. Im Gegensatz zum rekombinanten Zellsystem schien jedoch kein Funktionsverlust des gesamten  $G_{i/o}$ -Pools erfolgt zu sein, da eine Iperoxo-vermittelte Hemmung der Acetylcholin-Freisetzung in beiden Geweben deutlich zu messen war (vgl. Abb. 3.36 und Abb. 3.37). Die absolute Menge an alkylierten  $G_{i/o}$ -Proteinen dürfte bedingt durch die gleichen Reaktionsbedingungen in Striatum und Hippocampus annähernd gleich gewesen sein. Ob damit auch die relative Reduktion in den jeweiligen cholinergen Neuronen der beiden Gewebe ähnlich war, kann nicht beurteilt werden. Für die vorliegende Arbeit, die der erstmaligen Auslotung möglicher Effekte einer Reduktion funktionsfähiger  $G_{i/o}$ -Proteine auf die Agonist-induzierte Hemmung der Neurotransmitterfreisetzung gewidmet ist, ist dies jedoch nicht weiter von Belang.

Die durch die NEM-Behandlung der beiden Hirnregionen erzeugten Effekte unterschieden sich deutlich. Im  $M_2$ -Modell erfolgte eine leichte Rechtsverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurve um 0,3 Dekaden und eine signifikante Verkleinerung des maximalen Hemmeffektes von 85 auf ca. 70 % (t-Test,  $p < 0,001$ ), welcher auch bei supramaximalen Iperoxo-Konzentrationen auf dem gleichen Niveau blieb. Dies deutet auf eine hohe Sensibilität des  $M_2$ -Rezeptor-vermittelten Hemmeffektes gegenüber der Verfügbarkeit der präferentiellen G-Proteine hin.

Im  $M_4$ -Modell zeigte sich hingegen ein Unterschied zwischen Kontrolle und NEM-behandeltem Gewebe erst bei den beiden supramaximalen Iperoxo-Konzentrationen in Form einer größer werdenden Abnahme der Freisetzungshemmung. Mit  $10^{-7}$  M wurde jedoch der gleiche maximale Hemmeffekt von ca. 70 % erreicht. Die Datenpunkte von Iperoxo ohne bzw. mit NEM wurden mittels der Vier-Parameter-logistischen Gleichung (Gleichung 15) bzw. der Glockenfunktion (Gleichung 16) analysiert. Es ist nachvollziehbar, dass für die Analyse mit dem biphasischen Modell für gewöhnlich mehr Datenpunkte zur Verfügung gestellt werden müssen als für die Auswertung mit der weniger komplexen Vier-Parameter-logistischen Gleichung. Der experimentelle und finanzielle Aufwand der Superfusionsmethode für die Generierung von mehr Datenpunkten wurde an dieser Stelle allerdings als nicht gerechtfertigt erachtet, da die Festlegung der beiden Parameter in nachvollziehbarer und logischer Weise erfolgte und somit zu einem eindeutigen Ergebnis geführt hat.

Die Reduktion des Hemmeffektes bei supramaximalen Iperoxo-Konzentrationen im  $M_4$ -Modell deutete auf eine Aktivierung alternativer Signalwege hin, welche mit dem präferentiellen in Konkurrenz treten können, was im  $M_2$ -Modell nicht beobachtet werden konnte. Auf welche Effektorproteine (in Abb. 4.9 mit  $E_a$  bezeichnet) dies zurückzuführen ist, müsste durch tiefergreifende Versuche herausgefunden werden.

Eine Veränderung der relativen Verhältnisse von verschiedenen G-Proteinen innerhalb einer Zelle kann unter physiologischen Bedingungen nicht nur durch Änderungen im Expressionsmuster auftreten. Zum einen kann die Rekrutierung von G-Proteinen durch einen Rezeptor und der nachfolgende Signalweg innerhalb eines subzellulären Kompartiments an der Zellmembran stattfinden, in welchem bestimmte G-Proteine und Effektorenzyme für die Rezeptor-vermittelte Signalwegsaktivierung ko-lokalisiert sind (vgl. z.B. Ostrom & Insel, 2004; Arora et al., 2013). Zum anderen ist bekannt, dass ein sogenannter *Cross-Talk* zwischen GPCR stattfinden kann, die die gleichen Subtypen von  $G\alpha$ -Proteinen koppeln, eventuell bedingt durch die Ausbildung von Heterodimeren (vgl. z.B. Franco et al., 2007). Cholinerge Interneurone im Striatum exprimieren neben den  $M_4$ -Autorezeptoren noch eine Reihe weiterer GPCR, wie z. B. verschiedene Subtypen der

Dopamin-, Histamin-, Opioid- und Serotonin-Rezeptoren (Lim et al., 2014). Des Weiteren wurde gezeigt, dass in diesen Neuronen die  $M_4$ -vermittelten Effekte wesentlich auf die Signaltransduktion über  $G\alpha_{o2}$  zurückzuführen sind, welche bei einer pathophysiologischen Veränderung der Dopamin-Konzentration im Striatum durch Einwirken von RGS4 als regulatorisches Element der G-Protein-Funktion beeinträchtigt wird, sodass als Folge eine höhere Freisetzung von Acetylcholin stattfindet (Ding et al., 2006). Es erscheint also möglich, dass durch Modulation von G-Proteinen, wie sie z.B. in pathophysiologischen Situationen auftreten kann, durchaus eine Aktivierung von alternativen Signalwegen in Betracht kommt.

## 5 Zusammenfassung

Die muskarinischen Acetylcholinrezeptoren (mAChR) gehören zur Superfamilie der 7-Transmembranrezeptoren, welche über heterotrimere G-Proteine verschiedene intrazelluläre Signalwege initialisieren können (daher auch G-Protein gekoppelte Rezeptoren, GPCR). Charakteristisch für mAChR ist die hochkonservierte orthosterische Bindungsstelle für den endogenen Liganden sowie eine darüber liegende, allosterische Bindungstasche. Diese weist Unterschiede zwischen den fünf Subtypen auf und ist daher für die Entwicklung Subtyp-selektiver Liganden von Bedeutung. Die in der vorliegenden Arbeit betrachteten M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Rezeptoren weisen eine präferentielle Kopplung an inhibitorische G-Proteine (G<sub>i/o</sub>) auf. Diese beiden Rezeptoren kommen in einigen Organen auch gemeinsam vor und unterscheiden sich bezüglich ihrer Bindungsneigung an den endogenen Liganden Acetylcholin nicht wesentlich. Es steht jedoch die Hypothese im Raum, dass M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Rezeptoren keine funktionelle Redundanz aufweisen, sondern sich bezüglich ihrer Fähigkeiten zur Aktivierung sekundärer, alternativer Signalwege unterscheiden.

In der vorliegenden Arbeit dienten Iperoxo und seine Derivate mit schrittweise verlängertem *n*-Alkyl-Substituenten (-C<sub>2</sub> bis -C<sub>10</sub>) am quartären Stickstoff als molekulare Testsonden. Damit sollten die Unterschiede zwischen M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Rezeptor bezüglich ihrer präferentiellen Aktivierung inhibitorischer G-Proteine einerseits und einer Aktivierung stimulatorischer G-Proteine (G<sub>s</sub>) als eine ihnen zur Verfügung stehende Alternative untersucht werden.

Es wurden zunächst beide durch M<sub>2</sub>- bzw. M<sub>4</sub>-Rezeptoren induzierten Signalwege getrennt erfasst. Durch Messung der [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung in Membranhomogenaten aus M<sub>2</sub>- bzw. M<sub>4</sub>-exprimierenden Flp-In<sup>TM</sup>CHO-Zellen wurde die Fähigkeit zur G<sub>i</sub>-Aktivierung gemessen. Die Untersuchung der alternativen G<sub>s</sub>-Kopplung erfolgte an lebenden Zellen dieser Zell-Linien durch Messung der intrazellulären Bildung des sekundären Botenstoffs cAMP. Dazu wurden die Zellen zuvor mit Pertussis Toxin (PTX) behandelt, um G<sub>i/o</sub>-Proteine funktionsunfähig zu machen. Des Weiteren wurde die Affinität der molekularen Testsonden an den G-Protein-gekoppelten sowie an den ungekoppelten, inaktiven Rezeptorzustand anhand von Radioligand-Bindungsuntersuchungen unter Verwendung von [<sup>3</sup>H]N-Methylscopolamin bestimmt. Diese Daten dienten anschließend zur Berechnung von Bias-Faktoren, durch welche die Neigung eines Liganden zur Bevorzugung eines Signalweges im Vergleich zu einem Referenzagonisten systemunabhängig charakterisiert werden kann. Dabei wurden zwei Methoden angewendet, welche auf unterschiedlichen Auslegungen des *Operational Models* zur Beschreibung von Agonismus an GPCR beruhen und die Bias-Faktoren  $\Delta\Delta\log(\tau/K_A)$  bzw.  $\beta_{\text{lig}}$  liefern.

