

Modulation der Signaltransduktion des muskarinischen M1-Rezeptors mittels orthosterischer und dualsterischer Liganden

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Theresa Sophia Bödefeld

aus

Münster

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. Ivar von Kügelgen

Tag der Promotion: 01. Dezember 2017

Erscheinungsjahr: 2018

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 2014 bis August 2017 in der Abteilung Pharmakologie und Toxikologie des Pharmazeutischen Institutes der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Klaus Mohr angefertigt.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	G Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs).....	1
1.1.1	G Protein Zyklus	2
1.1.2	Muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren	3
1.1.2.1	Muskarinische Acetylcholin-Rezeptor Liganden in der Therapie	5
1.2	Rezeptor-Theorie der multiplen aktiven Rezeptorzustände	6
1.2.1	Allosterie.....	7
1.2.1.1	Dualsterische Liganden	10
1.2.2	Superagonismus	12
1.2.2.1	Rezeptor Reserve („spare receptors“)	13
1.3	Promiskuitive G Protein-Aktivierung.....	13
1.4	„Cross-talk“	14
1.4.1	Adenylylzyklasen	14
1.5	Zielsetzung.....	15
2	Material	17
2.1	Eingesetzte Verbindungen	17
2.1.1	Orthosterische Agonisten an muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren.....	17
2.1.2	Orthosterische Antagonisten an muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren und Inverse Agonisten	18
2.1.3	Dualsterische Hybridliganden	19
2.1.4	Orthosterische Agonisten an Prostaglandin-Rezeptoren	22
2.1.5	Radioliganden	23
2.2	Reagenzien	24
2.3	Lösungen.....	25
2.4	Verbrauchsmaterialien	28
2.5	Geräte und Apparaturen	29
2.6	Herstellerfirmen	30
2.7	Computerprogramme	32
3	Methoden.....	33
3.1.1	Zellkultur.....	33
3.1.2	Auftauen von Zellen.....	34
3.1.3	Einfrieren von Zellen	35

3.2	Herstellung von Membranhomogenaten.....	35
3.3	Proteinbestimmung nach Lowry	36
3.4	Radioligand-Bindungsversuche.....	37
3.4.1	Szintillationsverfahren	38
3.4.2	Bestimmung der Radioligandkonzentration.....	39
3.4.3	Homologe Konkurrenzexperimente.....	39
3.4.4.1	Heterologe Konkurrenzexperimente mit orthosterischen Liganden.....	46
3.4.4.2	Heterologe Interaktionsexperimente mit dualsterischen Hybridliganden.....	48
3.4.5	Dissoziationskinetik	49
3.4.5.1	Zwei-Punkt Kinetik	49
3.5	Funktionelle Untersuchungen	53
3.5.1	Messung des intrazellulären IP1-Gehaltes (IP1-assay)	53
3.5.2	Messung des intrazellulären cAMP-Gehaltes (cAMP-assay)	57
3.5.3	Messung des intrazellulären cAMP-Gehaltes nach Toxin-Zugabe.....	59
3.5.4	$[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsversuche	61
3.5.5	Messung der dynamischen Massenverteilung (DMR).....	63
3.5.6	Messung der ERK 1/2 Phosphorylierung.....	66
3.6	Statistik	68
3.6.1	Deskriptive Statistik	68
3.6.1.1	Der arithmetische Mittelwert und Standardfehler	68
3.6.2.1	Der F-Test.....	70
3.6.2.2	Ungepaarter, zweiseitiger Zweistichproben t-Test.....	71
3.6.2.3	Einstichproben t-Test.....	71
3.6.2.4	Analyse der Varianzen (ANOVA).....	72
4	Ergebnisse.....	73
4.1	Radioligand-Bindungsversuche	73
4.1.1	Bindungseigenschaften der Membranhomogenate stabil transfizierter CHO-M1 Zellen	73
4.1.2	Die drei orthosterischen Agonisten zeigten unterschiedliche Affinitäten für verschiedene Rezeptor-Populationen	74
4.2	Dissoziationskinetik: Zwei-Punkt Kinetik	76
4.2.1	Dualsterische Liganden verzögerten die $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation an M1-Rezeptoren	76
4.3	Radioligandbindungsversuche mit dualsterischen Hybridliganden.....	78
4.4	Funktionelle Untersuchungen	80

4.4.1 Messung des intrazellulären IP1-Gehaltes.....	80
4.4.1.2 Der endogene Agonist Acetylcholin führte zu einer Rezeptor-vermittelten Generierung von IP1	80
4.4.1.3 Der endogene Agonist Acetylcholin führte zu einer $G_{q/11}$ -vermittelten Generierung von IP1	81
4.4.1.4 Die beiden orthosterischen Agonisten Carbachol und Iperoxo zeigten vollagonistisches Verhalten an CHO-M1 Zellen	83
4.4.1.5 Dualsterische Hybridliganden konnten ebenfalls eine IP1-Synthese vermitteln .	84
4.4.1.5.1 Hybridliganden führten in hohen Konzentrationen zu unspezifischen Effekten an CHO-Zellen	84
4.4.1.5.2 Hybridliganden zeigten eine $G_{q/11}$ -vermittelte IP1-Synthese in CHO-M1 Zellen	86
4.4.1.5.3 Hybridliganden mit einem kleineren allosterischen Rest konnten $G_{q/11}$ -abhängige Signalkaskaden besser aktivieren.....	89
4.4.2 Eine simultane Aktivierung von $G_{i/o}$ und $G_{q/11}$ Proteinen führte zu einer intrazellulären IP1 Generierung.....	95
4.5 Messung des intrazellulären cAMP-Gehaltes (cAMP-Assay).....	98
4.5.1 Der endogene Agonist Acetylcholin führte zu einer G_s -vermittelten Generierung von intrazellulärem cAMP.....	98
4.5.2 Acetylcholin und Forskolin zeigten vergleichbare Effekte auf die cAMP-Generierung.....	100
4.5.3 Die beiden orthosterischen Agonisten Carbachol und Iperoxo zeigten vollagonistisches Verhalten für G_s -abhängige Signalwege.....	101
4.5.4 Dualsterische Hybride führten zu einem Konzentrationsanstieg an intrazellulärem cAMP	102
4.5.5 Neben G_s waren auch $G_{q/11}$ Proteine an der intrazellulären cAMP Generierung beteiligt	107
4.5.5.1 Eine Hemmung von $G_{q/11}$ Proteinen führte zu einer verminderten cAMP Generierung in der Zelle.....	107
4.5.5.2 Iperoxo und Carbachol zeigten ähnliche Effekte auf die Aktivierung von Adenylylzyklasen wie Acetylcholin.....	110
4.5.5.3 Dualsterische Hybride führten ebenfalls zu einer $G_{q/11}$ -abhängigen cAMP-Synthese	112
4.5.5.4 Hybride mit kleinem allosterischen Rest konnten Adenylylzyklasen $G_{q/11}$ -unabhängig stimulieren.....	116
4.5.5.5 Hybride mit dem allosterischen Substituenten Naphthalimid konnten keine rein G_s -vermittelte Stimulierung der Adenylylzyklasen bewirken	118
4.5.5.6 Der Ca^{2+} -Chelator BAPTA-AM hatte keinen Effekt auf die Adenylylzyklasen ...	119
4.5.5.7 HEK 293 Zellen zeigten keinen „Cross-talk“ zwischen G_s und $G_{q/11}$ Proteinen..	120

4.5.5.8 Der Ca^{2+} -Chelator BAPTA-AM zeigte keinen Effekt in HEK 293 Zellen	124
4.6 [^{35}S]GTP γ S-Bindungsversuche.....	124
4.6.1 Einstellung der optimalen GDP-Konzentration in [^{35}S]GTP γ S-Versuchen	125
4.6.2 Die [^{35}S]GTP γ S-Bindung an CHO-M1 Homogenaten wurde primär durch $G_{i/o}$ Proteine vermittelt.....	127
4.6.3 Die drei Orthostere induzierten eine [^{35}S]GTP γ S-Bindung an M1-Rezeptoren, jedoch mit unterschiedlicher Wirkstärke.....	129
4.6.4 Der M1-Rezeptor zeigte in [^{35}S]GTP γ S-Bindungsversuchen eine Agonist-unabhängige, spontane Aktivität	131
4.6.5 Iper-8-phth und Iper-fri-phth waren Partialagonisten für $G_{i/o}$ -vermittelte Signalwege	132
4.7 Messung der intrazellulären Dynamischen Massenumverteilung (DMR)	133
4.7.1 Messung der intrazellulären Massenumverteilung unter Kontrollbedingungen	133
4.7.1.1 Die orthosterischen Agonisten Acetylcholin, Carbachol und Iperoxo führten hauptsächlich zu einer $G_{q/11}$ Protein-abhängigen Massenumverteilung.....	133
4.7.2 Messung der intrazellulären Massenumverteilung unter Ausschaltung von $G_{q/11}$ Proteinen.....	137
4.7.2.1 Nach Ausschaltung von $G_{q/11}$ Proteinen aktivierten die Agonisten vorwiegend G_s -abhängige Signalwege.....	138
4.7.3 Messung der intrazellulären Massenumverteilung unter Ausschaltung von G_s Proteinen.....	142
4.7.3.1 Nach der Maskierung von G_s Proteinen ergab sich eine $G_{q/11}$ -abhängige Zellantwort	143
4.7.4 Messung der Dynamischen Massenumverteilung unter Ausschaltung von $G_{i/o}$ Proteinen.....	146
4.7.4.1 $G_{i/o}$ Proteine waren nicht in die Dynamische Massenumverteilung in CHO-M1 Zellen involviert	147
4.7.5 Die simultane Ausschaltung von G_s und $G_{i/o}$ Proteinen offenbarte im Vergleich zu einer reinen G_s Ausschaltung keine signifikanten Unterschiede	151
4.7.5.1 Vergleich der Kenngrößen, die in IP1-Assays und DMR-Assays für die Aktivierung von $G_{q/11}$ Proteinen durch Acetylcholin generiert worden sind.....	154
4.7.6 Durch eine Maskierung/Ausschaltung von G_s und $G_{q/11}$ Proteinen zeigten sich $G_{i/o}$ -vermittelte Kurvenverläufe mit geringer Intensität	156
4.7.6.1 Vergleich der Kenngrößen, die in [^{35}S]GTP γ S- und DMR-Assays (1500 Sek.) für die Aktivierung von $G_{i/o}$ Proteinen durch Acetylcholin generiert wurden	159
4.7.6.2 Vergleich der Kenngrößen, die in [^{35}S]GTP γ S- und DMR-Assays (2400 Sek.) für die Aktivierung von G_i Proteinen durch Acetylcholin generiert wurden	160
4.7.7 Durch eine Ausschaltung von $G_{q/11}$ und $G_{i/o}$ Proteinen zeigten sich Kurvenverläufe, die für eine Aktivierung von G_s Proteinen charakteristisch sind.....	162

4.7.7.1 Vergleich der Kenngrößen, die in cAMP- und DMR-Assays für die Aktivierung von G _s Proteinen durch Acetylcholin generiert wurden.....	165
4.7.8 Neben G _{q/11} , G _s und G _{i/o} Proteinen sind noch weitere Effektor-Proteine an der Zellantwort beteiligt.....	167
4.7.9 Der M1-Rezeptor aktivierte auch G _{12/13} Proteine	169
4.7.10 Effekte der Toxine auf die Signalwegsaktivierung der drei Orthostere	170
4.8 Messung der ERK 1/2 Phosphorylierung	172
4.8.1 Ermittlung der Zellzahl	172
4.8.2 Kinetische Experimente	174
4.8.2.1 An der ERK-Phosphorylierung waren unterschiedliche G Proteine beteiligt	174
4.8.2.2 Iperoxo zeigte eine ERK-Phosphorylierungskinetik, die sich nicht von Acetylcholin unterschieden hat.....	176
4.8.3 Dosis-Wirkungskurven ermöglichten einen genaueren Einblick in die Rolle der unterschiedlichen G Proteine.....	177
4.8.4 Dualsterische Liganden führten ebenfalls zu einer ERK-Phosphorylierung.....	179
5 Diskussion	183
5.1 Promiskuitive G Protein-Aktivierung und „Cross-talk“	183
5.1.1 Agonisten führten zu einer promiskuitiven G Protein-Aktivierung am M1-Rezeptor	183
5.1.2 Die Signalkaskade des M1-Rezeptors zeigte einen „Cross-talk“ zwischen den einzelnen G Proteinen	186
5.1.3 Dualsterische Hybride	189
5.1.3.1 „Naph-Hybride“ konnten Adenylylzyklasen nur in Abhängigkeit aktiver G _{q/11} Proteine aktivieren.....	189
5.1.3.2 „Phth-Hybride“ aktivierten Adenylylzyklasen sowohl über G _s als auch über G _{q/11} Proteine	189
5.1.4 Die Stimulation der Adenylylzyklasen war unabhängig vom Ca ²⁺ -Einstrom	190
5.1.5 HEK 293 Zellen zeigten keinen „Cross-talk“ zwischen G _s und G _{q/11} Proteinen	191
5.1.6 G _{i/o} Proteine waren an der intrazellulären IP1-Synthese beteiligt	192
5.2 Rezeptor-Theorie der „multiplen, aktiven Rezeptorzustände“	194
5.2.1 Die intrinsische Aktivität der orthosterischen Liganden Iperoxo und Carbachol war abhängig vom Signalweg	195
5.2.1.1 Iperoxo fungierte am M1-Rezeptor als Superagonist für G _{i/o} -abhängige Signalwege	195
5.2.1.2 Carbachol fungierte als Partialagonist für G _{i/o} -abhängige Signalwege	199
5.3 Dualsterische Hybridliganden	201

5.3.1 In Abhängigkeit der Kettenlänge und des allosterischen Substituenten kam es zu unterschiedlichen Einflüssen der Liganden auf die Signalwegs-Aktivierung	201
6 Zusammenfassung.....	211
7 Literaturverzeichnis.....	214
8 Abkürzungsverzeichnis.....	226
9 Anhang.....	229
9.1 Operational model of agonism (Black und Leff, 1983).....	229
9.1.2 Ergebnisse.....	230
10 Veröffentlichungen.....	232
10.1 Publikationen.....	232
10.2 Posterpräsentationen.....	232
11 Danksagung.....	233

1 Einleitung

John Langley und Paul Ehrlich entwickelten bereits Ende des 19. Jahrhunderts unabhängig voneinander die Basis für die noch heute gültige Rezeptor-Theorie. Sie postulierten, dass Verbindungen wie Nicotin und Curare nicht direkt auf Muskelfasern wirken können, sondern ihren Effekt über „receptive substances“ vermitteln.

Die von Langley und Ehrlich begründete Rezeptor-Theorie wurde im letzten Jahrhundert weiterentwickelt und die „receptive substances“ genauer charakterisiert und in vier verschiedene Rezeptor-Klassen, den Ligand-gesteuerten Ionenkanälen, den G Protein-gekoppelten Rezeptoren, den DNA-Transkription-regulierenden Rezeptoren und den Rezeptoren mit Enzymaktivität, unterteilt.

1.1 G Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs)

Der im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Subtyp 1 der muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren gehört zur Rezeptor-Klasse der G Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs).

Diese stellen eine der größten Protein-Familien im menschlichen Genom dar und werden durch ca. 800 Gene kodiert (Fredriksson et al., 2003). Sie vermitteln durch die Bindung verschiedener Neurotransmitter, Hormone und sensorischer Impulse die meisten zellulären Prozesse im Körper (Rosenbaum et al., 2009). Aus diesem Grund sind GPCRs eine der wichtigsten Zielstrukturen in der Arzneistoff-Forschung. In etwa 30% der sich derzeit auf dem Markt befindenden Arzneistoffe entfallen auf G Protein-gekoppelte Rezeptoren (Overington et al., 2006).

Aufgrund ihres Aufbaus innerhalb der Zellmembran werden GPCRs auch als 7-Transmembranrezeptoren (7TMR) bezeichnet. Ihr unverzweigter Proteinstrang durchspannt die Zellmembran sieben Mal in Form von α -Helices. Diese sind durch drei extra- und drei intrazelluläre Schleifen miteinander verknüpft. Das Amino-terminale Ende befindet sich extrazellulär, der C-Terminus intrazellulär (Hulme et al., 1990).

Phylogenetisch werden sie in fünf Sub-Familien, den Glutamat-, Rhodopsin-, Adhesion-, Frizzled/Taste- und Sekretin-Rezeptoren (GRAFS Nomenklatur, Fredriksson et al., 2003) unterteilt. Die muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren gehören zu der Rhodopsin-Familie, auch als Familie A bezeichnet. Diese repräsentiert die größte Familie unter den GPCRs. Mittels der Kristallstruktur von Rhodopsin gelang es tiefere Einblicke in den Aufbau der GPCRs der Familie A zu bekommen (Palczewski et al., 2000; Okada et al., 2002). Die

sieben transmembranären Helices lagern sich bündelartig innerhalb der Zellmembran zusammen und formen die Bindungstasche des endogenen Liganden.

1.1.1 G Protein Zyklus

G Protein-gekoppelte Rezeptoren befinden sich in der Zellmembran und nehmen extrazelluläre Stimuli auf, die sie in das Zellinnere weiterleiten. Die Aktivierung des Rezeptors und die damit einhergehende Konformationsänderung des Rezeptor-Proteins führen in der Folge zu einer Interaktion des Rezeptors mit Effektor-Proteinen. Die eingeleiteten Signalwege werden in der Regel über heterotrimere G Proteine vermittelt, können jedoch auch G Protein-unabhängig, zum Beispiel über β -Arrestine, verlaufen. G Proteine bestehen aus einer α , einer β und einer γ -Untereinheit und werden basierend auf ihrer Sequenzhomologie der α -Untereinheit in vier verschiedene Klassen, $G_{i/o}$, G_s , $G_{q/11}$ und $G_{12/13}$, unterteilt, die sich in ihren Signalkaskaden unterscheiden. G_s Proteine stimulieren Adenylylzyklasen (ACs) und fördern somit die intrazelluläre Synthese von cAMP. $G_{i/o}$ Proteine sind die Gegenspieler der G_s Proteine und hemmen Adenylylzyklasen. $G_{q/11}$ Proteine aktivieren die Phospholipase C β (PLC β), welche die Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP $_2$) in Inositoltriphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) bewirkt. IP3 vermittelt die Freisetzung von Ca $^{2+}$ aus intrazellulären Speichern. $G_{12/13}$ Proteine aktivieren die kleine GTPase Rho, sekundäre Botenstoffe in der $G_{12/13}$ Signalkaskade sind derzeit nicht bekannt. Auch die $\beta\gamma$ -Untereinheit kann mit verschiedenen Effektor-Proteinen interagieren und intrazelluläre Signalkaskaden einleiten. Die $\beta\gamma$ -Untereinheiten können zum Beispiel die Signalkaskaden der G α Proteine modulieren, indem sie an Adenylylzyklasen binden und die Wirkung der G α_s Proteine in Abhängigkeit der Isoform der Adenylylzyklasen entweder hemmen oder aktivieren (z.B. Hanoune et al., 1997). Des Weiteren können $\beta\gamma$ -Untereinheiten auch die Aktivität der Phospholipase C regulieren und somit in die Signalkaskade der G $\alpha_{q/11}$ Proteine eingreifen (Exton, 1996).

Die Interaktion des Rezeptors mit G Proteinen fördert den Austausch von GDP gegen GTP in der α -Untereinheit, dadurch wird das heterotrimere G Protein aktiviert. Die Bindung von GTP führt zu einer Dissoziation der $\beta\gamma$ -Untereinheit von der GTP-gebundenen α -Untereinheit und in der Folge können sowohl das $\beta\gamma$ -Dimer, als auch die α -Untereinheit mit ihren jeweiligen Effektor-Proteinen interagieren und entsprechende Signalkaskaden einleiten. Die α -Untereinheit verfügt über eine intrinsische GTPase-Aktivität, welche GTP zu GDP hydrolysiert und damit die Affinität der α -Untereinheit gegenüber der $\beta\gamma$ -Untereinheit wieder erhöht; es kommt zur Reassoziaton des heterotrimeren G Proteins, welches dann wieder im

inaktiven Zustand vorliegt. Die Hydrolyse-Geschwindigkeit wird durch RGS-Proteine („Regulators of G protein signaling“) erhöht.

Mithilfe bestimmter Toxine können Signalwege selektiv ausgeschaltet werden. **Pertussis Toxin** (PTX) ist ein Exotoxin des Bakteriums *Bordetella pertussis*. PTX katalysiert eine ADP-Ribosylierung der α -Untereinheit von $G_{i/o}$ Proteinen und verhindert so die Interaktion des $G_{i/o}$ Proteins mit dem Rezeptor. Das G Protein verbleibt im GDP-gebundenen, inaktiven Zustand und der $G_{i/o}$ -abhängige intrazelluläre Signalweg wird inhibiert.

Für G_s Proteine stehen derzeit noch keine spezifischen Inhibitoren zur Verfügung. Allerdings kann durch den permanenten G_s Protein-Aktivator **Cholera Toxin** (CTX) eine Agonist-vermittelte Aktivierung von G_s Proteinen maskiert werden. CTX ist ein Exotoxin, welches von dem Bakterium *Vibrio cholerae* produziert wird. Ebenfalls durch eine ADP-Ribosylierung wird die intrinsische GTPase-Aktivität des $G\alpha_s$ Proteins aufgehoben und das G Protein verbleibt durch die irreversible Kopplung an GTP im aktiven Zustand, somit wird der G_s -abhängige Signalweg maskiert. Dadurch kommt es bei CTX-behandelten Zellen zu keiner weiteren Agonist-vermittelten Aktivierung der Adenylzyklasen und damit zu einer Maskierung des Agonist- und Rezeptor-vermittelten Effektes auf G_s Proteine.

Der $G_{q/11}$ -Inhibitor **FR 900359** (FR) wird aus der Pflanze *Ardisia crenata* isoliert. FR verhindert den Nukleotidaustausch innerhalb der $G\alpha_{q/11}$ -Untereinheit und inhibiert so $G_{q/11}$ -abhängige Signalwege.

1.1.2 Muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren

Die muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren (mAChRs) sind metabotrope Rezeptoren und gehören zu der Familie A der GPCRs. Die Rezeptor-Familie der mAChRs besteht aus fünf Subtypen, M1-M5, welche sowohl im Zentralen Nervensystem (ZNS), als auch in der Peripherie exprimiert werden (Caulfield, 1993). In der Peripherie vermitteln die mAChRs parasymphatische Wirkungen an der glatten Muskulatur, den Drüsen und am Herzen. Im ZNS sind sie vor allem an motorischen und kognitiven Prozessen beteiligt. mAChRs werden sowohl prä-, als auch postsynaptisch exprimiert. Präsynaptisch fungieren sie als Autorezeptoren und kontrollieren so die Neurotransmitter-Ausschüttung, postsynaptisch dienen sie der Reizweiterleitung.

Durch die Einführung des Anti-Ulkus Medikamentes Pirenzepin, ein Antagonist an muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren mit einer Prävalenz für den M1-Subtyp, wurde ersichtlich, dass verschiedene Subtypen dieser Rezeptor-Familie existieren (Hammer et al.,

1980). Bis heute konnte die Existenz fünf verschiedener Subtypen nachgewiesen werden (Kubo et al., 1986; Bonner et al., 1987; Peralta et al., 1987). Diese fünf Subtypen, M1-M5, können aufgrund ihrer Kopplungspräferenz weiter unterteilt werden. M1-, M3- und M5-Rezeptoren koppeln bevorzugt an $G_{q/11}$ Proteine, M2- und M4-Rezeptoren an $G_{i/o}$ Proteine (Caulfield, 1993). Während die dritte intrazelluläre Schleife in ihrem C-Terminus hoch konserviert unter allen fünf Subtypen ist, ist die N-terminale Sequenz der dritten Schleife nur innerhalb der funktionellen Gruppen (M1/M3/M5 und M2/M4) konserviert, was eine wichtige Rolle der dritten intrazellulären Schleife in der G Protein Präferenz nahe legt (Wess et al., 1990, Hulme et al., 1990; Wess, 1993; Wess, 1996, Wess et al., 1997).

Die Acetylcholin-Bindungsstelle befindet sich tief innerhalb des heptahelikalen Bündels und wird auch als „orthosterische“ Bindungsstelle bezeichnet (ortho-, griechisch: richtig). Die Aminosäuren der orthosterischen Bindungstasche sind innerhalb der fünf Subtypen hochkonserviert (Hulme et al., 1990), weswegen orthosterische Liganden keine Subtyp-Selektivität, sondern allenfalls eine in vivo Prävalenz aufweisen (Eglen, 2005). Eine Therapie mit Muskarin-Liganden ist dadurch häufig mit Nebenwirkungen belastet, da alle Rezeptor-Subtypen durch diese Liganden beeinflusst werden.

Da in den meisten Organen und Geweben mehrere Rezeptor-Subtypen nebeneinander exprimiert werden, war eine Zuordnung der physiologischen Funktionen zu den verschiedenen Subtypen zunächst schwierig. Durch die Einführung von Maus-Modellen, welche aufgrund von gentechnischen Veränderungen einzelne Rezeptor-Subtypen nicht exprimieren können, gelang es schließlich die Physiologie der mAChRs besser zu untersuchen (Wess, 2004).

Der im Rahmen dieser Arbeit untersuchte M1-Subtyp befindet sich vorwiegend im Cortex und Hippocampus des Gehirns (Levey et al., 1991, 1995) und vermittelt dort vor allem motorische und kognitive Funktionen. Untersuchungen an M1-mutierten Mäusen machten die Rolle des M1-Rezeptors in der kognitiven Entwicklung deutlich (Anagnostaras et al., 2003). Aus diesem Grund stellt der M1-Rezeptor-Subtyp eine wichtige Zielstruktur in der Therapie des Morbus Alzheimer's als auch der Schizophrenie dar (Caulfield und Straughan, 1983; Raedler et al., 2003; Scarr et al., 2008, Langmead et al., 2008). Jedoch konnten aufgrund fehlender Subtyp-Selektivität und dadurch bedingten Nebenwirkungen bisher noch keine M1-Rezeptor Agonisten in die Arzneimittel-Therapie etabliert werden (Langmead et al., 2008).

Subtyp	Lokalisation	Physiologische Bedeutung
M1	<u>ZNS:</u> Cortex Hippocampus Striatum <u>Peripherie:</u> Magen	Kognitive Funktionen: Lernprozesse und Gedächtnisleistung Motorische Aktivität Hemmung der striatalen Dopamin-Ausschüttung
M2	<u>ZNS:</u> Hippocampus <u>Peripherie:</u> Herz Glatte Muskulatur	Regulierung der Herzfrequenz Antinozizeption Förderung der Kontraktion der glatten Muskulatur
M3	<u>ZNS:</u> Mesencephalon <u>Peripherie:</u> Glatte Muskulatur Drüsen	Kontraktion glatter Muskulatur Insulin-Sekretion Nahrungsaufnahme Salivation
M4	<u>ZNS:</u> Striatum Cortex Hippocampus	Antinozizeption Motorische Kontrolle
M5	<u>ZNS:</u> Substantia nigra	Vasodilatation Motorische Regulation

Tabelle 1: Übersicht über die Gewebe-Verteilung und die physiologischen Funktionen muskarinischer Acetylcholin-Rezeptoren.

Tabelle 1 gibt nur eine Auswahl der wichtigsten Effekte und Gewebe wider (Levey et al., 1994; Caulfield und Birdsall, 1998; Wess, 2003; Wess, 2004).

1.1.2.1 Muskarinische Acetylcholin-Rezeptor Liganden in der Therapie

Aufgrund der ubiquitären Verteilung muskarinischer Acetylcholin-Rezeptoren im menschlichen Körper ergeben sich vielfältige Indikationen für den Einsatz muskarinischer Liganden. Durch die mangelnde Organ- und Subtyp-Selektivität ist die klinische Bedeutung cholinergere Liganden allerdings begrenzt.

Parasympathomimetika: Agonisten der mAChRs werden in der Therapie der postoperativen Darm- und Blasenatonie (Bethanechol, Myocholine-Glenwood®) sowie in der

Therapie des Engwinkel-Glaukoms (Pilocarpin, z.B. Pilomann[®]) angewendet.

Parasympatholytika: Vor allem bei Patienten mit chronisch-obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) spielen antimuskarinische Wirkstoffe, wie zum Beispiel Ipratropium (Atrovent[®]) oder Tiotropium (Spiriva[®]), eine wichtige Rolle. Durch die lokale (inhalative) Gabe dieser Substanzen sind systemische Nebenwirkungen eher gering ausgeprägt. Eine systemische Anwendung cholinergischer Antagonisten ist zum Beispiel bei Gallen- und Nierenkoliken (N-Butylscopolamin, z.B. Buscopan[®]) oder bei Morbus Parkinson (Biperiden, z.B. Akineton[®]) indiziert. Aufgrund der Atropin-artigen Nebenwirkungen spielt Biperiden in der Therapie des Morbus Parkinson's allerdings eher eine untergeordnete Rolle. Atropin kann als ZNS-gängiger Antagonist an muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren bei Organophosphat-Vergiftungen als Antidot eingesetzt werden. Das ebenfalls ZNS-gängige Atropin-Derivat Scopolamin (z.B. Scopoderm TTS[®]) wird bei Kinetosen verwendet.

Des Weiteren werden auch einige Subtyp-prävalente Antagonisten in der Arzneimittel-Therapie eingesetzt, wie zum Beispiel Pirenzepin (Gastrozepin[®]); ein Medikament, welches bei peptischen Erkrankungen angewendet wird und eine M1-Rezeptor Prävalenz aufweist. Allerdings wurde auch dieser Wirkstoff durch andere, besser verträgliche Substanzen weitgehend aus der Therapie verdrängt. Die M3-Rezeptor prävalenten Antagonisten Darifenacin (Emselex[®]), Solifenacin (Vesikur[®]) und Fesoferodin (Toviaz[®]) werden in der Indikation der überaktiven Blase eingesetzt.

1.2 Rezeptor-Theorie der multiplen aktiven Rezeptorzustände

Ging man zunächst von einem Rezeptormodell aus, indem es nur einen aktiven und einen inaktiven Rezeptorzustand gibt, häufen sich jetzt die Hinweise, dass verschiedene Agonisten unterschiedliche, aktive Rezeptor-Konformationen induzieren können (Krumins und Barber 1997; Ghanouni et al., 2001). In der Folge können diese unterschiedlichen, aktiven Rezeptorzustände selektiv zu einer Aktivierung einzelner Signalwege führen (Kenakin, 1997; Kenakin, 2003). Liganden können unterschiedliche Affinitäten zu den verschiedenen Rezeptor-Konformationen aufweisen und diese somit bevorzugt induzieren bzw. stabilisieren (Burgen, 1966; Kenakin, 1996). Dieses Phänomen konnte bisher nur für wenige Rezeptor-Typen beobachtet werden, zum Beispiel für Cannabinoid- (Glass und Northup, 1999), 5-HT_{2A/2C}- (Berg et al., 1998) und α_1 - und β -Adrenorezeptoren (Perez et al., 1996; Zuscik et al., 1998; Übersichtsarbeit: Kenakin, 2003). Jedoch ergaben sich durch die Untersuchungen an muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren durch Akam et al. (2001) Hinweise darauf, dass auch in Muskarin-Rezeptoren unterschiedliche Rezeptor-Konformationen stabilisiert werden

können, die zu einer veränderten Signaltransduktion auf G Proteine unterschiedlicher Familien führen. Diese Befunde stützen die Hypothese, dass die Bindung unterschiedlicher Agonisten an den Rezeptor zu einer selektiven Aktivierung einzelner Signalwege durch die Rekrutierung verschiedener G Protein-Subtypen führen kann, was als „stimulus trafficking“ bezeichnet wird (Kenakin 1995b; Kenakin 1997). Können Rezeptoren verschiedene G Protein-Subtypen aktivieren, würden Agonisten mit hoher intrinsischer Aktivität vermutlich alle G Proteine aktivieren, die auch durch den endogenen Liganden aktiviert werden können (Neubig, 1998). Agonisten mit geringerer intrinsischer Aktivität könnten hingegen nur die vom jeweiligen Rezeptor präferierte G Protein Familie aktivieren (Neubig, 1998).

1.2.1 Allosterie

Neben der orthosterischen Bindungstasche, an die der endogene Ligand bindet, verfügen Rezeptoren häufig auch noch über „allosterische“ Bindungsstellen. Die Bindungsstelle allosterischer Modulatoren wird definiert als topographisch unterschiedlich zu der Bindungsstelle des endogenen Liganden (Neubig et al., 2003; Conn et al., 2009). Allosterische Liganden können einerseits die Bindung eines Orthosters modulieren, andererseits können sie jedoch auch selbst die Rezeptor-Aktivität beeinflussen (Christopoulos und Kenakin, 2002; Christopoulos, 2002). In Abhängigkeit ihres Effektes auf den orthosterischen Liganden unterscheidet man zwischen positiven allosterischen Modulatoren (PAMs), wenn sie die Bindung des Orthosters an den Rezeptor fördern, und negativen allosterischen Modulatoren (NAMs), wenn sie die Bindung des Orthosters hemmen; üben sie keinen Effekt auf das Orthoster aus, werden sie als stille allosterische Modulatoren (SAMs) bezeichnet. Es handelt sich hierbei um eine kooperative und nicht um eine kompetitive Interaktion (Christopoulos und Kenakin, 2002). Sowohl der allosterische als auch der orthosterische Ligand führen zu einer Änderung der Rezeptor-Konformation, dadurch kann es zu einer gegenseitigen Beeinflussung der beiden Liganden kommen (Monod et al., 1963). Ein großer Vorteil der allosterischen Bindungstasche ist, dass diese im Gegensatz zu der orthosterischen zwischen den einzelnen Subtypen einer Rezeptor-Familie weniger konserviert ist (Wess, 2005; Gao und Jacobson, 2006; Christopoulos, 2014). Durch die Bindung an allosterische Areale kann folglich eine Subtyp-Selektivität generiert werden. Derzeit werden hauptsächlich orthosterisch-bindende Liganden zur Rezeptor-Modulation eingesetzt, die den Nachteil haben, dass sie an alle Subtypen binden können. Da die unterschiedlichen Subtypen der mAChRs vielfältige physiologische Aufgaben im menschlichen Körper vermitteln, führt eine unselektive Modulation aller Subtypen zwangsläufig zu unerwünschten Wirkungen. Durch die Entdeckung weiterer, allosterischer

Bindungsareale innerhalb des Rezeptor-Proteins, die weit weniger konserviert sind, als die Bindungsstelle des endogenen Liganden, wurde die Basis für Subtyp-selektive Substanzen generiert.

Neben der Subtyp-selektiven Rezeptor-Bindung bieten allosterische Modulatoren weitere Vorteile in der Therapie (z.B. Tuček und Proška, 1995; Christopoulos und Kenakin, 2002; Birdsall und Lazareno, 2005; Wess, 2005). Dadurch, dass sie ihren Effekt nur in Abhängigkeit des endogenen Liganden im Körper ausüben, ist der Maximaleffekt des Allosters durch die Kooperativität mit dem körpereigenen, orthosterischen Liganden vorgegeben. Der Effekt des Allosters ist sättigbar und unterliegt folglich weniger der Gefahr einer Überdosierung. Zudem würde der Effekt des allosterischen Liganden nur dann eintreten, wenn der endogene Ligand ebenfalls an den Rezeptor gebunden vorliegt. Das Alloster entfaltet seine Wirkung dann synchron mit der physiologischen Ausschüttung des endogenen Liganden, zum Beispiel des Neurotransmitters Acetylcholin. Die Rezeptor-Aktivierung und Signaltransduktion würde durch das Alloster nur verstärkt werden, das räumliche und zeitliche Profil der Rezeptor-Aktivierung würde jedoch weiterhin unter physiologischen Bedingungen ablaufen. Aufgrund dessen werden allosterische Modulatoren am M1-Rezeptor in der Therapie des Morbus Alzheimer's diskutiert. In der Pathogenese der Alzheimer'schen Krankheit kommt es zum Untergang cholinergischer Neuronen und damit zu einem Mangel an Acetylcholin im Gehirn. Die Gehirnstrukturen des Hippocampus und des Cortex sind maßgeblich an der Gedächtnisleistung und an kognitiven Prozessen beteiligt, weswegen der M1-Rezeptor, der in diesen Hirngebieten vorwiegend exprimiert wird, im Fokus der Alzheimer-Forschung steht. Bisher wurde jedoch aufgrund mangelnder Subtyp-Selektivität und damit einhergehenden schwerwiegenden Nebenwirkungen noch kein Agonist an mAChRs in dieser Indikation zugelassen. Xanomelin zeigte eine M1/M4-Rezeptor Prävalenz und konnte die kognitiven Funktionen in Patienten mit Morbus Alzheimer verbessern, erlangte jedoch aufgrund von Nebenwirkungen, die durch M2- und M3-Rezeptoren vermittelt wurden, nicht die Zulassung auf dem Arzneimittel-Markt (Foster et al., 2014). Eine Förderung der Bindung und des Effektes von endogenem Acetylcholin an M1-Rezeptoren durch eine allosterische Modulation stellen demnach interessante Wirkmechanismen dar. Die verminderte Acetylcholin-Ausschüttung im Gehirn in Folge einer Alzheimer-Erkrankung könnte so durch eine Verstärkung des Effektes durch allosterische Modulatoren ausgeglichen werden.

Benzodiazepine sind die ersten allosterischen Modulatoren, die in die Therapie eingeführt worden sind. Sie binden abseits der Bindungsstelle für die γ -Aminobuttersäure (GABA) an den GABA_A-Rezeptor, welcher zu der Klasse der Ligand-gesteuerten Ionenkanäle gehört

und verstärken die Wirkung von GABA auf inhibitorische Neurone.

Untersuchungen von Alkanbisammonium-Verbindungen an Meerschweinchen-Vorhöfen führten erstmals zu der Erkenntnis, dass auch GPCRs, in diesem Fall der muskarinische M2-Rezeptor, sensitiv gegenüber einer allosterischen Modulation sind (Lüllmann et al., 1969). Ellis et al. (1991) konnten zeigen, dass alle fünf Subtypen der mAChRs durch allosterisch-bindende Substanzen moduliert werden können. Für die muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren wurden bisher mindestens zwei unterschiedliche allosterische Bindungsareale entdeckt (Christopoulos, 2002; Mohr et al., 2003; Birdsall und Lazareno, 2005). Die „common allosteric binding site“ (Ellis und Seidenberg, 1992), die am besten untersucht wurde, befindet sich innerhalb der extrazellulären Schleifen, oberhalb der orthosterischen Bindungstasche (Leppik et al., 1994; Proška und Tuček, 1994; Jakubík und Tuček, 1994; Mohr et al., 2010). Orthosterische Liganden müssen diese allosterische Bindungstasche passieren, bevor sie zu ihrem Bindungsort gelangen, deswegen führen Allosterie in muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren in der Regel zu einer Hemmung der Assoziation und einer Verzögerung der Dissoziation des Orthosters (Mohr et al., 2003).

Allosterische Modulatoren für die muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren befinden sich derzeit noch nicht in klinischen Studien, jedoch konnten bereits einige Subtyp-selektive allosterisch-bindende Liganden gefunden werden. BQCA ist ein Alloster ohne agonistische Aktivität, es kann jedoch die Wirkung von Acetylcholin an M1-Rezeptoren signifikant verstärken ohne einen Effekt auf die Wirksamkeit von Acetylcholin an M2-, M3- und M4-Rezeptoren auszuüben (Ray et al., 2008).

Die FDA hat im Jahr 2004 den ersten allosterischen Modulator an G Protein-gekoppelten Rezeptoren zugelassen; Cinacalcet (Mimpara®), ein Medikament zur Behandlung des sekundären Hyperparathyreoidismus (Block et al., 2004; Lindberg et al., 2005). Cinacalcet steigert die Empfindlichkeit des Calcium-sensitiven Rezeptors der Nebenschilddrüse gegenüber extrazellulärem Ca^{2+} und vermindert so die Ausschüttung des Parathormons (Nagano und Nemeth, 2005).

Im Jahr 2007 wurde mit Maraviroc (Celsentri®) der erste allosterische Modulator an einem G Protein-gekoppelten Rezeptor der Rhodopsin-Familie zugelassen. Maraviroc ist ein allosterischer Antagonist am CCR5-Rezeptor und wird in der HIV-Therapie eingesetzt. Durch die selektive Bindung von Maraviroc an diesen Rezeptor wird das Eindringen des HI-Virus' verhindert.

1.2.1.1 Dualsterische Liganden

Durch das Konzept der dualsterischen Hybridliganden nutzt man die simultane Bindung an die konservierte orthosterische Bindungsstelle, um den Rezeptor mit hoch-affinen Substanzen zu aktivieren bzw. zu inhibieren (**message**) und an eine weniger stark konservierte allosterische Bindungstasche, um eine Subtyp-Selektivität der Liganden zu generieren (**address**) (Antony et al., 2009). Orthoster und Alloster sind durch eine geeignete „Linker“-Kette miteinander verbunden. Die Länge der „Linker“-Kette sollte so gewählt werden, dass die einzelnen Bausteine so an den Rezeptor binden können, wie sie auch ohne den jeweils anderen Baustein binden würden.

Bock et al. (2012) gelang es mithilfe von dualsterischen Liganden zu zeigen, dass das Kopplungsverhalten des M2-Rezeptors hoch sensitiv von der Flexibilität der allosterischen Bindungstasche abhängt. Durch den gezielten Einsatz speziell dafür entwickelter Hybridliganden kann die Signaltransduktion des M2-Rezeptors folglich kontrolliert werden. Infolge einer Rezeptor-Aktivierung kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptor-Proteins, welche das allosterische Vestibül miteinschließt; diese Umlagerung spielt eine wichtige Rolle bei der nachfolgenden G Protein-Aktivierung (Wess et al., 2008; Mohr et al., 2010). Wird das allosterische Bindungsareal durch einen Liganden besetzt, kann die Konformationsänderung nicht, beziehungsweise nicht in vollem Ausmaß stattfinden und die nachgeschaltete G Protein-Aktivierung kann dadurch beeinträchtigt werden.

Um den Einfluss der Flexibilität der allosterischen Bindungstasche am M1-Rezeptor zu untersuchen, wurden CHO-M1 Zellen mit dualsterischen Liganden beprobt, welche zum Teil denen entsprechen, die von Bock et al. (2012) am M2-Rezeptor getestet wurden. Ausgehend von dem in Bock et al. (2012) dargestellten Bauprinzip wurde die Art und die Länge der „Linker“-Kette im Rahmen dieser Arbeit weiter variiert. Die dualsterischen Liganden, die hier Anwendung fanden, waren aus Iperoxo, als orthosterischem Baustein aufgebaut, welcher über eine Alkyl-Kette unterschiedlicher Länge (6,7,8 oder 10 Methylen-Einheiten) bzw. über einen Diamid-„Linker“ (-fri-) mit dem allosterischen Baustein Phthalimid oder Naphthalimid verknüpft war.

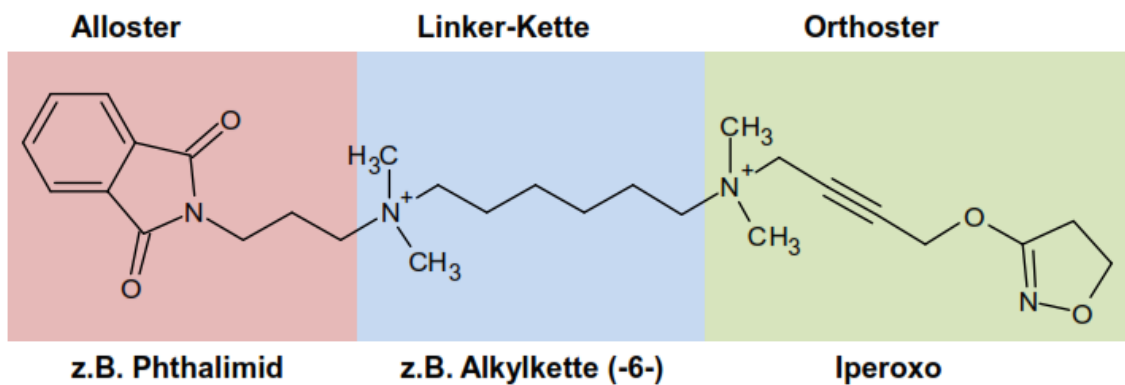


Abbildung 1: Aufbau der dualsterischen Liganden am Beispiel von Iper-6-phth.
 Weitere Strukturformeln sind in Kapitel 2 wiedergegeben.

Iperoxo ist ein orthosterischer Agonist mit außergewöhnlich hoher Affinität für die muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren (Dallanoce et al., 1999; Antony et al., 2009; Schrage et al., 2013 und 2014). Es leitet sich strukturell von Oxotremorin M ab. Phthalimid und Naphthalimid sind inverse Agonisten, die an das allosterische Vestibül des Rezeptors binden. Sie leiten sich von den beiden Strukturen W84 und Naphmethonium ab, die ebenfalls allosterisch an mAChRs binden und intensiv untersucht worden sind (Lüllmann et al., 1969; Muth et al., 2003; Prilla et al., 2006). Durch die Nutzung von inversen Agonisten als allosterischem Substituenten wird der Rezeptor nur dann aktiviert, wenn die Liganden in einem „dualsterischen“ Bindungsmodus an den Rezeptor binden, also die Bindung simultan an das orthosterische und das allosterische Vestibül stattfindet und nicht, wenn die Hybride rein allosterisch binden. Dieser „functional misfit“ der beiden Bausteine wirkt sich folglich gegenläufig auf die Rezeptor-Aktivierung aus, weswegen sich die intrinsische Aktivität und die Wirksamkeit der Hybridliganden zum Teil hoch signifikant von der Wirkung der Muttersubstanz Iperoxo unterscheidet (Mohr et al., 2010).

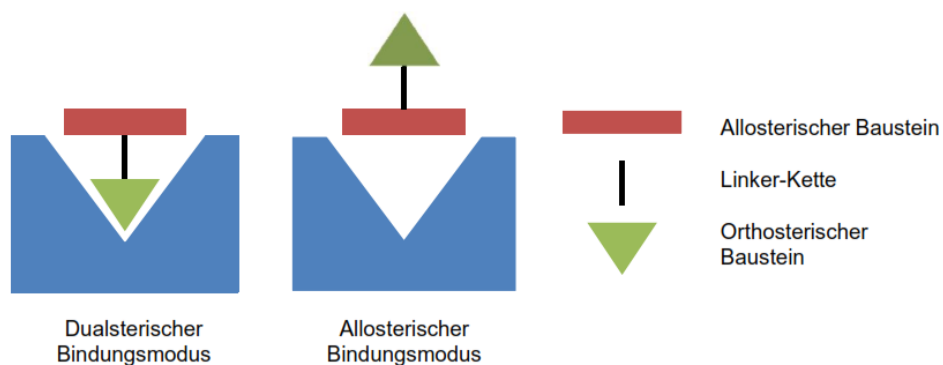


Abbildung 2: Darstellung der möglichen Bindungsmodi dualsterischer Hybridliganden.

1.2.2 Superagonismus

Der Begriff intrinsische Aktivität beziehungsweise „efficacy“ wurde 1956 von Stephenson geprägt und beschreibt die Fähigkeit eines Rezeptor-gebundenen Liganden eine physiologische beziehungsweise pharmakologische Zellantwort auszulösen (Stephenson 1956). Die „efficacy“, auch als E_{max} -Wert bezeichnet, beschreibt ein relatives Phänomen, denn in der Regel wird der Effekt, der durch einen Agonisten ausgelöst wird, in Relation zu dem Effekt, der durch den endogenen Liganden generiert wird, gesetzt. Demzufolge können unterschiedliche Agonisten aufgrund ihrer intrinsischen Aktivität relativ zum endogenen Liganden eingeordnet werden. Entspricht der E_{max} -Wert einer Substanz dem maximalen Effekt des endogenen Agonisten, wird diese Substanz als Vollagonist bezeichnet. Liganden, die auch in Rezeptor-sättigenden Konzentrationen nur eine submaximale Zellantwort hervorrufen, werden als Partialagonisten charakterisiert (Kenakin 1985; Rosenbaum et al., 2009; Nygaard et al., 2013). Neueren Untersuchungen zufolge können synthetische Liganden jedoch auch eine maximale Zellantwort generieren, die größer ist als die, welche durch den endogenen Liganden ausgelöst wird. Ein solches Verhalten wird als Superagonismus bezeichnet (z.B. Schrage et al., 2013; Übersichtsarbeiten: Smith et al., 2011; Langmead und Christopoulos, 2013; Schrage et al., 2016).

Der Begriff „Superagonismus“ kommt vor allem im Bereich der Immunologie vor (z.B. Chen et al., 2000; Beyersdorf et al., 2005), wird jedoch seit einigen Jahren auch in der Rezeptor-Pharmakologie der G Protein-gekoppelten Rezeptoren angewendet (Tan et al., 2002; Niemczyk et al., 2010; Schrage et al., 2013; Übersichtsarbeiten: Smith et al., 2011; Langmead und Christopoulos, 2013; Schrage et al., 2016). Im Feld der GPCRs bezeichnet der Begriff „Superagonist“ eine synthetisch hergestellte Substanz, die eine höhere intrinsische Aktivität („efficacy“) am Rezeptor aufweist, als der endogene Ligand.

Neben verschiedenen anderen GPCRs, wie zum Beispiel dem Ghrelin-Rezeptor (Bennett et al., 2009), dem Subtyp 4 des humanen Somatostatin-Rezeptors (Engström et al., 2005) und dem humanen Thyrotropin releasing-hormon Rezeptor (Thirunarayanan et al., 2012) konnte auch für den muskarinischen M2-Rezeptor (Schrage et al., 2013) gezeigt werden, dass synthetische Liganden eine höhere intrinsische Aktivität am Rezeptor aufweisen können, als der endogene Ligand.

Das Phänomen des Superagonismus wird häufig in pharmakologischen Assays nicht aufgedeckt (Smith et al., 2011), da vor allem „second messenger assays“ einer hohen Signalamplifikation unterliegen können (Milligan, 2003), welche zu einer Maskierung von unterschiedlichen intrinsischen Aktivitäten verschiedener Agonisten führen kann (vgl. Holst et

al., 2005 mit Bennett et al., 2009). Durch eine Messung der Rezeptor-Aktivierung anhand eines Effektor-Proteins, welches in der Signalkaskade nah an der Rezeptor-Aktivierung liegt, können die E_{max} -Werte unterschiedlicher Agonisten folglich besser miteinander verglichen werden (Strange, 2008), da diese Zellantwort weniger durch eine Signalamplifikation beeinflusst wird (Milligan, 2003).

1.2.2.1 Rezeptor Reserve („spare receptors“)

Stehen in einem System mehr Rezeptoren zur Verfügung, als zur Generierung einer maximalen Zellantwort benötigt werden, wird dieses als Rezeptor Reserve bezeichnet. In einem System mit hoher Rezeptor Reserve kann bereits die Aktivierung einer geringen Fraktion der Rezeptor-Population ausreichen, um eine maximale Zellantwort zu generieren, dadurch wird der super- oder partialagonistische Charakter von Liganden häufig maskiert. In einem System ohne Rezeptor Reserve entspricht die Wirksamkeit der Affinität ($EC_{50} = K_D$). Weichen Wirksamkeit und Affinität signifikant voneinander ab, ist das ein starkes Indiz für „spare receptors“.

1.3 Promiskuitive G Protein-Aktivierung

G Protein-gekoppelte Rezeptoren zeigen immer eine Kopplungspräferenz, trotzdem können sie häufig mit mehr als einer G Protein-Klasse interagieren. Dieses Phänomen wird als promiskuitive G Protein-Aktivierung bezeichnet und wird vor allem in rekombinanten Zellsystemen beobachtet, in denen die Rezeptoren überexprimiert wurden (Haga et al., 1989; Kenakin, 1995a; Burford et al., 1995; Akam et al., 2001; Thomas et al., 2008). Neben anderen Rezeptoren sind auch muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren zur promiskuitiven G Protein-Aktivierung befähigt. Der muskarinische M1-Rezeptor kann neben $G_{q/11}$ Proteinen auch G_s und $G_{i/o}$ Proteine aktivieren und deren jeweilige Signalkaskaden auslösen (Akam et al., 2001; Thomas et al., 2008). Ob auch endogen exprimierte M1-Rezeptoren promiskuitiv G Proteine verschiedener G Protein-Familien aktivieren können, und dieses Phänomen damit eine physiologische Relevanz aufweist, konnte bisher noch nicht gezeigt werden. Die Daten beschränken sich derzeit auf die Promiskuität, der in rekombinanten Zellsystemen exogen exprimierten M1-Rezeptoren (Akam et al., 2001; Thomas et al., 2008). Für den D1-Dopamin-Rezeptor konnten Jin et al. (2001) jedoch in nativem Hirngewebe von Ratten zeigen, dass diese Rezeptor-Subtypen sowohl G_s als auch $G_{q/11}$ Proteine aktivieren können und damit eine physiologische Relevanz der promiskuitiven G Protein-Aktivierung aufzeigen. Die

Signalwege mit sekundärer Präferenz werden häufig erst in hohen Agonist-Konzentrationen aktiviert, wohingegen das präferierte G Protein bereits in niedrigen Dosen rekrutiert wird.

1.4 „Cross-talk“

Neben einer unabhängigen Aktivierung verschiedener G Protein-Klassen können sich die Signalwege verschiedener G Protein-Familien über Konvergenz-Punkte gegenseitig beeinflussen. Ein möglicher Konvergenz-Punkt zwischen $G\alpha_{q/11}$ und der $\beta\gamma$ -Untereinheit der $G_{i/o}$ Proteine ist die Aktivierung der Phospholipase C (z.B. Exton, 1996) und daraus folgend ein synergistischer Effekt der beiden G Protein-Klassen auf die Generierung von intrazellulärem IP₃. Durch den Zusatz von Pertussis Toxin (PTX) kann der Aktivierungs-Mechanismus der Phospholipase C genauer beleuchtet werden, da nur $G_{i/o}$ Proteine sensitiv gegenüber diesem Inhibitor sind (Blank et al., 1991).

1.4.1 Adenylylzyklasen

Ein weiterer Konvergenz-Punkt besteht auf Höhe der Adenylylzyklasen (ACs), die durch eine Vielzahl von Effektor-Proteinen beeinflusst werden können. Insgesamt wurden bisher neun Membran-gebundene Isoformen der Adenylylzyklasen identifiziert, welche sich in ihrer Gewebeverteilung und in der Art ihrer Regulation stark unterscheiden (z.B. Hanoune et al., 1997; Simonds, 1999; Chern, 2000; Patel et al., 2001). Demzufolge ist die Art der möglichen Interaktion unterschiedlicher Effektor-Proteine abhängig vom untersuchten Gewebe und den darin exprimierten Isoformen der Adenylylzyklasen.

$G_{i/o}$ und G_s Proteine haben einen gegenläufigen Effekt auf Adenylylzyklasen, $G_{i/o}$ hemmen ACs, G_s Proteine stimulieren diese. Dieser direkte Effekt der G_s und $G_{i/o}$ Proteine wird über die α -Untereinheit des jeweiligen G Proteins ausgelöst. Allerdings kann auch die $\beta\gamma$ -Untereinheit verschiedener G Protein-Klassen einen synergistischen Effekt mit $G\alpha_s$ Proteinen auf die ACs ausüben. Die Aminosäure-Sequenz der Adenylylzyklasen besteht aus unterschiedlichen Epitopen, die eine separate Bindung und Interaktion von α_s , α_i und $\beta\gamma$ -Untereinheiten ermöglicht (Taussig et al., 1993 und 1994). Die Konzentration an $\beta\gamma$ -Untereinheiten, die für eine Aktivierung von Adenylylzyklasen des Subtyps II, IV und VII erforderlich ist, ist weitaus größer, als die benötigte Konzentration an $G\alpha_s$ -Untereinheiten (Tang und Gilman, 1992), demzufolge werden die Adenylylzyklasen nicht durch die $\beta\gamma$ -Untereinheit des G_s Proteins aktiviert, sondern durch die Untereinheit eines G Proteins,

welches in einem viel höheren Ausmaß simultan aktiviert wird (Tang und Gilman, 1992). In nativem Gewebe, wie zum Beispiel Hirngewebe handelt es sich hierbei vermutlich um $\beta\gamma$ -Untereinheiten, die von $G_{i/o}$ Proteinen abdissoziiert sind, da diese G Proteine zumindest im Gehirn überwiegend vorkommen (Tang und Gilman, 1992; Iyengar, 1993). Neben den verschiedenen G Protein-Familien können jedoch auch noch weitere Effektoren einen Einfluss auf Adenylylzyklasen ausüben. Vorherige Studien haben gezeigt, dass Ca^{2+} , abhängig von der jeweiligen Isoform der Adenylylzyklasen einen hemmenden, einen stimulierenden oder gar keinen Effekt auf die Adenylylzyklasen ausüben kann (z.B. Hanoune et al., 1997). Der jeweilige molekulare Mechanismus ist abhängig vom Zelltyp und den darin exprimierten Isoformen der Adenylylzyklasen und dient im nativen Gewebe vermutlich der Feinanpassung intrazellulärer Signalkaskaden, da sowohl unterschiedliche Rezeptoren als auch unterschiedliche G Proteine Einfluss auf die, durch Adenylylzyklasen ausgelöste, Zellantwort haben können.

1.5 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen der Forschergruppe „FOR 2372“ durchgeführt. Ziel dieser Arbeit war es, das Signaltransduktions-Repertoire des muskarinischen M1-Rezeptors genauer zu beleuchten. Bisher ist nur wenig über den Mechanismus der promiskuitiven G Protein-Aktivierung bekannt. Welche Voraussetzungen müssen im Rezeptor-Protein erfüllt sein, damit der Rezeptor mehr als eine G Protein-Klasse aktivieren kann? Für die Untersuchung der Signalwegs-Aktivierung wurden sowohl die drei orthosterischen Agonisten Acetylcholin, Carbachol und Iperoxo, als auch dualsterische Hybridliganden eingesetzt.

Durch die simultane Bindung der dualsterischen Liganden an das orthosterische und allosterische Vestibül sollte die Flexibilität des Rezeptor-Proteins, welche für eine ungestörte Rezeptor-Aktivierung unbedingt erforderlich ist, eingeschränkt werden. Bock et al. (2012) konnten bereits für den muskarinischen M2-Rezeptor zeigen, dass es möglich ist mittels dualsterischer Liganden eine Signalwegs-Selektivität („biased signaling“) zu generieren. Dabei konnten sie wichtige Einblicke in die Struktur-Wirkungsbeziehungen der eingesetzten Hybridliganden gewinnen. Sie postulierten, dass eine Restriktion der Flexibilität der allosterischen Bindungstasche vor allem die Rekrutierung von G Proteinen einschränkt, die mit sekundärer Präferenz aktiviert werden. Der präferierte Signalweg wird durch die verminderte Flexibilität im allosterischen Vestibül weniger beeinflusst. Folglich hängt die promiskuitive G Protein-Aktivierung wesentlich von der Konformation allosterischer Bindungsareale ab. Dieses Konzept sollte im Rahmen dieser Arbeit auf den M1-Rezeptor-

Subtyp übertragen werden, um zu prüfen, ob das von Mohr und Kollegen entwickelte Prinzip der dualsterischen Modulation der Signalwegs-Aktivierung Subtyp-übergreifende Bedeutung hat (Bock et al., 2012).

Neben der Untersuchung der unabhängig voneinander ablaufenden Aktivierung der verschiedenen G Protein-Familien, sollte im weiteren Verlauf getestet werden, ob sich die verschiedenen Signalkaskaden der G Proteine gegenseitig beeinflussen können, also ob ein „Cross-talk“ zwischen den drei G Proteinen $G_{q/11}$, G_s und $G_{i/o}$ besteht. Durch Konvergenz-Punkte in den Signalkaskaden der verschiedenen G Protein-Klassen können sich die jeweiligen Signalwege gegenseitig verstärken oder hemmen. In einer Übersichtsarbeit von Exton (1996) wurde ein „Cross-talk“ zwischen $G_{q/11}$ und $\beta\gamma$ -Untereinheiten der $G_{i/o}$ Proteine diskutiert; beide aktivieren die Phospholipase C und erhöhen dadurch die intrazelluläre IP₃-Konzentration. Durch den Einsatz des spezifischen $G_{i/o}$ Protein-Inhibitors PTX sollte im Rahmen dieser Arbeit eine Beteiligung der $G_{i/o}$ Proteine an der $G_{q/11}$ -abhängigen Signalkaskade des M1-Rezeptors untersucht werden.

Auch die Adenylylzyklasen (ACs), welche Schlüsselenzyme in der G_s - und $G_{i/o}$ -abhängigen Signaltransduktion sind, können auf vielfältige Weise moduliert werden und stellen ebenfalls eine potentielle Zielstruktur für einen „Cross-talk“ dar. Neben diesen beiden G Protein-Klassen können sowohl $\beta\gamma$ -Untereinheiten verschiedener G Proteine als auch Ca^{2+} , welches in Folge einer $G_{q/11}$ Protein-Aktivierung freigesetzt wird, einen Effekt auf ACs ausüben (z.B. Hanoune et al., 1997). Im Rahmen dieser Arbeit sollte getestet werden, ob die Signalkaskade des muskarinischen M1-Rezeptors einem solchen „Cross-talk“ unterliegt. Der Einsatz verschiedener G Protein-Inhibitoren (PTX und FR) bzw. Aktivatoren (CTX) sollte Aufschluss über den Mechanismus der cAMP-Synthese in CHO-M1 Zellen geben. Mithilfe des Ca^{2+} Chelators BAPTA-AM sollte intrazelluläres Ca^{2+} abgefangen werden, um so eine mögliche Beteiligung $G_{q/11}$ -abhängiger Signalwege an der Modulation von Adenylylzyklasen zu detektieren.

Mithilfe der spezifischen G Protein-Inhibitoren PTX und FR zur Ausschaltung des $G_{i/o}$ - bzw. des $G_{q/11}$ -Signalweges und des G_s Protein-Aktivators CTX zur Maskierung einer Agonist-vermittelten G_s Protein-Aktivierung, sollten im Rahmen dieser Arbeit tiefergreifende Einblicke in die Signalkaskade des primär $G_{q/11}$ -gekoppelten M1-Rezeptors gewonnen werden.

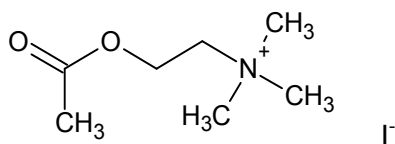
2 Material

2.1 Eingesetzte Verbindungen

Die eingesetzten Substanzen wurden entweder käuflich erworben oder synthetisiert und zur Verfügung gestellt von den Arbeitskreisen um Frau Professor Dr. U. Holzgrabe (AK Holzgrabe), Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg, sowie Herrn Professor Dr. M. De Amici (AK De Amici) vom Pharmazeutischen Institut der Universität Mailand.

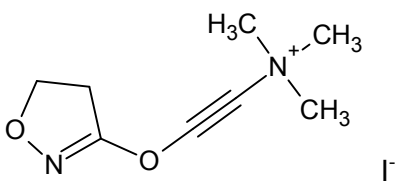
2.1.1 Orthosterische Agonisten an muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren

Acetylcholiniodid (ACh)



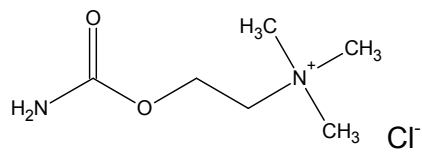
M_R : 273,11 g/mol
Artikelnummer: A7000
Hersteller: Sigma Aldrich

Iperoxoiodid



M_R : 324,16 g/mol
AK Holzgrabe/ AK De Amici

Carbamoylcholinchlorid (Carbachol)



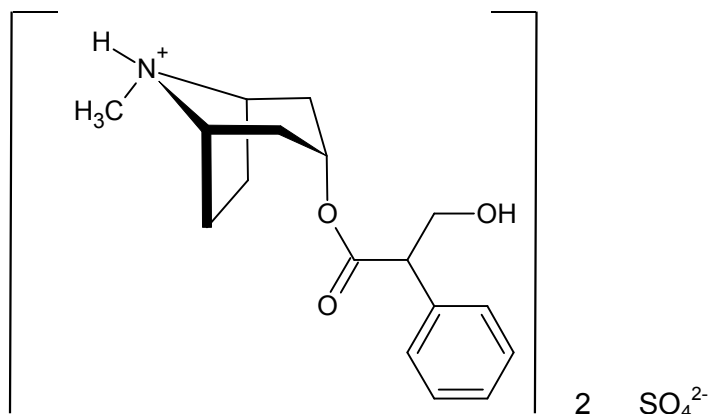
M_R : 182,65 g/mol

Artikelnummer: C4382-1G

Hersteller: Sigma Aldrich

2.1.2 Orthosterische Antagonisten an muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren und Inverse Agonisten

Atropinsulfat

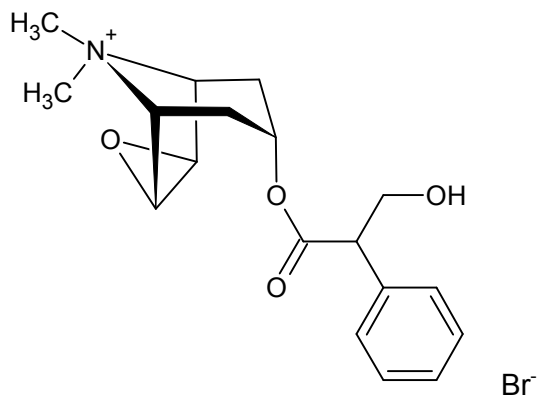


M_R : 676,8 g/mol

Artikelnummer: A0257

Hersteller: Sigma Aldrich

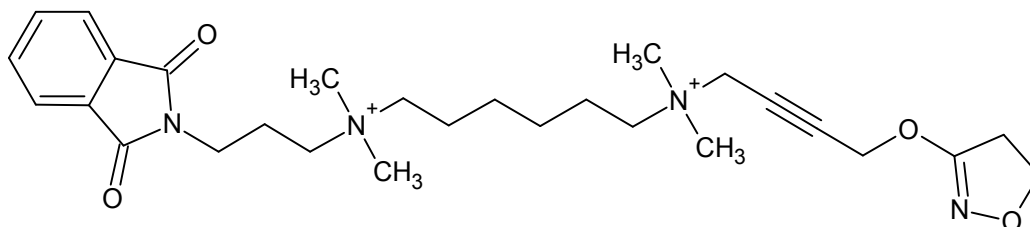
N-Methylscopolaminbromid (NMS)



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

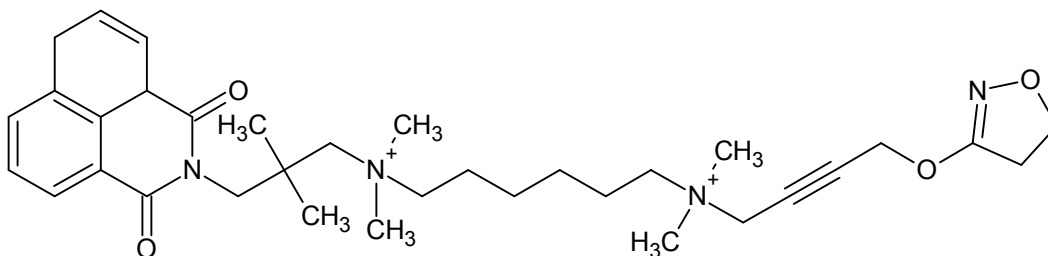
2.1.3 Dualsterische Hybridliganden

Iper-6-phth



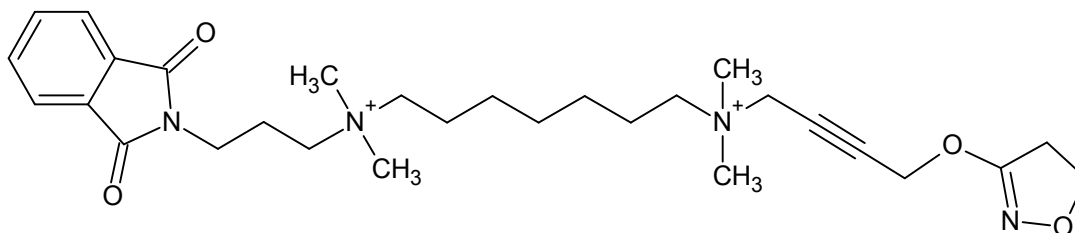
M_R : 658,46 g/mol
AK Holzgrabe/ AK De Amici

Iper-6-naph



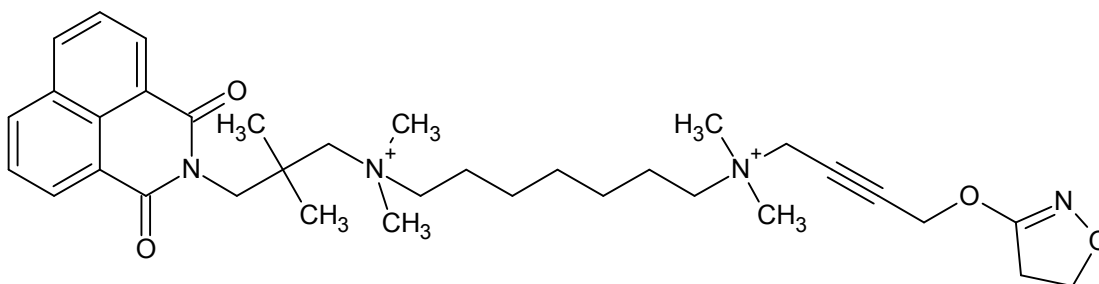
M_R : 736,58 g/mol
AK Holzgrabe/ AK De Amici

Iper-7-phth



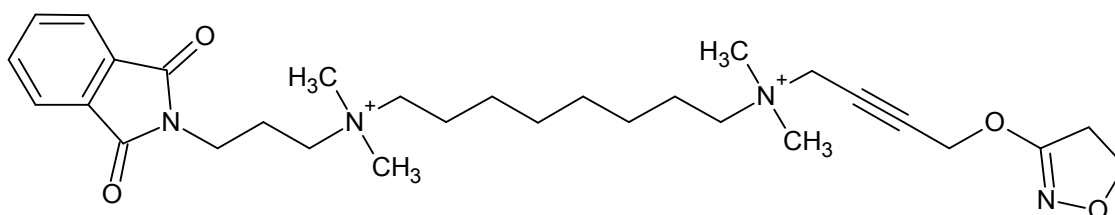
M_R: 672,49 g/mol
AK De Amici

Iper-7-naph



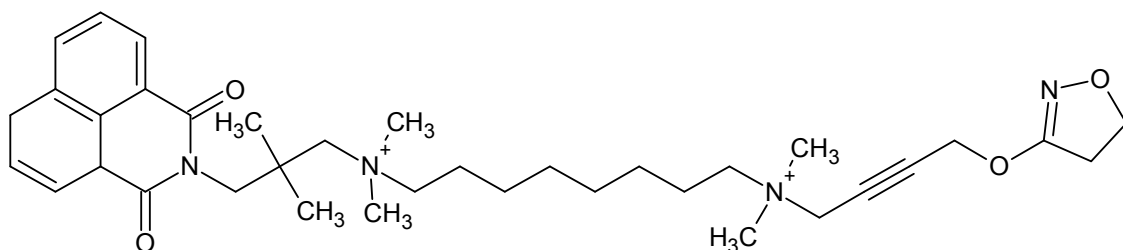
M_R: 750,61 g/mol
AK De Amici

Iper-8-phth



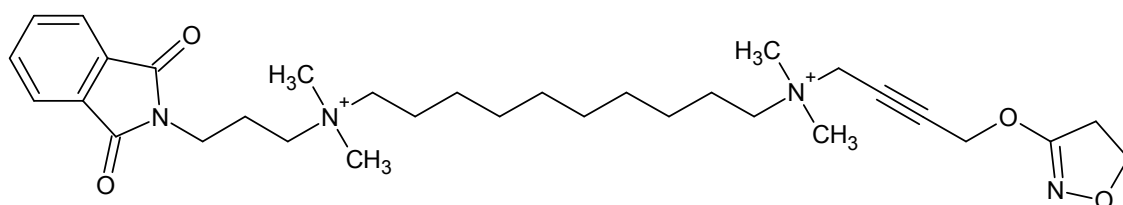
M_R: 686,52 g/mol
AK Holzgrabe/ AK De Amici

Iper-8-naph



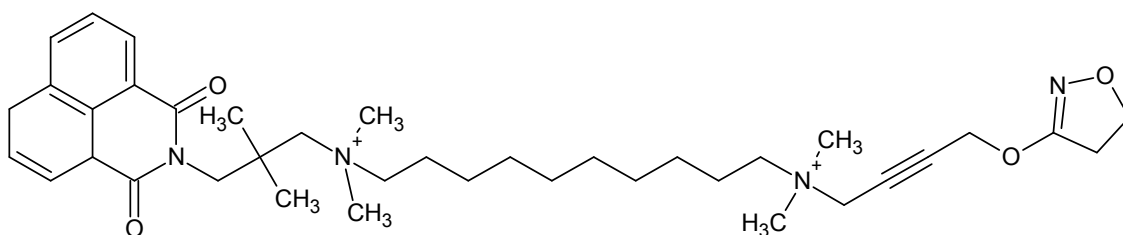
M_R: 764,63 g/mol
AK Holzgrabe/ AK De Amici

Iper-10-phth



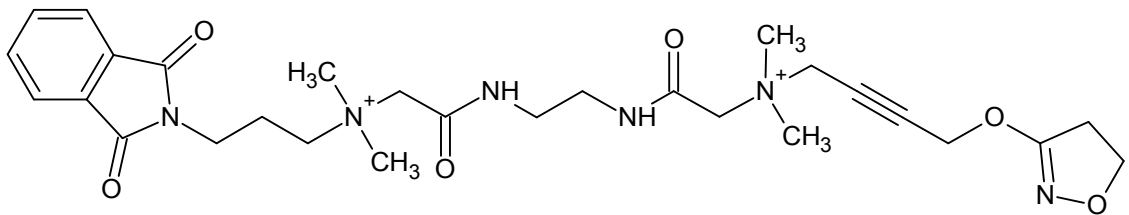
M_R: 714,57 g/mol
AK Holzgrabe/ AK De Amici

Iper-10-naph



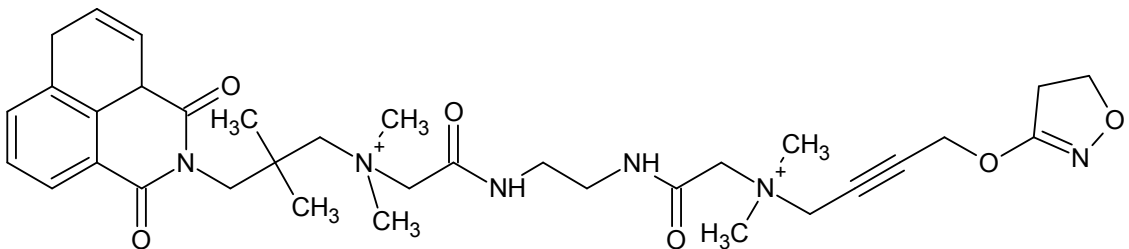
M_R: 792,68 g/mol
AK Holzgrabe/ AK De Amici

Iper-fri-phth



M_R: 627,56 g/mol
AK De Amici

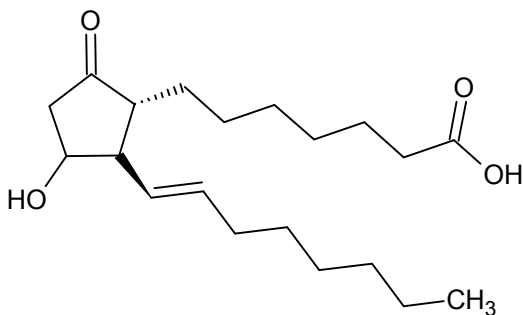
Iper-fri-naph



M_R: 705,67 g/mol
AK De Amici

2.1.4 Orthosterische Agonisten an Prostaglandin-Rezeptoren

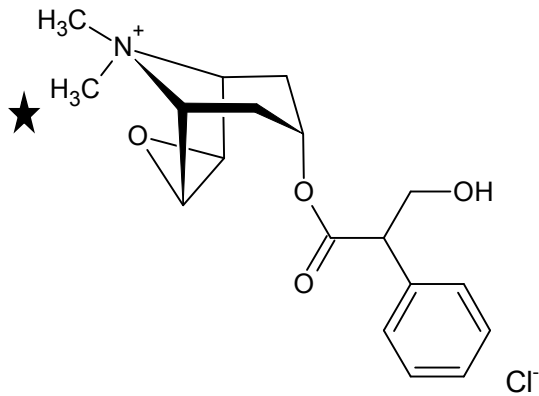
Prostaglandin E₁ (PGE₁)



M_R: 354,5 g/mol
Atrikelnummer: 13010
Hersteller: Cayman Chemical

2.1.5 Radioliganden

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



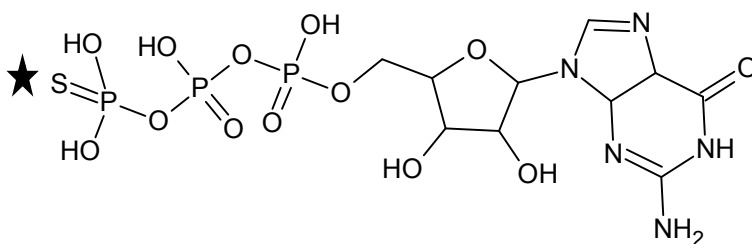
M_R: 398,39 g/mol

Artikelnummer: NET636001MC

Hersteller: Perkin Elmer, Deutschland

Der Stern (*) kennzeichnet die Position, an dem Wasserstoff gegen Tritium ausgetauscht worden ist.

[³⁵S]GTPγS



M_R: 539,2 g/mol

Artikelnummer: NEG030H250UC

Hersteller: Perkin Elmer, Deutschland

Der Stern (*) kennzeichnet die Position, an dem ein Sauerstoffatom gegen radioaktiv-markierten Schwefel (³⁵S) ausgetauscht worden ist.

