

Aus dem Institut für Pharmakologie  
der Universität Würzburg  
Vorstand: Prof. Dr. med. M. J. Lohse

**Neue Mutanten des humanen  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors  
zeigen für die Rezeptoraktivierung relevante Aminosäuren**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

**vorgelegt von**

**Björn Behr**

**aus Wuppertal**

**Würzburg, Mai 2006**



Aus dem Institut für Pharmakologie  
der Universität Würzburg  
Vorstand: Prof. Dr. med. M. J. Lohse

**Neue Mutanten des humanen  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors  
zeigen für die Rezeptoraktivierung relevante Aminosäuren**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

**vorgelegt von**

**Björn Behr**

**aus Wuppertal**

**Würzburg, Mai 2006**

Referent: Prof. Dr. rer. nat. K.-N. Klotz

Koreferent: Prof. Dr. med. H. Koepsell

Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 9. August 2006

Der Promovend ist Arzt

# *Inhaltsverzeichnis*

<b>I.</b>	<b>Einleitung</b>	1
	1. G-Protein vermittelte Signaltransduktion	1
	2. $\beta$ -adrenerge Rezeptoren	5
	3. Liganden an $\beta$ -adrenergen Rezeptoren	11
	4. Zielsetzung	16
<b>II.</b>	<b>Material und Methoden</b>	18
	1. Material	18
	2. Methoden	26
<b>III.</b>	<b>Ergebnisse</b>	42
	1. Herstellung von $\beta_1$ -Mutanten im pcDNA3 Vektor	42
	2. Auswahl der Zelllinie	42
	3. Charakterisierung der $\beta_1$ -Rezeptormutanten	52
<b>IV.</b>	<b>Diskussion</b>	58
	1. Endogene adrenerge Rezeptoren in Zelllinien	58
	2. Transfektionsmethoden	59
	3. Biologische Bedeutung der $\beta_1$ -Mutanten	60
	4. Perspektiven	70
<b>V.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	72
<b>VI.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	74
<b>VII.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	83
<b>VIII.</b>	<b>Anhang</b>	85

**Danksagung**

**Curriculum Vitae**

# *I. Einleitung*

## **1. G-Protein vermittelte Signaltransduktion**

### **1.1. G-Protein gekoppelte Rezeptoren**

Die Aktivität fast jeder Körperzelle wird über extrazelluläre Signale gesteuert, die über verschiedene Plasmamembranrezeptoren in die Zelle gelangen. Hormone oder Neurotransmitter vermitteln ihre Signale in der Mehrzahl der Fälle über G-Protein gekoppelte Rezeptoren (Ji et al., 1998, Wess 1997). Diese sind außerdem die wichtigsten Rezeptoren für das Riechen und Sehen. Mehr als 3% des menschlichen Genoms codiert für diese Rezeptorenklasse. Fast 2000 verschiedene Rezeptoren wurden schon beschrieben und ihre Vielzahl und große Bedeutung ließen sie zu interessanten pharmakologischen Zielstrukturen werden. Trotz der Vielzahl von Rezeptoren und den dazugehörigen Agonisten, wie Geruchs- und Geschmacksstoffe, Neuropeptide, Proteasen, niedermolekulare Substanzen und sogar Photonen, gibt es erstaunliche Ähnlichkeiten innerhalb dieser Rezeptorklasse.

Ein wesentliches Strukturmerkmal von G-Protein gekoppelten Rezeptoren sind die sieben  $\alpha$ -Helices, welche die Zellmembran alternierend durchspannen. Verbunden sind diese Helices, auch Transmembrandomänen genannt, durch intra- und extrazelluläre Schleifen (Abb. 1). Das extrazelluläre Ende der Polypeptidkette bildet der N-Terminus, der, neben den Transmembrandomänen, bei manchen Rezeptoren für die Bindung von Liganden von Bedeutung ist. Der intrazelluläre C-Terminus und die dritte intrazelluläre Schleife sind von Bedeutung für die Kopplung an das G-Protein, welches für die Weiterleitung des Signals in das innere einer Zelle verantwortlich ist (Strader et al., 1995, Wess 1997). Diese postulierte Struktur konnte mit der Röntgenstrukturanalyse von kristallisiertem Rhodopsin (Palczweski et al., 2000) bestätigt werden.

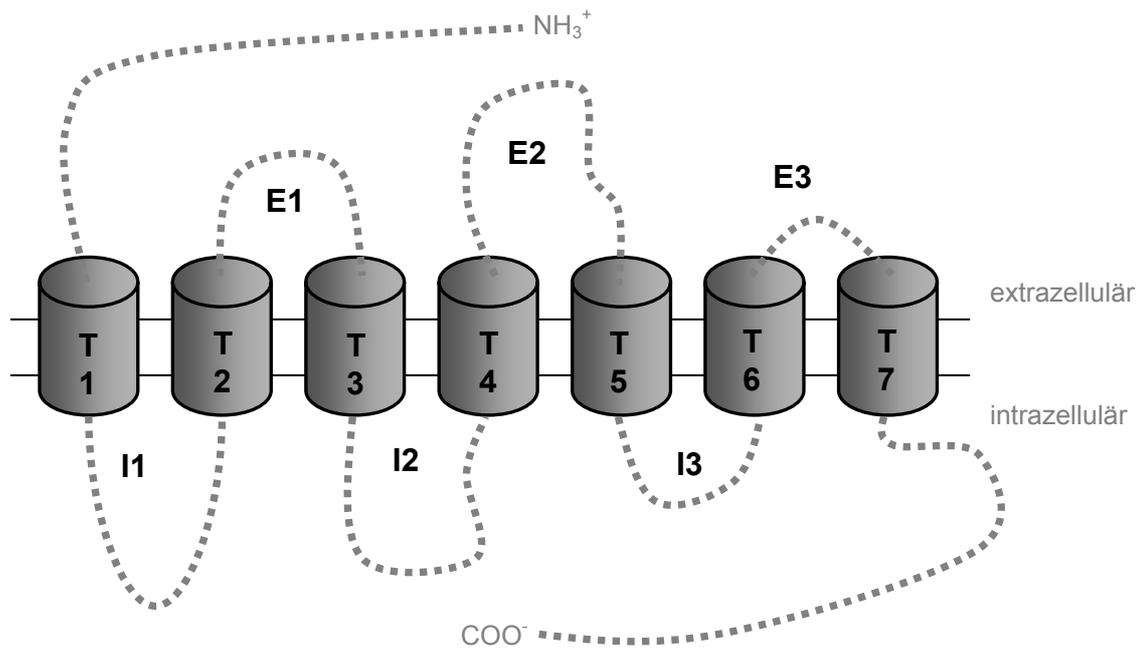


Abbildung 1 | **G-Protein-gekoppelter Rezeptor.** Vereinfachte zweidimensionale Struktur eines G-Protein gekoppelten Rezeptors. Die Polypeptidkette enthält einen hydrophilen N-Terminus (extrazellulär) und einen C-Terminus (intrazellulär) die durch sieben Transmembrandomänen (T1-T7) verbunden sind. Die Transmembrandomänen wiederum sind durch intrazelluläre (I1-I3) und extrazelluläre (E1-E3) Schleifen verbunden. Die Spezifität in der Bindung von Liganden wird in der Tertiärstruktur von mehreren miteinander interagierenden Transmembrandomänen, dem N-Terminus, oder in der Kombination der beiden gesehen. Für die Kopplung der Antwort des Rezeptors sind die Länge und Tertiärstruktur der intrazellulären Schleifen und des C-Terminus von Bedeutung, die mit dem G-Protein in Kontakt stehen.

Anders als andere Rezeptorklassen, wie ligandengesteuerte Ionenkanäle, geben G-Protein gekoppelte Rezeptoren ihr Signal nicht direkt weiter, sondern über zwischengeschaltete, intrazelluläre Botenstoffe (sog. „second messenger“), die wiederum durch Effektorenzyme oder Ionenkanäle zur Verfügung gestellt werden.

Nach einer vorausgegangen ligandeninduzierten Konformationsänderung des Rezeptors, erfolgt die weitere Kommunikation in Richtung Effektor über heterotrimere G-Proteine, welche an den aktivierten Rezeptor binden und die weitere Signalkaskade regulieren. Durch unterschiedliche Kombinationen von Komponenten dieser Signalkaskade, kann ein Organismus die Antwort auf einen Liganden variieren. Desweiteren kann die Signalkaskade zu einer

beachtlichen Verstärkung des Signals führen. Ein Rezeptor kann somit mehrere G-Proteine aktivieren, welche anschließend mehrere Effektorenzyme oder Ionenkanäle beeinflussen. Während eines Aktivierungszyklus werden einige tausend Moleküle eines second messengers produziert, um den gewünschten zellulären Effekt auszulösen.

## 1.2. Der G-Protein Zyklus

G-Proteine stellen die vermittelnde und regulierende Einheit in der Signaltransduktion zwischen Rezeptor und Effektor dar. Sie bestehen aus drei Untereinheiten: einer  $\alpha$ -Untereinheit, die Guaninnukleotide bindet und GTP hydrolysieren kann, einer  $\beta$ -Untereinheit und einer  $\gamma$ -Untereinheit, wobei die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit als eine funktionelle Einheit aufgefasst werden kann. Die Familie der G-Proteine wird in fünf Gruppen unterteilt:  $G_s$ ,  $G_i$ ,  $G_q$ ,  $G_t$  und  $G_{13}$ . Diese Untergruppen weisen Unterschiede in der  $\alpha$ -Untereinheit auf und viele Rezeptoren koppeln nur an eine dieser vier G-Protein-Klassen.  $G_s$  und  $G_i$  sind die am besten charakterisierten G-Proteine, die die Adenylylcyclase stimulieren bzw. inhibieren (Farfel et al. 1999).

Der inaktive Zustand eines G-Proteins ist durch die heterotrimere Proteinkonformation gekennzeichnet, das heißt die drei Untereinheiten liegen undissoziiert vor. Infolge einer ligandeninduzierten Konformationsänderung bindet das G-Protein an den Rezeptor und es kommt zur Freisetzung des an die  $\alpha$ -Untereinheit gebundenen GDP. Aufgrund der höheren intrazellulären Konzentration von GTP im Vergleich zu GDP bindet nun GTP an die  $\alpha$ -Untereinheit, was anschließend zu einer Dissoziation der  $\beta\gamma$ -Untereinheit von der  $\alpha$ -Untereinheit führt. Die GTP-besetzten  $\alpha$ -Untereinheiten sowie die  $\beta\gamma$ -Untereinheiten können dann bestimmte Effektormoleküle beeinflussen. Gleichzeitig wird die GTPase der  $\alpha$ -Untereinheit aktiviert, die GTP zu GDP spaltet, woraufhin  $G\alpha$  inaktiviert wird. Nach Reassoziierung der  $\beta\gamma$ -Untereinheit befindet sich das G-Protein nun wieder in seinem inaktiven Grundzustand (Abb.2) (Gilman 1987).

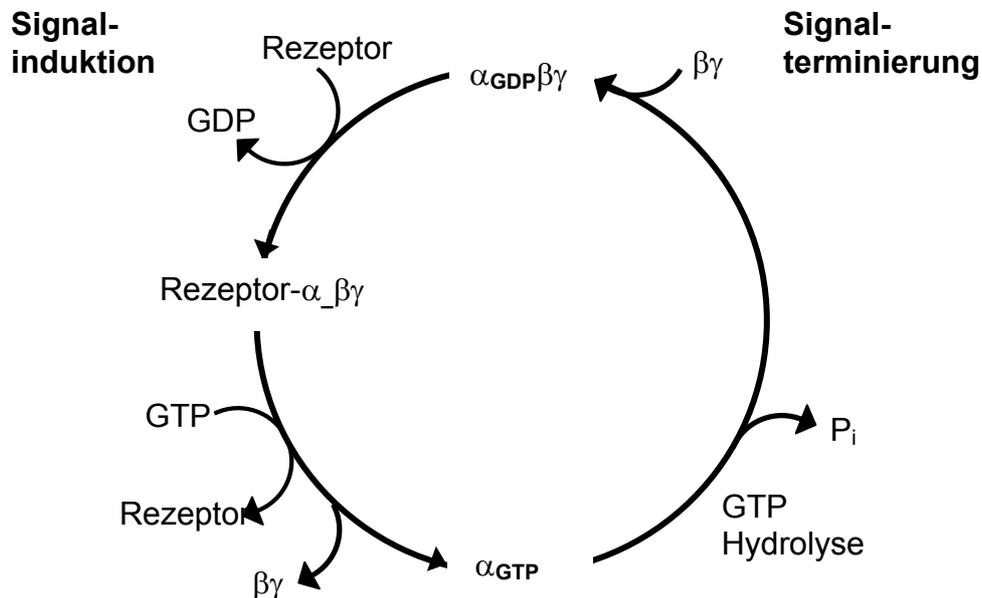


Abbildung 2| **Der G-Protein Zyklus.** Die Aktivierung eines G-Proteins erfolgt durch eine Konfirmationsänderung des Rezeptors, die zum Austausch von GDP zu GTP führt. Daraufhin dissoziieren die  $\alpha_{\text{GTP}}$  und  $\beta\gamma$ -Untereinheiten auseinander und können nun unabhängig voneinander Effektoren beeinflussen. Nach Hydrolyse von GTP durch die intrinsische  $\alpha$ -GTPase erfolgt die Abschaltung von  $\alpha$  und die Reassoziierung mit  $\beta\gamma$ . Das Protein liegt nun wieder im inaktiven Zustand vor.

### 1.3. Die Adenylylcyclase

Die membrangebundene Adenylylcyclase ist ein Protein, welches aus zwölf  $\alpha$ -Helices besteht, die die Zellmembran alternierend durchspannen. Zehn verschiedene Isoformen der Adenylylcyclase sind in Säugetierzellen bekannt. Aktiviert werden alle Isoformen durch  $G_{\alpha_s}$ . Die Adenylylcyclase hat zwei katalytische Zentren, zum einen an der intrazellulären Schleife zwischen der 6. und 7. Helix und zum anderen am intrazellulären C-Terminus. Nach Stimulation

durch  $G_{\alpha s}$  erfolgt eine Konformationsänderung des Enzyms, aus der schließlich die Produktion von cAMP aus ATP resultiert (Sunhara et al., 1996).

Die meisten Effekte von cAMP in eukaryotischen Zellen werden durch eine einzige Proteinkinase vermittelt: die Proteinkinase A.

Neben den schon länger bekannten cAMP abhängigen Ionenkanälen und Phosphodiesterasen konnten mit der Familie der EPAC (Exchange Protein directly Activated by cAMP) oder cAMP-GEF (cAMP regulated Guanine nucleotide Exchange Factor) weitere Proteine als Effektoren für cAMP gefunden werden (Springett et al., 2004).

## 2. $\beta$ -adrenerge Rezeptoren

### 2.1. Physiologische Bedeutung

Adrenerge Rezeptoren bilden die Schnittstelle zwischen dem sympathischen Nervensystem auf der einen Seite und den entsprechenden Zielorganen auf der anderen Seite. Sie beeinflussen alle großen Organsysteme. Das sympathische Nervensystem vermittelt die Antwortreaktion des Körpers auf Stress- und Fluchtreaktionen durch die Freisetzung von Katecholaminen, die zu einer höheren Leistungsbereitschaft und Leistungsfähigkeit des Organismus führen.

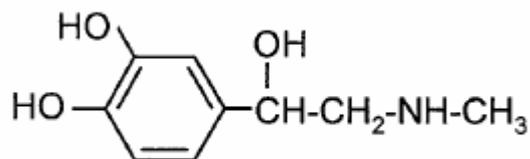


Abbildung 3| **Strukturformel von Adrenalin.** Adrenalin ist neben dem chemisch sehr ähnlichen Noradrenalin das physiologische Katecholamin, welches aus dem Nebennierenmark freigesetzt wird. Es vermittelt als Hormon die Antwortreaktionen des sympathischen Nervensystems auf äußere Reize.

Die höhere Leistungsbereitschaft resultiert aus zahlreichen Veränderungen. Das Herz schlägt schneller und mit einer größeren Auswurfraction; der

Blutdruck steigt; das Bronchialsystem erweitert sich um einen maximalen Luftfluss zu ermöglichen; Glykogen- und Fettreserven werden abgebaut, um mehr Energie bereitzustellen und Gefäße, welche die Skelettmuskulatur versorgen werden dilatiert. In der Haut dagegen werden die Gefäße enggestellt. Die große Vielfalt an Antwortreaktionen auf Katecholamine lässt sich durch mittlerweile neun bestimmte adrenerge Rezeptoren erklären. Diese lassen sich in drei Gruppen, die  $\alpha_1$ -Rezeptoren ( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ ), die  $\alpha_2$ -Rezeptoren ( $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ ,  $\alpha_{2C}$ ), und  $\beta$ -Rezeptoren ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ) untergliedern (Bylund et al., 1998), wobei in dieser Arbeit insbesondere die  $\beta$ -Rezeptoren betrachtet werden sollen. Ihr gemeinsames Klassifizierungsmerkmal ist die Aktivierbarkeit durch Isoprenalin sowie durch physiologische Konzentrationen von Adrenalin bzw. Noradrenalin.

In der klassischen Unterteilung der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren gilt der  $\beta_1$ -Rezeptor als kardiomyoztenstimulierender Subtyp, wohingegen der  $\beta_2$ -Rezeptor glatte Muskelzellen relaxiert (Lands et al., 1967). Diese beiden Lokalisationen sind auch heute noch von besonderer medizinischer Bedeutung.

Tabelle 1   Lokalisation und physiologische Effekte der humanen adrenergen Rezeptoren		
Rezeptor	Lokalisation	Effekt bei Aktivierung
$\alpha_1$	Glatte Muskulatur (Gefäße) M. Dilator Pupillae Prostata	Kontraktion Kontraktion (→ Mydriasis) Kontraktion
$\alpha_2$	Postsynaptische ZNS-Rez. Thrombozyten Cholinerge und adrenerge Nervenenden Teilweise glatte Muskulatur	Wahrscheinlich viele Effekte Aggregation Inhibition der Transmitterausschüttung  Kontraktion
$\beta_1$	Herz  Niere	Positive Inotropie Positive Chronotropie Positive Dromotropie Reninfreisetzung
$\beta_2$	Bronchien Gefäße (Skelettmuskulatur) schwangeren Uterus Pankreas Leber Mastzellen	Bronchodilatation Vasodilatation Tokolyse Insulinsekretion Glykogenolyse verminderte Degranulation
$\beta_3$	Braunes Fettgewebe	Lipolyse

Mittlerweile wurden im Herzen sämtliche Subtypen detektiert, dennoch dominieren die  $\beta_1$ -Rezeptoren gegenüber den  $\beta_2$ -Rezeptoren mit einem Verhältnis von 70 zu 30 (Brodde und Michel, 1999) und die maximale Steigerung der Kontraktilität kann nur über  $\beta_1$ -Rezeptoren erreicht werden (Kaumann et al., 1989). Auch in der glatten Muskulatur von Gefäßen oder Bronchien wurden die drei Subtypen gefunden. Für die Relaxation ist jedoch der  $\beta_2$ -Rezeptor der Bedeutendste (Guimarães und Moura, 2001). Der  $\beta_3$ -Rezeptor ist im Wesentlichen im Fettgewebe angesiedelt (Krief et al, 1993) und kontrolliert die Lipolyse.