Insgesamt zeigte sich eine höhere Tendenz zu einem G<sub>i</sub>-Bias am M<sub>2</sub>-Rezeptor bei Iperoxo-Derivaten mit sehr kurzen (-C<sub>2</sub> u. -C<sub>3</sub>) bzw. mit längerem (ab -C<sub>6</sub>) *n*-Alkyl-Substituenten, während am M<sub>4</sub>-Rezeptor durchgängig kaum Abweichung im Vergleich zur Referenzsubstanz zu sehen war. Die zuvor aufgestellte These eines größeren Potentials des M<sub>4</sub>-Rezeptors zur Aktivierung des G<sub>s</sub>-Signalwegs im Vergleich zu M<sub>2</sub> konnte hier anhand der Kopplungseffizienz  $\tau$  der Testsubstanzen bestätigt werden.

Die beiden Methoden der Bias-Berechnung lieferten übereinstimmende Ergebnisse beim partialagonistischen Verhalten der Testsubstanzen, jedoch zeigten sich Diskrepanzen beim vollagonistischen Verhalten der Derivate in beiden Signalwegen. Der Grund dafür konnte anhand der unterschiedlichen Berechnungsweisen dargelegt werden. Als Kompromiss-Wert wurde der Bias-Faktor  $\Delta\Delta\log RA_i$  gewählt und für den weiteren Vergleich des M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Rezeptors angewendet.

Mit Iperoxo und drei ausgewählten *n*-Alkyl-Derivaten wurden der präferentielle  $G_i$ - und der alternative  $G_s$ -Signalweg nicht getrennt, sondern parallel auf Ebene des intrazellulären cAMP-Gehalts in einem Versuchsansatz untersucht. Dies wurde ermöglicht durch die vorhandene Rezeptor-überexpression der verwendeten FlpIn<sup>TM</sup>-hM<sub>2</sub>- bzw. -hM<sub>4</sub>-CHO-Zellen. In diesem Testsystem konnte eine steigende Neigung zur Bevorzugung des  $G_i$ -Signalwegs durch den M<sub>2</sub>-Rezeptor mit wachsender Länge des *n*-Alkyl-Substituenten am Iperoxo-Grundgerüst beobachtet werden. Insgesamt konnte damit gezeigt werden, dass die Ausprägung des Bias-Faktors von der gewählten Messmethode abhängig sein kann. Dies sollte bei der Interpretation publizierter Bias-Daten neben der Abhängigkeit vom gewählten Referenzagonisten ebenfalls berücksichtigt werden.

In Bezug auf die insbesondere am M<sub>2</sub>-Rezeptor gut untersuchten dualsterischen (d.h. orthosterisch/allosterisch bindenden) Hybrid-Liganden zeigten die in vorliegender Arbeit untersuchten Testsubstanzen ferner, dass dem *n*-Alkyl-Linker der Hybrid-Substanzen nicht nur die Funktion eines verbindenden Abstandhalters zukommt, sondern dass dieser selbst Einfluss auf die Signalwegspräferenz des Rezeptors ausübt.

Des Weiteren wurde in vorliegender Arbeit die Muttersubstanz Iperoxo in einem ex-vivo Modell untersucht. Es sollte damit die These überprüft werden, ob hohe Agonist-Konzentrationen auch unter physiologischen Bedingungen zur Aktivierung alternativer Signalwege führen können, wie es für rekombinante Zellsysteme mit hoher Expressionsdichte eines Rezeptors bereits weithin bekannt ist.

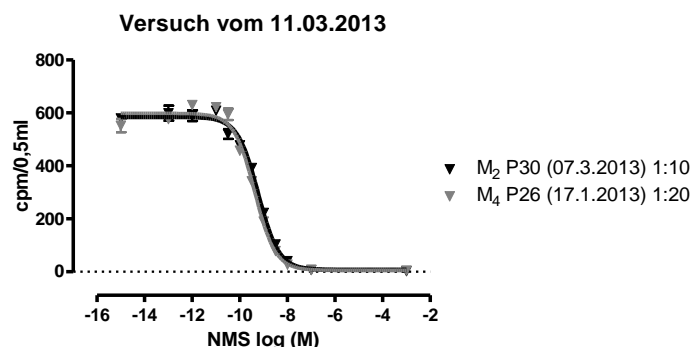
Zu diesem Zweck wurde die Hemmwirkung von Iperoxo auf die elektrisch stimulierte Acetylcholin-Freisetzung in Hirnschnitten der Maus untersucht; die Hemmung wird im Hippocampus über M<sub>2</sub>- und im Striatum über M<sub>4</sub>-Autorezeptoren vermittelt. Wurden unbehandelte Hirnschnitte untersucht, so ergab sich in beiden Rezeptor-Modellen kein Anhaltspunkt für eine der Autoinhibition entgegenwirkende alternative Signalwegsaktivierung.

Wurden die für die präferentielle Signalwegsaktivierung verfügbaren  $G_{i/o}$ -Proteine mit dem Alkylans N-Ethylmaleimid vermindert, so zeigte sich eine unterschiedliche Beeinflussung der M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Rezeptor-vermittelten Effekte. Am M<sub>2</sub>-Rezeptor war weiterhin kein Hinweis auf eine alternative Signalwegsaktivierung auszumachen, was Befunde an nativen und primären M<sub>2</sub>-Expressionssystemen bestätigt. Im M<sub>4</sub>-Modell zeigte sich durch die Modifizierung des intrinsischen  $G_{i/o}$ -Pools hingegen eine wieder abnehmende Hemmung der Neurotransmitter-Freisetzung bei steigenden, supramaximalen Iperoxo-Konzentrationen. Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass auch in einem physiologischen Kontext eine alternative Signalwegsaktivierung über den M<sub>4</sub>-Rezeptor möglich ist. Auf welchen Signalweg (z.B.  $G_s$ ) die beobachtete Wirkung zurückzuführen ist, wäre durch weiterführende Untersuchungen noch zu klären.

## 6 Anhang

### 6.1 Charakterisierung der verwendeten Zellmembranhomogenate

Durch mindestens drei homologe Konkurrenzexperimente mit dem Radioliganden [<sup>3</sup>H]NMS (vgl. Methodenabschnitt 2.1.3.3) wurden die Charakteristika der in vorliegender Arbeit verwendeten Zellmembranhomogenate bestimmt. In Abb. 6.1 sind exemplarisch die Messdaten eines Einzelversuchs wiedergegeben.



**Abb. 6.1** Homologes Konkurrenzexperiment an einem M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Zellmembranhomogenat mit [<sup>3</sup>H]NMS. Ordinate: gemessene Radioaktivität in counts per minute. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Kompetitor-Konzentration. Kurvenanpassung: Vier-Parameter-logistische Gleichung (Gleichung 15) mit konstantem Hill-Koeffizient n<sub>H</sub>=-1, da die freilaufende Kurvensteilheit nicht signifikant von -1 abwich (F-Test, p>>0,05). Datenpunkte: Mittelwert ± Standardfehler der spezifischen Bindung aus 3-4 Proben. Das M<sub>2</sub>-Homogenat wurde hier in einer Verdünnung von 1:10 eingesetzt, um ein optimales Messfenster zu erreichen, das M<sub>4</sub>-Homogenat hingegen wurde 1:20 verdünnt. Die tatsächliche Radioligand-Konzentration betrug in diesem Versuch 0,203 nM.