2.2 Reagenzien

	Bezeichnung	Artikel-Nr.	Hersteller
R1	Aluminiumchlorid, $\geq 98\%$, wasserfrei, sublimiert	CN86.1	Carl Roth
R2	Aqua destillata (Herstellung mittels Elix®- Wasseraufbereitung)		Milli
R3	Aqua pro analysi (Herstellung mittels Milli-Q®- Wasseraufbereitung)		Milli
R4	Cholera Toxin (CTX)	P7208	Sigma
R5	Dimethylsulfoxid (DMSO)	D-5879	Sigma
R6	Dulbecco's modified Eagle's Nährmedium, high glucose (DMEM)	41966029	ThermoFisher
R7	Dulbeccos's phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	P04-36500	PAN Biotech
R8	Emulsifier Safe™ (Szintillationscocktail)	6013389	PerkinElmer
R9	Ethylendiaminotetraessigsäure- Dinatriumsalz (EDTA), Maßlösung, 100 mM	20271	Grüss
R10	Fetales Kälberserum	P30-3702	Sigma
R11	Folin-Ciocalteus Phenolreagenz	1.09001.0500	Merck
R12	Forskolin	A2165	AppliChem
R13	FR900359		(zur Verfügung gestellt von Prof. König/Prof. Kostenis, Institut für Pharm. Biologie, Bonn)
R14	L-Glutaminlösung (200 mM)	G7513	Sigma
R15	Guanosin-5'-diphosphat-Natrium (GDP)	G7127	Sigma
R16	G418-Disulfat	ant-gn	Invi
R17	Hanks' balanced salt solution (HBSS)	14025-050	Invi
R18	HEPES-Natriumsalz	A1040,0100	AppliChem
R19	HEPES, freie Säure	A1069,0250	AppliChem
R20	HEPES, wässrige Pufferlösung, 1M	15630-056	Invi
R21	HTRF®-cAMP dynamic 2-kit	62AM4PEC	Cisbio
R22	HTRF®-IP-One Tb-kit	62IPAPEX	Cisbio
R23	HTRF®-phospho ERK 1/2 (Thr202/Tyr204)	64ERKPEH	Cisbio
R24	Humanes Serumalbumin	A1653	Sigma
R25	3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX)	I5879	Sigma
R26	Isopropanol 100%		ZVE
R27	Kaliumdihydrogenphosphat	30407	Sigma
R28	Kalium-Natriumtartrat-Tetrahydrat ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \times 4\text{H}_2\text{O}$)	B6916	Sigma
R29	Kupfersulfat-Pentahydrat ($\text{CuSO}_4 \times$ $5 \text{H}_2\text{O}$)	1.02790.0250	Merck
R30	Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$)	31413	RdH

2 Material

R31	Natriumbutyrat	A11079	Alfa Aesar
R32	Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃), wasserfrei	A3900,0500	AppliChem
R33	Natriumchlorid (NaCl)	1.06404.1000	Merck
R34	Natriumfluorid, 99,995%	4503.1	Carl Roth
R35	Natronlauge 0,1 M (NaOH)	35263	Fluka
R36	Natronlauge 1 M (NaOH)	35256	Fluka
R37	Nutrient mixture F-12 Ham	N-4888	Sigma
R38	Penicillin-Streptomycin-Lösung (PenStrep) (Penicillin 10.000 U/ml, Streptomycin 10mg/ml)	P-0781	Sigma
R39	Pertussis Toxin (PTX)	BP0372	Biotrend
R40	Polyethylenimin, 50%, wässrige Lösung (PEI)	P-3143	Sigma
R41	Salzsäure 1N (HCl)	23204	Grüss
R42	ThermoClean Blau	002522-0100	Bioanalytic
R43	Trypsin-EDTA-Lösung	T-3924	Sigma

2.3 Lösungen

- L1 **Albuminlösung 2mg/ml**
30 mg humanes Serumalbumin (R24)
15ml HEPES-Puffer (L8)
- L2 **Aluminiumchloridlösung 2,4 mM in Inkubationspuffer für DMR-Messungen (L13)**
0,00032 g Aluminiumchlorid (R1)
1 ml Inkubationspuffer für DMR-Messungen (L13)
- L3 **Aluminiumchloridlösung 2,4 mM in Inkubationspuffer für IP1-Messungen**
0,00032 g Aluminiumchlorid (R1)
1 ml einfach-konzentrierter Stimulationspuffer (R22)
- L4 **Aluminiumfluoridlösung 1,2 mM in Inkubationspuffer (L13/R22)**
1 Teil Aluminiumchloridlösung 2,4 mM (L2/L3)
1 Teil Natriumfluoridlösung 80 mM (L24)
- L5 **Arbeitslösung für die Proteinbestimmung nach Lowry**
100 Teile 2%-ige Natriumcarbonatlösung in 0,1 N Natronlauge (L23)
1 Teil 2%-ige, wässrige Kalium-Natriumtartratlösung (L16)
1 Teil 1%-ige, wässrige Kupfersulfatlösung (L17)
- L6 **Farblösung für die Proteinbestimmung nach Lowry**
1 Teil Folin-Ciocalteaus Phenolreagenz (R11)
4 Teile Aqua destillata (R2)
-

- L7 **GDP-Stammlösung (10 mM)**
4,65 mg GDP-Natrium (R15)
1 ml Aqua destillata (R2)
Aliquota von 50 µl werden bei -20° C gelagert.
- L8 **HEPES-Puffer (12,5mM)**
1,085 g HEPES-Natriumsalz (R18)
1,986 g HEPES-Säure (R19)
2,541 g Magnesiumchlorid-Hexahydrat (R30)
7,305 g Natriumchlorid (R33)
ad 1000 ml Aqua destillata (R2)
Zur Adjustierung des pH-Wertes auf 7,4 wird NaOH 1M (R36) verwendet.
- L9 **HEPES-Stammlösung (200 mM)**
17,353 g HEPES-Natriumsalz (R18)
31,773 g HEPES-Säure (R19)
ad 1000 ml Aqua destillata (R2)
Zur Adjustierung des pH-Wertes auf 7,4 wird NaOH 1M (R36) verwendet.
- L10 **Homogenisationspuffer**
50 ml HEPES-Stammlösung (200 mM) (L9)
50 ml Na₂-EDTA (100 mM) (R9)
400 ml Aqua destillata (R2)
Der Puffer wird bei 2-8° C gelagert.
- L11 **IBMX-Stammlösung (1M)**
2,1 mg IBMX (R25)
9,45 µl DMSO (R5)
- L12 **Inkubationspuffer für cAMP-Messungen**
2 µl IBMX-Stammlösung (L11)
1,998 ml Inkubationspuffer für DMR-Messungen (L13)
- L13 **Inkubationspuffer für DMR-Messungen**
10 ml HEPES-Lösung (R20)
490 ml HBSS-Puffer (R17)
Dieser Puffer wird unter einer sterilen Werkbank hergestellt.
- L14 **Inkubationspuffer für IP1-Messungen**
1 Teil Stimulationspuffer (5-fach) (R22)
4 Teile Aqua destillata (R2)
- L15 **Kaliumdihydrogenphosphat-Stammlösung (0,5M)**
68 g Kaliumdihydrogenphosphat (R27)
1000 ml Aqua destillata (R2)
- L16 **Kalium-Natriumtartrat-Lösung 2%**
2 g Kalium-Natriumtartrat-Tetrahydrat (R28)
100 ml Aqua destillata (R2)
Die Lösung wird bei Raumtemperatur gelagert.
-

- L17 **Kupfer(II)sulfat-Lösung 1%**
1 g Kupfersulfat-Pentahydrat (R29)
100 ml Aqua destillata (R2)
Die Lösung wird bei Raumtemperatur gelagert.
- L18 **Nährmedium für CHO-Zellen aus Frankfurt (M1-M5 wt)** (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. G. Lamprecht von der Abteilung Pharmakologie des Biozentrums Niederursel, Universität Frankfurt am Main)
Zu einer Flasche (500 ml) Nährmedium F-12 (R37) wurde Folgendes ergänzt:

50 ml Fetales Kälberserum (R10)
5 ml Penicillin-Streptomycin-Lösung (R38)
3 ml L-Glutamin Lösung (200 mM) (R14)
1 ml G418 Stammlösung (100mg/ml) (R16)
- L19 **Nährmedium für CHO-K1-Zellen** (zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. M. Eckhardt von dem Institut für Physiologische Chemie der Universität Bonn)
Zu einer Flasche (500 ml) Nährmedium F-12 (R37) wurde Folgendes ergänzt:

50 ml Fetales Kälberserum (R10)
5 ml Penicillin-Streptomycin-Lösung (R38)
3 ml L-Glutamin Lösung (200 mM) (R14)
- L20 **Nährmedium für HEK 293 Zellen**
Zu einer Flasche (500 ml) Dulbecco's Modified Eagle's Medium, high glucose (DMEM) (R6) wurde Folgendes ergänzt:

50 ml Fetales Kälberserum (R10)
5 ml Penicillin-Streptomycin-Lösung (R38)
- L21 **Natriumbutyrythaltiges-Nährmedium für CHO Zellen aus Frankfurt**
18 ml Natriumbutyrat-Stammlösung (L22)
500 ml Nährmedium für CHO-Zellen (R37)
50 ml Fetales Kälberserum (R10)
5 ml Penicillin-Streptomycin-Lösung (R38)
3 ml L-Glutamin-Lösung (R14)
1 ml G418-Stammlösung (R16)
Natriumbutyrat wird in das Nährmedium steril filtriert.
- L22 **Natriumbutyrat-Stammlösung (100 mM)**
1,101 g Natriumbutyrat (R31)
100 ml Aqua destillata (R2)
- L23 **Natriumcarbonat-Lösung 2%**
2 g Natriumcarbonat (R32)
10 ml Aqua destillata (R2)
Bei jeder Proteinbestimmung ist diese Lösung frisch herzustellen.
- L24 **Natriumfluoridlösung 80 mM**
3,36 mg Natriumfluorid (R34)
1 ml Inkubationspuffer (L13/L14)
-

2 Material

- L25 **Polyethylenimin-Stammlösung 1 % (PEI)**
10 g PEI-Lösung 50% (R40)
ad 500 ml Aqua destillata (R2)
Diese Lösung wird bei 2-8° C gelagert
- L26 **Polyethylenimin-Lösung 0,1 % (PEI)**
50 ml PEI-Stammlösung (L25)
ad 500 ml Aqua destillata (R2)
Diese Lösung wird bei 2-8° C gelagert
- L27 **Zentrifugationspuffer**
50 ml HEPES-Stammlösung, 200 mM (L9)
0,5 ml Natrium-EDTA-Lösung, 100 mM (R9)
ad 500 ml Aqua destillata (R2)

2.4 Verbrauchsmaterialien

	Bezeichnung	Artikel-Nr.	Hersteller
V1	Aluminiumfolie Ja!		Rewe
V2	Cell Assay Plate, 384 Well	5040	Corning
V3	Cellstar®, Cell culture dishes, 145 x 20 mm (Gewebekulturschalen, steril)	639160	Greiner
V4	Cellstar®, Tubes 50 ml	227261	Greiner
V5	Finntip Stepper 0,5; 1,25; 2,5; 5,0; 12,5	9404170; 9404180 9404190; 9404200; 9404210	ThermoForma
V6	Injekt® 5 ml, Luer Solo	4606051V	B.Braun
V7	MultiLex™ A, 73 x 109 mm	1450-441	PerkinElmer
V8	Mikrotiterplatte, 384 Well	788093	Greiner
V9	Nalgene® System 100™ Cryogenic Tubes	5000-1012	ThermoFisher
V10	Parafilm® M Laboratory Film	PM-996	Brand
V11	Pipettenspitzen 0,5-5 ml	702600	Brand
V12	PP-Reaktionsgefäße Safe-lock 1,5 ml	0030 120.086	Epp
V13	Printed Filtermat A, 90 x 120 mm	1450-421	PerkinElmer
V14	Qualilab® Spritzenvorsatzfilter, 0,22 µm, CM-Membran, steril	5122110	Merck Lab
V15	Reaction tubes, 1,5 ml	616 201	Greiner
V16	Sample Bag for MicroBeta™	1450-432	PerkinElmer
V17	Szintillationsgefäß 20 ml	73.662.500	Sarstedt (D)
V18	Serologische Pipette 25 ml; 10 ml; 5 ml	86.1685.001; 86.1254.001; 86.1253.001	Sarstedt (D)
V19	Sterican® Einmalkanüle zur intramuskulären Injektion (0,9 x 70 mm)	4665791	B.Braun

2 Material

V20	Storage Plate, 384 Well „Source Plate“	3657	Corning
V21	Storage Plate, 96 Well, 1,2 ml	12114172	Fisher
V22	Tissue Culture Flask, 75 cm ²	83.1813.002	Sarstedt (US)
V23	Whatman™ Filter Unit 0,2 µM	10 462 200	GE
V24	Zellschaber 25 cm	83.1830	Sarstedt (US)
V25	Zellkulturplatten, 96 Well	CLS3595-50EA	Corning
V26	Zentrifugenröhrchen, Polycarbonat (PC), 50 ml	3138-0050	Nalgene
V27	1000 µl Blue, Graduated Tip	S1111-2021	Starlab
V28	200 µl Yellow, Bevelled Tip	S1111-1006	Starlab

2.5 Geräte und Apparaturen

	Bezeichnung	Hersteller
G1	Absaugvorrichtung, achtarmig	FM
G2	AccuJet®	Brand
G3	Analysenwaage AG 204	Mettler
G4	Avanti® J-20XP Ultrazentrifuge (Rotoren: JA 25.50; JS 4.3; JS 5.3)	Beckman
G5	Axiovert 25 Mikroskop	Zeiss
G6	Beckmann Coulter LS-6000 SC	Beckman
G7	CyBi® Selma Seriennummer 307001 16 2002	CyBio
G8	Dri-Block® DB2A	Tech
G9	Eismaschine AF-100	Scotsman
G10	Elix® Wasseraufbereiter	Millipore
G11	EPIC® BT ALPHA 157700 Seriennummer 252787	Corning
G12	Eppendorf Pipette (0,1-1 µl)	Eppendorf
G13	Eppendorf Tischzentrifuge	Eppendorf
G14	Finnpipette Stepper	ThermoForma
G15	Finnpipette 4500(1-5 ml; 200-1000 µl; 20-200 µl; 5-50 µl; 1-10 µl; 0,2-2 µl)	ThermoForma
G16	Finnpipette (20-200 µl, 8-Kanal)	ThermoForma
G17	Gefrierschrank -86° C ULT	ThermoFisher
G18	Harvester 96® (Mach III M, Tomtec, Nummer 963589) automat. Filtrationseinheit	PerkinElmer
G19	Harvester 96® (Mach III M, Tomtec, Nummer 990607010) manuelle Filtrationseinheit	PerkinElmer
G20	Heraeus-Brutschrank, B6060	Kendro
G21	Herasafe Werkbank HS15, Klasse II	Heraeus
G22	Inkubationswasserbad GFL 1083	GFL
G23	Inkubator für CyBi® Selma (G7): IN 160	Memmert
G24	Inkubator für EPIC® BT ALPHA (G10): IPP 110	Memmert
G25	Mikrowelle NN-E205W EPG	Panasonic
G26	Milli-Q® Reinstwasseraufbereitung	Millipore
G27	Mithras LB 960	Berthold
G28	Mr Frosty 5100 Cryo 1° C Freezing Container	Nalgene
G29	Neubauer Zählkammer	VWR
G30	pH-Elektrode SenTix 41	WTW

2 Material

G31	pH-Meter, pH 523	WTW
G32	Polytron-Homogenisator pT 10-35	Kinematica
G33	Präzisionsküvetten 100-QS	Hellma
G34	Präzisionswaage PB403-S	Mettler
G35	Schüttelwasserbad GFL 1083	GFL
G36	Stickstofftank LS4800 mit Flüssigstickstoff- Lager- und Transportbehälter XL-100	Taylor-Wharton
G37	Thermo Forma Series II Water Jacketed CO ₂ -Inkubator	ThermoForma
G38	Trockenschrank UM500	Memmert
G39	Ultrospec 3300 pro (UV-VIS-Spektrometer)	Bio
G40	Vakuumpumpe RE16/ 1023-703Q-ER56X	vacuubrand/ GastManu
G41	Varioklav Dampfsterilisator Typ 135 S	H+P
G42	Variomag Magnetrührer	H+P
G43	Vortex Genie 2®, G-560 E	Sci
G44	Wasserbad Julabo TW12 (beheizbar)	Julabo
G45	1450-Microbeta® Trilux Liquid Scintillation & Luminescence Counter	PerkinElmer

2.6 Herstellerfirmen

Kürzel	Anschrift
ACD/Labs	Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Kanada
Acros	Acros Organics, Geel, Belgien
App Bio	Applied Biosystems, Applera GmbH, Darmstadt, Deutschland
AppliChem	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
B. Braun	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
BeckC	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Beckl	Beckman Industries, Palo Alto, Kalifornien, USA
Berthold	Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Deutschland
Bioanalytic	Bioanalytic GmbH, Umkirch/Freiburg, Deutschland
Bio	Biochrom Ltd., Cambridge, UK
Biotrend	Biotrend Chemicals AG, Wangen, Schweiz
Brand	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Carl Roth	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Cayman Chemical	Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA
Corning	Corning Inc., New York, USA
Corning Life Science	Corning Life Science, Tewksbury, Massachusetts, USA
Cisbio	Cisbio Bioassays, Codolet, Frankreich
CyBio	CyBio AG, Jena, Deutschland
Eppendorf	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Fisher	Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Fluka	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
FM	Feinmechanische Werkstatt der Universität Bonn, Deutschland
GastManu	Gast Manufacturing Inc., Benton Harbor, USA
GE	GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK
GFL	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
GraphPad	GraphPad Software Incorporated, San Diego, Kalifornien, USA

2 Material

Greiner	Greiner-Bio-One, Solingen, Deutschland
Grüss	Grüssing Diagnostika Analytika, Filsum, Deutschland
H+P	H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim, Deutschland
Hellma	Hellma GmbH & Co. KG, Mühlheim, Deutschland
Heraeus	Heraeus, Hilden, Deutschland
Invi	Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, USA
Julabo	Julabo Labortechnik, Seelbach, Deutschland
Kendro	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland
Kinematika	Kinematika AG, Littau-Luzern, Schweiz
Memmert	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Merck	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Merck Lab	Merck Labor und Chemie Vertrieb GmbH, Bruchsal, Deutschland
Mettler	Mettler-Toledo GmbH, Giessen, Deutschland
Microsoft	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
Milli	Millipore, Schwabach, Deutschland
Nalgene	Nalgene Company (Sybron Corporation), Rochester, New York, USA
Panasonic	Panasonic Europe GmbH, Hamburg, Deutschland
PerkinElmer	Perkin Elmer Life Sciences GmbH, Rodgau-Jügesheim, Deutschland Perkin Elmer Inc., Waltham, Massachusetts, USA
RdH	Riedel-de-Häen, Laborchemikalien GmbH & Co. KG, Seelze, Deutschland
Rewe	Rewe-Markt, Bonn, Deutschland
Sarstedt	Sarstedt AG Co., Nümbrecht, Deutschland Sarstedt Inc., Newton, North Carolina, USA
Sci	Scientific Industries Inc., Bohemia, New York, USA
Scotsman	Scotsman Ice Systems, Bettolino di Pogliano, Mailand, Italien
Sigma	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Starlab	STARLAB GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Taylor-Wharton	Taylor-Wharton Harsco GmbH, Husum, Deutschland
Techne	Techne AG, Jahnsdorf, Deutschland
ThermoFisher	ThermoFisher Scientific, Marietta, Ohio, USA ThermoFisher Scientific Oy, Vantaa, Finnland
ThermoForma	ThermoForma SCIENTIFIC, Marietta, Ohio, USA
vacuubrand	vacuubrand GmbH & Co. G, Wertheim, Deutschland
VWR	VWR International, Langenfeld, Deutschland
Whatman	Whatman GmbH, Dassel, Deutschland
WTW	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland
Zeiss	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
ZVE	Zentrale Chemikalienversorgung Eendenich, Bonn, D

2.7 Computerprogramme

	Bezeichnung	Hersteller
P1	ChemSketch®	ACD/Labs
P2	Citavi® 5	Swiss Academic Software GmbH
P3	GraphPad Prism® 5.03	GraphPad
P4	Microsoft® Office Excel 2010	Microsoft
P5	Microsoft® Office Power Point 2010	Microsoft
P6	Microsoft® Office Word 2010	Microsoft

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Arbeiten

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten zellbiologischen Arbeiten erfolgten an CHO-Zellen, welche stabil mit humaner cDNA des muskarinischen Acetylcholin-Rezeptors vom Subtyp 1 (CHO-M1) transfiziert worden sind. Die Zellen wurden dankenswerterweise von Prof. Dr. G. Lamprecht von der Abteilung Pharmakologie des Biozentrums Niederursel, Universität Frankfurt am Main, zur Verfügung gestellt. CHO-Zellen stammen aus dem Ovarialgewebe des Chinesischen Seidenhamsters (*Cricetulus griseus*) und werden deshalb als Chinese Hamster ovarial cells oder kurz CHO-cells/ CHO-Zellen bezeichnet. Diese Zellen exprimieren selbst weder muskarinische Rezeptoren (Dissertation Eckstein, 2004) noch Cholinesterasen (Lazareno und Birdsall, 1993), weshalb sie sich besonders gut eignen, um nach erfolgter Transfektion mit dem humanen muskarinischen Acetylcholin-Rezeptor vom Subtyp 1 (M1 mAChR) spezifische Effekte dieses Rezeptor-Subtyps zu untersuchen (Lazareno und Birdsall, 1993). Zudem verfügen diese CHO-Zellen über ein sogenanntes „neo“-Reportergen als dominanten Selektionsmarker, welches für die Aminoglykosid-Phosphotransferase codiert. Aus diesem Grund können durch den Zusatz des zytotoxischen Aminoglykosidantibiotikums G418 (Geneticin) zum Nährmedium nur transfizierte Zellen überleben.

Um mögliche unspezifische Effekte durch die Testsubstanzen an CHO-Zellen zu detektieren, wurden neben den CHO-M1 Zellen auch untransfizierte Zellen (CHO-K1 Zellen) in einigen Versuchen verwendet. Diese Zellen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. M. Eckhardt von dem Institut für Physiologische Chemie der Universität Bonn zur Verfügung gestellt.

Des Weiteren wurden einige Versuche an untransfizierten HEK 293 Zellen durchgeführt. HEK 293 ist eine humane Zell-Linie, die aus dem Nierengewebe menschlicher Embryos isoliert worden ist (human emryonic kidney cells). Neben dem muskarinischen Acetylcholin-Rezeptor vom Subtyp 3 werden auch Prostaglandin-Rezeptoren in dieser Zell-Linie endogen exprimiert. Zudem werden auch noch weitere Rezeptoren in HEK 293 Zellen exprimiert, die aber in der vorliegenden Arbeit nicht zu untersuchen waren.

3.1.1 Zellkultur

Alle Arbeiten mit lebenden CHO-Zellen wurden unter aseptischen Bedingungen unter einer Werkbank mit laminarem Luftstrom durchgeführt. Zwischen den Arbeitsschritten wurden die

Zellen in Zellkulturschalen im Brutschrank bei 37° C, 5% CO₂- Begasung und 96% relativer Luftfeuchtigkeit im entsprechenden Nährmedium inkubiert. In Kultur wachsen diese Zellen einschichtig. Sobald die Zellen eine Konfluenz von 90-95% erreicht hatten, wurden sie im Verhältnis von 1:8 bis 1:10 auf neue Zellkulturschalen überführt. Dies geschah in der Regel alle 2-3 Tage. Als Nährmedium wurde Nutrient mixture F-12 Ham unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (FKS, R10), 1% eines Gemisches aus Penicillin und Streptomycin (PenStrep, R38), 1mM Glutamin (R14) und 0,2 mg/ml des Antibiotikums G418 (R16) verwendet. Für die nachfolgende Passagierung der Zellen wurde zunächst das Nährmedium abgesaugt und der Zellrasen mit warmem DPBS-Puffer (R7) gewaschen. Nach der Zugabe von 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung (R43) und zwei-minütiger Inkubation bei 37° C im Brutschrank konnte man die Zellen durch saches Klopfen an die Zellkulturschale leicht ablösen. Sobald sich die Zellen vollständig von der Zellkulturschale gelöst hatten, wurden 8 ml des erwärmten Nährmediums (L18) hinzugegeben und die Zellsuspension im oben beschriebenen Verhältnis auf neue Zellkulturschalen (V3) überführt, in denen bereits 18 ml des Nährmediums vorgelegt worden waren. Durch leichtes Schwenken der Zellkulturschalen erreichte man eine gleichmäßige Verteilung der Zellen auf der gesamten Platte. Danach wurden die Zellen bis zur nächsten Passagierung im Brutschrank inkubiert.

Die Kultivierung von CHO-K1- und HEK 293-Zellen erfolgte auf die gleiche Weise, allerdings wurden für diese beiden Zell-Linien andere Nährmedien verwendet. CHO-K1 Zellen verfügen nicht über eine G418-Resistenz, dem F-12 Ham Medium wurde dementsprechend nur 10 % fetales Kälberserum (R10), 1 % eines Gemisches an Penicillin und Streptomycin (R38) und 1 mM Glutamin (R14) und kein G418 zugesetzt (L19). Zur Kultivierung von HEK 293 Zellen wurde Dulbecco's modified Eagle's Medium (4,5 g/l Glucose) unter Zusatz von 10 % FKS (R10) und 1 % PenStrep (R38) verwendet (L20).

3.1.2 Auftauen von Zellen

Die dauerhafte Lagerung der Zellen findet bei -196° C im Stickstofftank statt. Zur Kultivierung der CHO-Zellen wurden 18 ml des erwärmten Nährmediums in einer Zellkulturschale vorgelegt. Die Einfriergefäße (V9) mit der DMSO-haltigen Zellsuspension wurden aus dem Stickstofftank genommen und durch Reiben zwischen den Händen schnellstmöglich aufgetaut, damit die Zellen nicht durch das zelltoxische DMSO (R5) beschädigt worden wären. Die aufgetaute Zellsuspension wurde tröpfchenweise auf das Nährmedium in der Zellkulturschale gegeben. Nach sechs bis acht stündiger Inkubation im Brutschrank hafteten die Zellen bereits an der Zellkulturschale und es erfolgte ein Medienwechsel.

3.1.3 Einfrieren von Zellen

Ähnlich wie unter Kultivierung der Zellen beschrieben, wurde auch bei diesem Arbeitsschritt das Nährmedium einer konfluent bewachsenen Zellkulturschale abgesaugt und der Zellrasen mit 10 ml warmem DPBS-Puffer (R7) gewaschen. Durch Trypsinierung und kurzer Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen von der Platte abgelöst und mit 8 ml Nährmedium auf ein Endvolumen von 10 ml gebracht. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 900 rpm (rounds per minute/ Umdrehungen pro Minute) bei Raumtemperatur vier Minuten zentrifugiert (Rotor JS 4.3, G4). Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das verbliebene Zellpellet mit 900 µl Nährmedium resuspendiert und in ein Einfriergefäß (V9) überführt, in dem bereits 100 µl DMSO (R5) vorgelegt worden waren. Der Zusatz von 10% DMSO verhindert die Bildung von Eiskristallen, welche die Zellen während des Einfrierens beschädigen würden.

Das Einfriergefäß wurde zunächst in einem Einfrierbehälter (Mister Frosty[®], G28), der 250 ml reinen Isopropanol (R26) enthält, für drei Tage bei -80° C gelagert, bevor es dann zur dauerhaften Lagerung in den Stickstofftank überführt worden ist. Der Einfrierbehälter dient der schonenden Einfrierung, indem die Zellsuspension mit einer kontinuierlichen Einfrierrate von 1° C pro Minute runtergekühlt wird.

3.2 Herstellung von Membranhomogenaten

Die in den Kapiteln 3.4.3 bis 3.4.5 und 3.5.4 beschriebenen Radioligand-Bindungsversuche wurden ausschließlich an Zellhomogenaten durchgeführt. Zunächst wurden dafür Membranpräparationen der entsprechenden Zell-Linien durchgeführt. Die gewünschte Zell-Linie, in dieser Arbeit die CHO-M1 Zellen, wurde bis zur Konfluenz von, in der Regel, vierzig Platten vermehrt. Am Tag vor der Membranpräparation wurde das Nährmedium abgesaugt und die Zellen für 16 Stunden mit natriumbutyryrathaltigem (5mM) Nährmedium kultiviert. Natriumbutyryrat (R31) dient dazu die Expressionsrate der Rezeptoren durch eine Steigerung der Proteinbiosynthese zu erhöhen (Kruh, 1982). Teilungsprozesse der Zellen werden durch den Zusatz von Butyryrat jedoch gestoppt.

Am Tag der Membranpräparation wurde das Nährmedium abgesaugt und pro Schale 2,4 ml eiskalter Homogenisationspuffer (L10) auf den Zellrasen gegeben, welcher dann mit Zellschabern (V24) abgelöst worden ist. Die Zellsuspension wurde anschließend in Zentrifugenröhrchen (V26) überführt und auf Eis gelagert. Jeweils fünf Zellkulturschalen wurden mit 6 ml Homogenisationspuffer erneut gespült und die Zellsuspension in den

Zentrifugenröhrchen vereinigt. Die Zellsuspension wurde zweimal für 25 Sekunden auf Stufe 6 mithilfe eines Polytron-Homogenisators (G32) homogenisiert. Zwischen den Homogenisationsschritten wurde die Zellsuspension auf Eis gelagert, um der Wärmeentwicklung, die durch das Homogenisieren entsteht, entgegenzuwirken.

Das Membranhomogenat wurde anschließend drei Mal bei 40.000 g und 4° C für zehn Minuten zentrifugiert (Rotor JA 25.50, G4). Zwischen den Zentrifugationsschritten wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 15 ml Zentrifugationspuffer (L27) resuspendiert und gewaschen.

Die nach der dritten Zentrifugation erhaltenen Zellpellets wurden in 40 ml HEPES-Puffer (L8) resuspendiert und Aliquota von 1 ml in Eppendorf-Gefäße (V15) überführt, die dann bei -80° C gelagert wurden.

3.3 Proteinbestimmung nach Lowry

Theoretische Grundlagen

Bevor das Membranhomogenat in Radioligandbindungsstudien und [³⁵S]GTPyS-Versuchen eingesetzt werden konnte, musste zunächst der Proteingehalt bestimmt werden. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach einer kolorimetrischen Messmethode nach Lowry et al. (1951). Der Proteingehalt wurde anschließend in Duplikaten UV/Vis-spektrometrisch bestimmt.

Das Prinzip beruht auf zwei aufeinanderfolgenden Reaktionen. Durch den Zusatz von Cu²⁺-Ionen in alkalischer Lösung kommt es im ersten Schritt zur Ausbildung von blau-violetten, quadratisch-planaren Komplexen zwischen den Peptidbindungen der Proteine und den Cu²⁺-Ionen. Diese Komplexbildung wird als Biuret-Reaktion bezeichnet. Der gebildete Komplex reduziert dann in einem zweiten Schritt, das hinzugegebene Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz (R11), eine Phosphomolybdat-Phosphowolframat-Verbindung. Dabei werden die Cu²⁺-Ionen des Kupfer-Protein-Komplexes zu Cu⁺ reduziert. Die resultierende Blaufärbung der Lösung korreliert mit der in der Lösung vorhandenen Proteinkonzentration und kann bei einer Wellenlänge von 500 nm UV/Vis-spektrometrisch erfasst werden.

Dem Lambert-Beerschen Gesetz folgend, ist die resultierende Lichtintensität nach Durchtritt durch die Testsubstanz proportional zu der Proteinkonzentration der Lösung. Die Extinktion ist abhängig von den absorbierenden Eigenschaften der Substanz, der Schichtdicke des Probengefäßes und der Substanzmenge. Die in der Lösung enthaltene Proteinkonzentration

kann durch die Eichkurve einer parallel vermessenen Serumalbuminlösung photometrisch bestimmt werden.

Versuchsdurchführung

Die kupferionenhaltige-Arbeitslösung (L5) wurde an jedem Versuchstag frisch hergestellt. Zur präziseren Bestimmung und um zu gewährleisten, dass sich Extinktionen im Bereich des Lambert-Beerschen Gesetzes ergeben, wurde das zu vermessende Membranhomogenat in den Verhältnissen 1:2; 1:4 und 1:8 mit Hepes-Puffer (L8) verdünnt. Als externer Standard wurde eine Eichreihe aus frisch hergestellter humaner Serumalbuminlösung (L1) parallel vermessen. Die Eichreihe bestand aus insgesamt sieben Verdünnungen, die einen Konzentrationsbereich von 0 bis 2 mg/ml abdeckten. 200 µl der Proben- und Vergleichslösungen wurden mit 2 ml Arbeitslösung versetzt und zehn Minuten unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden 200 µl Folin-Ciocalteaus Phenolreagenz (R11) unter Schütteln hinzugegeben und die Lösungen für weitere dreißig Minuten unter Lichtausschluss inkubiert. Die Lösungen wurden anschließend bei einer Wellenlänge von 500 nm UV/Vis-spektrometrisch vermessen.

Auswertung

Die Auswertung der Daten erfolgte computergestützt durch das Programm Microsoft® Office Excel 2010 (P4). Durch Auftragen der Proteinkonzentration der Serumalbuminlösung gegen die Extinktion, konnte man anschließend den Proteingehalt des Membranhomogenates bestimmen.

3.4 Radioligand-Bindungsversuche

Radioaktiv markierte Testsonden dienen der Untersuchung von Interaktionen zwischen Liganden und ihren Bindungsstellen im Rezeptor. Der Austausch eines Atoms gegen ein radioaktiv-markiertes Atom ändert nur die physikalischen Eigenschaften eines Moleküls, die chemischen Eigenschaften bleiben unverändert. In einem Experiment, in dem sowohl ein radioaktiv-markierter Ligand, als auch ein nicht radioaktiv-markierter Ligand um eine Bindungsstelle im Rezeptor konkurrieren, kommt es dem Massenwirkungsgesetz folgend zur Ausbildung von Radioligand-Rezeptor-Komplexen, dessen Quantität abhängig von den Affinitäten der beiden Kompetitoren ist (Bennet und Yamamura, 1985). Im Rahmen dieser

Arbeit wurde das Bindungsverhalten orthosterisch-bindender Muskarin-Rezeptor Agonisten und verschiedener dualsterisch-bindender Hybridliganden untersucht.

Bei Untersuchungen an muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren kommen vor allem die tritiierten inversen Agonisten Quinuclidinylbenzylat ($[^3\text{H}]\text{QNB}$) und N-Methylscopolamin ($[^3\text{H}]\text{NMS}$) zur Anwendung. Im Gegensatz zu $[^3\text{H}]\text{QNB}$ ist $[^3\text{H}]\text{NMS}$ jedoch nicht membrangängig und eignet sich somit nur zur Bestimmung der membrangebundenen mAChRs bzw. zur Anwendung an Membranhomogenaten. $[^3\text{H}]\text{QNB}$ kann Zellmembranen überwinden und somit auch an intrazellulär gelegene Rezeptoren binden (Galper et al., 1982; Bylund et al., 2004; Uwada et al., 2011). Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Radioligand-Bindungsstudien wurden ausschließlich Membranhomogenate verwendet. Da aus diesem Grund keine Zellmembranen überwunden werden mussten, erwies sich der Radioligand $[^3\text{H}]\text{N}$ -Methylscopolamin als geeignet.

Alle Radioligand-Bindungsversuche erfolgten in Quadruplikaten mit mindestens zwei unabhängigen Verdünnungsreihen.

3.4.1 Szintillationsverfahren

Mithilfe von Szintillationsdetektoren kann man die Energie ionisierender Strahlung messen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Flüssig- und Feststoffszintillationsverfahren genutzt, um Radioaktivität quantitativ bestimmen zu können. Sowohl Tritium ($[^3\text{H}]$) als auch das radioaktive Isotop des Schwefels ($[^{35}\text{S}]$) werden als β^- -Strahler klassifiziert. Charakteristisch dafür ist ein Überschuss an Neutronen. Atomkerne mit einem ungünstigen Verhältnis zwischen Protonen und Neutronen sind instabil und zerfallen, unter Umwandlung eines Neutrons in ein Proton, in ein stabileres Atom. Dabei senden sie ein Elektron und ein Antineutrino aus. Die freiwerdenden Elektronen werden mithilfe der Szintillatorsubstanzen in Lichtblitze umgewandelt. Im Vergleich zur Flüssigszintillation, in der zunächst organische Lösungsmittelmoleküle angeregt werden, werden bei der Feststoffszintillation die Szintillatorsubstanzen direkt angeregt. Die Hüllenelektronen der Szintillatorsubstanzen gehen durch die ionisierende Strahlung in einen angeregten Zustand über und emittieren Photonen, wenn sie in den Grundzustand zurückfallen. Mittels eines Photomultipliers werden die emittierten Photonen in elektrische Impulse umgewandelt und damit in zählbare Ereignisse. Die Frequenz der Impulse ist proportional zu der Energie des β^- -Strahlers.

3.4.2 Bestimmung der Radioligandkonzentration

Für die Auswertung und die Berechnung der Bindungs-Charakteristika wurde für jeden Versuch die Konzentration des Radioliganden bestimmt. Hierfür wurden 50 µl der eingesetzten Radioligand-Lösung und 5 ml des Szintillationscocktails Emusifier Safe (R8) in ein Szintillationsgefäß (V17) gegeben. Die Lösung wurde mittels Flüssigszintillation im Beckman Coulter LS 6000 Szintillationszähler (G6) in Duplikaten vermessen. Die sich daraus ergebene Radioaktivität wird über die spezifische Aktivität nach Gleichung 1 in die Konzentration nmol/l umgerechnet.

$$[L] = \frac{A}{A_{\text{spez}} * 2220 * V} \quad (\text{Gleichung 1})$$

- A: gemessene Aktivität [dpm]
A_{spez}: spezifische Aktivität [Ci/mmol]
V: eingesetztes Volumen [ml]
2220: Umrechnungsfaktor von nCi nach dpm
1 Bq = 60 dpm
1 Ci = 3,7 * 10¹⁰ Bq
1 nCi = 37 Bq = 2220 dpm

Für die Hintergrundmessung wurden zwei Szintillationsgefäße mit je 5 ml Szintillationscocktail vermessen und der resultierende Mittelwert von allen Messungen automatisch abgezogen.

3.4.3 Homologe Konkurrenzexperimente

Mittels homologer Konkurrenzexperimente wurden Bindungs-Charakteristika, wie der K_D- und der B_{max}-Wert einer rezeptorhaltigen Membransuspension bestimmt. Der K_D-Wert ist ein spezifisches Maß für die Affinität des Radioliganden zum Rezeptor. Der B_{max}-Wert bezeichnet die Konzentration der spezifischen Bindungsstellen in einem Homogenat, also die Expressionsdichte.

Theoretische Grundlagen

In homologen Konkurrenzversuchen konkurriert ein radioaktiv-markierter Ligand mit einem strukturidentischen, nicht markierten Liganden um die Bindungsstelle im Rezeptor. Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Radioligand ist [³H]NMS, bei dem nicht-markierten, strukturidentischen Kompetitor handelte es sich um NMS. Während die Konzentration des

3 Methoden

Radioliganden konstant geblieben ist, wurde die Konzentration des „kalten“/nicht-radioaktiv markierten Liganden stufenweise erhöht. Mit steigenden Konzentrationen des Kompetitors wurde mehr Radioligand aus seiner Rezeptor-Bindung verdrängt. Durch einen strukturverschiedenen Kompetitor, der im Überschuss zugegeben wurde, wurde die unspezifische Bindung bestimmt. Durch den Überschuss wurden alle spezifischen Bindungsstellen gesättigt und die gemessene Radioligand-Bindung ist auf unspezifische Wechselwirkungen zurückzuführen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der muskarinische, orthosterisch-bindende Antagonist Atropin in einer Endkonzentration von 10 µM für die Bestimmung der unspezifischen Bindung verwendet.

Die gemessene Radioaktivität wurde gegen den dekadischen Logarithmus der molaren Konzentration des unmarkierten Liganden aufgetragen, woraus sich eine sigmoide Kurve ergab. Die Datenpunkte wurden mithilfe einer nichtlinearen Regressionsanalyse und der „Vier-Parameter-logistischen Gleichung“ nach Barlow und Blake (1989) durch das Computerprogramm GraphPad Prism® 5.03 ausgewertet (Gleichung 2).

$$B_{ges} = bottom + \frac{(top-bottom)}{1 + \left(\frac{IC_{50}}{10(x)}\right)^{n_H}} \quad (\text{Gleichung 2})$$

B_{ges} : Gesamtbindung des Radioliganden

bottom: unteres Plateau der Kurve

top: oberes Plateau der Kurve

IC_{50} : Konzentration des Kompetitors im Wendepunkt der Kurve (Konzentration des Liganden, bei der die maximale Bindung um die Hälfte reduziert wurde)

(x): Konzentration des Kompetitors

n_H : Hill-Koeffizient (Maß für die Kurvensteilheit)

Das obere Kurvenplateau (top) entspricht der Gesamtbindung des Radioliganden in Abwesenheit eines Kompetitors. Das untere Kurvenplateau wird durch die unspezifische Bindung gebildet, also durch die nicht-sättigbare Fraktion der Radioligand-Bindung, die zum Beispiel durch eine unspezifische Adsorption an Zellmembranen bedingt ist.

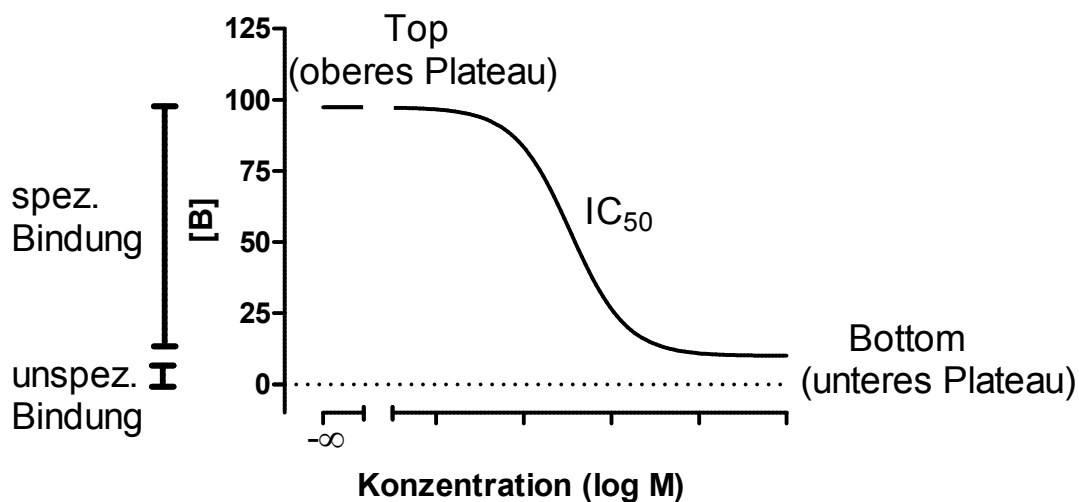


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines Wettbewerbsversuchs.

Ordinate: Bindung des Radioliganden oder Prozent einer Referenzsubstanz. Abszisse: Eingesetzte Konzentration des Kompetitors als dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration. Oberes Kurvenplateau entspricht der Gesamtbindung des Radioliganden in Abwesenheit des Kompetitors. Das untere Plateau entspricht der unspezifischen Bindung, die durch einen strukturverschiedenen Kompetitor bestimmt worden ist. Der IC_{50} -Wert entspricht der Konzentration des Liganden bei halbmaximaler Rezeptorbesetzung.

Das Steilheitsmaß (Hill-Koeffizient) gibt die theoretische Anzahl der Ligandbindungsstellen an. Ein Hill-Koeffizient, der sich nicht signifikant von $1/-1$ unterscheidet, deutet auf eine homogene Rezeptor-Population hin, die Interaktion des Liganden mit dem Rezeptor beruht folglich auf einer bimolekularen Interaktion. Die apparente Affinitätskonstante K_{App} entspricht im Fall einer 1:1 Interaktion der wahren Affinitätskonstante K_D (Hill, 1910). Eine Kurvensteilheit von $n_H < 1$ lässt auf ein heterogenes Rezeptorkollektiv schließen.

Anhand des Wendepunktes, dem IC_{50} -Wert, kann die Affinität des Inhibitors zu dem untersuchten Rezeptor berechnet werden. Befindet sich die Reaktion im Gleichgewicht kann dafür die Gleichung von Cheng und Prusoff (1973) herangezogen werden:

$$K_I = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L]}{K_D}} \quad (\text{Gleichung 3})$$

- K_I : Gleichgewichts-Dissoziationskonstante der Kompetitor-Bindung
- IC_{50} : Wendepunkt der Inhibitionskurve bei halblogarithmischer Auftragung
- $[L]$: Konzentration des Radioliganden
- K_D : Gleichgewichts-Dissoziationskonstante der Radioligand-Bindung

Im Spezialfall der homologen Wettbewerbsversuche sind Radioligand und Kompetitor strukturgleich und unterscheiden sich somit auch nicht in ihren Bindungseigenschaften.

3 Methoden

Daraus resultierend vereinfacht sich Gleichung 3 (Cheng und Prusoff, 1973):

$$K_D = K_I = IC_{50} - [L] \quad (\text{Gleichung 4})$$

K_I : Gleichgewichts-Dissoziationskonstante der Kompetitor-Bindung
 IC_{50} : Wendepunkt der Inhibitionskurve bei halblogarithmischer Auftragung
 $[L]$: Konzentration des Radioliganden
 K_D : Gleichgewichts-Dissoziationskonstante der Radioligand-Bindung

Der Wendepunkt der Kurve ist somit abhängig von der Konzentration und der Affinität des Radioliganden.

In einem reellen System gibt es nur eine begrenzte Anzahl an Bindungsstellen B_{max} , die Ligand-Rezeptor-Interaktion ist also sättigbar. Bezieht man die spezifische Radioligandbindung B_0 in die oben beschriebene Gleichung (Gleichung 4) mit ein, kann nach DeBlasi et al. (1989), die Anzahl der Bindungsstellen B_{max} berechnet werden:

$$B_{max} = \frac{B_0 * IC_{50}}{[L]} \quad (\text{Gleichung 5})$$

B_{max} : Maximale Anzahl an Bindungsstellen für den Radioliganden in der Membransuspension (fmol/ml bzw. bei bekannter Proteinkonzentration in fmol/mg)
 B_0 : Spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit des Kompetitors (top-bottom)
 IC_{50} : Wendepunkt der Inhibitionskurve bei halblogarithmischer Auftragung
 $[L]$: Konzentration des Radioliganden

Für die Anwendung dieser Analyse müssen folgende Voraussetzungen gewährleistet sein:

- 1) Der Versuch muss im Reaktionsgleichgewicht durchgeführt werden und die Bindung des Liganden an den Rezeptor muss reversibel an.
- 2) Das Rezeptorkollektiv muss homogen sein und die Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor muss auf einer bimolekularen Reaktion beruhen, die Kurvensteilheit darf folglich nicht signifikant verschieden von 1 sein.
- 3) Um die Endkonzentration des Radioliganden mit der eingesetzten Konzentration gleichsetzen zu dürfen, dürfen maximal 10 % des eingesetzten Radioliganden in Rezeptor-Ligand-Komplexen gebunden vorliegen.

Die Konstanten K_D und B_{max} sind substanzspezifische Kenngrößen einer Rezeptorpopulation, die für jedes Membranhomogenat neu bestimmt werden müssen.

Versuchsdurchführung

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Liganden binden reversibel an das Rezeptor-Protein. Das bedeutet, dass Assoziation (Bildung) und Dissoziation (Zerfall) der Radioligand-Rezeptor-Komplexe mit der gleichen Geschwindigkeit ablaufen, sobald sich ein Reaktionsgleichgewicht eingestellt hat (Bennet und Yamamura, 1985).



Die Geschwindigkeiten der Assoziation (v_{hin}) und der Dissoziation ($v_{\text{rück}}$) berechnen sich wie folgt:

$$v_{\text{hin}} = k_{+1} * [R] * [L] \quad (\text{Gleichung 7})$$

$$v_{\text{rück}} = k_{-1} * [RL] \quad (\text{Gleichung 8})$$

Befinden sich Assoziation und Dissoziation im Gleichgewicht, laufen beide Schritte mit der gleichen Geschwindigkeit ab und die Konzentrationen der gebildeten Rezeptor-Ligand-Komplexe, des freien Liganden und des ungebundenen Rezeptors sind konstant.

$$k_{+1} * [R] * [L] = k_{-1} * [RL] \quad (\text{Gleichung 9})$$

Daraus resultiert für die Dissoziationskonstante K_D :

$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{[R] * [L]}{[RL]} = \frac{1}{K_A} \quad (\text{Gleichung 10})$$

K_D : Gleichgewichts-Dissoziationskonstante
 K_A : Gleichgewichts-Assoziationskonstante

Die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_D entspricht der Ligand-Konzentration, bei der die Hälfte aller Rezeptoren an Liganden gebunden vorliegt und ergibt sich aus dem Quotienten der Geschwindigkeitskonstanten von Assoziation k_{+1} und Dissoziation k_{-1} . Je kleiner der K_D -Wert (mol/l) ist, desto höher ist die Affinität des Liganden zum Rezeptor.

Dem Pipettierschema (Tabelle 2) folgend wurden zunächst alle Substanzen in die Kavitäten einer Polypropylen Mikrotiterplatte mit insgesamt 96 Vertiefungen (V21) pipettiert. Durch die Zugabe der Membransuspension wurde der Versuch gestartet. Um Gleichgewichtsbedingungen zu erzielen, wurde die Versuchsplatte für zwei Stunden bei 30° C in einem Schüttelwasserbad (G35) inkubiert. Die Inkubationszeit ist abhängig von der Halbwertszeit des Liganden am Rezeptor. Um Gleichgewichtsbedingungen zu

3 Methoden

gewährleisten, wurden die Versuchsplatten für mindestens fünf Halbwertszeiten bei 30° C im Schüttelwasserbad inkubiert.

Um unspezifische Bindungsstellen des Glasfaserfilters (V23) vor der Filtration zu sättigen, wurde der Filter für 30 Sekunden in eiskalter PEI-Lösung 0,1 % (L26) eingelegt, da Polyethylenimin (PEI), als positiv geladene Substanz, sich an die negative Oberfläche der Filtermatte anlagert. Nach zweistündiger Inkubation wurden alle Proben zeitgleich in der halbautomatischen Filtrationsanlage Tomtec® Harvester (G18) abgesaugt und der Glasfaserfilter (V23) zweimal mit eiskaltem Wasser gespült. Die Membranproteine und die daran gebundenen Liganden wurden von dem Filter (V23) retiniert, wohingegen die freien Liganden während der Spülvorgänge vom Filter gewaschen und abgesaugt worden sind, da sie aufgrund ihrer geringen Größe die Filterporen passieren können. Nach der Filtration wurde der Filter für 3 Minuten bei 400 Watt in einer Mikrowelle (G25) getrocknet und anschließend ein Szintillationswachs (V7) zur besseren Detektion der Radioaktivität auf der Filtermatte geschmolzen (Dri-Block®, G8). Sobald das Wachs ausgehärtet war, wurde der Filter in eine Klarsichthülle gegeben und in dem Szintillationsmessgerät Trilux® (G45) vermessen.

Pipettierschema:

Komponente	Gesamt- bindung (µl)	Unspezifische Bindung (µl)	Hybrid	Eingesetzte Konz.	Konz. im Ansatz
H ₂ O	50				
Hybrid in H ₂ O			50	1x10 ^{-x} 3x10 ^{-x}	1x10 ^{-(x+1)} 3x10 ^{-(x+1)}
Atropin in H ₂ O		50		100µM	10µM
Membran- suspension in Puffer	100	100	100	37,5 µg/ml	7,5 µg/ml
Puffer	300	300	300	12,5 mM	10 mM
[³ H]NMS in Puffer	50	50	50	1,5 nM	0,15 nM
Gesamtvol.	500	500	500		

Tabelle 2: Pipettierschema zur Durchführung von homologen Wettbewerbsversuchen mit dem Radioantagonisten [³H]N-Methylscopolamin.

Alle Volumina sind in µl angegeben. Die Inkubation erfolgte bei 30° C im Schüttelwasserbad. Die Versuche erfolgten in Quadruplikaten und wurden mit mindestens zwei unabhängigen Verdünnungsreihen durchgeführt.

Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism® 5.03 (P2) und der „Vier-Parameter-logistischen Gleichung“ (Gleichung 2). Durch die erhaltenen EC₅₀-Werte konnten die Parameter K_D und B_{max} im Folgenden berechnet werden. Sofern die Kurvensteilheit nicht signifikant von -1 abwich, wurden die pK_D-Werte auf der Basis der n_H=1 fixierten Kurve berechnet.

3.4.4 Heterologe Wettbewerbsexperimente

Unterscheiden sich Radioligand und Kompetitor in ihrer Struktur spricht man von heterologen Wettbewerbsexperimenten und die vereinfachte Gleichung nach Cheng und Prusoff (1973) kann nicht mehr angewendet werden. Stattdessen findet Gleichung 11 hier Anwendung:

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

K_I : Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des Kompetitors
 IC_{50} : Wendepunkt der Inhibitionskurve bei halblogarithmischer Auftragung
 K_D : Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des Radioliganden

Des Weiteren müssen hier auch die speziellen Bindungs-Charakteristika der Testsubstanz beachtet werden. Diese kann, genau wie der Radioligand [^3H]NMS, orthosterisch an den Rezeptor binden, sich an allosterische Haftareale anlagern oder sowohl an orthosterische als auch an allosterische Bindungsstellen simultan binden. Konkurrieren beide Liganden um die gleiche Bindungsstelle spricht man von kompetitiver Interaktion.

3.4.4.1 Heterologe Konkurrenzexperimente mit orthosterischen Liganden

Durch steigende Konzentrationen der nicht-radioaktiv markierten Liganden, die mit dem Radioliganden um dieselbe Bindungsstelle konkurrieren, sinkt die gemessene Radioaktivität stetig ab. Handelt es sich bei den Kompetitoren um Agonisten, haben die resultierenden Inhibitionskurven häufig einen Hill-Koeffizienten $n_H < 1$, die Kurven sind dementsprechend flacher. Das lässt auf ein heterogenes Rezeptorkollektiv schließen, indem die Rezeptoren entweder an G Proteine gekoppelt oder entkoppelt vorliegen. Agonisten können an beide Rezeptorzustände binden, jedoch mit unterschiedlicher Affinität (Hulme et al., 1990). Daraus resultieren häufig biphasische Kurven mit zwei Wendepunkten. Der erste Wendepunkt liegt bei geringen Konzentrationen der Testsubstanz, da Agonisten eine relativ hohe Affinität zu Rezeptor-G-Protein-Komplexen aufweisen, es kommt zur Ausbildung von ternären Rezeptor-Ligand-G Protein-Komplexen (De Lean et al., 1980). Der zweite Wendepunkt liegt bei höheren Konzentrationen und gibt die Affinität des Agonisten zu G Protein-entkoppelten Rezeptoren wider. Bei Antagonisten kann das Phänomen der biphasischen Kurven nicht beobachtet werden, da sie nicht zwischen dem hochaffinen und dem niedrigaffinen Rezeptorzustand unterscheiden können und mit gleicher Affinität an beide Zustände binden (Kent et al., 1980, De Lean et al., 1980).

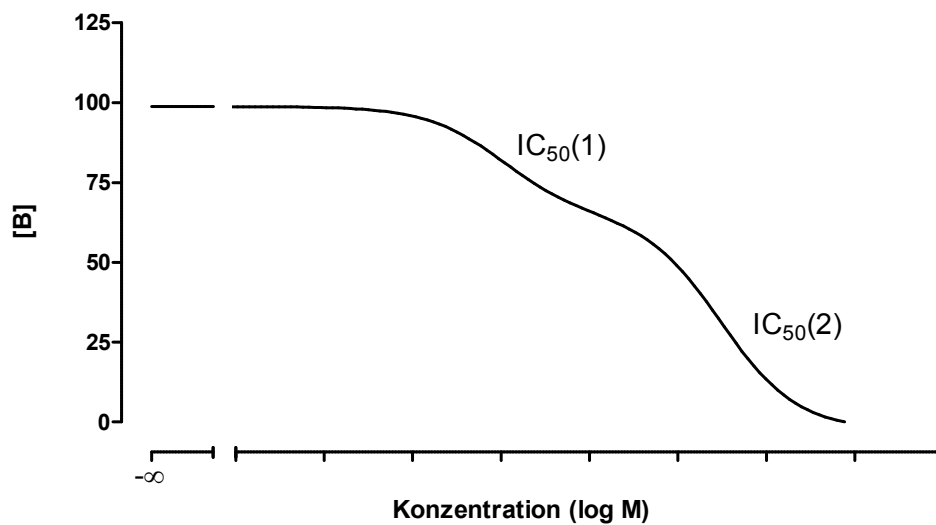


Abbildung 4: Schematische Darstellung einer biphasischen Kurve.

Ordinate: Bindung des Radioliganden oder Prozent einer Referenzsubstanz. Abszisse: Eingesetzte Konzentration des Kompetitors als dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration.

Zur Auswertung von biphasischen Kurven wird folgende Gleichung angewendet:

$$[B] = bottom + \left(Span * \frac{F1}{1+10^{[x]-logEC_{50}(1)}} \right) + \left(Span * \frac{1-F1}{1+10^{[x]-logEC_{50}(2)}} \right) \quad (\text{Gleichung 12})$$

B: Bindung des Radioliganden

Span: bottom + top

F1: Fraktion 1 (Anteil der hochaffinen Fraktion an der Gesamtbindung)

EC₅₀₍₁₎: hochaffiner Wendepunkt

EC₅₀₍₂₎: niedrigaffiner Wendepunkt

Mithilfe des Verfahrens nach Cheng und Prusoff (1973) werden die erhaltenen EC₅₀-Werte in Affinitätswerte umgerechnet. Dadurch erhält man K_i-Werte, die unabhängig von Radioligand-Affinität und -Konzentration sind. Um zu überprüfen, ob sich der Kurvenverlauf besser durch ein monophasisches oder biphasisches Modell beschreiben lässt, wurde ein F-Test verwendet.

Versuchsdurchführung und Auswertung

Der Versuchsaufbau, die Durchführung und die Auswertung erfolgten analog zu dem Protokoll, welches im Abschnitt über homologe Konkurrenzexperimente (Kapitel 3.4.3)

beschrieben worden ist. Als Inkubationszeit wurden ebenfalls zwei Stunden gewählt.

3.4.4.2 Heterologe Interaktionsexperimente mit dualsterischen Hybridliganden

Dualsterische Hybridsubstanzen können sowohl rein allosterisch, als auch dualsterisch binden, d.h. sie binden simultan an das orthosterische Haftareal und an eine allosterische Bindungstasche des Rezeptors. Binden die Substanzen rein allosterisch können sie einen dissoziationsverzögernden Effekt an muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren zeigen (Lee und El-Fakahany, 1991; Lazareno und Birdsall, 1995; Kostenis und Mohr, 1996). Ein dualsterischer Bindungsmodus ist allerdings oft wahrscheinlicher, weshalb die meisten Substanzen eine negative Kooperativität mit dem Radioliganden aufweisen, da sie den orthosterisch-bindenden Radioliganden aus seiner Bindung verdrängen. Wichtige Parameter für die Berechnung der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten im dualsterischen Bindungsmodus ($K_{B\text{dual}}$) nach Antony et al. (2009) waren in der vorliegenden Arbeit nicht bekannt. Aus diesem Grund erfolgte eine deskriptive Kurvenauswertung nach dem Cheng-Prusoff-Verfahren, also analog der Auswertung für orthosterische Agonisten.

Die Versuchsdurchführung entspricht dem in Kapitel 3.4.3 beschriebenen Protokoll für homologe Konkurrenzexperimente. Durch den potentiell dissoziationsverzögernden Effekt der dualsterischen Substanzen musste aber zunächst die Halbwertszeit der einzelnen Substanzen ermittelt und die Inkubationszeit angepasst werden. Dafür wurde die Dissoziationskinetik von [³H]NMS in Gegenwart der Testsubstanz gemessen. Die Auswertung und Berechnung der Inkubationszeit bis zum Erreichen eines Reaktionsgleichgewichtes erfolgten nach der Gleichung von Lazareno und Birdsall (1995). Nach fünf Halbwertszeiten hat die Radioligand-Bindung 97 % ihres Gleichgewichtes erreicht.

$$t_{0,5\text{ obs}} = t_{0,5\text{ off}} * \left(1 + \frac{[A]}{EC_{0,5\text{ diss}}}\right) \quad \text{(Gleichung14)}$$

$t_{0,5\text{ obs}}$:	Halbwertszeit der Radioligandkonzentration in Anwesenheit der Modulatorkonzentration [A]
$t_{0,5\text{ off}}$:	Halbwertszeit der Radioliganddissoziation unter Kontrollbedingungen (ohne Modulator)
[A]:	eingesetzte Modulatorkonzentration
$EC_{50\text{ diss}}$:	Modulatorkonzentration, bei der die Radioliganddissoziation halbmaximal verzögert ist

Da die ermittelte Inkubationszeit für die einzelnen Substanzen zwischen zwei und 16 Stunden variierte, wurden alle Testsubstanzen für 16 Stunden inkubiert, also für mindestens fünf Halbwertszeiten, um auszuschließen, dass sich Unterschiede in den Affinitäten

zwischen den verschiedenen Substanzen durch unterschiedlich lange Inkubationszeiten ergeben. Als Kontrolle wurden zeitgleich homologe Konkurrenzexperimente ebenfalls für 16 Stunden inkubiert, um einen möglichen Rezeptorabbau, der durch die lange Inkubation bedingt sein könnte, auszuschließen.

3.4.5 Dissoziationskinetik

Mittels kinetischer Experimente wurde der Effekt von allosterischen Hybridliganden auf die Dissoziationsgeschwindigkeit des orthosterischen Radioantagonisten [³H]NMS bestimmt. Dissoziationskinetiken dienen zur Bestimmung des Parameters EC_{50diss} . Dieser Wert entspricht der Alloster-Konzentration bei welcher die Radioligand-Dissoziation vom Rezeptor um die Hälfte reduziert worden ist. Im Gegensatz zu den Radioligand-Bindungsstudien, die in den Kapiteln 3.4.3 und 3.4.4 beschrieben worden sind, finden Dissoziationsexperimente unter Ungleichgewichtsbedingungen statt. Sie stellen eine wichtige Methode dar, um eine allosterische Interaktion eines Liganden mit dem Rezeptor-Protein aufzudecken und zu quantifizieren (Christopoulos und Kenakin, 2002). Um die im Folgenden beschriebenen „Zwei-Punkt Kinetiken“ durchführen zu können, muss zunächst die Dissoziationshalbwertszeit des Radioliganden am Rezeptor bekannt sein. In vorangegangenen Dissertationen wurde die Halbwertszeit von [³H]NMS am M1 mAChR bereits untersucht. Diese lag bei $11,6 \pm 1,5$ Minuten (Dissertation Vogel, 2015) und wurde für die hier vorliegende Arbeit übernommen.

3.4.5.1 Zwei-Punkt Kinetik

Eine Methode zur einfacheren Erfassung von Dissoziationskinetiken stellt die von Kostenis und Mohr (1996) etablierte „Zwei-Punkt-Kinetik“ dar.

Rein allosterisch bindende Substanzen vermögen die Dissoziationsgeschwindigkeit eines Orthosters vom Rezeptor zu reduzieren, indem sie den Austritt des Orthosters aus der Bindung zum Rezeptor verzögern (Stockton et al., 1983; Lazareno und Birdsall, 1995; Kostenis und Mohr, 1996). Eine Dissoziationsverzögerung ist also spezifisch für allosterisch-bindende Substanzen (Kostenis und Mohr, 1996). Die Alloster-Konzentration, die zu einer halbmaximalen Dissoziationsverzögerung führt, wird als EC_{50diss} bezeichnet. Dem Protokoll der Zwei-Punkt Kinetik nach Kostenis und Mohr (1996) folgend, wurde untersucht, ob die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Hybridsubstanzen einen dissoziationsverzögernden

Effekt aufweisen und dementsprechend die Inkubationszeit bis zum Erreichen eines Reaktionsgleichgewichtes verlängert werden muss.

Versuchsdurchführung und Auswertung

In vorangegangenen Dissertationen hat sich eine Vorinkubation von [³H]NMS und Membransuspension von 45 Minuten als ausreichend und praktikabel erwiesen, weshalb dieser Zeitrahmen auch für die hier vorliegende Arbeit gewählt worden ist. Während der Vorinkubation konkurriert der Radioligand nicht mit anderen Substanzen und kann an der orthosterischen Bindungsstelle des Rezeptors ungehindert durch potentielle Kompetitoren haften. Dafür wurde ein „Mastermix“ hergestellt, der ein Vielfaches der benötigten Menge von Inkubationspuffer und Radioligand enthielt. Durch Zugabe der Membransuspension zum „Mastermix“ wurde der Versuch gestartet. Zu definierten Zeitpunkten wurde ein Aliquot des „Mastermixes“ in die Kavitäten der Versuchsplatte (V21) gegeben, die vier verschiedene Ansätze enthielt. Ein Ansatz, der weder Atropin noch Testsubstanz enthielt, wurde 45 Minuten vor der Filtration angesetzt und diente der Bestimmung der [³H]NMS-Bindung zum Zeitpunkt 0. Der zweite Messwert wird nach 1,5 Halbwertszeiten der Radioliganddissoziation unter Kontrollbedingungen erhoben. Für den M1 mAChR betrug die Halbwertszeit $11,6 \pm 1,5$ Minuten (Dissertation Vogel, 2015), weshalb sich eine zweite Probenahme nach 17 Minuten ergab. Um das Resultat zu präzisieren, wurde ebenfalls ein dritter Ansatz nach 14-minütiger Inkubation vermessen. Die Ansätze für die Probenentnahmen nach 14 und 17 Minuten enthielten die Testsubstanz in verschiedenen Konzentrationen und 10 μ M Atropin. Ein vierter Versuchsansatz diente der Bestimmung der unspezifischen [³H]NMS-Bindung, dieser Ansatz enthielt 10 μ M Atropin anstelle der Testsubstanz. Die Radioligand-Endkonzentration betrug 2 nM für alle Dissoziationskinetiken. Der Versuch erfolgte in Duplikaten mit mindestens zwei unabhängigen Verdünnungsreihen.

Die Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm GraphPad Prism® 5.03 und erfolgte anhand der Gleichung für den einphasischen, exponentiellen Zerfall:

$$[RL]_t = [RL]_0 * e^{-k_{-1} * t} \quad \text{(Gleichung 15)}$$

$[RL]_t$: Radioligand-Rezeptor-Komplexe zum Zeitpunkt t nach Start der Dissoziationsbestimmung

$[RL]_0$: Radioligand-Rezeptor-Komplexe zum Zeitpunkt t=0

k_{-1} : Geschwindigkeitskonstante der Radioligand-Dissoziation

t: Zeit nach Start der Dissoziationsbestimmung

3 Methoden

Die Halbwertszeit lässt sich nach folgender Gleichung ermitteln:

$$HWZ = \frac{\ln 2}{k_{-1}} \quad (\text{Gleichung 16})$$

$$k_{-1} = \ln \frac{\left(\frac{B_{tspez}}{B_{0spez}}\right)}{t} \quad (\text{Gleichung 17})$$

B_{tspez} : spezifische Bindung des Radioliganden zum Zeitpunkt t

B_{0spez} : spezifische Bindung des Radioliganden beim Start der Dissoziationskinetik-Bestimmung ($t=0$)

t : Zeitpunkt der Beendigung der Radioligand-Dissoziations-Messung (Vakuumfiltration)

Mithilfe des Computerprogramms GraphPad Prism® 5.03 konnten sowohl die Halbwertszeit (Gleichung 16) als auch die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} (Gleichung 17) ermittelt werden. Normiert man die k_{-1} -Werte der verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanz, die im Versuch verwendet worden sind, auf den Kontrollwert und trägt die erhaltenen Prozentzahlen halblogarithmisch gegen die molare Konzentration der Testsubstanz auf, erhält man eine sigmoide Kurve, deren Wendepunkt der Affinität der Testsubstanz zum [³H]NMS-besetzten Rezeptor entspricht. Die resultierende Kurve wurde dann mit der Vier-Parameter-logistischen Gleichung (Gleichung 2) charakterisiert. Bei dem Ansatz ohne Modulator findet eine vollständige Dissoziation des Radioliganden vom Rezeptor statt, wohingegen hohe Konzentrationen eines potenten Modulators die Dissoziation deutlich verlangsamen können.

Pipettierschema:

Komponente	Gesamt- bindung (µl)	Unspez. Bindung (µl)	Kontrolle	Hybrid	Eingesetzte Konz.	Konz. im Ansatz
H ₂ O	50	50	50			
Hybrid in Puffer				50	1x10 ^{-x} 3x10 ^{-x}	1x10 ^{-(x+1)} 3x10 ^{-(x+1)}
Atropin in Puffer		50	50	50	100µM	10µM
Zellen in Puffer	50	50	50	50	37,5 µg/ml	7,5 µg/ml
HEPES- Puffer	350	300	300	300	12,5 mM	10 mM
[³ H]NMS in Puffer	50	50	50	50	20nM	2nm
Gesamtvol.	500	500	500	500		

Tabelle 3: Pipettierschema zur Zwei-Punkt-Kinetik

Die Versuche wurden in Duplikaten durchgeführt. Der Versuchsansatz wurde 45 Minuten im Schüttelwasserbad bei 30° C vorinkubiert und zwischen den einzelnen Zugabeschritten weiterhin im Wasserbad belassen.

0 Minuten	Start der Vorinkubation des „Mastermixes“ (MM1), der 17 Minuten mit der Testsubstanz inkubiert wird, also 1,5 Halbwertszeiten
3 Minuten	Start der Vorinkubation des „Mastermixes“ (MM2), der 14 Minuten mit der Testsubstanz inkubiert wird (zur präziseren Bestimmung)
17 Minuten	Zugabe der Zellsuspension in die Kavitäten der Gesamt- und der unspezifischen Bindung
45 Minuten	Zugabe des MM1 in die mit Atropin und Testsubstanz vorbereiteten Kavitäten, die 17 Minuten später abfiltriert werden (nach 1,5 HWZ)
48 Minuten	Zugabe des MM2 in die mit Atropin und Testsubstanz vorbereiteten Kavitäten, die 14 Minuten später abfiltriert werden
62 Minuten	Filtration

Tabelle 4: Zeitprotokoll zur Durchführung von „Zwei-Punkt-kinetischen Experimenten“ nach Kostenis und Mohr (1996)

„Mastermix“: Vielfaches der benötigten Menge an Inkubationspuffer, Radioligand und Membransuspension für alle Reaktionsansätze. Die Vorinkubation wird gestartet, indem die Membransuspension zu dem „Mastermix“ hinzugefügt wird. Dieser Zeitplan gewährleistet, dass zum Zeitpunkt 45 Minuten + 1,5 HWZ, also nach 62 Minuten, alle Versuchsansätze zeitgleich filtriert werden können.

3.5 Funktionelle Untersuchungen

Im Gegensatz zu Radioligand-Bindungsversuchen, die Informationen über die Art und die Affinität der Bindung zwischen Liganden und Rezeptor generieren sollten, werden funktionelle Untersuchungen dazu genutzt, die Signalkaskade, die aufgrund einer Rezeptor-Aktivierung in Gang gesetzt wird, näher zu beleuchten. Durch halblogarithmische Auftragung des generierten Mess-Signals gegen die molare Konzentration der eingesetzten Testsubstanz ergaben sich sigmoide Kurven, die mithilfe des Computerprogramms GraphPad Prism® 5.03 und der Vier-Parameter-logistischen Gleichung (Gleichung 2) charakterisiert werden konnten. Der Wendepunkt der Kurve (EC_{50} -Wert) ist ein Maß für die Wirksamkeit einer agonistisch wirkenden Substanz.

3.5.1 Messung des intrazellulären IP1-Gehaltes (IP1-assay)

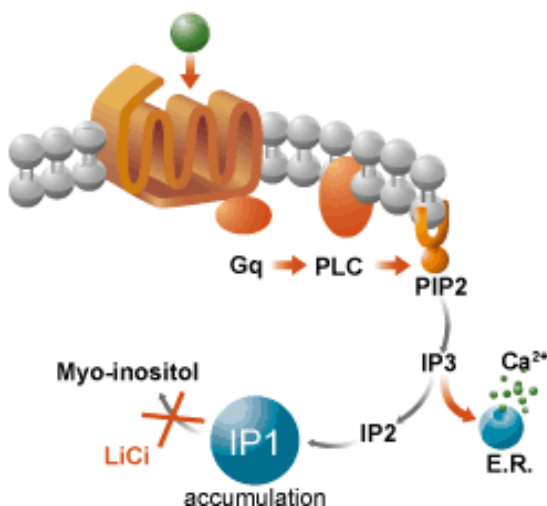


Abbildung 5: Signalkaskade eines $G_{q/11}$ -gekoppelten Rezeptors; übernommen von <http://www.cisbio.com/drug-discovery/ip-one-htrf-assay-kit>

Diese Abbildung zeigt die Signalwegskaskade eines $G_{q/11}$ -gekoppelten Rezeptors, basierend auf dem HTRF®-IP-One Tb-kit der Firma „cisbio“. Durch Aktivierung des „Sieben-Transmembranären-Rezeptors“ (7TMR), werden $G_{q/11}$ Proteine aktiviert, die einen stimulierenden Effekt auf die Phospholipase C haben, welche die Reaktion von Phosphoinositidbisphosphat in Inositol-3-Phosphat (IP3) katalysiert. In der Folge koppelt IP3 an IP3-Rezeptoren am Endoplasmatischen Retikulum, wodurch Ca^{2+} aus internen Speichern freigesetzt wird und die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ansteigt. IP3 wird zunächst zu IP2, später zu IP1 abgebaut. Durch den Zusatz von Lithiumchlorid zum Inkubationspuffer, wird ein weiterer Abbau zu Myo-inositol verhindert und das entstandene IP1 kann quantitativ bestimmt werden.

Ungeradzahlige mAChRs koppeln bevorzugt an G Proteine der $G_{q/11}$ -Familie. In Folge der

3 Methoden

$G_{q/11}$ -Aktivierung kommt es zunächst durch die $G\alpha$ -Untereinheit zu einer Aktivierung der Phospholipase C β (PLC β), welche die Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in Diacylglycerol und Inositoltriphosphat (IP3) katalysiert. IP3 führt zu einer Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Gehaltes. Die quantitative Bestimmung von Ca^{2+} und IP1, ein Abbauprodukt von IP3, welches durch den Zusatz von Lithiumchlorid im Inkubationspuffer stabil bleibt, dient zur Bestimmung der $G_{q/11}$ -Aktivierung. Lithium-Ionen hemmen das Enzym Inositolmonophosphatase, sodass es zu einer Anreicherung von IP1 kommt. Zur Messung der $G_{q/11}$ Protein-Aktivierung eignet sich das kompetitive Immunoassay-Kit HTRF[®]-IP-One Tb-Kit, welches auf einem FRET- (Förster-Resonanzenergietransfer) Signal zwischen einem Terbium-markierten Antikörper und einem Farbstoff, dem (d2)-gekoppelten Inositol-1-Phosphat, beruht. Das endogene IP1 konkurriert mit dem artifiziellen d2-IP1 um die Bindung an den Antikörper. Bei geringen Konzentrationen an endogenem IP1 bindet der markierte Antikörper bevorzugt an das artifizielle (d2)-gekoppelte IP1 und das FRET-Signal steigt (Trinquet et al., 2006). Nach der Kopplung des Rezeptors an $G_{q/11}$ Proteine aufgrund einer Aktivierung durch Liganden wird die IP1-Synthese gesteigert und der Antikörper bindet mehr endogenes IP1, dementsprechend wird das FRET-Signal kleiner.

Zum besseren Verständnis stellt Abbildung 7 (Kapitel 3.5.2) das gleiche Messprinzip für cAMP-Assays graphisch dar. Das Messprinzip für IP1-Assays beruht auf derselben Interaktion zwischen markiertem d2-Farbstoff und monoklonalem Antikörper.

Neben der PLC β -Aktivierung durch $G_{q/11}$ Proteine kann diese auch durch die $\beta\gamma$ -Untereinheit von $G_{i/o}$ Proteinen aktiviert werden (Padrell et al., 1991, Exton 1996), weshalb in einigen Versuchen die CHO-M1 Zellen mit 100 ng/ml Pertussis Toxin (PTX) vorinkubiert worden sind, um $G_{i/o}$ Proteine auszuschalten. Mithilfe dieses Toxins sollte eine mögliche Beteiligung der $G_{i/o}$ Proteine an der Aktivierung der PLC β detektiert werden.

Versuchsdurchführung

Die abgelösten Zellen wurden zunächst im Nährmedium bei 900 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert und die Zellpellets in DPBS resuspendiert. 10 μ l dieser Zellsuspension wurden anschließend auf eine Neubauer Zählkammer gegeben und die darauf befindlichen Zellen unter dem Mikroskop gezählt. Um zu berechnen wie viele Zellen pro Milliliter vorliegen, wurde der Durchschnittswert der Zellen aller vier Quadranten der Zählkammer gebildet und dieser Wert mit 1000 multipliziert. Das Volumen mit der gewünschten Zellzahl wurde daraufhin zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in dem zuvor berechneten notwendigen Volumen des Assay-Puffers resuspendiert. Im Fall des IP1-

3 Methoden

Assays handelte es sich hierbei um den im Assay-Kit befindlichen Stimulationspuffer. In diesem Assay wurde die Zellzahl auf 100.000 Zellen pro 7 µl eingestellt. Jeweils 7 µl dieser Zellsuspension wurden anschließend in die Kavitäten einer 384-Well-Mikrotiterplatte (V8) gegeben. Die Platte mit den darin befindlichen Zellen wurde für 10 Sekunden bei 900 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert (Rotor JS 5.3) und im Brutschrank inkubiert. Nach 30 Minuten erfolgte die Zugabe von 7 µl der Testlösungen in zweifacher Konzentration, da im Well eine 1:1 Verdünnung mit der Zellsuspension stattfand. Nach einer 30-minütigen Inkubation erfolgte dann die Zugabe von 3 µl d2-IP1 und unmittelbar danach von 3 µl Terbium-markiertem Antikörper. Die Vermessung der Platte erfolgte nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss im Mithras LB 960 (G27).

Um die Beteiligung von G_{q/11} Proteinen an dem Mess-Signal zu verifizieren, wurde der G_{q/11}-Inhibitor FR900359 (FR) (Schrage et al., 2015) eingesetzt und das Versuchsprotokoll modifiziert. Nach dem Aussäen der Zellen in den Mikrotiterplatten (V8) wurden die Zellen für 10 Minuten im Brutschrank inkubiert und daraufhin 3,5 µl einer 3 µM FR-Lösung hinzugefügt bzw. in den Wells in denen keine FR-Zugabe stattfinden sollte, wurde stattdessen 3,5 µl des Assay-Puffers zugegeben. Nach zwei Stunden schloss sich dann die Zugabe von 3,5 µl einer vierfach-konzentrierten Testlösung an. Der weitere Verlauf des Versuchs ist identisch mit dem oben beschriebenen Protokoll ohne FR-Zugabe.

Auswertung

Der Terbium-markierte Antikörper fungiert als Energiedonor und sendet nach Anregung bei einer Wellenlänge von 337 nm Energie aus, die von dem Akzeptor d2-IP1 aufgenommen werden kann. Bei einer Interaktion zwischen Donor und Akzeptor wird Licht der Wellenlänge 665 nm ausgesendet, liegt der Donor ungebunden oder an endogenes IP1 gebunden vor, wird Licht mit einer Wellenlänge von 620 nm ausgestrahlt und wird als interner Standard ebenfalls detektiert. Der Quotient beider Wellenlängen (665 nm/ 620 nm) wird nach der Inkubation im Mithras LB 960 (G27) gemessen und mithilfe des Computerprogramms GraphPad Prism® 5.03 ausgewertet. Um Störgrößen, wie zum Beispiel eine Fluoreszenzlöschung (Quenching) möglichst gering zu halten, wird dieser Quotient anstelle eines einzelnen Messwertes für die Auswertung genutzt.

$$Ratio = \frac{A_{665\text{ nm}}}{A_{620\text{ nm}}} * 10^4 \quad (\text{Gleichung 18})$$

A_{665 nm}: Emission des Akzeptors

A_{620 nm}: Emission des Donors (interner Standard)

3 Methoden

Dieser Wert ist umso größer, je mehr artifizielles d2-IP1 an den monoklonalen Antikörper gekoppelt vorliegt.

Die nach Gleichung 18 erhaltenen Werte wurden nach Anweisung des Herstellers (R22) in Delta F Werte transformiert:

$$\Delta F = \frac{Ratio_{test} - Ratio_{neg}}{Ratio_{neg}} * 100 \quad (\text{Gleichung 19})$$

Ratio_{test}: Nach Gleichung 18 erhaltener Wert für die Testsubstanz

Ratio_{neg}: Nach Gleichung 18 erhaltener Wert für die Negativkontrolle (Versuchsansatz ohne Testsubstanz und (d2)-IP1)

Die logarithmierten Werte der Konzentrationen der Testlösungen wurden gegen die nach Gleichung 19 erhaltenen Delta F-Werte aufgetragen.

Da höhere Konzentrationen an endogenem IP1 in kleineren Messwerten resultieren, wurden die erhaltenen Werte normiert, wobei der 0 % Wert dem Basalwert entsprach und der 100 % Wert auf 100 µM des Referenzagonisten Acetylcholin festgelegt worden ist. Die Datenpunkte wurden dann anhand der Vier-Parameter-logistischen Gleichung (Gleichung 2) analysiert.

Um vergleichbare Ergebnisse zwischen den PTX-vorinkubierten und den unbehandelten Zellen zu erhalten, erfolgte die Auswertung anhand von absoluten IP1-Werten. Dafür wurde eine IP1-Standardkurve vermessen (Abbildung 6).

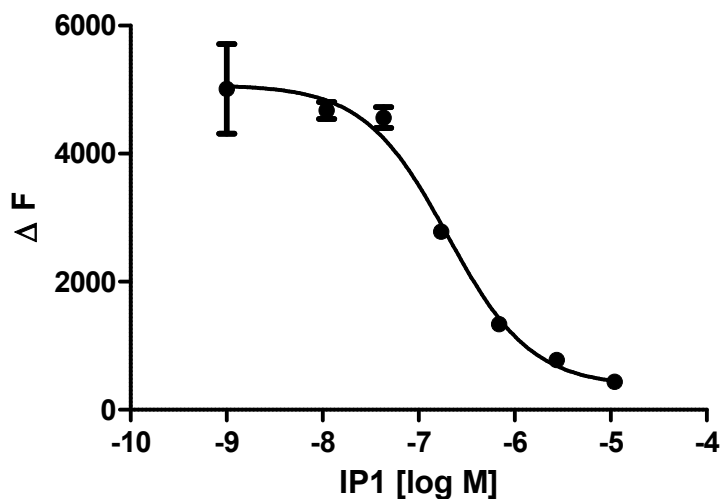


Abbildung 6: IP1 Standardkurve

Der Versuchsbeschreibung des HTRF[®]-IP-One Tb-kit folgend wurde eine Standardkurve vermessen anhand derer die Messwerte aus späteren Versuchen an CHO-M1 Zellen in Absolutwerte [nM] umgerechnet werden konnten. Zunächst wurden sieben verschiedene IP1-Standardverdünnungen hergestellt. Nach 30 minütiger Inkubation wurden jeweils 3 µl d2-IP1 und IP1-Cryptat zugegeben und die Versuchsplatte für 60 Minuten unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie am Mithras LB 960 (G27) vermessen werden konnte. Die resultierenden Werte beschreiben den Quotienten der emittierten Wellenlänge (665 nm/620 nm) und werden als Delta F angegeben. Trägt man die erhaltenen Daten halblogarithmisch gegen die molare Konzentration der eingesetzten IP1-Standards auf, erhält man eine sigmoide Kurve, deren Parameter für die Berechnung der Absolutwerte notwendig sind.

Die erhaltenen Datenpunkte wurden mittels der Vier-Parameter-logistischen Gleichung (Gleichung 2) ausgewertet und die daraus resultierenden Parameter für folgende Gleichung verwendet:

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{(1 + 10^{((LogEC_{50} - x) * n_H)})} \quad (\text{Gleichung 20})$$

Mithilfe dieser Gleichung konnten die Messwerte aus den anschließenden Versuchen an CHO-M1 Zellen auf absolute IP1-Werte in nM umgerechnet werden, die dann miteinander vergleichbare Ergebnisse für die unterschiedlich behandelten Zellen ergaben.

3.5.2 Messung des intrazellulären cAMP-Gehaltes (cAMP-assay)

Neben anderen Rezeptoren sind auch muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren zur promiskuitiven G Protein-Aktivierung befähigt. Der muskarinische M1 Rezeptor kann neben

$G_{q/11}$ Proteinen auch G_s und $G_{i/o}$ Proteine aktivieren und deren jeweilige Signalkaskaden auslösen (Thomas et al., 2008).

Cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) ist ein sekundärer Botenstoff, der sowohl in die Signalkaskade von $G_{i/o}$, als auch von G_s Proteinen involviert ist. $G_{i/o}$ und G_s Proteine haben einen gegenläufigen Effekt auf die Adenylzyklasen (ACs); $G_{i/o}$ Proteine hemmen dieses Enzym, G_s Proteine stimulieren es. Durch Aktivierung der ACs kommt es zu einem Anstieg an intrazellulärem cAMP. Dieser Konzentrationsanstieg soll in dem im Folgenden beschriebenen Assay mit dem HTRF®- cAMP-dynamic 2-Kit (R21) gemessen werden.

Versuchsdurchführung und Auswertung

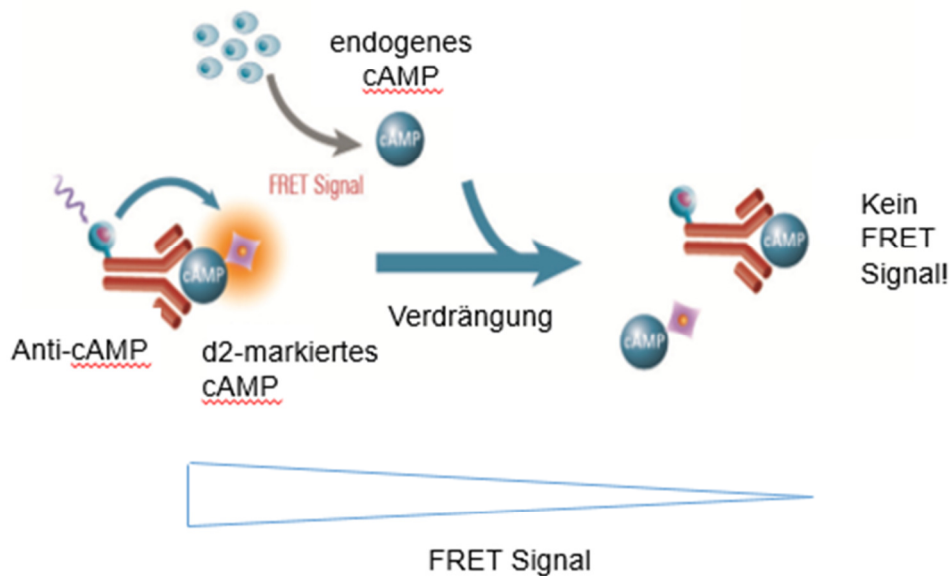


Abbildung 7: Darstellung des Messprinzips einer cAMP-Messung mit dem HTRF®-dynamic 2 cAMP-kit; modifiziert nach der HTRF®-dynamic 2 cAMP-kit Anleitung
Die Abbildung symbolisiert die Konkurrenz des durch Rezeptor-Aktivierung generierten endogenen cAMPs und des artifiziellen d2-markierten cAMPs um die Bindung an den monoklonalen Antikörper anti-cAMP. Das resultierende Mess-Signal ist antiproportional zu der Menge des gebildeten endogenen cAMPs. Mit steigenden Agonist-Konzentrationen werden vermehrt Rezeptoren aktiviert und die Konzentration an endogenem cAMP steigt. Folglich steht mehr nicht-markiertes (endogenes) cAMP zur Verfügung und kann an den Antikörper binden und damit markiertes cAMP aus der Bindung verdrängen. Dadurch wird das Mess-Signal kleiner. Wird wenig cAMP gebildet, bindet vermehrt das d2-markierte cAMP an den Antikörper und das Mess-Signal wird größer.

Zunächst wurden auch in diesem Versuch die Zellen von der Zellkulturschale abgelöst und das Nährmedium nach erfolgter Zentrifugation abgesaugt. Das Zellpellet wird in HBSS+Hepes (20mM) Puffer (L13) resuspendiert und die Zellzahl, wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben, bestimmt. Die Zellsuspension wurde nochmals zentrifugiert und das Zellpellet mit dem erforderlichen Volumen an HBSS+Hepes (20mM) + 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX) (R25) resuspendiert. IBMX ist ein Phosphodiesterase-Hemmstoff, welcher dem Abbau von generiertem cAMP entgegenwirken soll. Die Zellzahl wurde in diesem Versuch auf 50.000 Zellen pro 5 μ l eingestellt und 5 μ l der Zellsuspension in jedes Well pipettiert. Nach einer 30-minütigen Inkubation erfolgte die Zugabe von 5 μ l zweifach-konzentrierter Testsubstanz. Nach einer Inkubation von 30 Minuten im Brutschrank schloss sich die Zugabe von jeweils 5 μ l d2-cAMP und Europium-markiertem Antikörper an und die Versuchsplatte wurde für 60 Minuten unter Lichtausschluss inkubiert, bevor sie im Mithras LB 960 (G27) vermessen werden konnte.

Die Auswertung verlief analog der in Kapitel 3.5.1 beschriebenen IP1-Assay Auswertung.

3.5.3 Messung des intrazellulären cAMP-Gehaltes nach Toxin-Zugabe

Neben G_s und $G_{i/o}$ können auch $G_{q/11}$ Proteine einen Effekt auf Adenylylzyklasen (ACs) ausüben. Insgesamt neun Isoformen für Membran-gebundene Adenylylzyklasen sind in der Literatur beschrieben (Hanoune und Defer, 2001), die unterschiedlich innerviert werden können. Ein bekannter Modulator ist Ca^{2+} , das, abhängig von der Isoform, sowohl einen hemmenden als auch einen stimulierenden Effekt auf Adenylylzyklasen haben kann. Des Weiteren kann auch die $\beta\gamma$ -Untereinheit verschiedener G Proteine einen Einfluss auf die Aktivität der ACs haben. Um dieses Phänomen genauer zu beleuchten, wurden weitere cAMP-Assays in modifizierter Weise durchgeführt. Um eine potentielle Beteiligung von $G_{i/o}$ Proteinen zu detektieren, wurden die Zellen für 16-18 Stunden mit 100 ng/ml des $G_{i/o}$ Protein Inhibitors Pertussis Toxin vorbehandelt. Mithilfe des G_s Protein-Aktivators Cholera Toxin (CTX) sollte geprüft werden, ob das im cAMP-Assay generierte Mess-Signal vollständig auf einer G_s Protein-Aktivierung beruht oder ob sich ein Restsignal zeigt, dass auf die Beteiligung anderer G Proteine schließen lässt. Dafür wurden die Zellen analog zu der PTX-Vorbehandlung für 16-18 Stunden mit 100 ng/ml CTX vorbehandelt. $G_{q/11}$ Proteine wurden während des Versuches mit dem $G_{q/11}$ Protein-Inhibitor FR stumm geschaltet, wie es in Kapitel 3.5.1 beschrieben worden ist. Um eine mögliche Signalüberlagerung mehrerer G Proteine zu detektieren, wurden die verschiedenen G Protein-Inhibitoren kombiniert

angewendet.

Versuchsdurchführung und Auswertung

Die Versuchsdurchführung entsprach dem in Kapitel 3.5.2 beschriebenen Versuchsprotokoll. Die verschiedenen Toxin-Vorbehandlungen können unterschiedliche Effekte auf den Basalwert und damit auf die Auswertung haben. Um vergleichbare Daten zu erzielen, wurde deshalb eine cAMP-Standardkurve generiert (Abbildung 8).

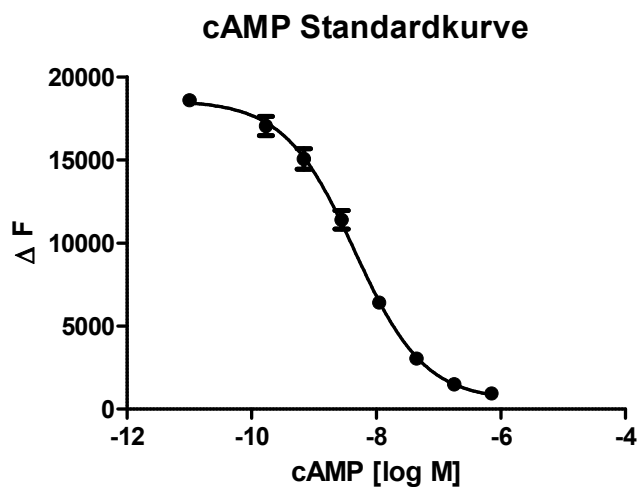


Abbildung 8: cAMP Standardkurve

Der Versuchsbeschreibung des HTRF[®] dynamic 2 cAMP-kits folgend wurde eine Standardkurve vermessen anhand derer die Messwerte aus späteren Versuchen an CHO-M1 Zellen in Absolutwerte [nM] umgerechnet werden konnten. Zunächst wurden sieben verschiedene cAMP-Standardverdünnungen hergestellt, die einem Messfenster von 0,07-70 nM cAMP entsprachen. Nach 30 minütiger Inkubation wurden jeweils 5 µl cAMP-d2 und cAMP-Cryptat zugegeben und die Versuchsplatte für 60 Minuten unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie am Mithras LB 960 (G27) vermessen werden konnte. Die resultierenden Werte beschreiben den Quotienten der emittierten Wellenlänge (665 nm/620 nm) und werden als Delta F angegeben. Trägt man die erhaltenen Daten halblogarithmisch gegen die molare Konzentration der eingesetzten cAMP-Standards auf, erhält man eine sigmoide Kurve, dessen Parameter für die Berechnung der Absolutwerte notwendig sind.

Die erhaltenen Datenpunkte wurden mittels der Vier-Parameter-logistischen Gleichung (Gleichung 2) ausgewertet und die daraus resultierenden Parameter für folgende Gleichung verwendet:

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{(1 + 10^{((LogEC_{50} - x) * n_H)})} \quad (\text{Gleichung 21})$$

Mithilfe dieser Gleichung konnten die Messwerte aus den anschließenden Versuchen an

CHO-M1 Zellen auf absolute cAMP-Werte in nM umgerechnet werden, die dann miteinander vergleichbare Ergebnisse für die unterschiedlich behandelten Zellen ergaben.

3.5.4 [³⁵S]GTPγS-Bindungsversuche

In der Substanz [³⁵S]GTPγS wurde ein Sauerstoffatom, welches in der Ursubstanz GTP γ-ständig an einen Phosphatrest der Ribose gebunden vorliegt, gegen ein radioaktiv-markiertes Schwefelatom ³⁵S ausgetauscht. Der Radioligand weist eine hohe Affinität zu der α-Untereinheit von G Proteinen auf. Infolge einer Agonist-vermittelten oder spontanen Rezeptor-Aktivierung wird im Austausch gegen GDP vermehrt das überschüssige [³⁵S]GTPγS an das G Protein gekoppelt und der G Protein-Zyklus unterbrochen, da der Radioligand eine GTPase-Stabilität aufweist. Infolgedessen akkumulieren die [³⁵S]GTPγS-G Protein-Komplexe, welche vom Glasfaserfilter retiniert werden. Die resultierende Radioaktivität kann durch eine Vermessung im Trilux® (G45) quantitativ ermittelt werden und ist proportional zur Agonist-vermittelten Rezeptor-Aktivierung.

Versuchsdurchführung

[³⁵S]GTPγS-Bindungsversuche wurden ausschließlich an Membranhomogenaten durchgeführt, da der Radioligand eine positive Ladung trägt und somit die Zellmembran nicht überwinden kann. Der Versuch erfolgte in Quadruplikaten aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Verdünnungsreihen.