Unterschiede hinsichtlich der verschiedenen Subtypen zeigen sich auch in der Affinität zu den endogenen Katecholaminen Adrenalin und Noradrenalin.  $\beta_1$ -Rezeptoren binden sie in gleicher Weise, wohingegen die  $\beta_2$ -Rezeptoren eine deutlich höhere Affinität zu Adrenalin haben. Die  $\beta_3$ -Rezeptoren wiederum binden Noradrenalin erheblich besser als Adrenalin (Hoffmann et al., 2004).

## 2.2. Die Signalkaskade eines $\beta$ -Rezeptors

$\beta$ -adrenerge Rezeptoren gehören zu den intensiv untersuchten Rezeptoren der großen Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Die über diese Rezeptorklasse gewonnenen Erkenntnisse haben viel zum allgemeinen Verständnis der G-Protein gekoppelten Rezeptoren beigetragen.

Die klassische Signalkaskade aller  $\beta$ -Rezeptorsubtypen beinhaltet die Aktivierung der Adenylylcyclase vermittelt durch  $G_s$ , was in einem Anstieg von cAMP resultiert (Dixon et al., 1986, Frielle et al., 1987, Emorine et al., 1989).

Es wurde jedoch auch gezeigt, dass sowohl der  $\beta_2$ -Rezeptor als auch der  $\beta_3$ -Rezeptor neben  $G_s$  auch an  $G_i$  koppeln können (Gauthier et al., 1996, Daaka et al., 1997). Außerdem kann der  $\beta_2$ -Rezeptor ohne Aktivierung des G-Protein Mechanismus die Natrium-Protonen Pumpe in der Niere inhibieren (Hall et al., 1998).

Die wesentliche Zielstruktur von cAMP ist die Proteinkinase A. In Kardiomyozyten ist bekannt, dass die Proteinkinase A verschiedene Proteine phosphoryliert, die wichtig für die Funktion sind. Diese sind L-Typ Calcium Kanäle, Troponin I, Phospholamban, Ryanodin Rezeptoren, Myosin bindendes Protein C und Phosphatase Inhibitor 1. Alle genannten Proteine beeinflussen die Kontraktilität am Herzen (Lohse et al., 2003). In glatten Muskelzellen, wie in der Bronchialmuskulatur, wird durch Aktivierung  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren und der damit assoziierten cAMP Konzentrationssteigerung eine Kontraktion inhibiert. Mit  $\beta$ -adrenergen Agonisten behandelte glatte Muskelzellen der Trachealmuskulatur zeigen eine Abnahme der Konzentration von Kalzium, der Phosphorylierung der Myosin Leichtketten Kinase (MLCK) und der Kraft (Tang et al., 1992).

## 2.3. Rezeptorsubtypen und ihre Struktureigenschaften

Die codierenden Sequenzen der drei bekannten humanen  $\beta$ -Rezeptorsubtypen sind von unterschiedlicher Länge und auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert. Der  $\beta_1$ -Rezeptor besteht aus 477 Aminosäuren und wurde auf

Chromosom 10 detektiert (Frielle et al., 1987). Der  $\beta_2$ -Rezeptor ist mit 413 Aminosäuren kleiner und wurde auf Chromosom 5 entdeckt (Dixon et al., 1986). Diese beiden Rezeptoren weisen eine Gesamthomologie von 48.9% auf (72% in den Transmembrandomänen), wohingegen der  $\beta_3$ -Rezeptor zu 50.7% beziehungsweise 45.5% mit den beiden zuvor genannten Rezeptoren homolog ist (Emorine et al., 1989). Viele Aminosäuren sind in allen drei Rezeptoren an der gleichen Position konserviert (Dohlman et al., 1987). Der  $\beta_3$ -Rezeptor ist auf Chromosom 8 lokalisiert und 402 Aminosäuren lang (Emorine et al., 1989). Wichtige Informationen über die Interaktion von Liganden an  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren wurden durch Mutationsstudien am  $\beta_2$ -Rezeptor generiert. Aufgrund der leichteren molekularbiologischen Handhabbarkeit wurden fast alle bisherigen Erkenntnisse an diesem Rezeptor gewonnen und er gilt neben dem Rhodopsin als einer der am besten untersuchten G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Diese Mutationsstudien beinhalteten sowohl einzelne Punktmutationen als auch den Austausch oder die Deletion von ganzen Regionen. So konnte gezeigt werden, dass die Liganden in einer Bindungstasche innerhalb der  $\alpha$ -Helices der Transmembrandomänen binden. Diese Erkenntnis beruhte auf der Beobachtung, dass ein mutierter  $\beta_2$ -Rezeptor nach Deletion der hydrophilen Schleifen nach wie vor Liganden binden kann (Dixon et al., 1987).

Es folgten Erkenntnisse mit gezielten Punktmutationen. Für Asp<sup>113</sup> in der dritten Transmembrandomäne (Abb. 4) konnte gezeigt werden, dass es für die Bindung der Aminogruppe von Agonisten und Antagonisten von Bedeutung ist. Ein Austausch führte hier zu einem Verlust von Affinität (Strader et al., 1987a). Für die Catecholgruppen von Agonisten wurden Ser<sup>203</sup>, Ser<sup>204</sup> und Ser<sup>207</sup> in der fünften Transmembrandomäne als wichtige Aminosäuren für die Interaktion beschrieben (Sato et al., 1999, Strader et al., 1989). In der sechsten Transmembrandomäne konnte mit Asn<sup>293</sup> eine Aminosäure gefunden werden, deren Austausch Auswirkungen auf die stereospezifische Bindung von Agonisten hat (Wieland et al., 1996). Sie ist auf der gleichen horizontalen Ebene wie die zuvor beschriebenen Aminosäuren angesiedelt und somit konnte eine Bindungstasche für Agonisten mit Wechselwirkungen zwischen der dritten,

fünften und sechsten Transmembrandomäne postuliert werden (Abb. 4). Da die genannten Aminosäuren interessanterweise in allen drei Subtypen an derselben Stelle konserviert sind, können sie nicht für ein subtypspezifisches Bindungsverhalten verantwortlich sein.

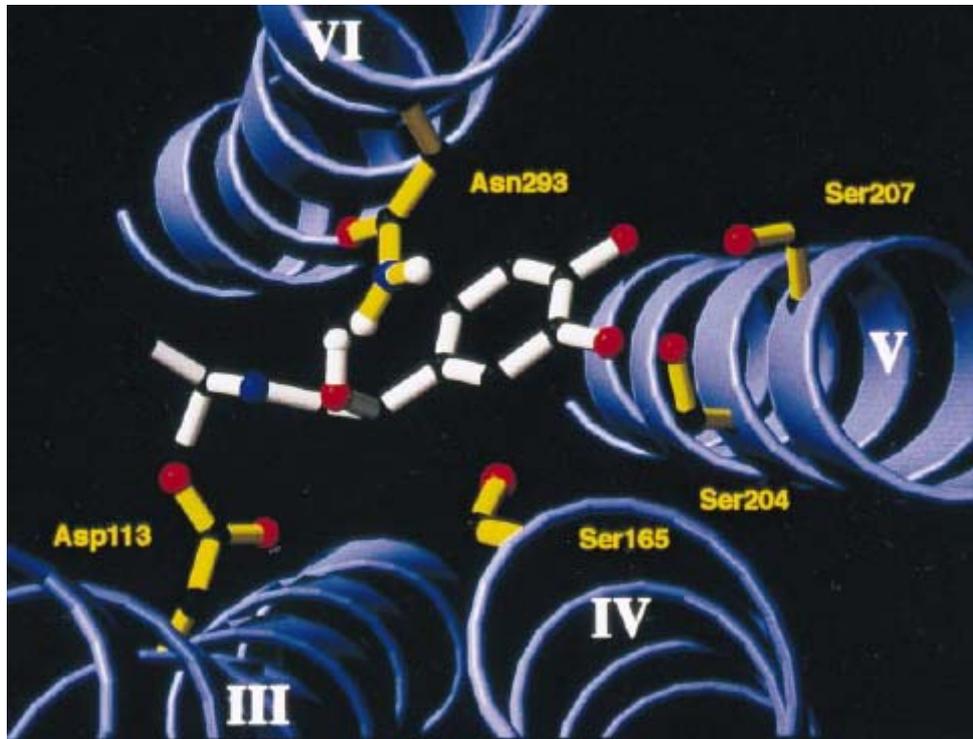


Abbildung 4 | **Bindungsmodell.** Modell, welches die Bindungsverhältnisse von (-) Isoproterenol am  $\beta_2$ -Rezeptor verdeutlicht (aus Wieland et al., 1996). Die Transmembrandomänen sind von der extrazellulären Seite und um 20° geneigt betrachtet.

Für die Ethergruppe von Antagonisten wie Alprenolol hingegen konnte mit der Aminosäure Asn<sup>312</sup> in der siebten Transmembrandomäne ein spezifischer Interaktionspartner gefunden werden, der die Vermutung nahe legte, dass die dritte und siebte Transmembrandomäne bei der Bindung von Antagonisten miteinander interagieren (Surayanarayana und Kobilka, 1993).

Außerdem wurden das N- und C-terminale Ende der dritten intrazellulären Schleife und der Beginn der vierten Transmembrandomäne mehrmals als wichtige Region für die Aktivierung des G-Proteins dargestellt (Strader et al., 1987b, O'Dowd et al., 1988, Cheung et al., 1989)

### 3. Liganden an $\beta$ -adrenergen Rezeptoren

Es existiert eine große Anzahl von klinisch und experimentell eingesetzten Liganden an  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren. Die beiden klinisch am häufigsten eingesetzten Substanzgruppen werden im folgenden vorgestellt. Im Anschluss wird eine pharmakologische Übersicht von ausgewählten Liganden präsentiert.

#### 3.1. Betablocker

Betablocker wurden 1968 mit dem unselektiven Propranolol in die Klinik eingeführt und fortan weiterentwickelt. Pharmakologisch lassen sie sich aufgrund ihrer Eigenschaften, wie  $\beta_1$ -Selektivität, intrinsischer sympathomimetischer Aktivität (ISA) und membranstabilisierenden Effekten weiter untergliedern. Die große Anzahl ihrer ursprünglichen Indikationsgebiete, wie Angina pectoris, Bluthochdruck, Tachykardie und kardiale Arrhythmie wurden in den letzten zehn Jahren um eine ehemalige Kontraindikation, der chronischen Herzinsuffizienz, erweitert. Es sind über 20 verschiedene Betablocker auf dem Markt erhältlich, wobei nur für drei Betablocker eine Verbesserung hinsichtlich der Mortalität und Morbidität für herzinsuffiziente Patienten in großen klinischen Studien nachgewiesen wurde.

Betablocker	Studie	Referenz
<b>Metoprolol</b>	Metoprolol CR/XL Randomized Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF)	MERIT-HF Investigators 1999
<b>Bisoprolol</b>	Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II)	CIBIS-II Investigators 1999
<b>Carvedilol</b>	Carvedilol Prospective Randomized Cumulative Survival (COPERNICUS) Study Group	Packer et al., 2002

Die Ergebnisse dieser und anderer Studien sind Bestandteile von Leitlinien für die tägliche klinische Praxis. Die COMET-Studie (Poole-Wilson et al., 2003) belegt außerdem, dass Carvedilol dem Metoprolol hinsichtlich der Mortalität bei

herzinsuffizienten Patienten überlegen ist. (Bristow 2000, Fowler 2004). Diese Studie gilt jedoch als umstritten, da für Metoprolol falsche Dosierungen und ein falsches Präparat verwendet wurden.

Die Nebenwirkungen von Betablockern leiten sich aus der Blockade der  $\beta$ -Rezeptoren ab und beinhalten unter anderem die Verschlechterung der Herzfunktion bei plötzlichem, nicht einschleichendem Therapiebeginn, die Neigung zu Bronchospasmen insbesondere bei Asthmatikern und die Prädisposition zur Entwicklung einer Hypoglykämie bei insulinabhängigen Diabetikern. Eines der Ziele der Weiterentwicklung von Betablockern war es deshalb, selektive Substanzen für einen bestimmten  $\beta$ -Rezeptorsubtyp zu gestalten, wobei man am Beispiel des unselektiven Antagonisten Carvedilol lernen musste, dass Selektivität nicht immer mit klinischer Verbesserung gleichzusetzen ist

### **3.2. $\beta_2$ -Agonisten**

Die durch  $\beta_2$ -Rezeptoren vermittelte Bronchodilatation wurde schon zu Beginn des 20. Jahrhunderts durch die Injektion von Adrenalin, später auch Isoprenalin, bei Asthmatikern therapeutisch beeinflusst. Die unerwünschten Wirkungen einer solchen Therapie waren auf Grund der Stimulation sämtlicher adrenerger Rezeptoren immens und es sollte bis in die späten 60er Jahre dauern, als mit den beiden Substanzen Salbutamol und Terbutalin zwei  $\beta_2$ -selektive Liganden entwickelt wurden, die als echte  $\beta_2$ -Agonisten in der Therapie eingesetzt werden konnten. Die Folgesubstanzen unterscheiden sich in der Wirkungsdauer, Salmeterol und Formoterol sind klinisch eingesetzte langwirksame  $\beta_2$ -Agonisten, oder in anderen pharmakologischen Eigenschaften. Ein wichtiges Ziel in der Weiterentwicklung war dabei Nebenwirkungen, wie die kardiale Stimulation, zu reduzieren oder anders formuliert die Selektivität zu erhöhen. Salbutamol und Terbutalin waren die 1968 und 1969 zuerst entwickelten  $\beta_2$ -Agonisten, es folgten, basierend auf den pharmakologischen Erkenntnissen, eine Reihe von weiterentwickelten Substanzen, von denen jedoch einige nur experimentell eingesetzt werden.

Salbutamol und Fenoterol sind die klinisch am häufigsten verschriebenen Substanzen.

Inhalierter  $\beta_2$ -Agonisten stellen nach wie vor die effektivste Form der Bronchodilatation dar, die momentan verfügbar ist und sie sind neben den Glukokortikoiden ein fester Bestandteil in den Richtlinien der Asthmatherapie (Waldeck 2002).

### **3.3. Pharmakologische Übersicht**

Trotz der hohen Anzahl von Publikationen über die Interaktion von Liganden mit  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren und der großen klinischen und experimentellen Bedeutung dieser Rezeptoren, gab es bis vor kurzem keine vergleichende Studie, die eine Auswahl von Liganden an den drei humanen  $\beta$ -Rezeptorsubtypen in einer einheitlichen Zelllinie untersucht hat.

Hoffmann et al. (2004) konnten mit ihrer Arbeit vergleichbare Daten beitragen und ein Bindungsprofil der humanen  $\beta$ -Rezeptorsubtypen erstellen. Viele existierenden Ergebnisse konnten verifiziert werden und einige neue Erkenntnisse wurden gewonnen. Als Zelllinie dienten CHO-Zellen, die anders als andere Zellen eine vernachlässigbare Anzahl von endogenen  $\beta$ -Rezeptoren exprimieren. Neben den endogenen Agonisten Adrenalin und Noradrenalin wurde das Bindungsprofil sowohl von experimentellen Substanzen (z.B. CGP-20712) als auch von im klinischen Alltag gebräuchlichen Medikamenten wie z.B. Salmeterol an den drei  $\beta$ -AR Subtypen untersucht

Eine Auswahl der Bindungsdaten (Tab.3) wird im Folgenden besprochen. Wie erwartet hat der  $\beta_1$ -Rezeptor keine Präferenz in der Bindung der endogenen Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin. Der  $\beta_2$ -Rezeptor hingegen bindet Adrenalin 35fach besser als Noradrenalin, er könnte deshalb laut den Autoren als „adrenerger“ Rezeptor bezeichnet werden. Der  $\beta_3$ -Rezeptor zeigt im Gegensatz dazu eine 30fach höhere Affinität für Noradrenalin und ist demzufolge der „noradrenerge“ Rezeptor.

Tabelle 3 | Bindungsdaten von ausgewählten Liganden an den humanen  $\beta$ -Rezeptorsubtypen. Dargestellt sind  $K_i$ -Werte [nM], die mit Hilfe von Verdrängungsexperimenten mit  $^{125}\text{I}$ -CYP wurden (aus Hoffmann et al., 2004).

Substanz	$\beta_1$	$\beta_2$	$\beta_3$
Noradrenalin	3,570	26,400	4,300
Adrenalin	3,970	735	126,000
Isoprenalin	224	458	1,570
Fenoterol	13,600	719	55,700
Salbutamol	2,440	2,170	53,700
Salmeterol	1,600	24.6	7,180
Broxaterol	1,310	1,290	3,990
Terbutalin	31,300	15,400	79,800
ICI-118551	49.5	0.7	611
CGP-20712	4.7	4,040	2,360

Die in der Klinik gebräuchlichen  $\beta_2$ -Agonisten Terbutalin und Salbutamol zeigen sowohl für den  $\beta_1$ -Rezeptor als auch für den  $\beta_2$ -Rezeptor eine ähnlich hohe Affinität und nur Salmeterol und, in geringerem Ausmaß, Fenoterol erweisen sich als  $\beta_2$ -selektiv.

In der Gruppe der Betablocker (hier nicht dargestellt) sind Pindolol, Carvedilol und S-Propranolol unselektiv hinsichtlich des  $\beta_1$  und  $\beta_2$ -Rezeptors. Atenolol, Bisoprolol und Metoprolol hingegen zeigen die erwartete  $\beta_1$ -Selektivität.

In der Gruppe der experimentellen Substanzen zeigte CGP-20712 die größte Selektivität für  $\beta_1$ -AR gegenüber den  $\beta_2$ - und  $\beta_3$ - Subtypen, ICI-118551 die größte Selektivität für  $\beta_2$ -AR gegenüber den anderen Subtypen.

Tabelle 4 | **Aktivierung der Adenylylcyclase über humane  $\beta$ -Rezeptorsubtypen durch ausgewählte Liganden.** Die Daten sind Prozentangaben und auf die maximale Antwort mit dem vollen Agonisten Isoproterenol (=100%) normiert. Inverser Agonismus wird als negative Prozentangabe auf die Basalaktivität normiert. Die Konzentration der Liganden entspricht dem 100fachen Wert für  $K_i$ . (aus Hoffmann et al., 2004).

<b>Substanz</b>	$\beta_1$	$\beta_2$	$\beta_3$
<b>Adrenalin</b>	133	110	106
<b>Noradrenalin</b>	123	103	122
<b>Fenoterol</b>	66	76	110
<b>Salmeterol</b>	-33	44	-13
<b>Salbutamol</b>	2	33	87
<b>Broxaterol</b>	-11	20	42
<b>Terbutalin</b>	6	41	45
<b>ICI-118551</b>	-22	-32	-30
<b>CGP-20712</b>	-25	-30	-20

Mit den gleichen Zelllinien wurden auch funktionellen Daten generiert (Tab.4). Gezeigt sind prozentuale Werte der Adenylylcyclaseaktivität, die auf die maximale Antwort des vollen Agonisten Isoprotenerol normiert sind. Die Substanzen können auf Grund ihres funktionellen Verhaltens in verschiedene Klassen untergliedert werden. So gibt es eine Gruppe die an allen  $\beta$ -Rezeptorsubtypen agonistisch wirkt, zum Beispiel Isoprotenerol, Adrenalin, Noradrenalin und Fenoterol. Die  $\beta_2$ -Agonisten Terbutalin, Salbutamol und Broxaterol sind partielle Agonisten am  $\beta_2$ -Rezeptor sowie am  $\beta_3$ -Rezeptor und Antagonisten am  $\beta_1$ -Rezeptor. Für Broxaterol wurde dieses Verhalten schon vor längerer Zeit beschrieben (Conti et al., 1998), für die beiden anderen Substanzen stellt diese funktionelle Selektivität eine neue Erkenntnis dar. Salmeterol ist der einzige  $\beta_2$ -Agonist der keine agonistische Aktivität an den anderen Rezeptorsubtypen aufzeigt. Alle anderen Substanzen waren sowohl am  $\beta_1$  als auch am  $\beta_2$ -Rezeptor Antagonisten oder inverse Agonisten (Hoffmann et al., 2004).