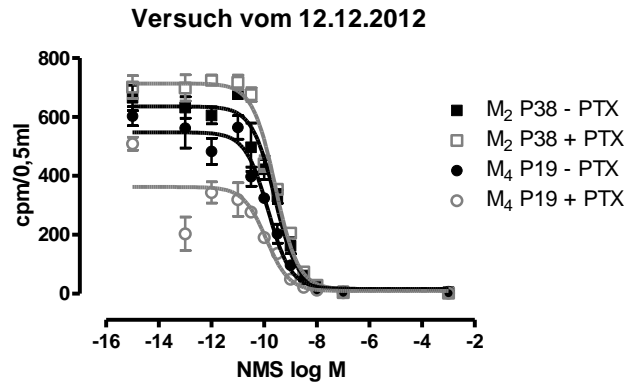
Homogenat aus FlpIn <sup>TM</sup> hM <sub>x</sub> -CHO	Herstellungsdatum	Proteingehalt (mg/ml)	pK <sub>D</sub>	B <sub>max</sub> (fmol/mg)	n
M <sub>2</sub> P21	14.2.2012	1,54	9,21 ± 0,10	2824 ± 165	3
M <sub>2</sub> P30 <sup>(2)</sup>	7.3.2013	1,30	9,22 ± 0,09	2249 ± 240	5
M <sub>2</sub> P7 <sup>(2)</sup>	24.9.2013	1,49	9,30 ± 0,07	2163 ± 338	3
M <sub>2</sub> P34 <sup>(1)</sup>	27.11.2014	1,74	9,26 ± 0,04	2931 ± 187	3
M <sub>2</sub> P10	23.4.2015	1,52	9,26 ± 0,08	2542 ± 533	4
M <sub>4</sub> P24 <sup>(2)</sup>	16.8.2012	1,25	9,66 ± 0,08	2493 ± 495	3
M <sub>4</sub> P26 <sup>(2)</sup>	17.1.2013	1,55	9,61 ± 0,04	2383 ± 285	4
M <sub>4</sub> P34	19.3.2013	1,73	9,51 ± 0,09	2591 ± 393	3
M <sub>4</sub> P11	1.7.2014	1,43	9,59 ± 0,15	2295 ± 398	4
M <sub>4</sub> P24 <sup>(1)</sup>	10.9.2014	1,21	9,41 ± 0,02	3404 ± 294	3

**Tab. 6.1** Charakteristika der verwendeten Zellmembranhomogenate aus FlpIn<sup>TM</sup>hM<sub>2</sub>- bzw. -hM<sub>4</sub>-CHO-Zellen. Neben der Subtypbezeichnung ist die zum Herstellungszeitpunkt erreichte Passage-Anzahl der Zell-Linie angegeben. Der Proteingehalt wurde wie im Methodenabschnitt 2.1.1.3 beschrieben ermittelt. pK<sub>D</sub>: negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K<sub>D</sub> des Radioliganden [<sup>3</sup>H]NMS berechnet mit Gleichung 6. B<sub>max</sub>: Rezeptordichte des Membranhomogenats berechnet mit Gleichung 7. n: Anzahl durchgeführter homologer Konkurrenzexperimente zur Bestimmung von K<sub>D</sub> und B<sub>max</sub>. <sup>(1)</sup> Homogenate verwendet für Vergleich der maximal-induzierten [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung (vgl. Abschnitt 3.1.2). <sup>(2)</sup> Homogenate verwendet zur Untersuchung der konzentrationsabhängigen [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung (vgl. Kapitel 3.1.1 (M<sub>4</sub>) und 6.4.2 (M<sub>2</sub>)).

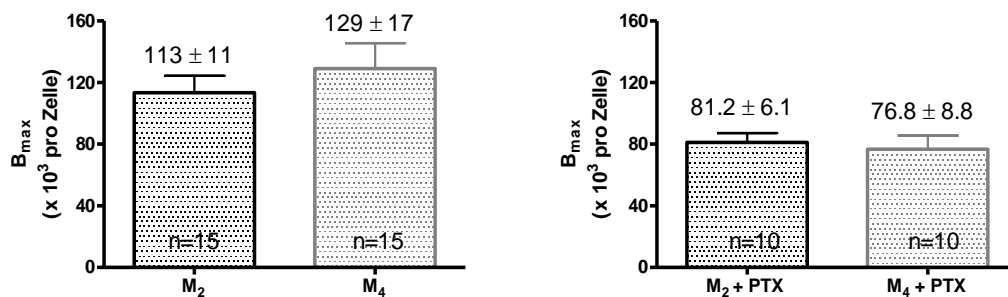


## 6.2 $B_{\max}$ -Bestimmung an lebenden Zellen

Durch homologe Konkurrenzexperimente an lebenden Zellen (vgl. Methodenabschnitt 2.1.3.4) wurde die Rezeptordichte der verwendeten Zell-Linien ermittelt. Untersucht wurden unbehandelte sowie mit PTX-vorbehandelte Zellen.



**Abb. 6.2** Beispiel für ein homologes Konkurrenzexperiment an lebenden FlpIn<sup>TM</sup>hM<sub>2</sub>- bzw.-hM<sub>4</sub>-CHO-Zellen mit und ohne PTX-Vorbehandlung. Im dem gezeigten Versuch wurden M<sub>2</sub>-Zellen der Passage 38 und M<sub>4</sub>-Zellen der Passage 19 mit jeweils 100.000 Zellen/ml eingesetzt. Ordinate: gemessene Radioaktivität in counts per minute. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konkretor-Konzentration. Kurvenanpassung: Vier-Parameter-logistische Gleichung (Gleichung 15) mit konstantem Hill-Koeffizient  $n_H = -1$ , da die freilaufende Kurvensteilheit nicht signifikant von -1 abwich (F-Test,  $p \gg 0,05$ ). Datenpunkte: Mittelwert  $\pm$  Standardfehler aus 3-4 Proben. Die tatsächliche  $[^3H]NMS$ -Konzentration betrug in diesem Versuch 0,196 nM.

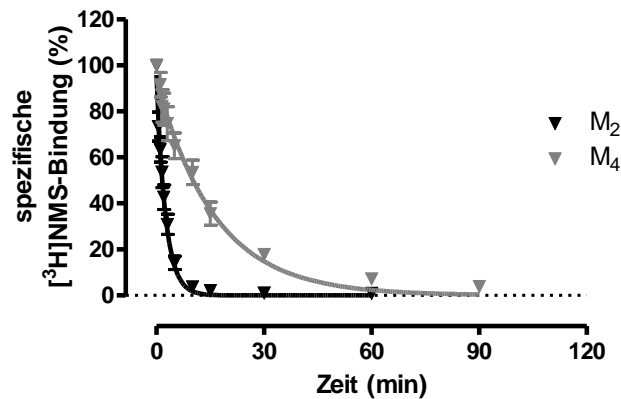


**Abb. 6.3** Rezeptordichte der verwendeten FlpIn<sup>TM</sup>hM<sub>2</sub>- bzw.-hM<sub>4</sub>-CHO-Zellen ohne (links) und nach PTX-Behandlung (rechts). Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler von 15 bzw. 10 Experimenten.  $B_{\max}$  wurde anhand der Gleichungen 7 und 9 bestimmt und ist hier in Tsd. angegeben. Die Expressionsdichte der muskarinischen Rezeptoren unterschied sich nicht zwischen den Zell-Linien (t-Test,  $p > 0,05$ ), jedoch senkte die PTX-Vorbehandlung die Expressionsdichte herab.

## 6.3 Kinetische Experimente mit [<sup>3</sup>H]NMS

### 6.3.1 Bestimmung der Halbwertszeit von [<sup>3</sup>H]NMS

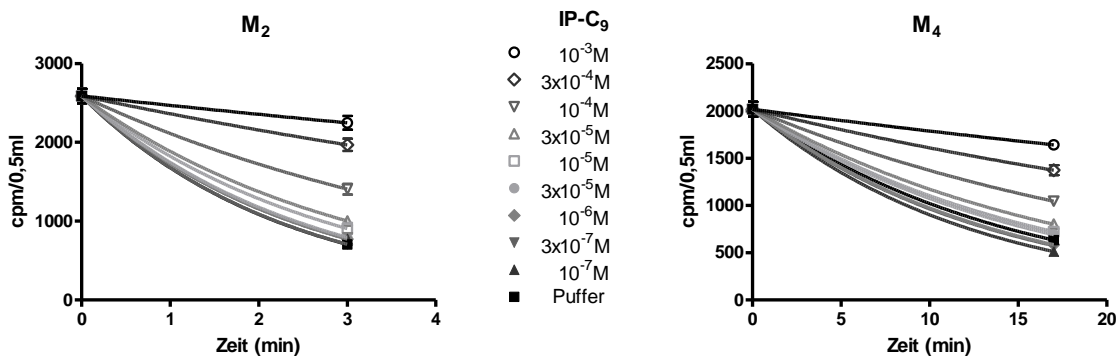
Mithilfe von Dissoziationsversuchen wurde die Halbwertszeit des Radioliganden an Zellmembranhomogenaten bestimmt (vgl. Methodenabschnitt 2.1.3.6). Dieser Kennwert war Voraussetzung zur Durchführung Zwei-Punkt-kinetischer Experimente (siehe Kapitel 3.2.2).