Dem Pipettierschema (Tabelle 5) folgend wurden alle Komponenten in eine Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten (V21) einpipettiert. Durch die Zugabe der Membransuspension wurde der Versuch gestartet und die Versuchsplatte bei 30° C in einem Schüttelwasserbad (G35) für 60 Minuten inkubiert. Da [³⁵S]GTPγS irreversibel an die Gα-Untereinheit des G Proteins bindet, kann sich kein Reaktionsgleichgewicht einstellen. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, ist es notwendig den Inkubationszeitraum immer gleich zu wählen. Ein Zeitraum von 60 Minuten hat sich bei vorherigen Versuchen durch andere Doktoranden als geeignet erwiesen, um eine ausreichende Akkumulation zu gewährleisten und damit ein gut detektierbares Messfenster zwischen Agonist-vermittelter und spontaner [³⁵S]GTPγS-Bindung zu erhalten (Dissertation Klemt, 2005; Dissertation Kebig, 2010). G Protein-gekoppelte Rezeptoren weisen häufig eine spontane Aktivität auf, was bedeutet, dass der G Protein-Zyklus ohne vorherige Agonist-Stimulation durchlaufen werden kann. Um die verwendeten Rezeptoren in der Membransuspension auf eine Spontanaktivität zu prüfen,

3 Methoden

werden supramaximale Konzentrationen eines inversen Agonisten eingesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dafür der muskarinische, orthosterisch-bindende inverse Agonist Atropin in einer Endkonzentration von 1 μM eingesetzt. Liegt der gemessene Atropin-vermittelte Messwert unterhalb des Basalwertes, ist das ein starkes Indiz für eine Spontanaktivität der Rezeptoren. Der Zusatz von 1 μM GDP (R15) sättigt leere Nukleotidbindungsstellen der α -Untereinheit ab und führt dadurch zu einem größeren Messfenster, indem die basale [^{35}S]GTP γ S-Bindung reduziert wird. In der Inkubationsphase wurde alles für die anschließende Vakuumfiltration vorbereitet. Analog der [^3H]NMS-Bindungsversuche wurde die Radioaktivität mittels Feststoffsintillation ermittelt, der Glasfaserfilter wurde jedoch für die [^{35}S]GTP γ S-Bindungsversuche für 30 Sekunden in Aqua destillata (R2) gelegt statt in PEI-Lösung (L26). Nach der Inkubation wurden die Radioligand-Rezeptor-Komplexe mittels Vakuumfiltration am Tomtec-Harvester® (G19) abgetrennt und der Filter wie in Kapitel 3.4.3 beschrieben weiterverarbeitet und im Trilux® (G45) vermessen.

Dieser Assay wird primär zur Bestimmung der $G_{i/o}$ Protein-abhängigen Rezeptor-Aktivierung genutzt. Da der M1-mAChR aber hauptsächlich $G_{q/11}$ Proteine zur Signalwegsaktivierung rekrutiert, sollte durch die Verwendung eines mit PTX vorbehandelten Membranhomogenates die Beteiligung der $G_{i/o}$ Proteine verifiziert werden. Dafür wurden die für die Membranpräparation vorbereiteten Zellkulturschalen für 16 Stunden mit 100 ng/ml PTX inkubiert.

Pipettierschema:

Komponente	Basale [³⁵ S]GTPγS-Bindung (μl)	Inverser Agonist (μl)	Hybrid	Eingesetzte Konz.	Konz. im Ansatz
H ₂ O	100	50	50		
Hybrid in Puffer			50	1x10 ^{-x} 3x10 ^{-x}	1x10 ^{-(x+1)} 3x10 ^{-(x+1)}
Atropin in Puffer		50		10 μM	1 μM
Zellen in Puffer	100	100	100	200 μg/ml	40 μg/ml
GDP in Puffer	50	50	50	10 μM	1 μM
Puffer	200	200	200	12,5 mM	10 mM
[³⁵ S]GTPγS in Puffer	50	50	50	0,7 nM	0,07 nM
Gesamtvol.	500	500	500		

Tabelle 5: Pipettierschema für [³⁵S] GTPγS-Bindungsversuche.

Der Versuch wurde in Quadruplikaten durchgeführt. Nach der Zugabe aller Substanzen wurde die Versuchsplatte für 60 Minuten im Schüttelwasserbad bei 30° C inkubiert.

Auswertung

Die gemessenen Radioaktivitätswerte (in counts per minute (cpm)) wurden gegen die logarithmierten Werte der molaren Konzentration aufgetragen und die Datenpunkte mittels der Vier-Parameter-logistischen Gleichung (Gleichung 2) analysiert.

3.5.5 Messung der dynamischen Massenumverteilung (DMR)

Im Vergleich zu den in den Kapiteln 3.5.1 bis 3.5.4 beschriebenen funktionellen Experimenten, die sich auf die Bestimmung eines einzelnen sekundären Botenstoffes beschränken, bietet die Messung der Dynamischen Massenumverteilung die Möglichkeit durch verschiedene G Proteine ausgelöste Signalwege simultan zu bestimmen. Diese Messung findet in Echtzeit und an lebenden Zellen statt. Ein weiterer Vorteil dieser Messmethode liegt darin, dass weder Rezeptoren noch Substanzen markiert und damit verändert

werden müssen, um ein Mess-Signal zu erhalten, welches quantitativ auswertbar ist.

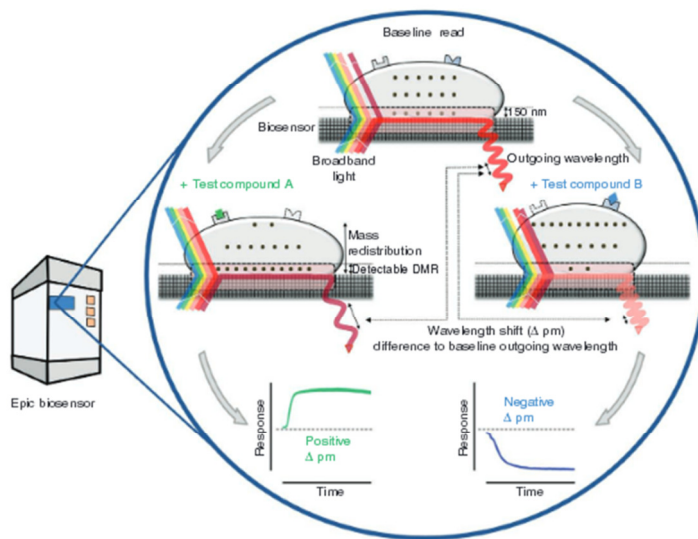


Abbildung 9: Prinzip der Dynamischen Massenumverteilung (DMR); übernommen von Schröder et al., 2011

Ausgehend von einem Laser wird der Biosensor in einer 384-well Versuchsplatte mit Breitbandlicht bestrahlt. In Abhängigkeit der Biomasse, die sich oberhalb (ca. 150 nm) des optischen Sensors befindet, wird Licht einer bestimmten Wellenlänge reflektiert. Testsubstanz-vermittelt kommt es zur Aktivierung bestimmter Signalkaskaden, die eine Massenumverteilung innerhalb der Zelle auslösen. Dadurch ändert sich die optische Dichte innerhalb des Detektionsbereiches und es kommt zu einer Verschiebung der reflektierten Wellenlänge, welche entweder in Form eines negativen oder positiven Signals detektiert werden kann.

Theoretische Grundlagen

Die durch G Protein-Aktivierung ausgelöste Massenumverteilung wurde an lebenden Zellen untersucht und mit dem Epic[®]-Biosensor (G11) im Arbeitskreis von Prof. Dr. Kostenis in der Pharmazeutischen Biologie der Universität Bonn gemessen. Die Messung erfolgte unter kontrollierten Temperaturbedingungen bei 28° C und wurde anhand des Protokolls von Schröder et al., 2010/2011 durchgeführt. Der Epic[®] (G11) ermöglicht die indirekte Bestimmung der intrazellulären Massenumverteilung, die beispielsweise auf die Aktivierung von G Protein-gekoppelten Rezeptoren folgt (Fang et al., 2007, Schröder et al., 2010 und 2011). Zahlreiche intrazelluläre Prozesse basieren auf der Relokalisierung von Botenstoffen und Proteinen innerhalb der Zelle oder auf einem Umbau des Zytoskeletts und können mithilfe des Epic[®]-Systems (G11) gemessen werden.

Das Mess-System besteht aus einem Laser, einem optischen Biosensor (resonant waveguide grating, RWG), welcher bereits in der 384-well Versuchsplatte (V2) integriert ist,

und einem Detektor. Der Laser sendet polarisiertes Breitbandlicht aus, welches dann auf den Biosensor trifft. Abhängig von der Biomasse oberhalb des Biosensors (ca. 150 nm) wird Licht einer bestimmten Wellenlänge reflektiert. Die reflektierte Wellenlänge ist abhängig vom zellulären Kontext, also von der Zellart und der Zelldichte und variiert dementsprechend bei Versuchen mit unterschiedlichen Zellen. Alle 15 Sekunden erfolgt eine Messung, die dem Mittelwert aus fünf Einzelmessungen entspricht. Zunächst erfolgt eine Messung an ruhenden Zellen, die in etwa 3600 Sekunden durchgeführt werden sollte. Nach einer Hintergrundmessung („baseline read“) von ca. 300 Sekunden erfolgt die simultane Substanzzugabe in allen Kavitäten mithilfe der automatischen Pipettierstation SELMA[®] (G7). Die resultierenden Messwerte sind die Differenzwerte zur Hintergrundmessung und werden in der Einheit Δ pm angegeben. Die Substanzen wurden ebenfalls auf 28° C in der Pipettierstation erwärmt, um das Temperaturprofil nicht zu verändern. In der Folge der Substanzzugabe kommt es in Echtzeitmessung zur Translokation von Zellproteinen und Botenstoffen und/oder zu einem Umbau des Zytoskeletts und damit entweder zu einer Erhöhung oder einer Erniedrigung der optischen Dichte innerhalb des Detektionsbereiches. Abhängig von der optischen Dichte innerhalb der 150 nm oberhalb des Biosensors kommt es zu einem positiv oder negativ ausgerichteten Mess-Signal (Lee et al., 2008). Die resultierende Signatur ist abhängig von der verwendeten Zellart, dem aktivierten Rezeptor und dem daraus resultierenden aktivierten Signalweg (Schröder et al., 2010/2011, Deng et al., 2013). Neben der Tatsache, dass bei der DMR-Messung die Aktivierung verschiedener G Proteine simultan gemessen werden kann, liegt ein weiterer Vorteil darin, dass es sich um ein sondenfreies Messverfahren handelt, bei dem also weder Rezeptoren noch Substanzen markiert und damit verändert werden müssen.

Versuchsdurchführung

Dem Protokoll Schröder et al. (2011) folgend, wurden die CHO-Zellen 24 Stunden vor der Messung in einer Dichte von 12.500 Zellen/Well in die Versuchsplatten ausgesät und die Platte für 10 Sekunden bei 800 rpm zentrifugiert, um Luftblasen zu entfernen. Die Zellen wurden anschließend für 24 Stunden bei 37° C, 5 % CO₂-Begasung und 96 %-Luftfeuchtigkeit inkubiert. Zur Ausschaltung von G_{i/o} und G_s Proteinen wurde fünf Stunden nach der Aussaat PTX (100 ng/ml) bzw. CTX (100 ng/ml) zugegeben. G_{q/11} Proteine wurden am Versuchstag nach dem Waschschrift mit dem G_{q/11}-Inhibitor FR blockiert. In der Regel wurden jeweils 40 μ l der Zellsuspension in die Kavitäten der Versuchsplatte ausgesät. Sollten die Zellen noch mit PTX und/oder CTX behandelt werden, wurden primär nur 30 μ l einpipettiert und nach fünf Stunden weitere 10 μ l des toxinhaltigen-Nährmediums

zugegeben.

24 Stunden später, nachdem sich ein dichter Zellrasen ausgebildet hatte, wurde das Nährmedium in allen Kavitäten mit einem 16-Kanalsauger entfernt und der Zellrasen zweimal mit 50 µl DMR-Inkubationspuffer (L13) gewaschen. Anschließend wurde entweder der $G_{q/11}$ -Inhibitor FR (Endkonzentration: 1 µM) oder der pan-G Protein-Aktivator AIF_4 (Endkonzentration 300 µM) hinzugefügt und die Wells mit DMR-Inkubationspuffer auf ein Endvolumen von 30 µl aufgefüllt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt von 10 Sekunden bei 800 rpm erfolgte der „baseline read“ im Epic[®]-Biosensor (G11). In einer weiteren Platte (source plate, V20) wurden die Testsubstanzen in vierfacher Konzentration im Inkubator ebenfalls auf 28° C erwärmt. Nach 3600 Sekunden wurden 10 µl der Testsubstanzen mittels der automatischen Pipettierstation SELMA[®] (G7) der Versuchsplatte (V2) zugegeben. Es schloss sich eine weitere Messung von 3600 Sekunden an, in der die G Protein-Aktivierung gemessen worden ist.

Auswertung

Die erhaltenen Messdaten wurden zunächst in ein Excel Programm konvertiert und die Rohdaten in GraphPad Prism[®] 5.03 überführt. Die Daten wurden in Form von repräsentativen Abbildungen eines Einzelversuches als Originalsignatur dargestellt und die Puffer-Werte von den erhaltenen Daten abgezogen. Zur Auswertung von Dosis-Wirkungskurven wurden die Messwerte nach 1500 Sekunden, nach 2400 Sekunden und als Area under the curve (3600 Sekunden) ermittelt und halblogarithmisch gegen die molare Konzentration aufgetragen.

3.5.6 Messung der ERK 1/2 Phosphorylierung

Die Messung der ERK 1/2 Phosphorylierung stellt ein gutes Messprinzip dar, um neben den in den Kapiteln 3.5.1 bis 3.5.5 beschriebenen funktionellen Versuchen, die zellulären Prozesse auf tiefergreifender Ebene darzustellen.

Theoretischer Hintergrund

Die Kinase ERK 1/2 (extracellular signal-related kinase) gehört zu der Familie der Mitogen-aktivierten Protein Kinasen (MAPK) und der Grad ihrer Phosphorylierung kann als

Messinstrument für eine G Protein-Aktivierung herangezogen werden. Die MAPK/ERK Kaskade ist in viele zelluläre Prozesse wie zum Beispiel die Transkription, Translation, Zellwachstum und Zelldifferenzierung involviert. Da die Effekte der verschiedenen G Proteine teilweise gegenläufig sind oder sich auch gegenseitig verstärken können, liegt der Vorteil dieses Versuches in der Messung eines Parameters, der ERK Phosphorylierung, welche unabhängig von der $G\alpha$ -Untereinheit des aktivierten G Proteins ist.

Versuchsdurchführung

24 Stunden vor Versuchsbeginn wurden die Zellen in einer Dichte von 25.000 Zellen pro Well und einem Volumen von 100 μ l in die Versuchsplatten (V25) ausgesät. Sollten die Zellen später noch mit einem G Protein-Inhibitor vorbehandelt werden, wurden zunächst 80 μ l der Zellsuspension ausgesät und fünf Stunden später weitere 20 μ l des toxischen Nährmediums hinzugefügt. Die Konzentration der Toxine lag analog zu den anderen Versuchen bei 100 ng/ml CTX bzw. PTX. Um den Basalwert zu senken und damit ein größeres Messfenster zu erhalten, wurde 24 Stunden nach der Aussaat das Medium für vier Stunden durch FKS-freies Nährmedium („Starvation medium“) ersetzt. Im Anschluss wird das Medium zu definierten Zeitpunkten durch 50 μ l der Testsubstanzen bzw. 50 μ l des FKS-freien Mediums zur Bestimmung des Basalwertes ersetzt. Die Inkubation der Zellen mit dem Agonisten lag zwischen zwei Minuten und zwei Stunden und erfolgte bei 37° C im Brutschrank. Im Anschluss an die zweistündige Inkubation wurde der Agonist/das Medium aus allen Kavitäten abgesaugt und die Zellen mit 50 μ l Lysispuffer (R23) lysiert und für 30 Minuten auf dem Schüttler bei Raumtemperatur von der Versuchsplatte abgelöst. Im Anschluss wurden 16 μ l des Lysats in eine 384-well Mikrotiter Platte (V8) überführt und 4 μ l des Antikörpers hinzugefügt. Nach zweistündiger Inkubation unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur konnte die Versuchsplatte im Mithras LB 960 (G27) vermessen werden.

Auswertung

Die erhaltenen Werte wurden in das Computerprogramm GraphPad Prism® 5.03 überführt und der Basalwert von den Messwerten subtrahiert. Wurde ein kinetisches Experiment durchgeführt, wurde für jeden Zeitpunkt der Substanzzugabe ein entsprechender Basalwert aufgenommen. Graphisch wurde anschließend das Verhältnis zwischen Messwert und Basalwert gegen die Zeit aufgetragen, woraus sich ein Zeitprofil ergeben hat, welches die ERK Phosphorylierung in Echtzeit wiedergibt.

Sollten Dosis-Wirkungskurven erstellt werden, wurden zu einem definierten Zeitpunkt alle zu untersuchenden Konzentrationen der Testsubstanz zeitgleich zugegeben und nur ein Basalwert in Form eines Triplikats gemessen. Die erhaltenen Werte wurden auf den Effekt normiert, den der Referenzagonist Acetylcholin bei einer Konzentration von 100 μM ausgelöst hat. Das untere Plateau wurde auf den Basalwert normiert. Die daraus erhaltenen Prozentzahlen wurden halblogarithmisch gegen die molare Konzentration aufgetragen und die Kurve, falls möglich, auf einen Hill-Koeffizienten von $n_H=1$ fixiert.

3.6 Statistik

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten statistischen Tests wurden mithilfe des Computerprogramms GraphPad Prism® 5.03 generiert. Die statistischen Prüfverfahren und die Bestimmung der Lage- und Streuungsparameter basierten auf der Annahme, dass die erhobenen Datensätze einer Normalverteilung unterlagen. Die mithilfe der „Vier-Parameter-logistischen Gleichung“ ermittelten Kenngrößen wurden für jede Kurve individuell bestimmt und die Gesamtkurve als Mittelwert \pm S.E.M. der Einzelversuche angegeben.

3.6.1 Deskriptive Statistik

Lage- und Streuungsparameter stellen wichtige Kenngrößen in der deskriptiven Statistik dar, um eine Aussage über die Einheitlichkeit der erhobenen Messwerte treffen zu können.

3.6.1.1 Der arithmetische Mittelwert und Standardfehler

Alle in dieser Arbeit angegebenen Mittelwerte waren arithmetische Mittel, die sich durch folgende Gleichung berechnen lassen:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} * \sum_{i=1}^n x_i \quad (\text{Gleichung 22})$$

- \bar{x} : Arithmetisches Mittel
- n : Anzahl an unabhängigen Experimenten
- x_i : Messwert des i -ten unabhängigen Experimentes

Als Streuungsmaß wurde der Standardfehler S.E.M. (standard error of the mean) angegeben, der mithilfe von Gleichung 22 berechnet werden kann (Gleichung 23):

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (\text{Gleichung 23})$$

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

Im Rahmen dieser Arbeit wird der Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M.) als Streuungsmaß verwendet. Der S.E.M. ermöglicht die Streuung der Einzelwerte um den Mittelwert genauer zu beleuchten.

$$S.E.M. = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (\text{Gleichung 24})$$

S.E.M.: Standard error of the mean; Standardfehler
SD: Standardabweichung (vgl. Gleichung 23)
n: Anzahl an unabhängigen Experimenten

Die Bestimmung des arithmetischen Mittels und des S.E.M. erfolgte computergestützt mithilfe des Programms GraphPad Prism® 5.03.

3.6.2 Statistische Tests

Statistische Tests werden durchgeführt, um anhand der erhobenen Daten, die einen Stichprobenbefund darstellen, Rückschlüsse auf die Grundgesamtheit ziehen zu können. Ein Hypothesentest entscheidet darüber, ob die Nullhypothese (es besteht kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen zwei Parametern) angenommen werden darf oder verworfen werden muss. Im Fall der Verwerfung greift eine Alternativhypothese, die mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit (α) von 5 % besagt, dass ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Parametern oder Messwerten besteht. Trifft der Erwartungswert zu wird die Nullhypothese akzeptiert. Alle hier beschriebenen statistischen Tests wurden zweiseitig durchgeführt und eine Irrtumswahrscheinlichkeit (α) von 5 % vorgegeben. Die Datenpunkte wurde mithilfe einer nichtlinearen Regressionsanalyse und der Vier-Parameter logistischen Gleichung (Gleichung 2) nach Barlow und Blake (1989) durch das Computerprogramm GraphPad Prism® 5.03 analysiert.

3.6.2.1 Der F-Test

Mithilfe des F-Tests wird entschieden, ob die Nullhypothese angenommen werden darf oder ob die Datenpunkte durch eine Alternativhypothese besser beschrieben werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde der F-Test angewendet, um zu prüfen, ob eine sigmoide Kurve einen Hill-Koeffizienten von $n_H = 1/-1$ aufweist. Konnte die Datenauswertung anhand einer $n_H = 1/-1$ fixierten Kurve erfolgen, wurde die Nullhypothese akzeptiert. Für den Fall, dass die Kurve mit einem Steilheitsmaß von $1/-1$ angepasst werden konnte, hing das Modell nur noch von drei Parametern ab, dem oberen und unteren Plateau (top und bottom) und dem EC_{50} -Wert. Konnte die Kurve nicht mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 1/-1$ fixiert werden, galt die Kurvenanpassung als „komplexes Modell“ und war neben den drei oben beschriebenen Parametern auch noch von dem Parameter der Kurvensteilheit n_H abhängig. Die Entscheidung zwischen den beiden Hypothesen wurde automatisch durch das Computerprogramm GraphPad Prism® 5.03 vorgenommen. Dieses Programm vergleicht den ermittelten F-Wert mit einem tabellierten und entscheidet welches der beiden Regressionsmodelle die Daten besser beschreiben kann. Ist der berechnete F-Wert größer als der tabellierte unterscheiden sich die analysierten Messwerte mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % voneinander. Der F-Test berücksichtigt die Anzahl an Freiheitsgraden und die Güte der Kurvenanpassung, beschrieben durch die Abstandsquadrate.

$$F = \frac{\frac{(SS_{Null} - SS_{Alt})}{SS_{Alt}}}{\frac{(DF_{Null} - DF_{Alt})}{DF_{Alt}}} \quad (\text{Gleichung 25})$$

F: F-Wert

SS_{Null} : Summe der Abstandsquadrate (Nullhypothese)

SS_{Alt} : Summe der Abstandsquadrate (Alternativhypothese)

DF_{Null} : Anzahl der Freiheitsgrade (Nullhypothese)

DF_{Alt} : Anzahl der Freiheitsgrade (Alternativhypothese)

Der Abstand jedes Datenpunktes von der Kurve wird quadriert und die einzelnen Abstandsquadrate summiert. Die Summe der quadrierten Abstandsquadrate ist umso kleiner, desto besser das gewählte Modell die Datenpunkte beschreiben kann (Motulsky und Christopoulos, 2004).

Der p-Wert wird von dem Computerprogramm GraphPad Prism® 5.03 automatisch ermittelt, indem die berechnete Prüfgröße des jeweiligen statistischen Tests einem Tabellenwert gegenübergestellt und ein entsprechender p-Wert zugeordnet wird.

$p < 0,05$: Die Alternativhypothese wurde angenommen und die Kurve mit einem variablen Steilheitsmaß angepasst; die Nullhypothese wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit (α) von 5 % verworfen

$p > 0,05$: Die Nullhypothese wurde angenommen und die Kurve mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H=1/-1$ fixiert (Motulsky und Christopoulos, 2004)

3.6.2.2 Ungepaarter, zweiseitiger Zweistichproben t-Test

Mittels eines ungepaarten, zweiseitigen Zweistichproben t-Tests wurde getestet, ob der Unterschied zwischen zwei in der Regressionsanalyse ermittelten Kenngrößen zufällig zustande gekommen war oder ob sich die zugrunde liegenden Grundgesamtheiten statistisch unterscheiden. Das Auswerteprogramm GraphPad Prism® 5.03 ermittelt automatisch einen p-Wert zu den generierten t-Werten. Ein statistischer Unterschied gilt als bewiesen, wenn $p < 0,05$ ist (mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %). Die Voraussetzung für die Gültigkeit ist jedoch eine Normalverteilung der Messwerte.

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right) * \frac{(n_1-1)*SD_1^2 + (n_2-1)*SD_2^2}{n_1+n_2-2}}} \quad (\text{Gleichung 26})$$

t: t-Wert
 \bar{x} : Arithmetischer Mittelwert
SD: Standardabweichung
n: Anzahl an unabhängigen Experimenten

3.6.2.3 Einstichproben t-Test

Der hier dem t-Wert zugeordnete p-Wert entschied darüber, ob der Mittelwert einer Versuchsreihe von einem hypothetischen Wert signifikant abwich.

$$t = \frac{\bar{x} - \mu_0}{S.E.M.} \quad (\text{Gleichung 27})$$

t: t-Wert
 \bar{x} : Arithmetischer Mittelwert
 μ_0 : Hypothetischer Wert
S.E.M.: Standard error of the mean; Standardfehler

Bei einem p-Wert $< 0,05$ wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % davon

ausgegangen, dass sich der getestete Mittelwert signifikant von dem hypothetischen Wert unterschied.

Sofern nicht anders angegeben bezieht sich die Angabe „t-Test“ in dieser Arbeit auf den ungepaarten, zweiseitigen Zweistichproben t-Test (Gleichung 26).

3.6.2.4 Analyse der Varianzen (ANOVA)

Sollen mehr als zwei Mittelwerte auf einen signifikanten Unterschied hin getestet werden, wurde das Analyseverfahren ANOVA angewendet. Hierbei unterscheidet man die einfaktorielle (One-way ANOVA) von der zweifaktoriellen (Two-way ANOVA) Analyse. Würde man jeden einzelnen Mittelwert gegen einen anderen testen, stiege die Irrtumswahrscheinlichkeit massiv an. Der Parameter F_{ANOVA} gibt analog zu der oben beschriebenen Methode an, ob die Nullhypothese angenommen oder verworfen werden muss. In der Analyse der Varianzen vereint der F_{ANOVA} -Wert die Varianzen der einzelnen Stichproben zu einer Gesamtvarianz und vergleicht diese mit den Varianzen der einzelnen Stichproben. Dieser Wert gibt an, ob die Nullhypothese (Alle Werte sind gleich) angenommen werden darf oder ob die Alternativhypothese (Zwischen mindestens zwei Mittelwerten besteht ein signifikanter Unterschied) greift. Er gibt also Auskunft über die Gleichheit der einzelnen Mittelwerte. F_{ANOVA} gibt das Verhältnis der Quadratsummen an, die zwischen den einzelnen Gruppen und innerhalb der Gruppen ermittelt worden sind. Ein p-Wert $< 0,05$ führte zur Annahme der Alternativhypothese.

$$F_{ANOVA} = \frac{\frac{SSB}{DFB}}{\frac{SSW}{DFW}} \quad (\text{Gleichung 28})$$

F_{ANOVA} : F-Wert der Varianzanalyse ANOVA

SSB: Quadratsumme zwischen den Gruppen

DFB: Anzahl der Freiheitsgrade zwischen den Gruppen

SSW: Quadratsumme innerhalb der Gruppen

DFW: Anzahl der Freiheitsgrade innerhalb der Gruppen

Wurde die Nullhypothese verworfen, schloss sich ein Post-Test an, um zu zeigen zwischen welchen Mittelwerten ein signifikanter Unterschied bestand. Der Dunnett's post-Test wurde angewendet, um potentielle Unterschiede zwischen den Mittelwerten und einem definierten Kontrollwert zu beleuchten. Der Bonferroni's post-Test schloss sich an, sofern alle Mittelwertspaare untereinander auf Signifikanz getestet werden sollten.

4 Ergebnisse

4.1 Radioligand-Bindungsversuche

4.1.1 Bindungseigenschaften der Membranhomogenate stabil transfizierter CHO-M1 Zellen

Die Charakterisierung der [³H]N-Methylscopolamin-Bindungseigenschaften am M1-Rezeptor erfolgte, wie in Kapitel 3.4.3 beschrieben, in homologen Konkurrenzexperimenten. Die Versuche wurden an Membranhomogenaten stabil transfizierter CHO-M1 Zellen durchgeführt. Die Kurvenanpassung der erhobenen Datenpunkte erfolgte mittels Nichtlinearer Regressionsanalyse und der „Vier-Parameter-logistischen Gleichung“ (Kapitel 3.4.3, Gleichung 2) nach Barlow und Blake (1989). Die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_D wurde mithilfe des Verfahrens nach Cheng und Prusoff (Kapitel 3.4.3, Gleichung 3) bestimmt, die maximale Anzahl an Bindungsstellen B_{max} nach DeBlasi (Kapitel 3.4.3, Gleichung 5). K_D ist ein Maß für die Affinität des Radioliganden zum Rezeptor und ist für die Analyse des Bindungsverhaltens der Testsubstanzen unbedingt erforderlich.

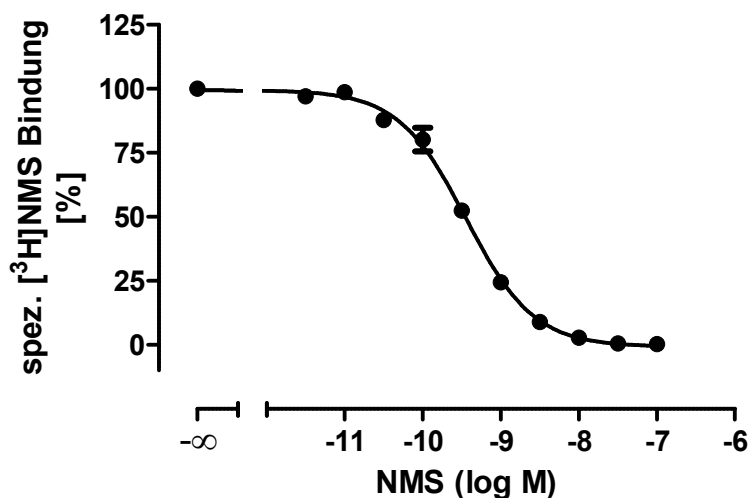


Abbildung 10: Homologe Konkurrenz mit dem Radioliganden [³H]NMS an CHO-M1 Zellen.

Ordinate: spezifische Bindung des Radioliganden [³H]NMS in Prozent der Gesamtbindung. Abszisse: dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration des nicht-markierten Kompetitors NMS. Die Versuche wurden an Membransuspensionen stabil transfizierter CHO-M1 Zellen mit einer Proteinkonzentration von 7,5 -10 µg pro ml in HEPES-Puffer (L8) durchgeführt. Der Versuchsansatz wurde für zwei Stunden in einem Schüttelwasserbad (G35) bei 30° C inkubiert. In Gegenwart von 10 µM des inversen Agonisten Atropin wurde die unspezifische Bindung bestimmt. Die Radioligandkonzentration im Versuchsansatz betrug 0,15 nM.

Zell-Linie	n	n_H	pK_D	B_{max} (pmol/mg)
CHO-M1	4	-1,06 ^{n.s.}	9,85 ± 0,20	5,38 ± 0,91

Tabelle 6: Bindungs-Charakteristika von [³H]NMS an Membranhomogenaten stabil transfizierter CHO-M1 Zellen.

Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E.M. n: Anzahl der Experimente. n_H : Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. pK_D : Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K_D . B_{max} : Anzahl der maximalen Bindungsstellen pro mg Rezeptor-Protein. ^{n.s.}: Nicht signifikant verschieden von einem Hill-Koeffizienten $n_H = -1$ (F-Test, $p > 0,05$). pK_D - und B_{max} -Werte beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten $n_H = -1$

Alle Einzelkurven ließen sich mit einem normalen Steilheitsmaß von $n_H = -1$ angleichen, was auf eine bimolekulare Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor-Protein und eine einheitliche Rezeptor-Population hindeutet.

4.1.2 Die drei orthosterischen Agonisten zeigten unterschiedliche Affinitäten für verschiedene Rezeptor-Populationen

Wie in Kapitel 3.4.4.1 erklärt, zeigen die Bindungsdaten von agonistischen Liganden häufig einen biphasischen Kurvenverlauf. Dieser ist dadurch bedingt, dass Agonisten unterschiedliche Affinitäten zu verschiedenen Rezeptor-Populationen zeigen. Liegt der Rezeptor bereits an G Proteine gekoppelt vor, weisen Agonisten eine höhere Affinität zu diesem Rezeptor-G Protein Komplex auf, als zu G Protein-entkoppelten Rezeptoren. In diesem Zusammenhang spricht man von einem hochaffinen und einem niedrigaffinen Rezeptorzustand (De Lean et al., 1980, Hulme et al., 1990).

4 Ergebnisse

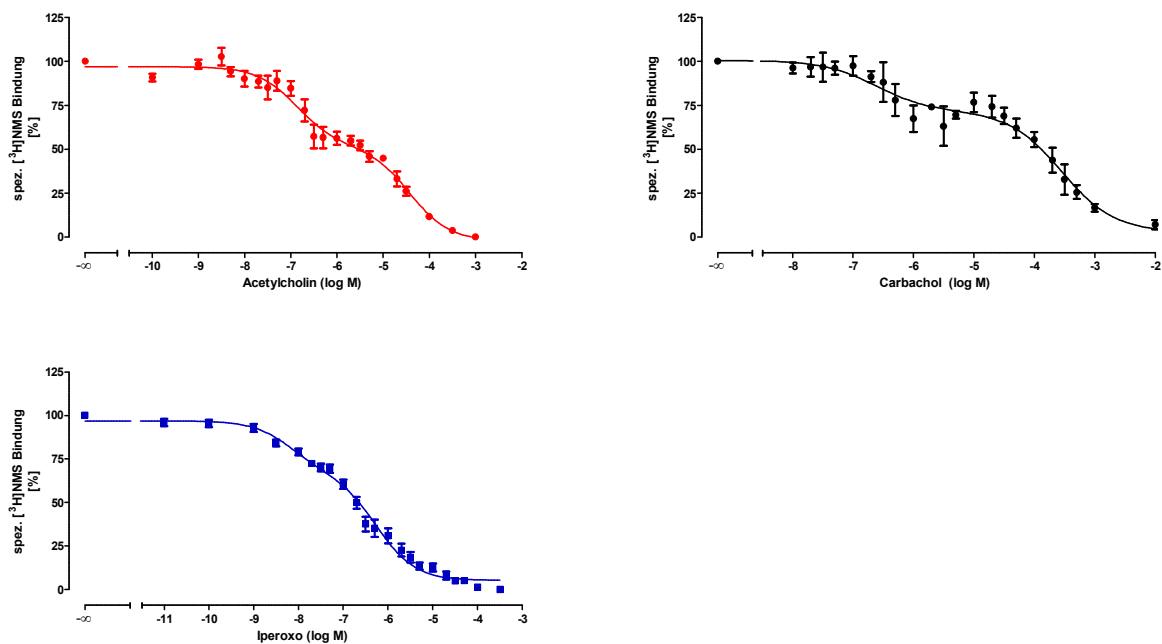


Abbildung 11: Biphasischer Kurvenverlauf der agonistischen Bindungsdaten deutete auf heterogenes Rezeptor-Kollektiv hin.

Ordinate: spezifische Bindung des Radioliganden $[^3\text{H}]\text{NMS}$ in Prozent der Gesamtbindung. Abszisse: dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanzen. Die Versuche wurden an Membransuspensionen stabil transfizierter CHO-M1 Zellen mit einer Proteinkonzentration von 7,5 -20 μg pro ml in HEPES-Puffer (L8) durchgeführt. Die Radioligandkonzentration im Versuchsansatz betrug 0,15 nM.

Testsubstanz	Bi vs. Mono	$\text{pK}_{\text{app}(\text{hoch})}$	$\text{pK}_{\text{app}(\text{niedrig})}$	hochaffine Fraktion (%)
Acetylcholin	3/1	$7,12 \pm 0,07$	$4,51 \pm 0,02$	$36,5 \pm 4,3$
Carbachol	3/0	$6,46 \pm 0,16$	$3,48 \pm 0,08$	$31,5 \pm 0,1$
Iperoxo	6/0	$8,22 \pm 0,09$	$6,17 \pm 0,06$	$36,1 \pm 6,9$

Tabelle 7: Bindungs-Charakteristika der drei orthosterischen Agonisten an Membranhomogenaten stabil transfizierter CHO-M1 Zellen.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus drei bis sechs Einzelversuchen in Vierfachbestimmung. Bi vs. Mono: gibt das Verhältnis an, wie viele Einzelversuche sich besser mit einer biphasischen im Vergleich zu einer monophasischen Kurvenauswertung beschreiben lassen. $\text{pK}_{\text{app}(\text{hoch})}$ und $\text{pK}_{\text{app}(\text{niedrig})}$: Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten $K_{\text{app}(\text{hoch})}$ für die hochaffine Rezeptorfraktion und $K_{\text{app}(\text{niedrig})}$ für die niedrigaffine Rezeptorfraktion.

Die Einzelversuche der drei untersuchten Substanzen ließen sich überwiegend besser mithilfe von Gleichung 12 nach einem biphasischen Modell auswerten. Das zeigt, dass das

untersuchte Membranhomogenat unterschiedliche Rezeptor-Populationen aufgewiesen hat. In etwa ein Drittel der Rezeptoren lagen bereits an G Proteine gekoppelt vor und die drei Agonisten konnten mit hoher Affinität an diesen Rezeptor-G Protein Komplex binden. Die Bindungsaffinität zum hochaffinen Rezeptorzustand lag für Iperoxo um etwa eine Dekade höher, als die von Acetylcholin, die Affinität zum niedrigaffinen Rezeptorzustand um etwa 1,5 Dekaden. Die Affinitäten von Carbachol zum hochaffinen und zum niedrigaffinen Rezeptorzustand sind um etwa eine Dekade geringer, als die von Acetylcholin.

4.2 Dissoziationskinetik: Zwei-Punkt Kinetik

4.2.1 Dualsterische Liganden verzögerten die [³H]NMS-Dissoziation an M1-Rezeptoren

Orthosterische Liganden passieren zunächst die allosterische Bindungstasche ehe sie an das orthosterische Haftareal des Rezeptor-Proteins binden (Kruse et al., 2012). Dadurch weisen rein allosterisch-bindende Substanzen häufig einen dissoziationsverzögernden Effekt auf. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Hybridliganden können ebenfalls einen rein-allosterischen Bindungsmodus aufweisen oder simultan an die orthosterische und allosterische Bindungstasche haften. Um Konkurrenzexperimente trotzdem unter Gleichgewichtsbedingungen durchführen zu können, wurde zunächst anhand von Dissoziationskinetiken nach dem Protokoll der „Zwei-Punkt Kinetik“ nach Kostenis und Mohr (1996) wie in Kapitel 3.4.5.1 beschrieben, der dissoziationsverzögernde Effekt der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten dualsterischen Substanzen quantifiziert.

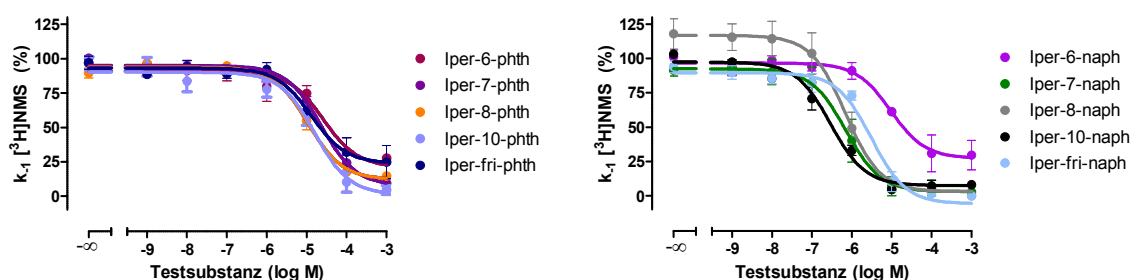


Abbildung 12: Ermittlung der Affinität der dualsterischen Hybridliganden zum [³H]NMS besetzen M1-Rezeptor.

Dieser Versuch wurde an Membranhomogenaten stabil transfizierter CHO-M1 Zellen durchgeführt. Ordinate: Geschwindigkeitskonstante der [³H]NMS-Dissoziation. 100% entspricht der Geschwindigkeitskonstante ohne allosterische Modulation. 0% entspricht dem Wert, der einer vollständigen Blockierung der [³H]NMS-Dissoziation vom Rezeptor durch die Testsubstanzen entsprechen würde. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanzen.

4 Ergebnisse

Die dosisabhängige Verminderung der Geschwindigkeitskonstanten k_{-1} zeigt, dass alle im Rahmen dieser Arbeit getesteten Hybridliganden die [^3H]NMS-Dissoziation vom Rezeptor-Protein verlangsamten. Die Parameter für die in Abbildung 12 dargestellten Kurven wurden in Tabelle 8 zusammengefasst.

Testsubstanz	n	n_H	Unteres Plateau (%)	pEC_{50Diss}
Iper-6-phth	3	-1,13 ^{n.s.}	21,1 ± 9,9 ^{N.S.}	4,59 ± 0,25
Iper-7-phth	2	-0,86 ^{n.s.}	7,7 ± 3,2 ^{N.S.}	4,64 ± 0,08
Iper-8-phth	2	-1,17 ^{n.s.}	12,1 ± 4,9 ^{N.S.}	4,97 ± 0,14
Iper-10-phth	2	-0,93 ^{n.s.}	1,2 ± 5,4 ^{N.S.}	4,80 ± 0,14
Iper-fri-phth	3	-1,26 ^{n.s.}	23,8 ± 5,2 ⁺	4,89 ± 0,16
Iper-6-naph	3	-1,17 ^{n.s.}	27,3 ± 5,8 ⁺⁺	5,03 ± 0,15
Iper-7-naph	2	-1,10 ^{n.s.}	3,1 ± 4,8 ^{N.S.}	6,15 ± 0,15
Iper-8-naph	2	-1,04 ^{n.s.}	3,2 ± 8,6 ^{N.S.}	6,16 ± 0,16
Iper-10-naph	2	-0,71 ^{n.s.}	7,5 ± 3,9 ^{N.S.}	6,53 ± 0,11
Iper-fri-naph	4	-1,56 ^{n.s.}	-5,7 ± 6,0 ^{N.S.}	5,51 ± 0,13

Tabelle 8: Bindungs-Charakteristika der dualsterischen Hybride zum [^3H]NMS-besetzten M1-Rezeptor.

Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E.M. aus zwei bis vier Einzelversuchen in Doppelbestimmung. n: Anzahl der Experimente. n_H : Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. Unteres Plateau: Unteres Plateau der Kurvenverläufe. pEC_{50Diss} : Negativer dekadischer Logarithmus der Testsubstanz-Konzentration, die zu einer halbmaximalen Verzögerung der [^3H]NMS-Dissoziation geführt hat. ^{n.s.}: Nicht signifikant verschieden von einem Hill-Koeffizienten $n_H = -1$ (F-Test, $p > 0,05$). ^{N.S.}: Nicht signifikant verschieden von einer vollständigen Dissoziationsverzögerung (t-Test, $p > 0,05$). ^{+,++}: Signifikant verschieden von einer vollständigen Dissoziationsverzögerung (t-Test, $p < 0,05, 0,01$).

Alle Kurven konnten mit einem normalen Steilheitsmaß von $n_H = -1$ angepasst werden. Bei den beiden Substanzen Iper-6-naph und Iper-fri-phth kam es zu einer unvollständigen Dissoziationsverzögerung. Auch bei hohen Testsubstanz-Konzentrationen von 1 mM konnte der Radioligand noch vom Rezeptor-Protein abdissoziieren. Alle anderen hier untersuchten Hybridliganden führten in hohen Konzentrationen zu einer vollständigen Dissoziations-

verzögerung. Mit Ausnahme der beiden Hybride Iper-6-phth und Iper-6-naph zeigten alle „naph-Hybride“ eine signifikant höhere Affinität für den [^3H]NMS-besetzten M1-Rezeptor als ihre korrespondierenden Hybridliganden mit dem kleineren allosterischen Rest Phthalimid. Das steht in Einklang mit den funktionellen Daten aus den IP1-Assays (vgl. Tabelle 13, Kapitel 4.4.1.5.3), in denen die „naph-Hybride“, mit Ausnahme von Iper-10-naph, ebenfalls eine höhere Wirksamkeit am M1-Rezeptor gezeigt haben, als die „phth-Hybride“.

4.3 Radioligandbindungsversuche mit dualsterischen Hybridliganden

Auf der Basis der zuvor durchgeführten Dissoziationskinetiken wurde die Inkubationszeit berechnet, die benötigt wird, um Bindungsversuche im Reaktionsgleichgewicht durchzuführen. Die berechnete Inkubationsdauer variierte stark zwischen den einzelnen Hybridliganden und wurde somit für alle Testsubstanzen auf 16 Stunden festgesetzt, um eine Vergleichbarkeit zwischen den Hybriden zu gewährleisten, da es aufgrund der langen Inkubationszeit bei 30° C eventuell zu einem Rezeptor-Abbau oder einer Schädigung der Membran kommen kann. Des Weiteren wurde zeitgleich eine homologe Konkurrenz durchgeführt, die ebenfalls für 16 Stunden bei 30° C inkubiert wurde, um auf der Basis der hier berechneten K_D -Werte, die K_I -Werte der Hybridliganden zu ermitteln. Eine Schädigung der Rezeptoren oder der Membran würde sich hier auch zeigen.

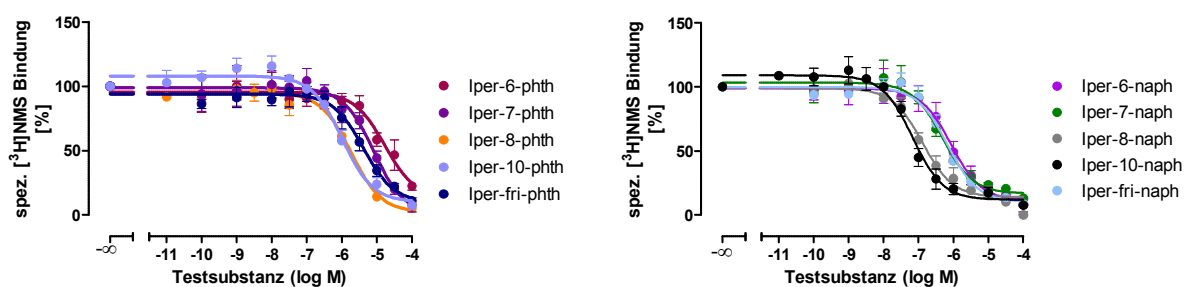


Abbildung 13: „Naph-Hybride“ zeigten eine höhere Affinität zum M1-Rezeptor als „phth-Hybride“.

Die Versuche wurden an Membransuspensionen stabil transfizierter CHO-M1 Zellen mit einer Proteinkonzentration von 7,5 -15 μg pro ml in HEPES-Puffer (L8) durchgeführt. Die Radioligandkonzentration im Versuchsansatz betrug 0,15 nM. Der Zusatz von GDP 100 μM führte zu einer Entkopplung der Rezeptoren von G Proteinen. Ordinate: spezifische Bindung des Radioliganden [^3H]NMS in Prozent der Gesamtbindung. Abszisse: dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanzen.

4 Ergebnisse

Testsubstanz	n	n_H	pK_i
Iper-6-phth	3	-0,49 ^{n.s.}	4,71 ± 0,04
Iper-7-phth	3	-0,99 ^{n.s.}	5,23 ± 0,02
Iper-8-phth	4	-0,99 ^{n.s.}	6,04 ± 0,05
Iper-10-phth	3	-0,95 ^{n.s.}	6,00 ± 0,17
Iper-fri-phth	4	-0,99 ^{n.s.}	5,57 ± 0,05
Iper-6-naph	3	-0,95 ^{n.s.}	6,34 ± 0,03
Iper-7-naph	4	-1,19 ^{n.s.}	6,55 ± 0,07
Iper-8-naph	3	-0,87 ^{n.s.}	8,08 ± 0,04
Iper-10-naph	3	-1,28 ^{n.s.}	7,16 ± 0,16
Iper-fri-naph	4	-1,23 ^{n.s.}	6,33 ± 0,05

Tabelle 9: Bindungs-Charakteristika der dualsterischen Liganden an Membranhomogenaten stabil transfizierter CHO-M1 Zellen.

Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E.M. aus drei bis vier Einzelversuchen in Vierfachbestimmung. n: Anzahl der Experimente. n_H : Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. pK_i : Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K_i . ^{n.s.}: Nicht signifikant verschieden von einem Hill-Koeffizienten $n_H = -1$ (F-Test, $p > 0,05$).

Alle Kurven konnten mit einem normalen Steilheitsmaß von $n_H = -1$ angepasst werden. Durch die Zugabe von GDP 100 μ M wurden bei der Untersuchung der Hybridliganden ausschließlich monophasische Kurvenverläufe mit nur einem Wendepunkt detektiert. Der Zusatz von Guanylnukleotiden, wie zum Beispiel Guanosin-5'-diphosphat (GDP) oder Guanosin-5'-triphosphat (GTP), im Überschuss führt zu einer Entkopplung der Rezeptoren von G Proteinen und somit zu einer Verminderung der Agonist-Affinität zum Rezeptor. Durch die Zugabe von Guanylnukleotiden resultiert ein homogenes Rezeptorkollektiv, in dem alle Rezeptoren im G Protein-entkoppelten Zustand vorliegen. Der hochaffine, G Protein-gekoppelte Rezeptorzustand entfällt folglich und es resultieren monophasische Kurvenverläufe mit nur einem Wendepunkt, da die Agonisten nicht mehr zwischen einem hochaffinen und einem niedrigaffinen Rezeptorzustand unterscheiden.

Wie bereits in Kapitel 4.2.1 beschrieben, konnte auch in diesen Versuchen eine höhere

Affinität der „naph-Hybride“ im Vergleich zu ihren korrespondierenden „phth-Hybriden“ detektiert werden.

4.4 Funktionelle Untersuchungen

Die zuvor beschriebenen Radioligand-Bindungsstudien dienten der Datenerhebung über die Art und die Affinität der Bindung zwischen Liganden und dem Rezeptor-Protein. In den folgenden Kapiteln sollen nun die durch G Protein-Aktivierung eingeleiteten intrazellulären Prozesse genauer charakterisiert werden. Infolge einer Rezeptor-Aktivierung wird eine, für das jeweilige G Protein typische, intrazelluläre Signalkaskade in Gang gesetzt. Es kommt zu einer Generierung sekundärer Botenstoffe, wie zum Beispiel Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG) durch G_{q/11} Protein-Aktivierung, einer Erhöhung der cAMP-Konzentration durch G_s Proteine beziehungsweise einer Erniedrigung der cAMP-Konzentration durch Aktivierung von G_{i/o} Proteinen. Durch quantitative Messverfahren lässt sich der Gehalt an intrazellulären Botenstoffen bestimmen, wodurch in der Folge Rückschlüsse auf die Rezeptor- und G Protein-Aktivierung gezogen werden können.

4.4.1 Messung des intrazellulären IP₁-Gehaltes

Ungeradzahlige Subtypen der Rezeptor-Familie der muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren koppeln bevorzugt an G Proteine der G_{q/11}-Familie. Deswegen wurde dieser Signalweg in der hier vorliegenden Arbeit als Erstes charakterisiert. Im Fall des hier gemessenen IP₁'s handelt es sich um ein Abbauprodukt des durch G_{q/11} Protein-Aktivierung generiertem Inositoltriphosphates (IP₃'s), welches durch die Zugabe von Lithium-Ionen zum Inkubationspuffer stabil bleibt und dadurch quantitativ bestimmt werden kann.

4.4.1.2 Der endogene Agonist Acetylcholin führte zu einer Rezeptor-vermittelten Generierung von IP₁

Um eine Rezeptor-vermittelte Zellantwort in CHO-M1 Zellen zu verifizieren, wurde zunächst getestet, ob sich auch ein messbares Signal ergibt, wenn dieser Versuch an untransfizierten Zellen durchgeführt wird. Dafür wurden CHO-K1 Zellen verwendet, die selbst weder muskarinische Rezeptoren noch Cholinesterasen exprimieren. Dementsprechend sollte es in Versuchen mit Acetylcholin zu keiner G Protein-Aktivierung kommen.

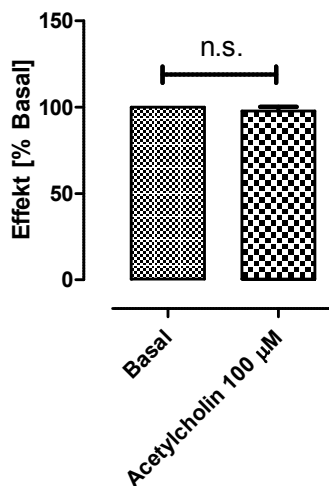


Abbildung 14: Untransfizierte CHO-Zellen (CHO-K1) zeigten im Vergleich zum Basalwert keine signifikante Steigerung der intrazellulären IP1-Synthese.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus zehn Einzelversuchen ($n=10$). Ordinate: Effekt des Agonisten auf die IP1-Synthese in CHO-K1 Zellen. 100 % entspricht dem Basalwert.

Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen deutlich, dass Acetylcholin keine Zellantwort in CHO-K1 Zellen hervorgerufen hat. In Konzentrationen von 100 μ M kam es ebenfalls nicht zu unspezifischen Effekten zwischen dem Liganden und dem Rezeptor-Protein. Eine gesteigerte IP1-Synthese, die in den Versuchen an CHO-Zellen, die mit der cDNA des muskarinischen Acetylcholin-Rezeptors vom Subtyp 1 transfiziert worden sind, detektiert wurde, beruhte demzufolge auf spezifischen Effekten zwischen Acetylcholin und dem Rezeptor-Protein und basierte auf einer direkten Interaktion zwischen dem Agonisten und dem M1 Rezeptor.

4.4.1.3 Der endogene Agonist Acetylcholin führte zu einer $G_{q/11}$ -vermittelten Generierung von IP1

Acetylcholin ist der endogene Ligand, der auch im menschlichen Körper an muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren bindet und diese aktiviert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Acetylcholin in jedem Assay gemessen und bei der späteren Auswertung der Versuche als Referenzagonist gesetzt. Die Zellantwort, die durch 100 μ M Acetylcholin ausgelöst wurde, wurde als 100 %-Wert gesetzt und die Effekte der anderen Liganden darauf normiert.

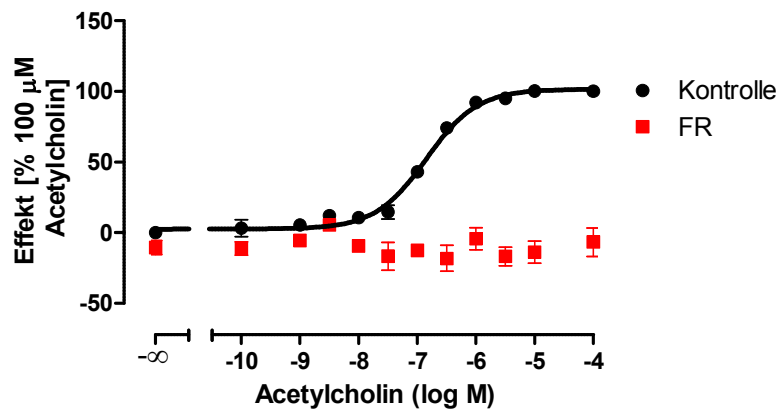


Abbildung 15: Acetylcholin führte zu einer $G_{q/11}$ -vermittelten Generierung von IP1.

Ordinate: Prozentuale Zellantwort. 0 % entspricht dem Basalwert, 100 % entspricht dem Effekt, der durch 100 μM Acetylcholin unter Kontrollbedingungen ausgelöst wurde. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Legende: Kontrolle: kein Zusatz von Inhibitoren. FR: Zusatz von 1 μM des $G_{q/11}$ Protein-spezifischen Inhibitors FR.

Mithilfe des $G_{q/11}$ Protein-Inhibitors FR konnte die Beteiligung von $G_{q/11}$ Proteinen an der Generierung von IP1 verifiziert werden, da es durch den spezifischen Inhibitor zu einer vollständigen Blockade der Zellantwort gekommen ist. Auch in hohen Konzentrationen des potenten Rezeptor-Agonisten konnte unter Einsatz von FR kein Signal detektiert werden, welches sich signifikant von dem Basalwert unterschieden hat.

Testsubstanz	n	n_H	E_{max} (%)	pEC_{50}
Acetylcholin	3	$1,22 \pm 0,12^{n.s.}$	$100,8 \pm 0,2^+$	$6,86 \pm 0,01$

Tabelle 10: Kenngrößen \pm S.E.M. der Konzentrations-Effekt Kurve aus Abbildung 15.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus drei Einzelversuchen in Dreifachbestimmung. n: Anzahl der Experimente. n_H : Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. E_{max} : Maximale Zellantwort in Prozent, beschrieben durch das obere Plateau, welches auf den Effekt von Acetylcholin 100 μM unter Kontrollbedingungen normiert wurde. pEC_{50} : Negativer dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz, welche eine halbmaximale Zellantwort hervorgerufen hat. ^{n.s.}: Nicht signifikant verschieden von einem Hill-Koeffizienten $n_H=1$ (F-Test, $p>0,05$). ⁺: Signifikant verschieden von 100 %, also von der Zellantwort, die durch 100 μM Acetylcholin ausgelöst wurde (t-Test, $p<0,05$).

4.4.1.4 Die beiden orthosterischen Agonisten Carbachol und Iperoxo zeigten vollagonistisches Verhalten an CHO-M1 Zellen

Carbachol und Iperoxo sind weitere Beispiele für muskarinische Agonisten, die ebenfalls an der orthosterischen Bindungstasche des Rezeptor-Proteins angreifen. Carbachol und Iperoxo können an alle fünf Subtypen der muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren binden. Iperoxo weist die höchste Affinität für den Subtyp M2 auf (Dissertation Kaufel, 2010).

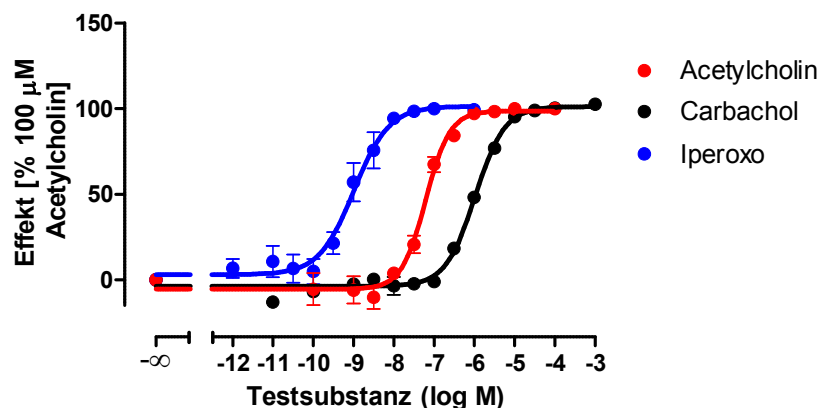


Abbildung 16: Carbachol und Iperoxo zeigten im Vergleich zu dem Referenzagonisten Acetylcholin ebenfalls vollagonistisches Verhalten, jedoch mit unterschiedlicher Wirksamkeit.

Ordinate: Zellantwort in Prozent. 100 % entspricht dem Effekt, der durch 100 µM Acetylcholin ausgelöst wurde. 0 % entspricht dem Basalwert. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanzen.

Testsubstanz	n	n_H	E_{max}	pEC_{50}
Acetylcholin	3	$1,45 \pm 0,20^*$	$100,9 \pm 0,7^{NS}$	$7,19 \pm 0,05$
Carbachol	4	$1,18 \pm 0,09^*$	$101,3 \pm 0,8^{NS}$	$5,96 \pm 0,02^{###}$
Iperoxo	6	$1,22 \pm 0,26^{n.s.}$	$99,9 \pm 0,3^{NS}$	$9,00 \pm 0,06^{###}$

Tabelle 11: Kenngrößen \pm S.E.M. der Konzentrations-Effekt Kurven aus Abbildung 16.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus drei bis sechs Einzelversuchen in Dreifachbestimmung. n: Anzahl der Experimente. n_H : Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. E_{max} : Maximale Zellantwort in Prozent, beschrieben durch das obere Plateau, welches auf den Effekt von Acetylcholin 100 µM unter Kontrollbedingungen normiert wurde. pEC_{50} : Negativer dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanzen, welche eine halbmaximale Zellantwort hervorgerufen hat. *: Signifikanter Unterschied zu einem Hill-Koeffizienten $n_H=1$ (F-Test, $p<0,05$). $n.s.$: Nicht signifikant verschieden von einem Hill-Koeffizienten $n_H=1$. NS : Nicht signifikant verschieden von dem Effekt, welcher durch 100 µM Acetylcholin ausgelöst wurde. $^{###}$: Signifikanter Unterschied zwischen dem pEC_{50} -Wert der Testsubstanz und dem pEC_{50} -Wert des Referenzagonisten Acetylcholin (t-Test, $p<0,001$).

Iperoxo ist ein orthosterischer Muskarinrezeptor-Agonist mit einer sehr hohen Wirksamkeit. Tabelle 11 zeigt, dass Iperoxo an CHO-M1 Zellen in etwa 100-fach wirksamer war als der endogene Agonist Acetylcholin. Dieser Befund steht in Einklang mit den Ergebnissen ehemaliger Doktoranden an den anderen Muskarinrezeptor-Subtypen (Dissertation Janßen, 2011; Bock et al., 2012; Dissertation Vogel, 2015). Carbachol war im Vergleich zu Acetylcholin in etwa 10-fach schwächer wirksam. In ihrer intrinsischen Aktivität unterschieden sich Carbachol und Iperoxo nicht von dem endogenen Liganden Acetylcholin.

4.4.1.5 Dualsterische Hybridliganden konnten ebenfalls eine IP1-Synthese vermitteln

Im weiteren Verlauf sollte getestet werden, ob auch dualsterische Liganden in der Lage sind, $G_{q/11}$ - und Rezeptor-vermittelt die Signalkaskade der $G_{q/11}$ -Proteine zu aktivieren. Zu diesem Zweck wurden sowohl der $G_{q/11}$ -Inhibitor FR als auch untransfizierte CHO-Zellen (CHO-K1) in IP1-Assays mit Hybridliganden verwendet.

4.4.1.5.1 Hybridliganden führten in hohen Konzentrationen zu unspezifischen Effekten an CHO-Zellen

Anhand dieser Versuche konnte gezeigt werden, dass die hier verwendeten Hybridliganden in hohen Konzentrationen auch unspezifische Effekte an CHO-Zellen aufwiesen. Die gemessenen Effekte an CHO-M1 Zellen können also nur bis zu einer bestimmten Konzentration auf spezifische Effekte zwischen den dualsterischen Liganden und dem Rezeptor-Protein zurückgeführt werden. Ab welcher Konzentration unspezifische Effekte beobachtet werden konnten, ist Tabelle 12 zu entnehmen und variiert zwischen den einzelnen Hybrids-substanzen. Es lässt sich keine generelle Aussage über eine Korrelation zwischen dem Auftreten von unspezifischen Effekten und der Beschaffenheit des allosterischen Substituenten oder der Länge der „Linker“-Kette treffen.

4 Ergebnisse

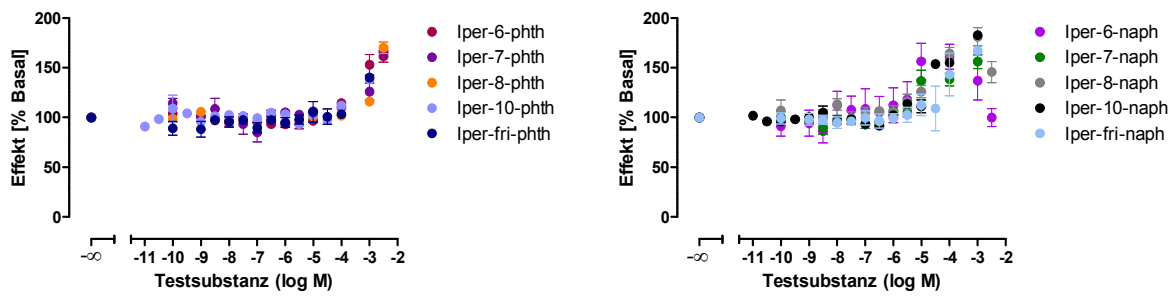


Abbildung 17: Unspezifische Effekte der Hybridliganden, gemessen an untransfizierten CHO-Zellen (CHO-K1).

Ordinate: Zellantwort in Prozent. 100 % entspricht dem Basalwert, 0 % entspricht Null. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanzen.

Testsubstanz	Konzentration ab der es zu unspezifischen Effekten kommt
Iper-6-phth	100 μM^{**}
Iper-7-phth	10 μM^{***}
Iper-8-phth	3 μM^{***}
Iper-10-phth	100 μM^*
Iper-fri-phth	10 μM^{**}
Iper-6-naph	10 μM^{**}
Iper-7-naph	1 mM^*
Iper-8-naph	100 μM^{**}
Iper-10-naph	30 μM^*
Iper-fri-naph	1 mM^{**}

Tabelle 12: Dualsterische Liganden führten in hohen Konzentrationen zu unspezifischen Effekten an CHO-Zellen.

*, **, ***: Signifikanter Unterschied zwischen dem gemessenen Wert und dem Basalwert (One-way ANOVA, Dunnett's post-Test $p < 0,05$, $0,01$, $0,001$).

Die Versuche an CHO-K1 Zellen zeigten, dass die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Hybridliganden in hohen Konzentrationen zu unspezifischen Effekten an den CHO-Zellen

fürten. Für die weiteren Versuche an CHO-M1 Zellen war diese Kenntnis von enormer Wichtigkeit, da die Auswertung dieser Versuche nur auf spezifischen Effekten zwischen dem Liganden und dem Rezeptor-Protein beruhen sollte.

4.4.1.5.2 Hybridliganden zeigten eine $G_{q/11}$ -vermittelte IP1-Synthese in CHO-M1 Zellen

Des Weiteren sollte die Beteiligung von $G_{q/11}$ Proteinen an der Generierung von intrazellulärem IP1 verifiziert werden. Hierfür wurde der $G_{q/11}$ -Inhibitor FR, wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben, im IP1 Assay verwendet.

4 Ergebnisse

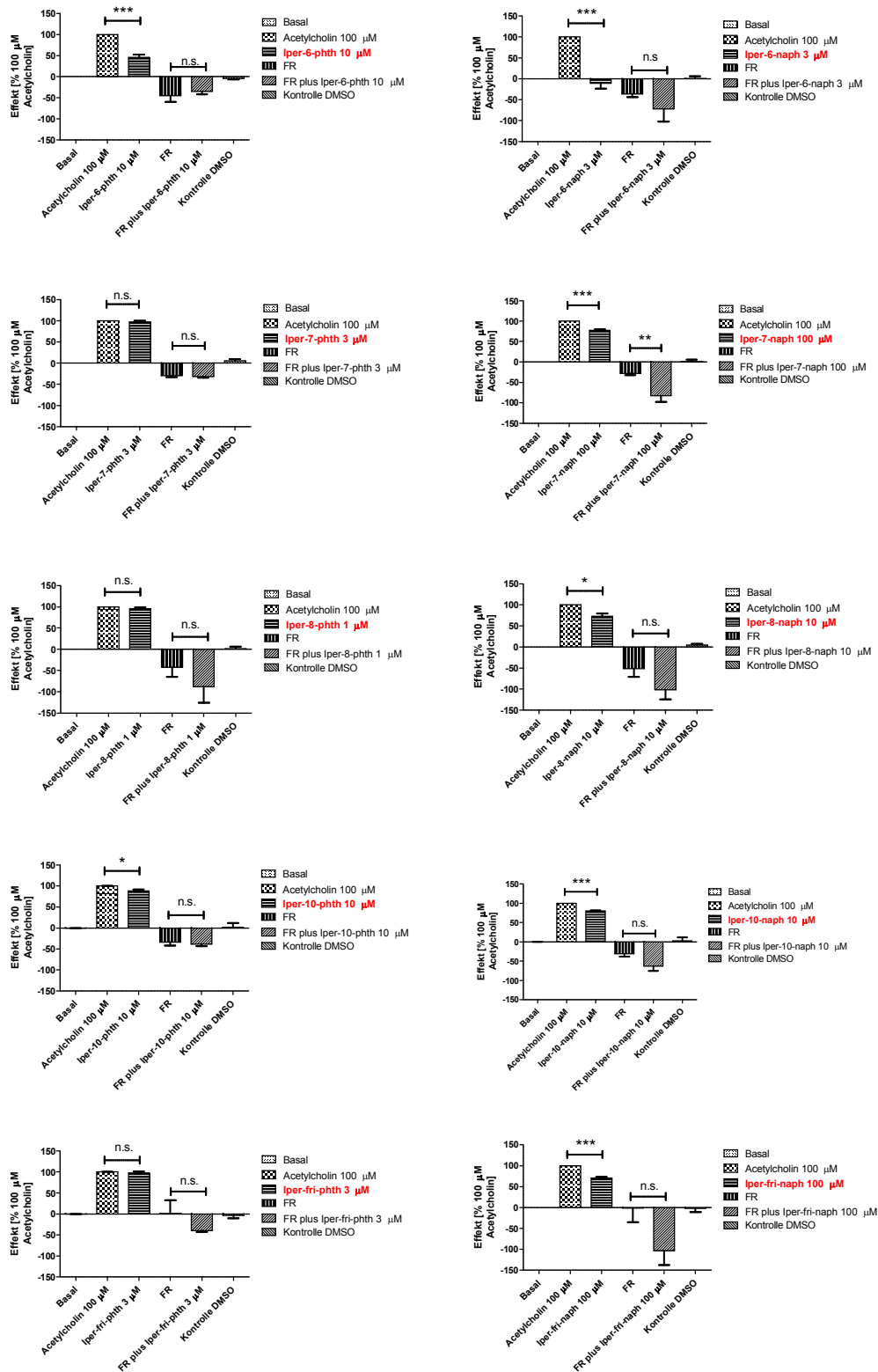


Abbildung 18: IP1 Generierung durch dualsterische Hybridliganden war G_q-vermittelt. Ordinate: Zellantwort in Prozent. 100 % entspricht dem Effekt, der durch 100 µM Acetylcholin ausgelöst wurde. 0 % entspricht dem Basalwert. n.s.: Kein signifikanter Unterschied zwischen dem Kontrollwert und der Testsubstanz (t-Test). *, **, ***: Signifikanter Unterschied zwischen dem Kontrollwert und der Testsubstanz (t-Test p<0,05, 0,01, 0,001).

In den obigen Balkendiagrammen wird der Effekt auf die intrazelluläre IP1-Synthese gezeigt, der durch die jeweiligen dualsterischen Hybridliganden ausgelöst wurde. Iper-6-naph war die einzige Substanz, die im Rahmen dieser Arbeit getestet worden ist, welche, in der untersuchten Konzentration, keine $G_{q/11}$ Protein-Aktivierung zeigte. In vorhergehenden Radioligand-Bindungsstudien wurde jedoch gezeigt, dass Iper-6-naph an den M1-Rezeptor binden konnte. Demzufolge ergab sich hier der erste Hinweis darauf, dass Iper-6-naph ein Antagonist an M1-Rezeptoren ist, da es zwar an den Rezeptor binden kann, jedoch keine intrinsische Aktivität für diesen Rezeptor aufweist. Im Vergleich zu Iper-6-naph war Iper-6-phth, dessen einziger Unterschied zu Iper-6-naph in einem kleineren allosterischen Substituenten liegt, ein Partialagonist für $G_{q/11}$ -abhängige Signalwege. Dieses Muster spiegelte sich auch bei den Substanzen mit längeren „Linker“-Ketten wider. Generell konnten die Hybride mit dem kleineren allosterischen Rest Phthalimid signifikant besser $G_{q/11}$ -abhängige Signalwege aktivieren als ihre korrespondierenden Hybridsubstanzen mit dem voluminöseren allosterischen Substituenten Naphthalimid. Erst bei einer Kettenlänge von zehn Kohlenstoff-Atomen kam es zwischen den korrespondierenden Hybriden zu keinem signifikanten Unterschied mehr in der intrinsischen Aktivität. Die Hybride mit einer „Diamid-Linker“-Kette („fri-Hybride“) wiesen einen hoch signifikanten Unterschied untereinander auf, der allein durch den allosterischen Rest bedingt war. Iper-fri-phth zeigte vollagonistisches Verhalten für $G_{q/11}$ -abhängige Signalwege, während Iper-fri-naph ein Partialagonist mit einer intrinsischen Aktivität von $75,7 \pm 0,6 \%$ war. Die Zellantwort nach FR-Behandlung sank in der Regel unter das Level des Basalwertes, was auf eine Spontanaktivität der untersuchten Zellen hindeutete. In der Kombination von $G_{q/11}$ -Inhibitor FR und der Testsubstanz zeigten sich keine signifikant unterschiedlichen Effekte im Vergleich zu einer alleinigen FR-Behandlung der Zellen. Die einzige Ausnahme bildete hier die Testsubstanz Iper-7-naph, die einen signifikanten Unterschied zwischen FR und der Kombination von FR und der Testsubstanz zeigte. Warum sich dieser Unterschied im Fall von Iper-7-naph zeigte, ist jedoch unklar.

4.4.1.5.3 Hybridliganden mit einem kleineren allosterischen Rest konnten $G_{q/11}$ -abhängige Signalkaskaden besser aktivieren

Im Folgenden sollte getestet werden, ob sich durch die zu untersuchenden Hybridliganden konzentrationsabhängige Effekte in der IP1-Generierung ergeben.

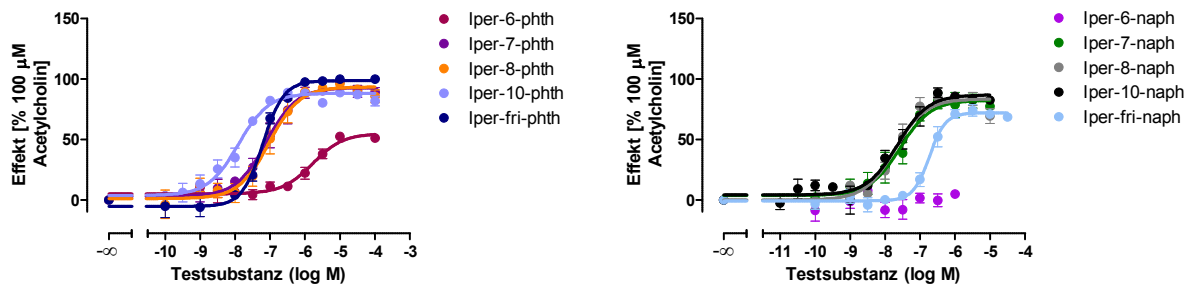


Abbildung 19: Dualsterische Hybridliganden führten zu einer konzentrationsabhängigen intrazellulären IP1-Synthese.

Ordinate: Zellantwort in Prozent. 100 % entspricht dem Effekt, welcher durch 100 μM des Referenzagonisten Acetylcholin ausgelöst wurde. 0 % entspricht dem Basalwert. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanzen.

Abbildung 19 zeigt, dass alle hier untersuchten Hybridsubstanzen mit Ausnahme von Iper-6-naph einen konzentrationsabhängigen Effekt auf die intrazelluläre IP1-Synthese ausgeübt haben und damit in der Lage waren $G_{q/11}$ Proteine zu aktivieren.

4 Ergebnisse

Testsubstanz	n	n _H	E _{max}	pEC ₅₀
Iper-6-phth	3	1,28 ± 0,38 ^{n.s.}	55,0 ± 1,5 ⁺⁺⁺	5,80 ± 0,05 ^{###}
Iper-7-phth	3	0,98 ± 0,19 ^{n.s.}	93,6 ± 1,5 ⁺	7,07 ± 0,10 ^{N.S.}
Iper-8-phth	5	1,23 ± 0,30 ^{n.s.}	93,3 ± 1,0 ⁺⁺⁺	7,03 ± 0,06 ^{N.S.}
Iper-10-phth	5	1,00 ± 0,17 ^{n.s.}	87,2 ± 0,8 ⁺⁺⁺	7,95 ± 0,06 ^{###}
Iper-fri-phth	3	1,45 ± 0,20 [*]	100,9 ± 0,7 ^{NS}	7,19 ± 0,05 ^{N.S.}
Iper-6-naph	3	Antagonist	Antagonist	Antagonist
Iper-7-naph	5	1,66 ± 0,14 ^{n.s.}	81,6 ± 2,6 ⁺⁺⁺	7,66 ± 0,09 ^{##}
Iper-8-naph	3	1,46 ± 0,16 ^{n.s.}	82,4 ± 2,3 ⁺⁺	7,78 ± 0,06 ^{##}
Iper-10-naph	5	1,29 ± 0,08 ^{n.s.}	89,0 ± 0,9 ⁺⁺⁺	7,60 ± 0,09 [#]
Iper-fri-naph	4	1,74 ± 0,16 [*]	75,7 ± 0,6 ⁺⁺⁺	6,59 ± 0,08 ^{##}

Tabelle 13: Kenngrößen ± S.E.M. der Konzentrations-Effekt Kurven aus Abbildung 19.

Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E.M. von drei bis fünf Einzelversuchen in Dreifachbestimmung. n: Anzahl der Experimente. n_H: Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. E_{max}: Maximale Zellantwort in Prozent, beschrieben durch das obere Plateau, welches auf den Effekt von Acetylcholin 100 µM normiert wurde. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanzen, welche eine halbmaximale Zellantwort hervorgerufen hat. ^{n.s.}: Nicht signifikanter Unterschied zu einem Hill-Koeffizienten n_H=1 ^{*}: Signifikanter Unterschied zu einem Hill-Koeffizienten von n_H=1 (F-Test, p<0,05). ^{NS}: Nicht signifikanter Unterschied zu dem Effekt, der durch 100 µM des Referenzagonisten Acetylcholin ausgelöst wurde. ^{+,++,+++}: Signifikanter Unterschied zu dem Effekt, der durch 100 µM des Referenzagonisten Acetylcholin ausgelöst wurde (t-Test, p< 0,05, 0,01, 0,001). ^{N.S.}: Nicht signifikanter Unterschied zu dem pEC₅₀-Wert von Acetylcholin. ^{#,##,###}: Signifikanter Unterschied zu dem pEC₅₀-Wert von Acetylcholin (t-Test, p< 0,05, 0,01, 0,001).

Iper-6-phth zeigte mit einer intrinsischen Aktivität von 55,0 ± 1,5 % partialagonistisches Verhalten für G_{q/11}-abhängige Signalwege des M1-Rezeptors, mit einer Wirksamkeit von 5,80 ± 0,05. Die Aktivierungs-Parameter dieser Substanz waren hoch signifikant verschieden von denen des Referenzagonisten Acetylcholin. Durch eine Substitution des allosterischen Restes dieser Substanz gegen Naphthalimid wurde die Flexibilität des Rezeptor-Proteins so weit eingeschränkt, dass Iper-6-naph den M1-Rezeptor nicht mehr für die Rekrutierung von G_{q/11} Proteinen aktivieren konnte. Durch eine Verlängerung der „Linker“-Ketten ausgehend von den Substanzen Iper-6-phth und Iper-6-naph um weitere Kohlenstoff-Atome verbesserte sich die Flexibilität des Rezeptor-Proteins wieder und damit auch die Fähigkeit des

Rezeptors zur Signaltransduktion. Iper-7-phth und Iper-8-phth waren starke Partialagonisten für $G_{q/11}$ -abhängige Signalwege mit intrinsischen Aktivitäten oberhalb von 90 % und unterschieden sich in ihren Wirksamkeiten nicht signifikant von dem pEC_{50} -Wert von Acetylcholin. Die korrespondierenden Hybridliganden Iper-7-naph und Iper-8-naph zeigten eine intrinsische Aktivität von $81,6 \pm 2,6$ % beziehungsweise $82,4 \pm 2,3$ % und unterschieden sich damit sowohl in ihrer intrinsischen Aktivität als auch in ihren Wirksamkeiten ($7,66 \pm 0,09$ bzw. $7,78 \pm 0,06$) hoch signifikant von Acetylcholin. Im Fall von Iper-10-phth verschlechterte sich die intrinsische Aktivität gegenüber den Hybriden mit kürzeren Kettenlängen, wie Iper-7-phth und Iper-8-phth. Im Gegensatz dazu kam es durch eine Verlängerung der Alkyl-Kette der „naph-Hybride“ im Fall von Iper-10-naph zu einer verbesserten intrinsischen Aktivität, im Vergleich zu Iper-7-naph und Iper-8-naph. Längere Alkyl-Ketten hatten dementsprechend gegenläufige Effekte auf die maximalen Effekte der korrespondierenden Hybride mit unterschiedlich großen allosterischen Resten. Durch eine Substitution der Alkyl-Kette gegen „Diamid-Linker“ wurde ersichtlich, dass auch diese Art von „Linker“-Ketten gegenläufige Effekte auf die $G_{q/11}$ Protein-Aktivierung ausüben; Iper-fri-phth unterschied sich weder in der intrinsischen Aktivität noch in der Wirksamkeit signifikant von Acetylcholin und konnte damit als Vollagonist für $G_{q/11}$ -abhängige Signalwege klassifiziert werden. Iper-fri-naph zeigte mit einer intrinsischen Aktivität von $75,7 \pm 0,6$ % und einer Wirksamkeit von $6,59 \pm 0,08$ signifikante Unterschiede zu dem endogenen Liganden Acetylcholin.

4 Ergebnisse

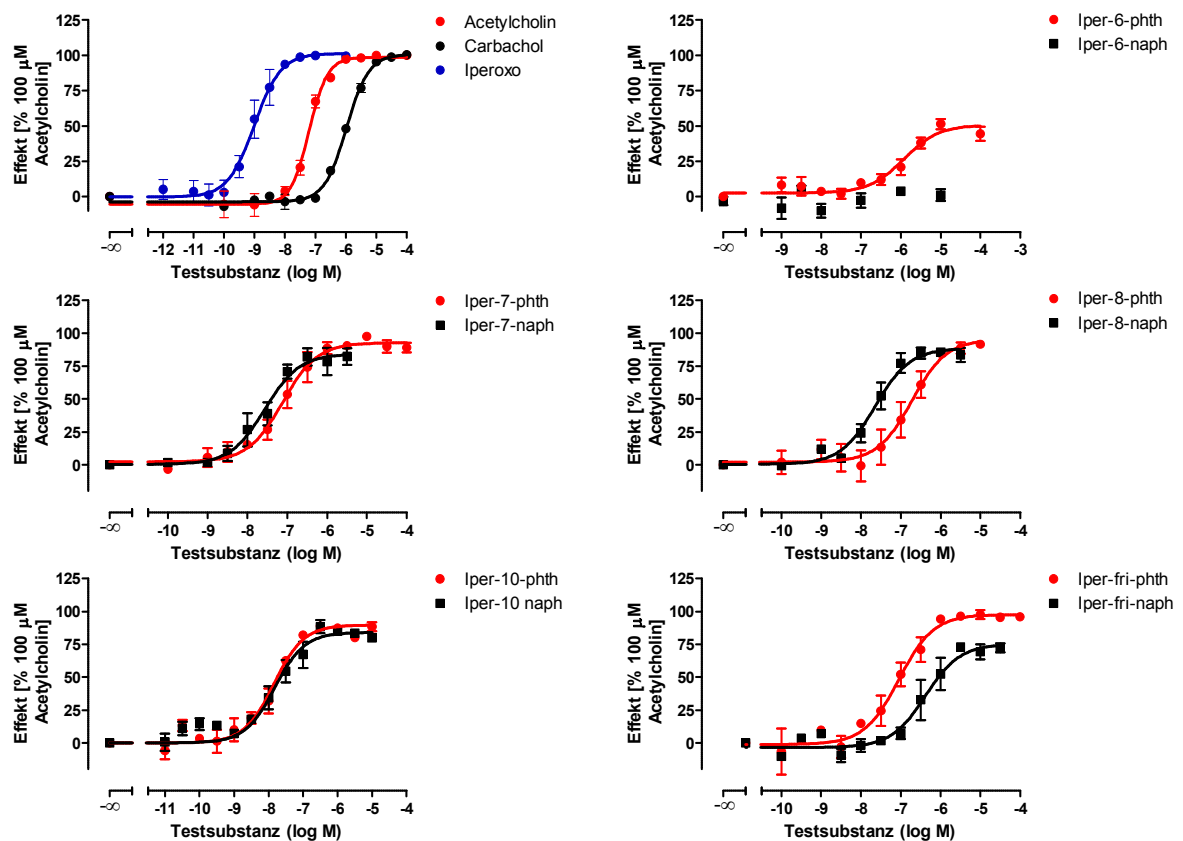


Abbildung 20: Vergleich der intrazellulären IP1-Synthese zwischen den korrespondierenden Hybridliganden.

Ordinate: Zellantwort in Prozent. 100 % entspricht dem Effekt, der durch 100 μM des Referenzagonisten Acetylcholin ausgelöst wurde. 0 % entspricht dem Basalwert. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanzen.

Abbildung 20 zeigt die Unterschiede in den Dosis-Wirkungskurven zwischen den korrespondierenden Hybridliganden. Die Substanzen in den jeweiligen Graphen unterscheiden sich ausschließlich in ihrem allosterischen Substituenten, Kettenlänge und orthosterischer Rest bleiben unverändert. Es zeigte sich, dass vor allem bei sehr kurzen „Linker“-Ketten (vgl. Iper-6-phth und Iper-6-naph) die Größe des allosterischen Substituenten eine wichtige Rolle bei der $G_{q/11}$ Protein-Aktivierung spielte. Iper-6-naph zeigte keine Aktivierung von $G_{q/11}$ Proteinen, wohingegen Iper-6-phth als Partialagonist für $G_{q/11}$ -abhängige Signalwege fungierte. Wurde die Alkyl-Kette gegen einen „Diamid-Linker“ ausgetauscht, zeigten sich ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den korrespondierenden Hybriden, sowohl in der Wirksamkeit, als auch in der intrinsischen Aktivität. Zwischen Iper-fri-phth und Acetylcholin konnten keine signifikanten Unterschiede in der Wirksamkeit und der intrinsischen Aktivität detektiert werden. Iper-fri-naph hingegen

4 Ergebnisse

zeigte eine deutliche Diskrepanz in Wirksamkeit und intrinsischer Aktivität im Vergleich zu dem endogenen Liganden Acetylcholin.

	Testsubstanz	Korrespondierender Hybridligand
	Iper-6-phth	Iper-6-naph
pEC₅₀	5,80 ± 0,05 ⁺⁺⁺	k.A. da Antagonist ⁺⁺⁺
E_{max}	55,0 ± 1,5 ⁺⁺⁺	k.A. da Antagonist ⁺⁺⁺
n	3	3
	Iper-7-phth	Iper-7-naph
pEC₅₀	7,07 ± 0,10 ⁺⁺	7,66 ± 0,09 ⁺⁺
E_{max}	93,6 ± 1,5 ⁺	81,6 ± 2,6 ⁺
n	3	5
	Iper-8-phth	Iper-8-naph
pEC₅₀	7,03 ± 0,06 ⁺⁺⁺	7,78 ± 0,06 ⁺⁺⁺
E_{max}	93,3 ± 1,0 ⁺⁺	82,4 ± 2,3 ⁺⁺
n	5	3
	Iper-10-phth	Iper-10-naph
pEC₅₀	7,95 ± 0,06 ^{NS}	7,60 ± 0,09 ^{NS}
E_{max}	87,2 ± 0,8 ^{NS}	89,0 ± 0,9 ^{NS}
n	5	5

	Iper-fri-phth	Iper-fri-naph
pEC ₅₀	7,19 ± 0,05 ⁺⁺	6,59 ± 0,08 ⁺⁺
E _{max}	100,9 ± 0,7 ⁺⁺⁺	75,7 ± 0,6 ⁺⁺⁺
n	3	4

Tabelle 14: Unterschiede in Wirksamkeit und intrinsischer Aktivität zwischen den korrespondierenden Hybridliganden.

Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E.M. aus drei bis fünf Einzelversuchen in Dreifachbestimmung. n: Anzahl der Experimente. n_H: Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. E_{max}: Maximale Zellantwort in Prozent, beschrieben durch das obere Plateau, welches auf den Effekt von Acetylcholin 100 µM normiert wurde. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanzen, welche eine halbmaximale Zellantwort hervorgerufen hat. ^{NS}: Nicht signifikanter Unterschied zu dem Effekt, der durch den korrespondierenden Hybridliganden ausgelöst wurde. ^{+,++,+++}: Signifikanter Unterschied zu dem Effekt, der durch den korrespondierenden Hybridliganden ausgelöst wurde (t-Test, p<0,05, 0,01, 0,001). ^{NS}: Nicht signifikanter Unterschied zu dem pEC₅₀-Wert des korrespondierenden Hybridliganden. ^{###,####}: Signifikanter Unterschied zu dem pEC₅₀-Wert des korrespondierenden Hybridliganden (t-Test, p< 0,05, 0,01, 0,001).

Generell lässt sich sagen, dass die Testsubstanzen mit dem größeren allosterischen Substituenten Naphthalimid eine geringere intrinsische Aktivität aufwiesen, als ihre korrespondierenden Hybridliganden mit dem kleineren allosterischen Rest Phthalimid. Folglich führten die Hybride mit dem voluminöseren allosterischen Substituenten Naphthalimid zu einer stärkeren Einschränkung der Flexibilität in der allosterischen Bindungstasche, als ihre korrespondierenden Hybridliganden mit dem kleineren allosterischen Rest Phthalimid. Die Flexibilität des Rezeptor-Proteins in der allosterischen Bindungstasche scheint demzufolge von enormer Wichtigkeit für die Signaltransduktion vom Rezeptor auf Effektor-Proteine zu sein. Bei einer Kettenlänge von zehn Kohlenstoffatomen glich sich dieses Phänomen jedoch aus und es kam zu keinen signifikanten Unterschieden zwischen dem phth- und dem naph-Liganden. Wurde die Alkyl-Kette jedoch gegen einen „Diamid-Linker“ substituiert, zeigte sich ebenfalls das Phänomen, dass der größere allosterische Substituent die maximale Zellantwort im G_{q/11}-Assay stärker behindert hat, als der Ligand mit dem kleineren Rest. Vergleicht man die Aktivierungs-Charakteristika der korrespondierenden Liganden miteinander, fällt auf, dass bei kurzen „Linker“-Ketten von sechs Kohlenstoffatomen, der Ligand mit dem größeren Rest (Iper-6-naph) keinerlei Aktivierung zeigte, Iper-6-phth jedoch ein Partialagonist mit einer intrinsischen Aktivität von 55,0 ± 1,5 % und einer Wirksamkeit von 5,80 ± 0,05 war. Eine Verlängerung der Alkyl-Kette auf sieben oder acht Kohlenstoffatome führte zu einer höheren Wirksamkeit, aber einer geringeren intrinsischen Aktivität der Hybride mit dem voluminöseren allosterischen Rest

„naph“, verglichen mit ihren korrespondierenden Hybridliganden mit kleinerem allosterischen Rest. Die Reduktion der maximalen Zellantwort der „naph-Hybride“ basiert vermutlich auf einer größeren Einschränkung der Rezeptor-Flexibilität durch Naphthalimid im Vergleich zu Phthalimid.

4.4.2 Eine simultane Aktivierung von $G_{i/o}$ und $G_{q/11}$ Proteinen führte zu einer intrazellulären IP1 Generierung

Neben $G_{q/11}$ können auch G Proteine der $G_{i/o}$ Familie einen Effekt auf die intrazelluläre IP1-Synthese haben, indem sie einen, durch die $\beta\gamma$ -Untereinheit-vermittelten, stimulierenden Effekt auf die Phospholipase C β ausüben (Exton, 1996). Padrell und Kollegen (1991) konnten in Oozyten des Afrikanischen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) zeigen, dass sowohl zwei verschiedene Isoformen der G_o Proteine als auch eine rekombinante Form der α_o -Untereinheit einen stimulierenden Effekt auf eine Muskarin-abhängige Aktivierung der Phospholipase C β haben. In der Folge der Rezeptor-Aktivierung kommt es dann zu einer IP3-abhängigen Aktivierung von Chlorid-Kanälen (Padrell et al., 1991). Die Phospholipase C β ist ebenfalls ein Schlüsselenzym in der $G_{q/11}$ -abhängigen Signalkaskade, da es Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP $_2$) in Diacylglycerol (DAG) und Inositoltriphosphat (IP3) spaltet, welche wichtige sekundäre Botenstoffe zur Signalweiterleitung darstellen. Das in diesem Assay gemessene IP1 ist ein Abbauprodukt des Inositoltriphosphates, welches durch die Zugabe von Lithium-Ionen zum Inkubationspuffer nicht mehr durch die Inositolmonophosphatase abgebaut werden kann und somit akkumuliert und quantitativ bestimmt werden kann. Da, wie oben beschrieben, auch $G_{i/o}$ Proteine die Phospholipase C β aktivieren können, kann es auch nach $G_{i/o}$ Protein-Aktivierung zu einem Anstieg an intrazellulärem IP1 kommen. Um diesen Mechanismus genauer zu beleuchten, wurden die $G_{i/o}$ Proteine im Folgenden mittels Pertussis Toxin blockiert und der rein $G_{q/11}$ -vermittelte Effekt auf die intrazelluläre IP1-Konzentration gemessen. Um Störgrößen, die durch die PTX-Behandlung der Zellen bedingt sein könnten, weitestgehend auszuschalten, wurden die gemessenen IP1-Konzentrationen nicht normiert, sondern in Absolutwerte umgerechnet. Dafür wurde dem Protokoll des HTRF[®]-IP-One Tb-kits der Firma „cisbio“ folgend, wie in Kapitel 3.5.1, Abbildung 6 beschrieben, zunächst eine IP1-Standardkurve vermessen und die Daten anhand der „Vier-Parameter-logistischen Gleichung“ (Gleichung 2) ausgewertet. Die vier Parameter Top, Bottom, Hill-Koeffizient und EC $_{50}$ -Wert wurden in Gleichung 20 (Kapitel 3.5.1) eingepflegt und die IP1-Werte der folgenden Versuche an CHO-M1 Zellen anhand dieser Gleichung in Absolutwerte umgerechnet.

4 Ergebnisse

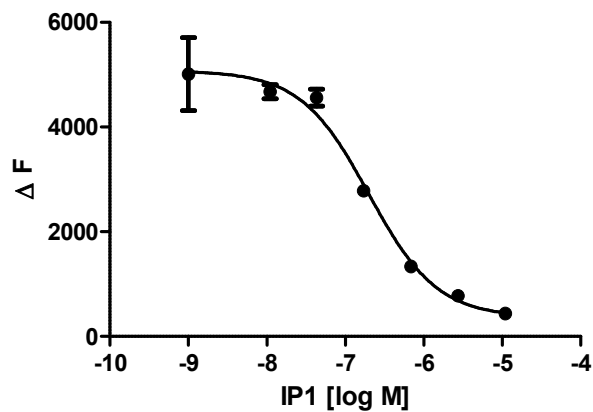


Abbildung 21: IP1-Standardkurve, die auch in Abbildung 6 (Kapitel 3.5.1) bereits gezeigt und näher erläutert wurde.

Aus der Kurvenauswertung konnten folgende Parameter entnommen werden, die in Gleichung 20 eingepflegt worden sind:

Top: 5077
 Bottom: 364,4
 Hill-Koeffizient: -1
 EC₅₀-Wert: 2,002e-007

$$\text{Gleichung 20: } Y = \text{Bottom} + \frac{(\text{Top} - \text{Bottom})}{(1 + 10^{((\text{LogEC}_{50} - x) * n_H)})}$$

Daraus ergab sich folgende Kurve für die Untersuchung an CHO-M1 Zellen:

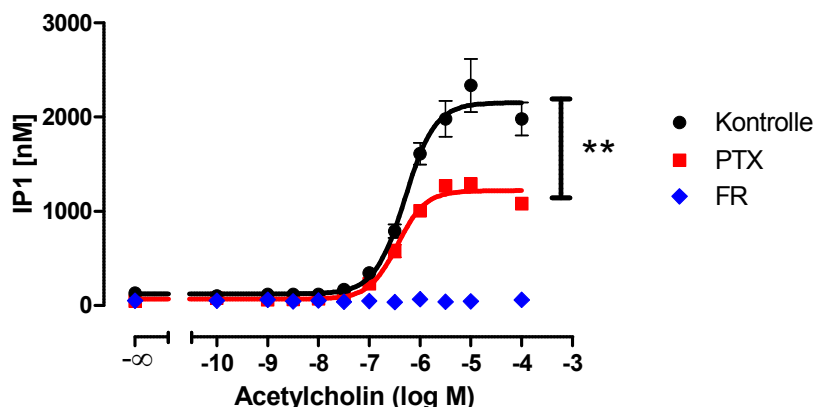


Abbildung 22: Neben G_{q/11} Proteinen hatten auch PTX-sensitive G Proteine einen Einfluss auf die intrazelluläre IP1-Synthese in CHO-M1 Zellen.

Ordinate: Intrazelluläre IP1-Konzentration in nM. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz Acetylcholin. **: Signifikanter Unterschied zwischen der IP1-Synthese in PTX-vorbehandelten Zellen und Zellen unter Kontrollbedingungen (t-Test, p<0,01).

4 Ergebnisse

Es zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der intrazellulären IP1-Generierung zwischen den Zellen, deren $G_{i/o}$ Proteine mittels PTX stumm geschaltet wurden und den PTX-unbehandelten Zellen. G Proteine der $G_{q/11}$ Familie zeigen keine Sensitivität gegenüber PTX (Blank et al., 1991). Der hier beobachtete Effekt ist also $G_{i/o}$ Protein-spezifisch. Padrell und Kollegen (1991) haben postuliert, dass es sich bei den PTX-sensitiven G Proteinen, die in die $G_{q/11}$ -Signalkaskade eingreifen, um G_o und nicht um G_i Proteine handelt. Die Untersuchungen erfolgten an Oozyten des Afrikanischen Krallenfroschs. Exton (1996) vermutete aufgrund der geringen Gewebeverteilung von G_o Proteinen, jedoch eine G_i Protein-Beteiligung an der Phospholipase C-Aktivierung. Ob der Effekt G_i - oder G_o -vermittelt ist, ist demzufolge vermutlich abhängig von dem untersuchten Gewebe. Durch eine Blockierung von $G_{q/11}$ Proteinen mittels FR zeigte sich, dass auch bei hohen Acetylcholin-Konzentrationen kein Restsignal detektiert werden konnte. $G_{i/o}$ Proteine alleine scheinen also nicht zu einer intrazellulären IP1-Synthese in CHO-M1 Zellen befähigt zu sein, sondern nur durch simultane Aktivierung mit $G_{q/11}$ Proteinen.

Inhibitor	n	n_H	E_{max} (nM)	pEC_{50}	Unteres Plateau (nM)
Kontrolle	4	$1,45 \pm 0,28^*$	$2153,0 \pm 81,4$	$6,30 \pm 0,07$	$132,5 \pm 8,5$
PTX	4	$1,57 \pm 0,17^*$	$1220,0 \pm 25,3$	$6,45 \pm 0,04^{N.S.}$	$48,0 \pm 1,7^{###}$
FR	3	k.A.	$49,2 \pm 4,5^{NS}$	k.A.	$52,3 \pm 10,5^{##}$

Tabelle 15: Kenngrößen \pm S.E.M. der Konzentrations-Effekt Kurven aus Abbildung 22. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus drei bis vier Einzelversuchen in Dreifachbestimmung. n: Anzahl der Experimente. n_H : Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. E_{max} : Maximale IP1-Synthese in nM. pEC_{50} : Negativer dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz, welche eine halbmaximale Zellantwort hervorgerufen hat. *: Signifikanter Unterschied zu einem Hill-Koeffizienten von $n_H=1$ (F-Test, $p<0,05$). NS : Nicht signifikanter Unterschied zu dem basalen IP1-Wert. $^{N.S.}$: Nicht signifikanter Unterschied zu dem pEC_{50} -Wert der Kontrolldaten. $^{###}$: Signifikanter Unterschied zu dem Basalwert unter Kontrollbedingungen (t-Test, $p<0,01$, $0,001$).

Durch die Berechnung der IP1-Produktion in Absolutwerten hat sich der pEC_{50} -Wert, verglichen mit den normierten Daten, um etwa eine Dekade nach rechts verschoben, also zu höheren Konzentrationen. Betrachtet man die Rohdaten ergibt sich, übereinstimmend mit Tabelle 11, ein pEC_{50} -Wert von $7,00 \pm 0,12$. Wurden die Zellen mit G Protein-Inhibitoren, wie PTX und FR, behandelt, reduzierte sich die basale IP1-Konzentration in der Zelle, die unter Kontrollbedingungen gemessen worden ist, signifikant. Ein Grund hierfür könnte zum Beispiel eine verminderte Rezeptor-Anzahl durch die toxischen Einflüsse der Inhibitoren

sein. Der Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit unterschied sich sowohl im Fall der PTX-behandelten Zellen als auch im Fall der PTX-unbehandelten Zellen signifikant von einem normalen Steilheitsmaß $n_H=1$, was auf eine heterogene Rezeptor-Population bzw. eine Ligand-Rezeptor-Interaktion hindeutet, die von einer 1:1 Interaktion abweicht.

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

Wie oben bereits erwähnt, koppeln ungeradzahlige Muskarin-Rezeptoren bevorzugt an G Proteine der $G_{q/11}$ Familie. Des Weiteren sind sie aber auch zu einer promiskuitiven G Protein-Aktivierung befähigt und koppeln neben $G_{q/11}$ Proteinen auch an G Proteine der G_s und der $G_{i/o}$ Familie (Thomas et al., 2008). Diese promiskuitive G Protein-Aktivierung sollte in den folgenden Versuchen näher untersucht werden.

4.5.1 Der endogene Agonist Acetylcholin führte zu einer G_s -vermittelten Generierung von intrazellulärem cAMP

Um eine spezifische Zellantwort durch G Proteine detektieren zu können, nutzt man in der Regel spezifische Inhibitoren des jeweiligen G Proteins. Im Fall der G_s Proteine wurde bisher jedoch noch kein spezifischer Inhibitor entdeckt, weswegen Cholera Toxin (CTX) im Rahmen dieser Arbeit zur Maskierung einer G_s -vermittelten Zellantwort verwendet wurde. Cholera Toxin gilt als starker und permanenter Aktivator von G_s Proteinen. Es katalysiert eine ADP-Ribosylierung an der α -Untereinheit von G_s Proteinen, wodurch die GTPase Aktivität der G_s Proteine aufgehoben wird und das G_s Protein durch die irreversible Kopplung an GTP in der aktivierten Form verbleibt. Demzufolge kommt es bei CTX-behandelten Zellen zu keiner weiteren Agonist-vermittelten Aktivierung der Adenylzyklasen und damit zu einer Maskierung des Effektes, welcher durch G_s Proteine ausgelöst wird.

Zunächst wurde unter Verwendung des Cholera Toxins (CTX) überprüft, ob der endogene Ligand, der im Rahmen dieser Arbeit als Referenzagonist fungierte, eine spezifische Aktivierung von G_s Proteinen hervorrufen kann.

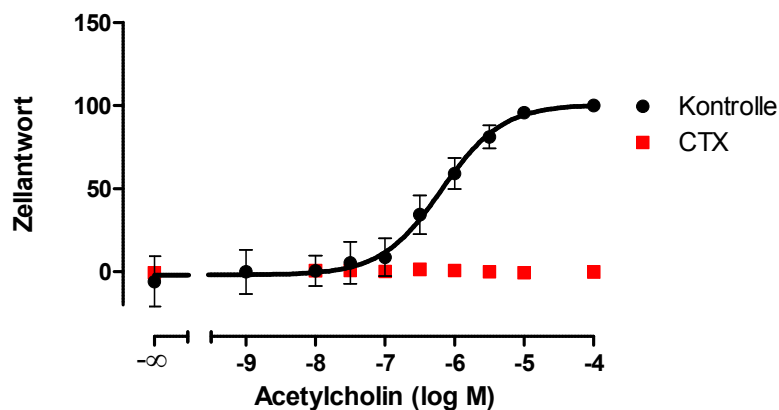


Abbildung 23: Acetylcholin-vermittelte cAMP-Generierung.

Ordinate: Zellantwort in Prozent: 100 % entspricht dem Effekt, der durch 100 μM Acetylcholin ausgelöst wurde. 0 % entspricht dem Basalwert. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz Acetylcholin.

Es konnte gezeigt werden, dass es Agonist-vermittelt zu einem Konzentrationsanstieg an intrazellulärem cAMP kam. In CTX-vorbehandelten Zellen konnte keine weitere Stimulation der Adenylylzyklasen, gemessen am intrazellulären cAMP-Spiegel, detektiert werden.

Testsubstanz	n	n_H	E_{max}	pEC_{50}
Acetylcholin	5	$0,95 \pm 0,29^{n.s.}$	$100,6 \pm 7,1^{NS}$	$6,19 \pm 0,15$

Tabelle 16: Kenngrößen \pm S.E.M. der Konzentrations-Effekt Kurve aus Abbildung 23.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus fünf Einzelversuchen in Dreifachbestimmung. n: Anzahl der Experimente. n_H : Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. E_{max} : Maximale cAMP-Konzentration in Prozent, bezogen auf den Effekt, der durch 100 μM des Referenzagonisten Acetylcholin ausgelöst wurde. pEC_{50} : Negativer dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz, welche eine halbmaximale Zellantwort hervorgerufen hat. ^{n.s.}: Nicht signifikanter Unterschied zu einem Hill-Koeffizienten $n_H=1$ (F-Test, $p>0,05$). ^{NS}: Nicht signifikanter Unterschied zu dem Effekt, der durch 100 μM des Referenzagonisten Acetylcholin ausgelöst wurde (t-Test, $p>0,05$).

Die Wirksamkeit (vgl. pEC_{50} -Wert) von Acetylcholin in cAMP-Assays, als Messinstrument für die G_s -abhängige Signalwegsaktivierung, war in etwa 10-fach schwächer, als die Wirksamkeit von Acetylcholin für $G_{q/11}$ -abhängige Signalwege, gemessen in IP1-Assays.

4.5.2 Acetylcholin und Forskolin zeigten vergleichbare Effekte auf die cAMP-Generierung

Forskolin ist ein direkter Stimulator der Adenylylzyklasen und katalysiert damit Rezeptor-unabhängig die Umwandlung von Adenosintriphosphat (ATP) in cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP). Es kommt demzufolge zu einer Rezeptor-unabhängigen cAMP-Synthese in der Zelle.

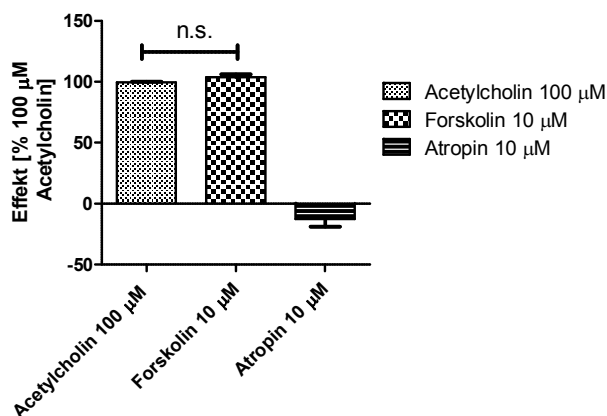


Abbildung 24: Acetylcholin und Forskolin hatten vergleichbare Effekte auf die maximale cAMP-Synthese in der Zelle.

Ordinate: Zellantwort in Prozent. 100 % entspricht dem Effekt, der durch 100 µM Acetylcholin ausgelöst wurde. 0 % entspricht dem Basalwert.

Vergleicht man die maximalen Effekte, die Acetylcholin Rezeptor-vermittelt und Forskolin über eine direkte Stimulation der Adenylylzyklasen ausgeübt haben, zeigt sich, dass es zu keinen signifikanten Unterschieden zwischen diesen beiden Testsubstanzen kam. Atropin ist ein inverser Agonist an muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren. Durch den Einsatz dieser Testsubstanz konnte geprüft werden, ob die Rezeptoren über eine Spontanaktivität verfügen. In dem oben dargestellten Balkendiagramm unterscheidet sich der Effekt, der durch 10 µM Atropin ausgelöst wurde, nicht signifikant von dem Basalwert, dementsprechend zeigten die CHO-M1 Zellen hier keine spontane, Agonist-unabhängige Aktivität.

4.5.3 Die beiden orthosterischen Agonisten Carbachol und Iperoxo zeigten vollagonistisches Verhalten für G_s-abhängige Signalwege

Bereits in früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Iperoxo ein Vollagonist mit hoher Wirksamkeit für mehr als einen G Protein-Signalweg in Muskarin-Rezeptor-exprimierenden CHO-Zellen ist (Bock et al., 2012, Dissertation Vogel, 2015). Im Rahmen dieser Arbeit konnte das ebenfalls für den M1-Rezeptor verifiziert werden.

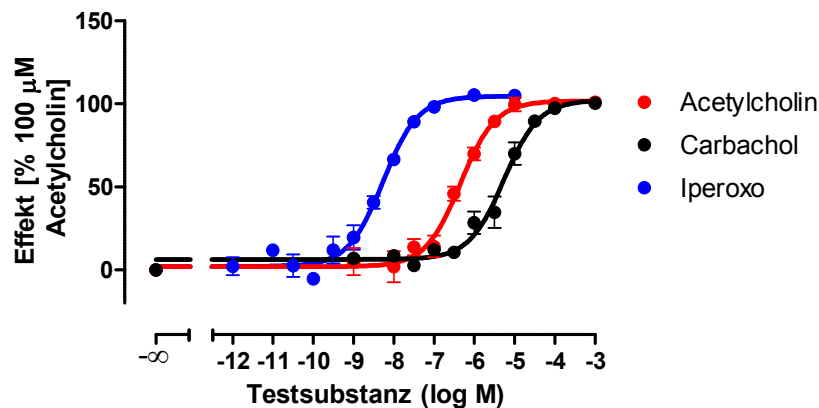


Abbildung 25: Die beiden orthosterischen Muskarin-Rezeptor-Liganden Iperoxo und Carbachol zeigten vollagonistisches Verhalten für G_s-abhängige Signalwege.

Ordinate: Zellantwort in Prozent, 100 % entspricht dem Effekt, der durch 100 µM des Referenzagonisten Acetylcholin ausgelöst wurde, 0 % entspricht dem Basalwert. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanzen.

Testsubstanz	n	n _H	E _{max}	pEC ₅₀
Acetylcholin	3	1,05 ± 0,16 ^{n.s.}	101,7 ± 2,7 ^{NS}	6,34 ± 0,07
Carbachol	3	0,96 ± 0,15 ^{n.s.}	102,1 ± 3,3 ^{NS}	5,26 ± 0,08 ^{###}
Iperoxo	3	0,93 ± 0,11 ^{n.s.}	104,5 ± 2,5 ^{NS}	8,26 ± 0,06 ^{###}

Tabelle 17: Kenngrößen ± S.E.M. der Konzentrations-Effekt Kurven aus Abbildung 25.

Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E.M. aus jeweils drei Einzelversuchen in Dreifachbestimmung. n: Anzahl der Experimente. n_H: Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. E_{max}: Maximale cAMP-Konzentration in Prozent, bezogen auf den Effekt, der durch 100 µM des Referenzagonisten Acetylcholin ausgelöst wurde. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz, welche eine halbmaximale Zellantwort hervorgerufen hat. ^{n.s.}: Nicht signifikanter Unterschied zu einem Hill-Koeffizienten n_H=1 (F-Test, p>0,05). ^{NS}: Nicht signifikanter Unterschied zu dem Effekt, der durch 100 µM des Referenzagonisten Acetylcholin ausgelöst wurde. ^{###}: Signifikanter Unterschied zu dem pEC₅₀-Wert von Acetylcholin (t-Test, p<0,001).

Iperoxo zeigte neben der hohen Wirksamkeit für die Aktivierung von $G_{q/11}$ Proteinen in CHO-M1 Zellen auch eine, von der Wirksamkeit des endogenen Liganden Acetylcholin signifikant unterschiedliche, hohe Wirksamkeit für die Aktivierung von G_s Proteinen. Vergleichbar mit den Daten der IP1-Assays zeigte Iperoxo auch für G_s -abhängige Signalwegsaktivierung eine Wirksamkeit, die in etwa 100-fach höher war, als die von Acetylcholin. Carbachol, als Beispiel für einen weiteren orthosterisch-bindenden Muskarin-Rezeptor-Liganden, war im Vergleich zu Acetylcholin um etwa eine Dekade schwächer wirksam. Auch diese Befunde stehen in Einklang mit den Daten, die in IP1-Assays erhoben wurden. Nichtsdestotrotz zeigten, bezogen auf den endogenen Liganden Acetylcholin, sowohl Iperoxo als auch Carbachol vollagonistisches Verhalten für G_s -abhängige Signalwegsaktivierung.

4.5.4 Dualsterische Hybride führten zu einem Konzentrationsanstieg an intrazellulärem cAMP

Neben den drei oben beschriebenen Vollagonisten Acetylcholin, Carbachol und Iperoxo kam es auch in der Folge einer Rezeptor-Aktivierung durch dualsterische Hybridliganden zu einer konzentrationsabhängigen intrazellulären cAMP-Generierung.

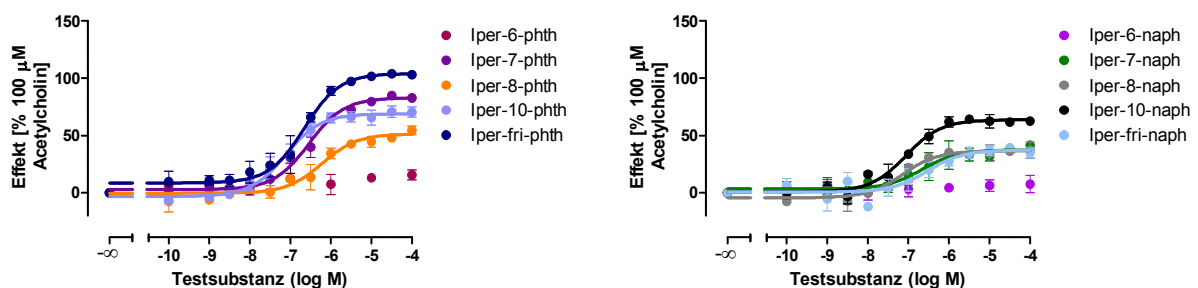


Abbildung 26: Die Aktivierung von G_s Proteinen wurde durch den größeren allosterischen Substituenten Naphthalimid (rechts) stärker beeinträchtigt, als durch Phthalimid (links).

Ordinate: Zellantwort in Prozent. 100 % entspricht dem Effekt, der durch 100 μM des Referenzagonisten Acetylcholin ausgelöst wurde, 0 % entspricht dem Basalwert. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanzen.

Testsubstanz	n	n_H	E_{max}	pEC_{50}
Iper-6-phth	3	--- entfällt, da Antagonist ---		
Iper-7-phth	3	$0,81 \pm 0,11^{n.s.}$	$82,9 \pm 2,0^{++}$	$6,54 \pm 0,07^{N.S.}$
Iper-8-phth	3	$0,68 \pm 0,18^{n.s.}$	$51,4 \pm 2,7^{+++}$	$6,23 \pm 0,15^{N.S.}$
Iper-10-phth	3	$0,90 \pm 0,17^{n.s.}$	$69,0 \pm 2,2^{+++}$	$7,12 \pm 0,09^{##}$
Iper-fri-phth	3	$0,97 \pm 0,20^{n.s.}$	$104,0 \pm 3,5^{NS}$	$6,66 \pm 0,10^{N.S.}$
Iper-6-naph	3	--- entfällt, da Antagonist ---		
Iper-7-naph	3	$0,79 \pm 0,44^{n.s.}$	$37,3 \pm 3,5^{+++}$	$6,67 \pm 0,28^{N.S.}$
Iper-8-naph	3	$1,56 \pm 0,48^{n.s.}$	$36,6 \pm 1,7^{+++}$	$7,14 \pm 0,13^{##}$
Iper-10-naph	3	$0,96 \pm 0,21^{n.s.}$	$63,7 \pm 2,1^{+++}$	$7,06 \pm 0,11^{##}$
Iper-fri-naph	3	$1,06 \pm 0,56^{n.s.}$	$37,2 \pm 3,4^{+++}$	$6,54 \pm 0,25^{N.S.}$

Tabelle 18: Kenngrößen \pm S.E.M. der Konzentrations-Effekt Kurven aus Abbildung 26.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus jeweils drei Einzelversuchen in Dreifachbestimmung. n: Anzahl der Experimente. n_H : Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. E_{max} : Maximale cAMP-Konzentration in Prozent, bezogen auf den Effekt, der durch 100 μ M des Referenzagonisten Acetylcholin ausgelöst wurde. pEC_{50} : Negativer dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz, welche eine halbmaximale Zellantwort hervorgerufen hat. ^{n.s.}: Nicht signifikanter Unterschied zu einem Hill-Koeffizienten $n_H=1$ (F-Test, $p>0,05$). ^{NS}: Nicht signifikanter Unterschied zu dem Effekt, der durch 100 μ M des Referenzagonisten Acetylcholin ausgelöst wurde. ^{++,+++}: Signifikanter Unterschied zu dem Effekt, der durch 100 μ M Acetylcholin ausgelöst wurde (t-Test, $p<0,01,0,001$). ^{N.S.}: Nicht signifikanter Unterschied zu dem pEC_{50} -Wert von Acetylcholin. ^{##}: Signifikanter Unterschied zu dem pEC_{50} -Wert von Acetylcholin (t-Test, $p<0,01$).

Generell lässt sich sagen, dass die intrinsische Aktivität der Hybridliganden für G_s -abhängige Signalwege stärker durch allosterische Substituenten beeinträchtigt wurde, als die intrinsische Aktivität $G_{q/11}$ -abhängiger Signalwege. Das lässt sich am besten durch die beiden Hybride mit den kürzesten „Linker“-Ketten veranschaulichen. Iper-6-phth hat in $G_{q/11}$ -Assays partialagonistischen Aktivierungs-Charakter gezeigt (vgl. Kapitel 4.4.1.5.3), in Bezug auf eine G_s Protein-Aktivierung konnte es allerdings keinerlei intrinsische Aktivität hervorrufen. Dieser Befund lieferte einen ersten Hinweis auf den $G_{q/11}$ -selektiven Charakter des Hybrids Iper-6-phth. Vorherige Arbeiten haben im Gegensatz zu diesen Befunden gezeigt, dass Iper-6-phth in M2-, M3- und M4-Rezeptoren G Proteine aus mindestens zwei unterschiedlichen G Protein-Familien aktivieren kann (Dissertation Janßen, 2011; Bock et al., 2012; Dissertation

Vogel, 2015). Das korrespondierende Hybrid Iper-6-naph hat weder im $G_{q/11}$ - noch im G_s -Assay intrinsische Aktivität gezeigt, was einen weiteren Hinweis auf antagonistisches Verhalten dieser Substanz am M1-Rezeptor lieferte. Auch im Fall von Iper-6-naph haben vorangegangene Arbeiten gezeigt, dass diese Substanz in der Lage ist G Proteine aus mindestens zwei unterschiedlichen G Protein-Familien zu aktivieren (Dissertation Janßen, 2011; Bock et al., 2012; Dissertation Vogel, 2015). Da keine Daten über das Verhalten von Iper-6-naph an M5-Rezeptoren vorliegen, lässt sich noch keine abschließende Aussage treffen, aber Iper-6-naph könnte ein M1-selektiver Antagonist sein. Iper-7-phth wies eine intrinsische Aktivität von $82,9 \pm 2,0$ % auf und zeigte damit eine höhere „efficacy“ als das Hybrid mit einer etwas längeren Alkyl-Kette Iper-8-phth. Obwohl prinzipiell gesagt werden kann, dass mit zunehmender „Linker“-Kettenlänge, die intrinsische Aktivität dieser Hybride verbessert wurde, zeigte sich im Fall von Iper-7-phth eine Ausnahme. Scheinbar beeinträchtigt eine Kettenlänge von sieben Kohlenstoffatomen in Kombination mit dem kleineren allosterischen Substituenten die Konformationsänderung des Rezeptors, die zur Weiterleitung des extrazellulären Signals an G Proteine unbedingt erforderlich ist, weniger, als längere „Linker“-Ketten. In Hinblick auf die Wirksamkeit unterschieden sich diese beiden Hybride allerdings nicht signifikant voneinander. Im Gegensatz zu diesen Befunden konnten keine signifikanten Unterschiede in Wirksamkeit und intrinsischer Aktivität zwischen Iper-7-naph und Iper-8-naph gefunden werden. Iper-10-phth wies zwar eine signifikant geringere intrinsische Aktivität auf als Iper-7-phth, jedoch zeigte sich eine signifikant höhere Wirksamkeit. Die Effekte der einzelnen Hybride auf intrinsische Aktivität und Wirksamkeit scheinen demzufolge nicht zu korrelieren. Iper-10-naph zeigte im Vergleich zu Iper-7-naph und Iper-8-naph eine signifikant höhere intrinsische Aktivität. In den Wirksamkeiten unterschieden sich diese drei Hybride jedoch nicht voneinander. Durch eine Substitution der Alkyl-Ketten gegen „Diamid-Linker“ (durch den Arbeitskreis um Prof. M. De Amici, Mailand) offenbarte sich ein hoch signifikanter Unterschied in den intrinsischen Aktivitäten der beiden korrespondierenden „fri-Hybride“. Von allen im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Hybridliganden zeigte Iper-fri-phth als einzige Testsubstanz vollagonistisches Verhalten für $G_{q/11}$ - und G_s -abhängige Signalwege an M1-Rezeptoren. Iper-fri-naph hingegen war ein schwacher Partialagonist, dessen Wirksamkeit und intrinsische Aktivität sich nicht von Iper-7-naph und Iper-8-naph unterschied.

4 Ergebnisse

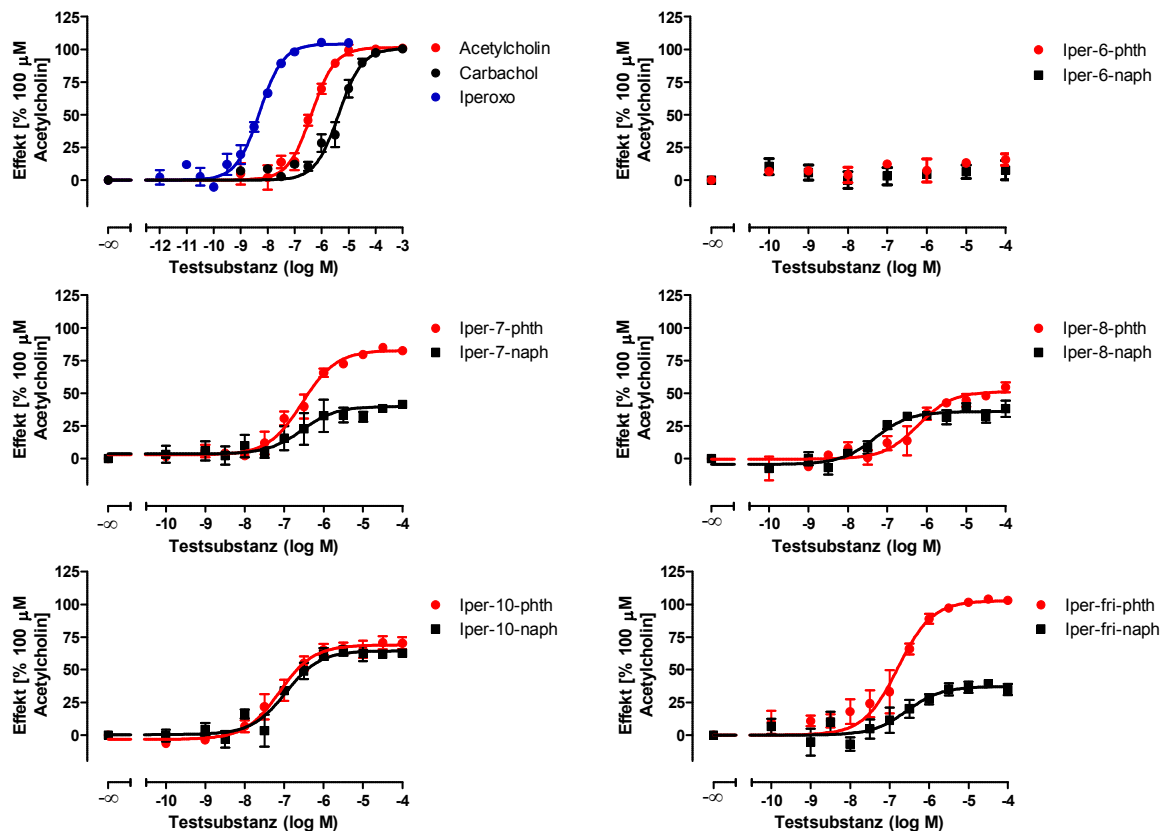


Abbildung 27: Vergleich der intrazellulären cAMP-Synthese zwischen den korrespondierenden Hybridliganden.

Ordinate: Zellantwort in Prozent. 100 % entspricht dem Effekt, der durch 100 μM des Referenzagonisten Acetylcholin ausgelöst wurde. 0 % entspricht dem Basalwert. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanzen.

	Testsubstanz	Korrespondierender Hybridligand
	Iper-6-phth	Iper-6-naph
pEC_{50}	k.A. da Antagonist	k.A. da Antagonist
E_{max}	k.A. da Antagonist	k.A. da Antagonist
n	3	3
	Iper-7-phth	Iper-7-naph
pEC_{50}	$6,54 \pm 0,07^{\text{NS}}$	$6,67 \pm 0,28^{\text{NS}}$
E_{max}	$82,9 \pm 2,0^{+++}$	$37,3 \pm 3,5^{+++}$
n	3	3

4 Ergebnisse

	lper-8-phth	lper-8-naph
pEC₅₀	6,23 ± 0,15 ⁺	7,14 ± 0,13 ⁺
E_{max}	51,4 ± 2,7 ⁺⁺	36,6 ± 1,7 ⁺⁺
n	3	3
	lper-10-phth	lper-10-naph
pEC₅₀	7,12 ± 0,09 ^{NS}	7,06 ± 0,11 ^{NS}
E_{max}	69,0 ± 2,2 ^{NS}	63,7 ± 2,1 ^{NS}
n	3	3
	lper-fri-phth	lper-fri-naph
pEC₅₀	6,66 ± 0,10 ^{NS}	6,54 ± 0,25 ^{NS}
E_{max}	104,0 ± 3,5 ⁺⁺⁺	37,2 ± 3,4 ⁺⁺⁺
n	3	3

Tabelle 19: Unterschiede in Wirksamkeit und intrinsischer Aktivität zwischen den korrespondierenden Hybridliganden.

Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E.M. aus jeweils drei Einzelversuchen in Dreifachbestimmung. n: Anzahl der Experimente. n_H : Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. E_{max}: Maximale Zellantwort in Prozent, bezogen auf den Effekt, der durch 100 µM des Referenzagonisten Acetylcholin ausgelöst wurde. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz, welche eine halbmaximale Zellantwort hervorgerufen hat. ^{NS}: Nicht signifikanter Unterschied zu dem Effekt, der durch den korrespondierenden Hybridliganden ausgelöst wurde. ^{+,++,+++}: Signifikanter Unterschied zu dem Effekt, der durch den korrespondierenden Hybridliganden ausgelöst wurde (t-Test, p<0,05, 0,01, 0,001). ^{N.S.}: Nicht signifikanter Unterschied zu dem pEC₅₀-Wert des korrespondierenden Hybridliganden. ^{###,####}: Signifikanter Unterschied zu dem pEC₅₀-Wert des korrespondierenden Hybridliganden (t-Test, p< 0,05, 0,01, 0,001).

Vergleicht man die korrespondierenden Hybridliganden miteinander, fällt auf, dass die Hybride mit dem kleineren allosterischen Substituenten in der Regel eine höhere intrinsische Aktivität aufwiesen, als ihre korrespondierenden Testsubstanzen mit dem größeren Naphthalimid-Rest. Die Flexibilität der allosterischen Bindungstasche des Rezeptor-Proteins war folglich von enormer Wichtigkeit für die Intensität der Signaltransduktion vom Rezeptor-Protein auf Effektor-Proteine. Die Flexibilität wurde durch die Hybride mit dem voluminöseren allosterischen Substituenten Naphthalimid stärker eingeschränkt, als durch Phthalimid. Folglich wiesen die Phthalimid-Hybride eine höhere „efficacy“ am M1-Rezeptor auf, als ihre

korrespondierenden Hybridliganden. Die einzigen Ausnahmen bildeten hier die Hybride mit einer Alkyl-Kette von zehn Kohlenstoffatomen. Diese beiden Hybride wiesen keine signifikanten Unterschiede zueinander auf, weder in der intrinsischen Aktivität noch in ihrer Wirksamkeit. Diese Befunde stehen in Einklang mit den in IP1-Assays erhobenen Daten, in denen diese beiden korrespondierenden Hybridliganden ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in Wirksamkeit und intrinsischer Aktivität zueinander aufwiesen. Betrachtet man die pEC_{50} -Werte der Hybride, unterschied sich nur Iper-7-phth signifikant von dem korrespondierenden Hybrid Iper-7-naph, welches eine höhere Wirksamkeit als Iper-7-phth aufwies. Das steht in Einklang mit den Befunden der $G_{q/11}$ Protein-Aktivierung, welche gezeigt hat, dass in diesem Fall auch die Hybride Iper-7-naph und Iper-8-naph stärker wirksam waren, als ihre korrespondierenden Hybridliganden mit kleinerem allosterischen Rest.

4.5.5 Neben G_s waren auch $G_{q/11}$ Proteine an der intrazellulären cAMP Generierung beteiligt

Adenylylzyklasen können neben G_s und $G_{i/o}$ Proteinen auch durch andere Stimuli, wie zum Beispiel Ca^{2+} oder $\beta\gamma$ -Untereinheiten anderer G Proteine, beeinflusst werden (Guillou et al., 1999, Cooper 2003, Olianas et al., 2012). In CHO-Zellen werden die beiden Isoformen 6 und 7 der Adenylylzyklasen exprimiert (Varga et al., 1998). Die Isoform 6 kann durch einen intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg, zum Beispiel als Folge einer $G_{q/11}$ Protein-Aktivierung gehemmt werden (Guillou et al., 1999, Cooper 2003, Olianas et al., 2012). Ist die Adenylylzyklase 6 die dominante Isoform in CHO-Zellen würde also eine Blockade der $G_{q/11}$ Proteine durch FR zu einem Anstieg des cAMP-Spiegels in der Zelle führen, welcher mit dem kompetitiven Immunoassay HTRF®-dynamic 2 cAMP-kit detektiert werden könnte. Die ebenfalls in CHO-Zellen exprimierte Isoform 7 ist nicht Ca^{2+} -sensitiv, kann aber durch $\beta\gamma$ -Untereinheiten anderer G Proteine synergistisch mit der $G\alpha_s$ -Untereinheit stimuliert werden. Hier würde eine Hemmung der $G_{q/11}$ Proteine also zu einer verminderten intrazellulären cAMP Konzentration führen.

4.5.5.1 Eine Hemmung von $G_{q/11}$ Proteinen führte zu einer verminderten cAMP Generierung in der Zelle

Um diesen Mechanismus genauer zu beleuchten, wurden die $G_{i/o}$ und $G_{q/11}$ Proteine im Folgenden mittels Pertussis Toxin beziehungsweise FR blockiert und der rein G_s -vermittelte

4 Ergebnisse

Effekt auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration gemessen. Um Störgrößen, die durch die Toxin-Behandlung der Zellen bedingt sein könnten, weitestgehend auszuschalten, wurden die gemessenen cAMP-Konzentrationen nicht normiert, sondern in Absolutwerte umgerechnet. Dafür wurde dem Protokoll des HTRF[®] dynamic 2 cAMP-kits der Firma „cisbio“ folgend, wie in Kapitel 3.5.3, Abbildung 8 beschrieben, zunächst eine cAMP-Standardkurve vermessen und die Daten anhand der „Vier-Parameter-logistischen Gleichung“ (Gleichung 2) ausgewertet. Die vier Parameter Top, Bottom, Hill-Koeffizient und EC₅₀-Wert wurden in Gleichung 20 (Kapitel 3.5.1) eingepflegt und die cAMP-Werte der folgenden Versuche an CHO-M1 Zellen anhand dieser Gleichung in Absolutwerte umgerechnet.

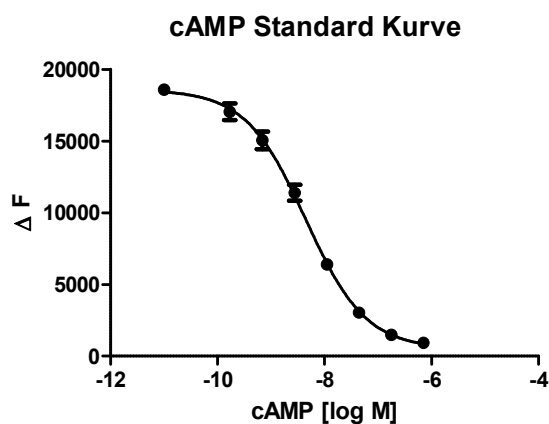


Abbildung 28: cAMP-Standardkurve, die auch in Abbildung 8 bereits gezeigt und näher erläutert worden ist.

Aus der Kurvenauswertung konnten folgende Parameter entnommen werden, die in Gleichung 20 eingepflegt worden sind:

Top: 18585

Bottom: 511,1

Hill-Koeffizient: -1

EC₅₀-Wert: 4,461e-009

$$\text{Gleichung 20: } Y = \text{Bottom} + \frac{(\text{Top} - \text{Bottom})}{(1 + 10^{((\text{LogEC}_{50} - x) * n_H)})}$$

Daraus ergab sich folgende Kurve für die Untersuchung von Acetylcholin an CHO-M1 Zellen:

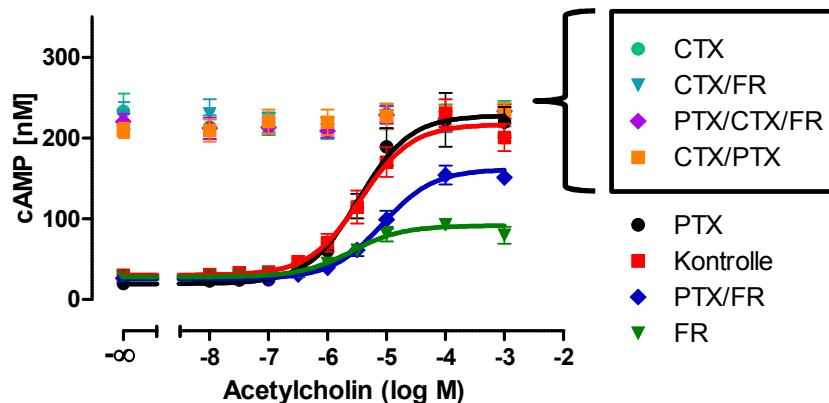


Abbildung 29: cAMP-Generierung in CHO-Zellen war nicht nur G_s Protein-abhängig.

Ordinate: cAMP-Konzentration in nM. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz Acetylcholin. Legende: G Protein-Inhibitoren, die zur Generierung der jeweiligen Kurven eingesetzt wurden.

Durch den Einsatz von Cholera Toxin (CTX) oder Cholera Toxin in Kombination mit anderen G Protein-Inhibitoren konnte keine weitere G_s -Stimulierung mehr detektiert werden. Das steht in Einklang mit der Vermutung, dass Cholera Toxin eine maximale Zellantwort hervorruft. Cholera Toxin hemmt durch ADP-Ribosylierung die GTPase-Aktivität der $G\alpha_s$ -Untereinheit, dadurch kommt es nicht mehr zum Austausch von GTP gegen GDP und G_s Proteine verweilen im aktiven Zustand. Unter Kontrollbedingungen (rote Kurve) wurde eine maximale Zellantwort erreicht, die sich nicht von den Ergebnissen der CTX-behandelten Zellen unterschieden hat. Wurden die Zellen mit dem $G_{i/o}$ Protein-Inhibitor behandelt, resultierte eine Kurve, die keine signifikanten Unterschiede zu den Daten unter Kontrollbedingungen aufwies. Demzufolge scheinen $G_{i/o}$ Proteine als funktionelle Gegenspieler der G_s Proteine nicht an dem cAMP-Signal beteiligt zu sein. $G_{i/o}$ Proteine inhibieren Adenylylzyklasen, weswegen es unter $G_{i/o}$ Protein-Ausschaltung zu einer vermehrten cAMP-Generierung kommen würde. Da das cAMP-Signal in diesem Fall aber unverändert geblieben ist, scheinen $G_{i/o}$ Proteine nicht in die Signalkaskade von M1-Rezeptoren involviert zu sein. Durch die simultane Inhibition von $G_{q/11}$ und $G_{i/o}$ Proteinen (blaue Kurve), konnte hier der ausschließliche G_s -abhängige Effekt auf Adenylylzyklasen beleuchtet werden. Dieser stimmte nicht mit den Ergebnissen unter Kontrollbedingungen (rote Kurve) überein. Demzufolge müssen auch noch andere G Proteine in den Prozess der cAMP-Generierung in CHO-M1 Zellen involviert sein. Betrachtet man die Kurve, die unter Ausschaltung von $G_{q/11}$ Proteinen aufgenommen wurde (grüne Kurve), zeigte sich ein hoch signifikanter Unterschied zu der Kurve unter Kontrollbedingungen (rote Kurve). Demzufolge spielten $G_{q/11}$ Proteine eine

außerordentlich große Rolle für die Aktivierung von Adenylylzyklasen in CHO-Zellen. Wurden neben den $G_{q/11}$ Proteinen auch $G_{i/o}$ Proteine inhibiert (blaue Kurve), kam es, verglichen mit der grünen Kurve, zu einem signifikanten Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration. Im Vergleich zu einer reinen $G_{q/11}$ Protein-Ausschaltung steht dieser Befund im Kontrast zu den vorher beschriebenen Ergebnissen, dass $G_{i/o}$ Proteine nicht in die Signalkaskade der M1-Rezeptoren involviert waren. Würden $G_{i/o}$ Proteine keine Rolle in der Signalwegsaktivierung spielen, würden die Daten für die simultane $G_{q/11}$ und $G_{i/o}$ Protein-Inhibition (blaue Kurve) mit den Daten der reinen $G_{q/11}$ Protein-Ausschaltung (grüne Kurve) übereinstimmen, jedoch war die cAMP-Generierung im Fall der zeitgleichen $G_{q/11}$ und $G_{i/o}$ -Blockade signifikant höher. Demzufolge lässt sich schließen, dass $G_{i/o}$ Proteine erst dann vom M1-Rezeptor für die Signal-Weiterleitung rekrutiert werden, wenn das bevorzugte $G_{q/11}$ Protein nicht mehr zur Verfügung steht. Ein weiterer Erklärungsansatz für dieses Phänomen wäre, dass unter Kontrollbedingungen bereits eine maximale cAMP-Generierung stattgefunden hat und durch die Ausschaltung von $G_{i/o}$ Proteinen aus diesem Grund keine darüber hinaus stattfindende cAMP-Synthese möglich war. Schlussfolgernd kann man sagen, dass Acetylcholin ein Vollagonist für G_s -abhängige Signalwege in CHO-M1 Zellen war, aber nicht für die G_s Protein-Aktivierung, da auch noch andere Faktoren zur Signalwegsaktivierung beigetragen haben.

4.5.5.2 Iperoxo und Carbachol zeigten ähnliche Effekte auf die Aktivierung von Adenylylzyklasen wie Acetylcholin

Des Weiteren wurden auch die Effekte der beiden anderen orthosterischen Vollagonisten Iperoxo und Carbachol auf Adenylylzyklasen näher beleuchtet. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Daten, die für Acetylcholin erhoben wurden, ebenfalls wieder mit aufgeführt.

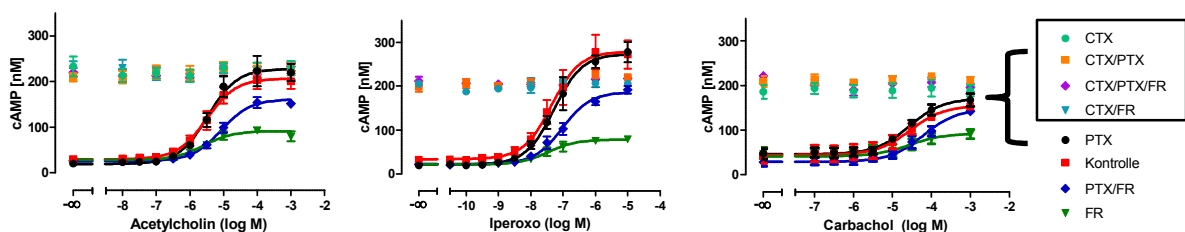


Abbildung 30: Effekte der drei orthosterischen Vollagonisten auf die Adenylylzyklasen.

Ordinate: cAMP-Konzentration in nM. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanzen Acetylcholin, Iperoxo und Carbachol. Legende: G Protein-Inhibitoren, die zur Generierung der jeweiligen Kurven eingesetzt wurden.

Prinzipiell ließen sich bei der Untersuchung der Effekte von Iperoxo und Carbachol auf die Adenylylzyklasen die gleichen Ergebnisse wie für Acetylcholin erzielen. Auch hier kam es zu einer hoch signifikanten Verminderung der intrazellulären cAMP-Generierung, wenn $G_{q/11}$ Proteine mittels FR inhibiert worden waren. Bei genauer Betrachtung konnte man aber auch einige Unterschiede zwischen den einzelnen Testsubstanzen erkennen. Im Fall von **Iperoxo** überstieg die Kontrollkurve (rote Kurve) und die Kurve für die Zellen unter PTX-Vorbehandlung (schwarze Kurve) das maximale cAMP-Level, welches durch die Vorbehandlung mit dem permanenten G_s Protein-Aktivator CTX vorgegeben worden war. Dieses Phänomen spricht für ein superagonistisches Verhalten von Iperoxo an CHO-M1 Zellen, welches bereits für den M2-Subtyp der Muskarin-Rezeptoren publiziert wurde (Schrage et al., 2013). Wurden $G_{q/11}$ und $G_{i/o}$ Proteine simultan inhibiert, zeigte sich im Fall von Iperoxo ein E_{max} -Wert, der nicht signifikant verschieden war, von der in dieser Arbeit postulierten maximalen cAMP-Generierung. Damit wäre Iperoxo im Gegensatz zu Acetylcholin ein Vollagonist für G_s Protein-Aktivierung. Wurde nur der $G_{q/11}$ -Inhibitor FR verwendet, ergab sich ein E_{max} -Wert, der hoch signifikant verschieden von dem E_{max} -Wert unter Kontrollbedingungen war. Die Kurve der PTX-vorbehandelten Zellen (schwarze Kurve) von **Carbachol** zeigte keine signifikanten Unterschiede in der maximalen cAMP-Generierung im Vergleich zu der Kontrollkurve (rote Kurve), wie es auch bei Acetylcholin und Iperoxo beobachtet werden konnte. Durch eine Inhibition der $G_{q/11}$ Proteine wurde die intrazelluläre cAMP-Generierung auch hier hoch signifikant vermindert. Im Gegensatz zu den anderen beiden orthosterischen Agonisten zeigte Carbachol im Vergleich zu der Kontrollkurve (rote Kurve) keine signifikanten Unterschiede in der maximalen Zellantwort unter PTX- und FR-Vorbehandlung (blaue Kurve). Die $G_{i/o}$ Protein-Inhibition konnte scheinbar im Fall von Carbachol den FR-vermittelten Effekt vollständig aufheben.

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass $G_{q/11}$ Proteine eine große Rolle in der intrazellulären cAMP-Generierung spielten. Da nach einer CTX-Vorbehandlung keine weitere Stimulation der Adenylylzyklasen möglich war, ist unklar, ob $G_{q/11}$ Proteine unabhängig von G_s Proteinen eine cAMP-Synthese bewirken können, oder ob es sich um eine synergistische Aktivierung durch $G_{q/11}$ und G_s Proteine handelt. Weiterhin wurde beobachtet, dass $G_{i/o}$ Proteine erst dann für die Signal-Weiterleitung rekrutiert wurden, wenn die vom M1-Rezeptor bevorzugten $G_{q/11}$ Proteine inhibiert worden waren.

4.5.5.3 Dualsterische Hybride führten ebenfalls zu einer $G_{q/11}$ -abhängigen cAMP-Synthese

Neben den drei Orthosteren wurden auch dualsterische Hybride auf die Effekte eines „Cross-talks“ zwischen $G_{q/11}$ und G_s Proteinen hin überprüft.

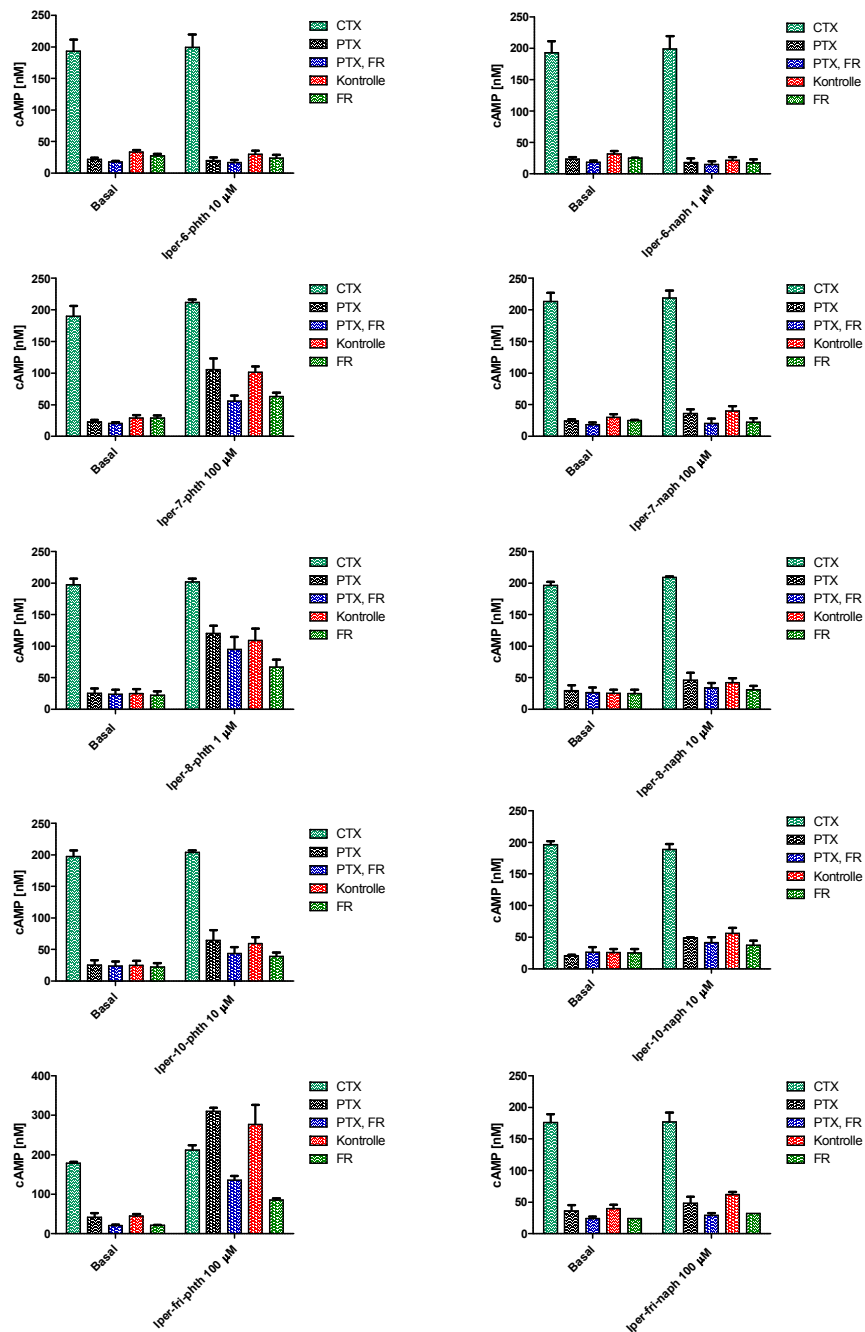


Abbildung 31: Hybride mit dem voluminösen allosterischen Substituenten Naphthalimid konnten keine G_s Proteine aktivieren.

Ordinate: cAMP-Synthese in nM. Abszisse: Basal-Wert und Testsubstanz in Maximal-Konzentrationen.

4 Ergebnisse

	n	E_{max} (cAMP in nM)	Basalwert (cAMP in nM)
Iper-6-phth			
CTX	4	199,0 ± 20,5 ^{NS}	193,1 ± 18,3 ^{NS}
PTX	4	19,5 ± 5,2 ^{NS}	21,8 ± 2,7 ^{NS}
PTX, FR	4	16,8 ± 4,2 ^{NS}	17,3 ± 1,8 ^{NS}
Kontrolle	4	29,8 ± 5,4 ^{NS}	33,4 ± 3,4 ^{NS}
FR	4	24,0 ± 5,0 ^{NS}	27,4 ± 3,0 ^{NS}
Iper-6-naph			
CTX	3	199,0 ± 20,5 ^{NS}	193,1 ± 18,3 ^{NS}
PTX	3	17,7 ± 7,1 ^{NS}	23,9 ± 2,8 ^{NS}
PTX, FR	3	14,8 ± 5,3 ^{NS}	18,4 ± 3,0 ^{NS}
Kontrolle	3	21,5 ± 5,0 ^{NS}	31,5 ± 5,1 ^{NS}
FR	3	17,4 ± 5,4 ^{NS}	24,9 ± 0,8 ^{NS}
Iper-7-phth			
CTX	3	211,8 ± 4,8 ^{NS}	190,3 ± 15,8 ^{NS}
PTX	3	105,4 ± 17,8 ⁺	22,8 ± 3,0 ⁺
PTX, FR	3	56,1 ± 8,3 ⁺	20,3 ± 2,1 ⁺
Kontrolle	3	101,1 ± 9,0 ⁺⁺	28,8 ± 4,5 ⁺⁺
FR	3	63,1 ± 5,9 ⁺⁺	29,1 ± 3,5 ⁺⁺
Iper-7-naph			
CTX	3	218,6 ± 11,9 ^{NS}	213,7 ± 13,3 ^{NS}

4 Ergebnisse

PTX	3	35,6 ± 6,6 ^{NS}	23,9 ± 3,0 ^{NS}
PTX, FR	3	20,0 ± 7,8 ^{NS}	18,4 ± 3,0 ^{NS}
Kontrolle	3	40,0 ± 7,6 ^{NS}	29,6 ± 4,8 ^{NS}
FR	3	22,2 ± 6,1 ^{NS}	24,9 ± 0,8 ^{NS}

Iper-8-phth

CTX	3	201,7 ± 5,3 ^{NS}	197,3 ± 9,5 ^{NS}
PTX	3	119,9 ± 12,6 ⁺⁺	25,4 ± 7,6 ⁺⁺
PTX, FR	3	94,7 ± 20,0 ⁺	23,6 ± 7,5 ⁺
Kontrolle	3	109,0 ± 18,7 ⁺	25,2 ± 6,6 ⁺
FR	3	66,9 ± 11,3 ⁺	22,6 ± 6,0 ⁺

Iper-8-naph

CTX	3	209,0 ± 1,5 ^{NS}	196,4 ± 5,7 ^{NS}
PTX	3	46,5 ± 11,5 ^{NS}	29,3 ± 9,0 ^{NS}
PTX, FR	3	33,8 ± 7,7 ^{NS}	26,2 ± 8,0 ^{NS}
Kontrolle	3	42,0 ± 7,2 ^{NS}	25,4 ± 5,8 ^{NS}
FR	3	31,1 ± 6,1 ^{NS}	25,0 ± 6,2 ^{NS}

Iper-10-phth

CTX	3	204,0 ± 3,1 ^{NS}	197,3 ± 9,5 ^{NS}
PTX	3	64,4 ± 16,3 ^{NS}	25,4 ± 7,6 ^{NS}
PTX, FR	3	43,6 ± 10,2 ^{NS}	23,6 ± 7,5 ^{NS}
Kontrolle	3	59,1 ± 10,3 ^{NS}	25,2 ± 6,6 ^{NS}

4 Ergebnisse

FR	3	39,1 ± 6,5 ^{NS}	22,6 ± 6,0 ^{NS}
Iper-10-naph			
CTX	3	189,2 ± 8,2 ^{NS}	196,4 ± 5,7 ^{NS}
PTX	3	49,0 ± 1,0 ⁺⁺⁺	20,4 ± 1,9 ⁺⁺⁺
PTX, FR	3	41,1 ± 9,0 ^{NS}	26,2 ± 8,0 ^{NS}
Kontrolle	3	55,9 ± 9,0 ⁺	25,4 ± 5,8 ⁺
FR	3	37,3 ± 7,2 ^{NS}	25,0 ± 6,2 ^{NS}
Iper-fri-phth			
CTX	3	211,8 ± 12,3 ^{NS}	178,5 ± 3,0 ^{NS}
PTX	3	310,4 ± 8,2 ⁺⁺⁺	41,2 ± 10,4 ⁺⁺⁺
PTX, FR	3	136,0 ± 9,7 ⁺⁺⁺	20,4 ± 2,3 ⁺⁺⁺
Kontrolle	3	276,3 ± 49,5 ⁺⁺	44,4 ± 5,2 ⁺⁺
FR	3	84,7 ± 4,3 ⁺⁺⁺	21,3 ± 1,2 ⁺⁺⁺
Iper-fri-naph			
CTX	3	177,5 ± 14,6 ^{NS}	176,2 ± 12,8 ^{NS}
PTX	3	48,5 ± 10,2 ^{NS}	36,0 ± 9,0 ^{NS}
PTX, FR	3	29,1 ± 3,5 ^{NS}	23,8 ± 3,2 ^{NS}
Kontrolle	3	61,5 ± 4,3 ⁺	39,8 ± 5,9 ⁺
FR	3	31,9 ± 5,4 ^{NS}	23,8 ± 3,5 ^{NS}

Tabelle 20: Signifikanztest zwischen Basalwerten und der maximalen Zellantwort, die in Folge einer Stimulation durch dualsterische Liganden ausgelöst wurde.

^{NS}: Nicht signifikanter Unterschied zwischen den Basalwerten und der Ligand-vermittelten cAMP-Synthese. ^{+,++,+++}: Signifikanter Unterschied zwischen den Basalwerten und der Ligand-vermittelten cAMP-Synthese (t-Test, p<0,05, 0,01, 0,001).

4 Ergebnisse

Aufgrund der starken Streuung zwischen den Einzelversuchen, wenn die Ergebnisse nicht normiert, sondern in absoluten Zahlen dargestellt werden, können für diese Versuchsreihe keine endgültigen Aussagen über die Signifikanz getroffen werden. Demzufolge werden bei der Darstellung der Ergebnisse nur Tendenzen aufgegriffen. Die Befunde für Iper-6-phth und Iper-6-naph stehen in Einklang mit den Daten, die in Kapitel 4.5.4 für cAMP-Assays ohne Toxin-Behandlung beschrieben worden sind. Beide Hybride zeigten keinerlei G_s Protein-Aktivierung. Mit längerer Kettenlänge und kleinem allosterischen Substituenten verbesserte sich die intrinsische Aktivität für G_s -abhängige Signalwege. Vergleichbar mit den Daten für die drei Orthostere zeigten auch Iper-7-phth, Iper-8-phth und Iper-fri-phth, dass die intrazelluläre cAMP Generierung hauptsächlich auf $G_{q/11}$ Proteine zurückzuführen war, G_s Proteine aber auch eine $G_{q/11}$ -unabhängige Stimulation der Adenylylzyklen bewirken konnten. Verlängert man die Alkyl-Kette um weitere Kohlenstoffatome (vgl. Iper-10-phth) zeigte sich, dass intakte $G_{q/11}$ Proteine für eine cAMP-Produktion unbedingt erforderlich waren. Wurden $G_{q/11}$ Proteine mittels FR ausgeschaltet, kam die cAMP Produktion im Fall von Iper-10-phth zum Erliegen. Mit größerem allosterischen Substituenten verstärkte sich dieses Phänomen. Die Hybride Iper-7-naph, Iper-8-naph, Iper-10-naph und Iper-fri-naph konnten keine rein G_s -vermittelte Aktivierung von Adenylylzyklen bewirken und führten damit zu einer Stimulation von Adenylylzyklen, die von dem Vorhandensein intakter $G_{q/11}$ Proteine abhängig war.

4.5.5.4 Hybride mit kleinem allosterischen Rest konnten Adenylylzyklen $G_{q/11}$ -unabhängig stimulieren

Im Folgenden werden die oben beschriebenen Phänomene über die Abhängigkeit des Ausmaßes einer Adenylylzyklen-Stimulation von der Größe des allosterischen Restes in Form von Dosis-Wirkungskurven genauer beleuchtet.

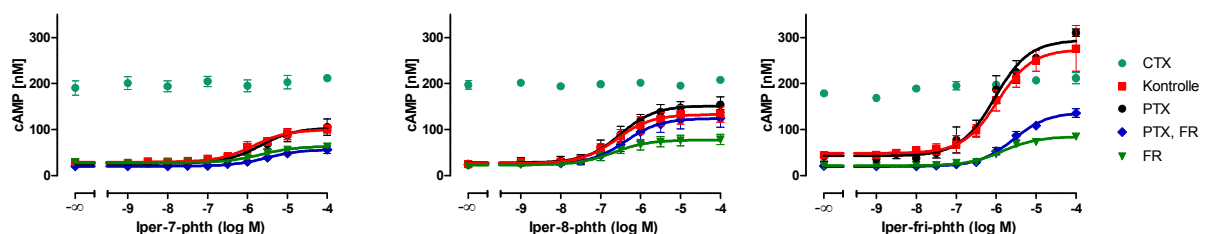


Abbildung 32: Hybridsubstanzen mit dem kleinen allosterischen Substituenten Phthalimid konnten Adenylylzyklen $G_{q/11}$ -unabhängig stimulieren.

Ordinate: cAMP Produktion in nM. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der jeweiligen Testsubstanzen. Legende: G Protein-Inhibitoren, die zur Generierung der jeweiligen Kurven eingesetzt wurden.

Wurden die Zellen mit CTX vorinkubiert, konnte keine weitere Agonist-vermittelte cAMP Generierung detektiert werden, weswegen im weiteren Verlauf dieser Versuchsreihe darauf verzichtet wurde, CTX in allen Toxin-Kombinationen einzusetzen. Für die Untersuchungen an den Hybriden wurden dementsprechend nur CTX und keine CTX-Kombinationen verwendet.

Alle drei dargestellten Hybride konnten sowohl $G_{q/11}$ Protein-abhängig (rote und schwarze Kurve) als auch $G_{q/11}$ Protein-unabhängig (grüne und blaue Kurve) Adenylylzyklasen stimulieren und damit eine intrazelluläre cAMP-Produktion bewirken. Die FR- und die PTX/FR-behandelten Zellen zeigten im Fall von Iper-7-phth einen identischen Kurvenverlauf, was einen ersten Hinweis darauf lieferte, dass dieses Hybrid keine $G_{i/o}$ -abhängigen Signalwege aktivieren konnte, auch dann nicht, wenn die, vom M1-Rezeptor bevorzugten $G_{q/11}$ Proteine, blockiert worden sind. Die detektierten cAMP Level lagen sowohl für die Kurven der $G_{q/11}$ inhibierten Zellen, als auch für die Kontrollbedingungen weit unterhalb der maximalen Zellantwort, die durch die CTX-Daten vorgegeben worden war. Iper-7-phth war folglich ein Partialagonist für G_s -abhängige Signalwege. Iper-8-phth verhielt sich ähnlich wie Iper-7-phth, jedoch scheint es neben $G_{q/11}$ und G_s Proteinen auch $G_{i/o}$ Proteine aktivieren zu können, da die Kurve für FR und PTX behandelte Zellen (blaue Kurve) oberhalb der grünen Kurve lag, bei der nur $G_{q/11}$ Proteine ausgeschaltet wurden. Wie oben bereits erwähnt, haben G_s und $G_{i/o}$ Proteine gegenläufige Effekte auf Adenylylzyklasen; G_s Proteine stimulieren, $G_{i/o}$ Proteine inhibieren diese. Werden $G_{i/o}$ Proteine mittels PTX blockiert, sollte in der Regel eine cAMP-Produktion resultieren, die höher ist, als unter Kontrollbedingungen. Im Fall von Iper-8-phth wurde durch die $G_{i/o}$ Protein-Inhibition eine maximale Zellantwort beobachtet, die nicht signifikant verschieden von der Kontrollkurve war (schwarze bzw. rote Kurve). Eine simultane Blockade von $G_{i/o}$ und $G_{q/11}$ Proteinen führte zu einem Anstieg der cAMP-Konzentration im Vergleich zu einer reinen $G_{q/11}$ Protein-Ausschaltung. Demzufolge scheinen $G_{i/o}$ Proteine im Fall dieses Hybrids in den Mechanismus der cAMP-Generierung involviert zu sein. Iper-fri-phth zeigte ein ähnliches Verhalten für die cAMP-Synthese wie Iperoxo: Die Kontrollkurve und die Kurve der PTX-behandelten Zellen scheinen das maximale cAMP Level, vorgegeben durch CTX, zu übersteigen. Allerdings konnte auch in diesem Fall aufgrund der starken Streuung keine endgültige Aussage getroffen werden. Durch eine Ausschaltung von $G_{q/11}$ Proteinen mittels FR kam es zu einer hoch signifikanten Verminderung des intrazellulären cAMP Levels nach Rezeptor-Aktivierung, welche durch die simultane Inhibition von $G_{q/11}$ und $G_{i/o}$ Proteinen ebenfalls wieder abgeschwächt werden konnte.

4.5.5.5 Hybride mit dem allosterischen Substituenten Naphthalimid konnten keine rein G_s -vermittelte Stimulierung der Adenylylzyklen bewirken

Auch im Fall der Hybride mit dem größeren allosterischen Substituenten Naphthalimid wurden zur besseren Betrachtung Dosis-Wirkungskurven generiert.

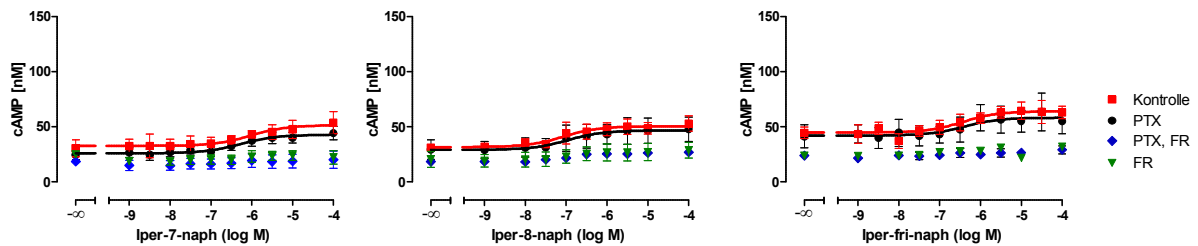


Abbildung 33: Hybride mit dem größeren allosterischen Rest führten nicht zu einer rein G_s -vermittelten Stimulation der Adenylylzyklen.

Ordinate: cAMP Produktion in nM. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der jeweiligen Testsubstanzen. Legende: G Protein-Inhibitoren, die zur Generierung der jeweiligen Kurven eingesetzt worden sind.

Die maximale Zellantwort, die durch CTX ermittelt werden kann, ist in diesen Graphen nicht mit abgebildet. Diese lag in etwa bei 200 bis 250 nM. Da sich jedoch nur sehr kleine Messfenster für diese drei Hybride ergeben haben, wurde eine Ordinaten-Skala gewählt, die die Datenpunkte für die CTX-behandelten Zellen nicht miteinschließt. Betrachtet man nun die Naphthalimid-Hybride zeigte sich, dass der große allosterische Rest eine Aktivierung von Adenylylzyklen, die ausschließlich von G_s Proteinen vermittelt wird, vollständig verhindern konnte. Die drei getesteten Hybride Iper-7-naph, Iper-8-naph und Iper-fri-naph zeigten nach Ausschaltung der $G_{q/11}$ Proteine keine weitere intrazelluläre cAMP-Generierung, die sich von dem Basalwert signifikant unterschieden hat. Demzufolge waren G_s Proteine zwar vermutlich an der Zellantwort beteiligt, konnten sie aber ohne simultane Aktivierung von $G_{q/11}$ Proteinen nicht bewirken. Ob $G_{q/11}$ Proteine auch G_s Protein-unabhängig mit Adenylylzyklen interagieren können, konnte anhand dieser Daten nicht beurteilt werden, da eine G_s Protein-Aktivierung durch CTX nur maskiert und nicht inhibiert werden kann. Mittels CTX wird die intrinsische GTPase-Aktivität der $G\alpha_s$ -Untereinheit aufgehoben und G_s Proteine verbleiben im aktiven Zustand. Eine darüberhinausgehende Agonist-vermittelte Aktivierung konnte nicht beobachtet werden. Aufgrund der Befunde, die in der Literatur zu finden sind, wird aber kein G_s Protein-unabhängiger Mechanismus vermutet, sondern eine simultane Aktivierung von G_s und $G_{q/11}$ Proteinen, die zu einer synergistischen Stimulierung der Adenylylzyklen führen

(Guillou et al., 1999, Cooper 2003, Olianas et al., 2012).

4.5.5.6 Der Ca^{2+} -Chelator BAPTA-AM hatte keinen Effekt auf die Adenylylzyklasen

Wie in Kapitel 4.5.5 beschrieben, gehört Ca^{2+} zu den möglichen Stimuli, die einen Einfluss auf Adenylylzyklasen haben können. Um die Stimuli, die auf die Adenylylzyklasen in CHO-Zellen wirken, genauer zu beleuchten, wurde in einem weiteren Schritt der Ca^{2+} -chelator BAPTA-AM in cAMP-Assays zugesetzt. BAPTA-AM fängt das, in Folge einer $G_{q/11}$ Protein-Aktivierung, intrazellulär gebildete Ca^{2+} ab, woraufhin Adenylylzyklasen nicht mehr durch Ca^{2+} beeinflusst werden können.

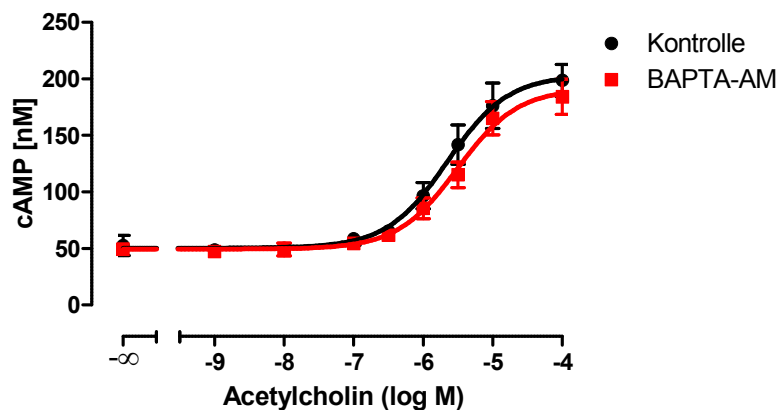


Abbildung 34: Der Ca^{2+} -Chelator BAPTA-AM hatte keinen Einfluss auf die intrazelluläre cAMP-Generierung.

Ordinate: cAMP in nM. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz Acetylcholin.

	n	n_H	E_{max}	pEC_{50}
Kontrolle	3	$1,10 \pm 0,26^{n.s.}$	$203,2 \pm 9,4^{NS}$	$5,65 \pm 0,11^{N.S.}$
BAPTA-AM	3	$1,10 \pm 0,24^{n.s.}$	$191,5 \pm 8,5^{NS}$	$5,51 \pm 0,10^{N.S.}$

Tabelle 21: Kenngrößen \pm S.E.M. der Konzentrations-Effekt Kurven aus Abbildung 34.

n: Anzahl der Experimente. n_H : Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. E_{max} : Maximale Zellantwort in Absolutwerten (cAMP in nM). pEC_{50} : Negativer dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz, welche eine halbmaximale Zellantwort hervorgerufen hat. ^{n.s.}: Nicht signifikanter Unterschied zu einem Hill-Koeffizienten $n_H=1$ (F-Test, $p>0,05$). ^{NS}: Nicht signifikanter Unterschied zwischen dem E_{max} -Wert unter Kontrollbedingungen und unter Einsatz von BAPTA-AM. ^{N.S.}: Nicht signifikanter Unterschied zwischen dem pEC_{50} -Wert unter Kontrollbedingungen und unter Einsatz von BAPTA-AM.

Die Ergebnisse zeigen, dass Ca^{2+} keinen Effekt auf die Adenylylzyklasen ausgeübt hat, da die erhobenen Daten für die mit BAPTA-AM behandelten Zellen keinen signifikanten Unterschied zu den Kontrollbedingungen zeigten. Demzufolge beruht der beobachtete Aktivierungsmechanismus der Adenylylzyklasen vermutlich auf einem direkten „Cross-talk“ zwischen $G_{q/11}$ und G_s Proteinen.

4.5.5.7 HEK 293 Zellen zeigten keinen „Cross-talk“ zwischen G_s und $G_{q/11}$ Proteinen

Der in den CHO-Zellen beobachtete „Cross-talk“ zwischen $G_{q/11}$ und G_s Proteinen ist ein Mechanismus, der stark vom Zellhintergrund abhängig ist, da verschiedene Zelltypen unterschiedliche Isoformen der Adenylylzyklasen exprimieren können. Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob auch andere Zell-Linien zu dem oben beschriebenen „Cross-talk“ befähigt sind. HEK 293 Zellen stammen aus dem menschlichen Nierengewebe und verfügen neben weiteren Rezeptoren auch über den muskarinischen Acetylcholin-Rezeptor vom Subtyp 3 (M3). Sie exprimieren mRNA für die Adenylylzyklasen I, III, V, VI, VII und IX und zu sehr geringen Konzentrationen auch IV (Atwood et al., 2011). Eine eindeutige Aussage über einen potentiellen „Cross-talk“ zwischen $G_{q/11}$ und G_s Proteinen zu treffen, ist aufgrund der Vielfalt an unterschiedlichen Isoformen der Adenylylzyklasen in diesem Zelltyp sehr schwierig, da alle Isoformen durch unterschiedliche Stimuli zum Teil auch gegensätzlich beeinflusst werden können.

Um eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den Ergebnissen zu erzielen, wurden die Versuche parallel auch an CHO-Zellen, die stabil mit dem Subtyp 3 der muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren transfiziert worden sind, durchgeführt. Potentielle Unterschiede in den Ergebnissen würden damit nur noch durch die unterschiedlichen Zell-Linien verursacht werden.

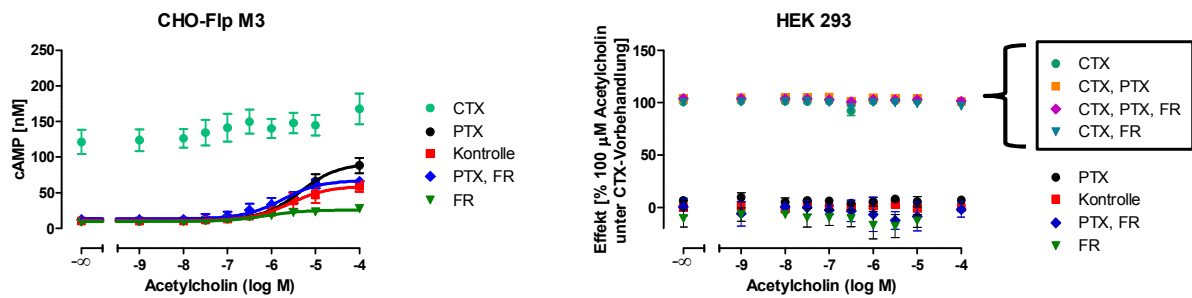


Abbildung 35: Im Gegensatz zu CHO-M3 Zellen ließ sich der G_s -Signalweg des M3-Rezeptors in HEK 293 Zellen nicht durch Acetylcholin aktivieren.

CHO-F1p M3-Zellen: Ordinate: cAMP in nM. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz Acetylcholin. Legende: G Protein-Inhibitoren, die zur Generierung der jeweiligen Kurven eingesetzt wurden.

HEK 293 Zellen: Ordinate: Zellantwort in Prozent, 100 % entspricht dem Wert, der durch 100 μ M Acetylcholin unter CTX-Vorbehandlung ausgelöst wurde, 0 % entspricht dem Wert, der durch 100 μ M Acetylcholin unter Kontrollbedingungen ausgelöst wurde. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz Acetylcholin. Legende: G Protein-Inhibitoren, die zur Generierung der jeweiligen Kurven eingesetzt wurden.

Die erhobenen Ergebnisse für HEK 293 Zellen lagen außerhalb des Messfensters der cAMP-Standardkurve, weshalb keine Absolutwerte berechnet werden konnten. Aus diesem Grund wurden die Messdaten in diesem Fall normiert. Auch die Einstellung auf verschiedene Zellzahlen im Versuch konnte das Messfenster nicht an die Standardkurve anpassen.

Der muskarinische Acetylcholin-Rezeptor vom Subtyp 3 (M3), der in HEK 293 Zellen endogen exprimiert wird, ließ sich nicht durch muskarinische Agonisten zur G_s Protein-Aktivierung stimulieren. Ein Grund dafür könnte sein, dass die endogen exprimierten M3-Rezeptoren in HEK 293 Zellen nicht zur promiskuitiven G Protein-Aktivierung befähigt sind, sondern nur $G_{q/11}$ Proteine rekrutieren können. Im Gegensatz zu CHO-Zellen exprimieren HEK 293 Zellen Cholinesterasen. Aus diesem Grund wäre es auch möglich, dass aufgrund des schnellen Abbaus von Acetylcholin durch Cholinesterasen keine intrazelluläre cAMP-Synthese detektiert werden konnte, weswegen in weiteren Versuchen Iperoxo als Muskarin-Rezeptor-Agonist eingesetzt wurde.

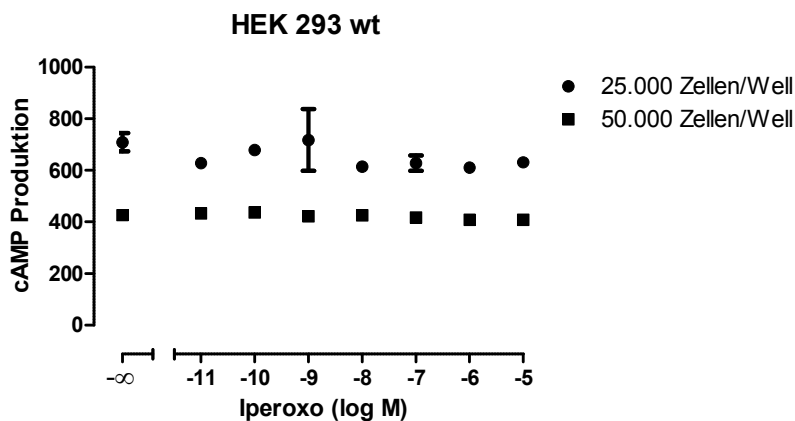


Abbildung 36: Iperoxo führte in HEK 293 Zellen zu keiner detektierbaren cAMP-Synthese.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. eines repräsentativen Versuches. Ordinate: cAMP-Produktion. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz Iperoxo.

In Einklang mit den Daten für Acetylcholin konnte auch der orthosterische Muskarin-Rezeptor-Agonist Iperoxo keine G_s -abhängigen Signalwege in HEK 293 Zellen aktivieren. Demzufolge scheinen HEK 293 Zellen nicht zu einer promiskuitiven G Protein-Aktivierung befähigt zu sein.