## 4. Zielsetzung

Basierend auf der Beobachtung, dass Terbutalin, Salbutamol und Broxaterol Antagonisten am  $\beta_1$ -Rezeptor und Agonisten am  $\beta_2$ - und  $\beta_3$ -Rezeptor sind, stellte sich die Frage, ob auf molekularer Ebene Unterschiede gefunden werden können, die diese unterschiedliche Aktivierbarkeit von  $\beta$ -Rezeptoren erklären könnten. Dazu sollten im Rahmen dieser Arbeit Mutanten des  $\beta_1$ -Rezeptors mit verändertem Aktivierungsverhalten hergestellt werden. Das Ziel dabei war, solche Mutanten zu finden, die sich durch Terbutalin oder Broxaterol aktivieren lassen.

- 1. Herstellung der Mutanten** Zur Suche nach Kandidaten zur Mutation wurden zuerst die Aminosäuresequenzen der drei Rezeptoren verglichen (Abb. 5). Die naheliegende Systematik der Suche bestand darin, Aminosäurepositionen in den Rezeptoren zu finden, die das funktionelle Verhalten der drei Substanzen widerspiegeln. Das Auswahlkriterium war demzufolge:  $\beta_1 \neq \beta_2 = \beta_3$ . An 17 Positionen innerhalb der drei Rezeptoren unterscheidet sich die Aminosäure des  $\beta_1$ -Rezeptors von der des  $\beta_2$ - und  $\beta_3$ -Rezeptors. Die sieben Positionen V120, L154, I185, D212, K253, F362 und I375, die bis auf eine Ausnahme alle in den Transmembrandomänen lokalisiert sind, wurden ausgewählt, um sie näher zu charakterisieren. Im  $\beta_1$ -Wildtyprezeptor sollte jeweils eine dieser Aminosäuren durch die korrespondierende Aminosäure des  $\beta_2$ - /  $\beta_3$ -Rezeptors mittels zielgerichteter Mutagenese ersetzt werden, um die entsprechende Mutante anschließend auf eine eventuelle Aktivierbarkeit durch Broxaterol und Terbutalin zu testen.
- 2. Generierung stabiler Zelllinien** Um die Mutanten zu charakterisieren, musste eine Zelllinie gefunden werden, die möglichst frei von endogenen  $\beta$ -Rezeptoren ist. Diese Zellen sollten dann mit den entsprechenden Konstrukten transient oder stabil transfiziert werden.

**3. Pharmakologische Untersuchung der Mutanten** In der folgenden pharmakologischen und funktionellen Charakterisierung sollte analysiert werden, ob die eingeführten Mutationen Auswirkungen auf das Bindungsverhalten und die Aktivierbarkeit durch verschiedene Substanzgruppen haben.

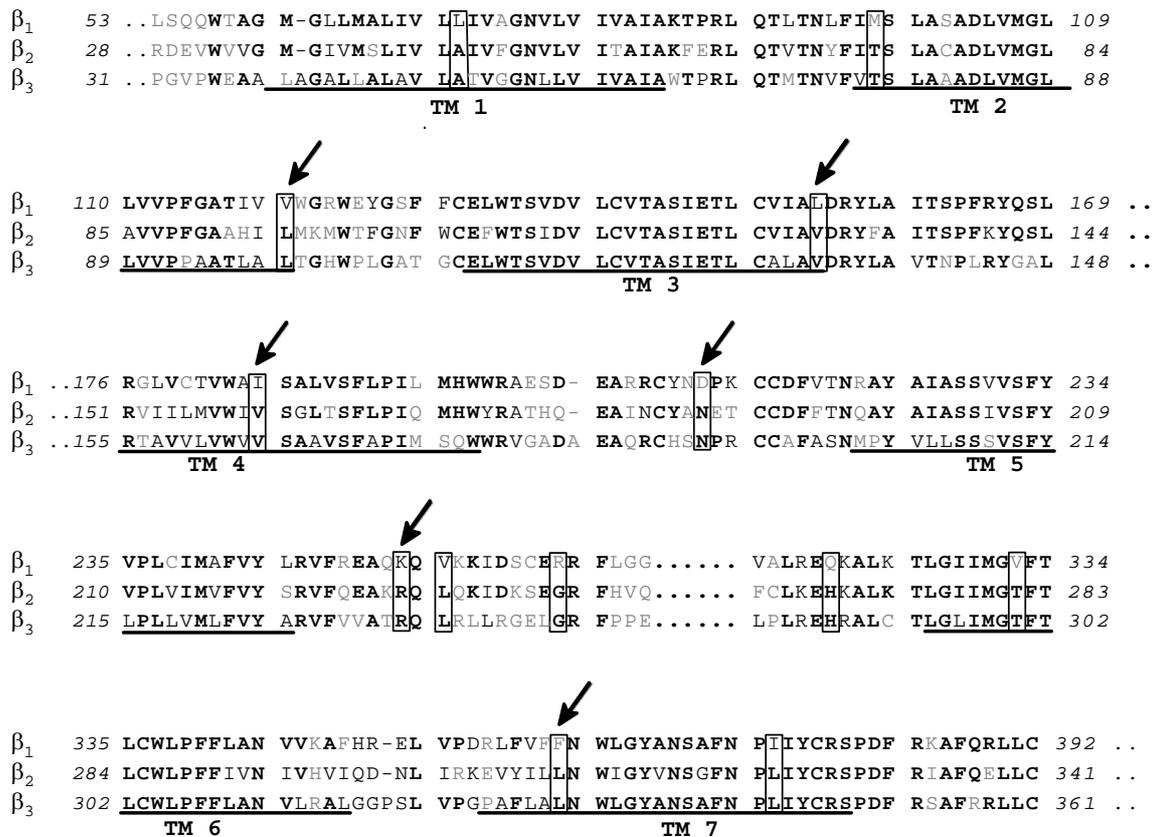


Abbildung 5| **Aminosäurevergleich der  $\beta$ -adrenergen Rezeptorsubtypen.** Dargestellt ist ein Auszug der Aminosäuresequenz der drei  $\beta$ -adrenergen Rezeptorsubtypen. Innerhalb der Transmembrandomänen ist die Aminosäureabfolge häufig homolog (mit schwarzen Buchstaben hervorgehoben). Mit Kästen hervorgehoben sind solche Positionen, an der sich die Aminosäure im  $\beta_1$ -Rezeptor von der im  $\beta_2$ - und  $\beta_3$ -Rezeptor unterscheidet. Mit Pfeilen gekennzeichnet sind die in dieser Arbeit hergestellten und pharmakologisch charakterisierten Mutanten.

## *II. Material & Methoden*

### **1. Material**

#### **1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien**

Adrenalin	Sigma
Ampicillin-Natriumsalz	Carl Roth GmbH
Agarose, Elektrophoresegrad	Gibco BRL
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]ATP	Perkin-Elmer LifeScience
Broxaterol	Prof. M. De Amici (Istituto di Chimica Farmaceutica e Tossicologica, Uni- versità degli Studi di Milano)
CGP-20712	Sigma
DNA Gel Extraction Kit	Millipore
DNA-Längenstandards:	New England Biolabs
100 bp-Ladder (500 µg/µl)	
1 kb-Ladder (500 µg/µl)	
Dulbecco`s modified Eagle`s Medium	PAN™
EndoFree Plasmid Maxi Kit	QIAGEN
Effectene® Transfection Reagent	QIAGEN
Fötale Kälberserum (FCS)	Sigma
FuGene 6 Transfection Reagent	Roche
(-)-3- <sup>125</sup> I-Cyanopindolol ( <sup>125</sup> I-CYP)	Amersham Biosciences
ICI-118551	RBI
Isoprenalin	Sigma
Noradrenalin	Sigma

PBS (steril, Zellkultur)	PAN™
Penicillin/Streptomycin (Zellkultur)	PAN™
Protein Assay-Reagenz Bradford	Biorad
Quiagen Maxi Kit	QIAGEN
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN
Salmeterol	GlaxoSmithKline
Select Agar	Gibco BRL
Select Peptone 140	Gibco BRL
Select Yeast Extract	Gibco BRL
Terbutalin	Sigma
Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid (Tris-HCl)	Merck
Trypsin-EDTA-Lösung (0.5 g/l Trypsin, 0.2 g/l EDTA)	Sigma
Zellkulturschalen	Nunc

Nicht aufgeführte Chemikalien stammten in der Regel von Merck, Roth oder Sigma.

## 1.2. Puffer und Medien

### 1.2.1. Puffer für molekularbiologische Arbeiten

10x DNA-Ladepuffer	100 mM EDTA 30% Glycerol 0.5% Bromphenolblau 0.5% Xylencyanol
50x TAE	Tris 242 g/l Borsäure 57,1 g/l 37,2 g Na <sub>2</sub> EDTA/l pH eingestellt auf 8,5

TE	10 mM Tris pH 7.4 1 mM EDTA pH 8.0
----	---------------------------------------

### 1.2.2. Puffer für proteinchemische Arbeiten

PBS	137 mM NaCl 2.7 mM KCl 4.3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1.4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7.4
5/2 Puffer	2 mM EDTA 5 mM Tris pH eingestellt auf 7.4
REA-Mix (5x)	42.5 ml H <sub>2</sub> O 25 ml 250 mM Tris pH 7.4 5 ml 0.5 mM cAMP 10 ml 1 % BSA 5 ml 50 µM GTP 5 ml 0.5 mM ATP 5 ml 5 mM MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O 2.5 ml 2.5 mM IBMX

### 1.2.3. Medien für Bakterien

LB-Medium, autoklaviert	1 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 1 % NaCl pH eingestellt auf 7,4 mit 1 M NaOH
Ampicillinhaltiger LB-Agar	1 % Trypton 0.5 % Hefeextrakt 1.5 % Agar 1 % NaCl pH eingestellt auf 7,4 mit 1 M NaOH Ampicillin bis zur Endkonzentration 100 µg/ml hinzugeben
TSB-Puffer	LB-Medium 10 % (w/v) PEG 3.000 5 % (v/v) DMSO 20 mM MgSO <sub>4</sub> pH eingestellt auf 5.0

### 1.2.4. Medien für eukaryotische Zellen

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) – mit 1g/l Glukose

+ 10% fötales Kälberserum (FCS)

+ 1% Penicillin (10,000 U/ml) / Streptomycin (10,000 µg/ml)

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) und der Nährstofflösung F-12

(DMEM F-12) – mit 1g/l Glukose

+ 10% fötales Kälberserum (FCS)

+ 1% Penicillin (10,000 U/ml) / Streptomycin (10,000 µg/ml)

## 1.3. Biologisches Material

### 1.3.1. Oligonukleotide

Die Oligonukleotide mit der Bezeichnung Seq sind Sequenzierungsprimer, die von der Firma MediGenomix hergestellt wurden. Alle anderen Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech AG geliefert.

Name	Sequenz (5'-3')	Schnittstellen- änderung	Orientierung
BstEII-beta1	GCG GGG GTG CTC GTC CTG GGC GCC TCC		vorwärts
P2-V120L	TTC GGG GCC ACC ATC GTG CTG TGG GGC CGC TGG GAG TAC GGC	BstX1 silent	vorwärts
P3-V120L	GCC GTA CTC CCA GCG GCC CCA CAG CAC GAT GGT GGC CCC GAA	BstX1 silent	rückwärts
P2-L154V	CTG TGT GTC ATT GCC GTC GAC CGC TAC CTC GCC ATC	HincII neu	vorwärts
P3-L154V	GAT GGC GAG GTA GCG GTC GAC GGC AAT GAC ACA CAG	HincII neu	rückwärts
P2-I185V	TGC ACC GTG TGG GCT GTC TCG GCT CTG GTG TCC TTC	XcmI silent	vorwärts
P3-I185V	GAA GGA CAC CAG AGC CGA GAC AGC CCA CAC CCT GCA	XcmI silent	rückwärts
P4-Ascl	GAT GCA CAG GGG CAC GTA GAA GGA GAC		rückwärts
P5Ascl	GAC GAG GCG CGC CGG TGC TAC AAC GAC	SgrAI neu	vorwärts
P5Ascl/D212N	GAC GAG GCG CGC CGG TGC TAC AAC CCC AAG TGC	SgrAI neu	vorwärts
P2-K253R	GTG TTC CGC GAG GCC CAG AGG CAG GTG AAG AAG ATC GAC		vorwärts
P3-K253R	GTC GAT CTT CTT CAC CTG CCT CTG GGC CTC GCG GAA CAC		rückwärts
P6NotI	CCC GTT GGC CAG CGG GGC GGT GGC		rückwärts
P7NotI	ATC GAC AGC TGC GAG CGC CGT TTC		vorwärts

P2-Q320H	CTC GTG GCC CTA CGC GAG CAT AAG GCG CTC AAG ACG CTG		vorwärts
P3-Q320H	CAG CGT CTT GAG CGC CTT ATG CTC GCG TAG GGC CAC GAG		rückwärts
P2-F362L	GAC CGC CTC TTC GTC TTC TTA AAC TGG CTG GGC TAC GCC		vorwärts
P3-F362L	GGC GTA GCC CAG CCA GTT TAA GAA GAC GAA GAG GCG GTC		rückwärts
P2-I375L	AAC TCG GCC TTC AAC CCC CTC ATC TAC TGC CGC AGC CCC		vorwärts
P3-I375L	GGG GCT GCG GCA GTA GAT GAG GGG GTT GAA GGC CGA GTT		rückwärts
P8XhoI	CTC GTC CAG GCT CGA GTC GCT GTC CGC CGC GGC CCC GCC GTT	SacII neu	rückwärts
Seq 14	GCG GGG GTG CTC GTC CTG GGC		vorwärts
Seq 23	TGG GCC ATC TCG GCC CTG GTG		vorwärts
Seq 33	ATC GAC AGC TGC GAG CGC CGT		vorwärts
Seq 41	CAC ATT CTG GGC TGT TAC GGA		rückwärts

### 1.3.2. Plasmidvektoren

Für die Expression von rekombinanten Proteinen in eukaryotischen Zellen wurde ausschließlich das pcDNA3-Vektorsystem benutzt.

Vektor	Eigenschaften	Bezugsquelle
pcDNA3	CMV-, T7-, SV40- SP6- Promotor; Amp <sup>r</sup> ; Hind III, Kpn I, BamH I, BstX I, EcoR I, Eco R V, Not I, Xho I, Xba I, Apa I	Invitrogen

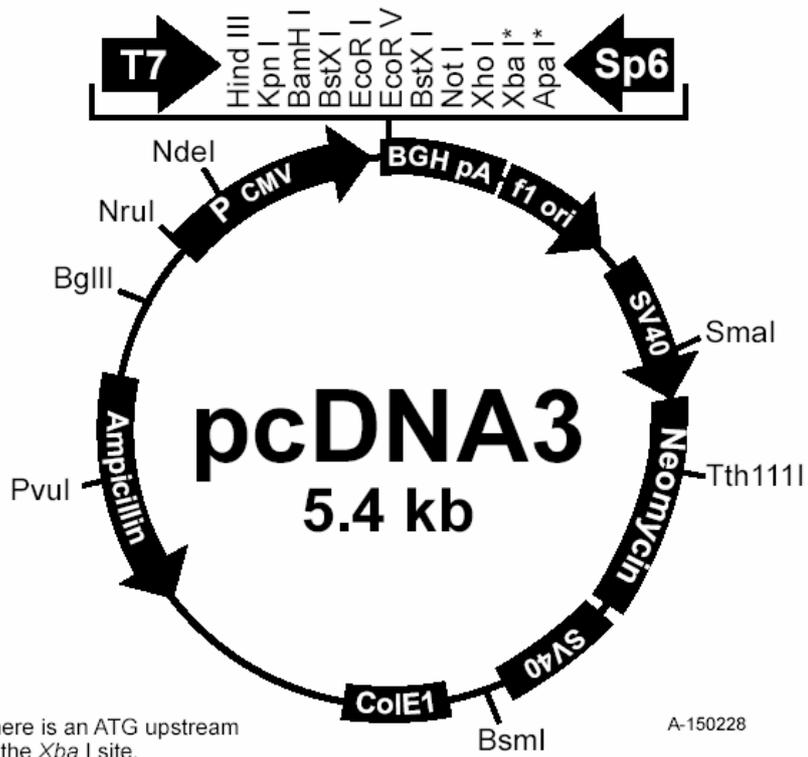


Abbildung 6 | **Schema des pcDNA3 Vektors** der Firma Invitrogen. Dargestellt ist der pcDNA3 Vektor der Firma Invitrogen inklusive der Antibiotikaresistenzgene (Abbildung von der Firmenhomepage [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)).

### 1.3.3. Plasmide

cDNA	Beschreibung	Referenz
$\beta_1$ -WT	Wildtyp des $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors mit den Polymorphismen 49-Ser und 389-Gly. GenBank Eintrag J03019	Hoffmann et al. 2004
$\beta_2$ -WT	Wildtyp des $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors mit den Polymorphismen 16-Arg, 27-Gln und 164-Thr. GenBank Eintrag Y00106	Hoffmann et al. 2004
$\beta_1$ -V120L	Wildtyp des $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors mit der Punktmutation Valin zu Leucin an Position 120 enthält	diese Arbeit
$\beta_1$ -L154V	Wildtyp des $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors mit der Punktmutation Leucin zu Valin an Position 154	diese Arbeit
$\beta_1$ -I185V	Wildtyp des $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors mit der Punktmutation Isoleucin zu Valin an Position 185	diese Arbeit

$\beta_1$ -D212N	Wildtyp des $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors mit der Punktmutation Asparaginsäure zu Asparagin an Position 212	diese Arbeit
$\beta_1$ -K253R	Wildtyp des $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors mit der Punktmutation Lysin zu Arginin an Position 253	diese Arbeit
$\beta_1$ -F362L	Wildtyp des $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors mit der Punktmutation Phenylalanin zu Leucin an Position 362	diese Arbeit
$\beta_1$ -I375L	Wildtyp des $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors mit der Punktmutation Isoleucin zu Leucin an Position 375	diese Arbeit

### 1.3.4. Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
E. coli XL1 blue	endA1, hsdR17 (rK <sup>-</sup> mK <sup>+</sup> ), supE44, lambda <sup>-</sup> , recA1, gyrA1, gyrA96, relA1, (lac <sup>-</sup> ), (F <sup>'</sup> , proAB, lac <sup>q</sup> ZΔM15, Tn10[tetR])	Stratagene

### 1.3.5. Eukaryotische Zelllinien

HEK-293	humane embryonale Nierenzellen <ul style="list-style-type: none"> <li>• Zelllinie I: HEK-293 Zellen (Lattion et al., 1999)</li> <li>• Zelllinie II: HEK-A<sub>2A</sub> Zellen (Klotz et al., 1998)</li> <li>• Zelllinie III: HEK Zellen aus dem Labor Castro</li> <li>• Zelllinie IV: HEK-tsA201 Zellen (Gao et al., 2000)</li> <li>• Zelllinie V: HEK-293 Zellen aus dem Labor Klotz</li> </ul>
CHO-K1	„Chinese Hamster Ovary“ Zellen (Hoffmann et al., 2004)
COS 7	SV40-transformierte Nierenzellen des „African green monkey“

### 1.3.6. Enzyme

T4-DNA-Ligase

New England Biolabs

Restriktionsenzyme

New England Biolabs

Dephosphorylierungskit

Roche Diagnostics

## 2. Methoden

### 2.1. Molekularbiologische Methoden

#### 2.1.1. Polymerase-Kettenreaktion

Grundlage der PCR ist eine selektive, enzymatische *in vitro* Vermehrung von DNA-Fragmenten. Durch Erhitzen von DNA-Doppelsträngen (dsDNA, double stranded DNA) lösen sich die Bindungen innerhalb der dsDNA, so dass zwei DNA-Einzelstränge (ssDNA, single stranded DNA) entstehen. Nach Absenken der Temperatur stehen diese nun in Gegenwart von zwei Oligonukleotiden („Primer“, komplementär zur DNA) für eine Auffüllreaktion zur Verfügung. Ein Einzelstrang wird hierbei unter Verwendung einer DNA-Polymerase und den entsprechenden Primern zum DNA-Doppelstrang (dsDNA) aufgefüllt. Für diese wiederholbare Reaktion wird eine hitzestabile Polymerase verwendet. Jeder Zyklus setzt sich aus der Denaturierung der dsDNA (1. Schritt), dem nachfolgenden Annealing (Hybridisierung) der Oligonukleotide (Primer) an die ssDNA (2. Schritt) und der Polymerisation (3. Schritt) zusammen. Die Annealingtemperatur wird aus der Nukleotidanzahl und Zusammensetzung der verwendeten Primer wie folgt berechnet:

$$T_M = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C) \text{ } ^\circ\text{C}$$

Bei der PCR wird die DNA-Polymerase eines thermophilen Bakteriums (Aktivitätsmaximum bei 72°C) eingesetzt, welches den zyklisch auftretenden Denaturierungstemperaturen von 95° standhält. Nach 25-30 Zyklen kann man durch die stetige Verdoppelung, ausgehend von einigen wenigen DNA-Molekülen genügend DNA für die Weiterverarbeitung erhalten.