**Abb. 6.4** [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation vom M<sub>2</sub>- bzw. M<sub>4</sub>-Rezeptoren in Zellmembranhomogenaten. Ordinate: spezifische [<sup>3</sup>H]NMS-Bindung normiert auf die Radioligandbindung zum Zeitpunkt 0 als 100 % und dem theoretischen Wert Null (keine spezifische [<sup>3</sup>H]NMS-Bindung) als 0 %. Abszisse: Zeit nach Zugabe des Reassoziationsblockers Atropin. Kurvenanpassung: exponentieller Zerfall nach Gleichung 12 mit einem Plateau von 0 % (F-Test, p>0,05). Datenpunkte: Mittelwert ± Standardfehler aus 3 Versuchen, jeweils mit Vierfachbestimmung. Die Halbwertszeit bei 30°C betrug 1,76 ± 0,23 min am M<sub>2</sub>-Rezeptor und 11,0 ± 1,6 am M<sub>4</sub>-Subtyp.

### 6.3.2 Zwei-Punkt-kinetische Experimente

Abb. 6.5 zeigt beispielhaft die Auswertung der Rohdaten eines Zwei-Punkt-kinetischen Versuchs mit der Substanz *n*-Nonylperoxo.

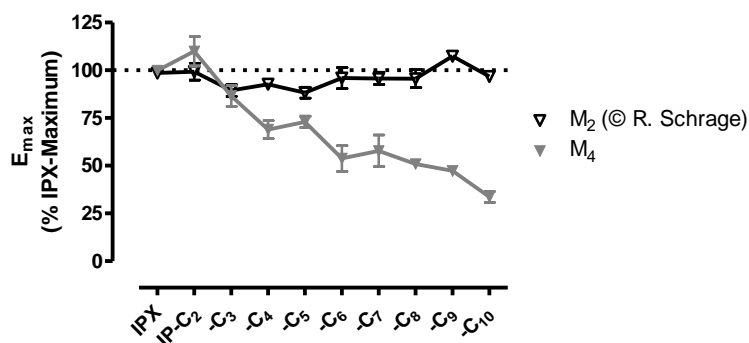


**Abb. 6.5** Verzögerung der [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation durch steigende Konzentrationen von IP-C<sub>9</sub>. Ordinate: spezifische [<sup>3</sup>H]NMS-Bindung in counts per minute pro Versuchsansatz. Abszisse: Zeit in Minuten. Kurvenanpassung: monophasischer, exponentieller Zerfall nach Gleichung 12 mit einem auf den Wert Null fixiertem Plateau. Datenpunkte: Mittelwert und Standardfehler der Vierfachbestimmung. Die Versuche wurden mit Membranhomogenaten von FlpIn<sup>TM</sup>hM<sub>2</sub>- bzw. -hM<sub>4</sub>-CHO-Zellen durchgeführt.

## 6.4 [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindungsversuche

### 6.4.1 Vergleich der maximal-induzierbaren [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung zwischen M<sub>2</sub> und M<sub>4</sub>

Nach Testung von Iperoxo und seinen Alkyl-Derivaten am Zellmembranhomogenat aus FlpIn<sup>TM</sup>hM<sub>4</sub>-CHO-Zellen (vgl. 3.1.1) wurden die Ergebnisse mit bereits in der Arbeitsgruppe vorliegenden Daten für den M<sub>2</sub>-Rezeptor verglichen. Eine parallele Untersuchung mit maximal-wirksamen Konzentrationen der Substanzen wurde zur Verifizierung dieses Ergebnisses im Anschluss durchgeführt (vgl. Ergebnisse Abschnitt 3.1.2.2).

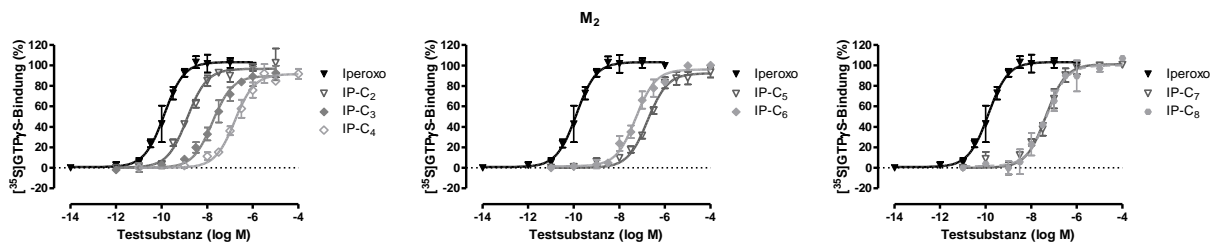


**Abb. 6.6** Maximal-induzierte [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung von Iperoxo und seinen Alkyl-Derivaten in M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Zellmembran-homogenaten. Die Daten für den M<sub>2</sub>-Rezeptor wurden freundlicherweise von Dr. R. Schrage (Arbeitskreis Prof. Mohr) für den Vergleich mit dem M<sub>4</sub>-Rezeptor zur Verfügung gestellt. Die Werte für E<sub>max</sub> entsprechen den oberen Plateaus von Konzentrations-Effekt-Kurven, welche auf das obere Plateau der Iperoxo-Kurve (M<sub>2</sub>) bzw. auf die maximal-wirksame Iperoxo-Konzentration von 1 μM (M<sub>4</sub>) normiert worden waren. Gezeigt sind die Mittelwerte ± Standardfehler aus 3-12 (M<sub>2</sub>) bzw. 3-5 (M<sub>4</sub>) Versuchen, jeweils in Vierfachbestimmung.

### 6.4.2 [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindungsversuche an M<sub>2</sub> für die Bias-Berechnung

Für die Berechnung der Bias-Faktoren (siehe Kapitel 3.3) wurden nochmals eigene [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindungsversuche an Zellmembranhomogenaten aus FlpIn<sup>TM</sup>hM<sub>2</sub>-CHO-Zellen mit Iperoxo und den Alkylderivaten bis -C<sub>8</sub> durchgeführt. Auf die Testung der Derivate *n*-Nonyl- und *n*-Decyliperoxo wurde verzichtet, da aufgrund der fehlenden Aktivierung des G<sub>s</sub>-Signalwegs (vgl. Abschnitt 3.1.3.3) eine Bias-Berechnung keinen Sinn gemacht hätte.

Wie erwartet, induzierten die Substanzen eine gleichhohe eigene [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung wie die Referenzsubstanz Iperoxo. Die Wendepunkte der Konzentrations-Effekt-Kurven waren im Vergleich zu den von Dr. R. Schrage (Arbeitskreis Prof. Mohr) erhobenen Daten im Durchschnitt um 0,2 Dekaden nach links verschoben. Die pEC<sub>50</sub>-Werte der Derivate *Ethyliperoxo* und *n*-Butyliperoxo unterschieden sich signifikant (IP-C<sub>2</sub>: 8,58±0,06 vs. eigener Wert von 8,88±0,09; t-Test mit p<0,05 und IP-C<sub>4</sub>: 6,21±0,10 vs. eigener Wert von 6,79±0,08; t-Test mit p<0,01). Diese Differenzen könnten auf unterschiedliche Eigenschaften der für die Versuche verwendeten Zellmembranhomogate-Chargen (z.B. Unterschiede in der Rezeptordichte) zurückzuführen sein. Da die für die hier dargestellten Versuche verwendeten M<sub>2</sub>-Homogenate keinen signifikanten Unterschied zum M<sub>4</sub>-Homogenat bezüglich der B<sub>max</sub>-Werte aufwiesen (vgl. Werte Tab. 6.1, ANOVA mit p>0,05).