Um trotzdem eine Aussage über einen möglichen „Cross-talk“ zwischen $G_{q/11}$ und G_s Proteinen in HEK 293 Zellen treffen zu können, wurden weitere Versuche an diesem Zelltyp mit Prostaglandin E_1 (PGE_1) zur Aktivierung endogen exprimierter Prostaglandin-Rezeptoren durchgeführt. Prostaglandin-Rezeptoren koppeln bevorzugt an G_s Proteine, allerdings haben IP1-Versuche an CHO-M1 Zellen gezeigt, dass auch der Signalweg der präferierten G Protein-Klasse einem „Cross-talk“ verschiedener G Proteine unterliegen kann. Aus diesem Grund wurde der Prostaglandin-Rezeptor als geeignet erachtet, um ein Aktivierungsmuster zu untersuchen, welches auf der simultanen Aktivierung verschiedener G Proteine beruht.

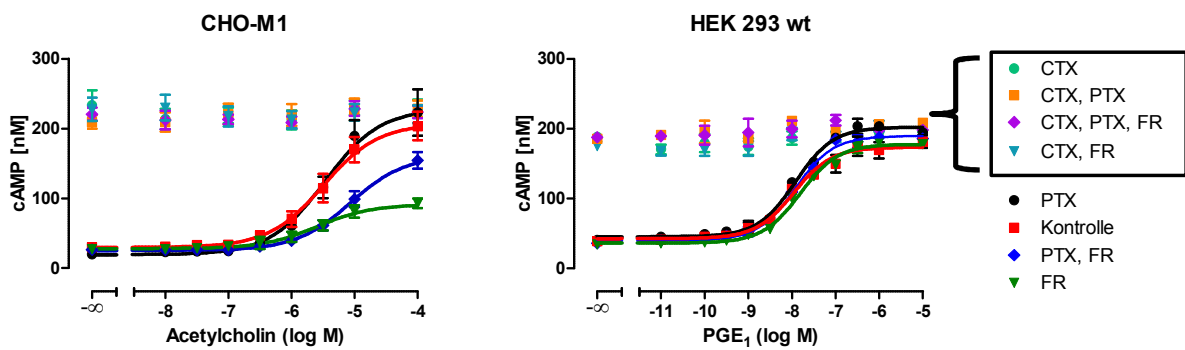


Abbildung 37: Der in CHO-Zellen beobachtete „Cross-talk“ zwischen $G_{q/11}$ und G_s Proteinen konnte in HEK 293 Zellen nicht beobachtet werden.

Ordinate: cAMP in nM. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der jeweiligen Testsubstanz. Legende: G Protein-Inhibitoren, die zur Generierung der jeweiligen Kurven eingesetzt wurden.

Der linke Graph stellt den in Kapitel 4.5.5.1 beschriebenen „Cross-talk“ zwischen $G_{q/11}$ und G_s Proteinen dar. Dieser Graph wurde dort bereits gezeigt und erläutert und ist nur zur besseren Vergleichbarkeit mit den Daten für die HEK 293 Zellen nochmal dargestellt. Der rechte Graph zeigt, dass neben G_s Proteinen keine G Proteine anderer Familien an der intrazellulären cAMP-Synthese beteiligt waren. Das gemessene cAMP-Signal beruhte folglich nur auf der Stimulation von Adenylylzyklasen durch G_s Proteine. Diese Befunde untermauern die Hypothese, dass der „Cross-talk“ zwischen $G_{q/11}$ und G_s Proteinen abhängig von der verwendeten Zelllinie und den darin exprimierten Isoformen der Adenylylzyklasen ist.

4.5.5.8 Der Ca^{2+} -Chelator BAPTA-AM zeigte keinen Effekt in HEK 293 Zellen

Um einen möglichen Effekt von Ca^{2+} auf die Adenylylzyklasen zu detektieren, der möglicherweise den Effekt anderer Stimuli wieder ausgleicht, wurde auch im Fall der HEK 293 Zellen der Ca^{2+} -Chelator BAPTA-AM eingesetzt, um intrazellulär gebildetes Ca^{2+} abzufangen.

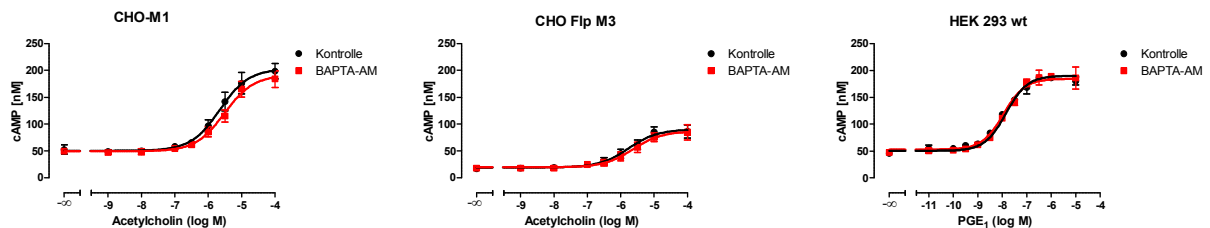


Abbildung 38: BAPTA-AM hatte keinen Effekt auf die cAMP-Generierung in CHO- und HEK 293 Zellen.

Ordinate: cAMP in nM. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der jeweiligen Testsubstanzen.

Der linke Graph wurde bereits in Kapitel 4.5.5.6 gezeigt und erläutert und ist nur zur besseren Vergleichbarkeit auch hier mit aufgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass der Ca^{2+} -Chelator BAPTA-AM keinen Effekt auf die Stimulation der Adenylylzyklasen in CHO-M1, CHO-Flp M3 und HEK 293 Zellen ausgeübt hat. Ca^{2+} scheint folglich kein Stimulus für die cAMP-Synthese in den hier getesteten Zelltypen zu sein.

4.6 [³⁵S]GTPγS-Bindungsversuche

[³⁵S]GTPγS interagiert mit dem ersten Schritt der Signaltransduktion von Rezeptor auf G Proteine. Nach erfolgter Rezeptor-Aktivierung rekrutieren die Rezeptoren G Proteine, die daraufhin aktiviert werden indem bereits gebundenes GDP gegen GTP ausgetauscht wird. Im Fall des [³⁵S]GTPγS-Experimentes wird radioaktiv-markiertes [³⁵S]GTPγS, welches im Überschuss zugegeben wurde, anstelle von GTP an das G Protein gebunden. [³⁵S]GTPγS weist eine GTPase Stabilität auf und kann dementsprechend nicht mehr vom G Protein abdissoziieren und der G Protein-Zyklus wird unterbrochen. Der Vorteil von [³⁵S]GTPγS-Bindungsversuchen gegenüber „second-messenger assays“, wie zum Beispiel IP1- oder cAMP-Assays oder DMR-Versuchen liegt in dem Eingreifen in die Signalkaskade auf Höhe der Interaktion zwischen Rezeptor und G Protein, also zu einem sehr frühen Zeitpunkt der

Signalkaskade. Deswegen unterliegen diese Untersuchungen einer geringeren Signalamplifikation (Harrison und Traynor, 2003), als „second-messenger assays“.

4.6.1 Einstellung der optimalen GDP-Konzentration in [³⁵S]GTPγS-Versuchen

Aufgrund des schnelleren Austausches von GDP gegen GTP in G_{i/o} Proteinen im Vergleich zu G_s und G_{q/11} Proteinen, eignet sich dieses Assay besonders gut zur Detektion der G_{i/o} Protein-Aktivierung (Milligan, 2003). Besonders für die Subtypen M2 und M4, die bevorzugt an G_{i/o} Proteine koppeln, stellen [³⁵S]GTPγS-Versuche eine gute Messmethode zur Quantifizierung der G_{i/o} Protein-Aktivierung dar (Harrison und Traynor, 2003, Milligan, 2003). Um auch die G_{i/o} Protein-Aktivierung an den primär G_{q/11}-gekoppelten ungeradzahligen muskarinischen Subtypen zu untersuchen, besteht die Möglichkeit das Messfenster durch die Zugabe von GDP zu vergrößern, um Effekte besser detektieren zu können (Lazareno und Birdsall, 1993, Breivogel et al., 1998).

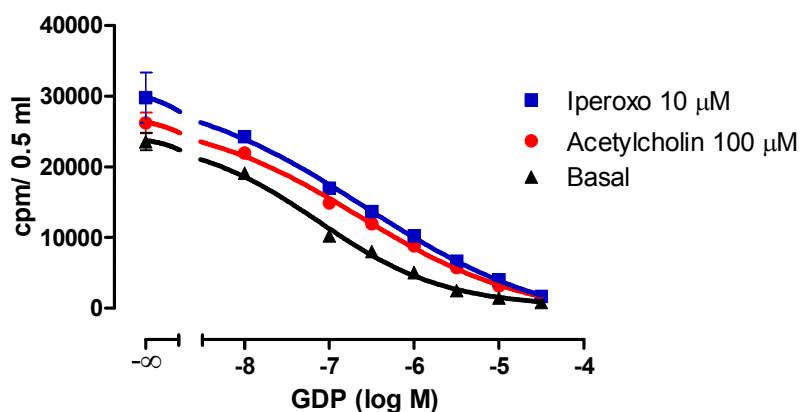


Abbildung 39: Optimierung der GDP-Konzentration in [³⁵S]GTPγS-Versuchen.

Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E.M. aus einem repräsentativen Einzelversuch in Quadruplikaten. Ordinate: Zerfälle pro Minute/ counts per minute (cpm) im Versuchsansatz von 0,5 ml unter Basalbedingungen (Inkubationspuffer), Acetylcholin (100 μM) und Iperoxo (10 μM). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von GDP.

Bei geringen Konzentrationen an GDP erhöhte sich sowohl das Agonist-vermittelte Messfenster, als auch die basale [³⁵S]GTPγS-Bindung, da der Radioligand vermehrt an ungesättigte Nukleotidbindungsstellen der G Proteine bindet.

4 Ergebnisse

GDP-Konzentration		cpm/0,5 ml	Messfenster ($\Delta_{\text{Agonist-Basal}}$)
0,01 μM	Basal	19130 \pm 864	-
	ACh 100 μM	21999 \pm 1448	2869 [*]
	Iperoxo 10 μM	24295 \pm 767	5165 ^{**}
0,1 μM	Basal	10252 \pm 320	-
	ACh 100 μM	14896 \pm 618	4644 ^{***}
	Iperoxo 10 μM	16990 \pm 512	6738 ^{***}
0,3 μM	Basal	8005 \pm 479	-
	ACh 100 μM	11945 \pm 432	3940 ^{***}
	Iperoxo 10 μM	13702 \pm 353	5697 ^{***}
1 μM	Basal	5051 \pm 226	-
	ACh 100 μM	8825 \pm 202	3774 ^{***}
	Iperoxo 10 μM	10243 \pm 478	5192 ^{***}
3 μM	Basal	2515 \pm 26	-
	ACh 100 μM	5754 \pm 165	3239 ^{***}
	Iperoxo 10 μM	6663 \pm 360	4148 ^{***}
10 μM	Basal	1457 \pm 55	-
	ACh 100 μM	3156 \pm 89	1699 ^{***}
	Iperoxo 10 μM	4008 \pm 338	2551 ^{***}

30 μ M	Basal	825 \pm 100	-
	ACh 100 μ M	1566 \pm 37	741 ^{***}
	Iperoxo 10 μ M	1686 \pm 103	861 ^{***}

Tabelle 22: Mess-Signale in [³⁵S]GTP γ S-Versuchen an CHO-M1 Homogenaten in Abhängigkeit der GDP-Konzentration.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus einem repräsentativen Einzelversuch in Vierfachbestimmung. cpm/0,5 ml: Zerfälle pro Minute/ counts per minute im Versuchsansatz von 0,5 ml. ^{***}: Signifikant verschieden vom jeweiligen Basalwert (One-way ANOVA, Dunnett's post Test, $p < 0,05$, 0,01, 0,001).

Für alle GDP-Konzentrationen haben sich sowohl für Acetylcholin als auch für Iperoxo Messwerte ergeben, die signifikant verschieden vom jeweiligen Basalwert waren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine GDP-Konzentration von 10 μ M für die weiteren Versuche verwendet, da bei sehr geringen Konzentrationen an GDP häufig flache Kurven resultieren, die sich nicht mit einem normalen Steilheitsmaß $n_H=1$ anpassen lassen.

4.6.2 Die [³⁵S]GTP γ S-Bindung an CHO-M1 Homogenaten wurde primär durch G_{i/o} Proteine vermittelt

Untersuchungen an CHO- und HEK Zellen an ungeradzahligen Muskarin-Rezeptoren (M1 oder M3) haben ergeben, dass diese Rezeptor-Subtypen, die vorwiegend PTX-insensitive G_{q/11} Proteine rekrutieren, in [³⁵S]GTP γ S-Bindungsversuchen sowohl über die Aktivierung PTX-sensitiver als auch PTX-insensitiver G Proteine eine Bindung an [³⁵S]GTP γ S induzieren (Lazareno und Birdsall, 1993; Offermanns et al., 1994; Burford et al., 1995). Aus diesem Grund wurde zunächst überprüft, welche G Protein-Familie in den hier getesteten CHO-M1 Homogenaten in die Bindung an [³⁵S]GTP γ S involviert war. Eine mögliche Beteiligung von PTX-sensitiven G_{i/o} Proteinen sollte durch den Einsatz des G_{i/o} Protein-Inhibitors PTX aufgedeckt werden und Aufschluss darüber geben, ob die gemessene [³⁵S]GTP γ S-Bindung wirklich G_{i/o}-vermittelt oder durch andere G Proteine bedingt ist.

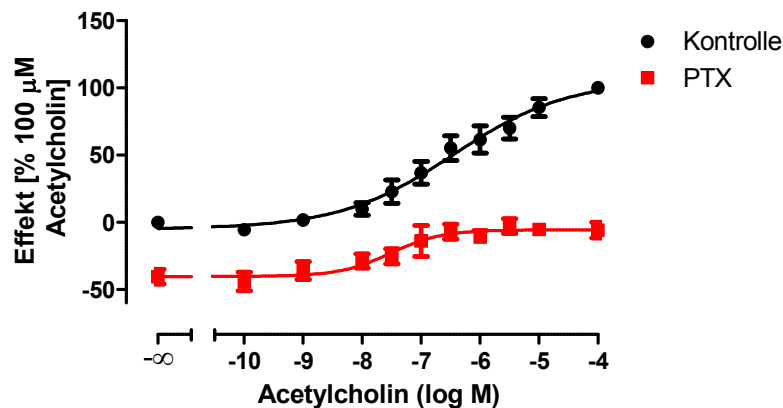


Abbildung 40: Die Zellantwort in [³⁵S]GTPγS-Versuchen war G_{i/o}-vermittelt.

Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E.M. aus drei Einzelversuchen in Vierfachbestimmung. Ordinate: Zellantwort in Prozent. 100 % entspricht dem Effekt, der durch 100 μM des Referenzagonisten Acetylcholin unter Kontrollbedingungen ausgelöst wurde. 0 % entspricht dem Basalwert unter Kontrollbedingungen.

In den in Abbildung 40 dargestellten Daten zeigte sich, dass die [³⁵S]GTPγS-Bindung hauptsächlich durch G_{i/o} Proteine vermittelt wurde, da PTX sowohl die basale, als auch die maximale Zellantwort signifikant absenken konnte. Trotzdem ergab sich auch für Homogenate der PTX-vorbehandelten Zellen ein dosisabhängiger Anstieg der Agonist-vermittelten [³⁵S]GTPγS-Bindung. Demzufolge spielten auch PTX-insensitive G Proteine, zum Beispiel aus der Familie der G_{q/11} Proteine eine Rolle in der hier gemessenen Signaltransduktion des Rezeptors auf G Proteine.

	n	n _H	E _{max}	pEC ₅₀
Kontrolle	3	0,45 ± 0,10*	105,9 ± 11,1	6,45 ± 0,25
PTX	3	0,73 ± 0,38 ^{n.s.}	-5,6 ± 2,7 ⁺⁺⁺	7,51 ± 0,25 [#]

Tabelle 23: Kenngrößen ± S.E.M. der Konzentrations-Effekt Kurven aus Abbildung 40.

n: Anzahl der Experimente. n_H: Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. E_{max}: Maximale Zellantwort in Prozent, bezogen auf den Effekt, der durch 100 μM Acetylcholin ausgelöst wurde. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz, welche eine halbmaximale Zellantwort hervorgerufen hat. ^{n.s.}: Nicht signifikanter Unterschied zu einem Hill-Koeffizienten n_H=1 (F-Test, p>0,05). *: Signifikanter Unterschied zu einem Hill-Koeffizienten n_H=1 (F-Test, p<0,05). ⁺⁺⁺: Signifikanter Unterschied zu dem E_{max}-Wert unter Kontrollbedingungen (t-Test, p<0,001). #: Signifikanter Unterschied zu dem pEC₅₀-Wert unter Kontrollbedingungen.

Die [³⁵S]GTPγS-Bindungskurve unter Kontrollbedingungen war signifikant verschieden von einem Hill-Koeffizienten n_H=1. In den Einzelversuchen konnte nur eine der drei Kurven mit

einem normalen Steilheitsmaß angepasst werden. Die Rezeptor-Ligand-Interaktion scheint demzufolge nicht bimolekular zu sein. Obwohl die einzusetzende GDP-Konzentration zuvor genau austariert worden ist, scheint es in den Dosis-Wirkungskurven von Acetylcholin so zu sein, dass die eingesetzte GDP-Konzentration doch zu gering war und sich deshalb Kurven ergeben haben, die nur mit einem freilaufenden Steilheitsmaß anzupassen waren.

4.6.3 Die drei Orthostere induzierten eine [³⁵S]GTPγS-Bindung an M1-Rezeptoren, jedoch mit unterschiedlicher Wirkstärke

Vergleicht man die Aktivierungs-Charakteristika der drei Orthostere Acetylcholin, Iperoxo und Carbachol, die für $G_{q/11}$ - und G_s -abhängige Signalwege alle vollagonistisches Verhalten gezeigt haben, fallen für die $G_{i/o}$ Protein-Aktivierung markante Unterschiede in den Wirksamkeiten und den intrinsischen Aktivitäten auf.

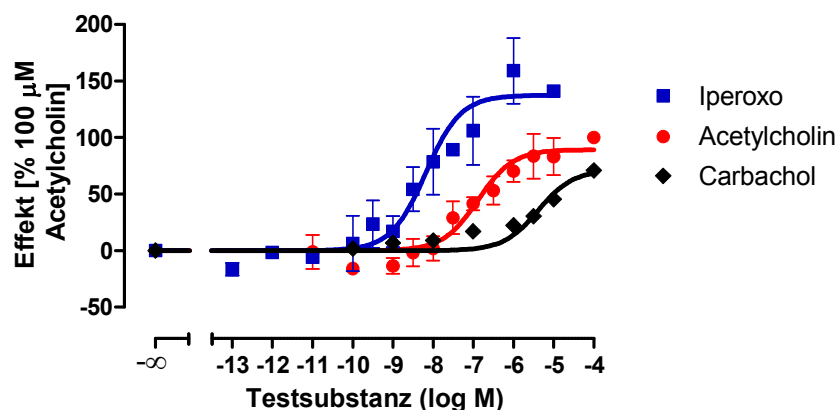


Abbildung 41: Die drei orthosterischen Agonisten zeigten unterschiedliche Effekte auf die [³⁵S]GTPγS-Bindung.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus vier bis fünf Einzelversuchen in Vierfachbestimmung. Ordinate: Zellantwort in Prozent. 100 % entspricht dem Effekt, der durch 100 μM des Referenzagonisten Acetylcholin ausgelöst wurde. 0 % entspricht dem Basalwert. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der jeweiligen Testsubstanz.

4 Ergebnisse

Testsubstanz	n	n_H	E_{max}	pEC_{50}
Acetylcholin	4	$0,75 \pm 0,22^{n.s.}$	$89,3 \pm 6,2^{NS}$	$6,88 \pm 0,15$
Carbachol	4	$0,44 \pm 0,38^{n.s.}$	$71,4 \pm 4,5^{+++}$	$5,38 \pm 0,11^{###}$
Iperoxo	5	$0,56 \pm 0,43^{n.s.}$	$137,4 \pm 13,3^+$	$8,18 \pm 0,20^{##}$

Tabelle 24: Kenngrößen \pm S.E.M. der Konzentrations-Effekt Kurven aus Abbildung 41.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus vier bis fünf Einzelversuchen in Vierfachbestimmung. n: Anzahl der Experimente. n_H : Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. E_{max} : maximale Zellantwort in Prozent, bezogen auf den Effekt, der durch 100 μ M des Referenzagonisten Acetylcholin ausgelöst wurde. pEC_{50} : Negativer dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz, welche eine halbmaximale Zellantwort hervorgerufen hat. ^{n.s.}: Nicht signifikanter Unterschied zu einem Hill-Koeffizienten $n_H=1$ (F-Test, $p>0,05$). ^{NS}: Nicht signifikanter Unterschied zu dem Effekt, der durch 100 μ M des Referenzagonisten Acetylcholin ausgelöst wurde. ^{+,+++}: Signifikanter Unterschied zu dem Effekt, der durch 100 μ M des Referenzagonisten Acetylcholin ausgelöst wurde (t-Test, $p<0,05$, 0,001). ^{##,###}: Signifikanter Unterschied zu dem pEC_{50} -Wert von Acetylcholin (t-Test, $p<0,01$, 0,001).

Iperoxo wies eine signifikant höhere intrinsische Aktivität auf als der endogene Agonist Acetylcholin. Dieses Verhalten wird als superagonistisch klassifiziert. Schrage et al. (2013) konnten das superagonistische Verhalten von Iperoxo bereits an M2 mAChRs für $G_{i/o}$ - und G_s -abhängige Signalwege zeigen. Im Fall des M1-Subtyps zeigte Iperoxo allerdings nur für $G_{i/o}$ -vermittelte Signalwege eine höhere intrinsische Aktivität als der endogene Ligand. Für die Aktivierung von $G_{q/11}$ und G_s Proteinen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der maximalen Zellantwort zwischen Iperoxo und Acetylcholin. Die Wirksamkeit für $G_{i/o}$ -vermittelte Signalwege lag im Fall von Iperoxo um etwa eine Dekade höher, als die von Acetylcholin. Damit zeigte Iperoxo signifikant höhere Wirksamkeiten als Acetylcholin für die Signalwege der drei, im Rahmen dieser Arbeit, untersuchten G Proteine. Im Vergleich zu diesen Befunden zeigte Carbachol partialagonistisches Verhalten für $G_{i/o}$ -abhängige Signalwege. Carbachol wies eine signifikant verminderte intrinsische Aktivität und Wirksamkeit auf als der endogene Ligand Acetylcholin.

4.6.4 Der M1-Rezeptor zeigte in [³⁵S]GTPγS-Bindungsversuchen eine Agonist-unabhängige, spontane Aktivität

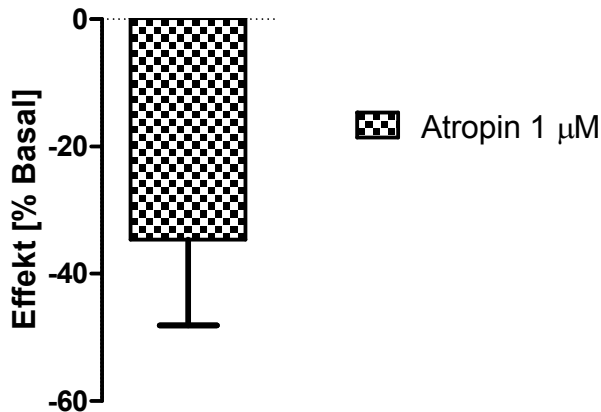


Abbildung 42: Der Einsatz des inversen Agonisten Atropin deckte eine Spontanaktivität der Rezeptoren auf.

Ordinate: Zellantwort in Prozent. 0 % entspricht dem Basalwert.

Testsubstanz	n	Effekt (in %)
Atropin 1 μM	8	-34,6 ± 13,4 ⁺

Tabelle 25: Kenngrößen ± S.E.M. für das Balkendiagramm aus Abbildung 42.

n= Anzahl der Experimente. Effekt (in %): Effekt, welcher durch 1 μM Atropin hervorgerufen wurde. 0% entspricht dem Basalwert. ⁺: Signifikant verschieden von dem Basalwert (t-Test, p<0,05).

Mittels supramaximaler Konzentrationen an inversen Agonisten kann geprüft werden, ob die zu untersuchenden Rezeptoren über eine Agonist-unabhängige, spontane Aktivität verfügen. Inverse Agonisten stabilisieren den inaktiven Rezeptorzustand. Ergeben sich Messwerte, die signifikant unterhalb des Basal-Levels liegen, ist das ein starkes Indiz für einen inversen Agonismus und eine Spontanaktivität der Rezeptoren. Das Maß der Spontanaktivität unterlag in diesem Fall einer starken Streuung innerhalb der Einzelversuche. Die Werte streuten trotz identischer Pufferbedingungen zwischen -4,4 und -107,4 %. Da aber keine weiteren inversen Agonisten im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, hatte diese starke Streuung keinen Effekt auf die erhobenen Daten.

4.6.5 Iper-8-phth und Iper-fri-phth waren Partialagonisten für $G_{i/o}$ -vermittelte Signalwege

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten dualsterischen Hybridliganden konnten mit Ausnahme von Iper-8-phth und Iper-fri-phth keine $G_{i/o}$ -vermittelten Signalwege aktivieren.

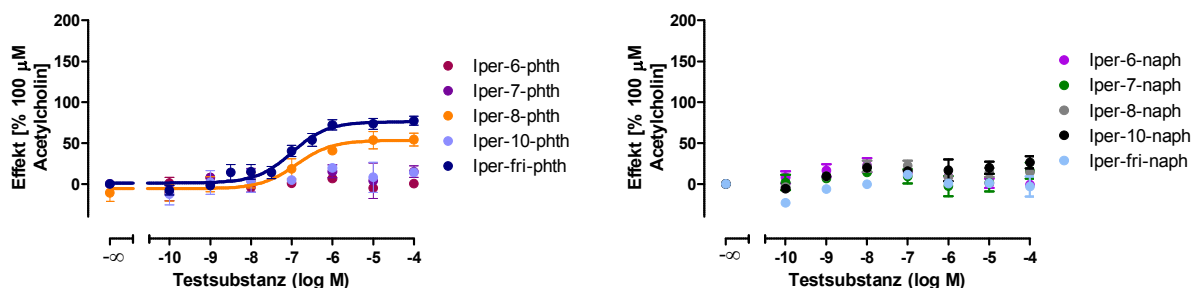


Abbildung 43: Iper-8-phth und Iper-fri-phth zeigten partialagonistisches Verhalten für $G_{i/o}$ -abhängige Signalwege.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus drei bis fünf Einzelversuchen in Vierfachbestimmung. Ordinate: Zellantwort in Prozent. 100 % entspricht dem Effekt, der durch 100 μ M des Referenzagonisten Acetylcholin ausgelöst wurde. 0 % entspricht dem Basalwert. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanzen.

Testsubstanz	n	n_H	E_{max}	pEC_{50}
Iper-8-phth	3	$0,47 \pm 0,30^{n.s.}$	$53,4 \pm 6,5^{++}$	$6,89 \pm 0,33^{N.S.}$
Iper-fri-phth	5	$0,76 \pm 0,20^{n.s.}$	$76,1 \pm 4,4^{+++}$	$7,00 \pm 0,14^{N.S.}$

Tabelle 26: Kenngrößen \pm S.E.M. der Konzentrations-Effekt Kurven aus Abbildung 43.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus drei bis fünf Einzelversuchen in Vierfachbestimmung. n: Anzahl der Experimente. n_H : Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. E_{max} : maximale Zellantwort in Prozent, bezogen auf den Effekt, der durch 100 μ M des Referenzagonisten Acetylcholin ausgelöst wurde. pEC_{50} : Negativer dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz, welche eine halbmaximale Zellantwort hervorgerufen hat. ^{n.s.}: Nicht signifikanter Unterschied zu einem Hill-Koeffizienten $n_H=1$ (F-Test, $p>0,05$). ^{++,+++}: Signifikanter Unterschied zu dem Effekt, der durch 100 μ M des Referenzagonisten Acetylcholin ausgelöst wurde (t-Test, $p<0,01$, 0,001). ^{N.S.}: Nicht signifikanter Unterschied zu dem pEC_{50} -Wert von Acetylcholin.

Anhand der Daten der dualsterischen Hybridliganden in [³⁵S]GTP γ S-Bindungsexperimenten konnte gefolgert werden, dass eine Aktivierung von $G_{i/o}$ Proteinen sensitiver gegenüber einer räumlichen Einschränkung der Rezeptor-Flexibilität durch allosterische Substituenten ist, als die Aktivierung von $G_{q/11}$ und G_s Proteinen. Nur zwei der zehn untersuchten Hybridliganden,

namentlich Iper-8-phth und Iper-fri-phth, konnten $G_{i/o}$ -abhängige Signalwege aktivieren. Kürzere Kettenlängen und voluminösere allosterische Reste scheinen eine $G_{i/o}$ Protein-Aktivierung vollständig zu verhindern. Im untersuchten Konzentrationsbereich besaßen die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Hybride, mit Ausnahme von Iper-8-phth und Iper-fri-phth, keine agonistische Aktivität für $G_{i/o}$ -abhängige Signalwege.

4.7 Messung der intrazellulären Dynamischen Massenumverteilung (DMR)

Im Vergleich zu den oben beschriebenen funktionellen Assays, die die Rekrutierung von G Proteinen einer einzelnen G Protein-Familie untersuchen, stellt die Messung der intrazellulären dynamischen Massenumverteilung eine gute und etablierte Methode (Schröder et al., 2010 und 2011) dar, um die intrazellulären Prozesse, als Folge einer G Protein-Aktivierung, auf tiefergreifender Ebene zu untersuchen. Abhängig von der Familie der aktivierten G Proteine kommt es zu charakteristischen Umbauprozessen des Zytoskeletts und/oder Umstrukturierungen intrazellulär gelegener Proteine und Botenstoffe und damit zu einer veränderten Biomasse innerhalb des durch den Biosensor detektierten Bereiches. Hierbei können sich die Effekte von G Proteinen verschiedener Familien überlagern.

4.7.1 Messung der intrazellulären Massenumverteilung unter Kontrollbedingungen

Werden keine Toxine zu den Zellen zugegeben und alle G Proteine bleiben während des kompletten Versuches aktiv, spricht man von Kontrollbedingungen. Anhand dieser Daten sollte untersucht werden, welche Mess-Signale unter physiologischen Bedingungen detektiert werden können, um Rückschlüsse auf die entsprechenden aktivierten G Proteine ziehen zu können. Im Fall der Messung der Dynamischen Massenumverteilung können sich unter Kontrollbedingungen verschiedene Signalwege, die durch unterschiedliche G Proteine ausgelöst worden sind, überlagern und es resultiert ein „Misch-Signal“.

4.7.1.1 Die orthosterischen Agonisten Acetylcholin, Carbachol und Iperoxo führten hauptsächlich zu einer $G_{q/11}$ Protein-abhängigen Massenumverteilung

Bei der Untersuchung des endogenen muskarinischen Agonisten Acetylcholin und der

4 Ergebnisse

beiden Vollagonisten Carbachol und Iperoxo konnten unter Kontrollbedingungen Mess-Signale detektiert werden, die charakteristisch für eine $G_{q/11}$ Protein-Aktivierung sind.

Kontrollbedingungen

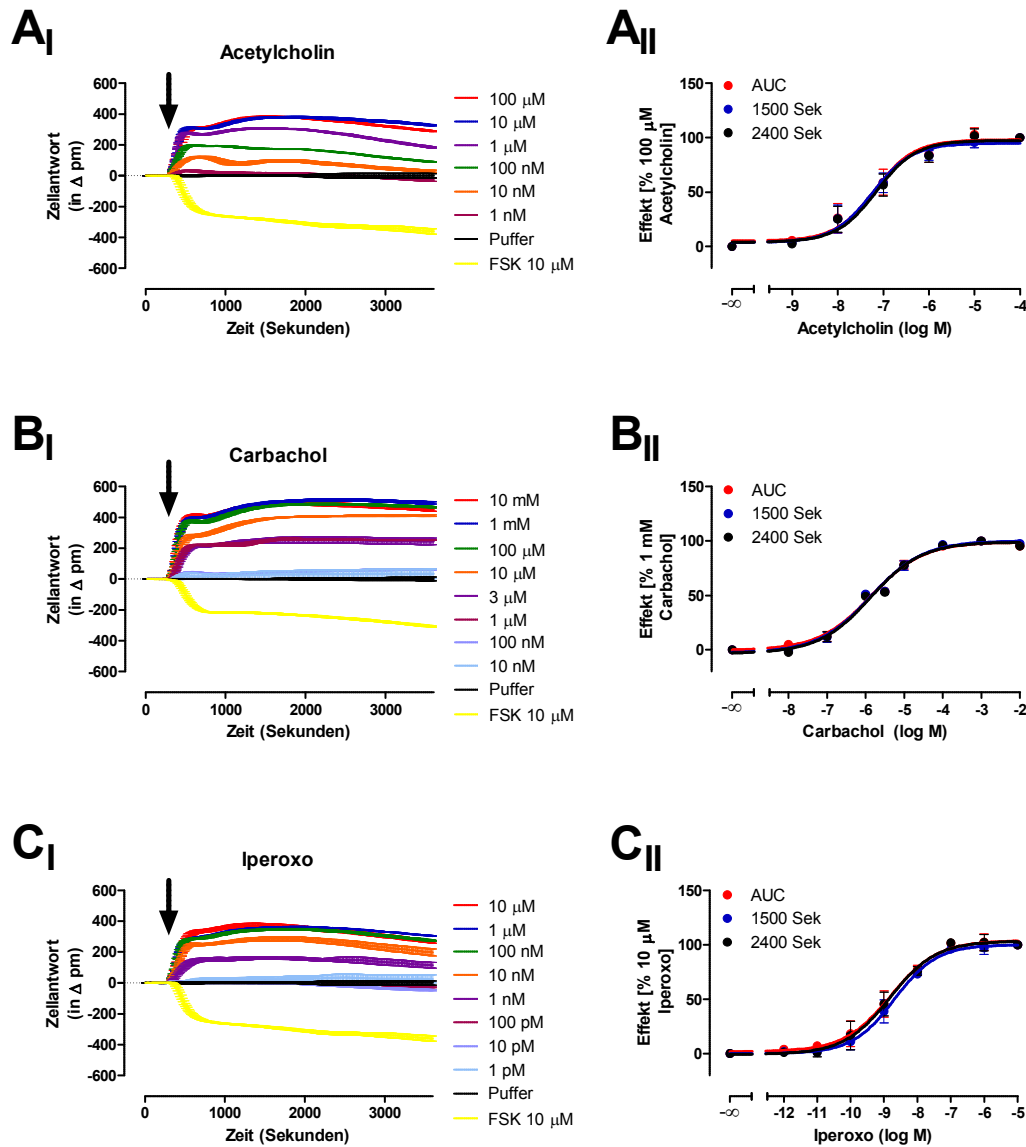


Abbildung 44: Die orthosterischen Agonisten führten unter Kontrollbedingungen hauptsächlich zu einer Massenumverteilung, die für eine Aktivierung von $G_{q/11}$ Proteinen charakteristisch ist.

(A_I, B_I, C_I) Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. einer repräsentativen, basislinien-korrigierten Originalsignatur in Vierfachbestimmung. Der Pfeil gibt an, wann die Substanz-Zugabe stattgefunden hat. Ordinate: Wellenlängenverschiebung in Picometern. Abszisse: Zeit in Sekunden. (A_{II}, B_{II}, C_{II}) Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus drei Einzelversuchen in Vierfachbestimmung. Ordinate: Zellantwort in Prozent. 100 % entspricht dem Effekt, der durch 100 μ M Acetylcholin (A_{II}), 1 mM Carbachol (B_{II}) bzw. 10 μ M Iperoxo (C_{II}) ausgelöst wurde. 0 % entspricht dem Basalwert. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanzen.

4 Ergebnisse

Ligand	Zeitpunkt der Messung	n_H	E_{max}	pEC_{50}
ACh (n=3)	AUC (3600 Sek.)	$0,59 \pm 0,17^{n.s.}$	$97,9 \pm 4,7^{NS}$	$7,19 \pm 0,16^{N.S.}$
	1500 Sek.	$0,61 \pm 0,14^{n.s.}$	$94,8 \pm 4,0^{NS}$	$7,24 \pm 0,14^{N.S.}$
	2400 Sek.	$0,60 \pm 0,15^{n.s.}$	$97,3 \pm 4,4^{NS}$	$7,15 \pm 0,15^{N.S.}$
Carbachol (n=3)	AUC (3600 Sek.)	$0,64 \pm 0,07^*$	$99,0 \pm 2,3^{NS}$	$5,86 \pm 0,08^{N.S.}$
	1500 Sek.	$0,64 \pm 0,08^*$	$100,0 \pm 2,5^{NS}$	$5,88 \pm 0,09^{N.S.}$
	2400 Sek.	$0,65 \pm 0,07^*$	$99,0 \pm 2,3^{NS}$	$5,88 \pm 0,07^{N.S.}$
Iperoxo (n=3)	AUC (3600 Sek.)	$0,62 \pm 0,13^*$	$103,8 \pm 4,5^{NS}$	$8,80 \pm 0,16^{NS}$
	1500 Sek.	$0,68 \pm 0,11^*$	$100,1 \pm 3,3^{NS}$	$8,69 \pm 0,11^{NS}$
	2400 Sek.	$0,63 \pm 0,13^*$	$103,4 \pm 4,5^{NS}$	$8,82 \pm 0,16^{NS}$

Tabelle 27: Kenngrößen \pm S.E.M. der Konzentrations-Effekt Kurven aus Abbildung 44.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus drei Einzelversuchen in Vierfachbestimmung. n: Anzahl der Experimente. n_H : Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. E_{max} : maximale Zellantwort in Prozent, bezogen auf den Effekt, der durch 100 μ M Acetylcholin, 1 mM Carbachol bzw. 10 μ M Iperoxo ausgelöst wurde. pEC_{50} : Negativer dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration, welche eine halbmaximale Zellantwort hervorgerufen hat. ^{n.s.}: Nicht signifikanter Unterschied zu einem Hill-Koeffizienten $n_H=1$ (F-Test, $p>0,05$). ^{*}: Signifikanter Unterschied zu einem Hill-Koeffizienten $n_H=1$ (F-Test, $p<0,05$). ^{NS}: Nicht signifikanter Unterschied zwischen den maximalen Effekten, die sich durch eine Auswertung der AUC nach 3600 Sekunden, nach 1500 Sekunden und nach 2400 Sekunden ergeben haben (One-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni's Post-Test). ^{N.S.}: Nicht signifikanter Unterschied zwischen den pEC_{50} -Werten, die sich durch eine Auswertung der AUC nach 3600 Sekunden, nach 1500 Sekunden und nach 2400 Sekunden ergeben haben (One-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni's Post-Test).

Der endogene Ligand Acetylcholin und die beiden Orthostere Carbachol und Iperoxo führten in CHO-M1 Zellen zu einem positiv ausgerichteten Mess-Signal mit einem charakteristischen Verlauf, welches in vorherigen Arbeiten als $G_{q/11}$ Protein-abhängiges Signal identifiziert werden konnte (Schröder et al., 2010 und 2011). Im Gegensatz zu den Daten, die durch Schröder und Kollegen für den M3-Rezeptor erhoben worden sind (2010 und 2011), welcher ebenfalls primär an G Proteine des $G_{q/11}$ -Subtyps koppelt, zeigte sich für den M1-Rezeptor unmittelbar nach Rezeptor-Stimulierung durch die Agonisten ein positiv ausgerichtetes Mess-Signal, welches sofort wieder abflachte. Unmittelbar darauf ging das detektierte Signal

in ein Plateau über, welches charakteristisch für eine Aktivierung von $G_{q/11}$ Proteinen ist. Dieses erste, transiente Mess-Signal konnte durch eine Maskierung von G_s Proteinen durch CTX aufgehoben werden (vgl. Kapitel 4.7.3.1, Abbildung 48). Demzufolge kam es unmittelbar nach der Aktivierung von M1-Rezeptoren zu einer Einleitung G_s -abhängiger Signalwege und daraus resultierenden intrazellulären Massenumverteilungen, die zu einer veränderten detektierten Wellenlänge geführt haben. Der Austausch von GDP gegen GTP läuft in $G_{q/11}$ Proteinen im Vergleich zu anderen G Proteinen verhältnismäßig langsam ab (Milligan, 2003). Als Konsequenz ergibt sich daraus vermutlich, das, im Vergleich zu G_s Proteinen, verzögerte $G_{q/11}$ Protein-abhängige Mess-Signal in DMR-Assays. Die Intensität des Mess-Signals unterschied sich zwischen den einzelnen Versuchstagen, weshalb hier nur die Originalsignatur eines Einzelexperimentes dargestellt wurde. Abgesehen von der Intensität gab es jedoch keine Unterschiede in Form und Verlauf zwischen den Einzelversuchen, weshalb die oben dargestellte Kurve als repräsentativ für alle Versuchstage eingestuft werden kann.

Zur Auswertung der Dosis-abhängigen Effekte wurden die Daten, die sich als AUC (area under the curve) nach 3600 Sekunden, zum Zeitpunkt $t= 1500$ Sekunden und $t= 2400$ Sekunden ergeben haben, in eine Dosis-Wirkungskurve transformiert. Die resultierenden Mittelwertskurven, die sich durch die Detektion der Effekte zu verschiedenen Zeitpunkten beziehungsweise als AUC nach 3600 Sekunden ergeben haben, waren deckungsgleich und unterschieden sich weder in ihrer maximalen Zellantwort noch in ihrem pEC_{50} -Wert voneinander. Die Kurven der einzelnen Versuchstage konnten bei allen drei Substanzen überwiegend mit einem normalen Steilheitsmaß angepasst werden. Die signifikante Abweichung der Mittelwertskurven von einem Hill-Koeffizienten von $n_H=1$ im Fall von Carbachol und Iperoxo beruhte demzufolge vermutlich auf einer leichten Parallelverschiebung der pEC_{50} -Werte zwischen den einzelnen Versuchstagen und basierte nicht auf einer Rezeptor-Ligand-Interaktion, die abweichend von einer 1:1 Interaktion war.

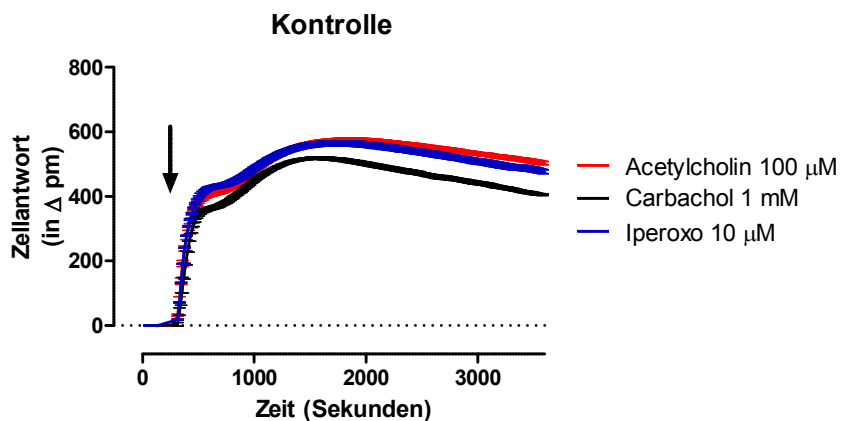


Abbildung 45: Vergleich der drei orthosterischen Agonisten unter Kontrollbedingungen.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. einer repräsentativen, basislinien-korrigierten Originalsignatur in Vierfachbestimmung. Der Pfeil gibt an, wann die Substanz-Zugabe stattgefunden hat. Ordinate: Wellenlängenverschiebung in Picometern. Abszisse: Zeit in Sekunden.

Acetylcholin und Iperoxo zeigten unter Kontrollbedingungen sowohl in ihrer Intensität als auch in ihrem Kurvenverlauf ähnliche Wellenlängenverschiebungen. Im Vergleich dazu kam es bei der Untersuchung von Carbachol zu deutlich geringeren Wellenlängenverschiebungen in den positiven Bereich, der Kurvenverlauf unterschied sich jedoch nicht von den Kurven unter Acetylcholin und Iperoxo.

4.7.2 Messung der intrazellulären Massenumverteilung unter Ausschaltung von $G_{q/11}$ Proteinen

Der Einsatz des $G_{q/11}$ Protein-Inhibitors FR sollte Aufschluss darüber geben, welche Signalwege in CHO-Zellen aktiviert werden, wenn das präferierte G Protein des M1-Rezeptors ausgeschaltet worden ist.

4.7.2.1 Nach Ausschaltung von $G_{q/11}$ Proteinen aktivierten die Agonisten vorwiegend G_s -abhängige Signalwege

Toxin: FR

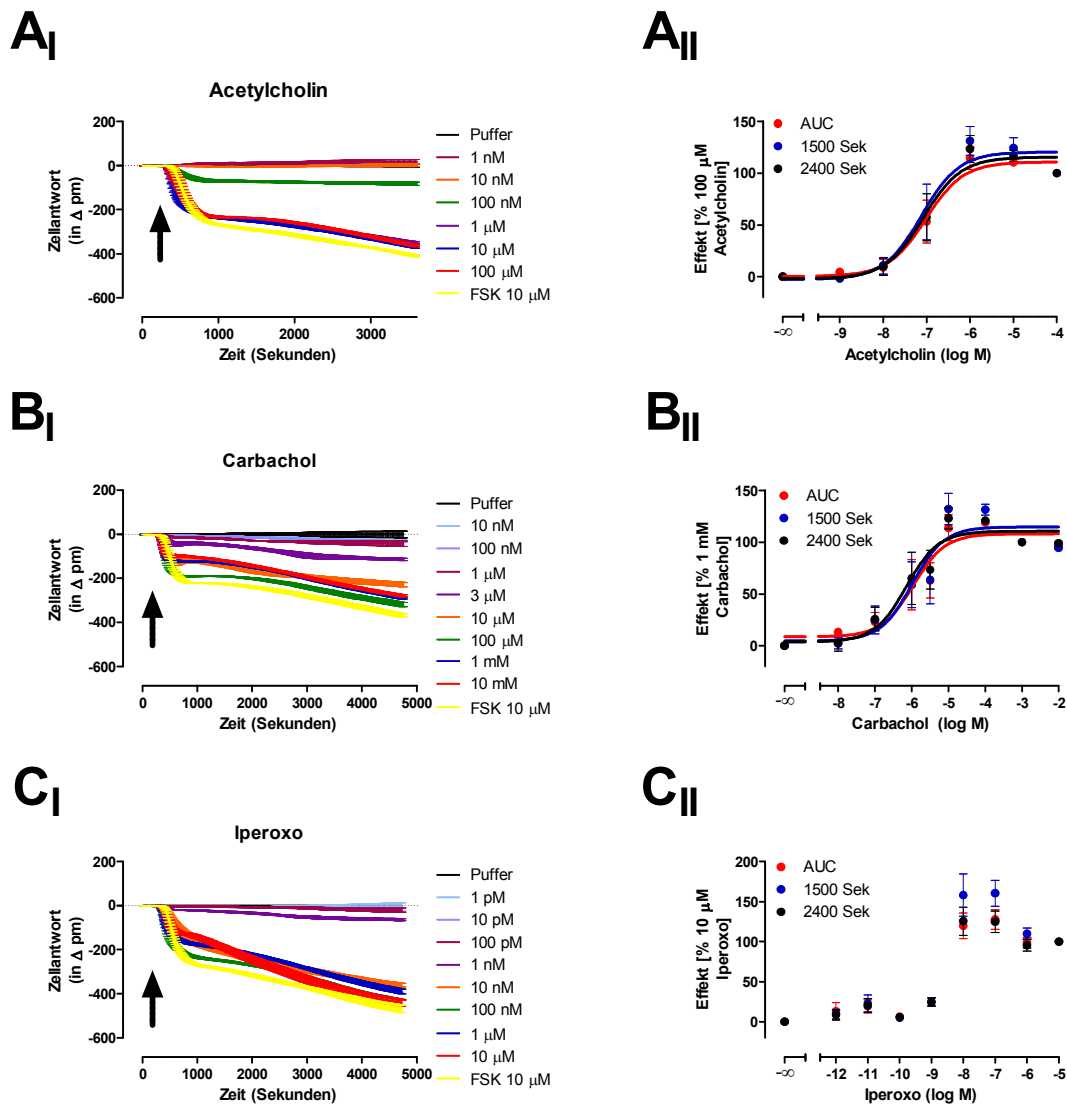


Abbildung 46: Die drei Agonisten führten unter Ausschaltung von $G_{q/11}$ Proteinen hauptsächlich zu einer Massenumverteilung, die für eine Aktivierung von G_s Proteinen charakteristisch ist.

(A_I, B_I, C_I) Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. einer repräsentativen, basislinien-korrigierten Originalsignatur in Vierfachbestimmung. Der Pfeil gibt an, wann die Substanz-Zugabe stattgefunden hat. Ordinate: Wellenlängenverschiebung in Picometern. Abszisse: Zeit in Sekunden. (A_{II}, B_{II}, C_{II}) Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus drei (Acetylcholin und Iperoxo) bzw. vier (Carbachol) Einzelversuchen in Vierfachbestimmung mit dem $G_{q/11}$ -Inhibitor FR. Ordinate: Zellantwort in Prozent. 100 % entspricht dem Effekt, der durch 100 μ M Acetylcholin (A_{II}), 1 mM Carbachol (B_{II}) bzw. 10 μ M Iperoxo (C_{II}) ausgelöst wurde. 0 % entspricht dem Basalwert. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanzen.

4 Ergebnisse

Ligand	Zeitpunkt der Messung	n_H	E_{max}	pEC_{50}
ACh (n=3)	AUC (3600 Sek.)	2,45 ± 0,42*	110,7 ± 5,9 ^{NS}	7,02 ± 0,16 ^{N.S.}
	1500 Sek.	/	120,2 ± 8,1 ^{NS}	7,12 ± 0,21 ^{N.S.}
	2400 Sek.	2,06 ± 0,48*	115,3 ± 6,9 ^{NS}	7,08 ± 0,18 ^{N.S.}
Carbachol (n=4)	AUC (3600 Sek.)	0,91 ± 0,39 ^{n.s.}	108,1 ± 6,3 ^{NS}	5,96 ± 0,19 ^{N.S.}
	1500 Sek.	1,06 ± 0,54 ^{n.s.}	114,7 ± 7,7 ^{NS}	6,00 ± 0,22 ^{N.S.}
	2400 Sek.	0,89 ± 0,35 ^{n.s.}	110,5 ± 6,5 ^{NS}	6,15 ± 0,20 ^{N.S.}
Iperoxo (n=3)	AUC (3600 Sek.)	k.A.	k.A.	k.A.
	1500 Sek.	k.A.	k.A.	k.A.
	2400 Sek.	k.A.	k.A.	k.A.

Tabelle 28: Kenngrößen ± S.E.M. der Konzentrations-Effekt Kurven aus Abbildung 46.

Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E.M. aus drei bis vier Einzelversuchen in Vierfachbestimmung. n: Anzahl der Experimente. n_H : Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. E_{max} : maximale Zellantwort in Prozent, bezogen auf den Effekt, der durch 100 μ M Acetylcholin, 1 mM Carbachol bzw. 10 μ M Iperoxo ausgelöst wurde. pEC_{50} : Negativer dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz, welche eine halbmaximale Zellantwort hervorgerufen hat. /: Die Datenwerte ließen sich nur mit einem normalen Steilheitsmaß auswerten. ^{n.s.}: Nicht signifikanter Unterschied zu einem Hill-Koeffizienten $n_H=1$ (F-Test, $p>0,05$). *: Signifikanter Unterschied zu einem Hill-Koeffizienten $n_H=1$ (F-Test, $p<0,05$). ^{NS}: Nicht signifikanter Unterschied zwischen den maximalen Effekten, die sich durch eine Auswertung der AUC nach 3600 Sekunden, und zu den Zeitpunkten $t=1500$ Sekunden und $t=2400$ Sekunden ergeben haben (One-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni's Post-Test). ^{N.S.}: Nicht signifikanter Unterschied zwischen den pEC_{50} -Werten, die sich durch eine Auswertung der AUC nach 3600 Sekunden, und zu den Zeitpunkten $t=1500$ Sekunden und $t=2400$ Sekunden ergeben haben (One-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni's Post-Test).

Durch eine Blockade der $G_{q/11}$ Proteine mittels FR zeigte sich ein Mess-Signal mit einem negativ-ausgerichteten Kurvenverlauf, welches Schröder und Kollegen (2010) in CHO- β_2 Zellen, die primär an G_s Proteine koppeln, ebenfalls detektieren konnten. Somit ist dieses negativ ausgerichtete Mess-Signal als Charakteristikum für eine Aktivierung von G_s Proteinen anzusehen. Ein weiterer Hinweis auf eine G_s -abhängige intrazelluläre Massenumverteilung ergab sich durch den Einsatz von Forskolin. Als direkter, Rezeptor-unabhängiger Aktivator

der Adenylylzyklasen imitiert Forskolin eine G_s -abhängige Signalwegs-Aktivierung. Die Messwerte für Forskolin und $100 \mu\text{M}$ Acetylcholin ergaben nahezu identische Kurvenverläufe, was ein weiteres Indiz für eine Aktivierung von G_s Proteinen war. Im Fall von Carbachol und Iperoxo haben hohe Konzentrationen der Testsubstanzen zu einer geringeren Wellenlängenverschiebung geführt als mittlere Konzentrationen. 100 nM Carbachol bzw. Iperoxo entsprachen der Wellenlängenverschiebung, die durch Forskolin vermittelt wurde. Höhere Konzentrationen verursachten eine geringere Wellenlängenverschiebung, da in supramaximalen Konzentrationen vermutlich neben G_s Proteinen, auch noch $G_{i/o}$ Proteine als funktioneller Gegenspieler aktiviert worden waren. Eine Aktivierung von $G_{i/o}$ Proteinen führt zu einer Wellenlängenverschiebung in den positiven Bereich (Schröder et al., 2010 und 2011) und könnte, im zuvor beschriebenen Fall, die G_s -vermittelte negative Wellenlängenverschiebung mindern.

Die Generierung von Dosis-Wirkungskurven anhand der Messwerte der AUC nach 3600 Sekunden, und der Messwerte zu den Zeitpunkten $t=1500$ Sekunden und $t=2400$ Sekunden, ergaben, wie auch unter Kontrollbedingungen, nahezu deckungsgleiche Kurvenverläufe.

Acetylcholin: Die resultierenden Dosis-Wirkungskurven von Acetylcholin zeigten Hill-Koeffizienten, welche signifikant größer waren als ein normales Steilheitsmaß von $n_H=1$. Drei der neun generierten Kurven ließen sich ausschließlich mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H=1$ auswerten, da sie übersteil waren und ein flexibles Steilheitsmaß zu keinen sinnvollen Datenauswertungen geführt hat. Ein möglicher Grund hierfür wäre, dass sich durch die Ausschaltung von $G_{q/11}$ Proteinen Rezeptor-Ligand-G Protein-Interaktionen ergeben haben, welche weitaus komplizierter sind, als dass sie durch eine deskriptive Kurvenauswertung erfasst werden könnten.

Carbachol: Im Vergleich zu den Daten, die bei der Untersuchung von Acetylcholin erhoben worden sind, zeigte sich im Fall von Carbachol keine Korrelation zwischen Konzentration und Effekt. Hohe Konzentrationen (10 mM und 1 mM) wiesen keine maximale G_s Protein-Aktivierung auf, sondern lagen im Bereich des Effektes, der durch $10 \mu\text{M}$ der Testsubstanz erzielt werden konnte. $100 \mu\text{M}$ Carbachol zeigte eine größere Zellantwort, als die beiden eingesetzten Konzentrationen im millimolaren Bereich. Dieses Phänomen lieferte neben den Daten, die in cAMP-Assays erhoben worden sind, einen weiteren Hinweis darauf, dass M1-Rezeptoren neben G_s Proteinen nach einer Ausschaltung von $G_{q/11}$ Proteinen auch $G_{i/o}$ Proteine rekrutieren, die den stimulierenden Effekt der G_s Proteine auf Adenylylzyklasen mindern können.

Die Kurven der Einzelversuche ließen sich ausnahmslos mit einem normalen Steilheitsmaß

anpassen. Es zeigte sich jedoch, dass hohe Konzentrationen der Testsubstanz eine geringere Zellantwort hervorriefen als eine Konzentration von 100 μM , weswegen die Datenpunkte nicht optimal durch eine sigmoide Kurve beschrieben werden konnten.

Iperoxo: Nach der Ausschaltung von $G_{q/11}$ Proteinen rekrutierte der M1-Rezeptor überwiegend, aber nicht exklusiv G_s Proteine. Eine geringere Wellenlängenverschiebung in den negativen Bereich in einem Konzentrationsbereich von 1-10 μM , im Vergleich zu der Wellenlängenverschiebung, die durch 100 nM Iperoxo ausgelöst wurde, lieferte erste Hinweise darauf, dass neben Carbachol auch Iperoxo vor allem in hohen Konzentrationen neben einer G_s Protein-Aktivierung auch andere Effekte in der Zelle auslöst. Da G_s und $G_{i/o}$ Proteine funktionelle Gegenspieler mit gegenläufigen Effekten auf die cAMP-Generierung sind, deutete eine geringere Wellenlängenverschiebung in den negativen Bereich auf eine parallel ablaufende Aktivierung von $G_{i/o}$ Proteinen hin.

Die Dosis-Wirkungskurven ließen sich im Fall von Iperoxo unter Ausschaltung von $G_{q/11}$ Proteinen nicht durch die „Vier-Parameter-logistische Gleichung“ nach Barlow und Blake (1989) auswerten.

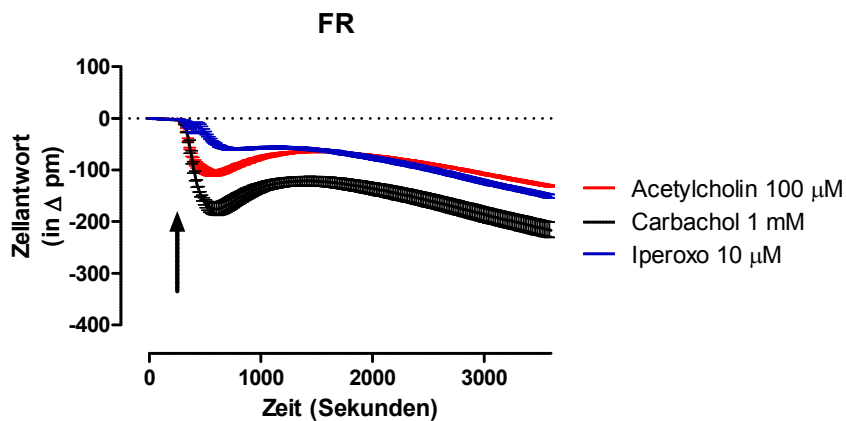


Abbildung 47: Vergleich der drei orthosterischen Agonisten unter Ausschaltung von $G_{q/11}$ Proteinen.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. einer repräsentativen, basislinien-korrigierten Originalsignatur in Vierfachbestimmung. Der Pfeil gibt an, wann die Substanz-Zugabe stattgefunden hat. Ordinate: Wellenlängenverschiebung in Picometern. Abszisse: Zeit in Sekunden.

Carbachol zeigte im Gegensatz zu dem endogenen Liganden Acetylcholin eine deutlich höhere Wellenlängenverschiebung in den negativen Bereich. Acetylcholin aktivierte in Konzentrationen von 100 μM vermutlich neben G_s Proteinen noch andere Effektor-Proteine,

welche die Wellenlängenverschiebung im Vergleich zu Carbachol deutlich minderten. Iperoxo zeigte unter Verwendung von FR noch geringere Wellenlängenverschiebungen als Acetylcholin. Iperoxo zeigte bereits in [³⁵S]GTPγS-Versuchen superagonistisches Verhalten für die Aktivierung von G_{i/o} Proteinen. Dieses Phänomen spiegelte sich vermutlich auch hier wider, weswegen die Wellenlängenverschiebungen in den negativen Bereich deutlich geringer waren als bei Acetylcholin, da die Aktivierung von G_{i/o} Proteinen zu Wellenlängenverschiebungen in den positiven Bereich führen. Dadurch wurde der G_s-vermittelte Effekt gemindert.

4.7.3 Messung der intrazellulären Massenumverteilung unter Ausschaltung von G_s Proteinen

Durch eine Maskierung der G_s Proteine mittels CTX sollte getestet werden, ob sich Kurvenverläufe ergeben, die den Daten unter Kontrollbedingungen entsprechen. Das wäre ein Indiz dafür, dass unter physiologischen Bedingungen ausschließlich G_{q/11} Proteine an der Zellantwort beteiligt sind. Ergeben sich Datensätze, die sich von denen unter Kontrollbedingungen signifikant unterscheiden, wäre das ein Hinweis darauf, dass auch unter physiologischen Bedingungen neben G_{q/11} auch G_s Proteine an der Zellantwort beteiligt sind.

4.7.3.1 Nach der Maskierung von G_s Proteinen ergab sich eine $G_{q/11}$ -abhängige Zellantwort

Toxin: CTX

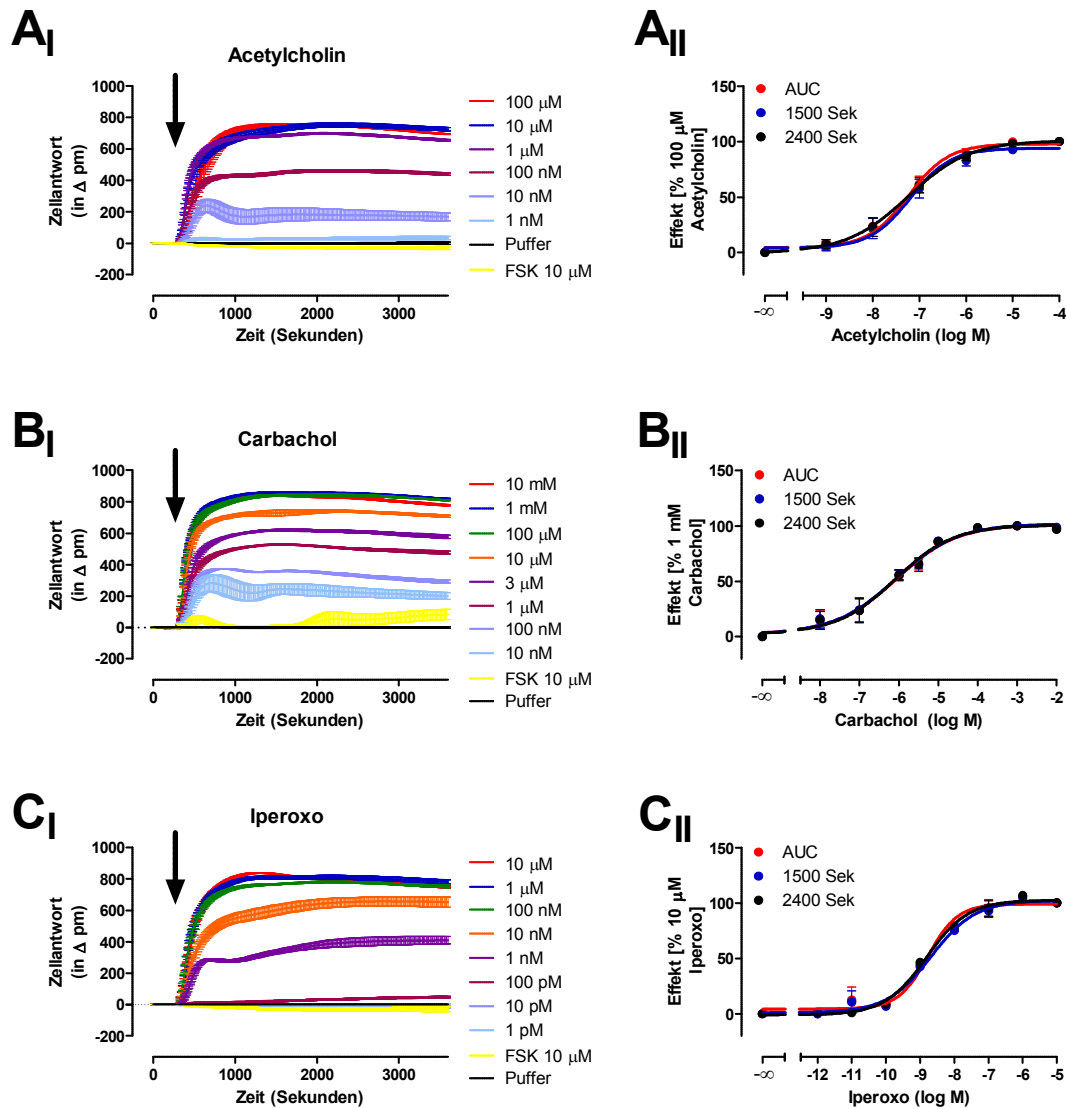


Abbildung 48: Unter Ausschaltung von G_s Proteinen zeigten sich andere Kurvenverläufe als unter Kontrollbedingungen.

(**A_I**, **B_I**, **C_I**) Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. einer repräsentativen, basislinien-korrigierten Originalsignatur in Vierfachbestimmung. Der Pfeil gibt an, wann die Substanz-Zugabe stattgefunden hat. Ordinate: Wellenlängenverschiebung in Picometern. Abszisse: Zeit in Sekunden. (**A_{II}**, **B_{II}**, **C_{II}**) Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus drei Einzelversuchen in Vierfachbestimmung mit dem G_s Protein-Aktivator CTX. Ordinate: Zellantwort in Prozent. 100 % entspricht dem Effekt, der durch 100 μM Acetylcholin (**A_{II}**), 1 mM Carbachol (**B_{II}**) bzw. 10 μM Iperoxo (**C_{II}**) ausgelöst wurde. 0 % entspricht dem Basalwert. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz.

4 Ergebnisse

Ligand	Zeitpunkt der Messung	n_H	E_{max}	pEC_{50}
ACh (n=3)	AUC (3600 Sek.)	$0,70 \pm 0,12^{n.s.}$	$98,0 \pm 3,0^{NS}$	$7,23 \pm 0,10^{N.S.}$
	1500 Sek.	$0,63 \pm 0,13^{n.s.}$	$94,0 \pm 3,3^{NS}$	$7,20 \pm 0,12^{N.S.}$
	2400 Sek.	$0,67 \pm 0,12^*$	$100,8 \pm 3,7^{NS}$	$7,24 \pm 0,11^{N.S.}$
Carbachol (n=3)	AUC (3600 Sek.)	$0,57 \pm 0,10^*$	$101,2 \pm 3,6^{NS}$	$6,06 \pm 0,14^{N.S.}$
	1500 Sek.	$0,56 \pm 0,10^*$	$101,9 \pm 3,9^{NS}$	$6,08 \pm 0,16^{N.S.}$
	2400 Sek.	$0,59 \pm 0,10^*$	$100,8 \pm 3,5^{NS}$	$6,09 \pm 0,14^{N.S.}$
Iperoxo (n=3)	AUC (3600 Sek.)	$0,69 \pm 0,12^{n.s.}$	$99,15 \pm 3,0^{NS}$	$8,78 \pm 0,11^{N.S.}$
	1500 Sek.	$0,67 \pm 0,12^*$	$102,3 \pm 3,3^{NS}$	$8,69 \pm 0,12^{N.S.}$
	2400 Sek.	$0,71 \pm 0,09^*$	$102,6 \pm 2,4^{NS}$	$8,82 \pm 0,08^{N.S.}$

Tabelle 29: Kenngrößen \pm S.E.M. der Konzentrations-Effekt Kurven aus Abbildung 48.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus jeweils drei Einzelversuchen in Vierfachbestimmung. n: Anzahl der Experimente. n_H : Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. E_{max} : maximale Zellantwort in Prozent, bezogen auf den Effekt, der durch 100 μ M Acetylcholin, 1 mM Carbachol bzw. 10 μ M Iperoxo ausgelöst wurde. pEC_{50} : Negativer dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz, welche eine halbmaximale Zellantwort hervorgerufen hat. ^{n.s.}: Nicht signifikanter Unterschied zu einem Hill-Koeffizienten $n_H=1$ (F-Test, $p>0,05$). ^{*}: Signifikanter Unterschied zu einem Hill-Koeffizienten $n_H=1$ (F-Test, $p<0,05$). ^{NS}: Nicht signifikanter Unterschied zwischen den maximalen Effekten, die sich durch eine Auswertung der AUC nach 3600 Sekunden, und zu den Zeitpunkten $t= 1500$ Sekunden und $t= 2400$ Sekunden ergeben haben (One-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni's Post-Test). ^{N.S.}: Nicht signifikanter Unterschied zwischen den pEC_{50} -Werten, die sich durch eine Auswertung der AUC nach 3600 Sekunden, und zu den Zeitpunkten $t= 1500$ Sekunden und $t= 2400$ Sekunden ergeben haben (One-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni's Post-Test).

Durch den Einsatz des permanenten G_s Protein-Aktivators CTX ergaben sich für alle drei getesteten Agonisten Datensätze, die charakteristisch für eine Aktivierung von $G_{q/11}$ Proteinen sind. Hierbei handelte es sich um ein positiv ausgerichtetes Mess-Signal in Form einer steil ansteigenden Kurve, die auch nach 3600 Sekunden nicht abgeflacht war. Einen ähnlichen Kurvenverlauf konnten Schröder und Kollegen (2010) für den M3-Rezeptor zeigen, welcher ebenfalls primär an $G_{q/11}$ Proteine koppelt. Im Vergleich zu den Datensätzen unter Kontrollbedingungen zeigten sich signifikante Unterschiede, einerseits in der Intensität des

Mess-Signals, welche unter Kontrollbedingungen deutlich geringer war und andererseits in einem primären transienten „Peak“ unmittelbar nach der Substanz-Zugabe. Dieser primäre „Peak“ und die geringere Intensität unter Kontrollbedingungen waren demzufolge vermutlich durch eine intrazelluläre Massenumverteilung, die auf einer Aktivierung von G_s Proteinen beruht, bedingt.

Die Generierung von Dosis-Wirkungskurven anhand der Messwerte der AUC nach 3600 Sekunden, und der Messwerte zu den Zeitpunkten $t=1500$ Sekunden und $t=2400$ Sekunden, ergaben, wie auch unter Kontrollbedingungen, nahezu deckungsgleiche Kurvenverläufe.

Acetylcholin: Die Einzelkurven ließen sich in vier von neun Fällen besser durch ein freilaufendes Steilheitsmaß beschreiben. Mittelt man die Einzelkurven der Datensätze zu jeweils einer Gesamtkurve unterschied sich das Steilheitsmaß allerdings nur im Fall der Daten zum Zeitpunkt $t=2400$ Sekunden signifikant von einem Hill-Koeffizienten $n_H=1$. Folglich scheint die Rezeptor-Ligand Interaktion einer bimolekularen Reaktion zu folgen.

Carbachol: In Einklang mit den Daten für Acetylcholin ließen sich auch hier die Einzelkurven überwiegend besser mit einem von $n_H=1$ abweichenden Hill-Koeffizienten auswerten, was sich auch in den sehr flach verlaufenden Mittelwertskurven widerspiegelte.

Iperoxo: Alle Einzelkurven konnten adäquat mit einem normalen Steilheitsmaß angepasst werden. Durch eine Zusammenfassung der Daten zu einer Mittelwertskurve ergaben sich jedoch für die Daten zum Zeitpunkt $t=1500$ Sekunden und $t=2400$ Sekunden signifikante Unterschiede zu einem normalen Steilheitsmaß, was vermutlich auf einer geringfügigen Parallelverschiebung der Einzelkurven beruht und nicht auf der Art der Rezeptor-Ligand-Interaktion.

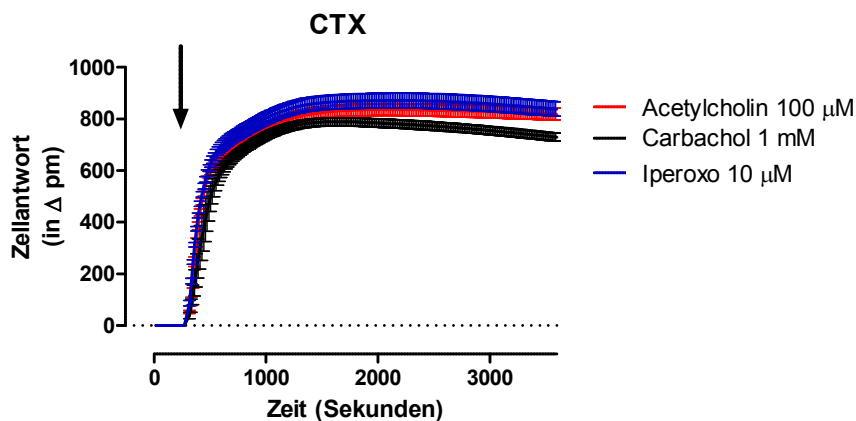


Abbildung 49: Vergleich der drei orthosterischen Agonisten unter Maskierung von G_s Proteinen.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. einer repräsentativen, basislinien-korrigierten Originalsignatur in Vierfachbestimmung. Der Pfeil gibt an, wann die Substanz-Zugabe stattgefunden hat. Ordinate: Wellenlängenverschiebung in Picometern. Abszisse: Zeit in Sekunden.

In Einklang mit den Daten unter Kontrollbedingungen zeigte Carbachol auch unter Maskierung von G_s Proteinen deutlich geringere Wellenlängenverschiebungen und damit einen geringeren Effekt auf die Aktivierung von $G_{q/11}$ Proteinen als Acetylcholin und Iperoxo.

4.7.4 Messung der Dynamischen Massenumverteilung unter Ausschaltung von $G_{i/o}$ Proteinen

Mithilfe des $G_{i/o}$ Protein-Inhibitors PTX sollte getestet werden, ob $G_{i/o}$ Proteine in die Signalkaskade des M1-Rezeptors involviert sind. In vorangegangenen cAMP-Assays (Kapitel 4.5.5) konnte bereits gezeigt werden, dass $G_{i/o}$ Proteine erst dann von, in CHO-Zellen exprimierten, M1-Rezeptoren rekrutiert wurden, wenn $G_{q/11}$ Proteine ausgeschaltet worden waren. In DMR-Assays sollte dieses Phänomen nun verifiziert werden.

4.7.4.1 $G_{i/o}$ Proteine waren nicht in die Dynamische Massenumverteilung in CHO-M1 Zellen involviert

Toxin: PTX

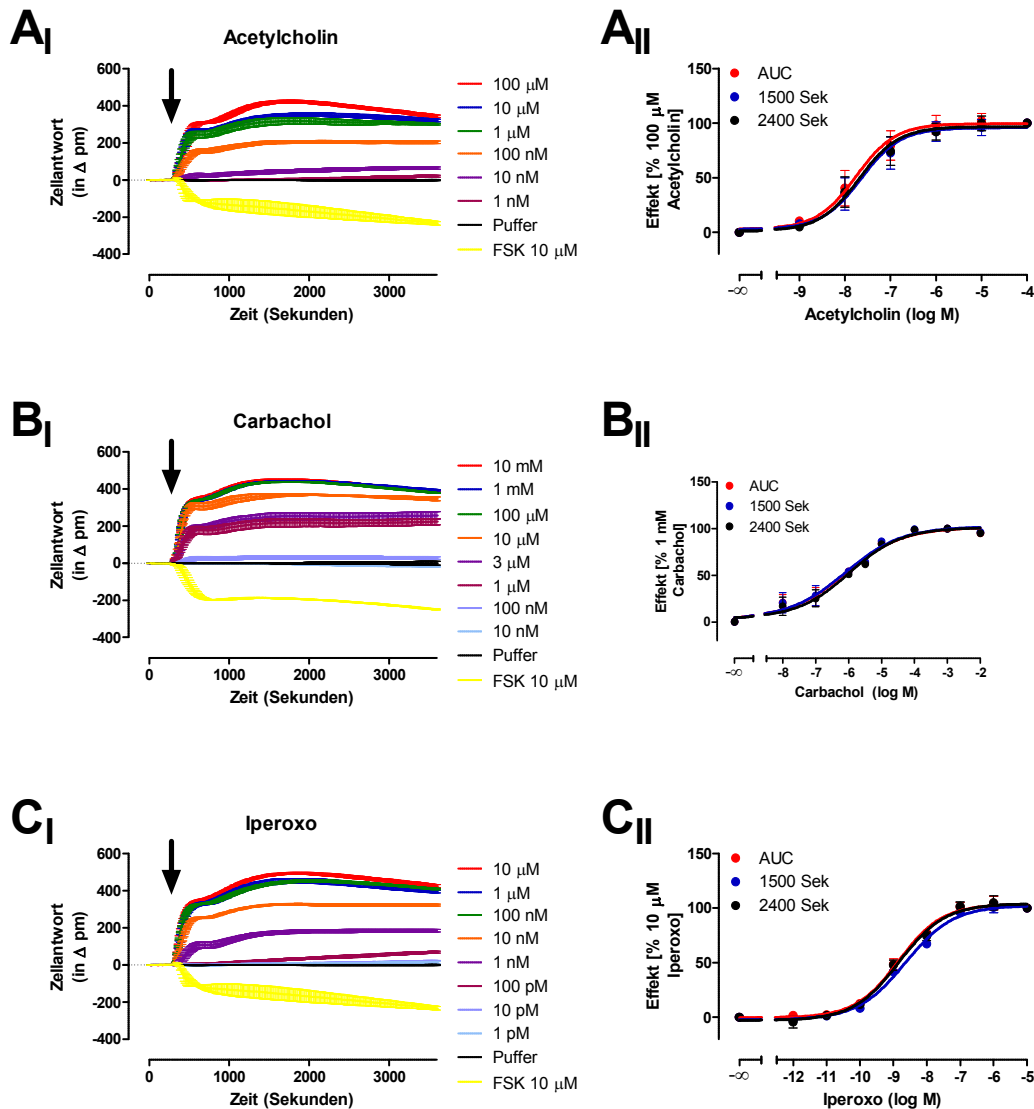


Abbildung 50: Unter Ausschaltung von $G_{i/o}$ Proteinen zeigten sich Kurvenverläufe, die den Kurven unter Kontrollbedingungen entsprachen.

(A_I, B_I, C_I) Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. einer repräsentativen, basislinien-korrigierten Originalsignatur in Vierfachbestimmung. Der Pfeil gibt an, wann die Substanz-Zugabe stattgefunden hat. Ordinate: Wellenlängenverschiebung in Picometern. Abszisse: Zeit in Sekunden. (A_{II}, B_{II}, C_{II}) Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus drei Einzelversuchen in Vierfachbestimmung mit dem $G_{i/o}$ Protein-Inhibitor PTX. Ordinate: Zellantwort in Prozent. 100 % entspricht dem Effekt, der durch 100 μ M Acetylcholin (A_{II}), 1 mM Carbachol (B_{II}) bzw. 10 μ M Iperoxo (C_{II}) ausgelöst wurde. 0 % entspricht dem Basalwert. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz.

4 Ergebnisse

Ligand	Zeitpunkt der Messung	n_H	E_{max}	pEC_{50}
ACh (n=3)	AUC (3600 Sek.)	$0,75 \pm 0,24^{n.s.}$	$99,6 \pm 4,6^{NS}$	$7,75 \pm 0,17^{N.S.}$
	1500 Sek.	$0,71 \pm 0,23^{n.s.}$	$95,8 \pm 4,8^{NS}$	$7,64 \pm 0,19^{N.S.}$
	2400 Sek.	$0,73 \pm 0,21^{n.s.}$	$96,7 \pm 4,3^{NS}$	$7,69 \pm 0,17^{N.S.}$
Carbachol (n=3)	AUC (3600 Sek.)	$0,51 \pm 0,10^*$	$101,3 \pm 4,1^{NS}$	$6,08 \pm 0,17^{N.S.}$
	1500 Sek.	$0,51 \pm 0,11^*$	$102,1 \pm 4,5^{NS}$	$6,10 \pm 0,19^{N.S.}$
	2400 Sek.	$0,55 \pm 0,10^*$	$101,1 \pm 3,8^{NS}$	$5,98 \pm 0,15^{N.S.}$
Iperoxo (n=3)	AUC (3600 Sek.)	$0,67 \pm 0,08^*$	$103,5 \pm 2,5^{NS}$	$8,85 \pm 0,09^{N.S.}$
	1500 Sek.	$0,60 \pm 0,06^*$	$102,4 \pm 2,4^{NS}$	$8,64 \pm 0,08^{N.S.}$
	2400 Sek.	$0,63 \pm 0,09^*$	$104,1 \pm 3,0^{NS}$	$8,83 \pm 0,10^{N.S.}$

Tabelle 30: Kenngrößen \pm S.E.M. der Konzentrations-Effekt Kurven aus Abbildung 50.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus jeweils drei Einzelversuchen in Vierfachbestimmung. n: Anzahl der Experimente. n_H : Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. E_{max} : maximale Zellantwort in Prozent, bezogen auf den Effekt, der durch 100 μ M Acetylcholin, 1 mM Carbachol bzw. 10 μ M Iperoxo ausgelöst wurde. pEC_{50} : Negativer dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz, welche eine halbmaximale Zellantwort hervorgerufen hat. ^{n.s.}: Nicht signifikanter Unterschied zu einem Hill-Koeffizienten $n_H=1$ (F-Test, $p>0,05$). ^{*}: Signifikanter Unterschied zu einem Hill-Koeffizienten $n_H=1$ (F-Test, $p<0,05$). ^{NS}: Nicht signifikanter Unterschied zwischen den maximalen Effekten, die sich durch eine Auswertung der AUC nach 3600 Sekunden, und zu den Zeitpunkten $t= 1500$ Sekunden und $t= 2400$ Sekunden ergeben haben (One-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni's Post-Test). ^{N.S.}: Nicht signifikanter Unterschied zwischen den pEC_{50} -Werten, die sich durch eine Auswertung der AUC nach 3600 Sekunden, und zu den Zeitpunkten $t= 1500$ Sekunden und $t= 2400$ Sekunden ergeben haben (One-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni's Post-Test).

Durch die Ausschaltung von $G_{i/o}$ Proteinen mithilfe von PTX sollte getestet werden, ob $G_{i/o}$ Proteine unter physiologischen Bedingungen, also wenn alle anderen G Proteine aktiv sind, eine Rolle in der Signalkaskade des M1-Rezeptors spielen. cAMP-Assays lieferten erste Hinweise darauf, dass $G_{i/o}$ Proteine nur dann von M1-Rezeptoren zur Signaltransduktion genutzt werden, wenn $G_{q/11}$ Proteine ausgeschaltet worden waren. Vergleicht man die hier erhobenen Daten mit den Daten, die unter Kontrollbedingungen detektiert wurden,

unterschieden diese Kurven sich weder in der Intensität des Mess-Signals noch in dem Verlauf der Kurve, was einen weiteren Hinweis darauf lieferte, dass $G_{i/o}$ Proteine unter physiologischen Bedingungen nicht von M1-Rezeptoren rekrutiert und zur Signaltransduktion genutzt werden.

Acetylcholin: Die Auswertung der Dosis-Wirkungskurven mithilfe der Nichtlinearen Regressionsanalyse und der „Vier-Parameter-logistischen Gleichung“ nach Barlow und Blake (1989) ergab nur für Acetylcholin eine Mittelwertskurve, die mit einem normalen Steilheitsmaß angepasst werden konnte.

Carbachol: Durch eine Mittelung der einzelnen Versuchstage ergab sich eine Mittelwertskurve, deren Steilheit signifikant von einem normalen Steilheitsmaß abwich. Sieben der neun Einzelkurven konnten jedoch mit einem Hill-Koeffizienten $n_H=1$ ausgewertet werden, weshalb die Rezeptor-Ligand-Interaktion vermutlich trotz der flach verlaufenden Mittelwertskurve auf einer bimolekularen Interaktion beruhte.

Iperoxo: Vier von neun Einzelkurven, wie auch die Mittelwertskurven konnten nur mit einem freilaufenden Steilheitsmaß angepasst werden und waren flacher, als eine Rezeptor-Ligand-Interaktion von 1:1 erwarten lassen würde.

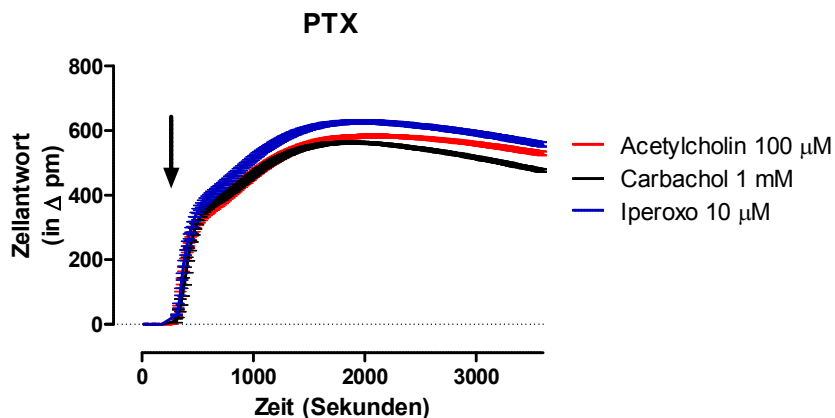


Abbildung 51: Vergleich der drei orthosterischen Agonisten unter Ausschaltung von $G_{i/o}$ Proteinen.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. einer repräsentativen, basislinien-korrigierten Originalsignatur in Vierfachbestimmung. Der Pfeil gibt an, wann die Substanz-Zugabe stattgefunden hat. Ordinate: Wellenlängenverschiebung in Picometern. Abszisse: Zeit in Sekunden.

4 Ergebnisse

Unter Ausschaltung von $G_{i/o}$ Proteinen kam es zu geringen Unterschieden in Intensität und Kurvenverlauf zwischen den drei getesteten Orthosteren. Iperoxo zeigte die größten Effekte, Carbachol die geringsten. Dadurch, dass hier nur Originalsignaturen eines Einzelversuches gezeigt werden und keine gemittelten Daten, lässt sich keine Aussage über die Signifikanz treffen.