100 µl Reaktionsansatz:

4 µl einer 10mM Lösung der vier Desoxynukleotidtriphosphate

1 µl (200 pmol) der beiden Primer

150 ng Template

2 µl Mg<sup>++</sup> (2 mM)  
5 µl DMSO  
10 µl Vent-Polymerasepuffer (10x)  
2µl (4 U) Vent®-Polymerase  
ad 100 µl H<sub>2</sub>O

Für die 30 Zyklen wurden die folgenden Temperaturen im Thermocycler (Perkin Elmer DNA Thermal Cycler 480) gewählt, wobei je nach Experiment die Annealingtemperatur optimiert wurde.

1. Zyklus:	4 min	94°C
	1 min	50°C
	2 min	72°C
2.-29. Zyklus:	1 min	94°C
	1 min	50°C
	2 min	72°C
30. Zyklus	1 min	94°C
	1 min	50°C
	4 min	72°C
nach Reaktionsende		4°C

### **2.1.2. Größenauffrennung von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese**

DNA-Fragmente wurden in einer Gelkammer in 0.8%iger bis 1.5%iger Agarose in TAE bei konstanter Spannung (80-100 V) für ca. 30 Minuten aufgetrennt. Die Agarose-Gele wurden mit 0.1% Ethidiumbromid zur Sichtbarmachung der DNA unter UV-Licht versetzt. Zur besseren optischen Kennzeichnung der Proben auf dem Gel, wurde die DNA mit 10x DNA- Ladepuffer versetzt.

Die Darstellung der DNA-Fragente erfolgte unter UV-Licht ( $\lambda=365$  nm) durch Fluoreszenz von interkaliertem Ethidiumbromid. Die Größe der DNA-Fragmente wurde anhand des Vergleichs mit DNA-Größenstandards (100 Basenpaar DNA-Leiter, bzw. 1 Kilobasenpaar DNA-Leiter: 0.5  $\mu\text{g}$  pro Geltasche) bewertet.

### **2.1.3. DNA-Extraktion mit DNA Gel Extraction Kit**

Die DNA wurde auf Agarosegelen der Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die gewünschten DNA-Banden unter UV-Licht ausgeschnitten. Zur Extraktion der DNA wurde das *DNA Gel Extraction Kit* (Millipore) verwendet. Das entsprechende Gelstück wurde in ein *Ultrafree Cap* (mit eingebautem Filter) gegeben und für zehn Minuten bei 5,000 xg zentrifugiert. Das Volumen der entstandenen DNA-Lösung wurde bestimmt und mit TE-Puffer auf 400  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Im Folgenden wurden 1.5  $\mu\text{l}$  Glykogen, 140  $\mu\text{l}$  Ammoniumacetat sowie 1 ml Ethanol (100%) hinzugegeben. Nach kräftigem durchmischen wurde die Lösung für 30 Minuten bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert und anschließend mit der Tischzentrifuge für zehn Minuten bei 7,000 xg zentrifugiert. Das nun sichtbare DNA-Pellet wurde mit Ethanol gewaschen, in TE-Puffer gelöst und mittels der Agarosegel-Elektrophorese quantifiziert.

### **2.1.4. Enzymatische Behandlung von DNA**

#### **Restriktionsenzymverdau**

Die Menge von etwa 1  $\mu\text{g}$  DNA wurde mit 10-20 U eines Restriktionsenzym, 2  $\mu\text{l}$  des vom Hersteller empfohlenen Puffers und bei manchen Enzymen außerdem mit gereinigtem Rinderserumalbumin versetzt und schließlich mit vollentsalztem  $\text{H}_2\text{O}$  auf ein Endvolumen von 20  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Ein Restriktionsenzymverdau sollte eigentlich unter den idealen, vom Hersteller empfohlenen Bedingungen ablaufen. In einem kombinierten Verdau mit zwei Enzymen mussten jedoch gegebenenfalls suboptimale Umstände akzeptiert werden, die durch Erhöhung der Enzymkonzentration im Ansatz oder Verdau bei unterschiedlichen Temperaturen zumeist ausgeglichen werden konnten.

### **Dephosphorylierung und Ligation von DNA-Fragmenten**

Eine Ligation dient der Einfügung eines DNA-Fragmentes in einen DNA-Vektor. Vektor und Fragment werden zuvor mit der gleichen Doppelenzymkombination verdaut. Um die Wahrscheinlichkeit einer Religation des pCDNA3 Vektors zu reduzieren, sollten die Enden des Vektors dephosphoryliert werden. Außerdem kann damit der Einbau des DNA-Fragments (Insert) erleichtert werden. Nach erfolgter Reinigung des verdauten Vektors wurden ca. 200 ng der DNA in einem Gesamtvolumen von 9 µl zusammen mit 0,9 µl des 10x Dephosphorylierungspuffers und einer Einheit Shrimp Alkalischer Phosphatase für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die vollständige Inaktivierung des Enzyms durch eine Inkubation bei 65°C für 15 min.

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit T4-DNA-Ligase in wässriger Lösung entsprechend den Herstelleranweisungen durchgeführt. Die Mengenverhältnisse zwischen Vektor und Fragment wurden variiert, um ein optimales Ligationsverhältnis zu erhalten.

#### **2.1.5. Transformation von E. coli mit Hitzeschock**

200 µl kompetenter Bakterien wurden mit 200 - 400 ng DNA gemischt. Der 15 min andauernden Inkubation auf Eis folgte ein Hitzeschock bei 42°C, der für 40 sec durchgeführt wurde. Danach wurden die Zellen mit 800 µl ampicillinfreien LB-Medium versetzt und 30 min lang bei 37°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Nach fünf Minuten andauernder Zentrifugation mit der Tischzentrifuge bei 4,000 rpm wurde das entstandene Pallet mit dem Rücklaufvolumen gelöst. Die Bakteriensuspension wurde anschließend auf einer ampicillinhaltigen Agarplatte ausplattiert.

#### **2.1.6. Isolation von Plasmid-DNA mit Qiagen-Säulen**

##### **Qiagen Midi/Maxi Kit**

Große Mengen von Plasmid-DNA wurden mit dem *Qiagen Midi/Maxi-Kit* aufgereinigt. Dieses Verfahren beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse mit

anschließender chromatographischer Reinigung über Anionenaustauschersäulen.

Für die Maxipräparation der Plasmid-DNA wurden *E. coli*-Bakterienstämme mit den entsprechenden Plasmiden transformiert und die Bakterienkulturen über Nacht in 200 ml LB/Amp-Medium bei 37°C unter ständigem Schütteln herangezogen. Der Zentrifugation bei 7,000 rpm im JA 14 Rotor (Beckmann) für 5 Minuten bei 4°C folgte die Resuspendierung des Bakterienpellets in 10 ml Puffer P1 (50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase). Anschließend wurden 10 ml Puffer P2 (0.2 M NaOH, 1% SDS) hinzugegeben und 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Dieser Vorgang wurde mit 10 ml Lösung P3 (3 M Kaliumacetat, pH 5.5) gestoppt und anschließend das Lysat bei 17,000 rpm im JA 17 Rotor (Beckmann) 30 min lang bei 4°C zentrifugiert.

Der Überstand wurde unter Zuhilfenahme eines Filters, der gröbere Schwebeteilchen zurückhält, auf eine mit 10 ml QBT-Puffer (50 mM MOPS, pH 7.0; 400 mM NaCl; 0.15% Triton X-100) äquilibrierte Qiagen-Anionenaustauschersäule aufgetragen. Die Säule wurde zweimal mit 30 ml QC-Puffer (50 mM MOPS, pH 7.0; 750 mM NaCl; 15% Ethanol) gewaschen. Anschließend wurde die DNA mit 15 ml QF-Puffer eluiert (50 mM MOPS, pH 8.2; 1.25 M NaCl; 15% Ethanol). Das Eluat wurde mit 10.5 ml Isopropanol (70% (w/v)) gefällt und einige Stunden bei 4°C aufbewahrt. Anschließend wurde 30 min lang bei 15,000 xg zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde zweimal in 70% (w/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in ca. 100 µl vollentsalztem H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### **EndoFree Plasmid Maxi Kit**

Um die Transfektionseffizienz von eukaryoten Zellen zu erhöhen, wurde die Reinheit der DNA mit der Verwendung eines *EndoFree Plasmid Maxi Kit* der Firma Qiagen verbessert. Sämtliche in diesem Kit verwendeten Lösungen sind endotoxinfrei.

Die Präparation verläuft bis auf einen Zwischenschritt analog des Protokolls des *Qiagen Midi/Maxi-Kit*. Nach Zentrifugation des Lysates wird der Überstand hier in die QIAfilter Patrone gegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird das Lysat durch die Patrone gepresst, gefiltert und etwa 25

ml werden aufgefangen. Nach Zugabe von 2,5 ml des ER-Puffers (keine Herstellerangaben bezüglich der Zusammensetzung) wird das Lysat nochmals gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgen die beschriebenen Schritte der chromatographischen Reinigung über die Qiagen-Anionenaustauschersäulen, mit dem einzigen Unterschied, dass statt QF-Puffer der QN-Puffer (50mM MOPS, pH 7.0, 1.25 M NaCl, 15% Isopropanol) zur Elution verwendet wird.

### **2.1.7. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die DNA-Konzentration einer Probe kann durch photometrische Bestimmung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt werden. Hierzu wurde die DNA in einem Verhältnis von 1 zu 200 verdünnt und mit einem Photometer im Vergleich zu reinem H<sub>2</sub>O gemessen. Eine OD<sub>260</sub> von 1.0 bei Doppelstrang-DNA entspricht 50 ng/μl. Somit ergibt sich die DNA-Konzentration

in μg/μl mit der Formel  $\frac{OD_{260nm} \times 50ng / \mu l \times 200(Verdünnungsfaktor)}{1000}$ .

Eine zweite photometrische Messung der Probe bei einer Wellenlänge von 280 nm dient der Bestimmung der Proteinkontamination. Der Quotient OD<sub>260nm</sub>/OD<sub>280nm</sub> kontrolliert den Reinheitsgrad und sollte möglichst größer als 1.8 sein.

### **2.1.8. Zielgerichtete Punktmutationen**

Der in einer früheren Arbeit beschriebene β<sub>1</sub>-Wildtyprezeptor (Hoffmann et al. 2004) diente als Template für die PCR-basierte zielgerichtete Mutagenese. An diversen Positionen im β<sub>1</sub>-Wildtyprezeptor wurde eine Aminosäure durch die korrespondierende Aminosäure im β<sub>2</sub>-Wildtyprezeptor bzw. β<sub>3</sub>-Wildtyprezeptor ersetzt.

Die Oligonukleotide P2 und P3 (siehe 1.3.1), die jeweils exakt komplementär sind, enthalten in ihrem Zentrum das Codon der zu mutierenden Aminosäure. Im ersten Schritt wurden nun, unter Anwesenheit des Template, zwei

unabhängige PCRs angefertigt, zum einen P1 versus P3 und zum anderen P2 versus P4.

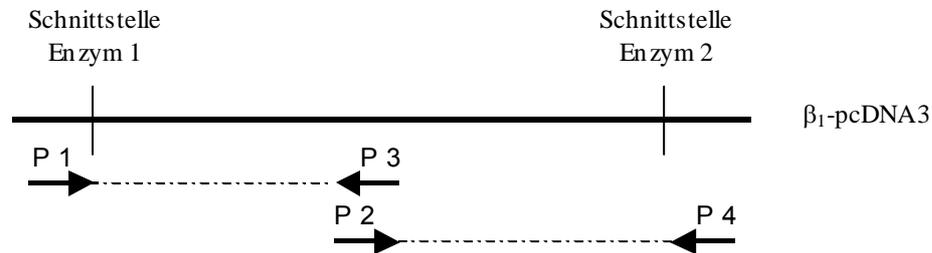


Abbildung 7 | Grundschemata des PCR-Designs

Die generierte DNA dieser beiden PCRs wurde isoliert, gereinigt und quantifiziert. Sie diente nun als Template für die folgende Fusions-PCR, die in Anwesenheit der Oligonukleotide P1 und P4 durchgeführt wurde. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde mit zwei geeigneten Enzymen verdaut, und das entstandene Fragment als Insert in die entsprechende Position im  $\beta_1$ -Wildtyprezeptor, der mit den gleichen Enzymen verdaut worden war, ligiert. Lediglich die Mutante  $\beta_1$ -D212N wurde abweichend von dem oben beschriebenen Schema hergestellt. Das Codon der zu mutierenden Aminosäure wurde in den Primer P1 integriert (hier P5 *AscI*/D212N) und somit entfiel der Schritt der Fusions-PCR.

Bei der Planung der Punktmutationen im  $\beta_1$ -Wildtyprezeptor (Länge: 1,560 bp) musste der limitierten Anzahl der Einfach-Restriktionsenzymsschnittstellen, sowie deren Kompatibilität im Restriktionsenzymverdau, Rechnung getragen werden.

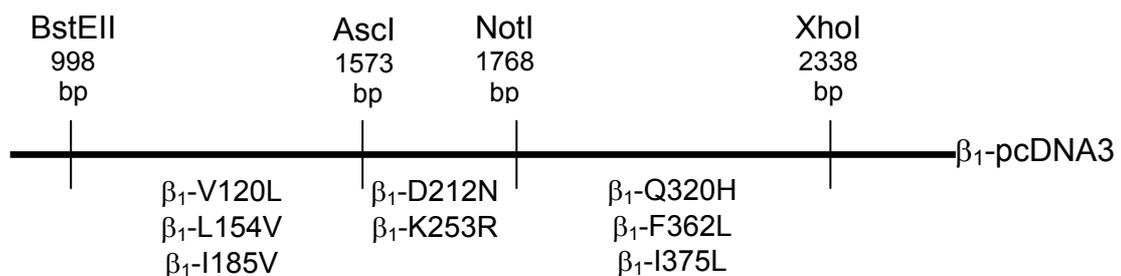


Abbildung 8 | Schematische Verteilung der Einzelschnittstellen und Mutanten im  $\beta_1$ -pcDNA3 Vektor

Die verschiedenen Mutanten wurden gemäß ihrer Position im Rezeptor in unterschiedlichen Abschnitten der codierenden Sequenz generiert, um das PCR-Produkt möglichst klein zu halten. Jede Mutante des  $\beta_1$ -Wildtyprezeptor enthält außerdem eine Restriktionsenzymchnittstellenveränderung gegenüber dem Wildtyprezeptor, um nach erfolgreicher Vermehrung der Plasmid-DNA in Bakterien, sowie Isolation derselben, in einem Restriktionsenzymverdau ein Screening durchführen zu können.

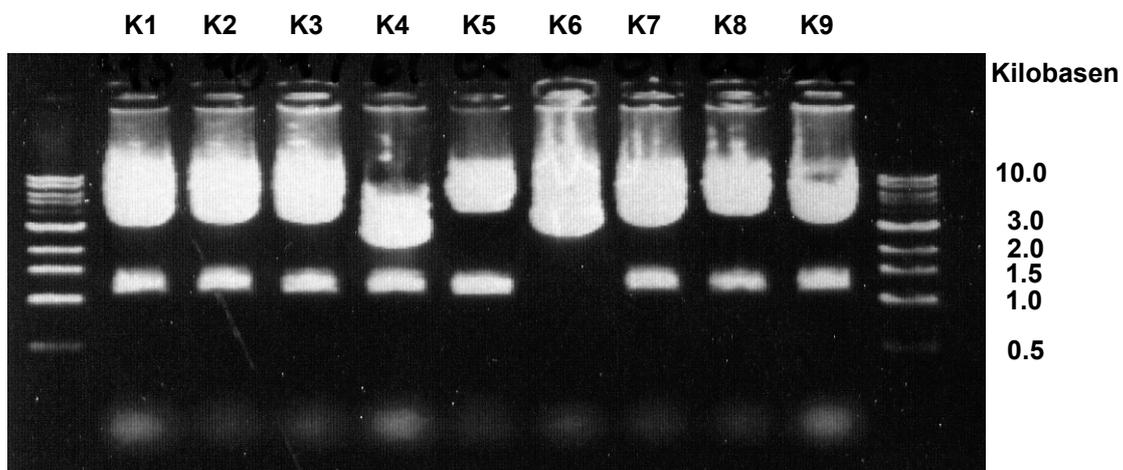


Abbildung 9| **Ergebnis eines Restriktionsenzymverdaues von Plasmid –DNA auf einem Agarosegel.** Dargestellt ist der Screening-Verdau von unterschiedlicher DNA des klonierten Konstruktes  $\beta_1$ -I375L pCDNA3 mit dem Enzym SacII. Links und rechts der neun Konstrukte sind die DNA-Leitern zur Größenorientierung aufgetragen. Das Konstrukt 6 enthält nicht die neu eingebaute Schnittstelle Sac II und wird somit nicht in die gesuchten DNA-Fragmente der Größe 180, 1.120 und 5.600 Basenpaare geschnitten. Konstrukt 8 wurde erfolgreich sequenziert.

Jeweils ein Plasmid mit veränderter Restriktionsmuster wurde anschließend von der Firma MediGenomix sequenziert. Bei korrektem Ergebnis wurde dann eine größere Menge dieser DNA hergestellt.

## **2.2. Zellkultur**

### **2.2.1. Kultivierung von E. coli**

E.coli-Kulturen wurden als Einzelkolonie oder als Vorkultur angeimpft.

Für den Ansatz einer Vorkultur wurde eine Einzelkolonie in 3 ml LB-Amp Medium (Ampicillin (100 mg/ml)) zur Selektion angeimpft und über zwölf Stunden in einem Thermoschüttler bei 37°C inkubiert.

Die Vorkultur wurde dann in 200 ml LB-Medium mit 200 µl Ampicillin in einem 1l-Schüttelkolben bei 37°C in einem Rotationsschüttler über zwölf Stunden angezogen.