**Abb. 6.7** Iperoxo-induzierte  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung im Vergleich zu seinen *N*-alkylierten Derivaten an Flp-In<sup>TM</sup>hM<sub>2</sub>-CHO-Membranhomogenat. *Ordinate*: Prozentuale  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung normiert auf den Maximalerfolg von Iperoxo (1  $\mu\text{M}$ ) als 100 % und die basale  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung ohne Ligand als 0%. *Abszisse*: Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. *Kurvenanpassung*: Vier-Parameter-logistische Gleichung (Gleichung 15) mit konstantem Hill-Koeffizient  $n_H=1$ , da die freilaufende Kurvensteilheit nicht signifikant von 1 abwich (F-Test,  $p>0,05$ ). *Datenpunkte*: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 3-5 unabhängigen Experimenten, jeweils in Vierfachbestimmung. Eine konstitutive Rezeptoraktivität wurde an keinem Versuchstag detektiert. Zu besseren Vergleich sind die Daten der Referenzsubstanz Iperoxo in jedem Graphen abgebildet.

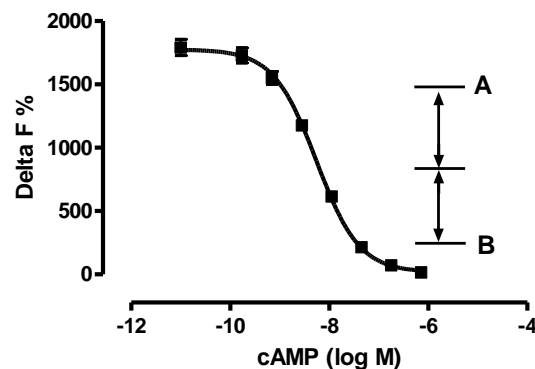
Testsubstanz an M <sub>2</sub>	$pEC_{50}$	$E_{max}$ (% IPX 1 $\mu\text{M}$ )	n
Iperoxo	9,88 $\pm$ 0,10	103 $\pm$ 3	4
IP-C <sub>2</sub>	8,88 $\pm$ 0,09	97 $\pm$ 3	3
IP-C <sub>3</sub>	7,76 $\pm$ 0,09	90 $\pm$ 4	4
IP-C <sub>4</sub>	6,79 $\pm$ 0,08	92 $\pm$ 3	5
IP-C <sub>5</sub>	6,76 $\pm$ 0,06	92 $\pm$ 2	4
IP-C <sub>6</sub>	7,27 $\pm$ 0,08	96 $\pm$ 3	3
IP-C <sub>7</sub>	7,35 $\pm$ 0,07	101 $\pm$ 3	3
IP-C <sub>8</sub>	7,32 $\pm$ 0,11	100 $\pm$ 4	3

**Tab. 6.2** Kenngrößen  $\pm$  Standardfehler der  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung aus Abb. 6.7.  $pEC_{50}$ : negativer dekadischer Logarithmus der molaren Testsubstanz-Konzentration beim halbmaximalen Effekt.  $E_{max}$ : Maximaleffekt der Testsubstanz normiert auf eine maximal-wirksame Konzentration von Iperoxo (IPX) von 1  $\mu\text{M}$  als 100 % und die basale  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung ohne Ligand als 0%. *n*: Anzahl der unabhängigen Einzelerperimente. Im jedem Einzelerperiment war der Hill-Koeffizient  $n_H$  nicht signifikant verschieden von 1 (F-Test,  $p>0,05$ ).

## 6.5 Vorversuche zur Messung cAMP-Generierung an transfizierten FlpIn<sup>TM</sup>-CHO-Zellen

### 6.5.1 cAMP-Standardkurve

Es wurde eine cAMP-Standardkurve gemäß der Herstellerangaben mit den Bestandteilen des Analysekits (K1) aufgenommen. Diese zeigte einen pEC<sub>50</sub>-Wert von  $8,26 \pm 0,04$ . Der lineare Abfall der Kurve erstreckte sich auf cAMP-Konzentrationen von ca. 1 nM bis 100 nM. Für ein optimales Messfenster in anschließenden Versuchen an Zellen wurden somit Delta F- Werte zwischen 1500 und 250 (A und B) angestrebt.

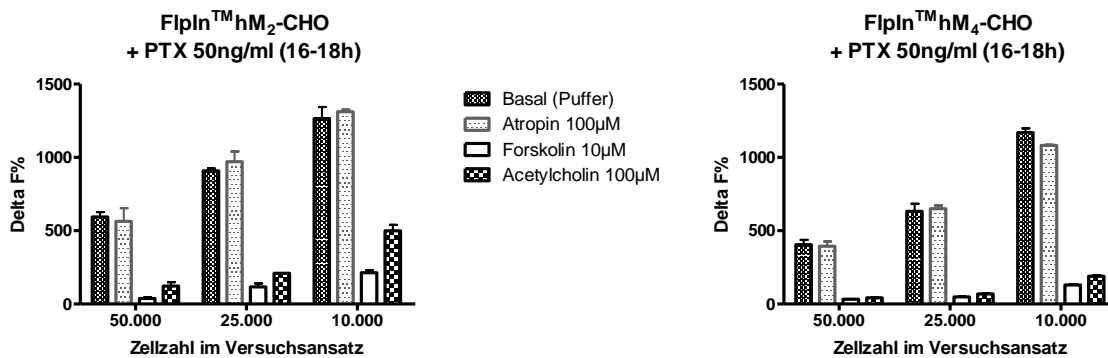


**Abb. 6.8 cAMP-Standardkurve.** Ordinate: Delta F in % berechnet aus den Messwerten gemäß Angaben in Abschnitt 2.1.2.2. Abszisse: dekadischer Logarithmus der eingesetzten cAMP-Konzentration. Kurvenanpassung: Vier-Parameter-logistische Gleichung (Gleichung 15) mit einem konstanten Hill-Koeffizienten von  $n_H = -1$ , da kein signifikanter Unterschied zu diesem Wert festgestellt wurde (F-Test,  $p > 0,05$ ). Datenpunkte: Mittelwert  $\pm$  Standardfehler aus 5 Experimenten, jeweils in Zwei- bis Dreifachbestimmung. A und B kennzeichnen den linearen Abfall der Kurve und somit den optimalen Messbereich für die Versuche an Zellen.

### 6.5.2 Zellzahloptimierung für Versuche mit PTX-Vorbehandlung

Nach Behandlung mit PTX wurden Suspensionen mit verschiedenen Zellzahlen hergestellt (siehe Abschnitt 2.1.2.2). Es wurde die basale sowie die durch Forskolin und Acetylcholin stimulierte cAMP-Bildung detektiert. Der Einsatz von Atropin in supramaximaler Konzentration diente der Aufdeckung einer möglichen spontanen Rezeptoraktivität.

Die nachfolgende Abbildung zeigt die Ergebnisse eines von drei durchgeführten Experimenten zur Zellzahloptimierung. Für beide Zell-Linien zeigte der Einsatz von 10.000 Zellen pro Messpunkt das größte Messfenster zwischen basaler und Forskolin- bzw. Agonist-stimulierter cAMP-Bildung mit Delta F-Werten innerhalb des linearen Bereichs der cAMP-Standardkurve (vgl. Abb. 6.8).

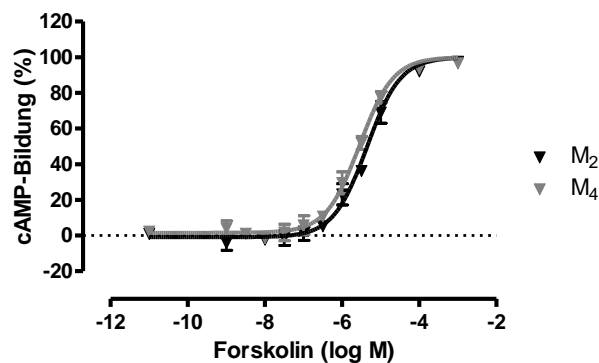


**Abb. 6.9** Zellzahloptimierung für cAMP-Experimente mit FlpIn<sup>TM</sup>hM<sub>2</sub>- bzw. -hM<sub>4</sub>-CHO-Zellen nach PTX-Behandlung. Ordinate: Delta F in % berechnet aus den Messwerten gemäß Angaben in Abschnitt 2.1.2.2. Abszisse: eingesetzte Zellzahl pro Messpunkt. Daten: Mittelwert ± Standardfehler nach Dreifachbestimmung.