4.7.5 Die simultane Ausschaltung von G_s und $G_{i/o}$ Proteinen offenbarte im Vergleich zu einer reinen G_s Ausschaltung keine signifikanten Unterschiede

Toxine: CTX und PTX

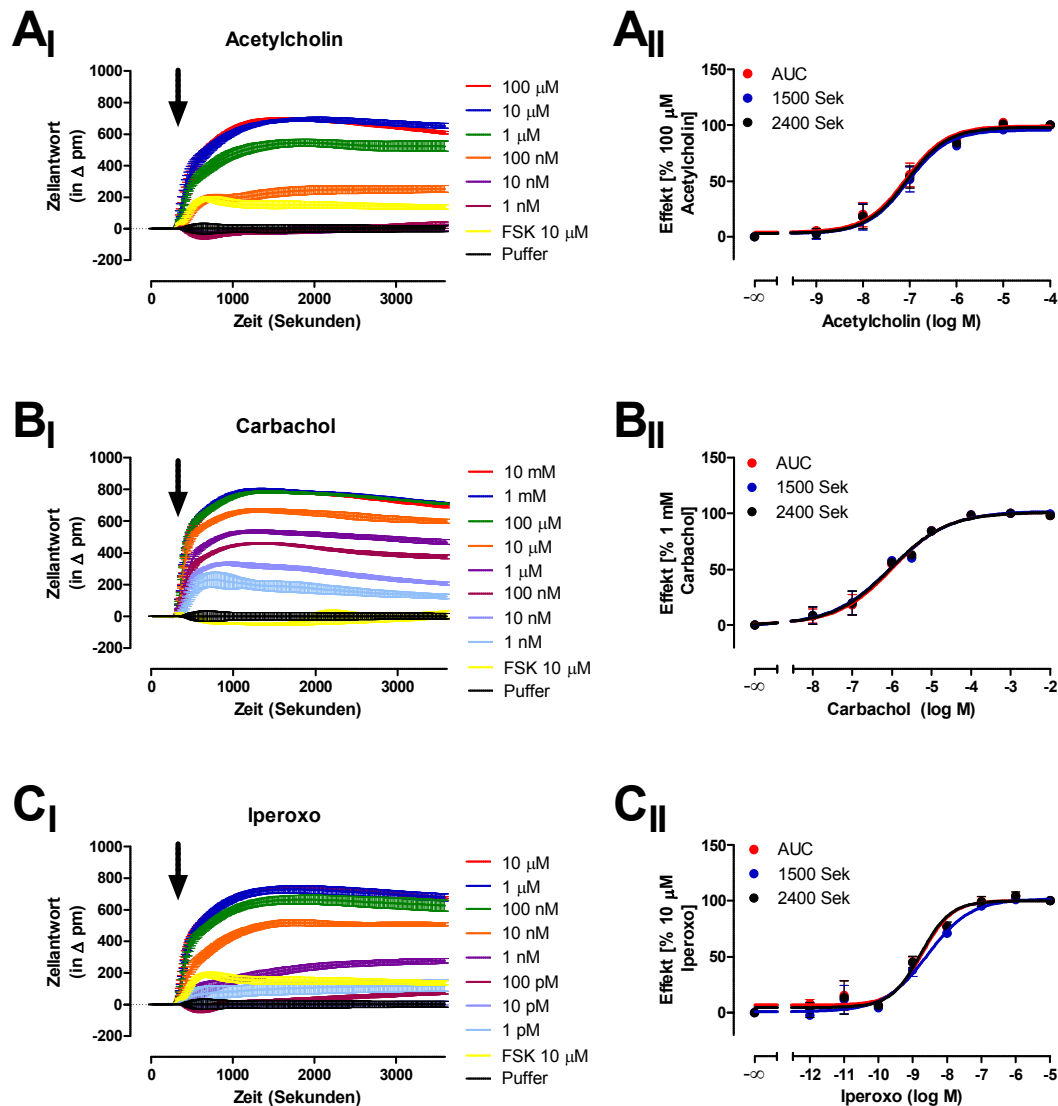


Abbildung 52: Unter Ausschaltung von $G_{i/o}$ und G_s Proteinen zeigten sich Kurvenverläufe, die für eine Aktivierung von $G_{q/11}$ Proteinen charakteristisch sind.

(A_I, B_I, C_I) Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. einer repräsentativen, basislinien-korrigierten Originalsignatur in Vierfachbestimmung. Der Pfeil gibt an, wann die Substanz-Zugabe stattgefunden hat. Ordinate: Wellenlängenverschiebung in Picometern. Abszisse: Zeit in Sekunden. (A_{II}, B_{II}, C_{II}) Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus drei Einzelversuchen in Vierfachbestimmung mit dem G_s Protein-Aktivator CTX und dem $G_{i/o}$ Protein-Inhibitor PTX. Ordinate: Zellantwort in Prozent. 100 % entspricht dem Effekt, der durch 100 μ M Acetylcholin (A_{II}), 1 mM Carbachol (B_{II}) bzw. 10 μ M Iperoxo (C_{II}) ausgelöst wurde. 0 % entspricht dem Basalwert. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz.

4 Ergebnisse

Ligand	Zeitpunkt der Messung	n_H	E_{max}	pEC_{50}
ACh (n=3)	AUC (3600 Sek.)	0,69 ± 0,15 ^{n.s.}	99,3 ± 3,6 ^{NS}	7,08 ± 0,12 ^{N.S.}
	1500 Sek.	0,65 ± 0,15 ^{n.s.}	95,7 ± 3,9 ^{NS}	7,04 ± 0,13 ^{N.S.}
	2400 Sek.	0,68 ± 0,15 ^{n.s.}	98,0 ± 3,6 ^{NS}	7,06 ± 0,12 ^{N.S.}
Carbachol (n=3)	AUC (3600 Sek.)	0,63 ± 0,09*	101,0 ± 2,9 ^{NS}	5,98 ± 0,10 ^{N.S.}
	1500 Sek.	0,58 ± 0,10*	101,9 ± 3,5 ^{NS}	6,03 ± 0,13 ^{N.S.}
	2400 Sek.	0,61 ± 0,09*	100,9 ± 3,1 ^{NS}	6,04 ± 0,12 ^{N.S.}
Iperoxo (n=3)	AUC (3600 Sek.)	0,75 ± 0,16 ^{n.s.}	100,1 ± 3,3 ^{NS}	8,71 ± 0,12 ^{N.S.}
	1500 Sek.	0,69 ± 0,12*	101,7 ± 3,8 ^{NS}	8,58 ± 0,13 ^{N.S.}
	2400 Sek.	0,74 ± 0,16 ^{n.s.}	100,0 ± 3,5 ^{NS}	8,77 ± 0,12 ^{N.S.}

Tabelle 31: Kenngrößen ± S.E.M. der Konzentrations-Effekt Kurven aus Abbildung 52.

Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E.M. aus jeweils drei Einzelversuchen in Vierfachbestimmung. n: Anzahl der Experimente. n_H : Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. E_{max} : maximale Zellantwort in Prozent, bezogen auf den Effekt, der durch 100 μ M Acetylcholin, 1 mM Carbachol bzw. 10 μ M Iperoxo ausgelöst wurde. pEC_{50} : Negativer dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz, welche eine halbmaximale Zellantwort hervorgerufen hat. ^{n.s.}: Nicht signifikanter Unterschied zu einem Hill-Koeffizienten $n_H=1$ (F-Test, $p>0,05$). *: Signifikanter Unterschied zu einem Hill-Koeffizienten $n_H=1$ (F-Test, $p<0,05$). ^{NS}: Nicht signifikanter Unterschied zwischen den maximalen Effekten, die sich durch eine Auswertung der AUC nach 3600 Sekunden, und zu den Zeitpunkten $t=1500$ Sekunden und $t=2400$ Sekunden ergeben haben (One-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni's Post-Test). ^{N.S.}: Nicht signifikanter Unterschied zwischen den pEC_{50} -Werten, die sich durch eine Auswertung der AUC nach 3600 Sekunden, und zu den Zeitpunkten $t=1500$ Sekunden und $t=2400$ Sekunden ergeben haben (One-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni's Post-Test).

Im Folgenden wurde die Hypothese, dass $G_{i/o}$ Proteine nur dann in die Signalkaskade des M1-Rezeptors involviert sind, wenn $G_{q/11}$ Proteine ausgeschaltet worden sind, weiter untersucht. Dafür wurden G_s und $G_{i/o}$ Proteine simultan blockiert. Es resultierten Massenverschiebungen, die sich sowohl in ihrer Intensität als auch in ihrem zeitlichen Verlauf nicht signifikant von denen unter reiner G_s Protein-Blockade unterschieden haben. Die Wirksamkeiten der drei Substanzen, die anhand von Dosis-Wirkungskurven ermittelt worden sind, unterschieden sich ebenfalls nicht zwischen den CTX-behandelten und den

CTX- und PTX- behandelten Zellen. Diese Resultate lieferten einen weiteren Hinweis darauf, dass $G_{i/o}$ Proteine unter physiologischen Bedingungen nicht an der Signaltransduktion des M1-Rezeptors beteiligt sind, sondern erst dann vom Rezeptor rekrutiert werden, wenn $G_{q/11}$ Proteine ausgeschaltet worden sind.

Acetylcholin: Die Auswertung der Dosis-Wirkungskurven mithilfe der Nichtlinearen Regressionsanalyse und der „Vier-Parameter-logistischen Gleichung“ nach Barlow und Blake (1989) ergab für Acetylcholin zu allen drei untersuchten Zeitpunkten eine Mittelwertskurve, die mit einem normalen Steilheitsmaß angepasst werden konnte.

Carbachol: Durch eine Mittelung der einzelnen Versuchstage ergab sich eine Mittelwertskurve, deren Steilheit signifikant von einem normalen Steilheitsmaß abwich. Sechs der neun Einzelkurven konnten jedoch mit einem Hill-Koeffizienten $n_H=1$ ausgewertet werden, weshalb die Rezeptor-Ligand-Interaktion vermutlich trotz der flach verlaufenden Mittelwertskurve auf einer bimolekularen Interaktion beruhte.

Iperoxo: Zwei der drei Mittelwertskurven konnten mit einem normalen Steilheitsmaß angepasst werden. Die Mittelwertskurve, die aus den Daten zum Zeitpunkt $t=1500$ Sekunden generiert wurde, zeigte signifikante Unterschiede zu einem normalen Steilheitsmaß von $n_H=1$. Vermutlich handelt es sich hierbei um ein Artefakt, dem keine biologische Bedeutung beigemessen wurde.

4.7.5.1 Vergleich der Kenngrößen, die in IP1-Assays und DMR-Assays für die Aktivierung von $G_{q/11}$ Proteinen durch Acetylcholin generiert worden sind

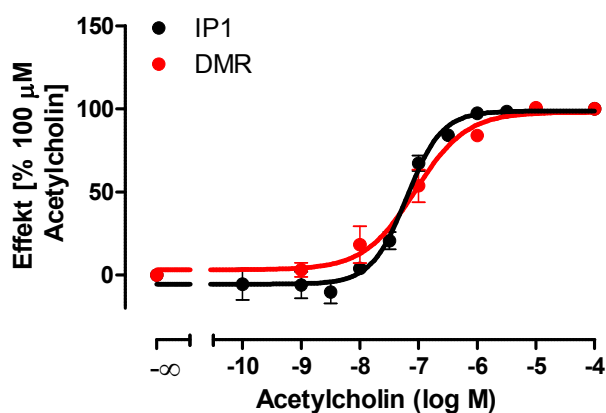


Abbildung 53: Vergleich der Kenngrößen der $G_{q/11}$ Protein-Aktivierung in verschiedenen Assays.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus drei Einzelversuchen in Dreifach- (IP1-Assay) bzw. Vierfachbestimmung (DMR). Die Zellen wurden im Fall des DMR-Assays mit CTX und PTX vorbehandelt, um eine rein $G_{q/11}$ -vermittelte Zellantwort zu erhalten. Ordinate: Zellantwort in Prozent. 100 % entspricht dem Effekt, der durch 100 μ M Acetylcholin im jeweiligen Assay ausgelöst wurde. 0 % entspricht dem Basalwert. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz.

Assay	n	n_H	E_{max}	pEC_{50}
IP1	3	$1,45 \pm 0,20^*$	$98,7 \pm 2,4$	$7,21 \pm 0,05$
DMR (2400 Sek)	3	$0,68 \pm 0,15^{n.s.}$	$98,0 \pm 3,6^{NS}$	$7,06 \pm 0,12^{N.S.}$

Tabelle 32: Kenngrößen \pm S.E.M. der Konzentrations-Effekt Kurven aus Abbildung 53.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus drei Einzelversuchen in Dreifach- (IP1-Assay) bzw. Vierfachbestimmung (DMR). n: Anzahl der Experimente. n_H : Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. E_{max} : maximale Zellantwort in Prozent, bezogen auf den Effekt, der durch 100 μ M Acetylcholin im jeweiligen Assay ausgelöst wurde. pEC_{50} : Negativer dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz, welche eine halbmaximale Zellantwort hervorgerufen hat. ^{n.s.}: Nicht signifikanter Unterschied zu einem Hill-Koeffizienten $n_H=1$ (F-Test, $p>0,05$). ^{*}: Signifikanter Unterschied zu einem Hill-Koeffizienten $n_H=1$ (F-Test, $p>0,05$). ^{NS}: Nicht signifikanter Unterschied zu dem E_{max} -Wert, welcher in IP1-Assays für Acetylcholin detektiert wurde. ^{N.S.}: Nicht signifikanter Unterschied zu dem pEC_{50} -Wert von Acetylcholin in IP1-Assays.

Die Auswertung der in IP1-Assays und DMR-Versuchen erhobenen Datensätze für Acetylcholin unterschieden sich in ihrer Wirksamkeit nicht signifikant voneinander. Das Steilheitsmaß war im Fall der IP1-Assays signifikant größer als $n_H=1$. Die Datensätze, die in

DMR-Assays erhoben wurden, konnten hingegen mit einem normalen Steilheitsmaß angepasst werden.

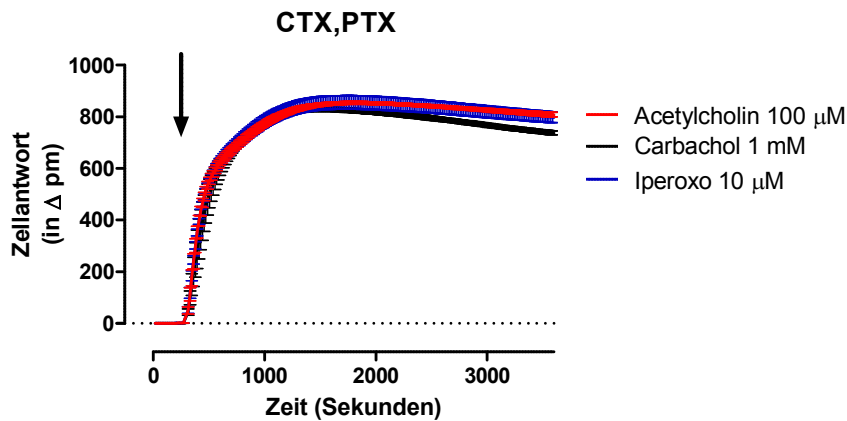


Abbildung 54: Vergleich der drei orthosterischen Agonisten unter Maskierung von G_s und Ausschaltung von $G_{i/o}$ Proteinen.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. einer repräsentativen, basislinien-korrigierten Originalsignatur in Vierfachbestimmung. Der Pfeil gibt an, wann die Substanz-Zugabe stattgefunden hat. Ordinate: Wellenlängenverschiebung in Picometern. Abszisse: Zeit in Sekunden.

Wurden G_s und $G_{i/o}$ Proteine maskiert beziehungsweise blockiert, kam es zu sehr geringen Unterschieden zwischen den drei getesteten Orthosteren. In Einklang mit den Daten aus IP1-Versuchen, scheinen Acetylcholin, Iperoxo und Carbachol auch in DMR-Assays vollagonistische Liganden für $G_{q/11}$ Protein-vermittelte Signalwege zu sein.

4.7.6 Durch eine Maskierung/Ausschaltung von G_s und $G_{q/11}$ Proteinen zeigten sich $G_{i/o}$ -vermittelte Kurvenverläufe mit geringer Intensität

Toxine: CTX und FR

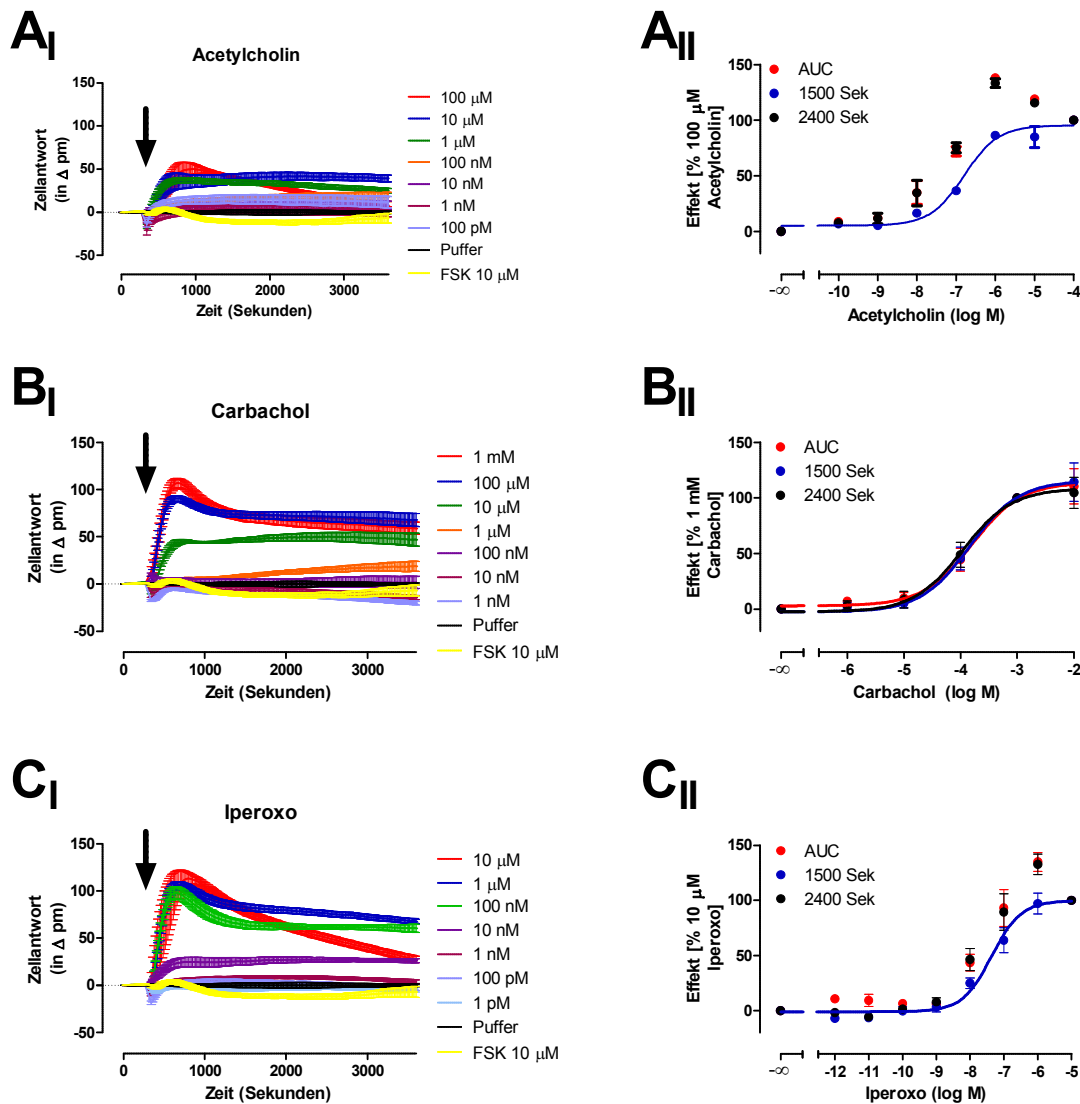


Abbildung 55: Unter Ausschaltung von $G_{q/11}$ und G_s Proteinen kam es zu einer Aktivierung von $G_{i/o}$ Proteinen, jedoch mit geringer Intensität.

(A_I, B_I, C_I) Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. einer repräsentativen, basislinien-korrigierten Originalsignatur in Vierfachbestimmung. Der Pfeil gibt an, wann die Substanz-Zugabe stattgefunden hat. Ordinate: Wellenlängenverschiebung in Picometern. Abszisse: Zeit in Sekunden. (A_{II}, B_{II}, C_{II}) Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus drei Einzelversuchen in Vierfachbestimmung mit dem G_s Protein-Aktivator CTX und dem $G_{q/11}$ Protein-Inhibitor FR. Ordinate: Zellantwort in Prozent. 100 % entspricht dem Effekt, der durch 100 μ M Acetylcholin (A_{II}), 1 mM Carbachol (B_{II}) bzw. 10 μ M Iperoxo (C_{II}) ausgelöst wurde. 0 % entspricht dem Basalwert. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz.

4 Ergebnisse

Ligand	Zeitpunkt der Messung	n_H	E_{max}	pEC_{50}
ACh (n=3)	AUC (3600 Sek.)	k.A.	115,3 ± 5,6 ⁺	k.A.
	1500 Sek.	0,79 ± 0,14 ^{n.s.}	95,5 ± 2,8 ⁺	6,80 ± 0,10
	2400 Sek.	k.A.	113,1 ± 5,2 ⁺	k.A.
Carbachol (n=3)	AUC (3600 Sek.)	1,06 ± 0,28 ^{n.s.}	113,8 ± 5,4 ^{NS}	3,79 ± 0,10 ^{N.S.}
	1500 Sek.	0,95 ± 0,24 ^{n.s.}	115,4 ± 5,6 ^{NS}	3,84 ± 0,10 ^{N.S.}
	2400 Sek.	0,98 ± 0,30 ^{n.s.}	108,4 ± 6,0 ^{NS}	3,96 ± 0,12 ^{N.S.}
Iperoxo (n=3)	AUC (3600 Sek.)	k.A.	116,8 ± 6,0 ^{NS}	k.A.
	1500 Sek.	0,73 ± 0,15 ^{n.s.}	99,5 ± 4,2 ^{NS}	7,37 ± 0,11
	2400 Sek.	k.A.	113,9 ± 5,8 ^{NS}	k.A.

Tabelle 33: Kenngrößen ± S.E.M. der Konzentrations-Effekt Kurven aus Abbildung 55.

Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E.M. aus jeweils drei Einzelversuchen in Vierfachbestimmung. n: Anzahl der Experimente. n_H : Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. E_{max} : maximale Zellantwort in Prozent, bezogen auf den Effekt, der durch 100 μ M Acetylcholin, 1 mM Carbachol bzw. 10 μ M Iperoxo ausgelöst wurde. pEC_{50} : Negativer dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz, welche eine halbmaximale Zellantwort hervorgerufen hat. ^{n.s.}: Nicht signifikanter Unterschied zu einem Hill-Koeffizienten $n_H=1$ (F-Test, $p>0,05$). ⁺: Signifikanter Unterschied zu einem Hill-Koeffizienten $n_H=1$ (F-Test, $p<0,05$). k.A.: Die Dosis-Wirkungskurve konnte nicht in Form einer sigmoiden Kurve dargestellt werden. ^{NS}: Nicht signifikanter Unterschied zwischen den maximalen Effekten, die sich durch eine Auswertung der AUC nach 3600 Sekunden, und zu den Zeitpunkten $t=1500$ Sekunden und $t=2400$ Sekunden ergeben haben (One-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni's Post-Test). ⁺: Signifikanter Unterschied zwischen den maximalen Effekten, die sich durch eine Auswertung der AUC nach 3600 Sekunden, und zu den Zeitpunkten $t=1500$ Sekunden und $t=2400$ Sekunden ergeben haben (One-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni's Post-Test). ^{N.S.}: Nicht signifikanter Unterschied zwischen den pEC_{50} -Werten, die sich durch eine Auswertung der AUC nach 3600 Sekunden, und zu den Zeitpunkten $t=1500$ Sekunden und $t=2400$ Sekunden ergeben haben (One-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni's Post-Test).

Schröder und Kollegen (2010) konnten an CHO-M2 Zellen zeigen, dass die Dynamische Massenumverteilung in CHO-Zellen, welche auf einer Aktivierung von $G_{i/o}$ Proteinen beruht, einen positiv-gerichteten „Peak“ unmittelbar nach Substanz-Zugabe zeigt, welcher daraufhin schnell wieder abflacht und dann ein Plateau bildet, welches auch nach 3600 Sekunden

noch nicht wieder komplett abgeflacht ist. Ähnliche Kurvenverläufe wurden auch im Rahmen dieser Arbeit an M1-Rezeptoren detektiert, nachdem G_s Proteine maskiert und $G_{q/11}$ Proteine blockiert worden sind. Die Wellenlängenverschiebung in den positiven Bereich war bei der Untersuchung einer $G_{i/o}$ Protein-Aktivierung von CHO-M1 Zellen sehr schwach ausgeprägt, was auf eine geringe Rekrutierung von $G_{i/o}$ Proteinen durch diesen Rezeptor-Subtyp hinweist.

Eine Generierung von Dosis-Wirkungskurven war im Fall von **Acetylcholin und Iperoxo** nur für die Daten möglich, die zum Zeitpunkt $t=1500$ Sekunden erhoben worden sind. Betrachtet man die Datenpunkte nach 2400 Sekunden bzw. als AUC nach 3600 Sekunden, zeigte sich keine Korrelation zwischen Konzentration und Effekt. Supramaximale Konzentrationen wiesen im Fall von Acetylcholin ($100 \mu\text{M}$) und Iperoxo ($10 \mu\text{M}$) andere Kurvenverläufe auf, als geringere Konzentrationen. Dieses Phänomen deutete darauf hin, dass in hohen Konzentrationen des Agonisten neben $G_{i/o}$ Proteinen auch noch andere Effektor-Proteine beeinflusst werden, welche ebenfalls zu einer intrazellulären Massenumverteilung führten.

Carbachol: Die Datensätze, die für Carbachol ermittelt werden konnten, zeigten nicht das Phänomen, das oben für Acetylcholin und Iperoxo beschrieben worden ist. Die Dosis-Wirkungskurven von Carbachol ließen sich in allen drei Fällen durch eine Nichtlineare Regressionsanalyse und der „Vier-Parameter-logistischen Gleichung“ in Form einer sigmoiden Kurve darstellen. Die Kurvensteilheit konnte ausreichend mit einem konstanten Hill-Koeffizienten von $n_H=1$ beschrieben werden.

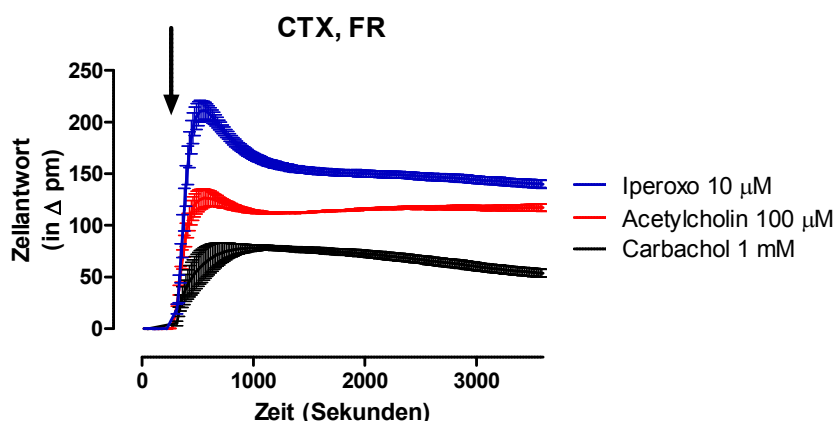


Abbildung 56: Vergleich der drei orthosterischen Agonisten unter Maskierung von G_s und Ausschaltung von $G_{q/11}$ Proteinen.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. einer repräsentativen, basislinien-korrigierten Originalsignatur in Vierfachbestimmung. Der Pfeil gibt an, wann die Substanz-Zugabe stattgefunden hat. Ordinate: Wellenlängenverschiebung in Picometern. Abszisse: Zeit in Sekunden.

Durch die Maskierung/Ausschaltung von G_s und $G_{q/11}$ Proteinen wurde hier der $G_{i/o}$ -vermittelte Signalweg detektiert. In Einklang mit den Daten aus $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Assays zeigte Iperoxo auch hier superagonistisches Verhalten und Carbachol partialagonistisches Verhalten für die Aktivierung von $G_{i/o}$ Proteinen.

4.7.6.1 Vergleich der Kenngrößen, die in $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ - und DMR-Assays (1500 Sek.) für die Aktivierung von $G_{i/o}$ Proteinen durch Acetylcholin generiert wurden

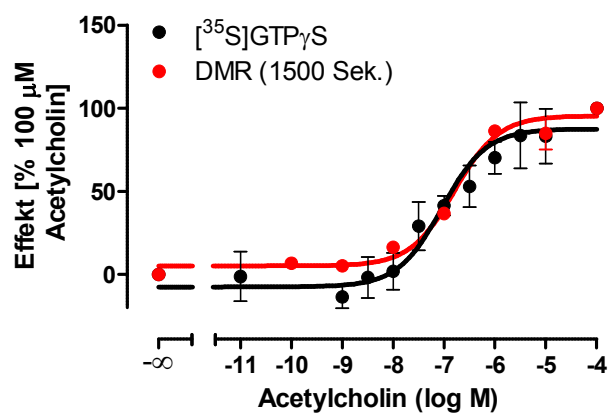


Abbildung 57: Vergleich der Kenngrößen der $G_{i/o}$ Protein-Aktivierung in verschiedenen Assays.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus drei bzw. vier Einzelversuchen in Vierfachbestimmung. Die Zellen wurden im Fall des DMR-Assays mit CTX und FR vorbehandelt, um eine rein $G_{i/o}$ -vermittelte Zellantwort zu erhalten. Ordinate: Zellantwort in Prozent. 100 % entspricht dem Effekt, der durch 100 μM Acetylcholin im jeweiligen Assay ausgelöst wurde. 0 % entspricht dem Basalwert. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz.

Assay	n	n_H	E_{max}	pEC_{50}
$[^{35}S]GTP\gamma S$	4	$0,75 \pm 0,22^{n.s.}$	$89,3 \pm 6,2$	$6,88 \pm 0,15$
DMR (1500 Sek.)	3	$0,79 \pm 0,14^{n.s.}$	$95,5 \pm 2,8^{NS}$	$6,80 \pm 0,10^{N.S.}$

Tabelle 34: Kenngrößen \pm S.E.M. der Konzentrations-Effekt Kurven aus Abbildung 57.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus drei bis vier Einzelversuchen in Vierfachbestimmung. n: Anzahl der Experimente. n_H : Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. E_{max} : maximale Zellantwort in Prozent, bezogen auf den Effekt, der durch 100 μM Acetylcholin im jeweiligen Assay ausgelöst wurde. pEC_{50} : Negativer dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz, welche eine halbmaximale Zellantwort hervorgerufen hat. ^{n.s.}: Nicht signifikanter Unterschied zu einem Hill-Koeffizienten $n_H=1$ (F-Test, $p>0,05$). ^{NS}: Nicht signifikanter Unterschied zu dem E_{max} -Wert, welcher in $[^{35}S]GTP\gamma S$ -Assays für Acetylcholin detektiert wurde. ^{N.S.}: Nicht signifikanter Unterschied zu dem pEC_{50} -Wert von Acetylcholin in $[^{35}S]GTP\gamma S$ -Assays.

Die Auswertung der in $[^{35}S]GTP\gamma S$ -Assays und DMR-Versuchen erhobenen Datensätze für Acetylcholin unterschieden sich in ihrer intrinsischen Aktivität und ihrer Wirksamkeit nicht signifikant voneinander. Die Dosis-Wirkungskurven konnten in beiden Assays ausreichend mit einem normalen Steilheitsmaß von $n_H=1$ angepasst werden.

4.7.6.2 Vergleich der Kenngrößen, die in $[^{35}S]GTP\gamma S$ - und DMR-Assays (2400 Sek.) für die Aktivierung von G_i Proteinen durch Acetylcholin generiert wurden

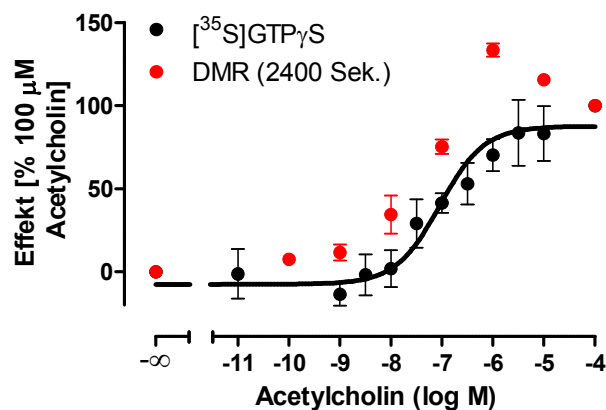


Abbildung 58: Vergleich der Kenngrößen der $G_{i/o}$ Protein-Aktivierung in verschiedenen Assays.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus drei bzw. vier Einzelversuchen in Vierfachbestimmung. Die Zellen wurden im Fall des DMR-Assays mit CTX und FR vorbehandelt, um eine rein $G_{i/o}$ -vermittelte Zellantwort zu erhalten. Ordinate: Zellantwort in Prozent. 100 % entspricht dem Effekt, der durch 100 μM Acetylcholin im jeweiligen Assay ausgelöst wurde. 0 % entspricht dem Basalwert. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz.

4 Ergebnisse

Assay	n	n _H	E _{max}	pEC ₅₀
[³⁵ S]GTPγS	4	0,75 ± 0,22 ^{n.s.}	89,3 ± 6,2	6,88 ± 0,15
DMR (2400 Sek.)	3	k.A.	113,1 ± 5,2 ⁺	k.A.

Tabelle 35: Kenngrößen ± S.E.M. der Konzentrations-Effekt Kurven aus Abbildung 58.

Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E.M. aus drei bis vier Einzelversuchen in Vierfachbestimmung. n: Anzahl der Experimente. n_H: Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. E_{max}: maximale Zellantwort in Prozent, bezogen auf den Effekt, der durch 100 µM Acetylcholin im jeweiligen Assay ausgelöst wurde. pEC₅₀: Negativer dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz, welche eine halbmaximale Zellantwort hervorgerufen hat. ^{n.s.}: Nicht signifikanter Unterschied zu einem Hill-Koeffizienten n_H=1 (F-Test, p>0,05). k.A.: Die Dosis-Wirkungskurve konnte nicht in Form einer sigmoiden Kurve dargestellt werden. ⁺: Signifikanter Unterschied zu dem E_{max}-Wert, welcher in [³⁵S]GTPγS-Assays für Acetylcholin detektiert wurde (t-Test, p<0,05).

Vergleicht man die Datensätze zum Zeitpunkt t=2400 Sekunden und nicht wie oben dargestellt zu einem Zeitpunkt t=1500 Sekunden ergaben sich jedoch signifikante Unterschiede in den Kenngrößen der G_{i/o} Protein-Aktivierung zwischen den beiden unterschiedlichen Assays. Die Datensätze, die in DMR-Assays zu einem Zeitpunkt t=2400 Sekunden erhoben worden sind, konnten nicht in Form einer sigmoiden Kurve dargestellt werden. Dementsprechend konnte auch die Wirksamkeit von Acetylcholin für dieses Assay nicht bestimmt werden. Ein Vergleich der Kenngrößen der G_{i/o} Protein-Aktivierung in CHO-M1 Zellen in unterschiedlichen Assays lässt sich demzufolge nicht endgültig anstellen, sondern ist von den Versuchsbedingungen und im Fall der Dynamischen Massenumverteilung von der Inkubationszeit des Agonisten abhängig.

4.7.7 Durch eine Ausschaltung von $G_{q/11}$ und $G_{i/o}$ Proteinen zeigten sich Kurvenverläufe, die für eine Aktivierung von G_s Proteinen charakteristisch sind

Toxine: PTX und FR

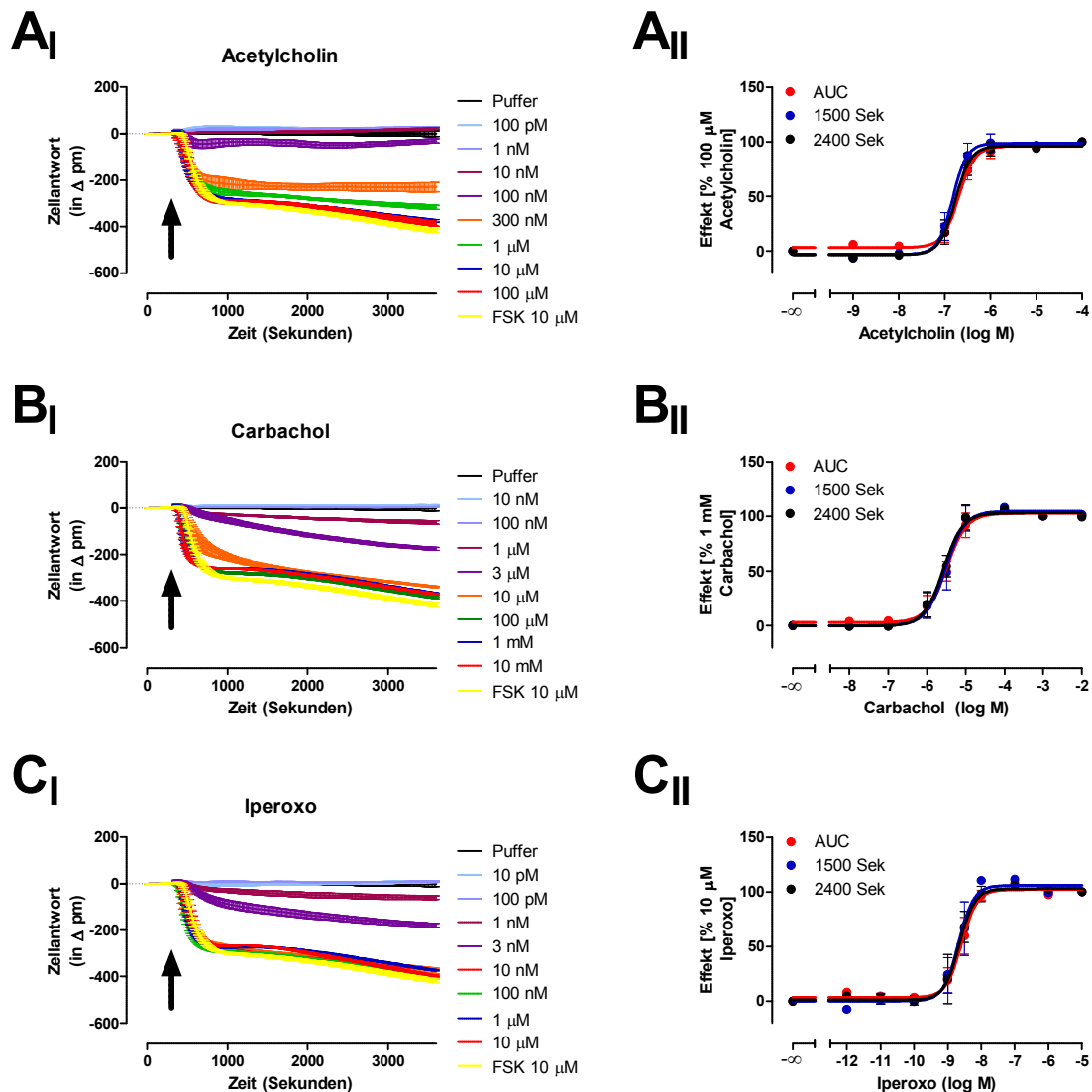


Abbildung 59: Unter Ausschaltung von $G_{i/o}$ und $G_{q/11}$ Proteinen zeigten sich negative Wellenlängenverschiebungen.

(A_I, B_I, C_I) Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. einer repräsentativen, basislinien-korrigierten Originalsignatur in Vierfachbestimmung. Der Pfeil gibt an, wann die Substanz-Zugabe stattgefunden hat. Ordinate: Wellenlängenverschiebung in Picometern. Abszisse: Zeit in Sekunden. (A_{II}, B_{II}, C_{II}) Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus drei Einzelversuchen in Vierfachbestimmung mit den $G_{i/o}$ und $G_{q/11}$ Protein-Inhibitoren PTX und FR. Ordinate: Zellantwort in Prozent. 100 % entspricht dem Effekt, der durch 100 μ M Acetylcholin (A_{II}), 1 mM

Carbachol (B_{II}) bzw. 10 μ M Iperoxo (C_{II}) ausgelöst wurde. 0 % entspricht dem Basalwert. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz.

4 Ergebnisse

Ligand	Zeitpunkt der Messung	n_H	E_{max}	pEC_{50}
ACh (n=3)	AUC (3600 Sek.)	2,46 ± 0,43*	96,0 ± 2,6 ^{NS}	6,69 ± 0,05 ^{N.S.}
	1500 Sek.	2,77 ± 0,71*	98,7 ± 3,4 ^{NS}	6,83 ± 0,06 ^{N.S.}
	2400 Sek.	2,51 ± 0,48*	96,3 ± 3,0 ^{NS}	6,77 ± 0,05 ^{N.S.}
Carbachol (n=3)	AUC (3600 Sek.)	1,67 ± 0,31*	102,7 ± 3,1 ^{NS}	5,50 ± 0,06 ^{N.S.}
	1500 Sek.	1,73 ± 0,39*	104,6 ± 3,8 ^{NS}	5,52 ± 0,07 ^{N.S.}
	2400 Sek.	1,73 ± 0,35*	103,0 ± 3,2 ^{NS}	5,58 ± 0,06 ^{N.S.}
Iperoxo (n=3)	AUC (3600 Sek.)	1,88 ± 0,37*	102,2 ± 2,8 ^{NS}	8,59 ± 0,06 ^{N.S.}
	1500 Sek.	1,90 ± 0,50*	106,0 ± 4,1 ^{NS}	8,68 ± 0,08 ^{N.S.}
	2400 Sek.	1,89 ± 0,43*	102,9 ± 3,1 ^{NS}	8,66 ± 0,06 ^{N.S.}

Tabelle 36: Kenngrößen ± S.E.M. der Konzentrations-Effekt Kurven aus Abbildung 59.

Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E.M. aus jeweils drei Einzelversuchen in Vierfachbestimmung. n: Anzahl der Experimente. n_H : Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. E_{max} : maximale Zellantwort in Prozent, bezogen auf den Effekt, der durch 100 μ M Acetylcholin, 1 mM Carbachol bzw. 10 μ M Iperoxo ausgelöst wurde. pEC_{50} : Negativer dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz, welche eine halbmaximale Zellantwort hervorgerufen hat. *: Signifikanter Unterschied zu einem Hill-Koeffizienten $n_H=1$ (F-Test, $p<0,05$). ^{NS}: Nicht signifikanter Unterschied zwischen den maximalen Effekten, die sich durch eine Auswertung der AUC nach 3600 Sekunden, und zu den Zeitpunkten $t= 1500$ Sekunden und $t= 2400$ Sekunden ergeben haben (One-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni's Post-Test). ^{N.S.}: Nicht signifikanter Unterschied zwischen den pEC_{50} -Werten, die sich durch eine Auswertung der AUC nach 3600 Sekunden, und zu den Zeitpunkten $t= 1500$ Sekunden und $t= 2400$ Sekunden ergeben haben (One-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni's Post-Test).

Durch die simultane Ausschaltung von $G_{q/11}$ und $G_{i/o}$ Proteinen ergaben sich Wellenlängenverschiebungen in den negativen Bereich, welche für eine Aktivierung von G_s Proteinen charakteristisch sind (Schröder et al., 2010). Zunächst kam es unmittelbar nach der Substanz-Zugabe zu einem steilen Anstieg in den negativen Bereich, woraufhin sich ein Plateau ausbildete, welches über den gesamten Zeitraum der Messung (3600 Sekunden) stabil blieb.

Durch die halblogarithmische Auftragung des Effektes zu einem bestimmten Zeitpunkt bzw. der AUC gegen die molare Konzentration der Testsubstanzen und einer Auswertung mittels Nichtlinearer Regressionsanalyse und der „Vier-Parameter-logistischen Gleichung“ ergaben sich sehr steil verlaufende sigmoide Dosis-Wirkungskurven. Somit scheint im Fall der reinen G_s Protein-Aktivierung die Bindung eines Liganden an den Rezeptor, die weitere Ligand-Bindung zu begünstigen.

Vergleicht man die drei Agonisten Acetylcholin, Carbachol und Iperoxo untereinander, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Art des Kurvenverlaufs. Analog zu den IP1- und cAMP-Assays war Iperoxo auch hier circa zwei Dekaden stärker wirksam als Acetylcholin, wohingegen Carbachol in etwa zehnfach schwächer wirksam war.

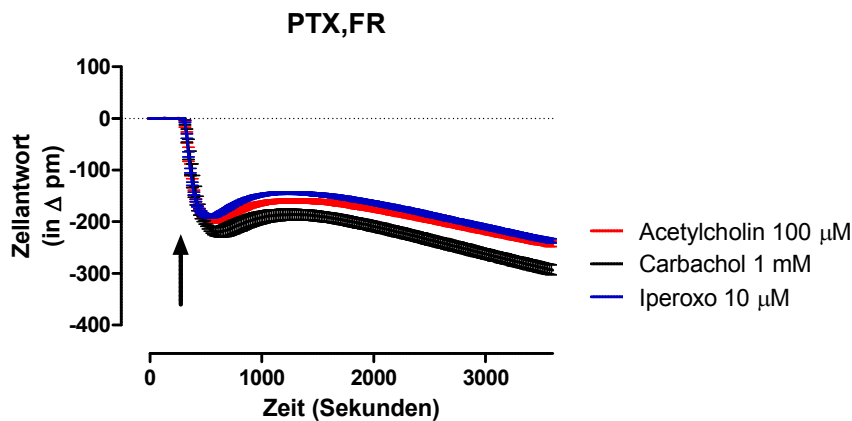


Abbildung 60: Vergleich der drei orthosterischen Agonisten unter Ausschaltung von $G_{i/o}$ und $G_{q/11}$ Proteinen.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. einer repräsentativen, basislinien-korrigierten Originalsignatur in Vierfachbestimmung. Der Pfeil gibt an, wann die Substanz-Zugabe stattgefunden hat. Ordinate: Wellenlängenverschiebung in Picometern. Abszisse: Zeit in Sekunden.

In Einklang mit den Daten aus Abbildung 46, in denen ausschließlich $G_{q/11}$ Proteine ausgeschaltet wurden, zeigten sich für Iperoxo und Acetylcholin auch unter Ausschaltung von $G_{i/o}$ und $G_{q/11}$ Proteinen geringere Wellenlängenverschiebungen in den negativen Bereich als für Carbachol, jedoch ist der Unterschied hier deutlich geringer. Das ist vermutlich dadurch bedingt, dass unter reiner $G_{q/11}$ Protein-Ausschaltung neben G_s Proteinen hauptsächlich $G_{i/o}$ Proteine als Gegenspieler aktiviert werden und es deshalb zu deutlich geringeren Verschiebungen in den negativen Bereich gekommen ist als hier. Wurden zudem auch noch $G_{i/o}$ Proteine inhibiert, wie in Abbildung 60 dargestellt, ist der Effekt auf die Wellenlängenverschiebung durch andere Effektor-Proteine deutlich geringer und es wurden hauptsächlich G_s -vermittelte Signalwege aktiviert. Der Unterschied in der Intensität zwischen

den drei Liganden zeigte aber, dass vor allem Iperoxo noch andere Effekte auf die Signaltransduktion hat, als eine reine Aktivierung von G_s Proteinen, da die Wellenlängenverschiebung im Fall von Iperoxo deutlich geringer war, als im Fall von Acetylcholin und Carbachol.

4.7.7.1 Vergleich der Kenngrößen, die in cAMP- und DMR-Assays für die Aktivierung von G_s Proteinen durch Acetylcholin generiert wurden

Toxine: PTX und FR

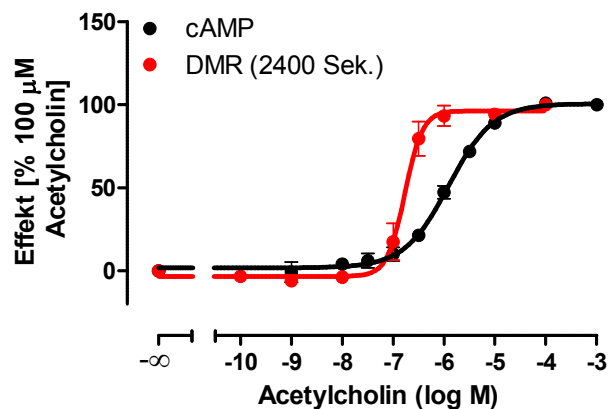


Abbildung 61: Vergleich der Kenngrößen der G_s Protein-Aktivierung in verschiedenen Assays.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus drei Einzelversuchen in Dreifach- (cAMP-Assay) bzw. Vierfachbestimmung (DMR-Assay). Die Zellen wurden in beiden Assays mit PTX und FR vorbehandelt, um eine rein G_s -vermittelte Zellantwort zu erhalten. Ordinate: Zellantwort in Prozent. 100 % entspricht dem Effekt, der durch 100 μ M Acetylcholin im jeweiligen Assay ausgelöst wurde. 0 % entspricht dem Basalwert. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz.

Assay	n	n_H	E_{max}	pEC_{50}
cAMP	3	$0,94 \pm 0,08^{n.s.}$	$100,6 \pm 1,9$	$5,91 \pm 0,04$
DMR (2400 Sek.)	3	$2,51 \pm 0,48^*$	$96,3 \pm 3,0^{NS}$	$6,77 \pm 0,05^{###}$

Tabelle 37: Kenngrößen \pm S.E.M. der Konzentrations-Effekt Kurven aus Abbildung 61.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus drei Einzelversuchen in Dreifach- (cAMP-Assay) bzw. Vierfachbestimmung (DMR-Assay). n: Anzahl der Experimente. n_H : Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. E_{max} : maximale Zellantwort in Prozent, bezogen auf den Effekt, der durch 100 μ M Acetylcholin im jeweiligen Assay ausgelöst wurde. pEC_{50} : Negativer dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz, welche eine halbmaximale Zellantwort hervorgerufen hat. ^{n.s.}: Nicht signifikanter Unterschied zu einem Hill-Koeffizienten $n_H=1$ (F-Test, $p>0,05$). ^{NS}: Nicht signifikanter Unterschied zu dem E_{max} -Wert, welcher in cAMP-Assays für Acetylcholin detektiert wurde (t-Test, $p>0,05$). ^{###}: Signifikanter Unterschied zu dem pEC_{50} -Wert, welcher für Acetylcholin in cAMP-Assays detektiert wurde (t-Test, $p<0,001$).

Abbildung 61 zeigt die Aktivierung von G_s -abhängigen Signalwegen in cAMP- und DMR-Assays. In beiden Fällen wurden die Zellen mit den G Protein-Inhibitoren PTX und FR behandelt, um $G_{i/o}$ und $G_{q/11}$ Proteine simultan zu blockieren, um dann eine rein G_s -vermittelte Zellantwort zu erhalten. Auffällig ist, dass Acetylcholin in DMR-Assays in etwa 10-fach wirksamer war, als in cAMP-Assays. Ein möglicher Grund hierfür wäre, dass neben G_s Proteinen auch noch andere Effektor-Proteine an der Zellantwort in DMR-Versuchen beteiligt waren, die sich jedoch nicht auf die intrazelluläre Synthese von cAMP auswirken und damit in cAMP-Assays nicht erfasst worden sind.

Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass die Dosis-Wirkungskurven, die in cAMP-Assays generiert wurden, mit einem normalen Steilheitsmaß angepasst werden konnten. Die Dosis-Wirkungskurve der DMR-Versuche zum Zeitpunkt $t=2400$ Sekunden hingegen war übersteil und konnte nicht mit einem Hill-Koeffizienten $n_H=1$ dargestellt werden. Übersteile Kurven ergeben sich dadurch, dass die Bindung eines Ligand-Moleküls den Rezeptor affiner für die Bindung weiterer Liganden macht. Allerdings müsste sich dieses Phänomen dann auch in den Daten der cAMP-Generierung zeigen, da beide Versuche die Aktivierung von G_s Proteinen detektieren.

4.7.8 Neben $G_{q/11}$, G_s und $G_{i/o}$ Proteinen sind noch weitere Effektor-Proteine an der Zellantwort beteiligt

Durch eine simultane Blockade von $G_{q/11}$, G_s und $G_{i/o}$ Proteinen sollte getestet werden, ob neben diesen drei G Proteinen noch weitere Effektor-Proteine, die ebenfalls zu einer intrazellulären Massenumverteilung und damit zu einer detektierbaren Wellenlängen-Verschiebung führen, an der Signalkaskade des M1-Rezeptors beteiligt sind.

Toxine: CTX, FR, PTX

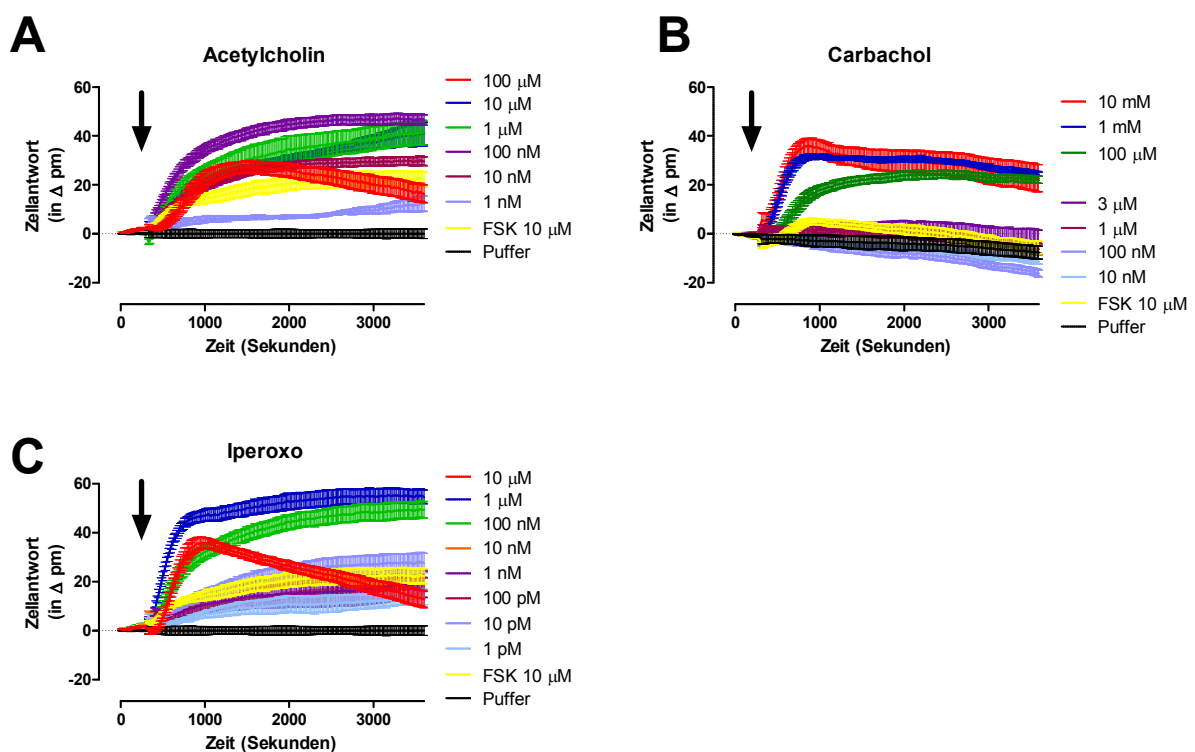


Abbildung 62: Nach einer simultanen Ausschaltung der drei G Proteine wurde ein Restsignal detektiert.

(A, B, C) Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. einer repräsentativen, basislinien-korrigierten Originalsignatur in Vierfachbestimmung. Der Pfeil gibt an, wann die Substanz-Zugabe stattgefunden hat. Ordinate: Wellenlängenverschiebung in Picometern. Abszisse: Zeit in Sekunden.

Abbildung 62 zeigt, dass neben $G_{q/11}$, G_s und $G_{i/o}$ Proteinen noch weitere Effektor-Proteine an der Signalwegskaskade des, in CHO-Zellen exprimierten, M1-Rezeptors beteiligt waren. Ob es sich hierbei um $G_{12/13}$ Proteine handelte oder gegebenenfalls auch um β -Arrestine wurde

in nachfolgenden Versuchen mit dem Pan-G Protein Aktivator Aluminiumfluorid getestet (Kapitel 4.7.9, Abbildung 64).

Die Originalsignaturen von Acetylcholin und Iperoxo lieferten weitere Hinweise darauf, dass supramaximale Konzentrationen der Testsubstanzen andere Effekte in der Zelle auslösen, als geringere Konzentrationen. Die Kurvenverläufe der supramaximalen Konzentrationen stiegen zunächst steil an, fielen aber unmittelbar darauf wieder steil ab. Es wäre möglich, dass sehr hohe Konzentrationen der Agonisten weitere Effektor-Proteine beeinflussen, die einen Effekt auf die Wellenlängenverschiebung haben. Jedoch könnte es sich hierbei auch um unspezifische Effekte der Testsubstanzen an den Zellen handeln, die nicht auf eine Signalwegsaktivierung zurückzuführen sind. Dieses Phänomen war im Fall von Carbachol nicht zu beobachten.

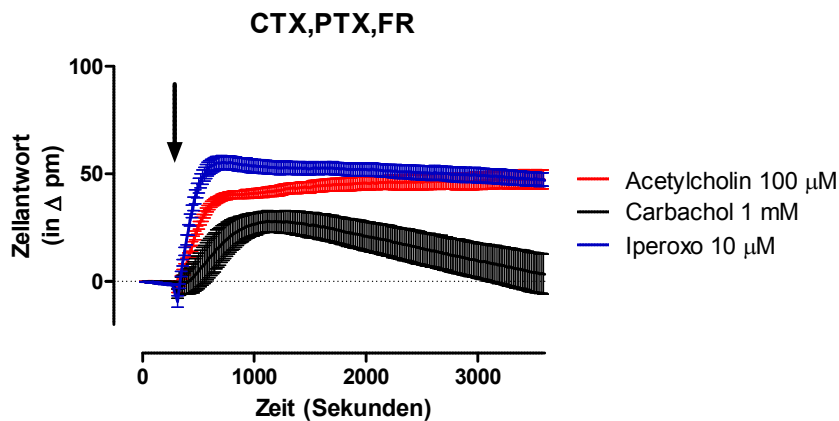


Abbildung 63: Vergleich der drei orthosterischen Agonisten unter Maskierung von G_s und Ausschaltung von $G_{i/o}$ und $G_{q/11}$ Proteinen.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. einer repräsentativen, basislinien-korrigierten Originalsignatur in Vierfachbestimmung. Der Pfeil gibt an, wann die Substanz-Zugabe stattgefunden hat. Ordinate: Wellenlängenverschiebung in Picometern. Abszisse: Zeit in Sekunden.

Wurden alle drei hier getesteten G Proteine ausgeschaltet, zeigte sich trotzdem ein Restsignal für alle drei Orthostere. Iperoxo zeigte das größte Signal, Carbachol das geringste. Im Fall von Carbachol flachte dieses Signal nach einem initialen „Peak“ schnell wieder ab und erreichte innerhalb der Messung von 3600 Sekunden wieder das basale Level. Im Gegensatz dazu bildete das detektierte Signal im Fall von Acetylcholin und Iperoxo ein Plateau und kehrte innerhalb von 3600 Sekunden nicht zum Basalwert zurück. Dieser Unterschied zwischen den drei Agonisten deutet wieder auf ein unterschiedliches Aktivierungsmuster der einzelnen Substanzen hin.

4.7.9 Der M1-Rezeptor aktivierte auch G_{12/13} Proteine

Die Versuche, die in Abbildung 62 (Kapitel 4.7.8) dargestellt sind, wurden unter Verwendung der drei Toxine CTX, PTX und FR durchgeführt. Durch diese Toxin-Kombination sollte getestet werden, ob neben G_s, G_{i/o} und G_{q/11} Proteinen noch weitere Effektor-Proteine an der Signalkaskade des M1-Rezeptors beteiligt waren. Abbildung 62 zeigt, dass nach der Ausschaltung beziehungsweise Maskierung von G_{q/11}, G_{i/o} und G_s Proteinen ein Restsignal detektiert werden konnte. Durch den Einsatz des Pan-G Protein-Aktivators Aluminiumfluorid (AlF₄) sollte getestet werden auf welche Effektor-Proteine das Restsignal aus Abbildung 62 zurückzuführen ist.

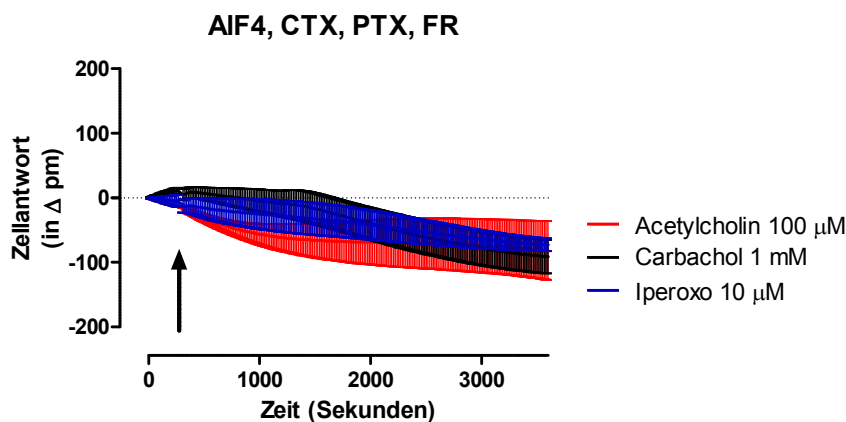


Abbildung 64: Vergleich der drei orthosterischen Agonisten unter Verwendung von AIF₄, CTX, PTX und FR.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. einer repräsentativen, basislinien-korrigierten Originalsignatur in Vierfachbestimmung. Der Pfeil gibt an, wann die Substanz-Zugabe stattgefunden hat. Ordinate: Wellenlängenverschiebung in Picometern. Abszisse: Zeit in Sekunden.

Die Daten für Acetylcholin, Iperoxo und Carbachol zeigten zu den Zeitpunkten $t=1500$ Sekunden, $t=2400$ Sekunden und $t=3600$ Sekunden keine signifikanten Unterschiede zum Basalwert. Das in Abbildung 62 (Kapitel 4.7.8) detektierte Restsignal zeigte sich sensitiv gegenüber AIF₄ und konnte demzufolge auf die Rekrutierung von G_{12/13} Proteinen zurückgeführt werden. Es konnte keine G Protein-unabhängige Signaltransduktion detektiert werden. Eine mögliche Aktivierung anderer Effektor-Proteine, wie zum Beispiel der β -Arrestine konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden. Jedoch ist durch die erhobenen Daten ersichtlich, dass eine mögliche Interaktion des M1-Rezeptors allenfalls auf einer G Protein-abhängigen Rekrutierung von β -Arrestinen beruht und nicht unabhängig von einer G Protein-Aktivierung ablaufen kann.

4.7.10 Effekte der Toxine auf die Signalwegsaktivierung der drei Orthostere

Im Anschluss an die Darstellung der einzelnen Effekte der Toxine auf die Signalwegsaktivierung von Acetylcholin, Carbachol und Iperoxo, werden diese hier noch einmal gesammelt dargestellt.

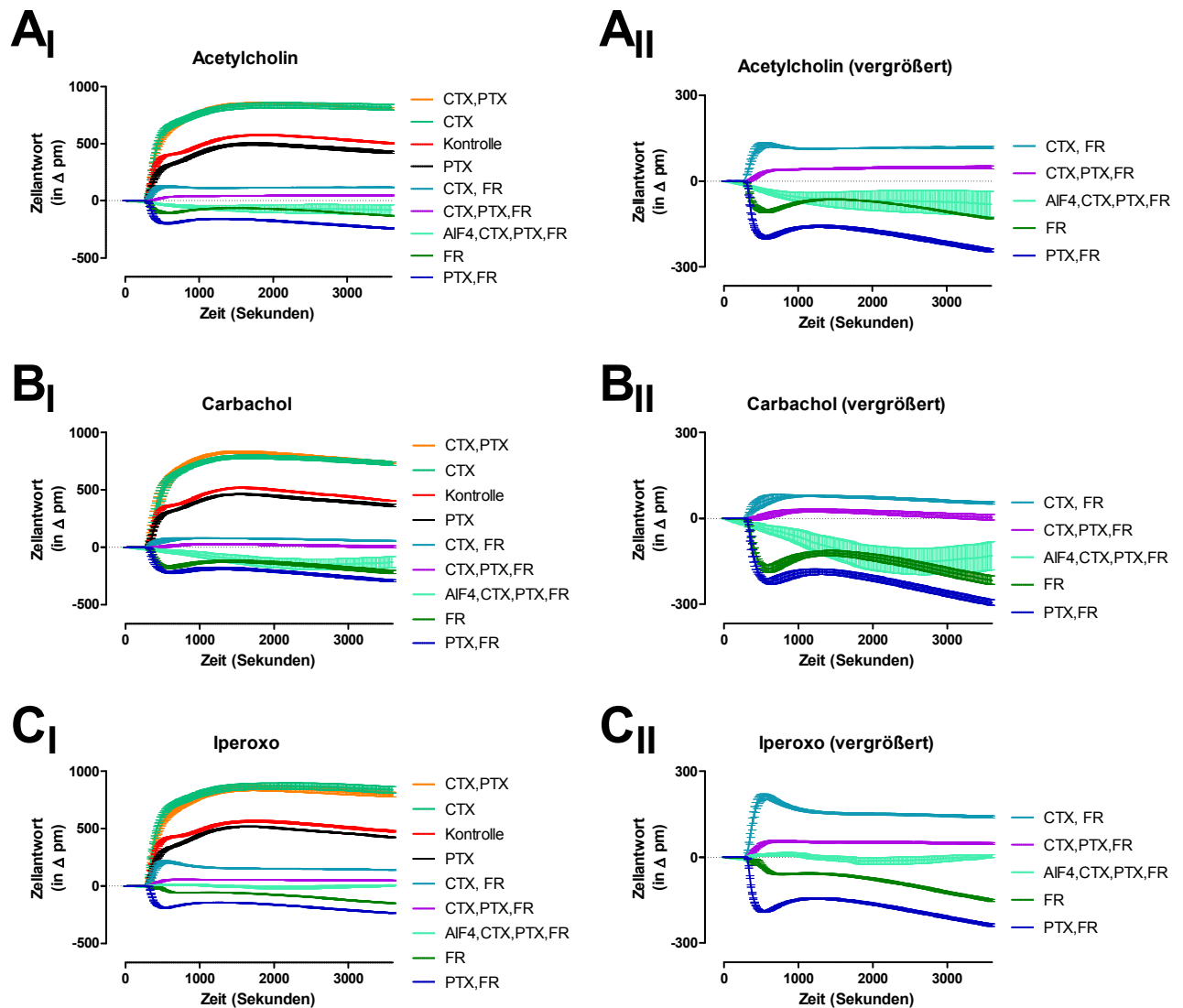


Abbildung 65: Effekte der Toxine auf die Aktivierung des M1-Rezeptors durch die drei Orthostere.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. einer repräsentativen, basislinien-korrigierten Originalsignatur in Vierfachbestimmung. Ordinate: Wellenlängenverschiebung in Picometern. Abszisse: Zeit in Sekunden.

(**A_I**, **B_I**, **C_I**) Effekte aller Toxine auf die Signalwegsaktivierung durch 100 μ M Acetylcholin (**A_I**), 1 mM Carbachol (**B_I**) bzw. 10 μ M Iperoxo (**C_I**). (**A_{II}**, **B_{II}**, **C_{II}**) Vergrößerte Darstellung der Daten aus (**A_I**, **B_I**, **C_I**).

In Abbildung 65 sind die Effekte aller Toxine und Toxin-Kombinationen im Vergleich für jede der drei Testsubstanzen dargestellt. Acetylcholin, Iperoxo und Carbachol unterscheiden sich kaum voneinander und die Tendenzen der Toxin-Effekte sind für alle drei Testsubstanzen gleich, weswegen hier nur eine allgemeine Zusammenfassung für Acetylcholin, Iperoxo und Carbachol zusammen dargestellt wird. Die Toxin-Effekte werden im Folgenden nach absteigender Intensität geordnet, dargestellt.

CTX, PTX bzw. CTX: Durch eine Maskierung G_s -vermittelter Effekte wurden die gleichen Kurvenverläufe detektiert wie unter einer simultanen Maskierung von G_s Proteinen und einer Inhibition von $G_{i/o}$ Proteinen. Die gemessenen Signale zeigten Wellenlängenverschiebungen in den positiven Bereich von sehr hoher Intensität. In diesem Signal spiegelte sich vermutlich ausschließlich die Aktivierung von $G_{q/11}$ Proteinen wider. $G_{i/o}$ Proteine scheinen, in Einklang mit den vorher generierten Daten, im Fall von aktiven $G_{q/11}$ Proteinen keine Rolle in der Signaltransduktion des M1-Rezeptors zu spielen, weswegen sich die CTX und PTX-Kurve nicht von der alleinigen CTX-Behandlung unterscheidet.

Kontrolle bzw. PTX: Die Intensität des Mess-Signals nahm unter Kontrollbedingungen im Vergleich zu den Daten unter CTX und PTX- beziehungsweise CTX-Vorbehandlung signifikant ab. Hier wurde das Mess-Signal vermutlich durch Effekte der G_s Protein-Aktivierung gemindert. Die Daten der PTX-vorbehandelten Zellen lagen marginal unterhalb der Kontrollkurve. Ein Grund für den etwas geringeren Effekt unter $G_{i/o}$ Protein-Ausschaltung könnte sein, dass vermehrt G_s Proteine aktiviert wurden nachdem $G_{i/o}$ Proteine ausgeschaltet worden sind. Der G_s -vermittelte Effekt in den negativen Wellenlängenbereich minderte dadurch die positive Wellenlängenverschiebung unter Kontrollbedingungen.

CTX,FR: Wurden G_s und $G_{q/11}$ Proteine simultan maskiert beziehungsweise inhibiert, zeigte sich ein sehr geringes Mess-Signal, welches aufgrund des Kurvenverlaufes auf eine Aktivierung von $G_{i/o}$ Proteinen hindeutete. Diese wurden nur zu einem sehr geringen Ausmaß von M1-Rezeptoren rekrutiert und zur Signaltransduktion genutzt.

CTX,PTX,FR: Wurden zudem auch noch $G_{i/o}$ Proteine inhibiert, zeigte sich ein noch geringeres Signal, welches jedoch signifikant verschieden von dem Basalwert war. Ob es sich bei diesem Rest-Signal, um ein G Protein-vermitteltes Signal oder um ein Signal, welches durch andere Effektor-Proteine vermittelt wurde, handelte, sollte mit Hilfe des Pan-G Protein-Aktivators Aluminiumfluorid (AlF_4) getestet werden.

AlF_4 ,CTX,PTX,FR: Die Kombination aus allen drei Toxinen, welche die drei G Proteine G_s , $G_{i/o}$ und $G_{q/11}$ ausschalten sollten, zusammen mit AlF_4 sollte zeigen, ob $G_{12/13}$ Proteine an der Zellantwort der CHO-M1 Zellen beteiligt waren. Es konnte kein signifikanter Unterschied

zwischen Basalwert und Messwert detektiert werden, folglich beruhte das Signal, welches unter Verwendung von CTX, PTX und FR detektiert wurde, auf einem G Protein-vermittelten Effekt. Da G_s , $G_{i/o}$ und $G_{q/11}$ Proteine zuvor maskiert beziehungsweise inhibiert wurden, ist das zuvor gemessene Restsignal unter Verwendung von CTX, PTX und FR durch eine Aktivierung von $G_{12/13}$ Proteinen vermittelt.

FR: Wurden ausschließlich $G_{q/11}$ Proteine inhibiert, kam es zu Wellenlängenverschiebungen in den negativen Bereich. Die detektierten Kurvenverläufe deuteten darauf hin, dass hier hauptsächlich G_s Proteine aktiviert wurden. Die Intensität der Mess-Signale war sehr gering.

PTX,FR: Wurden neben $G_{q/11}$ Proteinen auch noch $G_{i/o}$ Proteine inhibiert, zeigten sich ebenfalls Wellenlängenverschiebungen in den negativen Bereich. Die Intensität des Mess-Signals war deutlich höher als unter alleiniger FR-Behandlung. Demzufolge konnte unter alleiniger FR-Behandlung neben dem G_s -vermittelten Effekt auch noch ein Effekt durch Aktivierung von $G_{i/o}$ Proteinen detektiert werden. Eine Aktivierung von G_i Proteinen führt im Gegensatz zu einer Aktivierung von G_s Proteinen zu Wellenlängenverschiebungen in den positiven Bereich. Das Mess-Signal unter PTX- und FR-Behandlung führte demnach zu stärkeren Wellenlängen-Verschiebungen in den negativen Bereich als unter reiner FR-Behandlung, weil hier der mindernde Effekt der $G_{i/o}$ Proteine weggefallen war.

4.8 Messung der ERK 1/2 Phosphorylierung

ERK-Assays stellen eine ideale Methode dar, um eine Aktivierung von G Proteinen auf tieferegreifender Ebene darzustellen. Ein Vorteil liegt darin, dass der Endpunkt unabhängig von der aktivierten $G\alpha$ -Untereinheit ist.

4.8.1 Ermittlung der Zellzahl

Zur Vorbereitung auf kinetische Experimente und die Erstellung von Dosis-Wirkungskurven wurde zunächst die Zellzahl adjustiert. Diese sollte so gewählt werden, dass sich 24 Stunden nach der Aussaat ein dichter Zellrasen in den einzelnen Kavitäten der Versuchsplatte gebildet hatte und in den Versuchen ein ausreichend großes Messfenster resultierte.

4 Ergebnisse

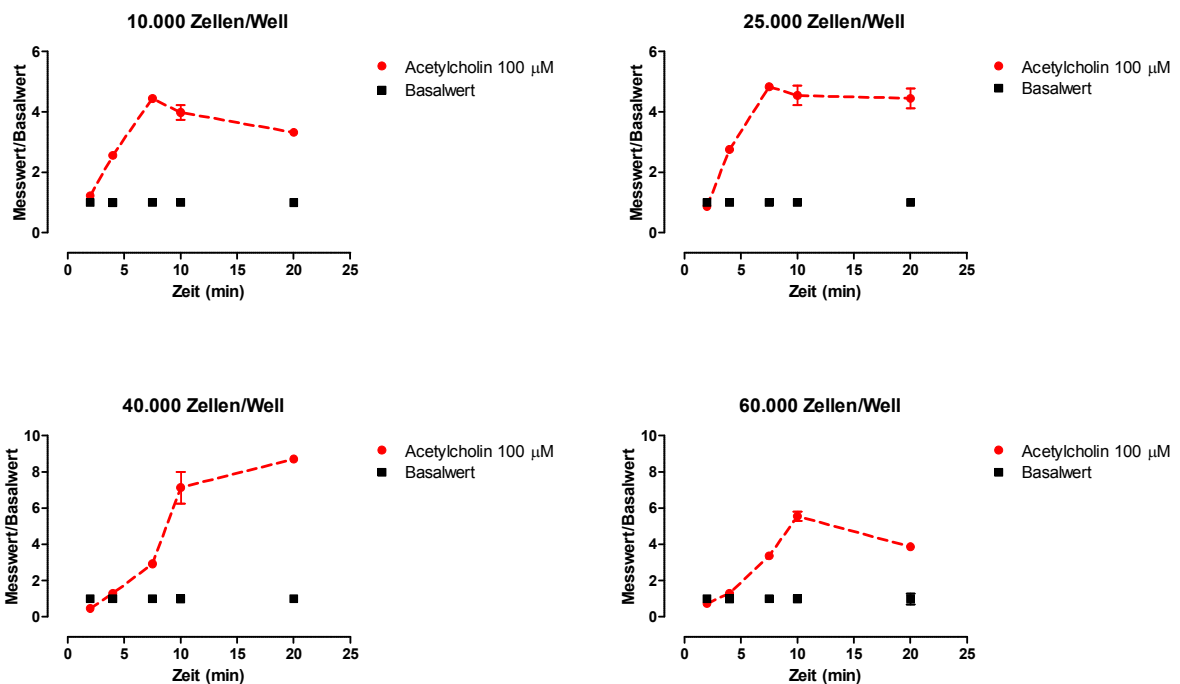


Abbildung 66: Optimierung der Zellzahl für phospho-ERK-Assays.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. eines Einzelversuches in Dreifachbestimmung. Ordinate: Verhältnis zwischen Messwert und Basalwert. Abszisse: Inkubationszeit des Agonisten Acetylcholin in Minuten. Die vier Graphen zeigen die Messdaten für vier unterschiedliche Zellzahlen pro Well: 10.000, 25.000, 40.000 und 60.000.

Die weiteren Versuche erfolgten mit einer Zellzahl von 25.000 Zellen/Well, weil sich bei dieser Zellzahl innerhalb von 24 Stunden ein dichter Zellrasen in den Kavitäten der Versuchsplatte ausgebildet hatte und zudem ein ausreichend großes Messfenster zwischen Messwert und Basalwert detektiert werden konnte.

4.8.2 Kinetische Experimente

Zunächst wurde ein kinetisches Profil der ERK 1/2 Phosphorylierung anhand des endogenen Liganden Acetylcholin unter Kontrollbedingungen erstellt, um für spätere Versuche ein Inkubationsfenster festlegen zu können.

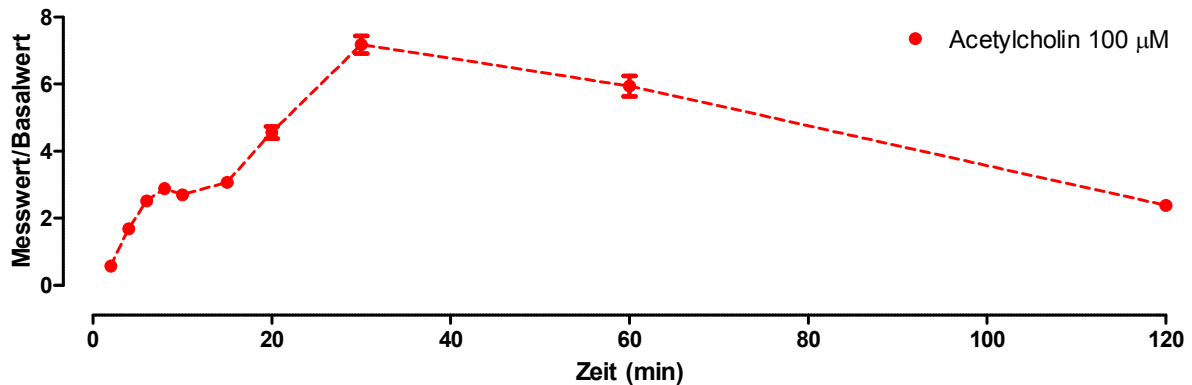


Abbildung 67: Das kinetische Profil der ERK-Phosphorylierung zeigte im Fall des endogenen Liganden Acetylcholin „Peaks“ zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus drei Einzelversuchen in Dreifachbestimmung. Ordinate: Verhältnis zwischen Messwert und Basalwert. Abszisse: Inkubationszeit des Agonisten Acetylcholin in Minuten.

Das kinetische Profil der ERK-Phosphorylierung zeigte im Fall von Acetylcholin zwei „Peaks“. Der erste Peak trat bereits nach acht Minuten auf und war transient und recht schwach ausgeprägt. Ein zweiter, dominanterer „Peak“ trat nach 30 Minuten auf und war länger andauernd. Nach 120 Minuten war das Phosphorylierungs-Level immer noch nicht auf den Basalwert zurückgefallen.

4.8.2.1 An der ERK-Phosphorylierung waren unterschiedliche G Proteine beteiligt

Im Folgenden sollte genauer beleuchtet werden, welche G Proteine an der ERK-Phosphorylierung durch Acetylcholin beteiligt waren. Dafür wurden analog zu den anderen funktionellen Assays die G Protein-Inhibitoren PTX und FR beziehungsweise CTX als permanenter G_s Protein-Aktivator eingesetzt.

4 Ergebnisse

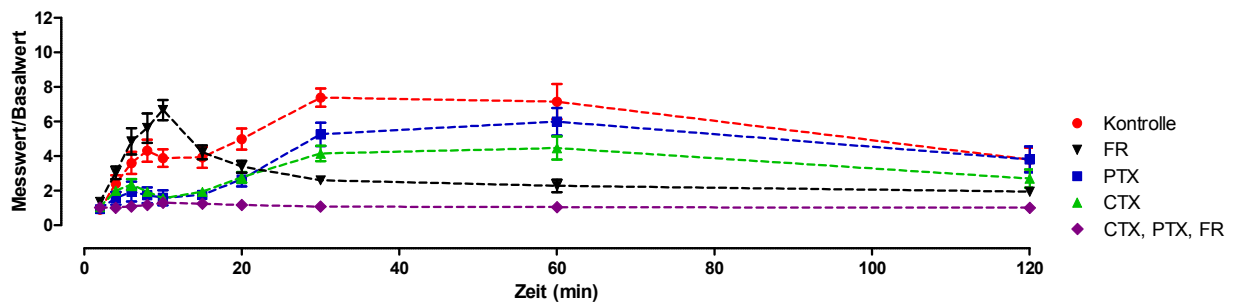


Abbildung 68: G Proteine unterschiedlicher Familien waren an der ERK-Phosphorylierung des M1-Rezeptors beteiligt.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus drei bis fünf Einzelversuchen in Dreifachbestimmung. Ordinate: Verhältnis zwischen Messwert und Basalwert. Abszisse: Inkubationszeit des Agonisten Acetylcholin in Minuten.

Durch die Blockierung einzelner G Proteine in ERK-Assays zeigte sich, welche G Proteine an welchem Mess-Signal in der Kinetik beteiligt waren. Der $G_{q/11}$ -Inhibitor FR (schwarze Linie) deckte auf, dass $G_{q/11}$ Proteine vor allem in den zweiten, dominanteren „Peak“ involviert waren. Wurden $G_{q/11}$ Proteine blockiert, reduzierte sich der Phosphorylierungsgrad nach 30 Minuten nahezu auf das Level des Basalwertes (schwarze Linie). Im Gegensatz dazu verstärkte sich der erste „Peak“ um etwa ein Drittel und trat zwei Minuten verzögert auf. $G_{i/o}$ und G_s Proteine scheinen vor allem für den ersten Phosphorylierungs-„Peak“ eine große Rolle zu spielen, da der Einsatz von PTX oder CTX zu einer signifikanten Reduzierung des ersten „Peaks“ führte, wohingegen der zweite „Peak“ nur schwach reduziert wurde (blaue und grüne Linie). Bereits im Kapitel über $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Versuche (Kapitel 4.6.1) wurde erläutert, dass die Signaltransduktion vom Rezeptor auf $G_{i/o}$ Proteine deutlich schneller abläuft, als bei $G_{q/11}$ Proteinen (Milligan, 2003). Diese Tatsache spiegelte sich vermutlich auch in phospho-ERK-Assays wider, bei denen $G_{i/o}$ Protein-vermittelt ein „Peak“ nach acht Minuten zu detektieren war und $G_{q/11}$ -vermittelt erst zu späteren Zeitpunkten. Wurden die drei Toxine CTX, PTX und FR kombiniert angewendet, ergaben sich Messwerte, die sich nicht signifikant vom Basalwert unterschieden haben (violette Linie). Demzufolge scheint die ERK-Phosphorylierung ausschließlich durch diese drei G Proteine bedingt zu sein. Ob auch β -Arrestine oder $G_{12/13}$ Proteine an der ERK-Phosphorylierung durch M1-Rezeptor-Aktivierung beteiligt sind, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden. Allerdings zeigten die Ergebnisse, dass es zumindest nicht zu einer G Protein-unabhängigen ERK-Phosphorylierung durch M1-Rezeptor-Aktivierung kam und $G_{12/13}$ Proteine allenfalls simultan mit anderen G Proteinen eine Phosphorylierung auslösen können.

4.8.2.2 Iperoxo zeigte eine ERK-Phosphorylierungskinetik, die sich nicht von Acetylcholin unterschieden hat.

Des Weiteren sollte getestet werden, ob auch andere Liganden des M1-Rezeptors vergleichbare Ergebnisse liefern wie Acetylcholin.

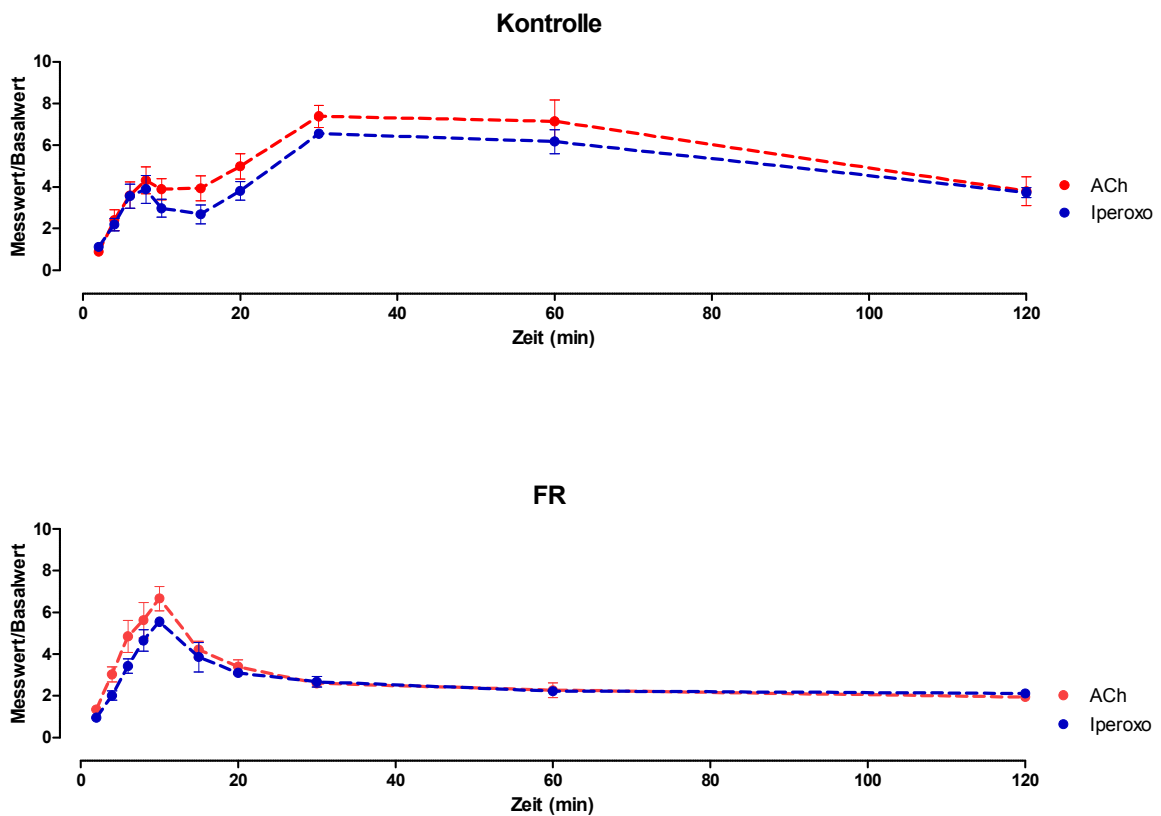


Abbildung 69: Iperoxo unterschied sich in seinem kinetischen Profil der ERK-Phosphorylierung nicht signifikant von Acetylcholin.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus fünf bis sechs Einzelversuchen in Dreifachbestimmung unter Kontrollbedingungen (obere Abbildung) und unter Einsatz des $G_{q/11}$ Protein-Inhibitors FR (untere Abbildung). Ordinate: Verhältnis zwischen Messwert und Basalwert. Abszisse: Inkubationszeit der Testsubstanzen in Minuten.

Die Ergebnisse der kinetischen Untersuchungen des ERK-Phosphorylierungsprofils ergaben, dass sich Iperoxo als exogener Ligand an muskarinischen M1-Rezeptoren nicht signifikant von Acetylcholin unterschieden hat. Sowohl unter Kontrollbedingungen, als auch unter Einsatz des $G_{q/11}$ Protein-Inhibitors FR ergaben sich zu keiner Zeit signifikante Unterschiede zwischen Iperoxo und Acetylcholin.

4.8.3 Dosis-Wirkungskurven ermöglichten einen genaueren Einblick in die Rolle der unterschiedlichen G Proteine

Um die Unterschiede in den Phosphorylierungsgraden genauer zu beleuchten, wurden Dosis-Wirkungskurven zu einem Zeitpunkt von 30 Minuten erstellt. Das bedeutet, dass der Agonist insgesamt 30 Minuten mit den Zellen inkubiert worden ist, bevor die Zellen lysiert wurden.