Die ampicillinhaltigen Agarplatten wurden bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

### **2.2.2. Kultivierung von eukaryotischen Zellen**

HEK-293 und COS 7 Zellen wurden bei 37°C und 7% CO<sub>2</sub> unter möglichst keimfreien Bedingungen kultiviert. Als Nährmedium diente DMEM, welches mit 10% fötalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 0.1 mg/ml Streptomycin versetzt worden war. Die CHO-K1 Zellen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Als Nährmedium diente hier DMEM/F12, welches ebenfalls mit 10% fötalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 0.1 mg/ml Streptomycin versetzt worden war.

Zum Passagieren der Zellen wurde unter möglichst keimfreien Bedingungen das Medium von den konfluent gewachsenen Monolayern abgesaugt und die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde Trypsin-EDTA-Lösung (0.5 g/l Trypsin, 0.2 g/l EDTA; Sigma) hinzugegeben. Diese dient der Lösung der Zellen von dem Monolayer. Nach zwei Minuten wurde die Trypsinlösung abgesaugt und mit Medium von dem Monolayer gespült, resuspendiert und im gewünschten Verhältnis auf neue Kulturschalen verteilt.

Das Verhältnis, mit dem die Zellen zur Weiterzucht passagiert wurden, variierte je nach folgendem Experiment zwischen 1:4 und 1:9. Die Zellen wurden zumeist im Zweitagesrhythmus passagiert.

### 2.2.3. Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen

#### Calciumphosphatpräzipitation

Zur transienten Transfektion von HEK-293 Zellen fand die Calciumphosphatpräzipitation nach Chen und Okayama (1987) Verwendung.

Für ein optimales Transfektionsergebnis wurden Zellen am Abend vor der Transfektion auf Petrischalen ( $\varnothing$  10 cm) gesplittet.

Zur Transfektion wurden folgende Lösungen (steril gefiltert) verwendet:

- Aqua bidest
- 2.5 M  $\text{CaCl}_2$
- 2x BBS (pH 6.95) 280 mM NaCl  
1.5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$   
50 mM BES

Es wurde folgender Transfektionsansatz benutzt:

pro Petrischale ( $\varnothing$ 10 cm)	
DNA	10-20 $\mu\text{g}$
Wasser	450 $\mu\text{l}$
$\text{CaCl}_2$	50 $\mu\text{l}$
2x BBS	500 $\mu\text{l}$

Die Präzipitation wurde durch gutes Schütteln induziert. Nach 10-20 min konnte der Ansatz auf die Zellen pipettiert werden. Diese wurden anschließend für zwölf Stunden bei 37°C und 3%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Innerhalb dieser Zeit erfolgte die Phagozytose der gebildeten DNA-Calciumphosphat-Kristalle durch die Zellen. Im Anschluß wurden die Zellen mit PBS gewaschen und unter Hinzugabe von neuem Medium für weitere 24 h bei 37°C und 7%  $\text{CO}_2$  kultiviert.

### **Transfektion mit Effectene®**

CHO-K1 Zellen wurden mit dem Effectene®-Reagenz transfiziert, welches auf dem Verfahren der Lipofektion beruht. Dazu wurden die Zellen vier Stunden vor Transfektion auf Petrischalen ( $\varnothing$  10 cm) gesplittet.

Zur Transfektion wurden folgende Lösungen benötigt:

- Buffer EC
- Enhancer
- Effectene
- DMEM/F12 Medium

Es wurde folgender Transfektionsansatz benutzt:

pro Petrischale ( $\varnothing$ 10 cm)	
Buffer EC	300 $\mu$ l
Enhancer	16 $\mu$ l
Effectene	60 $\mu$ l
DNA	2 $\mu$ g

Am Tag der Transfektion wurden die Zellen mit PBS Lösung gewaschen und mit 7 ml DMEM/F12 Medium versetzt. Die DNA wurde in Buffer EC gelöst und nach Zugabe des Enhancers für eine Sekunde intensiv geschüttelt. Nach 3 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde dem Reaktionsansatz die Effectene-Lösung hinzugefügt und nach mehrmaligen durchmischen für weitere zehn Minuten inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde dann mit 3 ml Medium vermischt, gleichmäßig über die Petrischale verteilt und 48 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### **Transfektion mit FuGENE 6**

CHO-K1 Zellen wurden außerdem mit FuGENE 6 transfiziert. Auch dies ist ein lipofektionsbasiertes Verfahren. Dazu wurden die Zellen 24 h vor Transfektion auf Petrischalen ( $\varnothing$  10 cm) gesplittet.

Es wurde folgender Transfektionsansatz benutzt:

pro Petrischale (Ø 10 cm)

DNA	4 µg
FuGENE	12 µl
DMEM/F12	200 µl

Das FuGENE Reagens wurde in serumfreies DMEM/F12 Medium pipettiert. Daraufhin wurde die DNA hinzugegeben, vorsichtig mit dem Reaktionsansatz vermischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch gleichmäßig über die Petrischale verteilt.

#### **2.2.4. Stabile Transfektion eukaryotischer Zellen**

CHO-K1 Zellen wurden stabil mit Plasmid-DNA transfiziert. Der erste Schritt bestand aus der Transfektion dieser Zellen mit dem Effectene<sup>®</sup> Reagenz.

Am darauf folgenden Tag begann die Selektion durch Zugabe von Geneticin (G-418) zum Medium in einer Konzentration von zunächst 1 mg/ml, die innerhalb von sieben Tagen schrittweise auf die Standardkonzentration von 0,2 mg/ml reduziert wurde. Diese Standardkonzentration dient der Aufrechterhaltung des Selektionsdruckes. In dieser Arbeit wurden keine Klone isoliert, sondern eine heterogene Zellpopulation, mit unterschiedlicher Rezeptorexpression, generiert. Sämtliche unter 1.3.3 aufgeführten Plasmide wurden stabil transfiziert und die Sättigungsexperimente mit <sup>125</sup>I-CYP zeigten vergleichbare Expressionsniveaus für die verschiedenen Mutanten.

## **2.3. Proteinchemische Assays**

### **2.3.1. Membranpräparation**

Die auf den Monolayern präkonfluent gewachsenen Zellen wurden mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen, mit einem Gummischaber von der Platte gelöst und in eine Pufferlösung (5 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 7.4) transferiert. Um Schäden an den Membranproteinen vorzubeugen, fand die anschließende Präparation in einem mit 4°C temperiertem Kühlraum, oder auf Eis statt. Anschließend wurden die Zellen durch Ultra-Turrax-Behandlung (2x 15 Sekunden bei höchster Geschwindigkeit im UltraTurrax T25 von Janke&Kunkel) im Kühlraum homogenisiert. Der nun folgende erste Zentrifugationsschritt bei 3.000 xg, 10 min. (Beckman JA 17 Rotor, 3200 rpm) diente der Entfernung von groben Bestandteilen, wie noch intakte Zellen und Zellkerne. Der Überstand wurde anschließend vorsichtig dekantiert und bei 30.000 xg, 40 min. (Beckman Ti70 Rotor, 37.000 rpm) ultrazentrifugiert. Das nun entstandene Pelett wurde in ca. 200 µl Tris-Puffer (pH 7,4, 50 mM) aufgenommen und in einem Glaspotter homogenisiert. Für die funktionellen Studien wurden die Membranen stets frisch angefertigt, bei der Erstellung von Bindungsstudien ist es möglich, die Membranen nach der Präparation zu aliquotieren, und in flüssigem Stickstoff zu lagern.

### **2.3.2. Quantifizierung von Protein nach Bradford**

Die Proteinkonzentrationen wurden photometrisch mit dem Protein-Assay-Kit (Biorad) nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt. Grundlage dieser Methode ist die Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nach 595 nm bei Bindung des Farbstoffs Coomassie-Brilliant-Blue G-250 an Proteine. Die Proteinmenge wurde anhand von Eichgeraden bestimmt, welche zuvor mit einer Rinderserumalbumin-Standardlösungen erstellt worden waren. Dabei wurde nach den Herstellerangaben verfahren.

### 2.3.3. Reinigung von [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP

[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP (ca.  $4 \times 10^6$  cpm/ml, Perkin Elmer LifeScience) wurde über Ionenaustauschersäulen, die mit ca. 800  $\mu$ l DOWEX-1 Cl—form; 1\*2-200 angefüllt waren, gereinigt. Die Säulen wurden anfangs mit 5 ml H<sub>2</sub>O gewaschen und nachfolgend die [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP Lösung darauf pipettiert. Anschließend wurden diese zweimal mit 5 ml einer HCl-Lösung (pH 1.5, 0,0316 N) gespült. Daraufhin wurde das gereinigte, radioaktiv markierte ATP nach Zugabe von 3x 1 ml HCl (0,25 N) in drei Aliquots eluiert und jeweils 1  $\mu$ l nicht radioaktives ATP (10mM) hinzupipettiert. Nun wurde der pH-Wert auf pH  $\leq$  7 mit 50 % Triethanolamin eingestellt und das gereinigte [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP in Aliquots bei -20°C gelagert.

### 2.3.4. Stimulation der Adenylylcyclase

Zur Messung der cAMP-Akkumulation wurde die von Jakobs (1976) beschriebene Methode verwendet. Sie sollte im folgenden als erstes Screening für die generierten  $\beta_1$ -Mutanten dienen, um zu sehen, ob die jeweilige Punktmutation eine Auswirkung auf die Stimulierbarkeit hat. Die Zellmembranen wurden vor jedem Versuch frisch präpariert.

Es wurde folgender Inkubationsansatz verwendet:

pro Inkubationsansatz (100 $\mu$ l)	
Membranprotein (50 $\mu$ g) in Tris-Puffer suspendiert	30 $\mu$ l
Testsubstanz (Isoprenalin, $\beta_2$ -Agonisten)	10 $\mu$ l
REA-Mix 400 $\mu$ l/ml einer vorbereiteten Lösung (siehe 1.2.2, REA-Mix 5x)	
5.9 mg/ml Phosphokreatin	
0.8 mg/ml Kreatinkinase	50 $\mu$ l
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]ATP (ca. 4 Mio cpm/ml, 0,2 mCi/Probe)	ad 100 $\mu$ l

Der Reaktionsansatz wurde nach gründlichem Mischen für 20 min bei 37°C inkubiert. Die anschließende Lagerung der Proben auf Eis beendete die

Reaktion. Es folgte die Zugabe von jeweils 400  $\mu\text{l}$  ZnAc (125 mM, frisch angesetzt) und 500  $\mu\text{l}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (144 mM), der eine Inkubationszeit von 10 min folgte. Der gebildete  $\text{Zn}_2\text{CO}_3$ -Niederschlag wurde 5 min. bei 14.000 rpm in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. In der Zwischenzeit wurden die Alumina-Säulen mit 2x 5 ml Tris (pH 7.4, 100 mM) äquilibriert und anschließend 800  $\mu\text{l}$  des Überstandes auf diese aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 2x 2 ml Tris (pH 7.4, 100 mM). Die gewonnenen Proben konnten nun in einem  $\beta$ -Counter (Beckman LS 1801) für 5 min. gezählt werden. Mit der Software Origin 6.1<sup>®</sup> wurden die Daten ausgewertet.

### 2.3.5. Radioligandenbindung

Zunächst wurde die Dissoziationskonstante  $K_D$  von  $^{125}\text{I}$ -CYP an den  $\beta_1$ -AR Mutanten in Sättigungsexperimenten bestimmt, welche eine Veränderung im funktionellen Verhalten zeigten. Wenn nicht anders angegeben, diente Tris (pH 7.4, 50 mM) als Versuchspuffer. Der Inkubationsansatz wurde auf Eis pipettiert.

Es wurde folgender Inkubationsansatz verwendet:

pro Inkubationsansatz (200 $\mu\text{l}$ )	
$^{125}\text{I}$ -CYP in acht verschiedenen Konzentrationen (variabel von etwa 5 pM bis 500 pM)	50 $\mu\text{l}$
Zellmembran (zwischen 0.6 und 3 $\mu\text{g}$ )	50 $\mu\text{l}$
Tris oder Alprenolol 400 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{l}$
GTP 400 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{l}$

Alprenolol ist ein unselektiver  $\beta$ -AR-Rezeptorantagonist, der zur Bestimmung der unspezifischen Bindung eingesetzt wurde. Für die Bestimmung der totalen Bindung wurde Alprenolol durch den Versuchspuffer Tris ersetzt. Das eingesetzte GTP dient der Entkopplung der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren von  $G_s$

und ermöglicht somit die Messung von monophasischen Verdrängungskurven bei Agonisten.

Für die Verdrängungsexperimente wurden die Versuchsbedingungen variiert. Es wurde eine konstante Konzentration von  $^{125}\text{I}$ -CYP (ca. 80 pM), sowie eine konstante Membrankonzentration (5  $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ ) neben den zu testenden Substanzen in sieben Verdünnungsstufen eingesetzt, die symmetrisch ober- und unterhalb des  $K_i$  festgesetzt wurden. Als Anhaltspunkt für den  $K_i$  sind existierende Daten (Hoffmann et al., 2004) herangezogen worden.

Nach Inkubation bei 30°C für 90 Minuten und Einstellung des Äquilibrium wurde der Reaktionsansatz durch eine aus zwölf parallel angeordneten Metallröhrchen bestehenden Absaugvorrichtung der Firma Skatron (Semi-automated cell harvester Type 7019) auf einen Glasfaserfilter (Whatman GF/C) transferiert. Nach jeder Absaugung wurden die Metallröhrchen dreimal mit kaltem Tris (pH 7.4, 50 mM) gewaschen. In den Sättigungsexperimenten musste die Absaugvorrichtung jedoch bei großen Unterschieden in der Konzentration der Radioaktivität zwischen den einzelnen Messungen sechsmal gewaschen werden, um Kontaminationen der folgenden Messreihe zu minimieren. Die Proben wurden aus dem Glasfaserfilter ausgestanzt und in einem  $\gamma$ -Counter (Wallac 1480 wizard 3'') für 1 min gezählt. Die Bestimmung der  $K_D$ -Werte erfolgte mit der Software SCTFIT durch nicht lineare Regressionsanalyse. Die  $\text{IC}_{50}$ -Werte der Verdrängungsbindungsexperimente hingegen wurden mit der Software Microsoft Excel<sup>®</sup> errechnet und in  $K_i$ -Werte umgewandelt (Cheng und Prussof 1976). Bei den Sättigungsexperimenten wurden Dreifachwerte für die totale und Doppelwerte für die unspezifische Bindung generiert, bei den Verdrängungsexperimenten stets Doppelwerte. Die angegebenen  $K_D$  bzw.  $K_i$ -Werte wurden aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten mit 95 % Konfidenzintervallen gemittelt.

### *III. Ergebnisse*

#### **1. Herstellung von $\beta_1$ -Mutanten im pcDNA3 Vektor**

Als Wildtyp diente ein  $\beta_1$ -Rezeptor mit den Polymorphismen 49-Ser und 389-Gly (GenBank Eintrag J03019). Dieser war bereits im pcDNA3-Vektor vorhanden (Hoffmann et al., 2004).

Sieben verschiedene Konstrukte mit Punktmutationen wurden, wie im Methodenteil beschrieben, im  $\beta_1$ -Wildtyprezeptor kloniert. Die erfolgreich sequenzierten Konstrukte waren im einzelnen:

Valin	120	zu Leucin	V120L
Leucin	154	zu Valin	L154V
Isoleucin	185	zu Valin	I185V
Asparaginsäure	212	zu Asparagin	D212N
Lysin	253	zu Arginin	K253R
Phenylalanin	362	zu Leucin	F362L
Isoleucin	375	zu Leucin	I375L

#### **2. Auswahl der Zelllinie**

Um die verschiedenen  $\beta_1$ -Rezeptormutanten auf ihre Eigenschaften zu testen, musste zuerst eine Zelllinie gefunden werden, die keine endogenen adrenergen Rezeptoren enthält, die mit den Messungen interferieren. Um möglichst schnell die ersten Daten zu generieren, sollte sie außerdem transienten transfizierbar sein. Zu diesem Zweck wurden HEK 293, COS-7 und CHO-K1 Zellen mit dem nichtselektiven  $\beta$ -Agonisten Isoprenalin stimuliert und die Aktivierung der Adenylylcyclase gemessen.

## 2.1. COS-7 Zellen

In unseren Händen zeigten untransfizierte COS-7 Zellen mit Isoprenalin eine Stimulation der Adenylylcyclase. Um zu testen, ob in dieser Zelllinie im wesentlichen der  $\beta_1$ -Rezeptor oder der  $\beta_2$ -Rezeptor exprimiert wird, führten wir die Stimulation von Isoprenalin in Anwesenheit des  $\beta_2$ -selektiven Antagonisten ICI-118551 oder des  $\beta_1$ -selektiven Antagonisten CGP-20712 aus.

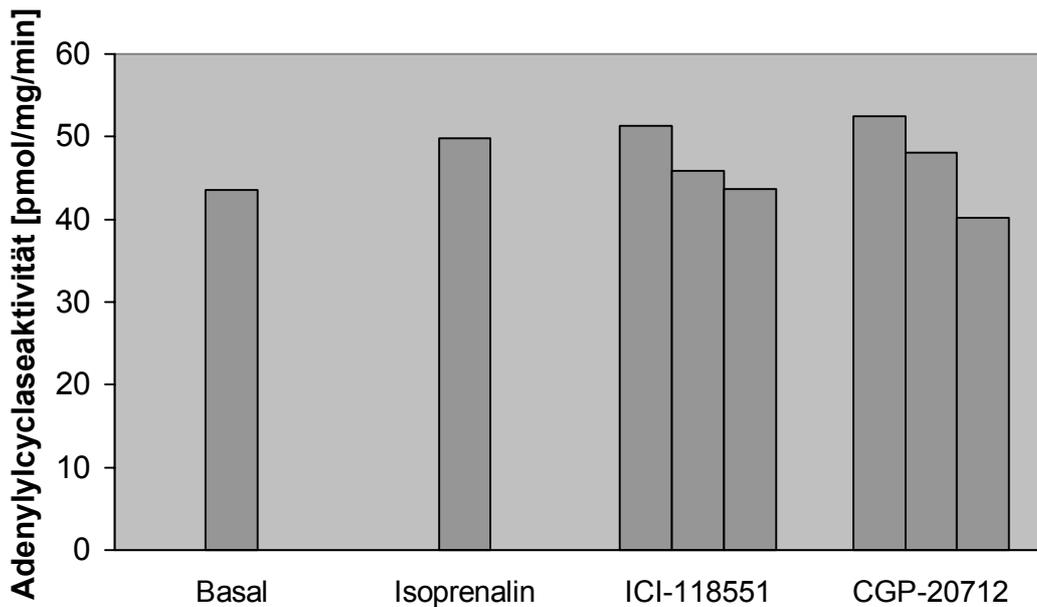


Abbildung 10| **Endogene adrenerge Rezeptoren in COS-7 Zellen.** Links dargestellt ist die Aktivierung der untransfizierten COS-Zellen mit Isoprenalin (10  $\mu\text{M}$ ) im Vergleich zum Basalwert. Rechts dargestellt ist die Stimulation der Zellen mit Isoprenalin (10  $\mu\text{M}$ ) unter Anwesenheit der Antagonisten ICI-118551 (Konzentrationen ansteigend 10 nM, 100 nM und 1  $\mu\text{M}$ ) sowie CGP-20712 (Konzentrationen ansteigend 0.1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$ ). Bei dem dargestellten Versuch handelt es sich um ein Einzelexperiment mit dreifach Werten.