### 6.5.3 Forskolin-induzierte cAMP-Bildung

Forskolin stimuliert die intrazelluläre cAMP-Bildung durch direkte Wirkung auf das Enzym Adenylatcyclase. Dieser Effekt ist konzentrationsabhängig.

Wie in nachfolgender Abbildung zu sehen, unterschieden sich die pEC<sub>50</sub>-Werte erwartungsgemäß nicht zwischen den beiden Zell-Linien (5,40 ± 0,07 vs. 5,59 ± 0,05, t-Test mit p>0,05). Ein maximaler Effekt wurde durch Konzentrationen über 100 µM erreicht.



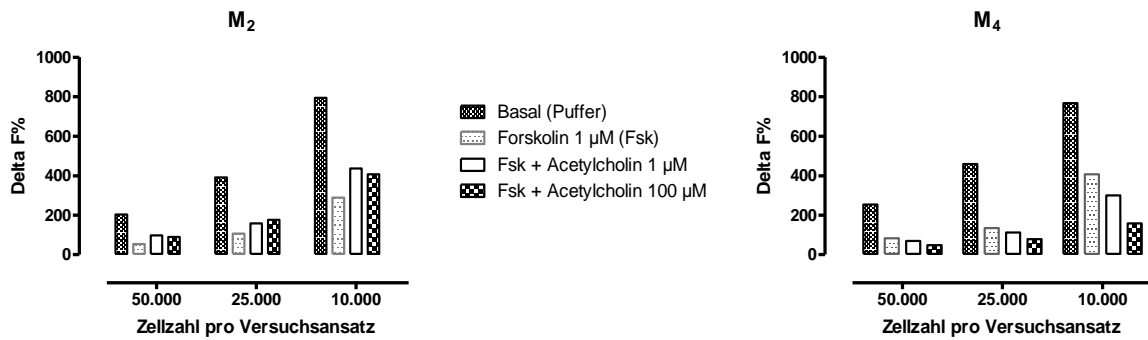
**Abb. 6.10** Forskolin-induzierte cAMP-Bildung in FlpIn<sup>TM</sup>hM<sub>2</sub>- bzw. -hM<sub>4</sub>-CHO-Zellen (ohne PTX-Behandlung). Ordinate: prozentuale cAMP-Bildung normiert auf den Effekt von 1mM Forskolin als 100% und den Basalwert als 0%. Abszisse: dekadischer Logarithmus der molaren Forskolin-Konzentration. Kurvenanpassung: Vier-Parameter-logistische Gleichung (Gleichung 15) mit konstantem Hill-Koeffizient n<sub>H</sub>=1, da die freilaufende Kurvensteilheit nicht signifikant von 1 abwich (F-Test, p>0,05). Datenpunkte: Mittelwert ± Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten, jeweils in Zweifachbestimmung.

### 6.5.4 Zellzahloptimierung für Versuche ohne PTX-Vorbehandlung

Analog zu Abschnitt 6.5.2 wurde eine Bestimmung der optimalen Zellzahl für Versuche ohne PTX-Vorbehandlung durchgeführt. Um die rezeptorvermittelte Aktivierung von G<sub>i/o</sub>-Proteinen durch den endogenen Liganden sichtbar zu machen, wurden die Zellen gleichzeitig mit 1 µM Forskolin stimuliert. Gleichzeitig wurde eine cAMP-Standardkurve (Delta F % → cAMP (log M)) aufgenommen.

Diese zeigte einen  $pEC_{50}$ -Wert von  $8,51 \pm 0,06$  und einen linearen Abfall im Bereich von ca. 1300 bis 150 Delta F % (Daten nicht gezeigt).

In Abb. 6.11 sind die Ergebnisse eines Experiments zur Zellzahloptimierung dargestellt. Die kleinste gewählte Zellzahl von 10.000 pro Messpunkt zeigte dabei ein ausreichend großes Messfenster. In weiteren Experimenten zeigte sich, dass Acetylcholin in geringeren Konzentrationen als  $1 \mu\text{M}$  zu einer Hemmung der Forskolin-induzierten cAMP-Bildung führte (vgl. Abschnitt 3.4.1.1).



**Abb. 6.11 Zellzahloptimierung für cAMP-Experimente mit FlpIn<sup>TM</sup>  $hM_2$ - bzw.  $-hM_4$ -CHO-Zellen ohne PTX-Behandlung.** Ordinate: Delta F in % berechnet aus den Messwerten gemäß Angaben in Abschnitt 2.1.2.2. Abszisse: eingesetzte Zellzahl pro Messpunkt. Daten: Mittelwert  $\pm$  Standardfehler nach Zweifachbestimmung.

## 7 Literaturverzeichnis

- Aidoo AY & Ward K (2006). Spatio-temporal concentration of acetylcholine in vertebrate synaptic cleft. *Mathematical and Computer Modelling* 44(9-10): 952-962
- 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.
- 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): 442-445
- Arora K, Sinha C, Zhang W, Ren A, Moon CS, Yarlagadda S, Naren AP (2013). Compartmentalization of cyclic nucleotide signaling: a question of when, where, and why? *Pflugers Arch* 465(10): 1397-1407
- Asano T & Ui M, Ogasawara N (1985). Prevention of the agonist binding to gamma-aminobutyric acid B receptors by guanine nucleotides and islet-activating protein, pertussis toxin, in bovine cerebral cortex. Possible coupling of the toxin-sensitive GTP-binding proteins to receptors. *J Biol Chem* 260(23): 12653-12658
- Black JW & Leff P (1983) Operational models of pharmacological agonism. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 220(1219): 141-162
- Black JW, Leff P, Shankley NP, Wood J (1985). An operational model of pharmacological agonism: the effect of E/[A] curve shape on agonist dissociation constant estimation. *Br J Pharmacol* 84(2): 561-571
- Black JW, Leff P, Shankley NP, Wood J (2010). An operational model of pharmacological agonism: the effect of E/[A] curve shape on agonist dissociation constant estimation - 1985. *Br J Pharmacol* 160 Suppl 1: S54-64
- Bock A, Merten N, Schrage R, Dallanoce C, Bätz J, Klöckner J, Schmitz J, Matera C, Simon K, Kebig A, Peters L, Müller A, Schrobang-Ley J, Tränkle C, Hoffmann C, 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
- Burt AR, Sautel M, Wilson MA, Rees S, Wise A, Milligan G (1998). Agonist occupation of an  $\alpha_{2A}$ -adrenoreceptor- $G_{i1}$  fusion protein results in activation of both receptor-linked and endogenous  $G_i$  proteins. Comparisons of their contributions to GTPase activity and signal transduction and analysis of receptor-G protein activation stoichiometry. *J Biol Chem* 273(17): 10367-10375
- Caulfield MP & Birdsall NJ (1998) International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* 50(2): 279-290
- Chen XP, Yang W, Fan Y, Luo JS, Hong K, Wang Z, Yan JF, Chen X, Lu JX, Benovic JL, Zhou NM (2010). Structural determinants in the second intracellular loop of the human cannabinoid CB1 receptor mediate selective coupling to  $G_s$  and  $G_i$ . *Br J Pharmacol* 161(8): 1817-1834