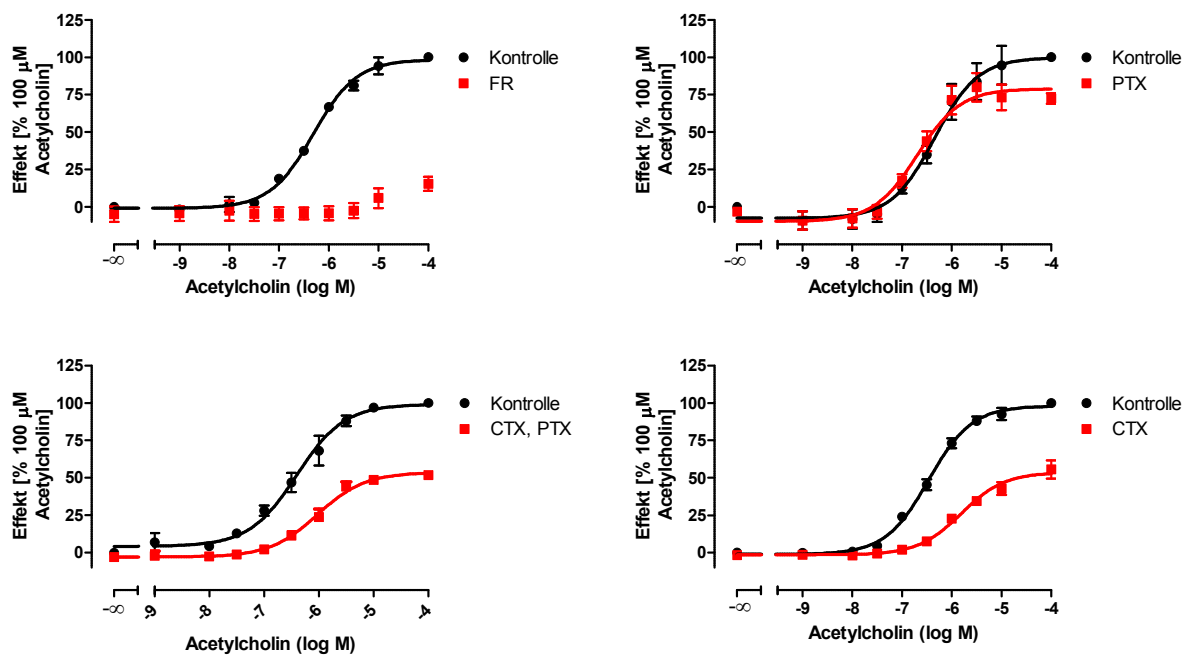


Abbildung 70: Primär waren $G_{q/11}$ Proteine an der ERK-Phosphorylierung nach 30 Minuten beteiligt, aber auch $G_{i/o}$ und G_s Proteine waren in die Zellantwort involviert.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus drei Einzelversuchen in Dreifachbestimmung. Ordinate: Zellantwort in Prozent. 100 % entspricht dem Effekt, der durch 100 μ M des Referenzagonisten Acetylcholin ausgelöst wurde. 0 % entspricht dem Basalwert. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanzen. Legende: G Protein-Inhibitoren, die zur Generierung der jeweiligen Kurven eingesetzt worden sind.

4 Ergebnisse

Bedingungen	n	n_H	E_{max}	pEC_{50}
Kontrolle	3	$0,91 \pm 0,08^{n.s.}$	$99,8 \pm 4,9^{NS}$	$6,34 \pm 0,11$
FR	3	-	$15,7 \pm 4,8^{+++}$	-
PTX	3	$1,48 \pm 0,37^{n.s.}$	$79,0 \pm 3,9^{++}$	$6,69 \pm 0,12^{N.S.}$
CTX, PTX	3	$1,14 \pm 0,17^{n.s.}$	$53,6 \pm 2,9^{+++}$	$6,03 \pm 0,07^{N.S.}$
CTX	3	$0,82 \pm 0,12^{n.s.}$	$53,7 \pm 2,1^{+++}$	$5,81 \pm 0,07^{\#}$

Tabelle 38: Kenngrößen \pm S.E.M. der Konzentrations-Effekt Kurven aus Abbildung 70.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus drei Einzelversuchen in Dreifachbestimmung. n: Anzahl der Experimente. n_H : Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit. E_{max} : maximale Zellantwort in Prozent, bezogen auf den Effekt, der durch 100 μ M des Referenzagonisten Acetylcholin unter Kontrollbedingungen ausgelöst wurde. pEC_{50} : Negativer dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz, welche eine halbmaximale Zellantwort hervorruft. ^{n.s.}: Nicht signifikanter Unterschied zu einem Hill-Koeffizienten $n_H=1$ (F-Test, $p>0,05$). ^{NS}: Nicht signifikanter Unterschied zu dem Effekt, der durch 100 μ M des Referenzagonisten Acetylcholin ausgelöst wurde (t-Test, $p>0,05$). ^{+,++,+++}: Signifikanter Unterschied zu dem Effekt, der durch 100 μ M des Referenzagonisten Acetylcholin ausgelöst wurde (t-Test, $p<0,01$, 0,001). ^{N.S.}: Nicht signifikanter Unterschied zu dem pEC_{50} -Wert von Acetylcholin. [#]: Signifikanter Unterschied zu dem pEC_{50} -Wert von Acetylcholin (t-Test, $p<0,05$).

Die Dosis-Wirkungskurven zeigen, dass vor allem $G_{q/11}$ Proteine an dem Signal der ERK-Phosphorylierung nach 30 Minuten beteiligt waren, da der $G_{q/11}$ -Inhibitor FR die Zellantwort bis zu einer Konzentration von 10 μ M Acetylcholin komplett hemmen konnte. Erst ab Konzentrationen von 100 μ M vermochte FR das Signal nur noch unzureichend zu hemmen und es ergaben sich Effekte, die sich signifikant vom Basalwert unterschieden haben. $G_{i/o}$ und G_s Proteine waren ebenfalls in das Signal nach 30 Minuten involviert, da sich durch den $G_{i/o}$ -Inhibitor PTX und den G_s Protein-Aktivator CTX ein maximaler Effekt eingestellt hat, der sich signifikant von den Effekten unter Kontrollbedingungen unterschieden hat. Im Fall von CTX war der Unterschied sogar noch gravierender. Unter Verwendung von PTX oder der Kombination von PTX und CTX ergaben sich Wirksamkeiten, die sich nicht signifikant von der Wirksamkeit unter Kontrollbedingungen unterschieden haben. Eine reine G_s Protein-Maskierung führte zu minimalen, jedoch signifikanten Unterschieden in der Wirksamkeit von Acetylcholin für ERK-Phosphorylierungen im Vergleich zu den Daten unter Kontrollbedingungen. Diesem geringen Unterschied wird jedoch keine biologische Bedeutung beigemessen.

4.8.4 Dualsterische Liganden führten ebenfalls zu einer ERK-Phosphorylierung

Bei der Untersuchung des Einflusses der dualsterischen Hybridsubstanzen auf die ERK-Phosphorylierung zeigte sich, dass auch diese in der Lage sind eine ERK-Phosphorylierung zu induzieren. Im Folgenden wurde der Effekt der Hybridliganden unter Kontrollbedingungen und unter Ausschaltung der $G_{q/11}$ Proteine auf den Phosphorylierungsgrad nach 30 Minuten untersucht.

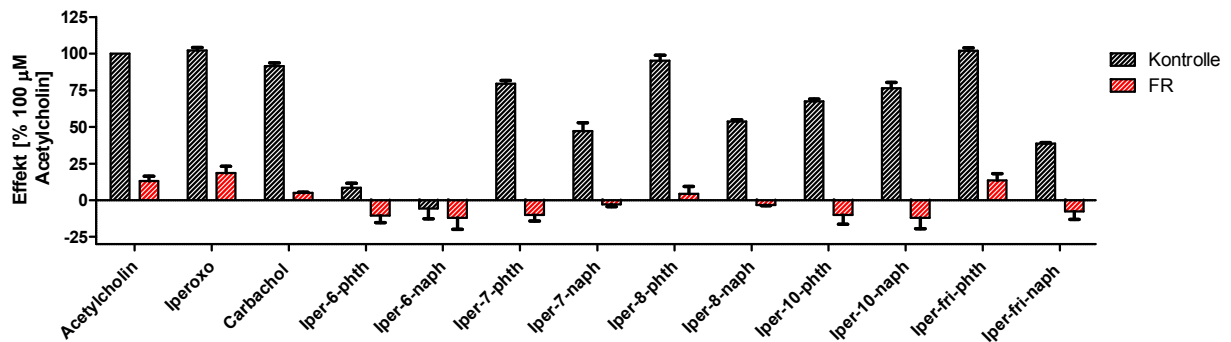


Abbildung 71: Dualsterische Hybridliganden zeigten unterschiedliche Effekte auf den Phosphorylierungsgrad.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus drei bis fünf Einzelversuchen in Dreifachbestimmung unter Kontrollbedingungen und unter Ausschaltung von $G_{q/11}$ Proteinen. Ordinate: Zellantwort in Prozent. 100 % entspricht dem Effekt, der durch 100 μ M des Referenzagonisten Acetylcholin unter Kontrollbedingungen ausgelöst wurde. 0 % entspricht dem Basalwert unter Kontrollbedingungen.

4 Ergebnisse

Testsubstanz	n	Effekt (Kontrolle)	Effekt (FR)
Acetylcholin	5	100,0 ± 0,0	13,0 ± 3,4 ^{###}
Iperoxo	3	102,0 ± 2,1 ^{NS}	18,6 ± 4,6 [#]
Carbachol	3	91,5 ± 2,2 ⁺⁺	5,1 ± 0,4 ^{###}
Iper-6-phth	5	8,5 ± 3,0 ⁺⁺⁺	-10,6 ± 4,7 ^{N.S.}
Iper-6-naph	3	-5,7 ± 6,9 ⁺⁺⁺	-12,0 ± 7,9 ^{N.S.}
Iper-7-phth	4	79,5 ± 2,2 ⁺⁺⁺	-10,2 ± 4,0 [#]
Iper-7-naph	4	47,0 ± 5,7 ⁺⁺⁺	-2,8 ± 1,6 ^{N.S.}
Iper-8-phth	4	95,1 ± 3,8 ^{NS}	4,3 ± 5,2 ^{N.S.}
Iper-8-naph	3	53,7 ± 1,1 ⁺⁺⁺	-3,3 ± 0,5 ^{##}
Iper-10-phth	3	67,4 ± 1,5 ⁺⁺⁺	-10,1 ± 6,2 ^{N.S.}
Iper-10-naph	3	76,3 ± 4,0 ⁺⁺⁺	-12,1 ± 7,3 ^{N.S.}
Iper-fri-phth	5	102,0 ± 2,0 ^{NS}	13,6 ± 4,5 [#]
Iper-fri-naph	4	38,5 ± 0,8 ⁺⁺⁺	-7,5 ± 5,6 ^{N.S.}

Tabelle 39: Effekte der ERK-Phosphorylierung unter Kontrollbedingungen und unter Ausschaltung von G_{q/11} Proteinen.

Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E.M. aus drei bis fünf Einzelversuchen in Dreifachbestimmung. n: Anzahl der Experimente. Effekt: Ausgelöster Effekt in Prozent, bezogen auf den Effekt, der durch 100 µM des Referenzagonisten Acetylcholin unter Kontrollbedingungen ausgelöst wurde. ^{NS}: Nicht signifikanter Unterschied zu dem Effekt, der durch 100 µM des Referenzagonisten Acetylcholin ausgelöst wurde. ^{++,+++}: Signifikanter Unterschied zu dem Effekt, der durch 100 µM des Referenzagonisten Acetylcholin ausgelöst wurde (t-Test, p<0,01, 0,001). ^{N.S.}: Nicht signifikanter Unterschied zu dem Effekt der durch 100 µM des Referenzagonisten Acetylcholin unter Ausschaltung von G_{q/11} Proteinen ausgelöst wurde. ^{###,####}: Signifikanter Unterschied zu dem Effekt, der durch 100 µM des Referenzagonisten Acetylcholin unter Ausschaltung von G_{q/11} Proteinen ausgelöst wurde (t-Test, p<0,05, 0,01, 0,001).

Die beiden orthosterischen Agonisten Acetylcholin und Iperoxo zeigten vollagonistisches Verhalten für ERK-Phosphorylierungsreaktionen. Carbachol hat in den „second messenger assays“, in denen der intrazelluläre Anstieg an IP1 und cAMP quantifiziert worden ist, ebenfalls vollagonistisches Verhalten gezeigt. Für ERK-Phosphorylierungen ist Carbachol allerdings nur ein starker Partialagonist mit einer intrinsischen Aktivität von 91,5 ± 2,2 %. Die

gemessenen Effekte für die Hybridliganden variierten in ihrem maximalen Effekt stark untereinander. Iper-8-phth und Iper-fri-phth fungierten als Vollagonisten in diesem Assay, alle anderen dualsterischen Hybride, die im Rahmen dieser Arbeit getestet worden sind, waren Partialagonisten für ERK-Phosphorylierungen. Iper-6-phth konnte in den vorangegangenen Assays als $G_{q/11}$ -selektiver Partialagonist klassifiziert werden, im ERK-Assay zeigte Iper-6-phth schwach partialagonistisches Verhalten. Die Befunde für Iper-6-naph stehen in Einklang mit den Ergebnissen aus „second messenger“- , $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ - und DMR-Assays. Iper-6-naph konnte zwar an den M1-Rezeptor binden, wie in $[^3\text{H}]\text{NMS}$ - Bindungsstudien gezeigt werden konnte, löste jedoch in keinem der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten funktionellen Experimente eine intrinsische Aktivität am M1-Rezeptor aus und konnte somit als Antagonist an M1-Rezeptoren klassifiziert werden. In vorangegangenen Dissertationen an muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren konnte gezeigt werden, dass Iper-6-naph $G_{i/o}$ und G_s Proteine an M2- (Bock et al., 2012) und M4-Rezeptoren (Dissertation Janßen, 2011) und $G_{q/11}$ und G_s Proteine an M3-Rezeptoren aktivieren kann (Dissertation Vogel, 2015). Da für Iper-6-naph keine Daten an M5-Rezeptoren vorliegen, lässt sich keine endgültige Aussage treffen, jedoch deuten die bisher erhobenen Befunde an den anderen muskarinischen Subtypen daraufhin, dass Iper-6-naph ein selektiver Antagonist an M1-Rezeptoren ist. In Einklang mit den Daten aus zuvor beschriebenen funktionellen Versuchen, wiesen die Hybride mit dem kleineren allosterischen Substituenten Phthalimid auch in phospho-ERK-Assays höhere intrinsische Aktivitäten auf, als ihre korrespondierenden Hybridliganden mit einem größeren allosterischen Substituenten. Die „phth-Hybride“ zeigten einen höheren Grad an Phosphorylierungsreaktionen, als die dualsterischen Liganden mit dem voluminöseren allosterischen Rest Naphthalimid. Die einzigen Ausnahmen bildeten hier die Hybride mit einer Alkyl-Kette von zehn Kohlenstoffatomen. Iper-10-naph zeigte einen signifikant höheren Effekt, als der korrespondierende Ligand Iper-10-phth.

Vergleicht man die Ergebnisse für die Effekte der ERK-Phosphorylierung unter Ausschaltung von $G_{q/11}$ Proteinen wird ersichtlich, dass vor allem die Vollagonisten dieses Assays Acetylcholin, Iperoxo und Iper-fri-phth trotz einer vollständigen $G_{q/11}$ Protein-Ausschaltung maximale Effekte der ERK-Phosphorylierung zeigten, die signifikant höher waren als der Basalwert. Dieser Befund steht in Einklang mit den in Kapitel 4.8.3 beschriebenen Daten für Acetylcholin. In hohen Konzentrationen eines potenten Agonisten konnten ERK-Phosphorylierungsreaktionen zu einem Zeitpunkt von 30 Minuten nicht vollständig durch den $G_{q/11}$ -Inhibitor FR verhindert werden. In hohen Konzentrationen wurden demzufolge neben $G_{q/11}$ Proteinen weitere G Proteine rekrutiert und die jeweiligen Signalkaskaden ausgelöst. Die verbleibende Zellantwort nach $G_{q/11}$ Protein-Ausschaltung war dementsprechend durch G Proteine anderer Familien bedingt. Die detektierte Zellantwort unter FR-Zugabe nach

4 Ergebnisse

erfolgter Rezeptor-Aktivierung durch Iper-7-phth und Iper-8-naph lag signifikant unterhalb des Basalwertes. Eine mögliche Erklärung dafür wäre eine Spontanaktivität der Rezeptoren, jedoch müsste diese sich auch bei anderen Hybriden widerspiegeln, da die Testsubstanzen simultan untersucht worden sind. Aufgrund der recht geringen Abweichung vom Basalwert liegt hier vermutlich nur ein Artefakt vor, welches nicht genauer erklärt werden kann, dem jedoch keine biologische Bedeutung beigemessen wird.

5 Diskussion

5.1 Promiskuitive G Protein-Aktivierung und „Cross-talk“

5.1.1 Agonisten führten zu einer promiskuitiven G Protein-Aktivierung am M1-Rezeptor

Rezeptoren, die in rekombinanten Zell-Linien überexprimiert werden, zeigen häufig das Phänomen einer promiskuitiven G Protein-Aktivierung (Haga et al., 1989; Kenakin 1995a; Burford et al., 1995; Akam et al., 2001; Thomas et al., 2008). Ob auch endogen exprimierte M1-Rezeptoren promiskuitiv G Proteine verschiedener G Protein-Familien aktivieren können, und dieses Phänomen damit eine physiologische Relevanz aufweist, konnte bisher noch nicht gezeigt werden. Die Daten beschränken sich derzeit auf die Promiskuität, der in rekombinanten Zellsystemen exogen exprimierten M1-Rezeptoren (Akam et al., 2001; Thomas et al., 2008). Der muskarinische M1-Rezeptor, welcher im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, koppelt bevorzugt an G Proteine des $G_{q/11}$ -Typs (Caulfield and Birdsall, 1998). Allerdings konnte in vorherigen Studien (z.B. Akam et al., 2001; Thomas et al., 2008) gezeigt werden, dass infolge einer Aktivierung des M1-Rezeptors auch G Proteine der $G_{i/o}$ - und G_s - Familie rekrutiert werden können und eine entsprechende Signalkaskade daraufhin eingeleitet werden kann.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Aktivierung von $G_{q/11}$, G_s und $G_{i/o}$ Proteinen infolge einer Rezeptor-Aktivierung quantitativ bestimmt. Durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren für das jeweilige G Protein wurde die Beteiligung des entsprechenden Signalwegs an der Zellantwort verifiziert.

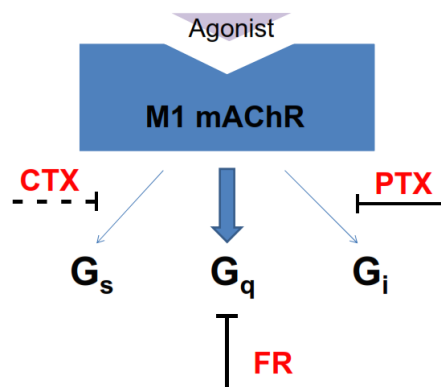


Abbildung 72: Schaubild über das Signaltransduktions-Repertoire des M1-Rezeptors und die Wirkungen der eingesetzten Toxine.

IP1-Assays dienen der Bestimmung des $G_{q/11}$ -vermittelten Signalweges. IP1 ist ein Abbauprodukt des Inositoltriphosphates (IP3), welches durch die Phospholipase C β aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat entsteht. Durch die Zugabe von Li^+ -Ionen zum Inkubationspuffer bleibt die Konzentration an IP1 stabil und kann quantitativ vermessen werden. In der Folge lassen sich schließlich Rückschlüsse auf die $G_{q/11}$ Protein-Aktivierung ziehen. FR ist ein spezifischer Inhibitor von $G_{q/11}$ Proteinen. Abbildung 15 (Kapitel 4.4.1.3) zeigt, dass der endogene Ligand Acetylcholin eine Zellantwort in $G_{q/11}$ -abhängigen Signalwegen hervorgerufen hat, welche durch den spezifischen $G_{q/11}$ -Inhibitor FR vollständig blockiert werden konnte. Diese Beobachtung zeigt, dass die Generierung des IP1's auf einer Rekrutierung von $G_{q/11}$ Proteinen basiert und in der Folge eine $G_{q/11}$ -abhängige Signalkaskade eingeleitet wurde.

In cAMP-Assays wurde eine Aktivierung von G_s Proteinen gemessen. Infolge einer G_s Protein-Aktivierung kommt es zu einer Stimulation von Adenylylzyklasen, welche daraufhin die Synthese von intrazellulärem cAMP bewirken. Acetylcholin konnte in CHO-M1 Zellen eine Akkumulation von cAMP vermitteln, welche durch den G_s Protein-Aktivator Cholera Toxin (CTX) vollständig maskiert werden konnte (Kapitel 4.5.1, Abbildung 23). Für G_s Proteine stehen derzeit noch keine spezifischen Inhibitoren zur Verfügung, weswegen hier der permanente Aktivator CTX eingesetzt wurde, um G_s Proteine maximal zu stimulieren, um dadurch eine darüberhinausgehende Agonist-vermittelte Aktivierung dieser G Proteine zu verhindern. Cholera Toxin gilt als starker und permanenter Aktivator von G_s Proteinen. Es katalysiert eine ADP-Ribosylierung an der α -Untereinheit von G_s Proteinen, wodurch die GTPase Aktivität der G_s Proteine aufgehoben wird und das G_s Protein durch die irreversible Kopplung an GTP in der aktivierten Form verbleibt. Demzufolge kommt es bei CTX-behandelten Zellen zu keiner weiteren Agonist-vermittelten Aktivierung der Adenylylzyklasen und damit zu einer Maskierung des Rezeptor-vermittelten Effektes auf G_s Proteine.

Der $G_{i/o}$ -vermittelte Signalweg wurde mithilfe von [^{35}S]GTP γ S-Bindungsversuchen untersucht. Mithilfe des spezifischen $G_{i/o}$ -Inhibitors Pertussis Toxin (PTX) konnte sowohl die basale, als auch die Agonist-vermittelte Bindung an [^{35}S]GTP γ S signifikant reduziert werden, was ein starkes Indiz für eine Beteiligung der $G_{i/o}$ Proteine an dieser Zellantwort darstellt. Jedoch konnte trotz des $G_{i/o}$ Protein-Inhibitors ein konzentrations-abhängiger Effekt von Acetylcholin auf die [^{35}S]GTP γ S-Bindung in Form einer Dosis-Wirkungskurve detektiert werden (Kapitel 4.6.2, Abbildung 40). Folglich scheinen neben $G_{i/o}$ Proteinen noch weitere G Proteine an dem gemessenen Signal beteiligt zu sein. Vermutlich handelt es sich hierbei um G Proteine der Familie $G_{q/11}$, da diese vorwiegend infolge einer M1-Rezeptor-Aktivierung rekrutiert werden.

Des Weiteren sollte eine mögliche Beteiligung von $G_{12/13}$ Proteinen an der Signalkaskade des M1-Rezeptors untersucht werden. Für diese Familie der G Proteine ist derzeit noch kein sekundärer Botenstoff bekannt, deswegen konnte die Messung der $G_{12/13}$ Protein-Aktivierung nur über ein Ausschlussverfahren in Versuchen, die die Dynamische Massenumverteilung (DMR) infolge einer Rezeptor-Aktivierung messen, geschehen. Zunächst wurde eine Kombination der drei Toxine FR, CTX und PTX angewendet, um zu untersuchen, ob sich nach der Ausschaltung der drei G Protein-Familien $G_{q/11}$, G_s und $G_{i/o}$ noch ein Restsignal in DMR-Versuchen zeigt. Dieses konnte verifiziert werden (Kapitel 4.7.8, Abbildung 62 und 63). Dieses Restsignal kann unter anderem durch die Aktivierung von $G_{12/13}$ Proteinen oder auch durch eine Rekrutierung von β -Arrestinen vermittelt sein. Um dieses Restsignal genauer zu beleuchten, wurde Aluminiumfluorid (AlF₄) als Pan-G Protein-Aktivator in Kombination mit den drei, oben erwähnten, Toxinen eingesetzt. Da $G_{q/11}$, G_s und $G_{i/o}$ Proteine simultan zu der Aktivierung durch AlF₄ blockiert wurden, würde eine Sensitivität gegenüber diesem Pan-G Protein-Aktivator ausschließlich auf G Proteine der $G_{12/13}$ Familie zurückzuführen sein.

Das Restsignal, welches zuvor detektiert werden konnte, zeigte sich AlF₄ gegenüber sensitiv und somit konnte eine Beteiligung von $G_{12/13}$ Proteinen in der Signalkaskade der CHO-M1 Zellen belegt werden (Kapitel 4.7.9, Abbildung 64). Das Signal, welches infolge einer Behandlung der Zellen mit FR, CTX, PTX und AlF₄ gemessen wurde, unterschied sich nicht signifikant von dem Basalwert. Folglich kam es zu keiner G Protein-unabhängigen Aktivierung von Effektor-Proteinen. Es besteht trotzdem die Möglichkeit, dass β -Arrestine an der Zellantwort der CHO-M1 Zellen beteiligt waren, jedoch allenfalls in Abhängigkeit von G Proteinen.

In ERK-Phosphorylierungs-Assays konnte hingegen keine Aktivierung von $G_{12/13}$ Proteinen detektiert werden. Durch den Zusatz der drei G Protein-Toxine CTX, PTX und FR, um G_s Proteine zu maskieren und $G_{i/o}$ und $G_{q/11}$ Proteine zu inhibieren, wurde getestet, ob neben diesen drei G Protein-Klassen noch weitere Effektor-Proteine an der ERK-Phosphorylierung beteiligt waren. Dieses konnte jedoch aufgrund der Messergebnisse ausgeschlossen werden, da sich Messwerte ergaben, die sich nicht signifikant von den Basalwerten unterschieden haben. $G_{12/13}$ Proteine waren folglich nicht an der Zellantwort der CHO-M1 Zellen in ERK-Assays beteiligt und es kam auch zu keiner G Protein-unabhängigen Phosphorylierung von ERK 1/2 (Abbildung 73).

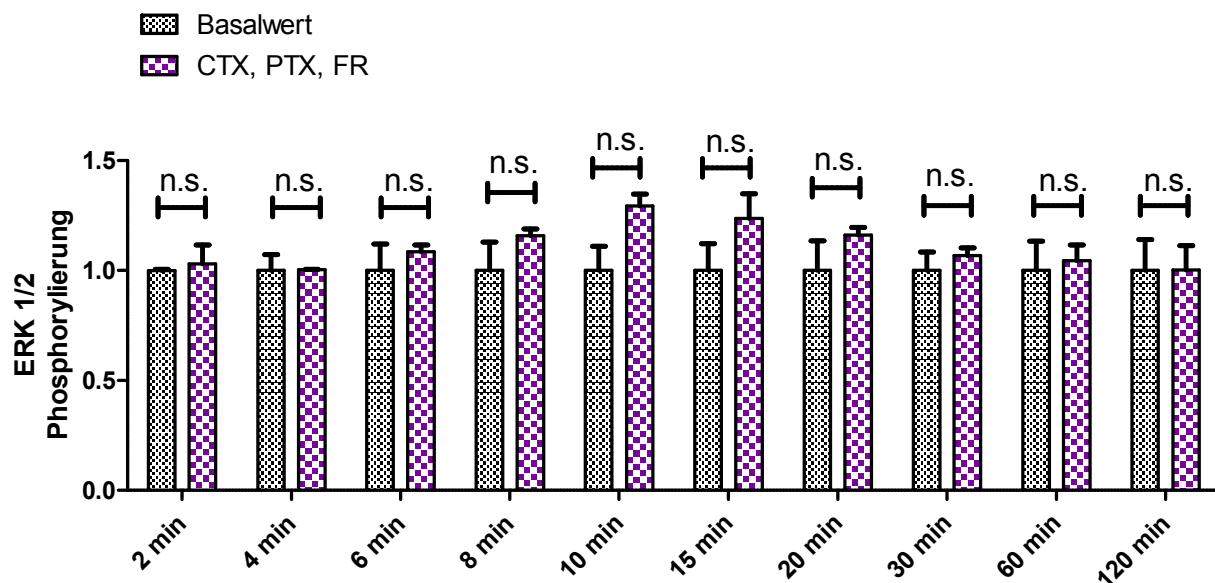


Abbildung 73: Neben G_s , $G_{i/o}$ und $G_{q/11}$ Proteinen waren keine weiteren Effektor-Proteine an der ERK-Phosphorylierung beteiligt.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus vier Einzelversuchen in Dreifachbestimmung. Ordinate: ERK-Phosphorylierung angegeben als Messwert/Basalwert. Abszisse: Inkubationsdauer des Agonisten Acetylcholin in Minuten, bevor die Zellen lysiert wurden. n.s.: Nicht signifikanter Unterschied zwischen Messwert und Basalwert (t-Test, $p > 0,05$).

5.1.2 Die Signalkaskade des M1-Rezeptors zeigte einen „Cross-talk“ zwischen den einzelnen G Proteinen

Neben der unabhängig voneinander ablaufenden Aktivierung der verschiedenen G Proteine besteht des Weiteren die Möglichkeit, dass sich die G Proteine unterschiedlicher Familien gegenseitig beeinflussen können oder auch durch Konvergenz-Punkte in der Signalkaskade andere Signalwege verstärken oder hemmen können. Dieses Phänomen wird als „Cross-talk“ bezeichnet.

Bezogen auf den Subtyp 1 der muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren besteht ein möglicher „Cross-talk“ zwischen der $G_{q/11}$ - und der G_s -Signalkaskade auf der Ebene der Adenylylzyklasen (ACs). Insgesamt wurden bisher neun Membran-gebundene Isoformen der Adenylylzyklasen identifiziert, welche sich in ihrer Gewebeverteilung und in der Art ihrer Regulation stark unterscheiden (z.B. Hanoune et al., 1997; Simonds, 1999; Chern, 2000; Patel et al., 2001). Demzufolge ist die Art der möglichen Interaktion unterschiedlicher Effektor-Proteine abhängig vom untersuchten Gewebe und den darin exprimierten Isoformen der Adenylylzyklasen. In CHO-Zellen, welche im Rahmen dieser Arbeit als Expressions-Modell des muskarinischen M1-Rezeptors dienten, werden Adenylylzyklasen des Subtyps VI

und VII (ACVI und ACVII) exprimiert (Varga et al., 1998). ACVI wird durch Ca^{2+} , welches zum Beispiel infolge einer $G_{q/11}$ Protein-Aktivierung aus intrazellulären Speichern freigesetzt wird, inhibiert (z.B. Hanoune et al., 1997). ACVII ist nicht sensitiv gegenüber eines Ca^{2+} -Einstroms, kann jedoch synergistisch durch $\beta\gamma$ -Untereinheiten und der α -Untereinheit des G_s Proteins aktiviert werden (z.B. Feinstein et al., 1991; Hanoune et al., 1997). Die Konzentration an $\beta\gamma$ -Untereinheiten, die für eine Aktivierung von Adenylylzyklasen des Subtyps VII erforderlich ist, ist weitaus größer, als die benötigte Konzentration an $G\alpha_s$ -Untereinheiten (Tang und Gilman, 1992), demzufolge werden die Adenylylzyklasen nicht durch die $\beta\gamma$ -Untereinheit des G_s Proteins aktiviert, sondern durch die Untereinheit eines G Proteins, welches in einem viel höheren Ausmaß simultan aktiviert wird (Tang und Gilman, 1992). In nativem Gewebe, wie zum Beispiel Hirngewebe handelt es sich hierbei vermutlich um $\beta\gamma$ -Untereinheiten, die von $G_{i/o}$ Proteinen abdissoziiert sind, da diese G Proteine zumindest im Gehirn überwiegend vorkommen (Tang und Gilman, 1992; Iyengar, 1993). In den hier genutzten CHO-Zellen, die den M1-Rezeptor exprimieren, werden vorwiegend $G_{q/11}$ Proteine aktiviert, da der M1-Rezeptor diese G Protein-Familie präferiert. Folglich stellen die $G_{q/11}$ Proteine vermutlich die Quelle für die $\beta\gamma$ -Untereinheiten in CHO-M1 Zellen dar, welche synergistisch mit $G\alpha_s$ -Untereinheiten die Adenylylzyklase vom Subtyp VII aktivieren.

Die in CHO-Zellen exprimierten Adenylylzyklasen konnten durch G Proteine der G_s -Familie aktiviert werden, jedoch konnte die cAMP Akkumulation infolge einer $G_{q/11}$ Protein-Inhibition signifikant reduziert werden (Abbildung 74). Demzufolge spielten $G_{q/11}$ Proteine hier eine Schlüsselrolle bei der Stimulation von Adenylylzyklasen. Da kein spezifischer Inhibitor von G_s Proteinen zur Verfügung steht, und der Effekt von G_s Proteinen somit nur maskiert und nicht blockiert werden kann, konnte nicht getestet werden, ob $G_{q/11}$ Proteine auch einen alleinigen Effekt auf Adenylylzyklasen ausüben. Aus der Studienlage geht jedoch hervor, dass $\beta\gamma$ -Untereinheiten nur einen synergistischen Effekt mit $G\alpha_s$ auf Adenylylzyklasen ausüben und diese nicht unabhängig von G_s Proteinen stimulieren können (z.B. Hanoune et al., 1997). Unter Kontrollbedingungen wurde eine maximale Zellantwort erreicht, die sich nicht von den Ergebnissen der CTX-behandelten Zellen unterschieden hat. Durch den Zusatz von Cholera Toxin werden G_s Proteine Rezeptor- und Agonist-unabhängig maximal stimuliert. Da sich die Acetylcholin-vermittelte G_s Protein-Aktivierung unter Kontrollbedingungen nicht signifikant von dem CTX-vermittelten Effekt unterscheidet, wird Acetylcholin im Rahmen dieser Arbeit als Vollagonist für G_s -abhängige Signalwege klassifiziert. Durch die simultane Inhibition von $G_{q/11}$ und $G_{i/o}$ Proteinen (Abbildung 74, blauer Balken) konnte hier der ausschließlich G_s -vermittelte Effekt auf Adenylylzyklasen beleuchtet werden. Dieser stimmte nicht mit den Ergebnissen unter Kontrollbedingungen (Abbildung 74, roter Balken) überein. Demzufolge müssen auch noch andere G Proteine in den Prozess der cAMP-Generierung in CHO-M1

Zellen involviert sein. Acetylcholin war folglich zwar ein Vollagonist für G_s -abhängige Signalwege, jedoch konnte der maximale Effekt durch eine reine G_s Protein-Aktivierung nicht erreicht werden.

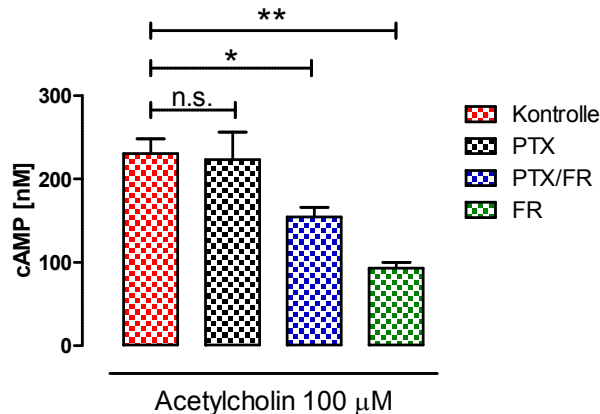


Abbildung 74: Effekt der verschiedenen G Proteine auf die intrazelluläre cAMP-Synthese.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus vier Einzelversuchen in Dreifachbestimmung. Ordinate: cAMP-Konzentration in nM. Legende: G Protein-Inhibitoren, die zur Generierung der jeweiligen Daten eingesetzt wurden. n.s.: Nicht signifikant verschieden von dem Effekt, der durch Acetylcholin 100 μ M unter Kontrollbedingungen ausgelöst wurde (t-Test, $p > 0,05$). *, **: Signifikant verschieden von dem Effekt, der durch Acetylcholin 100 μ M unter Kontrollbedingungen ausgelöst wurde (t-Test $p < 0,05$, $0,01$).

$G_{i/o}$ und G_s Proteine haben einen gegenläufigen Effekt auf Adenylylzyklasen, $G_{i/o}$ hemmen ACs, G_s Proteine stimulieren diese. Wurden die CHO-Zellen ausschließlich mit dem $G_{i/o}$ -Inhibitor PTX vorbehandelt, zeigte sich keine Reduktion in der intrazellulären cAMP-Synthese im Vergleich zu den Kontrolldaten. Demzufolge haben $G_{i/o}$ Proteine, zumindest in CHO-M1 Zellen keinen Einfluss auf die Adenylylzyklasen und hemmen den Effekt, der durch G_s Proteine vermittelt wurde, nicht. Durch die Zugabe des $G_{q/11}$ -Inhibitors FR wurde die intrazelluläre cAMP-Konzentration signifikant reduziert. $G_{q/11}$ Proteine spielten folglich eine Schlüsselrolle bei der Stimulation der Adenylylzyklasen und damit der Generierung von intrazellulärem cAMP. Interessanterweise konnte der Effekt, welcher durch die Zugabe von FR beobachtet werden konnte, durch eine Inkubation der Zellen mit PTX abgeschwächt werden, obwohl PTX ohne die simultane Behandlung der Zellen mit FR keinen Effekt auf die Modulation der Adenylylzyklasen hatte. Bei der simultanen Behandlung der Zellen mit FR und PTX nahm die intrazelluläre cAMP-Konzentration im Vergleich zur alleinigen FR-Behandlung wieder zu, lag jedoch signifikant unterhalb der Kontrollkurve. Möglicherweise üben $G_{i/o}$ Proteine in CHO-M1 Zellen erst dann einen Effekt auf die Signalkaskade des M1-Rezeptors aus, wenn die präferierten $G_{q/11}$ Proteine inhibiert wurden. Ein weiterer

Erklärungsansatz für dieses Phänomen wäre, dass unter Kontrollbedingungen bereits eine maximale cAMP-Generierung stattgefunden hat und durch die Ausschaltung von $G_{i/o}$ Proteinen aus diesem Grund keine darüber hinaus stattfindende cAMP-Synthese möglich war (vgl. Kapitel 4.5.5, Abbildung 29 und 30).

An der maximalen Zellantwort waren neben G_s auch $G_{q/11}$ Proteine beteiligt, diese jedoch nur in Abhängigkeit aktivierter G_s Proteine. Schlussfolgernd kann man sagen, dass Acetylcholin ein Vollagonist für G_s -abhängige Signalwege in CHO-M1 Zellen war, da, die durch den permanenten G_s Protein-Aktivator CTX ausgelöste maximale Zellantwort auch Rezeptor-vermittelt durch Acetylcholin erreicht werden konnte. Für die reine G_s Protein-Aktivierung war Acetylcholin hingegen ein Partialagonist, da die maximale Zellantwort durch die alleinige G_s Protein-Aktivierung nicht erreicht werden konnte, sondern auch noch andere Faktoren an der cAMP-Synthese beteiligt waren.

5.1.3 Dualsterische Hybride

5.1.3.1 „Naph-Hybride“ konnten Adenylylzyklasen nur in Abhängigkeit aktiver $G_{q/11}$ Proteine aktivieren

Die „naph-Hybride“ konnten die Adenylylzyklasen nur in Abhängigkeit von aktivierten $G_{q/11}$ Proteinen stimulieren. Wurden die $G_{q/11}$ Proteine mithilfe des spezifischen $G_{q/11}$ -Inhibitors FR blockiert, ergaben sich Messwerte, die sich nicht signifikant vom Basalwert unterschieden haben (Kapitel 4.5.5.3, Abbildung 31 und 4.5.5.5, Abbildung 33). Unter Kontrollbedingungen und unter Zusatz von PTX konnten jedoch alle „naph-Hybride“ mit Ausnahme von Iper-6-naph eine Stimulation der Adenylylzyklasen bewirken. Iper-6-naph fungierte hier, wie auch in IP1-Assays und [35 S]GTP γ S-Bindungsversuchen als Antagonist.

5.1.3.2 „Phth-Hybride“ aktivierten Adenylylzyklasen sowohl über G_s als auch über $G_{q/11}$ Proteine

Die „phth-Hybride“ konnten mit Ausnahme von Iper-6-phth und Iper-10-phth alle eine cAMP-Synthese auch in Abwesenheit intakter $G_{q/11}$ Proteine induzieren, jedoch wurde auch hier die intrazelluläre cAMP-Konzentration durch den Zusatz von FR signifikant gesenkt. Agonisten mit hoher intrinsischer Aktivität können anscheinend multiple Signalkaskaden des jeweiligen Rezeptors induzieren, wohingegen Agonisten mit geringer intrinsischer Aktivität nur die präferierten G Proteine aktivieren können (Kenakin, 1995b). Auch Untersuchungen durch

Gurwitz et al. (1994) ergaben, dass nicht alle Agonisten eine intrazelluläre cAMP-Akkumulation in CHO-rM1 Zellen induzieren konnten. Sie fanden einen engen Zusammenhang zwischen der Flexibilität des Liganden und dem Vermögen des Rezeptors G_s Proteine zu aktivieren (Gurwitz et al., 1994). Die Liganden mit dem kleineren allosterischen Substituenten Phthalimid schränkten die Flexibilität des Rezeptors zu einem geringeren Ausmaß ein, als die „naph-Hybride“ und konnten somit G_s -abhängige Signalwege induzieren. Vor allem das sehr rigide Iper-fri-naph, aber auch die anderen „naph-Hybride“ verhinderten die Ausbildung der zur G_s Protein-Aktivierung notwendigen Rezeptor-Konformation und konnten nur in Abhängigkeit intakter $G_{q/11}$ Proteine eine cAMP-Akkumulation bewirken.

5.1.4 Die Stimulation der Adenylylzyklasen war unabhängig vom Ca^{2+} -Einstrom

Um die Art des „Cross-talks“ tiefergreifend zu beleuchten, wurde in weiteren cAMP-Assays der Ca^{2+} -Chelator BAPTA-AM eingesetzt. Anhand dieser Versuche sollte getestet werden, an welchem Punkt der $G_{q/11}$ -Signalkaskade der „Cross-talk“ zu G_s Proteinen besteht. Infolge einer $G_{q/11}$ Protein-Aktivierung wird Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern freigesetzt. Vorherige Studien haben gezeigt, dass Ca^{2+} , abhängig von der jeweiligen Isoform der Adenylylzyklasen, einen hemmenden, einen stimulierenden oder gar keinen Effekt auf die Adenylylzyklasen ausüben kann (z.B. Hanoune et al., 1997). Wie oben bereits erwähnt, werden in CHO-Zellen die Ca^{2+} -sensitive ACVI und die Ca^{2+} -insensitive Isoform ACVII exprimiert. BAPTA-AM zeigte keinen Effekt auf die cAMP-Akkumulation in CHO-M1 Zellen, was darauf hindeutet, dass die Isoform ACVI keinen Einfluss auf die G_s -Signalkaskade in CHO-M1 Zellen ausübt (vgl. Kapitel 4.5.5.6, Abbildung 34). Da Ca^{2+} eigentlich einen hemmenden Effekt auf ACVI hat, sollte es aufgrund der Chelatisierung und damit Inaktivierung des intrazellulären Ca^{2+} zu einer gesteigerten Synthese an cAMP kommen, was in einem größeren Mess-Signal resultieren würde. Die Daten von Gurwitz et al. (1994) an Membranpräparationen von CHO-M1 Zellen legen nahe, dass die cAMP-Akkumulation unabhängig von intrazellulären Mediatoren ist und stehen damit in Einklang mit den hier erhobenen Ergebnissen, die eine Interaktion auf Höhe der G Proteine detektierten.

Folglich spielte vermutlich die Isoform VII der Adenylylzyklasen eine Schlüsselrolle in der Signalkaskade der hier untersuchten CHO-M1 Zellen. Wurden $G_{q/11}$ Proteine inhibiert, kam es zu einer hoch signifikanten Reduktion der intrazellulären cAMP-Konzentration. Ob dieser Effekt durch die α - oder $\beta\gamma$ -Untereinheit der $G_{q/11}$ Proteine vermittelt wurde, kann aufgrund der hier erhobenen Daten nicht beurteilt werden. Allerdings kann aufgrund der Studienlage

und den Regulationsmechanismen der Isoform VII geschlussfolgert werden, dass die $\beta\gamma$ -Untereinheit der $G_{q/11}$ Proteine synergistisch mit aktivierten G_{α_s} Proteinen diese Isoform der Adenylylzyklasen stimuliert (Feinstein et al., 1991; Gao und Gilman, 1991; Tang und Gilman, 1991). Burford und Nahorski (1996) konnten ebenfalls zeigen, dass G_{α_s} Proteine die cAMP-Generierung in CHO-M1 Zellen bewirken, allerdings schlussfolgerten sie aufgrund von Versuchen mit anti- $G_{q/11}$ -Serum, dass $G_{q/11}$ Proteine nicht an der Adenylylzyklasen-Aktivierung beteiligt waren. Jedoch gelang es im Rahmen dieser Arbeit durch den spezifischen $G_{q/11}$ -Inhibitor FR zu zeigen, dass der hier beobachtete „Cross-talk“ auf einer direkten Interaktion zwischen G_s und $G_{q/11}$ Proteinen mit Adenylylzyklasen basiert. Die Aminosäure-Sequenz der Adenylylzyklasen besteht aus unterschiedlichen Epitopen, die eine separate Bindung und Interaktion von α_s , $\alpha_{i/o}$ und $\beta\gamma$ -Untereinheiten ermöglicht (Taussig et al., 1993 und 1994). Untersuchungen an anderen Zell-Linien detektierten andere Effektor-Proteine als Modulator der Adenylylzyklasen. Versuche an M1-Rezeptoren, die in A9L-Zellen exprimiert wurden, konnten zeigen, dass die ACs durch die Aktivität der Phospholipase C infolge einer $G_{q/11}$ Protein-Aktivierung stimuliert werden (Felder et al., 1989). TMB-8, ein Inhibitor der intrazellulären Ca^{2+} -Freisetzung, führte ebenfalls in dieser Zell-Linie zu einer Reduktion der AC-Aktivität (Felder et al., 1989). Diese Ergebnisse suggerieren eine AC-Stimulation, die von einer Ca^{2+} /Calmodulin-Aktivierung abhängig ist (Felder et al., 1989). Der jeweilige molekulare Mechanismus ist folglich abhängig vom Zelltyp und den darin exprimierten Isoformen der Adenylylzyklasen und dient im nativen Gewebe vermutlich der Feinanpassung intrazellulärer Signalkaskaden, da sowohl unterschiedliche Rezeptoren als auch unterschiedliche G Proteine Einfluss auf die, durch Adenylylzyklasen ausgelöste, Zellantwort haben können.

5.1.5 HEK 293 Zellen zeigten keinen „Cross-talk“ zwischen G_s und $G_{q/11}$ Proteinen

Da die Expression der verschiedenen Isoformen der Adenylylzyklasen Gewebe- und Zelltyp-abhängig ist, wurden HEK 293 Zellen, welche den M3-Rezeptor-Subtyp endogen exprimieren, als weiteres Expressions-Modell gewählt, um die $G_{q/11}$ -vermittelten Effekte auf die Adenylylzyklasen in einem anderen Zellhintergrund zu messen.

Der muskarinische M3-Rezeptor wird in HEK 293 Zellen endogen exprimiert und aktiviert in Analogie zu dem M1-Rezeptor-Subtyp ebenfalls präferentiell G Proteine der $G_{q/11}$ -Familie. Der im Rahmen dieser Arbeit untersuchte M1-Rezeptor wurde in CHO-Zellen transfiziert und artifiziell überexprimiert, um eine Rezeptor-vermittelte Zellantwort besser detektieren zu

können. Rekombinante Expressionssysteme, wie zum Beispiel die hier verwendeten CHO-M1 Zellen, zeigen häufig das Phänomen der promiskuitiven G Protein-Aktivierung. Neben den bevorzugten G Proteinen können also auch G Proteine anderer Familien durch diesen Rezeptor aktiviert werden. Der in den HEK 293 Zellen untersuchte M3-Rezeptor wird von diesen endogen exprimiert und wurde nicht artifiziell überexprimiert. Das könnte ein Grund dafür sein, dass dieser Rezeptor verschiedene G Proteine nicht promiskuitiv aktivieren kann, denn im Rahmen dieser Arbeit konnten keine G_s -vermittelten Effekte durch die Aktivierung des M3-Rezeptors in HEK 293 Zellen detektiert werden (Kapitel 4.5.5.7, Abbildung 35 und 36).

Um trotzdem den Mechanismus der Adenylylzyklasen-Modulation in HEK 293 Zellen zu beleuchten, wurde daraufhin der in HEK 293 Zellen ebenfalls endogen exprimierte Prostaglandin-Rezeptor untersucht. Dieser koppelt primär an G Proteine der G_s -Familie. Eine weitere Schwierigkeit bestand darin, dass HEK-Zellen eine Vielzahl unterschiedlicher Isoformen von Adenylylzyklasen exprimieren (Atwood et al., 2011), sodass die resultierenden Ergebnisse schwer zu deuten sind, da sich die Effekte verschiedener Isoformen überlagern könnten. Es konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen G Protein-Inhibitoren keinen Einfluss auf die cAMP-Akkumulation in HEK 293 Zellen ausübten (Kapitel 4.5.5.7, Abbildung 35). Folglich scheinen in diesem Fall allein die G_s Proteine an der Stimulation der Adenylylzyklasen, welche eine Generierung an intrazellulärem cAMP bewirken, beteiligt zu sein.

Um eine mögliche Überlagerung der Effekte der verschiedenen Adenylylzyklasen-Isoformen zu untersuchen, wurde des Weiteren ebenfalls BAPTA-AM als intrazellulärer Ca^{2+} -Chelator zugesetzt. Jedoch konnte auch in den Versuchen an HEK 293 Zellen kein Einfluss von Ca^{2+} auf die Adenylylzyklasen detektiert werden (Kapitel 4.5.5.8, Abbildung 38).

5.1.6 $G_{i/o}$ Proteine waren an der intrazellulären IP1-Synthese beteiligt

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten IP1-Versuche zeigten eine $G_{q/11}$ -vermittelte Generierung von intrazellulärem IP1, die durch den spezifischen $G_{q/11}$ -Inhibitor FR vollständig blockiert werden konnte (Abbildung 75). Durch den Zusatz des $G_{i/o}$ -Inhibitors PTX konnte die Agonist-vermittelte IP1-Synthese jedoch signifikant reduziert werden (Abbildung 75). G Proteine der $G_{q/11}$ Familie zeigen keine Sensitivität gegenüber PTX (Blank et al., 1991). Der hier beobachtete Effekt ist also $G_{i/o}$ Protein-spezifisch. Diese Ergebnisse werden durch die Untersuchungen von Kasahara und Sugiyama (1994) untermauert, die in den Oozyten des Afrikanischen Krallenfroschs eine Kopplung von M1-Rezeptoren an G_i und G_o Proteine

detektieren konnten. Auch Padrell und Kollegen (1991) konnten in dem gleichen Zellhintergrund eine PTX-sensitive Zellantwort in der $G_{q/11}$ -Signalkaskade messen. Sie schlussfolgerten, dass es sich hierbei um die Wirkung von G_o und nicht von G_i Proteinen auf die Phospholipase C handelte. Exton (1996) vermutete aufgrund der geringen Gewebeverteilung von G_o Proteinen, jedoch eine Beteiligung von G_i Proteinen an der Phospholipase C-Aktivierung. Ob der Effekt G_i - oder G_o -vermittelt ist, ist demzufolge vermutlich abhängig von dem untersuchten Gewebe und den darin exprimierten G Proteinen.

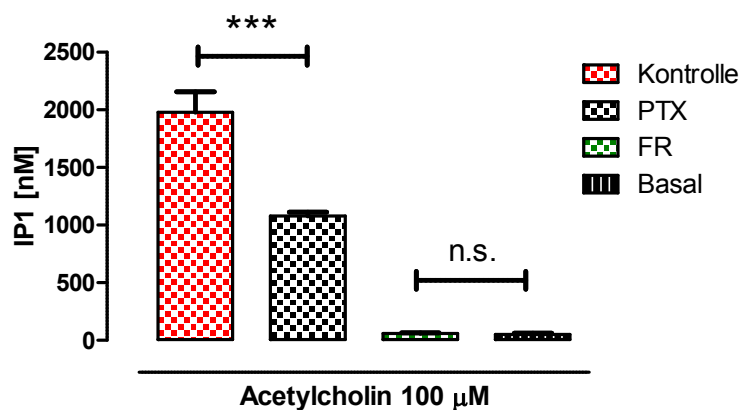


Abbildung 75: Neben $G_{q/11}$ waren auch $G_{i/o}$ Proteine an der IP1-Synthese beteiligt.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus vier Einzelversuchen in Dreifachbestimmung. Ordinate: IP1-Konzentration in nM. Legende: G Protein-Inhibitoren, die zur Generierung der jeweiligen Daten eingesetzt wurden. ***: Signifikant verschieden von dem Effekt, der durch Acetylcholin 100 μ M unter Kontrollbedingungen ausgelöst wurde (t-Test $p < 0,001$). n.s.: Nicht signifikant verschieden vom Basalwert (t-Test, $p > 0,05$).

Durch die Zugabe des spezifischen $G_{q/11}$ -Inhibitors FR ergaben sich Messwerte, die sich nicht signifikant vom Basalwert unterschieden haben, folglich haben $G_{i/o}$ Proteine keinen alleinigen Effekt auf die Phospholipase C, sondern aktivieren diese synergistisch mit G_{α_q} . Boyer et al. (1992) und Blank et al. (1992) konnten zeigen, dass der $G_{i/o}$ -vermittelte Effekt auf die Phospholipase C durch GDP-gebundene α_i -Untereinheiten blockiert werden konnte, und schlussfolgerten, dass dieser Effekt durch die $\beta\gamma$ -Untereinheit von G_i Proteinen bewirkt wird. Die benötigte Konzentration an $\beta\gamma$, um eine halbmaximale Zellantwort auszulösen, war in etwa 100-fach höher, als der EC_{50} -Wert von $\alpha_{q/11}$ -Untereinheiten für die Aktivierung der Phospholipase C. Abbildung 76 illustriert den vermuteten Mechanismus der $G_{q/11}$ - und $G_{i/o}$ -vermittelten Aktivierung der Phospholipase C und die für „second messenger assays“ übliche Signalamplifikation.

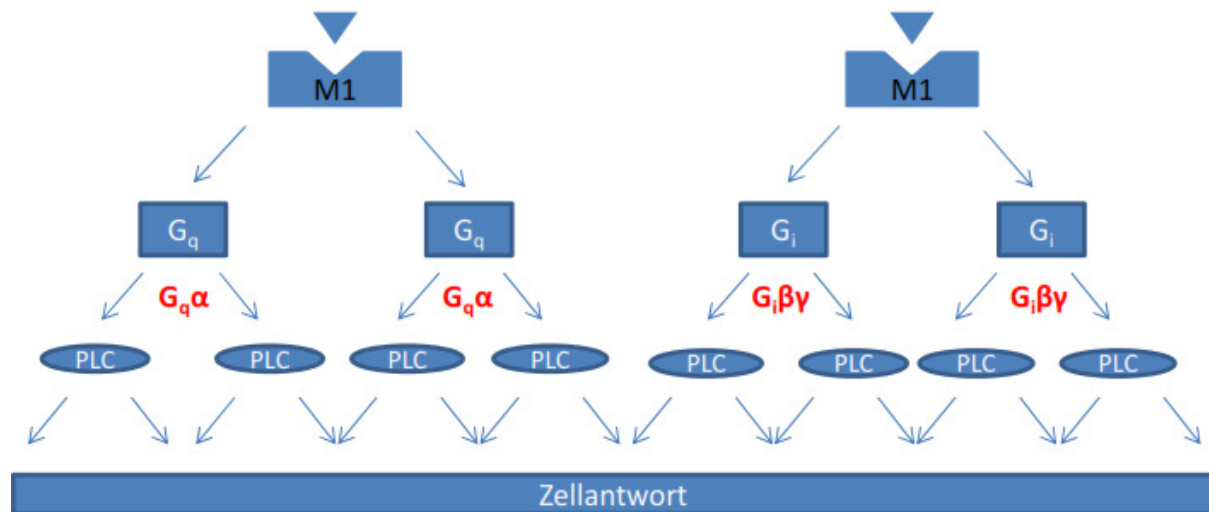


Abbildung 76: Konvergenz-Punkte und Signalamplifikation innerhalb der Signalkaskade des M1-Rezeptors. (Näheres siehe Text)

In CHO-M3 Zellen, die ebenfalls präferentiell $G_{q/11}$ Proteine rekrutieren, konnte keine Aktivierung der PLC durch G Proteine der $G_{i/o}$ Protein-Familie detektiert werden (Dell'Acqua et al., 1993). Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den von L. Vogel erhobenen Daten an CHO-M3 Zellen. Auch hier konnte kein Effekt von PTX-sensitiven G Proteinen auf die $G_{q/11}$ -Signalkaskade detektiert werden (Dissertation Vogel, 2015). Hier besteht möglicherweise ein Unterschied im Kopplungsverhalten der beiden ungeradzahligen muskarinischen Subtypen M1 und M3, die beide primär G Proteine der $G_{q/11}$ Protein-Familie aktivieren. Für den ebenfalls $G_{q/11}$ -gekoppelten M5-Rezeptor liegen bisher keine Daten vor.

5.2 Rezeptor-Theorie der „multiplen, aktiven Rezeptorzustände“

Neueren Untersuchungen zufolge können Rezeptor-Proteine mehr als einen aktiven Zustand ausbilden (Krumins und Barber, 1997; Ghanouni et al., 2001), zu denen Agonisten unterschiedliche Affinitäten aufweisen können (Burgen 1966; Kenakin 1996) und damit die Signaltransduktion und die Stärke der Zellantwort beeinflussen können (Kenakin, 2002). Während ein endogener Ligand vermutlich alle Signalkaskaden induzieren kann, die der entsprechende Rezeptor einleiten kann, würde ein anderer Ligand eventuell nur bestimmte Signalwege aktivieren, da er nicht alle Rezeptor-Konformationen stabilisieren kann (Smith et al., 2011), wodurch es zu Unterschieden in der Stärke der Zellantwort und zu einer

selektiven Aktivierung einzelner Signalwege kommen kann.

5.2.1 Die intrinsische Aktivität der orthosterischen Liganden Iperoxo und Carbachol war abhängig vom Signalweg

Ausgehend von dem Modell des „agonist-trafficking“ nach Kenakin (1995b und 1997, siehe auch Einleitung) können unterschiedliche Agonisten verschiedene Rezeptor-Konformationen induzieren und in der Folge zu unterschiedlichen pharmakologischen Effekten in der Zelle führen (Kenakin, 1995b und 1997). Diese Theorie wird im Folgenden auf die Daten der hier vorliegenden Arbeit angewendet.

Die funktionellen Daten, die in dieser Arbeit erhoben wurden, zeigten, dass die orthosterischen Agonisten Iperoxo und Carbachol in den verschiedenen Signalkaskaden unterschiedliche intrinsische Aktivitäten aufwiesen. Iperoxo führte in [³⁵S]GTPγS-Bindungsversuchen, welche die Aktivierung von G_{i/o} Proteinen untersuchen, zu supramaximalen Effekten, im Vergleich zu dem endogenen Liganden Acetylcholin (Kapitel 4.6.3, Abbildung 41). Carbachol fungierte hingegen in diesen Versuchen als Partialagonist und konnte, bezogen auf Acetylcholin, nur ca. 70 % des Effektes induzieren (Kapitel 4.6.3, Abbildung 41). In G_{q/11}- und G_s-abhängigen Signalwegen zeigten Iperoxo und Carbachol in Relation zu Acetylcholin jedoch keine signifikanten Unterschiede in ihren intrinsischen Aktivitäten (Kapitel 4.4.1.4, Abbildung 16 und Kapitel 4.5.3, Abbildung 25).

5.2.1.1 Iperoxo fungierte am M1-Rezeptor als Superagonist für G_{i/o}-abhängige Signalwege

Der Begriff „Superagonismus“ kommt vor allem im Bereich der Immunologie vor (z.B. Chen et al., 2000; Beyersdorf et al., 2005), wird jedoch seit einigen Jahren auch in der Rezeptor-Pharmakologie der G Protein-gekoppelten Rezeptoren angewendet (Tan et al., 2002; Niemczyk et al., 2010; Schrage et al., 2013; Übersichtsartikel: Smith et al., 2011; Langmead und Christopoulos, 2013; Schrage et al., 2016). Im Feld der GPCRs bezeichnet der Begriff „Super-Agonist“ eine synthetisch hergestellte Substanz, die eine höhere intrinsische Aktivität zu einem Rezeptor aufweist, als der endogene Ligand.

Schrage et al. (2013) konnten mithilfe des „operational model“ nach Black und Leff (1983) und durch eine Reduktion der Rezeptor-Reserve mittels einer Inaktivierungsmethode nach Furchgott (1966) zeigen, dass Iperoxo an muskarinischen M2-Rezeptoren sowohl für den

$G_{i/o}$ - als auch G_s -abhängigen Signalweg, gemessen in [^{35}S]GTP γ S- und DMR-Versuchen, eine höhere intrinsische Aktivität aufweist als der endogene Ligand Acetylcholin und konnten Iperoxo somit als Superagonist an muskarinischen M2-Rezeptoren charakterisieren (Schrage et al., 2013, Übersichtsartikel: Langmead und Christopoulos, 2013 und Schrage et al., 2016).

In der hier vorliegenden Arbeit konnte für den $G_{i/o}$ -Signalweg, welcher in [^{35}S]GTP γ S-Bindungsversuchen gemessen wurde, gezeigt werden, dass Iperoxo im Vergleich zu dem endogenen Liganden Acetylcholin als Superagonist am M1-Rezeptor, welcher stabil in CHO-Zellen exprimiert wurde, fungierte (Kapitel 4.6.3, Abbildung 41). [^{35}S]GTP γ S-Bindungsversuche messen den Nukleotidaustausch in Folge einer Rezeptor-Aktivierung und untersuchen somit ein Ereignis, welches unmittelbar auf die Aktivierung des Rezeptors durch den Agonisten folgt (vgl. Abbildung 77). Aus diesem Grund unterliegen diese Versuche allenfalls einer sehr geringen Signalamplifikation (Milligan, 2003, Colabufo et al., 2007). Da [^{35}S]GTP γ S-Bindungsversuche an Membranhomogenaten durchgeführt werden, hat eine Rezeptor-Desensibilisierung beziehungsweise -Internalisierung hier keinen Effekt auf den beobachteten Superagonismus von Iperoxo (vgl. Engström et al., 2005). Die Daten aus den „second messenger assays“ IP1 und cAMP, welche die Aktivierung des $G_{q/11}$ - beziehungsweise des G_s -Signalwegs untersuchen, zeigten im Gegensatz zu den [^{35}S]GTP γ S-Bindungsversuchen kein superagonistisches Verhalten von Iperoxo (vgl. Kapitel 4.4.1.4, Abbildung 16 und Kapitel 4.5.3, Abbildung 25). Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass diese Versuche einer höheren Signalamplifikation unterliegen und damit kein Unterschied in den intrinsischen Aktivitäten zwischen Iperoxo und Acetylcholin detektiert werden konnte (vgl. Abbildung 77). Allerdings kann das Phänomen des Superagonismus' auch nur in einzelnen Signalwegen, die durch den Rezeptor aktiviert werden können, auftreten und muss sich nicht zwangsläufig in allen möglichen Signalkaskaden widerspiegeln (Holst et al., 2005; Bennett et al., 2009).

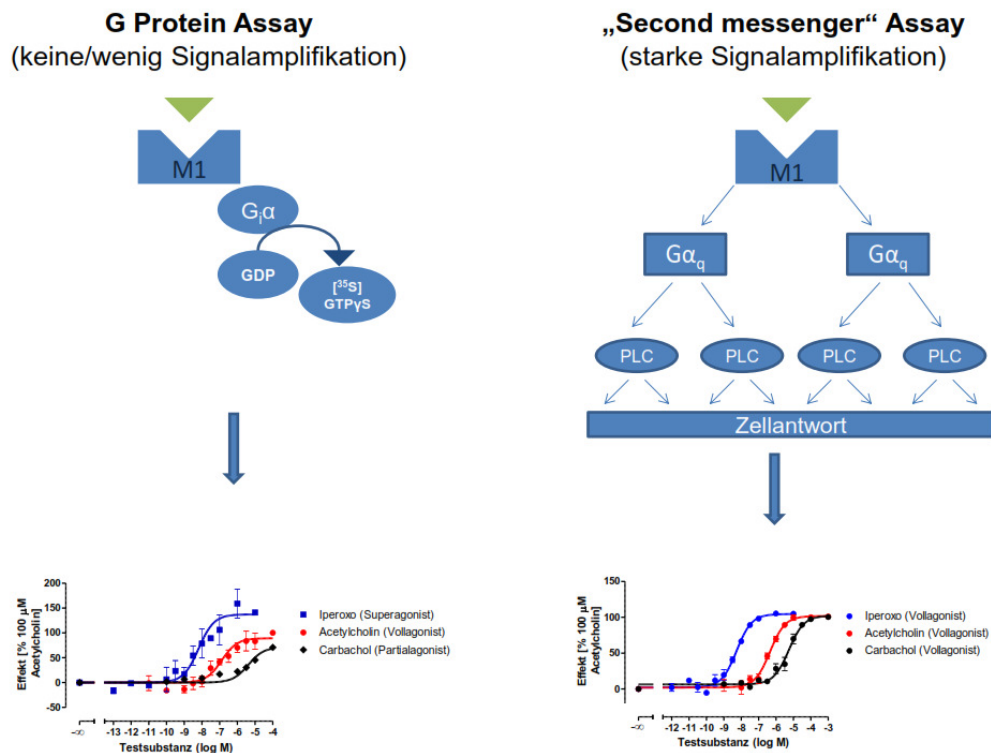


Abbildung 77: Starke Signalamplifikationen in „second messenger“ Assays (rechts) führten im Vergleich zu G Protein Assays (links) zu einer Maskierung von Super- und Partialagonisten.

Ein weiteres Indiz dafür, dass Iperoxo nur auf dem $G_{i/o}$ -Signalweg als Superagonist fungiert, wurde durch die Untersuchungen in DMR-Versuchen geliefert (Kapitel 4.7.6, Abbildung 56). DMR-Versuche können je nach Toxin-Vorbehandlung der Zellen einzelne Signalwege oder Misch-Signale verschiedener Signalwege detektieren. In der hier vorliegenden Arbeit wurden sämtliche Toxine und Toxin-Kombinationen angewendet, um sowohl jeden einzelnen, als auch Misch-Signale verschiedener Signalkaskaden zu messen. Wurden die CHO-M1 Zellen simultan mit dem G_s Protein-Aktivator CTX und dem $G_{q/11}$ Protein-Inhibitor FR behandelt, um die Signalwege der G_s und $G_{q/11}$ Proteine zu maskieren beziehungsweise zu inhibieren, zeigte sich in den resultierenden Daten der rein $G_{i/o}$ -vermittelte Effekt. Auch hier konnte der superagonistische Effekt des Iperoxos in Relation zu Acetylcholin detektiert werden (Kapitel 4.7.6, Abbildung 56). Für alle anderen untersuchten Signalwege im DMR-Assay fungierte Iperoxo als Voll- und nicht als Superagonist (Kapitel 4.7.5.1, Abbildung 54 und Kapitel 4.7.7, Abbildung 60). Da in diesem Assay der Umbau des Zytoskeletts und/oder die Umverteilung von Effektor-Proteinen in Folge einer Rezeptor-Aktivierung gemessen werden, können die gemessenen Zellantworten aller Signalwege vermutlich einem hohen Grad an Signalamplifikationen unterliegen. Da hier jedoch nur für den $G_{i/o}$ -Signalweg ein superagonistisches Verhalten von Iperoxo detektiert werden konnte, fungierte Iperoxo

vermutlich in den anderen Signalwegen, unabhängig von einer möglichen Signalamplifikation, nur als Vollagonist. Holst et al. (2005) und Bennett et al. (2009) haben bereits gezeigt, dass Superagonismus nicht zwangsläufig für alle möglichen Signalwege auftreten muss, sondern auch auf die Aktivierung einzelner Signalkaskaden begrenzt sein kann. Neben der supramaximalen intrinsischen Aktivität von Iperoxo in [³⁵S]GTPγS-Bindungsversuchen, zeigte Iperoxo in allen drei, hier untersuchten Signalwegen, eine Wirksamkeit, die 10-fach ([³⁵S]GTPγS-Bindungsversuche) bis 100-fach (IP1- und cAMP-Versuche) höher war, als die von Acetylcholin. Die Differenzen der Wirksamkeiten zwischen Iperoxo und Acetylcholin in IP1- und [³⁵S]GTPγS-Bindungsversuchen stimmen in etwa mit denen des ebenfalls primär G_{q/11} Protein-gekoppelten M3-Rezeptors überein (Dissertation Vogel, 2015).

Neben den funktionellen Daten wurde auch die Bindungsaffinität zum M1-Rezeptor für Iperoxo bestimmt (Kapitel 4.1.2, Abbildung 11). Sowohl für Acetylcholin als auch für Iperoxo ergaben sich bei der Untersuchung der Bindungsaffinität an Membranhomogenaten biphasische Kurvenverläufe mit einem hochaffinen und einem niedrigaffinen Bindungszustand. Die Bindungsaffinität zum hochaffinen Rezeptorzustand lag für Iperoxo um etwa eine Dekade höher, als die von Acetylcholin, die Affinität zum niedrigaffinen Rezeptorzustand um etwa 1,5 Dekaden. Auch die Differenzen in den Bindungsaffinitäten zwischen Iperoxo und Acetylcholin stimmten für die beiden primär G_{q/11} Protein-gekoppelten M1- und M3-Rezeptoren überein (Dissertation Vogel, 2015). Vorherige Studien zeigten, dass Iperoxo an allen fünf muskarinischen Subtypen eine höhere Bindungsaffinität aufwies, als Acetylcholin (Dissertation, Kaufel 2010; monophasische Kurvenauswertung).

Ein möglicher Grund für den superagonistischen Charakter und die hohe Wirksamkeit und Bindungsaffinität des Iperoxos, was auch in den Untersuchungen am muskarinischen M2-Rezeptor detektiert werden konnte (Schrage et al., 2013), liegt in der Interaktion des Moleküls mit dem Rezeptor-Protein. FRET- (Förster Resonanzenergietransfer) Untersuchungen am M2-Rezeptor offenbarten Unterschiede zwischen der Interaktion des Iperoxos und der des Acetylcholins mit dem Rezeptor (Bock et al., 2012). Infolge der Bindung von Iperoxo an das Rezeptorprotein kam es, vor allem im Bereich der intrazellulären Schleifen, zu einer stärkeren Konformationsänderung des Rezeptors im Vergleich zum Acetylcholin-gebundenen Rezeptor (Bock et al., 2012). Mutagenese-Studien haben gezeigt, dass vor allem die intrazellulären Schleifen 2 und 3 (ICL2 und ICL3) für die Bindung des G Proteins an den Rezeptor von großer Bedeutung sind (Jastrzebska, 2013) und die G Protein-Präferenz von Muskarin-Rezeptoren durch Aminosäuren der zweiten und dritten intrazellulären Domäne bestimmt wird (Blin et al., 1995; Wess, 1996). Mutations-Studien an

muskarinischen M2-Rezeptoren führten zu tiefgreifendem Verständnis über den Bindungsmodus von Iperoxo. Schrage et al. (2013) konnten zeigen, dass Iperoxo neben der klassischen Bindungsstelle (M2-Y104^{3.33}) im Rezeptor noch mindestens eine weitere Bindungsstelle im Rezeptor-Protein aufweist, die vermutlich durch den Isoxazolin-Ring des Iperoxos okkupiert wird (Schrage et al., 2013). Aufgrund dieses vermuteten doppelten Bindungsmodus‘ kann Iperoxo offenbar Rezeptorkonformationen stabilisieren, die G Proteine mit hoher Effizienz aktivieren können (Schrage et al., 2013).

Ob ein ähnlicher Bindungsmechanismus, wie der für den M2-Rezeptor oben beschriebene, auch für den M1-Rezeptor zutrifft, kann aufgrund der Datenlage zu diesem Zeitpunkt nicht geklärt werden. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie zwischen den einzelnen Subtypen der muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren wäre ein solcher Mechanismus jedoch denkbar und würde den superagonistischen Charakter und die hohe Bindungsaffinität und Wirksamkeit des Iperoxos am M1-Rezeptor erklären.

5.2.1.2 Carbachol fungierte als Partialagonist für G_{i/o}-abhängige Signalwege

Im Vergleich zu Acetylcholin zeigte Carbachol sowohl in [³⁵S]GTPγS-Bindungsversuchen (Kapitel 4.6.3, Abbildung 41) als auch in DMR-Assays (Kapitel 4.7.6, Abbildung 56) partialagonistisches Verhalten für den G_{i/o}-abhängigen Signalweg. In IP1- und cAMP-Assays (vgl. Kapitel 4.4.1.4, Abbildung 16 und Kapitel 4.5.3, Abbildung 25) hingegen fungierte Carbachol als Vollagonist. Wie oben bereits erläutert wurde, können Assays, welche die Generierung von sekundären Botenstoffen messen (IP1- und cAMP-Assays) durch eine Signalamplifikation die Unterschiede in den intrinsischen Aktivitäten von Agonisten maskieren und wie im Fall von Iperoxo gegebenenfalls einen Superagonismus maskieren. Wie im Fall von Carbachol können auch Partialagonisten fälschlicherweise als Vollagonisten charakterisiert werden (vgl. Abbildung 77). G Protein-Assays, wie die [³⁵S]GTPγS-Bindungsversuche, unterliegen nicht der Problematik der Signalamplifikation, da dieses Messverfahren den Nukleotidaustausch detektiert und damit ein Ereignis, welches unmittelbar auf die Rezeptor-Aktivierung folgt (Milligan 2003; Engström et al., 2005, vgl. Abbildung 77). Ein weiterer Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse in [³⁵S]GTPγS-Bindungsversuchen und cAMP-Assays könnte darin liegen, dass vor allem in cAMP-Assays die Rezeptor-Reserve eine große Rolle spielt, welche einen Partialagonisten als Vollagonisten maskieren kann (Adham et al., 1993; Umland et al., 2001). In der Zelle stellen Adenylzyklasen, welche das Schlüsselenzym in G_{i/o}- und G_s-abhängigen Signalwegen sind, den limitierenden Faktor im Vergleich zu Rezeptoren und G Proteinen dar, weswegen cAMP-

Assays häufig dem Phänomen der Rezeptor-Reserve unterliegen (Kim et al., 1994), und Partialagonismus demzufolge verschleiert werden kann. In rekombinanten Zell-Linien, wie die hier genutzten CHO-Zellen, werden die zu untersuchenden Rezeptoren häufig überexprimiert, was das stöchiometrische Ungleichgewicht zwischen Rezeptoren und Adenylylzyklasen noch verstärkt und damit auch das Phänomen der Rezeptor-Reserve.

Im Vergleich zu den Aktivierungsdaten für den G_s -abhängigen Signalweg aus cAMP-Versuchen (Kapitel 4.5.3, Abbildung 25), in denen Carbachol ein Vollagonist war, zeigten die Daten für G_s -abhängige Signalwege aus DMR-Versuchen signifikant höhere Wellenlängen-Verschiebungen in den negativen Bereich für Carbachol als für Acetylcholin (Abbildung 78). Da in DMR-Versuchen neben den G Proteinen auch noch andere Effektor-Proteine, wie zum Beispiel β -Arrestine, an der Zellantwort beteiligt sein können, kann hier keine endgültige Aussage über einen möglichen supramaximalen Effekt durch Carbachol getroffen werden, weil nicht alle Faktoren berücksichtigt werden können, die einen Einfluss auf die Wellenlängenverschiebung haben könnten. In cAMP-Assays, welche ebenfalls den G_s -abhängigen Signalweg untersuchen, konnte dieser supramaximale Effekt des Carbachols nicht beobachtet werden. Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass aufgrund einer hohen Rezeptor-Reserve oder einer hohen Signalamplifikation in diesem „second-messenger assay“ der superagonistische Charakter des Carbachols für G_s -vermittelte Signalwege maskiert wurde. Alternativ wäre es auch möglich, dass aufgrund der Interaktion des M1-Rezeptors mit anderen Effektor-Proteinen, die ebenfalls einen Einfluss auf die intrazelluläre Massenumverteilung haben, fälschlicherweise eine höhere Wellenlängen-Verschiebung auf einen superagonistischen Effekt zurückgeführt wurde.

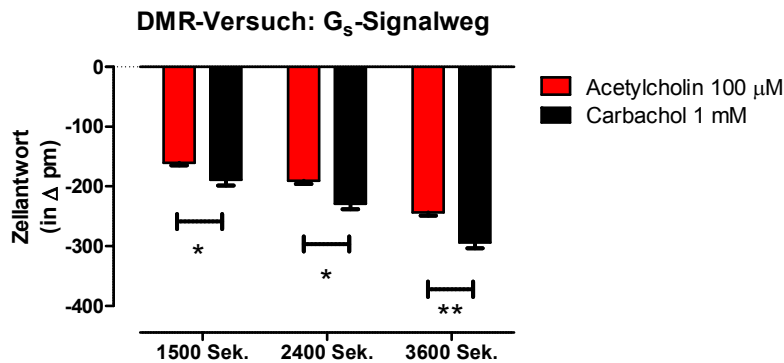


Abbildung 78: Vergleich der Wellenlängenverschiebungen zwischen Acetylcholin und Carbachol für den G_s-abhängigen Signalweg zu drei verschiedenen Zeitpunkten.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. eines repräsentativen, basislinien-korrigierten Einzelversuches in Vierfachbestimmung zu den Zeitpunkten $t=1500$ Sekunden, $t=2400$ Sekunden und $t=3600$ Sekunden. Ordinate: Wellenlängenverschiebung in Picometern. Abszisse: Zeitpunkt der Messung in Sekunden. **: Signifikanter Unterschied zwischen der Zellantwort (in Δ pm) durch Carbachol und Acetylcholin (t-Test, $p < 0,05$, $0,01$).

Bei der Untersuchung der Bindungs-Charakteristika von Carbachol am muskarinischen M1-Rezeptor konnten, wie im Fall von Acetylcholin und Iperoxo, auch hier biphasische Kurvenverläufe mit einem hochaffinen und einem niedrigaffinen Bindungszustand detektiert werden (Kapitel 4.1.2, Abbildung 11). Die Affinitäten von Carbachol zum hochaffinen und zum niedrigaffinen Rezeptorzustand waren um etwa eine Dekade geringer, als die von Acetylcholin.

5.3 Dualsterische Hybridliganden

5.3.1 In Abhängigkeit der Kettenlänge und des allosterischen Substituenten kam es zu unterschiedlichen Einflüssen der Liganden auf die Signalwegs-Aktivierung

Bereits 1969 konnten Lüllmann et al. das Verhalten von Alkanbisammonium-Verbindungen an M2-Rezeptoren in Meerschweinchen-Vorhöfen auf allosterische Interaktionen zurückführen, ein Mechanismus der zu diesem Zeitpunkt nur in der Enzymchemie bekannt war. Seit den achtziger Jahren häuften sich jedoch die Hinweise, dass G Protein-gekoppelte Rezeptoren der Familie A neben der orthosterischen Bindungstasche, an die der endogene Ligand bindet, über weitere „allosterische“ Bindungstaschen verfügen (Übersichtsartikel: Christopoulos, 2002; Christopoulos und Kenakin, 2002; Birdsall und Lazareno, 2005).

Abhängig von der Art des allosterischen Liganden können Rezeptor-Konformationen induziert werden, die unterschiedliche Effekte auf die Rezeptor-Aktivierung und Signaltransduktion ausüben können. Durch das Konzept der dualsterischen Hybridliganden nutzt man die simultane Bindung an eine weniger stark konservierte allosterische Bindungstasche, um eine Subtyp- und Signalweg-Selektivität der Liganden zu generieren, und an die konservierte orthosterische Bindungsstelle, um den Rezeptor mit hoch-affinen Substanzen zu aktivieren (Antony et al., 2009).

Die hier verwendeten dualsterischen Hybridliganden zeigten in den Untersuchungen am M1-Rezeptor unterschiedliche Aktivierungsmuster in Bezug auf ihre intrinsische Aktivität, ihre Wirksamkeit und Affinität zum Rezeptor und auch in ihren Einflüssen auf die G Protein-Kopplung. Bock et al. (2012) gelang es mithilfe von dualsterischen Liganden zu zeigen, dass das Kopplungsverhalten des M2-Rezeptors hoch sensitiv von der Flexibilität der allosterischen Bindungstasche abhängt und damit durch den gezielten Einsatz speziell dafür entwickelter Hybridliganden die Signaltransduktion des M2-Rezeptors kontrolliert werden kann. Dieses Konzept wurde im Rahmen dieser Arbeit für den M1-Rezeptor umgesetzt. Infolge einer Rezeptor-Aktivierung kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptor-Proteins, welche das allosterische Vestibül miteinschließt; diese Umlagerung spielt eine wichtige Rolle bei der nachfolgenden G Protein-Aktivierung (Wess et al., 2008; Mohr et al., 2010). Wird das allosterische Bindungsareal durch einen Liganden besetzt, kann die Konformationsänderung nicht, beziehungsweise nicht in vollem Ausmaß stattfinden und die nachgeschaltete G Protein-Aktivierung kann dadurch beeinträchtigt werden. Der M1-Rezeptor kann in Abhängigkeit vom Agonisten unterschiedliche aktive Konformationen einnehmen (Shapiro et al., 1992), die sich in ihrer Signaltransduktion unterscheiden können (Kenakin, 2002). Vor allem flexible Liganden können zahlreiche Konformationen im Rezeptor-Protein induzieren (Schulman et al., 1991)

Der Aufbau der hier genutzten dualsterischen Liganden beruht auf dem gleichen Prinzip, wie es für den M2-Rezeptor angewendet wurde, und die Substanzen sind zum Teil identisch mit denen, die von A. Bock genutzt wurden (Bock et al., 2012). Der orthosterische Baustein wird durch den hoch-affinen muskarinischen Agonisten Iperoxo gebildet, welcher über eine Alkyl-Kette unterschiedlicher Länge beziehungsweise über einen „Diamid-Linker“ mit dem allosterischen Substituenten Phthalimid oder Naphthalimid verknüpft ist. Iperoxo ist ein Agonist mit außergewöhnlich hoher Affinität für die muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren (Dallanoce et al., 1999; Antony et al., 2009; Schrage et al., 2013 und 2014). Phthalimid und Naphthalimid sind inverse Agonisten, die an das allosterische Vestibül des Rezeptors binden. Das Prinzip der dualsterischen Liganden beruht auf der Aktivierung des Rezeptors

durch einen orthosterisch-bindenden Liganden mit hoher Affinität zum Rezeptor und einer Generierung einer Subtyp-selektiven Rezeptor-Bindung mithilfe des allosterischen Bausteins, da die Aminosäuren der allosterischen Bindungstasche in der Regel weniger konserviert sind, als die der orthosterischen. Durch die Nutzung von inversen Agonisten als allosterischem Substituenten wird der Rezeptor nur dann aktiviert, wenn die Liganden in einem dualsterischen Bindungsmodus an den Rezeptor binden, also die Bindung simultan an das orthosterische und das allosterische Vestibül stattfindet und nicht, wenn die Hybride rein allosterisch binden.

„Molecular Docking Simulationen“ haben gezeigt, dass das extrazelluläre Vestibül des M1-Rezeptors enger ist, als das des M2-Rezeptors (Dr. Bermudez, FU Berlin, vgl. Abbildung 79, nicht publiziert). Demzufolge haben voluminöse allosterische Substituenten einen stärkeren Einfluss auf die Rezeptor-Flexibilität des M1-Rezeptors als dieses für den M2-Rezeptor gezeigt wurde (Bock et al., 2012).

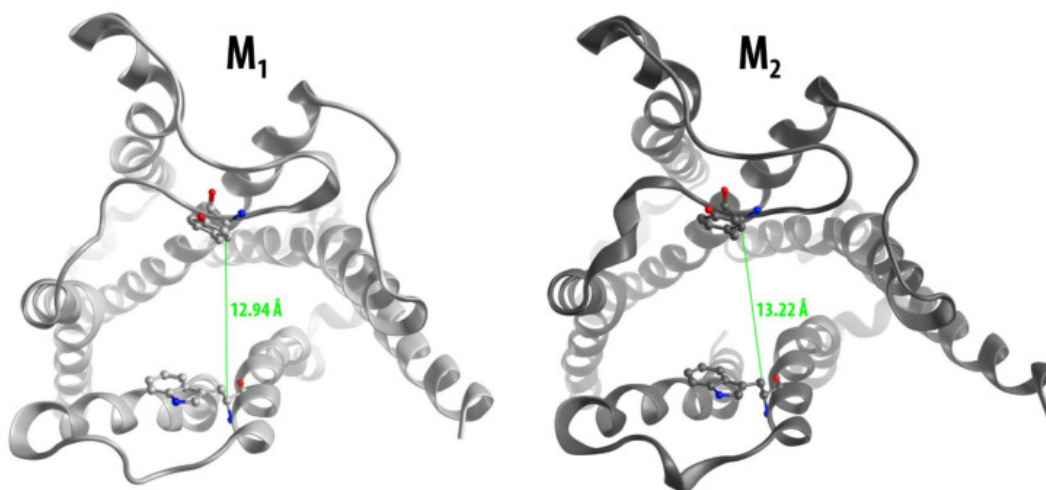


Abbildung 79: Das extrazelluläre Vestibül im M1-Rezeptor ist enger als das des M2-Rezeptors.

Ergebnisse einer „Molecular Docking-Simulation“ durch Dr. Marcel Bermudez und Professor Wolber, Freie Universität, Berlin (nicht publiziert). Vergleich der Kristallstrukturen des inaktiven Rezeptors (M1: 5CVX; M2: 3UON).

Funktionelle Daten aus IP1-Versuchen konnten die Hypothese bestätigen, dass der M1-Rezeptor sensitiver gegenüber einer Einschränkung der Flexibilität in der allosterischen Bindungstasche ist, als der M2-Rezeptor. Durch einen Vergleich der Signalwegsaktivierung des jeweils präferierten G Proteins des M1- beziehungsweise M2-Rezeptors wurde ersichtlich, dass der voluminöse Naphthalimid-Rest eine stärkere Einschränkung auf die Signaltransduktion des M1-Rezeptors ausgeübt hat, als auf den M2-Rezeptor. Da der M2-Rezeptor bevorzugt G Proteine der $G_{i/o}$ -Familie aktiviert, werden hier die Ergebnisse der

[³⁵S]GTPγS-Bindungsversuche mit den Ergebnissen aus IP1-Versuchen des M1-Rezeptors verglichen, da der M1-Rezeptor präferentiell G_{q/11} Proteine rekrutiert. Durch die kurze „Linker“-Kette und den voluminösen Rest Naphthalimid führte Iper-6-naph zu einer sehr starken Restriktion der Rezeptor-Flexibilität und konnte den M1-Rezeptor in keinem, der hier gemessenen, funktionellen Assays aktivieren. Im Gegensatz dazu konnte Iper-6-naph den M2-Rezeptor mit einer intrinsischen Aktivität von ca. 50 % für die Rekrutierung von G_{i/o} Proteinen aktivieren (Bock et al., 2012). Durch eine Substitution des allosterischen Restes Naphthalimid gegen das weniger voluminöse Phthalimid konnte sowohl für den M2-Rezeptor (Bock et al., 2012) als auch für den M1-Rezeptor eine Zunahme in der intrinsischen Aktivität von Iper-6-phth im Vergleich zu Iper-6-naph beobachtet werden.