Die untransfizierten COS-7 Zellen zeigten nach Stimulation ein Aktivitätsniveau, welches 7.1 pmol/mg/min über der Basalaktivität von 49.8 pmol/mg/min lag. Die Stimulation war somit sehr gering. Zusätzlich scheinen steigenden Konzentrationen der Antagonisten ICI-118551 sowie CGP-20712 die Stimulation zu unterdrücken. Der Experimentaufbau als Einzelexperiment mit dreifach Werten und hohen Ligandenkonzentrationen lässt jedoch keinen Rückschluss auf die Verteilung der  $\beta$ -Rezeptorsubtypen zu. Aufgrund der

hohen Basalaktivität wurde diese Zelllinie für die Charakterisierung der  $\beta_1$ -Rezeptormutanten zurückgestellt.

## 2.2. HEK-293 Zellen

Untransfizierte HEK-293 Zellen konnten mit Isoprenalin aktiviert werden. Um in dieser Zelllinie  $\beta_1$ -Rezeptoren oder  $\beta_2$ -Rezeptoren zu detektieren wurden auch hier die Antagonisten ICI-118551 sowie CGP-20712 zu den untransfizierten HEK-293 hinzugegeben.

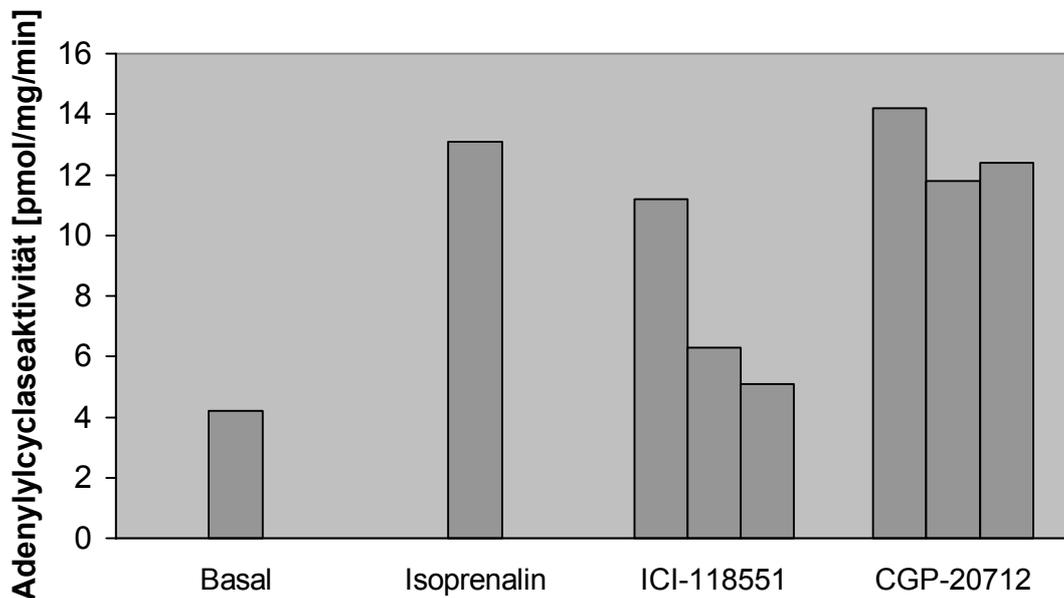


Abbildung 11| **Endogene adrenerge Rezeptoren in HEK-293 Zellen.** Links dargestellt ist die Aktivierung der untransfizierten HEK-293 Zellen mit Isoprenalin (10  $\mu\text{M}$ ) im Vergleich zu dem Basalwert. Rechts dargestellt ist die Stimulation der Zellen mit Isoprenalin (10  $\mu\text{M}$ ) unter Anwesenheit der Antagonisten ICI-118551 (Konzentrationen ansteigend 10 nM, 100 nM und 1  $\mu\text{M}$ ) sowie CGP-20712 (Konzentrationen ansteigend 0.1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$ ). Bei dem dargestellten Versuch handelt es sich um ein Einzelexperiment mit dreifach Werten.

Die Aktivierung der Zellen beträgt hier etwa 13 pmol/mg/min bei deutlich niedrigerer Basalaktivität im Vergleich zu den COS-7 Zellen. In dieser Zelllinie kann außerdem eine Dominanz der  $\beta_2$ -Rezeptoren verzeichnet werden, da nur nach Zugabe des  $\beta_2$ -selektiven Antagonisten ICI-118551 die Stimulation durch Isoprenalin konzentrationsabhängig gehemmt werden kann.

Die hohe Stimulierbarkeit dieser Zellen (ca. die 6fache Basalaktivität ) ließ auch diese Zelllinie als wenig geeignet für eine Charakterisierung der  $\beta_1$ -Rezeptormutanten erscheinen. Allerdings ist die niedrige Basalaktivität für die Messungen von Vorteil, so dass im folgenden verschiedene HEK-Zelllinien aus aus dem *Institute de Pharmacologie et Toxicologie* der Universität Lausanne und dem Institut für Pharmakologie der Universität Würzburg auf endogene adrenerge Rezeptoren getestet wurden.

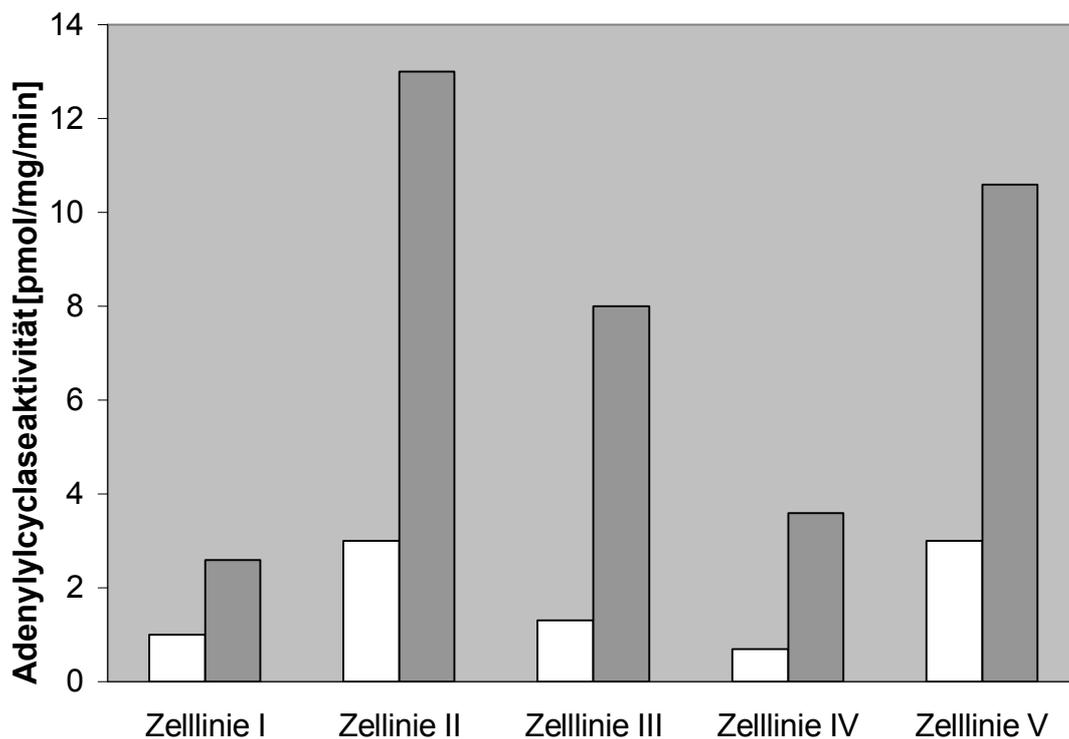


Abbildung 12| **Vergleich von endogenen adrenergen Rezeptoren innerhalb verschiedener HEK-Zelllinien.** Dargestellt ist die Aktivierbarkeit von fünf verschiedenen Zelllinien mit 10  $\mu$ M Isoprenalin (graue Säulen) im Vergleich zur Basalaktivität (weiße Säulen). Bei dem dargestellten Versuch handelt es sich um ein Einzelexperiment mit dreifach Werten.

Alle getesteten Zelllinien weisen endogenen adrenerge Rezeptoren auf, wobei Zelllinie I die geringste Cyclaseantwort (ca. 2.5fache Basalaktivität) zeigt. Sie hat außerdem eine niedrige Basalaktivität und wäre somit die am besten geeignete HEK-Zelllinie, um  $\beta_1$ -Rezeptormutanten zu charakterisieren. Alle anderen HEK-Zelllinien sind besser durch Isoprenalin stimulierbar und weisen somit mehr endogene adrenerge Rezeptoren auf.

### 2.3. CHO-K1 Zellen

CHO-K1 Zellen sind aus früheren Arbeiten mit  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren (Lohse 1992, Hoffmann et al., 2004) für eine relativ geringe endogene adrenerge Rezeptordichte bekannt. Sie finden häufig bei stabilen Transfektionen Verwendung, werden jedoch auf Grund einer geringen Transfektionseffizienz für transiente Transfektionen gemieden. In dieser Arbeit wurde dennoch zunächst versucht die CHO-K1 Zellen mit einem geeigneten Verfahren transient zu transfizieren.

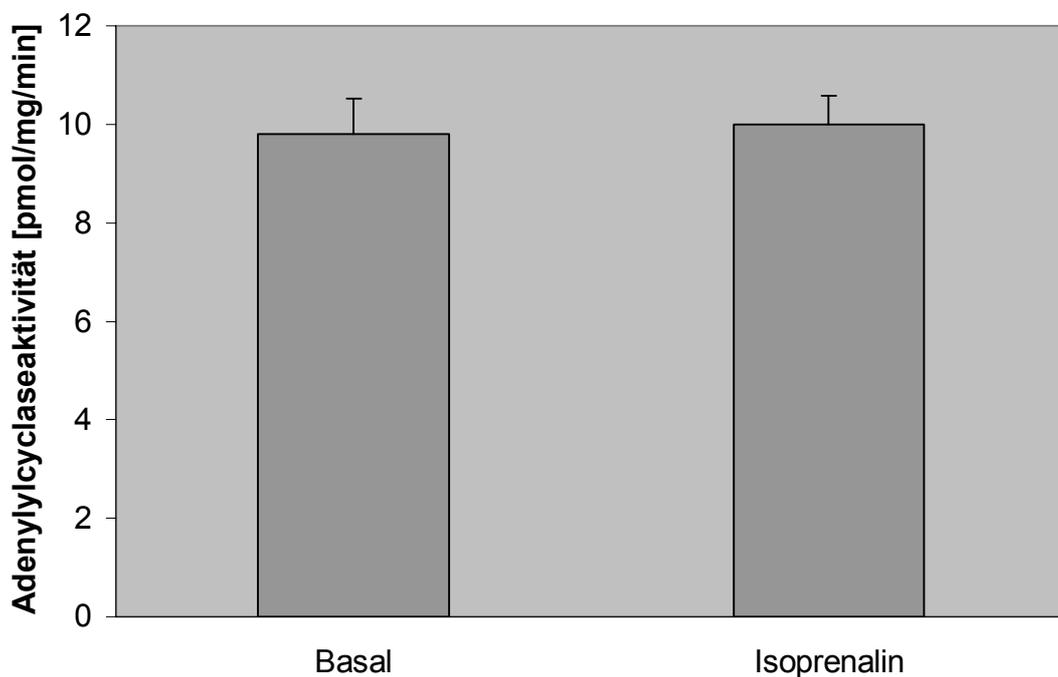


Abbildung 13| **Stimulationsversuch von CHO-K1 Zellen.** Nach Stimulation von untransfizierten CHO-K1 Zellen mit Isoprenalin ( $10\mu\text{M}$ ) bleibt die Antwortreaktion aus. Die Zellen sind somit nahezu frei von endogenen adrenergen Rezeptoren. Bei dem dargestellten Versuch handelt es sich um ein Einzelexperiment mit dreifach Werten.

In untransfizierten CHO-K1 Zellen ließ sich die Adenylylcyclase nicht mit Isoprenalin stimulieren, was für das weitgehende Fehlen von endogenen adrenergen Rezeptoren spricht. Die CHO-K1 Zelllinie stellt unter diesem Aspekt somit die am besten geeignete dar. Im folgenden wurde sie deshalb auf eine geeignete Transfektionsmethode untersucht.

Zur Analyse der Transfektionseffizienz wurde wieder die rezeptorvermittelte Stimulierung der Adenylylcyclase herangezogen.

### 2.3.1. Calciumphosphatpräzipitation

Die Calciumphosphatpräzipitation stellt eine kostengünstige Transfektionsmethode dar. Zur Transfektion von HEK-293 Zellen ist sie etabliert (Chen und Okayama, 1987) und es sollte im folgenden werden, sie für die transiente Transfektion mit CHO-K1 Zellen zu nutzen.

Die minimale Stimulation des  $\beta_1$ -Rezeptors legt eine niedrige Transfektionseffizienz nahe, mit der keine verlässlichen und reproduzierbaren Aussagen über Veränderungen der Stimulierbarkeit der Mutanten gewonnen werden können. Daraus folgte für dieses Projekt, dass weiter nach alternativen Transfektionsmethoden gesucht werden musste.

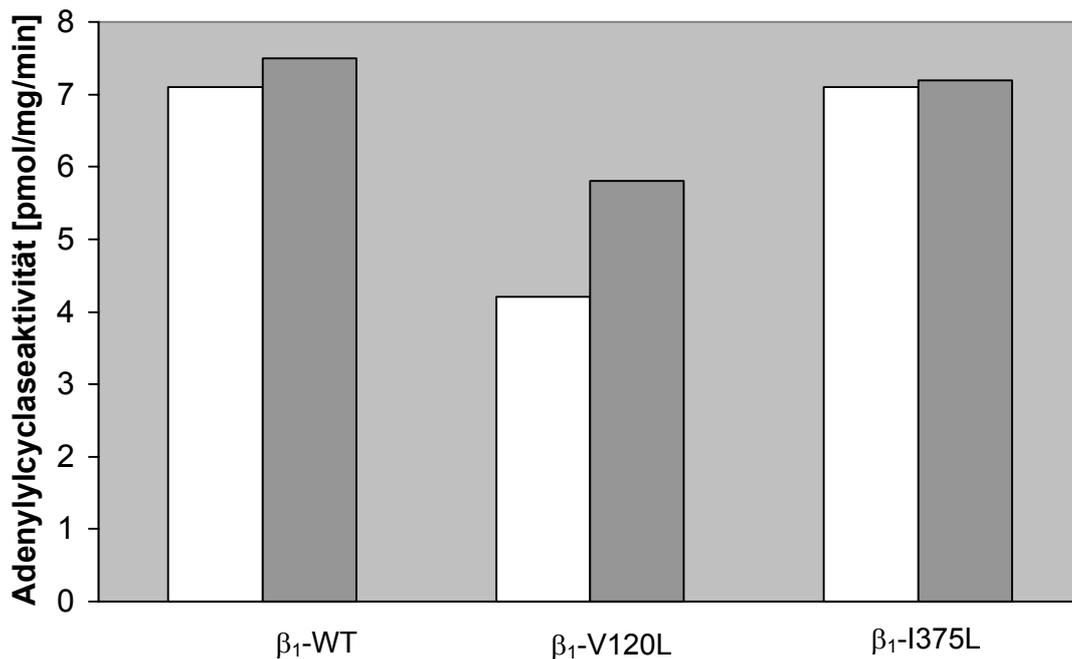


Abbildung 14| **Transfektion von CHO-K1 Zellen mit der Calciumphosphatpräzipitation.** CHO-K1 Zellen wurden mit Hilfe der Calciumphosphatpräzipitation mit der DNA des  $\beta_1$ -Wildtyprezeptors sowie zweier Mutanten transfiziert. Die minimale Stimulation mit 10  $\mu$ M Isoprenalin (graue Säulen; Basalaktivität: weiße Säulen) am  $\beta_1$ -Rezeptor lässt eine niedrige Transfektionseffizienz vermuten, was eine eingeschränkte Aussagefähigkeit, im Hinblick auf die Aktivierung der Mutanten, bedingt. Bei dem dargestellten Versuch handelt es sich um ein Einzelexperiment mit dreifach Werten.

### 2.3.2. FuGENE 6 und Effectene®

Aufgrund der niedrigen Transfektionseffizienz mit der Calciumphosphat-  
präzipitation wurden zwei kommerziell erhältliche Lipofektions-  
Transfektionsmedien getestet, die laut Herstellerangaben beide in der Lage  
sind, CHO-K1 Zellen zu transfizieren.

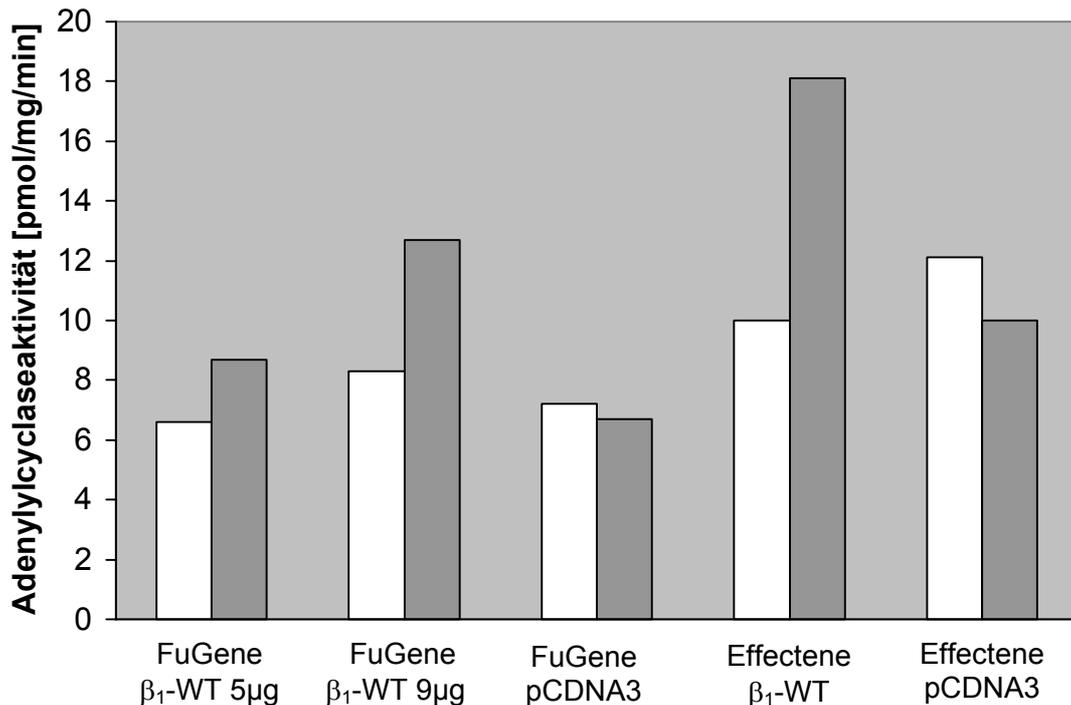


Abbildung 15| **Transfektion mit FuGENE 6 und Effectene®.** CHO-K1 Zellen wurden mit FuGENE 6 und Effectene® transfiziert. Die Stimulation mit Isoprenalin (10  $\mu$ M, in grau dargestellt) wurde mit der Basalaktivität (in weiß dargestellt) verglichen. Beide Transfektionen waren erfolgreich, wobei Effectene eine etwas höhere Effizienz aufweist. In der Transfektion mit FuGENE wurde außerdem die DNA-Menge variiert. Mehr DNA bedeutete hier eine verbesserte Transfektionseffizienz. Bei dem dargestellten Versuch handelt es sich um ein Einzelexperiment mit dreifach Werten.