- Cheng Y & Prusoff WH (1973). Relationship between the inhibition constant ( $K_1$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition ( $IC_{50}$ ) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 22(23): 3099-3108
- Chung KY (2013). Structural Aspects of GPCR-G Protein Coupling. *Toxicol Res* 29(3): 149-155
- Dallanoce C, Conti P, De Amici M, De Micheli C, Barocelli E, Chiavarini M, Ballabeni V, Bertoni S, Impicciatore M (1999). Synthesis and functional characterization of novel derivatives related to oxotremorine and oxotremorine-M. *Bioorg Med Chem* 7(8): 1539-1547
- 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: 227-229
- 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
- Ding J, Guzman JN, Tkatch T, Chen S, Goldberg JA, Ebert PJ, Levitt P, Wilson CJ, Hamm HE, Surmeier DJ (2006). RGS4-dependent attenuation of M4 autoreceptor function in striatal cholinergic interneurons following dopamine depletion. *Nat Neurosci* 9(6): 832-842
- Dittman AH, Weber JP, Hinds TR, Choi EJ, Migeon JC, Nathanson NM, Storm DR (1994). A novel mechanism for coupling of m4 muscarinic acetylcholine receptors to calmodulin-sensitive adenylyl cyclases: crossover from G protein-coupled inhibition to stimulation. *Biochemistry* 33(4): 943-951
- Duhe RJ, Nielsen MD, Dittman AH, Villacres EC, Choi EJ, Storm DR (1994). Oxidation of critical cysteine residues of type I adenylyl cyclase by o-iodosobenzoate or nitric oxide reversibly inhibits stimulation by calcium and calmodulin. *J Biol Chem* 269(10): 7290-7296
- Ehlert FJ & Rathbun BE (1990) Signaling through the muscarinic receptor-adenylate cyclase system of the heart is buffered against GTP over a range of concentrations. *Mol Pharmacol* 38(1): 148-158
- 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 M<sub>3</sub> muscarinic receptors in guinea pig ileum and transfected cells. *J Pharmacol Exp Ther* 289(2): 981-992
- Ehlert FJ (2008). On the analysis of ligand-directed signaling at G protein-coupled receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 377(4-6): 549-577
- Ehlert FJ (2015) Functional studies cast light on receptor states. *Trends Pharmacol Sci* 36(9): 596-604
- Franco R, Casadó V, Cortés A, Ferrada C, Mallol J, Woods A, Lluís C, Canela EI, Ferré S (2007). Basic concepts in G-protein-coupled receptor homo- and heterodimerization. *ScientificWorldJournal* 7: 48-57
- Giusti L, Taddei S, Ceccarelli F, Chericoni S, Bigini G, Lucacchini A, Mazzoni MR (2003). Alkylation of sulfhydryl groups on  $G\alpha_{s/olf}$  subunits by N-ethylmaleimide: regulation by guanine nucleotides. *Biochim Biophys Acta* 1613(1-2): 7-14

- Greenberg B (2016) Novel Therapies for Heart Failure - Where Do They Stand? *Circ J* 80(9): 1882-1891
- 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
- 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 M<sub>2</sub> muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist. *Nature* 482(7386): 547-551
- Hamm HE, Deretic D, Arendt A, Hargrave PA, Koenig B, Hofmann KP (1988). Site of G protein binding to rhodopsin mapped with synthetic peptides from the alpha subunit. *Science* 241(4867): 832-835
- Hervé D (2011). Identification of a specific assembly of the g protein golf as a critical and regulated module of dopamine and adenosine-activated cAMP pathways in the striatum. *Front Neuroanat* 5: 48
- Heuss C, Scanziani M, Gähwiler BH, Gerber U (1999) G-protein-independent signaling mediated by metabotropic glutamate receptors. *Nat Neurosci* 2(12): 1070-1077
- Hoshino S, Kikkawa S, Takahashi K, Itoh H, Kaziro Y, Kawasaki H, Suzuki K, Katada T, Ui M (1990). Identification of sites for alkylation by N-ethylmaleimide and pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation on GTP-binding proteins. *FEBS Lett* 276(1-2): 227-231
- Hsia JA, Hewlett EL, Moss J (1985). Heterologous desensitization of adenylate cyclase with prostaglandin E1 alters sensitivity to inhibitory as well as stimulatory agonists. *J Biol Chem* 260(8): 4922-4926
- Hulme EC, Birdsall NJ, Buckley NJ (1990). Muscarinic receptor subtypes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30: 633-673
- Jakubík J, Bacáková L, Lisá V, el-Fakahany EE, Tucek S (1996). Activation of muscarinic acetylcholine receptors via their allosteric binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(16): 8705-8709.
- Janßen N (2011). Zelluläre dynamische Massenumverteilung zur Erfassung der Signalwegsaktivierung 7-transmembranärer Rezeptoren unter besonderer Berücksichtigung des M<sub>4</sub>-Acetylcholinrezeptors. *Dissertationsschrift* Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn
- Kaufel D (2010). Interaktion orthosterisch/allosterischer Antagonist-Hybride mit muscarinischen M<sub>2</sub>-Acetylcholinrezeptoren. *Dissertationsschrift* Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn
- Kenakin T (2002) Efficacy at G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Drug Discov* 1(2): 103-110
- Kenakin T & Miller LJ (2010) Seven transmembrane receptors as shapeshifting proteins: the impact of allosteric modulation and functional selectivity on new drug discovery. *Pharmacol Rev* 62(2): 265-304

- Kenakin T, Watson C, Muniz-Medina V, Christopoulos A, Novick S (2012). A simple method for quantifying functional selectivity and agonist bias. *ACS Chem Neurosci* 3(3): 193-203
- Kenakin T (2013). New concepts in pharmacological efficacy at 7TM receptors: IUPHAR review 2. *Br J Pharmacol* 168(3): 554-575
- Kenakin T & Christopoulos A (2013) Signalling bias in new drug discovery: detection, quantification and therapeutic impact. *Nat Rev Drug Discov* 12(3): 205-216
- Kenakin T (2014). What is pharmacological 'affinity'? Relevance to biased agonism and antagonism. *Trends Pharmacol Sci* 35(9): 434-441
- Klause S (2013). N-alkylation of the superagonist iperoxo leads to distinct binding and G protein activation at muscarinic M<sub>2</sub> receptors *Bachelorarbeit* Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn
- Klein Herenbrink C, Sykes DA, Donthamsetti P, Canals M, Coudrat T, Shonberg J, Scammells PJ, Capuano B, Sexton PM, Charlton SJ, Javitch JA, Christopoulos A, Lane JR (2016). The role of kinetic context in apparent biased agonism at GPCRs. *Nat Commun* 7: 10842
- Kling RC, Lanig H, Clark T, Gmeiner P (2013). Active-state models of ternary GPCR complexes: determinants of selective receptor-G-protein coupling. *PLoS One* 8(6): e67244
- Kozasa T, Hajicek N, Chow CR, Suzuki N (2011). Signalling mechanisms of RhoGTPase regulation by the heterotrimeric G proteins G<sub>12</sub> and G<sub>13</sub>. *J Biochem* 150(4):357-69
- Kostenis E & Mohr K (1996). Two-point kinetic experiments to quantify allosteric effects on radioligand dissociation. *Trends Pharmacol Sci* 17(8): 280-283
- Kruse AC, Ring AM, Manglik A, Hu J, Hu K, Eitel K, Hübner H, Pardon E, Valant C, Sexton PM, Christopoulos A, Felder CC, Gmeiner P, Steyaert J, Weis WI, Garcia KC, Wess J, Kobilka BK (2013a). Activation and allosteric modulation of a muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* 504(7478): 101-106
- Kruse AC, Weiss DR, Rossi M, Hu J, Hu K, Eitel K, Gmeiner P, Wess J, Kobilka BK, Shoichet BK (2013b). Muscarinic receptors as model targets and antitargets for structure-based ligand discovery. *Mol Pharmacol* 84(4): 528-540
- Lim SAO, Kang UJ, McGehee DS (2014). Striatal cholinergic interneuron regulation and circuit effects. *Front Synaptic Neurosci* 6: 22
- Logothetis DE, Kurachi Y, Galper J, Neer EJ, Clapham DE (1987) The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K<sup>+</sup> channel in heart. *Nature* 325(6102): 321-326
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1): 265-275
- Luttrell LM & Lefkowitz RJ (2002) The role of  $\beta$ -arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci* 115(Pt 3):455-465