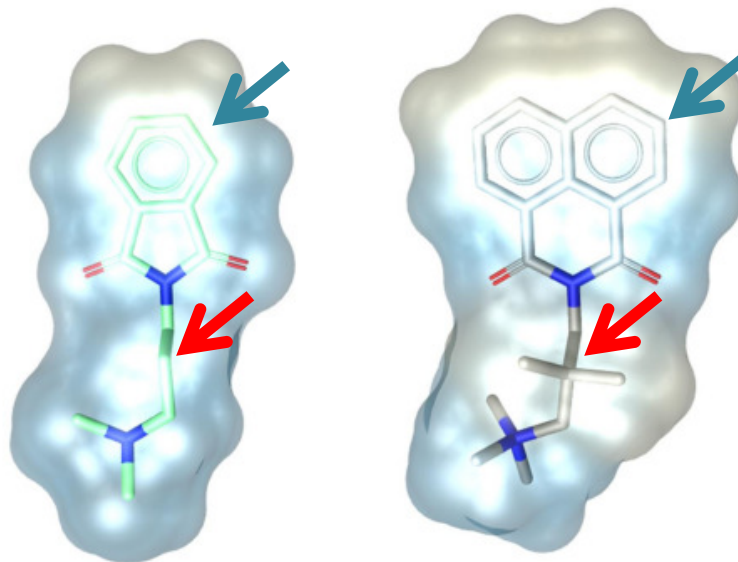


Abbildung 80: Vergleich des Volumens von Iper-6-phth (links) und Iper-6-naph (rechts).

Übernommen von Dr. Marcel Bermudez und Professor Wolber, Freie Universität, Berlin (nicht publiziert).

Unterschiede innerhalb der beiden Molekülstrukturen sind durch die Pfeile gekennzeichnet.

Abbildung 80 zeigt die Unterschiede in dem Volumen von Iper-6-phth und Iper-6-naph. Neben dem größeren allosterischen Rest (vgl. blaue Pfeile in Abbildung 80), weist Iper-6-naph, im Vergleich zu Iper-6-phth, zwischen dem positiv geladenen Stickstoff und dem Ringsystem an Position zwei des Trimethylen-„Linkers“ zwei zusätzliche Methylreste auf (vgl. rote Pfeile in Abbildung 80). Auch in diesem Bereich kommt es folglich zu einer Volumenzunahme, welche die Flexibilität des Ligand-besetzten Rezeptors weiter einschränkt.

Bock et al. (2012) konnten zeigen, dass der präferierte Signalweg des M2-Rezeptors, der

$G_{i/o}$ -abhängige Signalweg, weniger durch die allosterische Bindung beeinflusst wird, als der sekundäre Signalweg, also die Aktivierung von G_s Proteinen. Auch in den Untersuchungen am M1-Rezeptor konnte gezeigt werden, dass die vom M1-Rezeptor präferierten $G_{q/11}$ Proteine, gemessen in IP1-Assays, weniger durch die Einschränkung der Flexibilität in der allosterischen Bindungstasche beeinflusst werden, als die Aktivierung der weniger präferierten G_s Proteine. Iper-6-phth fungierte als $G_{q/11}$ -selektiver Agonist. Im $G_{q/11}$ -abhängigen Signalweg wies diese Substanz eine intrinsische Aktivität von $55,0 \pm 1,5$ % auf, in G_s - und $G_{i/o}$ -abhängigen Signalwegen wirkte sie jedoch antagonistisch. Diese funktionelle Selektivität, die Iper-6-phth am M1-Rezeptor zeigte, ist in der Arzneimittelforschung von großem Interesse, da die Substanzen gezielter eingesetzt und kontrolliert werden können und die Therapie weniger durch unerwünschte Arzneimittelwirkungen belastet wird. Der $G_{i/o}$ -abhängige Signalweg wurde zu einem noch größeren Ausmaß durch die Okkupierung der allosterischen Bindungstasche behindert. Nur die beiden Hybride Iper-8-phth und Iper-fri-phth konnten eine $G_{i/o}$ Protein-Aktivierung induzieren (Kapitel 4.6.5, Abbildung 43). Thomas et al. (2008) konnten für die beiden allosterischen Agonisten 77-LH-28-1 und AC-42 in [35 S]GTP γ S-Bindungsversuchen am M1-Rezeptor ebenfalls keine Aktivierung von $G_{i/o}$ Proteinen zeigen. Sie beobachteten, dass allosterische Agonisten, im Vergleich zu orthosterischen Partialagonisten mit ähnlicher intrinsischer Aktivität in anderen Signalwegen, den GDP/GTP-Austausch an $G_{i/o}$ Proteinen weniger effektiv induzieren können (Thomas et al., 2008). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und die von Thomas et al. (2008) suggerieren, dass der $G_{i/o}$ -Signalweg hoch sensitiv gegenüber einer Einschränkung der Flexibilität des allosterischen Vestibüls ist.

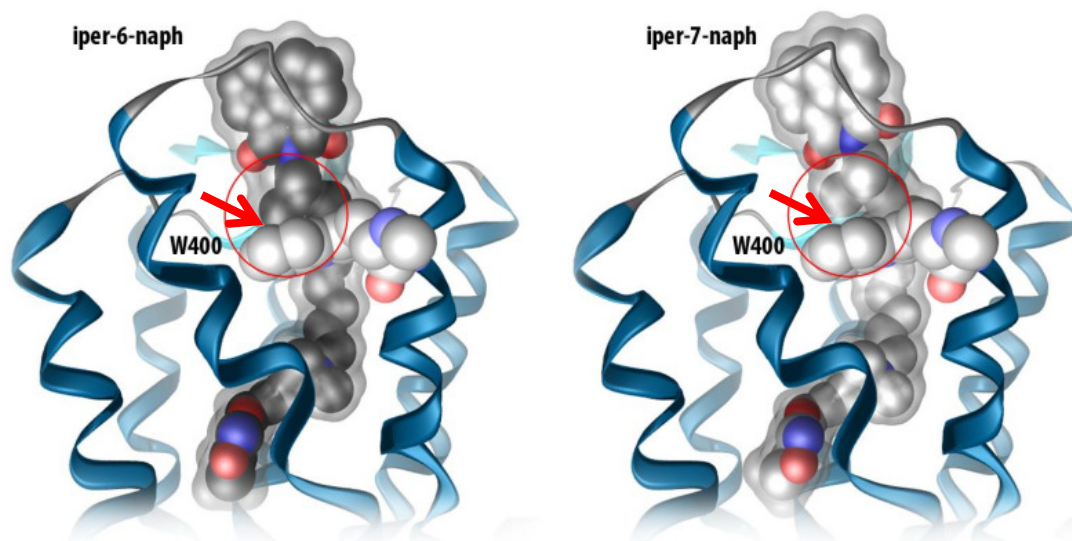


Abbildung 81: Die zwei zusätzlichen Methylgruppen in den „naph-Hybriden“ führten bei Liganden mit kurzen „Linker-Ketten“ (vgl. Iper-6-naph) zu einer sterischen Kollision mit der Aminosäure W400.

Ergebnisse einer „Molecular Docking Simulation“ durch Dr. Marcel Bermudez und Professor Wolber, Freie Universität, Berlin (nicht publiziert). Der rote Pfeil kennzeichnet den Unterschied in der sterischen Anordnung der beiden Methylreste in den Molekülen Iper-6-naph (links) und Iper-7-naph (rechts).

Abbildung 81 verdeutlicht den Unterschied in der sterischen Anordnung der zwei zusätzlichen Methylreste in den Naphthalimid-Hybriden in Abhängigkeit von der Kettenlänge. Die Aminosäure W400 spielt eine wichtige Rolle in der Bindung allosterischer Liganden an das Rezeptor-Protein (Matsui et al., 1995). In der Substanz Iper-6-naph (Abbildung 81, links) führten die beiden Methylreste zu einer sterisch ungünstigen Anordnung, sodass es zu einer Kollision mit der Aminosäure W400 kam. Dadurch wurden bei der Bindung von Iper-6-naph an den M1-Rezeptor bevorzugt inaktive Rezeptor-Konformationen induziert. Iper-6-naph konnte zwar an den M1-Rezeptor binden (Kapitel 4.3, Abbildung 13), aber konnte keine G Protein-abhängigen Signalkaskaden induzieren und zeigte somit antagonistisches Verhalten am M1-Rezeptor. Untersuchungen an M2-, M3- und M4-Rezeptoren zeigten, dass Iper-6-naph diese Rezeptoren zumindest für die Aktivierung von zwei unterschiedlichen G Protein-Familien aktivieren konnte (Dissertation Janßen, 2011; Bock et al., 2012; Dissertation Vogel, 2015). Iper-6-naph konnte aufgrund dieser Datenlage als M1-selektiver Antagonist charakterisiert werden (für den M5-Rezeptor liegen derzeit keine entsprechenden Daten vor). Da die Molekülstruktur von Iper-6-phth diese zwei Methylreste nicht aufwies, führte die Bindung dieser Substanz nicht zu einer sterischen Kollision mit W400 und Iper-6-phth konnte aktive Rezeptor-Konformationen stabilisieren, welche in der Folge zu einer Aktivierung der $G_{q/11}$ -abhängigen Signalkaskade führten. G_s und $G_{i/o}$ Proteine konnten im Gegensatz dazu

nicht durch die Bindung von Iper-6-phth an den M1-Rezeptor aktiviert werden. Iper-6-phth fungierte also als $G_{q/11}$ -selektiver Agonist. Untersuchungen an M2-, M3- und M4-Rezeptoren zeigten, dass Iper-6-phth mehr als eine G Protein-Familie in diesen Rezeptor-Subtypen aktivieren konnte und damit keine Signalweg-Selektivität in M2-, M3- und M4-Rezeptoren zeigt (Dissertation Janßen, 2011; Bock et al., 2012; Dissertation Vogel, 2015). Durch die verlängerte Alkyl-Kette in der Testsubstanz Iper-7-naph (Abbildung 81, rechts) verschob sich die Position der zwei Methylreste innerhalb des Rezeptor-Proteins, sodass diese nicht mehr mit der Aminosäure W400 kollidierten. Folglich wurde die Rezeptor-Aktivierung durch längere „Linker“ verbessert und der Rezeptor konnte verschiedene G Protein-Familien promiskuitiv aktivieren. Durch eine Verlängerung der „Linker“-Ketten gewinnt der Rezeptor wieder an Flexibilität und die intrinsische Aktivität der Substanzen wurde verbessert, zu Lasten der selektiven Signalwegsaktivierung. Zeigte Iper-6-phth noch $G_{q/11}$ -selektives Aktivierungsverhalten und Iper-6-naph M1-selektiven Antagonismus, konnten die Hybride mit längeren Alkyl-Ketten sowohl alle muskarinischen Rezeptor-Subtypen, als auch G Proteine unterschiedlicher G Protein-Familien aktivieren (für den M5-Rezeptor liegen keine Daten vor). Die Iper-7-X und Iper-10-X Hybride konnten neben $G_{q/11}$ Proteinen auch G_s Proteine aktivieren. Iper-8-phth und Iper-fri-phth konnten darüber hinaus auch noch $G_{i/o}$ -abhängige Signalwege aktivieren, ihre korrespondierenden Hybridliganden mit dem voluminöseren Rest Naphthalimid induzierten im Gegensatz dazu nur eine Aktivierung von $G_{q/11}$ und G_s Proteinen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden wesentliche Unterschiede zwischen der Aktivierung des M1-Rezeptors und der, der anderen muskarinischen Subtypen heraus gearbeitet. Die erhobenen Daten für die beiden Substanzen Iper-6-phth und Iper-6-naph zeigten, dass der M1-Rezeptor sensitiver gegenüber einer Restriktion des allosterischen Vestibüls ist, als die Subtypen M2, M3 und M4 (für den M5-Rezeptor liegen derzeit keine Daten vor). Iper-6-phth konnte in der hier vorliegenden Arbeit als $G_{q/11}$ -selektiver Agonist charakterisiert werden; Iper-6-naph als M1-selektiver Antagonist. Diese Daten verdeutlichen die Bedeutung der Flexibilität der allosterischen Bindungstasche für die Signalwegs-Aktivierung des M1-Rezeptors. Weitere Modifikationen der allosterischen Substituenten und der „Linker“-Ketten könnten in der Zukunft zu weiteren Subtyp-selektiven Substanzen führen.

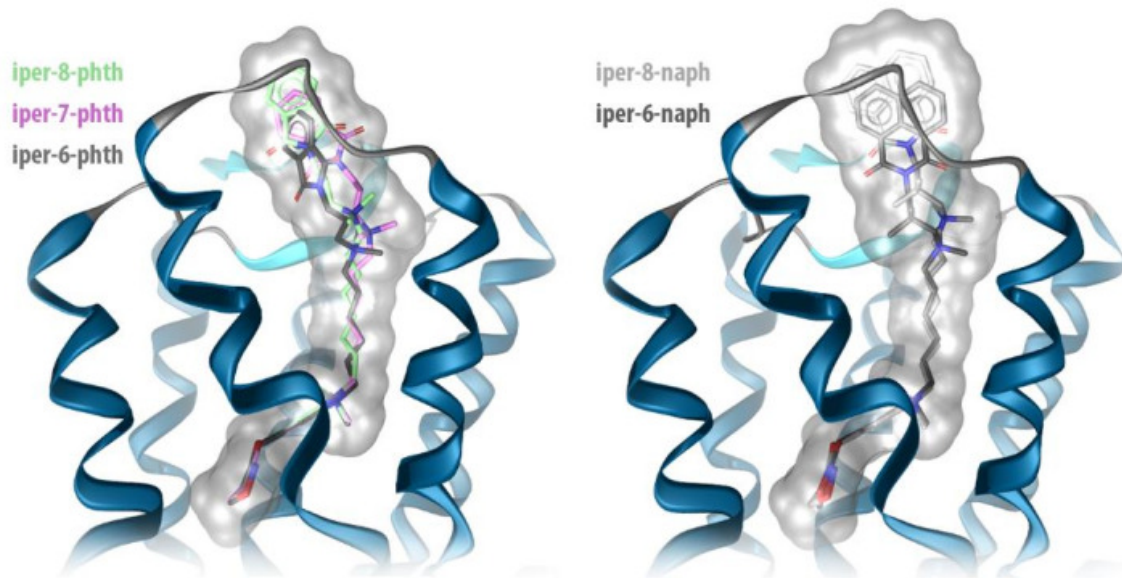


Abbildung 82: Vergleich der Lokalisation der Hybride mit Alkyl-„Linkern“ im M1-Rezeptor.

Ergebnisse einer „Molecular Docking-Simulation“ durch Dr. Marcel Bermudez und Professor Wolber, Freie Universität, Berlin (nicht publiziert).

Der orthosterische Baustein Iperoxo zeigte bei allen Hybriden, die im Rahmen dieser Arbeit genutzt wurden, eine nahezu identische Position im Rezeptor-Protein. Die Lage des allosterischen Restes war stark abhängig von der Art und der Länge des jeweiligen „Linkers“ (Abbildung 82). „Molecular Docking“ Simulationen zeigten, dass Iper-6-naph bevorzugt an die inaktive Struktur des M1-Rezeptors bindet, da es aufgrund der beiden zusätzlichen Methylreste in der Molekülstruktur des Iper-6-naphs zu einer sterischen Beeinträchtigung der Rezeptor-Bindung kam, vor allem im Bereich der Aminosäure W400 (Abbildung 81, Dr. Bermudez, nicht publiziert). Bock et al. (2012) konnten bereits für den M2-Rezeptor zeigen, dass die Lage des allosterischen Substituenten im extrazellulären Vestibül eine wichtige Rolle für die Signalwegsaktivierung spielt. Durch die Restriktion der Flexibilität des Rezeptor-Proteins, in Folge der allosterischen Bindung, kam es auch in den intrazellulären Schleifen zu einer Beeinträchtigung der Konformationsänderung und damit zu einer gestörten Signaltransduktion (Bock et al., 2012).

Durch eine Substitution der Alkyl-Kette gegen „Diamid-Linker“ wurde ersichtlich, dass diese Art von „Linker“-Ketten bezogen auf den allosterischen Rest gegenläufige Effekte auf die G Protein-Aktivierung ausüben; Iper-fri-phth unterschied sich weder in der intrinsischen Aktivität noch in der Wirksamkeit signifikant von Acetylcholin und konnte somit als Vollagonist für $G_{q/11}$ - und G_s -abhängige Signalwege klassifiziert werden. Iper-fri-naph zeigte in IP1-Assays mit einer intrinsischen Aktivität von $75,7 \pm 0,6$ % und einer Wirksamkeit von $6,59 \pm 0,08$ signifikante Unterschiede zu dem endogenen Liganden Acetylcholin. In G_s -abhängigen

Signalwegen war die intrinsische Aktivität von Iper-fri-naph mit $37,2 \pm 3,4 \%$ hoch signifikant verschieden von dem Effekt, der durch Acetylcholin ausgelöst wurde. Der starre „Diamid-Linker“, der seine Position im Rezeptor-Protein durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken stabilisiert, fixiert den allosterischen Substituenten im extrazellulären Vestibül. Im Fall des „Phth-Hybrids“ führt diese starre Anordnung zu einer höheren intrinsischen Aktivität in $G_{q/11}$ -, G_s - und $G_{i/o}$ -abhängigen Signalwegen im Vergleich zu dem Hybrid Iper-8-phth, welches eine ähnliche Kettenlänge aufweist (vgl. Abbildung 83). Iper-fri-phth und Iper-8-phth unterscheiden sich folglich nur in der Art der „Linker“-Kette. In ERK-Phosphorylierungs-Reaktionen fungierten beide Hybride als Vollagonist.

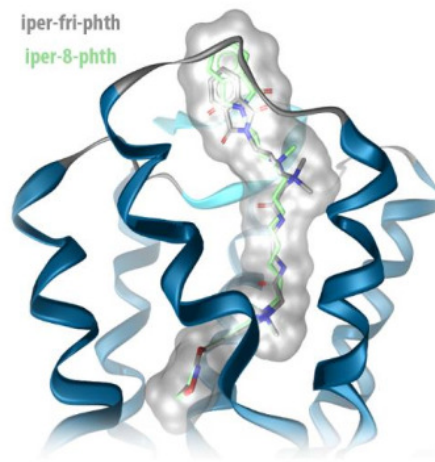


Abbildung 83: Vergleich der Lokalisation der beiden Hybride Iper-8-phth und Iper-fri-phth im M1-Rezeptor.

Ergebnisse einer „Molecular Docking-Simulation“ durch Dr. Marcel Bermudez und Professor Wolber, Freie Universität, Berlin (nicht publiziert).

Im Fall des „Naph-Hybrids“ führte diese starre Anordnung des Moleküls Iper-fri-naph im Rezeptor-Protein zu einer weiteren Einschränkung der Rezeptor-Flexibilität, welche im Vergleich zu dem, in der Kettenlänge korrespondierenden Hybrid, Iper-8-naph, in einer reduzierten intrinsischen Aktivität in $G_{q/11}$ -abhängigen Signalwegen resultierte. In G_s -abhängigen Signalwegen unterschieden sich Iper-fri-naph und Iper-8-naph in ihrer intrinsischen Aktivität nicht signifikant voneinander. Zudem konnten beide Hybride den Rezeptor nicht für die Rekrutierung von $G_{i/o}$ Proteinen aktivieren. Dieser Signalweg scheint folglich hoch sensitiv auf eine Restriktion der Flexibilität im allosterischen Bindungsareal zu reagieren.

G Protein-gekoppelte Rezeptoren können in Abhängigkeit des Liganden unterschiedliche, aktive Rezeptor-Konformationen ausbilden, die sich in ihrer Signaltransduktion und der

Rekrutierung von G Proteinen unterscheiden können (z.B. Christopoulos et al., 1998; Kenakin, 2003). In Anlehnung an dieses Konzept lassen sich die Unterschiede im Aktivierungsverhalten der dualsterischen Hybride so erklären, dass diese in Abhängigkeit des „Linkers“ und des allosterischen Restes unterschiedliche Konformationen im Rezeptor-Protein induzieren, die in ihren Effekten auf das Aktivierungsmuster des Rezeptors variieren (vgl. Thomas et al., 2008). Sowohl der orthosterische, als auch der allosterische Baustein des Liganden können die Konformation des Rezeptors beeinflussen (z.B. Mohr et al., 2013). Bei den hier genutzten Hybridliganden induzierte der orthosterische Baustein Iperoxo, als agonistisch-wirkende Substanz eine aktive Rezeptor-Konformation. Der allosterische Substituent, als inverser Agonist, stabilisierte eine inaktive Konformation des Rezeptors. Dieser „functional misfit“ (Mohr et al., 2010) der beiden Bausteine wirkt sich folglich gegenläufig auf die Rezeptor-Aktivierung aus, weswegen sich die intrinsische Aktivität der Hybridliganden zum Teil hoch signifikant von der, der Muttersubstanz Iperoxo unterscheidet. Interessanterweise, zeigten die „naph-Hybride“ trotz ihrer geringeren intrinsischen Aktivität am M1-Rezeptor eine signifikant höhere Affinität und Wirksamkeit zu diesem als ihre korrespondierenden Hybridliganden mit dem kleineren allosterischen Rest Phthalimid. Auch dieses Phänomen beruht vermutlich auf der Induzierung unterschiedlicher Rezeptor-Konformationen durch die „naph-“ beziehungsweise „phth-Hybride“. Neben einem dualsterischen Bindungsmodus können die Hybride auch rein allosterisch binden. Eine rein allosterische Bindung durch Phthalimid oder Naphthalimid würde nicht zu einer Aktivierung des Rezeptors führen, was sich in der Wirksamkeit des Hybrids widerspiegeln würde.

„Molecular Docking Simulationen“ am M1-Rezeptor ergaben, dass aufgrund des engeren extrazellulären Vestibüls im Vergleich zum M2-Rezeptor voluminöse allosterische Reste bevorzugt in der dualsterischen Bindungspose und nicht rein allosterisch binden (Dr. Bermudez, nicht publiziert). Eine genaue Aussage über den Bindungsmodus der dualsterischen Hybride am M1-Rezeptor ist zu diesem Zeitpunkt nicht möglich. Aufgrund der Befunde von Dr. Bermudez wäre es jedoch denkbar, dass eine größere Fraktion der „naph-Hybride“ in der dualsterischen Bindungspose an den M1-Rezeptor bindet und diese damit eine höhere Wirksamkeit und Affinität zum M1-Rezeptor zeigen, als die „phth-Hybride“, die eventuell bevorzugt rein allosterisch binden. Aufgrund der überexprimierten M1-Rezeptoren in CHO-Zellen und der damit verbundenen Rezeptor-Reserve reichte die geringere Fraktion, der dualsterisch-bindenden „phth-Hybride“ scheinbar aus, um zum Teil vollagonistische Effekte in IP1-Assays zu vermitteln und damit höhere intrinsische Aktivitäten als die „naph-Hybride“ aufzuweisen, die wie oben beschrieben bevorzugt inaktive Rezeptor-Konformationen stabilisieren.

6 Zusammenfassung

Muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren vom Subtyp 1 koppeln bevorzugt an G Proteine der $G_{q/11}$ -Familie, können aber promiskuitiv auch G Proteine anderer Familien aktivieren. Dualsterische Hybridliganden bieten aufgrund der Bindung an weniger konservierte allosterische Bindungsareale im Gegensatz zu orthosterisch-bindenden Liganden das Potential sowohl Subtyp- als auch Signalweg-selektiv zu sein. Eigenschaften, die in der Arzneimittelforschung von großem Interesse sind, um Wirkstoffe gezielter anwenden zu können und das Spektrum unerwünschter Arzneimittel-Wirkungen gering zu halten.

Die dualsterischen Hybridliganden führten zu einer Einschränkung der Flexibilität innerhalb der allosterischen Bindungstasche und konnten in Abhängigkeit von der Art und Länge ihrer „Linker“-Ketten und ihrem allosterischen Substituenten die Signaltransduktion am muskarinischen M1-Rezeptor einschränken. Durch die Substanz **Iper-6-phth** gelang es eine Signalwegs-Selektivität am M1-Subtyp zu erreichen; sie konnte als $G_{q/11}$ -selektive Substanz an diesem Subtyp charakterisiert werden. **Iper-6-naph** zeigte in funktionellen Experimenten keine intrinsische Aktivität, konnte jedoch an den M1-Rezeptor binden und zeigte dementsprechend antagonistischen Charakter. Vorherige Studien an den anderen muskarinischen Subtypen klassifizierten Iper-6-naph als Partialagonist (Dissertation Janßen, 2011; Bock et al., 2012; Dissertation Vogel, 2015). Iper-6-naph war folglich ein M1-selektiver Antagonist. Durch einen Vergleich der funktionellen Untersuchungen mit Iper-6-phth und Iper-6-naph an M1-, M2-, M3- und M4-Rezeptoren zeigte sich, dass der M1-Rezeptor am sensitivsten gegenüber einer Restriktion der allosterischen Flexibilität ist (vgl. Dissertation Janßen, 2011; Bock et al., 2012; Dissertation Vogel, 2015). Diese Ergebnisse zeigen, dass es tatsächlich möglich ist, durch den Einsatz dualsterischer Liganden sowohl eine Subtyp- als auch eine Signalwegs-Selektivität zu erreichen. Durch längere „Linker“-Ketten verbesserte sich die Flexibilität innerhalb des Rezeptor-Proteins wieder und die dualsterischen Hybridliganden mit längeren Alkyl-„Linkern“ beziehungsweise einem Diamid-„Linker“ (-fri-, synthetisiert von dem Arbeitskreis um Herrn Professor De Amici, Mailand) konnten promiskuitiv verschiedene Signalwege einleiten. Aufgrund des „functional misfits“ (Mohr et al., 2010) zwischen dem orthosterischen Agonisten Iperoxo und dem inversen Agonisten Phthalimid beziehungsweise Naphthalimid als allosterischem Substituenten, zeigten alle Hybridliganden in den drei untersuchten Signalwegen eine geringere Wirksamkeit, angegeben als EC_{50} -Wert, als die Muttersubstanz Iperoxo. Auch die intrinsische Aktivität der Hybride war zum Teil signifikant geringer als die der Muttersubstanz. Mit Ausnahme von Iper-8-phth und Iper-fri-phth konnte keine der hier untersuchten dualsterischen Substanzen den M1-Rezeptor für die Rekrutierung von $G_{i/o}$ Proteinen

aktivieren. Es ergab sich aufgrund der Daten aus funktionellen Experimenten folgende Reihenfolge in Bezug auf die Sensitivität des Signalwegs gegenüber einer Einschränkung der allosterischen Rezeptor-Flexibilität $G_{q/11} < G_s < G_{i/o}$. Folglich scheint der $G_{i/o}$ -vermittelte Signalweg am sensitivsten auf die Einschränkung der allosterischen Rezeptor-Flexibilität zu reagieren. Untersuchungen des G_s -abhängigen Signalwegs unter Zusatz des spezifischen $G_{q/11}$ Protein-Inhibitors FR zeigten, dass die Hybridliganden mit dem voluminösen Rest „naph“ G_s -abhängige Signalwege nur in Abhängigkeit aktiver $G_{q/11}$ Proteine einleiten konnten. Die „phth“ Hybride, mit Ausnahme von Iper-6-phth, konnten die Adenylylzyklen auch allein über G_s Proteine stimulieren, jedoch verstärkte sich der Effekt auf Adenylylzyklen signifikant in Anwesenheit aktiver $G_{q/11}$ Proteine. Auch der G_s -abhängige Signalweg zeigte sich demzufolge hoch sensitiv gegenüber einer Einschränkung der Flexibilität des allosterischen Bindungsareals.

Durch die Untersuchung der drei orthosterischen Liganden Acetylcholin, Carbachol und Iperoxo konnten auch Unterschiede in der Signalwegs-Aktivierung detektiert werden, die nicht auf der allosterischen Bindungstasche basieren. Die intrinsische Aktivität von Iperoxo für $G_{i/o}$ -abhängige Signalwege war signifikant höher, als die des endogenen Ligandens Acetylcholin. Iperoxo konnte also als Superagonist für $G_{i/o}$ -abhängige Signalwege identifiziert werden. Carbachol fungierte hingegen nur als Partialagonist für die Rekrutierung von $G_{i/o}$ Proteinen. Iperoxo und Carbachol scheinen folglich andere Rezeptor-Konformationen zu induzieren, als der endogene Ligand und unterscheiden sich dadurch sowohl in ihrer Affinität zum M1-Rezeptor als auch in ihrer intrinsischen Aktivität.

Die Interaktionen der Liganden mit der orthosterischen, als auch mit der allosterischen Bindungstasche spielen folglich eine Schlüsselrolle in der Signaltransduktion.

Ein weiteres Hauptziel dieser Arbeit war die Untersuchung eines möglichen „Cross-talks“ zwischen den untersuchten Signalwegen der $G_{q/11}$, G_s und $G_{i/o}$ Proteine.

Die Phospholipase C β kann sowohl durch $G_{q/11}$ Proteine als auch durch die $\beta\gamma$ -Untereinheit von $G_{i/o}$ Proteinen aktiviert werden (vgl. Übersichtsarbeit Exton, 1996). Mithilfe des $G_{i/o}$ -Inhibitors PTX konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass $G_{i/o}$ Proteine maßgeblich an der Generierung von intrazellulärem IP1 in CHO-M1 Zellen beteiligt waren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde postuliert, dass $G_{q/11}$ und $G_{i/o}$ Proteine einen synergistischen Effekt auf die Synthese von intrazellulärem IP1 in CHO-M1 Zellen haben. Durch den Zusatz des $G_{q/11}$ Protein-Inhibitors FR zeigte sich, dass $G_{i/o}$ Proteine keinen alleinigen Effekt auf die intrazelluläre IP1-Synthese haben, sondern nur in Abhängigkeit aktiver $G_{q/11}$ Proteine die Phospholipase C aktivieren können.

Ein zweiter Mechanismus eines „Cross-talks“ in den Signalkaskaden des M1-Rezeptors wurde auf der Höhe der Adenylylzyklasen identifiziert. In CHO-Zellen, welche im Rahmen dieser Arbeit als Expressions-Modell des muskarinischen M1-Rezeptors dienten, werden Adenylylzyklasen des Subtyps VI und VII (ACVI und ACVII) exprimiert (Varga et al., 1998). ACVI wird durch Ca^{2+} , welches zum Beispiel infolge einer $G_{q/11}$ Protein-Aktivierung aus intrazellulären Speichern freigesetzt wird, inhibiert (z.B. Hanoune et al., 1997). ACVII ist nicht sensitiv gegenüber eines Ca^{2+} -Einstroms, kann jedoch synergistisch durch $\beta\gamma$ -Untereinheiten und $G\alpha_s$ Proteine aktiviert werden (z.B. Hanoune et al., 1997). In den hier untersuchten CHO-M1 Zellen übten neben G_s Proteinen auch $G_{q/11}$ Proteine einen stimulierenden Effekt auf Adenylylzyklasen aus. Der spezifische $G_{q/11}$ -Inhibitor FR konnte die Konzentration an intrazellulärem cAMP signifikant senken. Der Ca^{2+} -Chelator BAPTA-AM hatte keinen Effekt auf die Konzentration von cAMP. Deswegen wurde im Rahmen dieser Arbeit postuliert, dass $\beta\gamma$ -Untereinheiten der simultan aktivierten $G_{q/11}$ Proteine einen synergistischen Effekt mit $G\alpha_s$ Proteinen auf die Aktivierung von Adenylylzyklasen ausüben. Der „Cross talk“ verläuft somit über die Isoform VII der Adenylylzyklasen. Durch den simultanen Zusatz der G Protein-Inhibitoren PTX und FR zeigte sich, dass $G_{i/o}$ Proteine nur dann einen Effekt auf die Adenylylzyklasen in CHO-M1 Zellen ausüben, wenn die präferierten $G_{q/11}$ Proteine inhibiert wurden.

Die „take-home message“ ist somit, dass das Signaltransduktions-Repertoire des M1-Rezeptors hoch sensitiv von der Konformation der orthosterischen als auch der allosterischen Bindungstasche abhängt. Der M1-Rezeptor konnte promiskuitiv alle G Protein-Klassen aktivieren, jedoch konnte das Signaltransduktions-Repertoire dieses Rezeptors sowohl durch orthosterische als auch dualsterische Liganden moduliert und zum Teil eingeschränkt werden. Durch den Einsatz verschiedener G Protein-Inhibitoren bzw. Aktivatoren konnten des Weiteren verschiedene „Cross-talk“ Mechanismen innerhalb der Signalkaskaden des muskarinischen M1-Rezeptors aufgedeckt werden.

7 Literaturverzeichnis

Adham, N.; Ellerbrock, B.; Hartig, P.; Weinshank, R. L.; Branchek, T. (1993): Receptor reserve masks partial agonist activity of drugs in a cloned rat 5-hydroxytryptamine_{1B} receptor expression system. In: *Molecular pharmacology* 43 (3), S. 427–433.

Akam, E. C.; Challiss, R. A.; Nahorski, S. R. (2001): G(q/11) and G(i/o) activation profiles in CHO cells expressing human muscarinic acetylcholine receptors. Dependence on agonist as well as receptor-subtype. In: *British journal of pharmacology* 132 (4), S. 950–958. DOI: 10.1038/sj.bjp.0703892.

Anagnostaras, S. G.; Murphy, G. G.; Hamilton, S. E.; Mitchell, S. L.; Rahnema, N. P.; Nathanson, N. M.; Silva, A. J. (2003): Selective cognitive dysfunction in acetylcholine M1 muscarinic receptor mutant mice. In: *Nature neuroscience* 6 (1), S. 51–58. DOI: 10.1038/nn992.

Antony, J.; Kellershohn, K.; Mohr-Andrä, M.; Kebig, A.; Prilla, S.; Muth, M. et al. (2009): Dualsteric GPCR targeting. A novel route to binding and signaling pathway selectivity. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23 (2), S. 442–450. DOI: 10.1096/fj.08-114751.

Atwood, B. K.; Lopez, J.; Wager-Miller, J.; Mackie, K.; Straiker, A. (2011): Expression of G protein-coupled receptors and related proteins in HEK293, AtT20, BV2, and N18 cell lines as revealed by microarray analysis. In: *BMC genomics* 12, S. 14. DOI: 10.1186/1471-2164-12-14.

Barlow, R.; Blake, J. F. (1989): Hill coefficients and the logistic equation. In: *Trends in pharmacological sciences* 10 (11), S. 440–441. DOI: 10.1016/S0165-6147(89)80006-9.

Bennet J. P.; Yamamura H. I. (1985) Neurotransmitter, hormone or drug receptor binding methods. Neurotransmitter receptor binding. New York, Raven Press, 2. Ausgabe.

Bennett, K. A.; Langmead, C. J.; Wise, A.; Milligan, G. (2009): Growth hormone secretagogues and growth hormone releasing peptides act as orthosteric super-agonists but not allosteric regulators for activation of the G protein G α (o1) by the Ghrelin receptor. In: *Molecular pharmacology* 76 (4), S. 802–811. DOI: 10.1124/mol.109.056101.

Berg, K. A.; Maayani, S.; Goldfarb, J.; Clarke, W. P. (1998): Pleiotropic behavior of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptor agonists. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 861, S. 104–110.

Beyersdorf, N.; Hanke, T.; Kerkau, T.; Hünig, T. (2005): Superagonistic anti-CD28 antibodies. Potent activators of regulatory T cells for the therapy of autoimmune diseases. In: *Annals of the rheumatic diseases* 64 Suppl 4, iv91-5. DOI: 10.1136/ard.2005.042564.

Birdsall, N. J. M.; Lazareno, S. (2005): Allosterism at muscarinic receptors. Ligands and mechanisms. In: *Mini reviews in medicinal chemistry* 5 (6), S. 523–543.

Black, J. W.; Leff, P. (1983): Operational models of pharmacological agonism. In: *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 220 (1219), S. 141–162.

Blank, J. L.; Ross, A. H.; Exton, J. H. (1991): Purification and characterization of two G-proteins that activate the beta 1 isozyme of phosphoinositide-specific phospholipase C. Identification as members of the G α q class. In: *The Journal of biological chemistry* 266 (27), S. 18206–18216.

- Blank, J. L.; Brattain, K. A.; Exton, J. H. (1992): Activation of cytosolic phosphoinositide phospholipase C by G-protein beta gamma subunits. In: *The Journal of biological chemistry* 267 (32), S. 23069–23075.
- Blin, N.; Yun, J.; Wess, J. (1995): Mapping of single amino acid residues required for selective activation of Gq/11 by the m3 muscarinic acetylcholine receptor. In: *The Journal of biological chemistry* 270 (30), S. 17741–17748.
- Block, G. A.; Martin, K. J.; Francisco, A. L. M. de; Turner, S. A.; Avram, M. M.; Suranyi, M. G. et al. (2004): Cinacalcet for secondary hyperparathyroidism in patients receiving hemodialysis. In: *The New England journal of medicine* 350 (15), S. 1516–1525. DOI: 10.1056/NEJMoa031633.
- Bock, A.; Merten, N.; Schrage, R.; Dallanocce, C.; Bätz, J.; Klöckner, J. et al. (2012): The allosteric vestibule of a seven transmembrane helical receptor controls G-protein coupling. In: *Nature communications* 3, S. 1044. DOI: 10.1038/ncomms2028.
- Bonner, T. I.; Buckley, N. J.; Young, A. C.; Brann, M. R. (1987): Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. In: *Science (New York, N.Y.)* 237 (4814), S. 527–532.
- Boyer, J. L.; Waldo, G. L.; Harden, T. K. (1992): Beta gamma-subunit activation of G-protein-regulated phospholipase C. In: *The Journal of biological chemistry* 267 (35), S. 25451–25456.
- Breivogel, C. S.; Selley, D. E.; Childers, S. R. (1998): Cannabinoid receptor agonist efficacy for stimulating 35SGTPgammaS binding to rat cerebellar membranes correlates with agonist-induced decreases in GDP affinity. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (27), S. 16865–16873.
- Burford, N. T.; Tobin, A. B.; Nahorski, S. R. (1995): Differential coupling of m1, m2 and m3 muscarinic receptor subtypes to inositol 1,4,5-trisphosphate and adenosine 3',5'-cyclic monophosphate accumulation in Chinese hamster ovary cells. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 274 (1), S. 134–142.
- Burford, N. T.; Nahorski, S. R. (1996): Muscarinic m1 receptor-stimulated adenylate cyclase activity in Chinese hamster ovary cells is mediated by Gs alpha and is not a consequence of phosphoinositidase C activation. In: *The Biochemical journal* 315 (Pt 3), S. 883–888.
- Burgen, A. S. (1966): The drug-receptor complex. In: *The Journal of pharmacy and pharmacology* 18 (3), S. 137–149.
- Bylund, D. B.; Deupree, J. D.; Toews, M. L. (2004): Radioligand-binding methods for membrane preparations and intact cells. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 259, S. 1–28. DOI: 10.1385/1-59259-754-8:001.
- Caulfield, M.; Straughan, D. (1983): Muscarinic receptors revisited. In: *Trends in Neurosciences* 6, S. 73–75. DOI: 10.1016/0166-2236(83)90041-3.
- Caulfield, M. P. (1993): Muscarinic receptors—characterization, coupling and function. In: *Pharmacology & therapeutics* 58 (3), S. 319–379.
- Caulfield, M. P.; Birdsall, N. J. (1998): International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. In: *Pharmacological reviews* 50 (2), S. 279–290.
- Chen, J. L.; Dunbar, P. R.; Gileadi, U.; Jäger, E.; Gnjatic, S.; Nagata, Y. et al. (2000): Identification of NY-ESO-1 peptide analogues capable of improved stimulation of tumor-
-

reactive CTL. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 165 (2), S. 948–955.

Cheng, Y.; Prusoff, W. H. (1973): Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. In: *Biochemical pharmacology* 22 (23), S. 3099–3108.

Chern, Y. (2000): Regulation of adenylyl cyclase in the central nervous system. In: *Cellular signalling* 12 (4), S. 195–204.

Christopoulos, A.; Lanzafame, A.; Mitchelson, F. (1998): Allosteric interactions at muscarinic cholinergic receptors. In: *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 25 (3-4), S. 185–194.

Christopoulos, A. (2002): Allosteric binding sites on cell-surface receptors. Novel targets for drug discovery. In: *Nature reviews. Drug discovery* 1 (3), S. 198–210. DOI: 10.1038/nrd746.

Christopoulos, A.; Kenakin, T. (2002): G protein-coupled receptor allosterism and complexing. In: *Pharmacological reviews* 54 (2), S. 323–374.

Christopoulos, A. (2014): Advances in G protein-coupled receptor allosterism. From function to structure. In: *Molecular pharmacology* 86 (5), S. 463–478. DOI: 10.1124/mol.114.094342.

Colabufo, N.A.; Perrone M.G.; Contino, M.; Berardi, F.; Perrone, R. (2007): Receptor-drug interaction. Europium employment for studying the biochemical pathway of g-protein-coupled receptor activation. In: *Metal-based drugs 2007*, S. 12635. DOI: 10.1155/2007/12635.

Conn, P. J.; Jones, C. K.; Lindsley, C. W. (2009): Subtype-selective allosteric modulators of muscarinic receptors for the treatment of CNS disorders. In: *Trends in pharmacological sciences* 30 (3), S. 148–155. DOI: 10.1016/j.tips.2008.12.002.

Cooper, D. M. F. (2003): Molecular and cellular requirements for the regulation of adenylate cyclases by calcium. In: *Biochemical Society transactions* 31 (Pt 5), S. 912–915.

Dallanoce, C.; Conti, P.; Amici, M. de; Micheli, C. de; Barocelli, E.; Chiavarini, M. et al. (1999): Synthesis and functional characterization of novel derivatives related to oxotremorine and oxotremorine-M. In: *Bioorganic & medicinal chemistry* 7 (8), S. 1539–1547.

De Lean, A.; Stadel, J. M.; Lefkowitz, R. J. (1980): A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. In: *The Journal of biological chemistry* 255 (15), S. 7108–7117.

DeBlasi, A.; O'Reilly, K.; Motulsky, H. J. (1989): Calculating receptor number from binding experiments using same compound as radioligand and competitor. In: *Trends in pharmacological sciences* 10 (6), S. 227–229.

Dell'Acqua, M. L.; Carroll, R. C.; Peralta, E. G. (1993): Transfected m2 muscarinic acetylcholine receptors couple to G alpha i2 and G alpha i3 in Chinese hamster ovary cells. Activation and desensitization of the phospholipase C signaling pathway. In: *The Journal of biological chemistry* 268 (8), S. 5676–5685.

Deng, H.; Sun, H.; Fang, Y. (2013): Label-free cell phenotypic assessment of the biased agonism and efficacy of agonists at the endogenous muscarinic M3 receptors. In: *Journal of pharmacological and toxicological methods* 68 (3), S. 323–333. DOI: 10.1016/j.vascn.2013.07.005.

Eckstein N. (2004): Pharmakologische und biochemische Untersuchungen zur allosterischen Modulation Agonist-induzierter Wirkungen an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren.

Dissertationsschrift, Bonn

- Eglen, R. M. (2005): Muscarinic receptor subtype pharmacology and physiology. In: *Progress in medicinal chemistry* 43, S. 105–136. DOI: 10.1016/S0079-6468(05)43004-0.
- Ellis, J.; Huyler, J.; Brann, M. R. (1991): Allosteric regulation of cloned m1-m5 muscarinic receptor subtypes. In: *Biochemical pharmacology* 42 (10), S. 1927–1932.
- Ellis, J.; Seidenberg, M. (1992): Two allosteric modulators interact at a common site on cardiac muscarinic receptors. In: *Molecular pharmacology* 42 (4), S. 638–641.
- Engström, M.; Tomperi, J.; El-Darwish, K.; Ahman, M.; Savola, J.-M.; Wurster, S. (2005): Superagonism at the human somatostatin receptor subtype 4. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 312 (1), S. 332–338. DOI: 10.1124/jpet.104.075531.
- Exton, J. H. (1996): Regulation of phosphoinositide phospholipases by hormones, neurotransmitters, and other agonists linked to G proteins. In: *Annual review of pharmacology and toxicology* 36, S. 481–509. DOI: 10.1146/annurev.pa.36.040196.002405.
- Fang, Y.; Li, G.; Ferrie, A. M. (2007): Non-invasive optical biosensor for assaying endogenous G protein-coupled receptors in adherent cells. In: *Journal of pharmacological and toxicological methods* 55 (3), S. 314–322. DOI: 10.1016/j.vascn.2006.11.001.
- Feinstein, P. G.; Schrader, K. A.; Bakalyar, H. A.; Tang, W. J.; Krupinski, J.; Gilman, A. G.; Reed, R. R. (1991): Molecular cloning and characterization of a Ca²⁺/calmodulin-insensitive adenylyl cyclase from rat brain. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (22), S. 10173–10177.
- Felder, C. C.; Kanterman, R. Y.; Ma, A. L.; Axelrod, J. (1989): A transfected m1 muscarinic acetylcholine receptor stimulates adenylyl cyclase via phosphatidylinositol hydrolysis. In: *The Journal of biological chemistry* 264 (34), S. 20356–20362.
- Foster, D. J.; Choi, D. L.; Conn, P. J.; Rook, J. M. (2014): Activation of M1 and M4 muscarinic receptors as potential treatments for Alzheimer's disease and schizophrenia. In: *Neuropsychiatric disease and treatment* 10, S. 183–191. DOI: 10.2147/NDT.S55104.
- Fredriksson, R.; Lagerström, M. C.; Lundin, L.-G.; Schiöth, H. B. (2003): The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. In: *Molecular pharmacology* 63 (6), S. 1256–1272. DOI: 10.1124/mol.63.6.1256.
- Furchgott, R.F. (1966): The use of B-haloalkylamines in the differentiation of receptors and in the determination of dissociation constants of receptor-agonist complexes. In: *Harper NJ, Simmonds AB (eds). Advances in Drug Research, Vol. 3. Academic Press: New York*, S. 21–55.
- Galper, J. B.; Dziekan, L. C.; O'Hara, D. S.; Smith, T. W. (1982): The biphasic response of muscarinic cholinergic receptors in cultured heart cells to agonists. Effects on receptor number and affinity in intact cells and homogenates. In: *The Journal of biological chemistry* 257 (17), S. 10344–10356.
- Gao, B. N.; Gilman, A. G. (1991): Cloning and expression of a widely distributed (type IV) adenylyl cyclase. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (22), S. 10178–10182.
- Gao, Z.-G.; Jacobson, K. A. (2006): Keynote review. Allosterism in membrane receptors. In:
-

Drug discovery today 11 (5-6), S. 191–202. DOI: 10.1016/S1359-6446(05)03689-5.

Ghanouni, P.; Gryczynski, Z.; Steenhuis, J. J.; Lee, T. W.; Farrens, D. L.; Lakowicz, J. R.; Kobilka, B. K. (2001): Functionally different agonists induce distinct conformations in the G protein coupling domain of the beta 2 adrenergic receptor. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (27), S. 24433–24436. DOI: 10.1074/jbc.C100162200.

Glass, M.; Northup, J. K. (1999): Agonist selective regulation of G proteins by cannabinoid CB(1) and CB(2) receptors. In: *Molecular pharmacology* 56 (6), S. 1362–1369.

Guillou, J. L.; Nakata, H.; Cooper, D. M. (1999): Inhibition by calcium of mammalian adenylyl cyclases. In: *The Journal of biological chemistry* 274 (50), S. 35539–35545.

Gurwitz, D.; Haring, R.; Heldman, E.; Fraser, C. M.; Manor, D.; Fisher, A. (1994): Discrete activation of transduction pathways associated with acetylcholine m1 receptor by several muscarinic ligands. In: *European journal of pharmacology* 267 (1), S. 21–31.

Haga, K.; Uchiyama, H.; Haga, T.; Ichiyama, A.; Kangawa, K.; Matsuo, H. (1989): Cerebral muscarinic acetylcholine receptors interact with three kinds of GTP-binding proteins in a reconstitution system of purified components. In: *Molecular pharmacology* 35 (3), S. 286–294.

Hammer, R.; Berrie, C. P.; Birdsall, N. J.; Burgen, A. S.; Hulme, E. C. (1980): Pirenzepine distinguishes between different subclasses of muscarinic receptors. In: *Nature* 283 (5742), S. 90–92.

Hanoune, J.; Pouille, Y.; Tzavara, E.; Shen, T.; Lipskaya, L.; Miyamoto, N. et al. (1997): Adenylyl cyclases. Structure, regulation and function in an enzyme superfamily. In: *Molecular and cellular endocrinology* 128 (1-2), S. 179–194.

Hanoune, J.; Defer, N. (2001): Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. In: *Annual review of pharmacology and toxicology* 41, S. 145–174. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.41.1.145.

Harrison, C.; Traynor, J. R. (2003): The 35SGTPgammaS binding assay. Approaches and applications in pharmacology. In: *Life sciences* 74 (4), S. 489–508.

Hill, A.V. (1910): The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. In: *J Physiol (Proc)* (40), S. 4-7.

Holst, B.; Brandt, E.; Bach, A.; Heding, A.; Schwartz, T. W. (2005): Nonpeptide and peptide growth hormone secretagogues act both as ghrelin receptor agonist and as positive or negative allosteric modulators of ghrelin signaling. In: *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 19 (9), S. 2400–2411. DOI: 10.1210/me.2005-0059.

Hulme, E. C.; Birdsall, N. J.; Buckley, N. J. (1990): Muscarinic receptor subtypes. In: *Annual review of pharmacology and toxicology* 30, S. 633–673. DOI: 10.1146/annurev.pa.30.040190.003221.

Iyengar, R. (1993): Molecular and functional diversity of mammalian Gs-stimulated adenylyl cyclases. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 7 (9), S. 768–775.

Jakubík, J.; Tuček, S. (1994): Protection by alcuronium of muscarinic receptors against chemical inactivation and location of the allosteric binding site for alcuronium. In: *Journal of neurochemistry* 63 (5), S. 1932–1940.

Janßen, N (2011): Zelluläre dynamische Massenumverteilung zur Erfassung der

Signalwegsaktivierung 7-transmembranärer Rezeptoren unter besonderer Berücksichtigung des M4-Acetylcholinrezeptors. Dissertationsschrift, Bonn

Jastrzebska, B. (2013): GPCR. G protein complexes--the fundamental signaling assembly. In: *Amino acids* 45 (6), S. 1303–1314. DOI: 10.1007/s00726-013-1593-y.

Jin, L. Q.; Wang, H. Y.; Friedman, E. (2001): Stimulated D(1) dopamine receptors couple to multiple Galpha proteins in different brain regions. In: *Journal of neurochemistry* 78 (5), S. 981–990.

Kasahara, J.; Sugiyama, H. (1994): Inositol phospholipid metabolism in *Xenopus* oocytes mediated by endogenous G(o) and Gi proteins. In: *FEBS letters* 355 (1), S. 41–44.

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

Kebig, A. (2010): Signalwegsaktivierung an muskarinischen M2-Rezeptoren: Einfluss der allosterischen Bindungstasche. Dissertationsschrift, Bonn

Kenakin, T. P. (1985): The quantification of relative efficacy of agonists. In: *Journal of pharmacological methods* 13 (4), S. 281–308.

Kenakin, T. (1995a): Agonist-receptor efficacy. I. Mechanisms of efficacy and receptor promiscuity. In: *Trends in pharmacological sciences* 16 (6), S. 188–192.

Kenakin, T. (1995b): Agonist-receptor efficacy. II. Agonist trafficking of receptor signals. In: *Trends in pharmacological sciences* 16 (7), S. 232–238.

Kenakin, T. (1996): The classification of seven transmembrane receptors in recombinant expression systems. In: *Pharmacological reviews* 48 (3), S. 413–463.

Kenakin, T. (1997): Agonist-specific receptor conformations. In: *Trends in pharmacological sciences* 18 (11), S. 416–417.

Kenakin, T. (2002): Efficacy at G-protein-coupled receptors. In: *Nature reviews. Drug discovery* 1 (2), S. 103–110. DOI: 10.1038/nrd722.

Kenakin, T. (2003): Ligand-selective receptor conformations revisited. The promise and the problem. In: *Trends in pharmacological sciences* 24 (7), S. 346–354. DOI: 10.1016/S0165-6147(03)00167-6.

Kent, R. S.; Lean, A. de; Lefkowitz, R. J. (1980): A quantitative analysis of beta-adrenergic receptor interactions. Resolution of high and low affinity states of the receptor by computer modeling of ligand binding data. In: *Molecular pharmacology* 17 (1), S. 14–23.

Kim, G. D.; Adie, E. J.; Milligan, G. (1994): Quantitative stoichiometry of the proteins of the stimulatory arm of the adenylyl cyclase cascade in neuroblastoma x glioma hybrid, NG108-15 cells. In: *European journal of biochemistry* 219 (1-2), S. 135–143.

Klemt, D. (2005): Allosterische Modulation der Pilocarpin-induzierten G Protein-Aktivierung am muskarinischen M₂- und M₄-Acetylcholin-Rezeptor. Dissertationsschrift, Bonn

Kostenis, E.; Mohr, K. (1996): Two-point kinetic experiments to quantify allosteric effects on radioligand dissociation. In: *Trends in pharmacological sciences* 17 (8), S. 280–283.

Kruh, J. (1982): Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture. In: *Molecular and cellular biochemistry* 42 (2), S. 65–82.

- Krumins, A. M.; Barber, R. (1997): The stability of the agonist beta2-adrenergic receptor-Gs complex. Evidence for agonist-specific states. In: *Molecular pharmacology* 52 (1), S. 144–154.
- Kruse, A. C.; Hu, J.; Pan, A. C.; Arlow, D. H.; Rosenbaum, D. M.; Rosemond, E. et al. (2012): Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor. In: *Nature* 482 (7386), S. 552–556. DOI: 10.1038/nature10867.
- Kubo, T.; Fukuda, K.; Mikami, A.; Maeda, A.; Takahashi, H.; Mishina, M. et al. (1986): Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. In: *Nature* 323 (6087), S. 411–416. DOI: 10.1038/323411a0.
- Langmead, C. J.; Watson, J.; Reavill, C. (2008): Muscarinic acetylcholine receptors as CNS drug targets. In: *Pharmacology & therapeutics* 117 (2), S. 232–243. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2007.09.009.
- Langmead, C. J.; Christopoulos, A. (2013): Supra-physiological efficacy at GPCRs. Superstition or super agonists? In: *British journal of pharmacology* 169 (2), S. 353–356. DOI: 10.1111/bph.12142.
- Lazareno, S.; Birdsall, N. J. (1993): Pharmacological characterization of acetylcholine-stimulated 35S-GTP gamma S binding mediated by human muscarinic m1-m4 receptors. Antagonist studies. In: *British journal of pharmacology* 109 (4), S. 1120–1127.
- Lazareno, S.; Birdsall, N. J. (1995): Detection, quantitation, and verification of allosteric interactions of agents with labeled and unlabeled ligands at G protein-coupled receptors. Interactions of strychnine and acetylcholine at muscarinic receptors. In: *Molecular pharmacology* 48 (2), S. 362–378.
- Lee, N. H.; el-Fakahany, E. E. (1991): Allosteric antagonists of the muscarinic acetylcholine receptor. In: *Biochemical pharmacology* 42 (2), S. 199–205.
- Lee, P.H.; Gao, A.; van Staden, C.; Ly, J.; Salon, J.; Xu, A. et al. (2008): Evaluation of dynamic mass redistribution technology for pharmacological studies of recombinant and endogenously expressed g protein-coupled receptors. In: *Assay and drug development technologies* 6 (1), S. 83–94. DOI: 10.1089/adt.2007.126.
- Leppik, R. A.; Miller, R. C.; Eck, M.; Paquet, J. L. (1994): Role of acidic amino acids in the allosteric modulation by gallamine of antagonist binding at the m2 muscarinic acetylcholine receptor. In: *Molecular pharmacology* 45 (5), S. 983–990.
- Levey, A. I.; Kitt, C. A.; Simonds, W. F.; Price, D. L.; Brann, M. R. (1991): Identification and localization of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype-specific antibodies. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 11 (10), S. 3218–3226.
- Levey, A. I.; Edmunds, S. M.; Heilman, C. J.; Desmond, T. J.; Frey, K. A. (1994): Localization of muscarinic m3 receptor protein and M3 receptor binding in rat brain. In: *Neuroscience* 63 (1), S. 207–221.
- Levey, A. I.; Edmunds, S. M.; Koliatsos, V.; Wiley, R. G.; Heilman, C. J. (1995): Expression of m1-m4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in rat hippocampus and regulation by cholinergic innervation. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15 (5 Pt 2), S. 4077–4092.
- Lindberg, J. S.; Culleton, B.; Wong, G.; Borah, M. F.; Clark, R. V.; Shapiro, W. B. et al. (2005): Cinacalcet HCl, an oral calcimimetic agent for the treatment of secondary
-

hyperparathyroidism in hemodialysis and peritoneal dialysis. A randomized, double-blind, multicenter study. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 16 (3), S. 800–807. DOI: 10.1681/ASN.2004060512.

Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. In: *The Journal of biological chemistry* 193 (1), S. 265–275.

Lüllmann, H.; Ohnesorge, F. K.; Schauwecker, G. C.; Wassermann, O. (1969): Inhibition of the actions of carbachol and DFP on guinea pig isolated atria by alkane-bis-ammonium compounds. In: *European journal of pharmacology* 6 (3), S. 241–247.

Matsui, H.; Lazareno, S.; Birdsall, N. J. (1995): Probing of the location of the allosteric site on m1 muscarinic receptors by site-directed mutagenesis. In: *Molecular pharmacology* 47 (1), S. 88–98.

Milligan, G. (2003): Principles. Extending the utility of 35SGTP gamma S binding assays. In: *Trends in pharmacological sciences* 24 (2), S. 87–90.

Mohr, K.; Tränkle, C.; Holzgrabe, U. (2003): Structure/activity relationships of M2 muscarinic allosteric modulators. In: *Receptors & channels* 9 (4), S. 229–240.

Mohr, K.; Tränkle, C.; Kostenis, E.; Barocelli, E.; de Amici, M.; Holzgrabe, U. (2010): Rational design of dualsteric GPCR ligands. Quests and promise. In: *British journal of pharmacology* 159 (5), S. 997–1008. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2009.00601.x.

Mohr, K.; Schmitz, J.; Schrage, R.; Tränkle, C.; Holzgrabe, U. (2013): Molecular alliance-from orthosteric and allosteric ligands to dualsteric/bitopic agonists at G protein coupled receptors. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 52 (2), S. 508–516. DOI: 10.1002/anie.201205315.

Monod, J.; Changeux, J.P.; Jacob, F. (1963): Allosteric proteins and cellular control systems. In: *Journal of molecular biology* 6, S. 306–329.

Motulsky, H., Christopoulos, A. (2004). *Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting*. Oxford University Press, USA.

Muth, M.; Bender, W.; Scharfenstein, O.; Holzgrabe, U.; Balatkova, E.; Tränkle, C.; Mohr, K. (2003): Systematic development of high affinity bis(ammonio)alkane-type allosteric enhancers of muscarinic ligand binding. In: *Journal of medicinal chemistry* 46 (6), S. 1031–1040. DOI: 10.1021/jm021017q.

Nagano, N.; Nemeth, E. F. (2005): Functional proteins involved in regulation of intracellular Ca(2+) for drug development. The extracellular calcium receptor and an innovative medical approach to control secondary hyperparathyroidism by calcimimetics. In: *Journal of pharmacological sciences* 97 (3), S. 355–360.

Neubig, R.R. (1998): Specificity of receptor-G protein coupling: protein structure and cellular determinants. *Seminars Neurosci.* 9:189–197

Neubig, R. R.; Spedding, M.; Kenakin, T.; Christopoulos, A. (2003): International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. In: *Pharmacological reviews* 55 (4), S. 597–606. DOI: 10.1124/pr.55.4.4.

Niemczyk, S.; Sikorska, H.; Wiecek, A.; Zukowska-Szzechowska, E.; Zalecka, K.; Gorkczyńska, J. et al. (2010): A super-agonist of growth hormone-releasing hormone causes rapid improvement of nutritional status in patients with chronic kidney disease. In: *Kidney*

international 77 (5), S. 450–458. DOI: 10.1038/ki.2009.480.

Nygaard, R.; Zou, Y.; Dror, R. O.; Mildorf, T. J.; Arlow, D. H.; Manglik, A. et al. (2013): The dynamic process of $\beta(2)$ -adrenergic receptor activation. In: *Cell* 152 (3), S. 532–542. DOI: 10.1016/j.cell.2013.01.008.

Offermanns, S.; Wieland, T.; Homann, D.; Sandmann, J.; Bombien, E.; Spicher, K. et al. (1994): Transfected muscarinic acetylcholine receptors selectively couple to Gi-type G proteins and Gq/11. In: *Molecular pharmacology* 45 (5), S. 890–898.

Okada, T.; Terakita, A.; Shichida, Y. (2002): Structure-function relationship in G protein-coupled receptors deduced from crystal structure of rhodopsin. In: *Tanpakushitsu kakusan koso. Protein, nucleic acid, enzyme* 47 (8 Suppl), S. 1123–1130.

Olianas, M. C.; Dedoni, S.; Onali, P. (2012): Potentiation of dopamine D1-like receptor signaling by concomitant activation of δ - and μ -opioid receptors in mouse medial prefrontal cortex. In: *Neurochemistry international* 61 (8), S. 1404–1416. DOI: 10.1016/j.neuint.2012.10.005.

Overington, J. P.; Al-Lazikani, B.; Hopkins, A. L. (2006): How many drug targets are there? In: *Nature reviews. Drug discovery* 5 (12), S. 993–996. DOI: 10.1038/nrd2199.

Padrell, E.; Carty, D. J.; Moriarty, T. M.; Hildebrandt, J. D.; Landau, E. M.; Iyengar, R. (1991): Two forms of the bovine brain Go that stimulate the inositol trisphosphate-mediated Cl⁻ currents in *Xenopus* oocytes. Distinct guanine nucleotide binding properties. In: *The Journal of biological chemistry* 266 (15), S. 9771–9777.

Palczewski, K.; Kumasaka, T.; Hori, T.; Behnke, C. A.; Motoshima, H.; Fox, B. A. et al. (2000): Crystal structure of rhodopsin. A G protein-coupled receptor. In: *Science (New York, N.Y.)* 289 (5480), S. 739–745.

Patel, T. B.; Du, Z.; Pierre, S.; Cartin, L.; Scholich, K. (2001): Molecular biological approaches to unravel adenylyl cyclase signaling and function. In: *Gene* 269 (1-2), S. 13–25.

Peralta, E. G.; Ashkenazi, A.; Winslow, J. W.; Smith, D. H.; Ramachandran, J.; Capon, D. J. (1987): Distinct primary structures, ligand-binding properties and tissue-specific expression of four human muscarinic acetylcholine receptors. In: *The EMBO journal* 6 (13), S. 3923–3929.

Perez, D. M.; Hwa, J.; Gaivin, R.; Mathur, M.; Brown, F.; Graham, R. M. (1996): Constitutive activation of a single effector pathway. Evidence for multiple activation states of a G protein-coupled receptor. In: *Molecular pharmacology* 49 (1), S. 112–122.

Prilla, S.; Schrobang, J.; Ellis, J.; Höltje, H.-D.; Mohr, K. (2006): Allosteric interactions with muscarinic acetylcholine receptors. Complex role of the conserved tryptophan M242Trp in a critical cluster of amino acids for baseline affinity, subtype selectivity, and cooperativity. In: *Molecular pharmacology* 70 (1), S. 181–193. DOI: 10.1124/mol.106.023481.

Proška, J.; Tuček, S. (1994): Mechanisms of steric and cooperative actions of alcuronium on cardiac muscarinic acetylcholine receptors. In: *Molecular pharmacology* 45 (4), S. 709–717.

Raedler, T. J.; Knable, M. B.; Jones, D. W.; Urbina, R. A.; Gorey, J. G.; Lee, K. S. et al. (2003): In vivo determination of muscarinic acetylcholine receptor availability in schizophrenia. In: *The American journal of psychiatry* 160 (1), S. 118–127. DOI: 10.1176/appi.ajp.160.1.118.

Ray, W. J.; Seager, M.; Ma, L.; Wittmann, M.; Getty, K.; Marlatt, M. et al. (2008): P4-305. Allosteric potentiation of the M1 muscarinic receptor provides unprecedented selectivity and

a novel therapeutic strategy for the treatment of Alzheimer's disease. In: *Alzheimer's & Dementia* 4 (4), T761. DOI: 10.1016/j.jalz.2008.05.2375.

Rosenbaum, D. M.; Rasmussen, S. G. F.; Kobilka, B. K. (2009): The structure and function of G-protein-coupled receptors. In: *Nature* 459 (7245), S. 356–363. DOI: 10.1038/nature08144.

Scarr, E.; Dean, B. (2008): Muscarinic receptors. Do they have a role in the pathology and treatment of schizophrenia? In: *Journal of neurochemistry* 107 (5), S. 1188–1195. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2008.05711.x.

Schrage, R.; Seemann, W. K.; Klöckner, J.; Dallanoce, C.; Racké, K.; Kostenis, E. et al. (2013): Agonists with supraphysiological efficacy at the muscarinic M2 ACh receptor. In: *British journal of pharmacology* 169 (2), S. 357–370. DOI: 10.1111/bph.12003.

Schrage, R.; Holze, J.; Klöckner, J.; Balkow, A.; Klause, A. S.; Schmitz, A.-L. et al. (2014): New insight into active muscarinic receptors with the novel radioagonist ³Hiperoxo. In: *Biochemical pharmacology* 90 (3), S. 307–319. DOI: 10.1016/j.bcp.2014.05.012.

Schrage, R.; Schmitz, A.-L.; Gaffal, E.; Annala, S.; Kehraus, S.; Wenzel, D. et al. (2015): The experimental power of FR900359 to study Gq-regulated biological processes. In: *Nature communications* 6, S. 10156. DOI: 10.1038/ncomms10156.

Schrage, R.; Min, A. de; Hochheiser, K.; Kostenis, E.; Mohr, K. (2016): Superagonism at G protein-coupled receptors and beyond. In: *British journal of pharmacology* 173 (20), S. 3018–3027. DOI: 10.1111/bph.13278.

Schröder, R.; Janssen, N.; Schmidt, J.; Kebig, A.; Merten, N.; Hennen, S. et al. (2010): Deconvolution of complex G protein-coupled receptor signaling in live cells using dynamic mass redistribution measurements. In: *Nature biotechnology* 28 (9), S. 943–949. DOI: 10.1038/nbt.1671.

Schröder, R.; Schmidt, J.; Blättermann, S.; Peters, L.; Janssen, N.; Grundmann, M. et al. (2011): Applying label-free dynamic mass redistribution technology to frame signaling of G protein-coupled receptors noninvasively in living cells. In: *Nature protocols* 6 (11), S. 1748–1760. DOI: 10.1038/nprot.2011.386.

Schulman, J. M.; Peck, R. C.; Disch, R. L. (1991): Recognition of cholinergic agonists by the muscarinic receptor. 2. Pilocarpine. In: *Journal of medicinal chemistry* 34 (4), S. 1455–1459.

Shapiro, G.; Floersheim, P.; Boelsterli, J.; Amstutz, R.; Bolliger, G.; Gammenthaler, H. et al. (1992): Muscarinic activity of the thiolactone, lactam, lactol, and thiolactol analogues of pilocarpine and a hypothetical model for the binding of agonists to the m1 receptor. In: *Journal of medicinal chemistry* 35 (1), S. 15–27.

Simonds, W. F. (1999): G protein regulation of adenylate cyclase. In: *Trends in pharmacological sciences* 20 (2), S. 66–73.

Smith, N. J.; Bennett, K. A.; Milligan, G. (2011): When simple agonism is not enough. Emerging modalities of GPCR ligands. In: *Molecular and cellular endocrinology* 331 (2), S. 241–247. DOI: 10.1016/j.mce.2010.07.009.

Stephenson, R.P. (1956): A modification of receptor theory. In: *British journal of pharmacology and chemotherapy* 11 (4), S. 379–393.

Stockton, J. M.; Birdsall, N. J.; Burgen, A. S.; Hulme, E. C. (1983): Modification of the binding properties of muscarinic receptors by gallamine. In: *Molecular pharmacology* 23 (3), S. 551–557.

- Strange, P. G. (2008): Agonist binding, agonist affinity and agonist efficacy at G protein-coupled receptors. In: *British journal of pharmacology* 153 (7), S. 1353–1363. DOI: 10.1038/sj.bjp.0707672.
- Tan, C. M.; Wilson, M. H.; MacMillan, L. B.; Kobilka, B. K.; Limbird, L. E. (2002): Heterozygous alpha 2A-adrenergic receptor mice unveil unique therapeutic benefits of partial agonists. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (19), S. 12471–12476. DOI: 10.1073/pnas.122368499.
- Tang, W. J.; Gilman, A. G. (1991): Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G protein beta gamma subunits. In: *Science (New York, N.Y.)* 254 (5037), S. 1500–1503.
- Tang, W. J.; Gilman, A. G. (1992): Adenylyl cyclases. In: *Cell* 70 (6), S. 869–872.
- Taussig, R.; Iñiguez-Lluhi, J. A.; Gilman, A. G. (1993): Inhibition of adenylyl cyclase by Gi alpha. In: *Science (New York, N.Y.)* 261 (5118), S. 218–221.
- Taussig, R.; Tang, W. J.; Hepler, J. R.; Gilman, A. G. (1994): Distinct patterns of bidirectional regulation of mammalian adenylyl cyclases. In: *The Journal of biological chemistry* 269 (8), S. 6093–6100.
- Thirunarayanan, N.; Raaka, B. M.; Gershengorn, M. C. (2012): Taltirelin is a superagonist at the human thyrotropin-releasing hormone receptor. In: *Frontiers in endocrinology* 3, S. 120. DOI: 10.3389/fendo.2012.00120.
- Thomas, R. L.; Mistry, R.; Langmead, C. J.; Wood, M. D.; Challiss, R. A. J. (2008): G protein coupling and signaling pathway activation by m1 muscarinic acetylcholine receptor orthosteric and allosteric agonists. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 327 (2), S. 365–374. DOI: 10.1124/jpet.108.141788.
- Trinquet, E.; Fink, M.; Bazin, H.; Grillet, F.; Maurin, F.; Bourrier, E. et al. (2006): D-myoinositol 1-phosphate as a surrogate of D-myoinositol 1,4,5-tris phosphate to monitor G protein-coupled receptor activation. In: *Analytical biochemistry* 358 (1), S. 126–135. DOI: 10.1016/j.ab.2006.08.002.
- Tuček, S.; Proška, J. (1995): Allosteric modulation of muscarinic acetylcholine receptors. In: *Trends in pharmacological sciences* 16 (6), S. 205–212.
- Umland, S. P.; Wan, Y.; Shah, H.; Billah, M.; Egan, R. W.; Hey, J. A. (2001): Receptor reserve analysis of the human alpha(2C)-adrenoceptor using. In: *European journal of pharmacology* 411 (3), S. 211–221.
- Uwada, J.; Anisuzzaman, A. S. M.; Nishimune, A.; Yoshiki, H.; Muramatsu, I. (2011): Intracellular distribution of functional M(1)-muscarinic acetylcholine receptors in N1E-115 neuroblastoma cells. In: *Journal of neurochemistry* 118 (6), S. 958–967. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2011.07378.x.
- Varga, E. V.; Stropova, D.; Rubenzik, M.; Wang, M.; Landsman, R. S.; Roeske, W. R.; Yamamura, H. I. (1998): Identification of adenylyl cyclase isoenzymes in CHO and B82 cells. In: *European journal of pharmacology* 348 (2-3), R1-2.
- Vogel, L (2015): Muskarinische M3-Rezeptoren: Einfluss des orthosterischen/ allosterischen Epitips Trp 7.35 auf Ligandbindung, Rezeptoraktivierung und Signalweiterleitung. Dissertationsschrift, Bonn
- Wess, J.; Bonner, T. I.; Dörje, F.; Brann, M. R. (1990): Delineation of muscarinic receptor domains conferring selectivity of coupling to guanine nucleotide-binding proteins and second
-

messengers. In: *Molecular pharmacology* 38 (4), S. 517–523.

Wess, J. (1993): Mutational analysis of muscarinic acetylcholine receptors. Structural basis of ligand/receptor/G protein interactions. In: *Life sciences* 53 (19), S. 1447–1463.

Wess, J. (1996): Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors. In: *Critical reviews in neurobiology* 10 (1), S. 69–99.

Wess, J.; Liu, J.; Blin, N.; Yun, J.; Lerche, C.; Kostenis, E. (1997): Structural basis of receptor/G protein coupling selectivity studied with muscarinic receptors as model systems. In: *Life sciences* 60 (13-14), S. 1007–1014.

Wess, J. (2003): Novel insights into muscarinic acetylcholine receptor function using gene targeting technology. In: *Trends in pharmacological sciences* 24 (8), S. 414–420. DOI: 10.1016/S0165-6147(03)00195-0.

Wess, J. (2004): Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. Novel phenotypes and clinical implications. In: *Annual review of pharmacology and toxicology* 44, S. 423–450. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121622.

Wess, Jürgen (2005): Allosteric binding sites on muscarinic acetylcholine receptors. In: *Molecular pharmacology* 68 (6), S. 1506–1509. DOI: 10.1124/mol.105.019141.

Wess, J.; Han, Sung-Jun; Kim, Soo-Kyung; Jacobson, Kenneth A.; Li, Jian Hua (2008): Conformational changes involved in G-protein-coupled-receptor activation. In: *Trends in pharmacological sciences* 29 (12), S. 616–625. DOI: 10.1016/j.tips.2008.08.006.

Zuscik, M. J.; Porter, J. E.; Gaivin, R.; Perez, D. M. (1998): Identification of a conserved switch residue responsible for selective constitutive activation of the beta2-adrenergic receptor. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (6), S. 3401–3407.

8 Abkürzungsverzeichnis

7TMR	7-Transmembranrezeptoren
AC	Adenylylzyklase
ACh	Acetylcholin
ANOVA	Analyse der Varianzen
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	<u>A</u> rea <u>u</u> nder the <u>c</u> urve
B _{max}	Anzahl der maximalen Bindungsstellen
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (complementary DNA)
CHO Zellen	Ovarialzellen des Chinesischen Hamsters (<u>C</u> hinese <u>H</u> amster <u>o</u> varial cells)
COPD	chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (chronic-obstructive pulmonary disease)
cpm	Zerfälle pro Minute (counts per minute)
CTX	Cholera Toxin
DAG	Diacylglycerol
DMR	Dynamische Massenumverteilung
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC _{0,5diss}	Alloster-Konzentration bei welcher die Radioligand-Dissoziation vom Rezeptor um die Hälfte reduziert worden ist
E _{max}	Maximaler Effekt
ERK	extracellular signal-related kinase
FDA	Food and Drug Administration (US-Amerikanische Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelzulassungsbehörde)
FKS	fetales Kälberserum

8 Abkürzungsverzeichnis

FR	FR 900359
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GABA	γ -Aminobuttersäure
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GPCR	G Protein-gekoppelte Rezeptoren
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HEK 293 Zellen	Zellen aus dem Nierengewebe menschlicher Embryos (<u>h</u> uman <u>e</u> mbryonic <u>k</u> idney cells)
HI-Virus	humanes Immundefizienz Virus
[³ H]NMS	[³ H]N-Methylscopolamin
[³ H]QNB	[³ H]Quinuclidinylbenzylat
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
IC ₅₀	Negativer dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz, welche eine halbmaximale Inhibition hervorgerufen hat
ICL	intrazelluläre Schleifen (intracellular loops)
IP1	Inositol-monophosphat
IP3	Inositoltriphosphat
Iper	Iperoxo
k ₋₁	Dissoziations-Geschwindigkeitskonstante
K _{App}	apparente Affinitätskonstante
K _D	Gleichgewichts-Dissoziationskonstante der Radioligand-Bindung
mAChR	muskarinischer Acetylcholin-Rezeptor
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinasen
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n	Anzahl an unabhängigen Experimenten

8 Abkürzungsverzeichnis

NAM	negativer allosterischer Modulator
Naph	Naphthalimid
n_H	Hill-Koeffizient als Maß für die Kurvensteilheit
NMS	N-Methylscopolamin
PAM	positiver allosterischer Modulator
pEC_{50}	Negativer dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz, welche eine halbmaximale Zellantwort hervorgerufen hat
PEI	Polyethylenimin
PenStrep	Penicillin und Streptomycin
PGE_1	Prostaglandin E_1
Phth	Phthalimid
PIP_2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
pK_D	Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K_D
PLC	Phospholipase C
PTX	Pertussis Toxin
RGS-Proteine	Regulators of G protein signaling
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
S.E.M.	Standardfehler (standard error of the mean)
SAM	stiller allosterischer Modulator
SD	Standardabweichung
ZNS	Zentrales Nervensystem

9 Anhang

9.1 Operational model of agonism (Black und Leff, 1983)

Mithilfe des „operational model of agonism“ nach Black und Leff (1983) wird untersucht, ob ein Agonist im Vergleich zu einem Referenzagonisten einen Signalweg gegenüber einem anderen favorisiert. Dieses Phänomen wird als „ligand bias“ beziehungsweise „biased signaling“ bezeichnet.

Durch das „operational model“ werden die beiden Parameter τ und K_A bestimmt. τ beschreibt das Maß des Agonismus' eines Liganden (transducer ratio nach Black und Leff, 1983) und gibt das Verhältnis der Gesamtkonzentration an Rezeptoren zu der Konzentration an Agonist-gebundenen Rezeptoren an, die zu einer halbmaximalen Systemantwort führen.

$$\tau = \frac{B_{max}}{K_E} \qquad \text{Gleichung 29}$$

τ : Kopplungseffizienz

B_{max} : Gesamtkonzentration an Rezeptoren

K_E : Agonist-Rezeptor-Komplexe, die für eine halbmaximale Systemantwort benötigt werden

K_A ist ein Affinitätsparameter und beschreibt die funktionelle Affinität. Diese hängt von einer Vielzahl von Faktoren ab und muss nicht zwangsläufig mit der Affinität übereinstimmen, die aus Radioligand-Bindungsversuchen erhalten wird.

Zur Ermittlung eines „ligand bias“ werden die Transduktionskoeffizienten $\log(\tau/K_A)$ sowohl für den zu untersuchenden Agonisten, als auch für den Referenzagonisten auf zwei verschiedenen Signalwegen, die miteinander verglichen werden sollen, ermittelt. Dieser Term vereint die Kopplungseffizienz τ , welche als Maß für die intrinsische Aktivität herangezogen werden kann, mit der funktionellen Affinität (K_A).

$\Delta\log(\tau/K_A)$ beschreibt den Transduktionskoeffizienten des zu untersuchenden Agonisten in Relation zu dem Referenzagonisten und gibt die relative intrinsische Aktivität des Agonisten für einen speziellen Signalweg wider.

Um einen „ligand bias“ zu untersuchen, werden die beiden relativen Transduktionskoeffizienten des Agonisten für zwei verschiedene Signalwege voneinander subtrahiert und als $\Delta\log(\tau/K_A)$ angegeben. Per definitionem zeigt der Referenzagonist keinen „ligand bias“ und wird gleich Null gesetzt. Umschließen die 95 %- Konfidenzintervalle

des untersuchten Agonisten nicht den Nullwert, liegt ein „ligand bias“ vor (Bock et al., 2012).

9.1.2 Ergebnisse

Als Referenzagonisten wurden für die Untersuchung eines „ligand bias“ sowohl der endogene Ligand Acetylcholin, als auch die Muttersubstanz der dualsterischen Hybridliganden Iperoxo, gewählt. Iper-6-phth und Iper-6-naph wurden nicht auf einen „ligand bias“ untersucht, da Iper-6-phth ausschließlich $G_{q/11}$ -abhängige Signalwege aktivieren konnte und Iper-6-naph ein Antagonist am M1-Rezeptor war und damit keinen der hier untersuchten Signalwege aktivieren konnte. Dementsprechend war eine Untersuchung, ob diese Testsubstanzen einen Signalweg gegenüber einem anderen bevorzugen hinfällig.

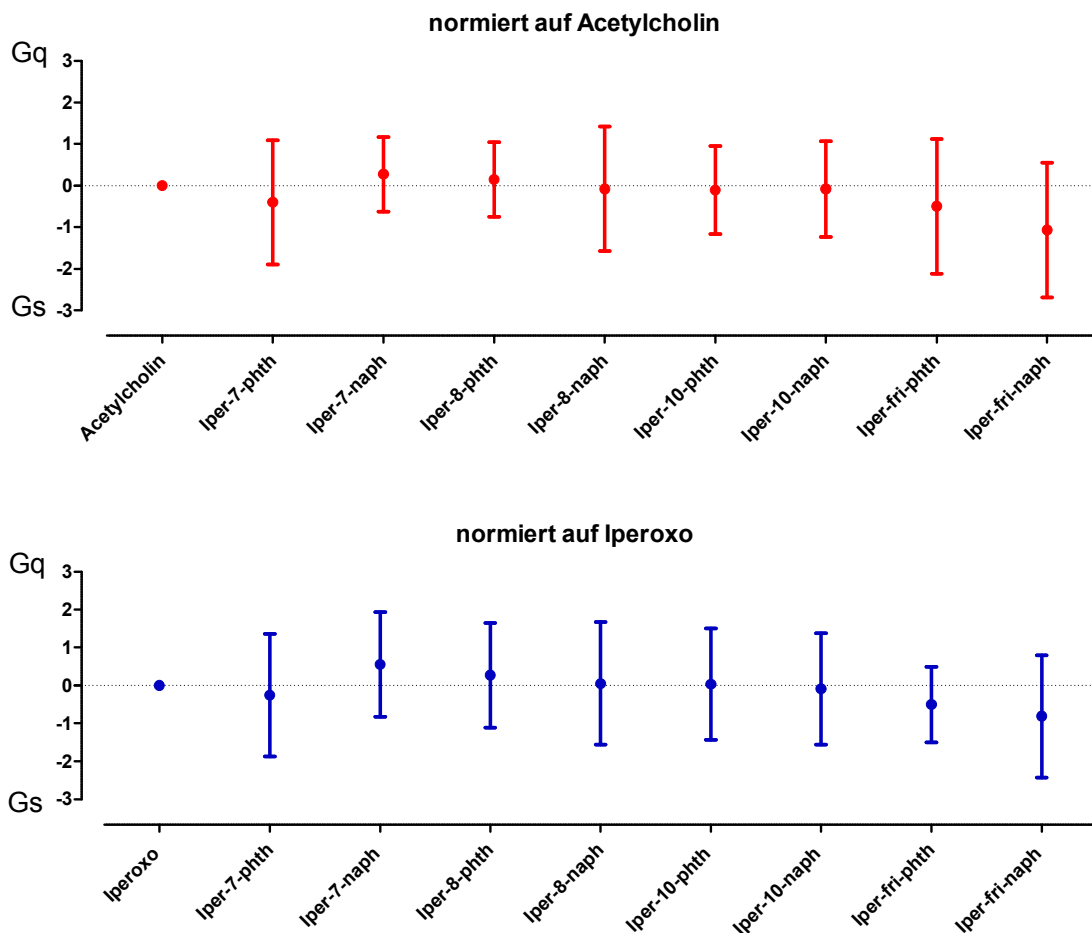


Abbildung 84: Keine der untersuchten Substanzen zeigte einen „ligand bias“.

Dargestellt sind Mittelwerte und die 95 %-Konfidenzintervalle aus den Berechnungen eines „ligand bias“ nach Black und Leff, 1983. Die Normierung erfolgte in Relation zu Acetylcholin (oben) bzw. in Relation zu Iperoxo (unten). Verglichen wurden hier $G_{q/11}$ -abhängige mit G_s -abhängigen Signalwegen.

Die 95 %-Konfidenzintervalle umschlossen bei allen untersuchten Substanzen den Nullwert, somit konnte bei keiner der hier untersuchten Substanzen ein „ligand bias“ festgestellt werden.

10 Veröffentlichungen

10.1 Publikationen

Seemann, W.K.; Wenzel, D.; Schrage, R.; Etscheid, J.; **Bödefeld, T.**; Bartol, A.; Warnken, M.; Sasse, P.; Klöckner, J.; Holzgrave, U.; DeAmici, M.; Schlicker, E.; Racké, K.; Kostenis, E.; Meyer, R.; Fleischmann, B.K.; Mohr, K. (2017): Engineered Context-Sensitive Agonism. Tissue-Selective Drug Signaling through a G Protein-Coupled Receptor. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 360 (2), S. 289–299. DOI: 10.1124/jpet.116.237149.

10.2 Posterpräsentationen

Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG), Düsseldorf: **Bödefeld T.**; Matera C.; Dallanoce C.; Messerer R.; De Amici M.; Holzgrave U.; Mohr K.; Schrage R. (2015): Selective activation of different pathways by dualsteric compounds in muscarinic M1 acetylcholine receptors.

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Berlin: **Bödefeld T.**; Matera C.; Dallanoce C.; Messerer R.; De Amici M.; Holzgrave U.; Mohr K.; Schrage R. (2016): Dualsteric compounds modulate the signaling pattern of muscarinic M1 acetylcholine receptors.

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Berlin: Schrage R.; **Bödefeld T.**; König G.M.; Kostenis E.; Mohr K. (2016): Unravel molecular mechanisms of G protein inhibition with radioligand binding experiments.

Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG), München: **Bödefeld T.**; Matera C.; Dallanoce C.; Messerer R.; De Amici M.; Holzgrave U.; Mohr K.; Schrage R. (2016): Dualsteric compounds to induce signaling pathway selectivity in CHO-M1 cells.

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Heidelberg: **Bödefeld T.**; Mohr K.; Schrage R. (2017): G protein inhibitors unravel crosstalk between G proteins from different families in CHO-M1 muscarinic receptors.

11 Danksagung

Ich danke der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die finanzielle Förderung meines Projektes im Rahmen der Forschergruppe „FOR 2372“.

Den Mitgliedern der Forschergruppe „FOR 2372“ danke ich herzlich für die konstruktiven Gespräche, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Klaus Mohr für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe eine Promotionsarbeit anzufertigen. Für die ausgezeichnete Betreuung und die angenehme Zusammenarbeit möchte ich mich herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. Ivar von Kügelgen danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Frau Prof. Dr. Dorothea Bartels und Herrn Prof. Dr. Ulrich Jaehde möchte ich herzlich für ihre Mitwirkung in der Prüfungskommission danken.

Frau Dr. Ramona Schrage gilt mein besonderer Dank. Ihre tatkräftige Unterstützung und hervorragende Betreuung haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ich bedanke mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Evi Kostenis für die großzügige Bereitstellung verschiedener Geräte zur Messung von „second messenger assays“.

Allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Abteilung Pharmakologie und Toxikologie möchte ich für die tolle Arbeitsatmosphäre und die Unterstützung danken. Besonders möchte ich mich bei Janine Holze für die tolle Zeit im gemeinsamen Büro bedanken.

Ich bedanke mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe und Herrn Prof. Dr. Marco De Amici, sowie deren Mitarbeitern für die Synthese und die Bereitstellung der dualsterischen Liganden.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Marcel Bermudez und Prof. Dr. Gerhard Wolber für die Bereitstellung und Analyse der „Molecular Docking Simulationen“ bedanken.

Meiner Mutter danke ich für ihre bedingungslose Liebe. Ihre Unterstützung ermöglichte mir meinen Weg bis hierher zu gehen.

Bei meinem Vater möchte ich mich herzlich für seine Unterstützung und das Mitfiebern während der Promotionszeit bedanken.

Meine Schwester war immer mein großes Vorbild, für ihre Hilfe in allen Lebenslagen möchte

11 Danksagung

ich ihr herzlich danken. Mein Dank gilt auch ihrem Mann Daniel, der wie ein Bruder für mich ist.

Mein besonderer Dank gilt meinen Neffen Max und Tim. Sie zeigten mir auch am Ende eines stressigen Labortages wie schön die Welt durch die Augen eines Kindes aussieht und wie leicht es ist sich über Kleinigkeiten zu freuen.