Die Transfektion mit kommerziell erhältlichen Reagenzien war im Gegensatz zur Calciumphosphatpräzipitation erfolgreich. In der Transfektion mit Effectene konnte eine 1.8fache Stimulation der Basalaktivität erreicht werden. Die Transfektionseffizienz mit FuGene war mit einer 1.3fachen (5  $\mu$ g DNA) beziehungsweise 1.5 fachen (9  $\mu$ g DNA) Stimulation der Basalaktivität im Vergleich geringer. Die bessere Effizienz sowie die längere Haltbarkeit sprechen dafür, das Effectene®-Reagenz für die Transfektion von CHO-K1 Zellen zu favorisieren.

### 2.3.3. Endotoxinfreie DNA

Die Qualität und Reinheit der DNA sind wichtige Faktoren für die Transfektionseffizienz. Laut Herstellerangaben liefert die endotoxinfreie DNA-Präparation bessere Transfektionsergebnisse als die herkömmliche. Um zu testen, welche Auswirkungen eine endotoxinfreie DNA-Präparation auf unser Zell- und Transfektionssystem hat, wurde die Plasmid-DNA eines  $\beta_1$ -Rezeptors mit dem kommerziell erhältlichen EndoFree Maxi Kit der Firma Qiagen aufgereinigt und mit  $\beta_1$ -Rezeptor DNA der herkömmlichen Qualität verglichen.

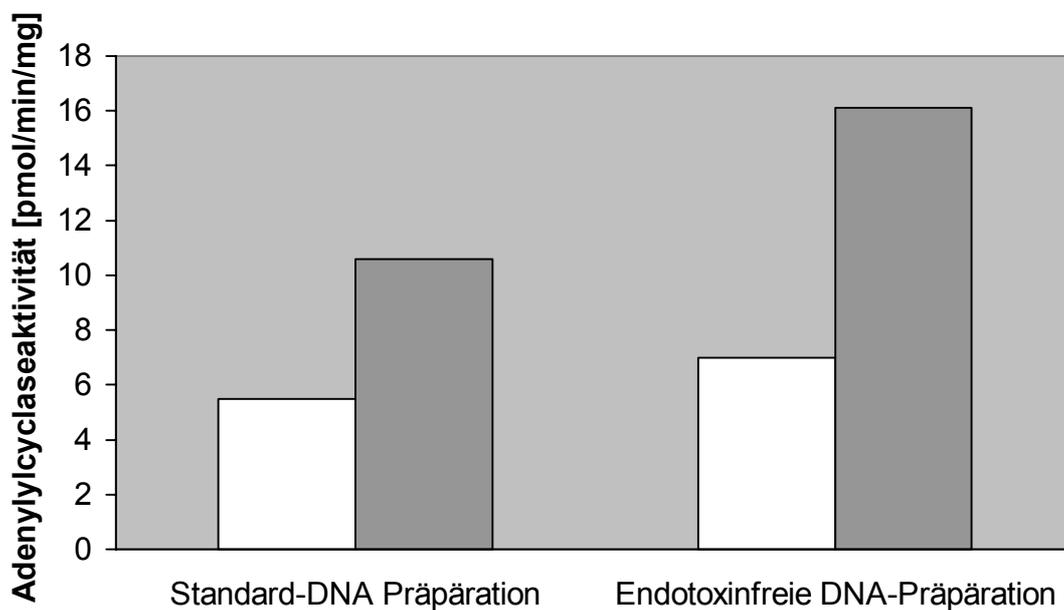


Abbildung 16| **Endotoxinfreie und Standard-DNA-Präparation im Vergleich.** Unterschiedlich präparierte DNA eines  $\beta_1$ -Rezeptors wurde mit Effectene in CHO-K1 Zellen transfiziert. Dargestellt ist die Stimulation mit Isoprenalin (10  $\mu$ M, in grau) im Vergleich zur Basalaktivität (weiß). Die Stimulation der mit endotoxinfreier DNA transfizierten Zellen ist größer als die Stimulation, die mit der herkömmlichen DNA-Präparationsmethode erreichbar ist. Bei dem dargestellten Versuch handelt es sich um ein Einzelexperiment mit dreifach Werten.

Die Stimulation der CHO-K1 Zellen, die mit herkömmlich aufgereinigter DNA transfiziert wurden, war geringer (1.9fache Basalaktivität) als jene, die mit endotoxinfreier DNA (2.3fache Basalaktivität) behandelt wurden. Unter Verwendung von endotoxinfreier DNA ist also eine größere Stimulation erreichbar.

### 2.3.4. Cotransfektion

Im folgenden Experiment sollte versucht werden, die mit Isoprenalin erreichbare maximale Stimulation zu vergrößern. Zu diesem Zweck wurde neben der DNA des  $\beta_1$ -Wildtyprezeptors auch die DNA der G-Protein Untereinheit  $\alpha_s$  und der Adenylylcyclase in unterschiedlicher Kombination cotransfiziert. Hintergrund dieser Vorgehensweise ist die Überlegung, dass möglicherweise ein Mangel an zelleigenem G-Protein beziehungsweise zelleigener Adenylylcyclase ursächlich für das relativ kleine Signal sei. Durch Transfektion der entsprechenden DNA könnte ein hypothetischer Mangel durch Produktion des entsprechenden Proteins ausgeglichen werden.

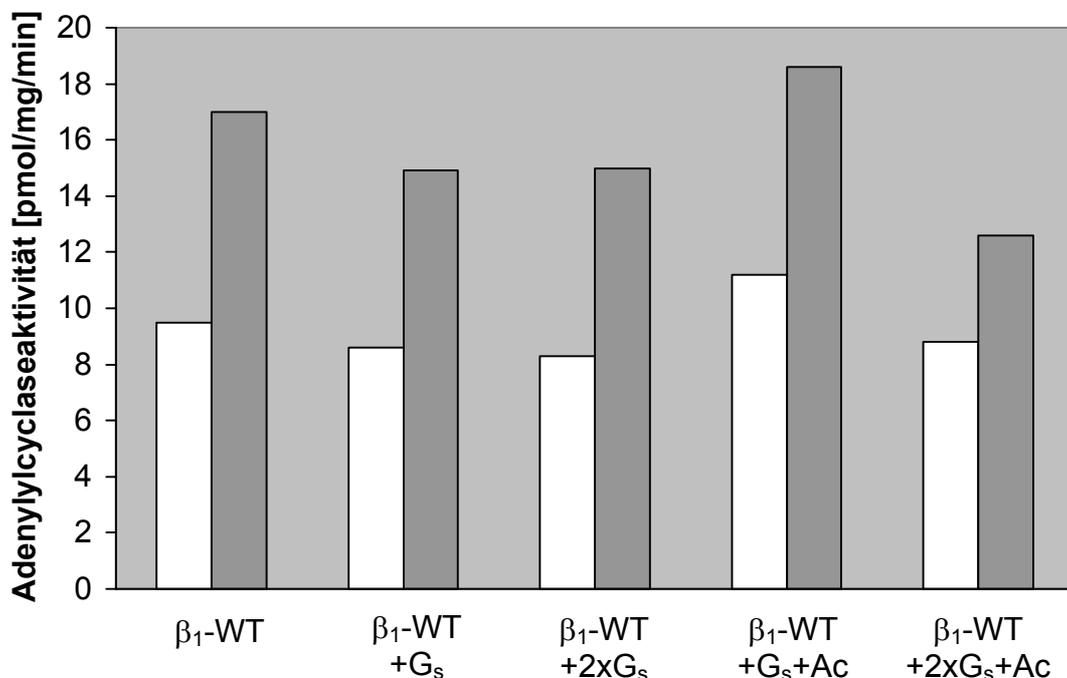


Abbildung 17| **Cotransfektion von  $G_s$  und Ac.** CHO-K1 Zellen wurden mit dem  $\beta_1$ -Wildtyprezeptor sowie mit  $\alpha_s$  und AC in verschiedenen Kombinationen transfiziert. Als Transfektionsreagenz diente Effectene. Dargestellt ist die Stimulation der unterschiedlich transfizierten CHO Zellen mit 10  $\mu$ M Isoprenalin ( graue Säulen) im Vergleich zur Basalaktivität (weiße Säulen). Mit der Cotransfektion konnte unter diesen Bedingungen keine nennenswerte Vergrößerung der Stimulation erreicht werden. Bei dem dargestellten Versuch handelt es sich um ein Einzelexperiment mit dreifach Werten.

Die Cotransfektion von  $\alpha_s$  sowie der Adenylylcyclase hatte unter unseren experimentellen Bedingungen keine wesentlichen Auswirkungen auf die

maximal mögliche Rezeptorstimulation. Daraus folgt, dass weder die Menge von  $\alpha_s$  noch der Adenylylcyclase in unseren Zellen für die Rezeptorstimulation ein limitierender Faktor zu sein scheint.

### 2.3.5. Heterogene stabile Transfektion

Mit keiner der verschiedenen bisher untersuchten transienten Transfektionsmethoden konnte eine Stimulation erreicht werden, die mehrfach über der Basalaktivität gelegen war. Aus diesem Grund wurde nun eine stabile Transfektion versucht. Dies geschah ohne eine Selektion von Zellklonen, so dass im folgenden heterogene stabil transfizierte Zellen hergestellt wurden. Die CHO-K1 Zellen wurden mit Effectene und der entsprechenden DNA transfiziert, anschließend wurden die transfizierten Zellen mit dem Antibiotikum G-418 selektiert.

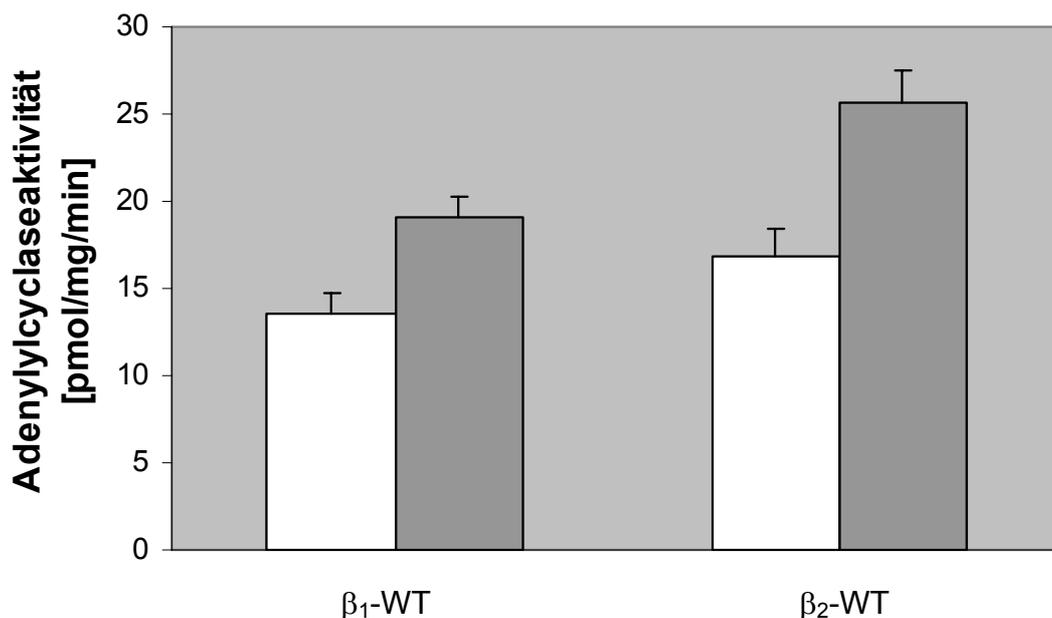


Abbildung 18| **Heterogene stabile Transfektion.** Der  $\beta_1$ - sowie der  $\beta_2$ -adrenerge Wildtyprezeptor wurden heterogenen stabil transfiziert. Dargestellt ist die Stimulation mit Isoprenalin (10  $\mu$ M, in grau) im Vergleich zur Basalaktivität (weiß). Heterogene stabile Zelllinien zeigen eine 1.4-fache ( $\beta_1$ ) beziehungsweise 1.5-fache ( $\beta_2$ ) Stimulierbarkeit über der Basalaktivität. Dargestellt ist das geometrische Mittel aus mindestens drei Versuchen mit dreifach Werten.

Die erreichbare Stimulation mit Isoprenalin lag in diesem Experiment bei 1.4facher Basalaktivität für den  $\beta_1$ -Rezeptor beziehungsweise bei 1.5facher Basalaktivität für den  $\beta_2$ -Rezeptor. Außerdem fällt die relativ hohe Basalaktivität auf. Dennoch konnte in Folgeexperimenten mit den  $\beta_1$ -Rezeptormutanten eine sehr konstante Stimulation erreicht werden, so dass diese heterogenen stabilen Zelllinien schließlich als Meßsystem für die folgende Charakterisierung der  $\beta_1$ -Rezeptormutanten gewählt wurden.

### **3. Charakterisierung der $\beta_1$ -Rezeptormutanten**

#### **3.1. Funktionelle Unterschiede**

Um einen Eindruck zu bekommen, ob unter den hergestellten  $\beta_1$ -Rezeptormutanten solche existieren, die eine veränderte Aktivierbarkeit mit einem  $\beta_1$ -Antagonisten/ $\beta_2$ -Agonisten zeigen, wurde in heterogen stabil transfizierte CHO-K1 Zellen die Adenylylcyclase mit verschiedenen Agonisten stimuliert.

Außerdem wurden sowohl der  $\beta_1$ - als auch der  $\beta_2$ -Wildtyprezeptor als Kontrollen heterogen stabil in CHO-K1 Zellen transfiziert. Terbutalin (100  $\mu$ M) und Broxaterol (130  $\mu$ M) wurden als  $\beta_2$ -Agonisten zur Stimulation der  $\beta$ -Wildtyprezeptoren und der  $\beta_1$ -Rezeptormutanten gewählt, und diese Stimulation wurde in Beziehung zur der von Isoprenalin (10  $\mu$ M), einem potenten Agonisten, gesetzt. Die Ergebnisse der Adenylylcyclasestimulation mit Agonisten sind als prozentuale Aktivität im Verhältnis zur Stimulierbarkeit mit Isoprenalin (diese normiert die Adenylylcyclaseaktivität auf 100%) dargestellt (Abb. 19).

Die Substanz Broxaterol stimuliert den  $\beta_1$ -Wildtyprezeptor nicht, den  $\beta_2$ -Wildtyprezeptor hingegen mit annähernd 60%, was auch schon in früheren Arbeiten gefunden wurde (Hoffmann et al., 2004, Conti et al., 1998). Sowohl die Mutante  $\beta_1$ -I185V als auch die Mutante  $\beta_1$ -D212N hingegen sind durch Broxaterol mit 42% beziehungsweise 49% der Isoprenalinaktivität aktivierbar. Dies entspricht also fast der Aktivierbarkeit des  $\beta_2$ -Wildtyprezeptors. Die

Mutanten  $\beta_1$ -L154V und  $\beta_1$ -F362L,  $\beta_1$ -V120L und  $\beta_1$ -K253R sind praktisch nicht mit Broxaterol stimulierbar.

Die Substanz Terbutalin stimuliert den  $\beta_1$ -Wildtyprezeptor geringfügig mit 18%, den  $\beta_2$ -Wildtyprezeptor hingegen deutlich mit 76% der Isoprenalinaktivität. Auch dies ist mit Literaturdaten (Hoffmann et al., 2004) vereinbar, wenngleich die Aktivierung des  $\beta_1$ -Wildtyprezeptors mit Terbutalin hier etwas niedriger ist. Die mit Broxaterol stimulierbaren Mutanten  $\beta_1$ -I185V und  $\beta_1$ -D212N können auch durch Terbutalin mit 45% beziehungsweise 53% der Isoprenalinaktivität stimuliert werden. Die Stimulation der beiden Mutanten  $\beta_1$ -V120L und  $\beta_1$ -K253R beträgt 69% der Isoprenalinaktivität und steht damit im Kontrast der nur geringfügigen Aktivierbarkeit mit dem  $\beta_2$ -Agonisten Broxaterol. Die Stimulierbarkeit ist also auch hier wieder mit der des  $\beta_2$ -Wildtyprezeptors vergleichbar. Die Mutanten  $\beta_1$ -L154V und  $\beta_1$ -F362L sind wie mit Broxaterol auch mit Terbutalin nur ähnlich gering wie der Wildtyp stimulierbar.

Für die Mutante  $\beta_1$ -I375L sind keine Daten in der Abbildung dargestellt, da es aus unbekanntem Gründen nicht gelungen ist, reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen.

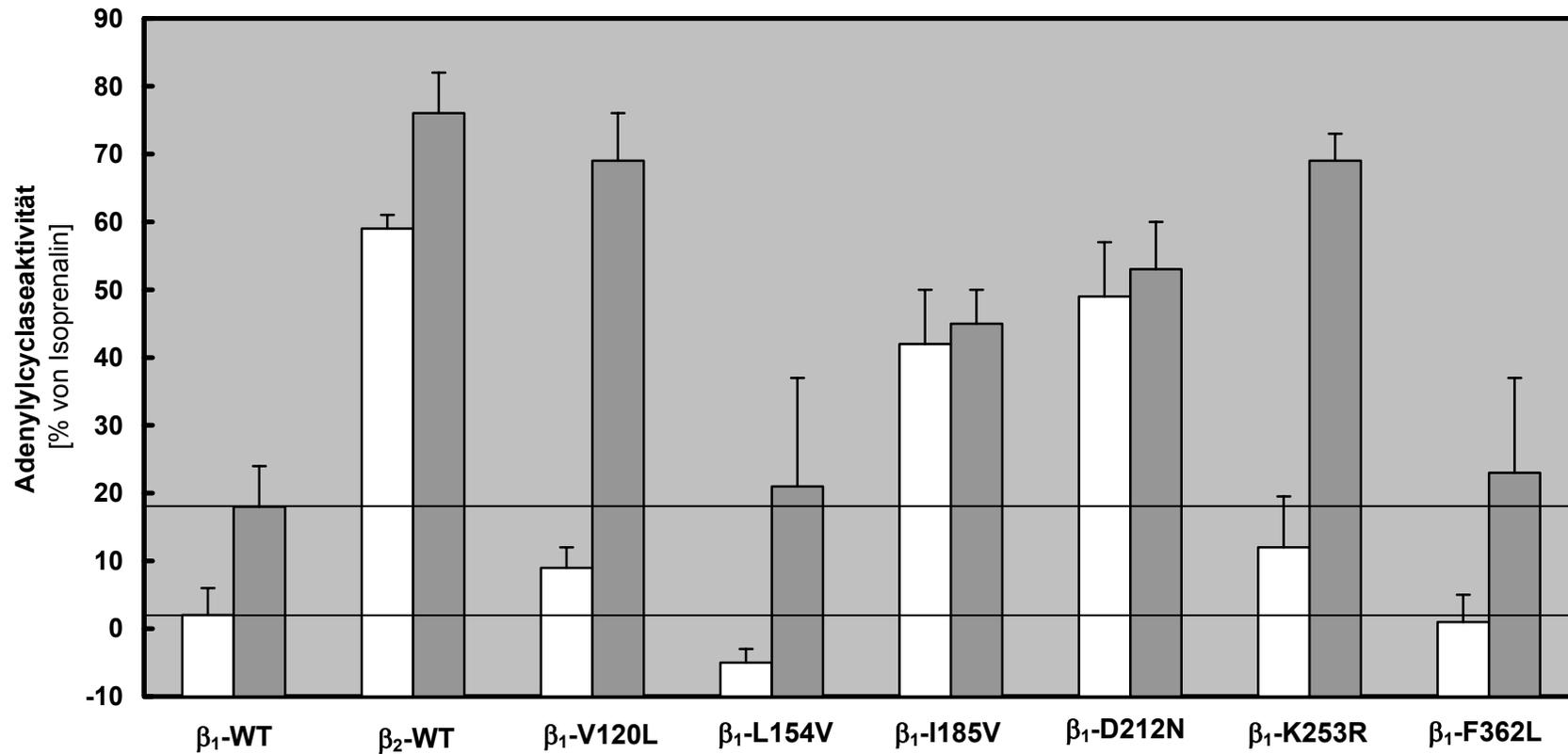


Abbildung 19| **Aktivierung der  $\beta_1$ -Rezeptormutanten mit Broxaterol und Terbutalin.** Dargestellt ist zum einen die Stimulation der beiden Wildtyprezeptoren mit Broxaterol (130  $\mu$ M in weiß) und zum anderen mit Terbutalin (100  $\mu$ M in grau). Die gezeigten Daten sind jeweils prozentuale Angaben der Adenylylcyclasestimulation einer Substanz im Vergleich zur Stimulation mit Isoprenalin (10  $\mu$ M). Die Daten wurden jeweils aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten mit dreifach Werten generiert. Zur besseren Orientierung innerhalb der Grafik sind jeweils die Stimulationswerte der beiden Substanzen am  $\beta_1$ -Wildtyprezeptor mit einer Hilfslinie eingezeichnet, um diese Ausgangsstimulation als Referenz für die Betrachtung der Rezeptormutanten zu gebrauchen.