- Manglik A, Lin H, Aryal DK, McCorvy JD, Dengler D, Corder G, Levit A, Kling RC, Bernat V, Hübner H, Huang XP, Sassano MF, Giguère PM, Löber S, Da Duan, Scherrer G, Kobilka BK, Gmeiner P, Roth BL, Shoichet BK (2016) Structure-based discovery of opioid analgesics with reduced side effects. *Nature* 537(7619): 185-190
- Mangmool S, Kurose H (2011).  $G_{i/o}$  protein-dependent and -independent actions of Pertussis Toxin (PTX). *Toxins (Basel)* 3(7): 884-899
- 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
- Michal P, Lysíková 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
- Migeon JC & Nathanson NM (1994). Differential regulation of cAMP-mediated gene transcription by  $m_1$  and  $m_4$  muscarinic acetylcholine receptors - Preferential coupling of  $m_4$  receptors to  $G_i\alpha-2$ . *J Biol Chem* 269(13): 9767-9773
- Migeon JC, Thomas SL, Nathanson NM (1995). Differential coupling of  $m_2$  and  $m_4$  muscarinic receptors to inhibition of adenylyl cyclase by  $G_i\alpha$  and  $G_o\alpha$  subunits. *J Biol Chem* 270(27): 16070-16074.
- 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 [ $^{35}$ S]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): 46-55
- 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
- Okamoto T & Nishimoto I (1992). Detection of G protein-activator regions in  $M_4$  subtype muscarinic, cholinergic, and  $\alpha_2$ -adrenergic receptors based upon characteristics in primary structure. *J Biol Chem* 267(12): 8342-8346
- Oldham WM, Hamm HE (2008). Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(1): 60-71.
- Olianas MC & Onali P (1991a). Muscarinic stimulation of adenylate cyclase activity of rat olfactory bulb. I. Analysis of agonist sensitivity. *J Pharmacol Exp Ther* 259(2): 673-679
- Olianas MC & Onali P (1991b). Muscarinic stimulation of adenylate cyclase activity of rat olfactory bulb. II. Characterization of the antagonist sensitivity and comparison with muscarinic inhibitions of the enzyme in striatum and heart. *J Pharmacol Exp Ther* 259(2): 680-686

- Onali P & Olanas MC (1995). Bimodal regulation of cyclic AMP by muscarinic receptors. Involvement of multiple G proteins and different forms of adenylyl cyclase. *Life Sci* 56(11-12): 973-980
- Ostrom RS & Insel PA (2004). The evolving role of lipid rafts and caveolae in G protein-coupled receptor signaling: implications for molecular pharmacology. *Br J Pharmacol* 143(2): 235-245
- Raehal KM, Walker JK, Bohn LM (2005) Morphine side effects in  $\beta$ -arrestin 2 knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther* 314(3): 1195-1201
- Rajagopal S, Ahn S, Rominger DH, Gowen-MacDonald W, Lam CM, Dewire SM, Violin JD, Lefkowitz RJ (2011). Quantifying ligand bias at seven-transmembrane receptors. *Mol Pharmacol* 80(3):367-377
- Rajagopal S (2013). Quantifying biased agonism: understanding the links between affinity and efficacy. *Nat Rev Drug Discov* 12(6): 483
- Rasmussen SG, DeVree BT, Zou Y, Kruse AC, Chung KY, Kobilka TS, Thian FS, Chae PS, Pardon E, Calinski D, Mathiesen JM, Shah ST, Lyons JA, Caffrey M, Gellman SH, Steyaert J, Skiniotis G, Weis WI, Sunahara RK, Kobilka BK (2011). Crystal structure of the  $\beta_2$  adrenergic receptor-G<sub>s</sub> protein complex. *Nature* 477(7366): 549-555
- Schrage R, Seemann WK, Klöckner J, Dallanocce C, Racké K, Kostenis E, De Amici M, Holzgrabe U, Mohr K (2013). Agonists with supraphysiological efficacy at the muscarinic M<sub>2</sub> ACh receptor. *Br J Pharmacol* 169(2): 357-370
- Schrage R, Holze J, Klöckner J, Balkow A, Klause AS, Schmitz AL, De Amici M, Kostenis E, Tränkle C, Holzgrabe U, Mohr K (2014). New insight into active muscarinic receptors with the novel radioagonist [<sup>3</sup>H]iperoxo. *Biochem Pharmacol* 90(3): 307-301
- Schulte K, Steingrüber N, Jergas B, Redmer A, Kurz CM, Buchalla R, Lutz B, Zimmer A, Schlicker E (2012). Cannabinoid CB1 receptor activation, pharmacological blockade, or genetic ablation affects the function of the muscarinic auto- and heteroreceptor. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 385(4): 385-396
- Scimemi A, Beato M (2009). Determining the neurotransmitter concentration profile at active synapses. *Mol Neurobiol* 40(3): 289-306
- Seemann WK (2012). Kontext-abhängige Signalwegsaktivierung des muskarinischen M<sub>2</sub>-Rezeptors. *Dissertationsschrift* Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn
- Seemann WK, Wenzel D, Schrage R, Etscheid J, Bödefeld T, Bartol A, Warnken M, Sasse P, Klöckner J, Holzgrabe U, DeAmici M, Schlicker E, Racké K, Kostenis E, Meyer R, Fleischmann BK, Mohr K (2017). Engineered Context-Sensitive Agonism: Tissue-Selective Drug Signaling through a G Protein-Coupled Receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 360(2): 289-299
- Shinoda M, Katada T, Ui M (1990). Selective coupling of purified alpha-subunits of pertussis toxin-substrate GTP-binding proteins to endogenous receptors in rat brain membranes treated with N-ethylmaleimide. *Cell Signal* 2(4): 403-414.

- Simon NC, Aktories K, Barbieri JT (2014). Novel bacterial ADP-ribosylating toxins: structure and function. *Nat Rev Microbiol* 12(9): 599-561
- Slessareva JE, Ma H, Depree KM, Flood LA, Bae H, Cabrera-Vera TM, Hamm HE, Graber SG (2003). Closely related G-protein-coupled receptors use multiple and distinct domains on G-protein alpha-subunits for selective coupling. *J Biol Chem* 278(50): 50530-50536
- Strange PG (2010). Use of the GTPγS ( $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  and Eu-GTPγS) binding assay for analysis of ligand potency and efficacy at G protein-coupled receptors. *Br J Pharmacol* 161(6): 1238-1249
- Tang WJ & Hurley JH (1998). Catalytic mechanism and regulation of mammalian adenylyl cyclases. *Mol Pharmacol* 54(2): 231-240
- Tecan Trading AG (2007). Development of a functional assay (HTRF<sup>®</sup>, Cisbio) to detect cAMP concentration after activation of 5-HT<sub>1A</sub> receptors. Application Note (abrufbar unter <http://ww3.tecan.com/platform/apps/virtualdirectories/here-it-is/>, letzter Zugriff 31.03.2017)
- Thal DM, Sun B, Feng D, Nawaratne V, Leach K, Felder CC, Bures MG, Evans DA, Weis WI, Bachhawat P, Kobilka TS, Sexton PM, Kobilka BK, Christopoulos A (2016). Crystal structures of the M<sub>1</sub> and M<sub>4</sub> muscarinic acetylcholine receptors. *Nature* 531(7594): 335-340
- Tubio MR, Fernandez N, Fitzsimons CP, Copsel S, Santiago S, Shayo C, Davio C, Monczor F (2010). Expression of a G protein-coupled receptor (GPCR) leads to attenuation of signaling by other GPCRs: experimental evidence for a spontaneous GPCR constitutive inactive form. *J Biol Chem* 285(20): 14990-14998
- Violin JD, Crombie AL, Soergel DG, Lark MW (2014) Biased ligands at G-protein-coupled receptors: promise and progress. *Trends Pharmacol Sci* 35(7): 308-316
- Vogel WK, Mosser VA, Bulseco DA, Schimerlik MI (1995). Porcine m2 muscarinic acetylcholine receptor-effector coupling in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 270(26): 15485-1593
- Wade SM, Lim WK, Lan KL, Chung DA, Nanamori M, Neubig RR (1999). G<sub>i</sub> activator region of α<sub>2A</sub>-adrenergic receptors: distinct basic residues mediate G<sub>i</sub> versus G<sub>s</sub> activation. *Mol Pharmacol* 56(5): 1005-1013
- Wess J (1996) Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors. *Crit Rev Neurobiol* 10(1): 69-99
- 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
- Zhang W, Basile AS, Gomeza J, Volpicelli LA, Levey AI, Wess J (2002). Characterization of central inhibitory muscarinic autoreceptors by the use of muscarinic acetylcholine receptor knock-out mice. *J Neurosci* 22(5): 1709-1717