### 3.2. Rezeptorexpression

Im folgenden führten wir Sättigungsexperimente mit den sechs  $\beta_1$ -Mutanten durch, deren Aktivierung mit Broxaterol und Terbutalin im vorangegangenen Absatz untersucht wurde. Die Sättigungsexperimente dienten der Bestimmung der exprimierten Rezeptorzahl  $B_{\max}$  sowie der Affinität des Radioliganden  $^{125}\text{I}$ -CYP ausgedrückt durch die Affinitätskonstante  $K_D$ .

Tabelle 5| **Sättigungsexperimente mit den  $\beta_1$ -Mutanten.** Die Affinität für  $^{125}\text{I}$ -CYP, sowie die exprimierte Rezeptorzahl ist innerhalb der Mutanten vergleichbar. Jedes Sättigungsbindungsexperiment wurde mindestens dreimal wiederholt; jeder Messpunkt resultiert aus der Mittelung von Dreifachwerten.

<b>Rezeptor</b>	<b><math>K_D</math>-Wert [pM]</b>	<b>95 % Konfidenzintervall</b>	<b><math>B_{\max} \pm \text{SEM}</math> [fmol/mg Protein]</b>
$\beta_1$	<b>38.5</b>	26.6 – 55.9	<b>398 <math>\pm</math> 84</b>
$\beta_2$	<b>16.7</b>	9.1 – 30.6	<b>124 <math>\pm</math> 7</b>
$\beta_1$ -V120L	<b>13.9</b>	7.4 – 26.5	<b>411 <math>\pm</math> 21</b>
$\beta_1$ -L154V	<b>33.6</b>	25.4 – 44.5	<b>273 <math>\pm</math> 16</b>
$\beta_1$ -I185V	<b>12.7</b>	7.5 – 21.6	<b>576 <math>\pm</math> 125</b>
$\beta_1$ -D212N	<b>23.5</b>	12.7 – 43.4	<b>370 <math>\pm</math> 54</b>
$\beta_1$ -K253R	<b>45.5</b>	35.2 – 58.9	<b>205 <math>\pm</math> 19</b>
$\beta_1$ -F362L	<b>27.6</b>	22.0 – 34.7	<b>287 <math>\pm</math> 31</b>

Die  $K_D$ -Werte der Mutanten bewegen sich zwischen 12.7 und 45.5 pM. Der  $K_D$ -Wert des  $\beta_1$ -Wildtyprezeptors beträgt 38.5 pM beziehungsweise 16.7 pM für den  $\beta_2$ -Wildtyprezeptor. Hoffmann et al. (2004) haben für zwei verschiedenen Klone des stabil transfizierten  $\beta_1$ -Wildtyprezeptors Werte von 61.9 und 95.5 pM beschrieben. Für den  $\beta_2$ -Wildtyprezeptor konnten  $K_D$ -Werte zwischen 44.3 und 50.7 pM gezeigt werden. Tate et al. (1991) hingegen fanden  $K_D$ -Werte von 17pM am  $\beta_1$ -Wildtyprezeptor beziehungsweise 31 pM am  $\beta_2$ -Wildtyprezeptor.

Die Werte der  $\beta_1$ -Mutanten sind demnach mit dem Wildtyprezeptor vergleichbar und es kann kein wesentlicher Affinitätsunterschied festgehalten werden.

Die  $B_{\max}$ -Werte für die Mutanten des  $\beta_1$ -Rezeptors liegen zwischen 205 und 576 [fmol/mg Membranprotein] und liegen daher in derselben Größenordnung wie die des parallel exprimierten Wildtyprezeptors.

### **3.3. Pharmakologische Charakterisierung**

Das pharmakologische Profil aller Mutanten, welche ein unterschiedliches Stimulationsverhalten im Vergleich zum  $\beta_1$ -Wildtyprezeptor zeigten, sollte abschließend mit ausgewählten Substanzen bestimmt werden. Das Bindungsprofil von Isoprenalin, Adrenalin und Noradrenalin, den  $\beta_2$ -Agonisten Terbutalin, Broxaterol und Salmeterol sowie von den experimentellen Substanzen ICI-118551 und CGP-20712 wurde in Verdrängungsexperimenten mit  $^{125}\text{I}$ -CYP als Radioligand bestimmt.

Die  $K_i$ -Werte der verschiedenen Substanzen an den  $\beta_1$ -Mutanten wurden mit denen des  $\beta_1$ -Wildtyprezeptor (Daten aus Hoffmann et al. 2004) verglichen (Tab.6). Interessanterweise zeigt sich für keine der verwendeten Substanzen ein wesentlicher Affinitätsunterschied innerhalb der verschiedenen  $\beta_1$ -Mutanten oder im Vergleich zum  $\beta_1$ -Wildtyprezeptor. Auch die sehr ähnlichen Affinitätswerte für CGP-20712, das wie bereits erwähnt die größte Selektivität für den  $\beta_1$ -Wildtyprezeptor gegenüber den  $\beta_2$ - und  $\beta_3$ - Wildtyprezeptoren besitzt, sprechen dafür, dass die  $\beta_1$ -Mutanten pharmakologisch gesehen immer noch  $\beta_1$ -Rezeptoren sind und durch die Punktmutation wirklich nur das beschriebene funktionelle Verhalten geändert wurde.

Tabelle 6| **Verdrängungsexperimente mit verschiedenen Substanzen an  $\beta_1$ -Mutanten.** Dargestellt sind Bindungsdaten von diversen Substanzen an vier  $\beta_1$ -Mutanten sowie dem  $\beta_1$ -Wildtyprezeptor. 80 pM  $^{125}$ I-CYP wurde als Radioligand verwendet. Die  $K_i$ -Werte [nM] wurden nach der Cheng-Prussow Gleichung errechnet und sind Mittelwerte von mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten; jeder Messpunkt wurde durch die Mittelung von Doppelwerten bestimmt. In Klammern sind die 95%-Konfidenzintervalle angegeben.

<b>Substanz</b>	<b><math>\beta_1</math>-WT</b>	<b>V120L</b>	<b>I185V</b>	<b>D212N</b>	<b>K253R</b>
Adrenalin	<b>4,000</b>	<b>5,400</b>	<b>5,600</b>	<b>4,500</b>	<b>6,900</b>
	(2,800 – 5,500)	(2,700 – 10,700)	(3,600 – 8,700)	(3,400 – 5,900)	(2,800 – 17,000)
Noradrenalin	<b>3,600</b>	<b>2,100</b>	<b>3,800</b>	<b>2,600</b>	<b>3,100</b>
	(2,400 – 5,200)	(1,100 – 3,800)	(1,400 – 10,400)	(1,900 – 3,600)	(1,000 – 9,300)
Isoprenalin	<b>220</b>	<b>280</b>	<b>260</b>	<b>300</b>	<b>450</b>
	(150 - 340)	(210 – 360)	(170 – 400)	(200 – 400)	(170 – 1,190)
Broxaterol	<b>1,300</b>	<b>1,100</b>	<b>1,400</b>	<b>910</b>	<b>870</b>
	(930 – 1,900)	(1000 – 1,100)	(980 – 2,000)	(560 – 1,500)	(560 – 1,400)
Terbutalin	<b>31,000</b>	<b>34,000</b>	<b>40,000</b>	<b>48,000</b>	<b>50,000</b>
	(19,000 – 52,000)	(30,000 – 39,000)	(22,000 – 73,000)	(24,000 – 98,000)	(39,000 – 63,000)
Salmeterol	<b>1,600</b>	<b>1,400</b>	<b>900</b>	<b>1,300</b>	<b>1,200</b>
	(1,100 – 2,300)	(1,100 – 1,700)	(700 – 1,200)	(560 – 3,000)	(780 – 2,000)
ICI-118551	<b>50</b>	<b>53</b>	<b>56</b>	<b>100</b>	<b>85</b>
	(40 – 361)	(32 – 89)	(32 – 98)	(44 – 240)	(56 – 130)
CGP-20712	<b>4.7</b>	<b>2.9</b>	<b>2.8</b>	<b>3.9</b>	<b>4.7</b>
	(4.0 – 5.5)	(1.8 – 4.7)	(1.8 – 4.2)	(1.6 – 9.9)	(2.5 – 8.7)

## *IV. Diskussion*

### **1. Endogene adrenerge Rezeptoren in Zelllinien**

Zelllinien sind seit langem bekannte und geeignete Modelle zur Untersuchung von menschlichen Rezeptoren. Eine Voraussetzung dafür ist jedoch, dass man eine Zelllinie findet, die idealerweise frei von endogenen Rezeptoren ist. Viele Zelllinien haben endogene adrenerge Rezeptoren und ihr Einfluss auf Messungen in Rezeptor-Zellsystemen muss stets, und selbstverständlich nicht nur bei endogenen adrenergen Rezeptoren, berücksichtigt werden. Schonbrunn A. und Steffen D. sind für eine sehr hilfreiche Datenbank verantwortlich, in der alle bekannten endogenen Rezeptoren in diversen Zelllinien aus verschiedenen Berichten zusammengetragen sind (The endogenous GPCR list, [www.tumor-gene.org/GPCR/gpcr.html](http://www.tumor-gene.org/GPCR/gpcr.html)).

Für COS-Zellen wurden analog zu den in dieser Arbeit gefundenen Daten, endogenen  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren ohne nähere Angaben zur Menge beschrieben. In HEK-293 Zellen konnten  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren in Mengen von 7-20 fmol/mg Protein gefunden werden. Auch diese Beobachtung steht im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit, wenngleich hier aufgrund einer anderen Fragestellung keine Bindungsexperimente (um  $B_{max}$ -Werte zu ermitteln), sondern funktionelle Experimente in Form der rezeptorvermittelten Stimulation der Adenylylcyclase durchgeführt wurden. Die Mengenangabe ist also nicht direkt vergleichbar. In der vorliegenden Arbeit wurde außerdem ein deutliches Überwiegen der  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren in der getesteten HEK-293 Zelllinie beschrieben, wohingegen die Datenbank in dieser Zelllinie nicht zwischen  $\beta$ -adrenergen Subtypen unterscheidet.

Betrachtet man die Angaben zu CHO-K1 Zellen, so ist in dieser Datenbank eine Menge von 30 fmol/mg Protein an  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren verzeichnet. Diese Angabe beruht auch wieder auf Bindungsexperimenten. In unserer CHO-K1 Zelllinie konnten durch Messung der rezeptorvermittelten Stimulation der Adenylylcyclase keine  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren identifiziert werden. Die am

Beispiel der HEK-293 Zellen gefundene hohe Variation der Menge von endogenen  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren lässt jedoch den Schluss zu, dass auch hier CHO-K1 Zelllinien, mit unterschiedlicher Qualität im Hinblick auf das Vorhandensein von endogenen Rezeptoren, parallel existieren. Ein vergleichbares Phänomen, nämlich eine stark divergierende Menge von endogenen Rezeptoren in einer Zelllinie, wurde auch schon bei den  $A_{2A}$ -Adenosinrezeptoren in PC12 Zellen beschrieben (Arslan et al., 1999).

## 2. Transfektionsmethoden

CHO-K1 Zellen werden schon lange als Modell ohne endogene  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren verwendet (Lohse 1992). Die transiente Transfektion dieser Zellen gestaltet sich jedoch schwierig. So verwundert es nicht, dass viele Arbeiten, welche die Vorzüge der CHO-K1 Zelllinie nutzen wollen, auf stabile Transfektionen zurückgreifen, deren Protokolle initial mit einer Calciumphosphatpräzipitation (Lohse 1992, Hoffmann et al., 2004) oder mit einer Lipofektion (Granneman et al., 1998) beginnen. In dieser Arbeit wurde versucht, ein transientes Transfektionssystem zu verwenden, um in einem Screeningversuch einen ersten Eindruck über das funktionelle Verhalten der  $\beta_1$ -Rezeptormutanten zu bekommen. Da mit herkömmlichen Transfektionsmethoden, wie der Calciumphosphatpräzipitation oder der DEAE-Dextran Methode keine durch Adenylylcyclasestimulation messbare Transfektion erzielt wurde, griffen wir auf die kommerziell erhältlichen Lipofektionsmedien FuGENE 6 und Effectene zurück. In den Anfängen der Lipofektionsmethode konnten je nach Zelllinie schon 5 bis 100 fach höhere Transfektionsraten als mit den herkömmlichen Methoden erzielt werden (Felgner et al., 1987, Keown et al., 1990). Die Transfektion war nun erfolgreich, doch die Stimulierbarkeit in der Adenylylcyclase, nämlich etwa die 1.8fache Basalaktivität, war für ein transientes Meßsystem noch nicht zufriedenstellend. Die anschließende mit endotoxinfreier DNA gemessene Transfektionseffizienzsteigerung ist mit den Herstellerangaben vereinbar.

Zusammenfassend müssen sämtliche getesteten transienten Verfahren mit CHO-K1 Zellen, unter dem Hintergrund der hohen Basalaktivität, als nur bedingt erfolgreich eingestuft werden, so dass zum Screening und anschließender Charakterisierung der  $\beta_1$ -Rezeptormutanten stabile Zelllinien generiert wurden.

### 3. Biologische Bedeutung der $\beta_1$ -Mutanten

#### 3.1 Beschriebene $\beta_1$ - Mutanten

Auf molekularer Ebene ist der  $\beta_1$ -adrenerge Rezeptor im Vergleich zum  $\beta_2$ -Subtyp, trotz der schon seit langem bekannten Aminosäuresequenz (Frielle et al., 1987), ein erstaunlich gering untersuchter G-Protein gekoppelter Rezeptor. Tabelle 7 listet die bisher publizierten Punktmutationen auf.

Alle 25 Punktmutanten am humanen  $\beta_1$ -Wildtyprezeptor sind nur im Rahmen von drei Publikationen (Isogaya et al., 1999, Lattion et al., 1999 und Sugimoto et al., 2002) beschrieben. Rechnet man noch Mutanten hinzu, bei denen mehr als eine Aminosäure ausgetauscht wurde, so kommt man auf insgesamt 29 publizierte Mutanten am  $\beta_1$ -Rezeptor (Datenbanken MuteXT und tGRAP [www.gpcr.org/7tm](http://www.gpcr.org/7tm) ). Neben den experimentell hergestellten Mutanten im  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor sind des weiteren noch sieben Polymorphismen mit Tausch einzelner Aminosäuren in diesem Rezeptor bekannt. Beschrieben wurden S49G, A59S, R389G, R399C, H402R, T404A und P418A. R389G ist die pharmakologisch bedeutsamste, da hier klare funktionelle Unterschiede *in vitro* detektiert wurden, die jedoch nicht *in vivo* nachvollzogen werden konnten. Sämtliche Polymorphismen befinden sich außerhalb der sieben Transmembrandomänen (Hein, 2001).

Für den humanen  $\beta_2$ -Wildtyprezeptor hingegen wurden über 250 Mutationen, also fast die zehnfache Anzahl, hergestellt. Dies wirft die Frage auf, ob der  $\beta_1$ -adrenerge Rezeptor möglicherweise weniger interessant ist, als der  $\beta_2$ -Rezeptor.

Tabelle 7| **Publizierte Punktmutationen am humanen  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor.** Aufgelistet sind alle veröffentlichten experimentellen Punktmutanten (Stand Januar 2005) am humanen  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor. Die Mutationen konzentrieren sich auf die Transmembrandomänen zwei, sechs und sieben.

$\beta_1$ - Punktmutante	Lokalisation	Referenz
M98A	TM 2	Isogaya et al., 1999
S102A	TM 2	Isogaya et al., 1999
L110A	TM 2	Isogaya et al., 1999
T117A	TM 2	Isogaya et al., 1999
I118A	TM 2	Isogaya et al., 1999
V119A	TM 2	Isogaya et al., 1999
V120A	TM 2	Isogaya et al., 1999
W121A	E 1	Isogaya et al., 1999
L323A	TM 6	Lattion et al., 1999
L323C	TM 6	Lattion et al., 1999
L323E	TM 6	Lattion et al., 1999
L323F	TM 6	Lattion et al., 1999
L323I	TM 6	Lattion et al., 1999
L323K	TM 6	Lattion et al., 1999
L323T	TM 6	Lattion et al., 1999
P355A	E 3	Sugimoto et al., 2002
D356A	E 3	Sugimoto et al., 2002
R357A	TM 7	Sugimoto et al., 2002
L358A	TM 7	Sugimoto et al., 2002
F359A	TM 7	Sugimoto et al., 2002
V360A	TM 7	Sugimoto et al., 2002
F361A	TM 7	Sugimoto et al., 2002
F362A	TM 7	Sugimoto et al., 2002
L365A	TM 7	Sugimoto et al., 2002
I375A	TM 7	Sugimoto et al., 2002

Betrachtet man die aktuelle intensive Forschung im kardiovaskulären Bereich mit klinischen Multizenterstudien über den Einsatz von Betablockern auf der einen Seite (Packer et al., 2002, Poole-Wilson et al., 2003), sowie die zu klärenden Fragen in der Grundlagenforschung über die Funktion des  $\beta_1$ -Rezeptors in der Herzinsuffizienz (Lohse et al., 2003), oder die pathophysiologische Rolle der Polymorphismen des  $\beta_1$ -Rezeptors auf der anderen Seite (Liggett 2004), so kann man keineswegs von einem weniger interessantem Rezeptor sprechen.

Vielmehr stellt die Generierung von Mutanten an diesem Rezeptor ein größeres Problem dar, da in der Oligonukleotidsequenz die Cytosin-Guanosin Häufigkeit

bei über 80% liegt. Dieses Basenpaar führt bedingt durch Dreifachbindung zu einer erhöhten Stabilität des DNA-Doppelstranges. Dies wiederum führt zu schwierigen PCR-Bedingungen mit einer höheren Fehlerwahrscheinlichkeit für die DNA-Polymerase. In der vorliegenden Arbeit wurde diesem Problem insofern begegnet, als dass auch quantitativ gesehen sehr kleine PCR-Produkte, welche auf dem Agarosegel die richtige Länge besaßen, weiterverarbeitet und schließlich in den Wildtyprezeptor ligiert wurden. Die anschließende Sequenzierung der DNA verdeutlichte die Probleme der DNA-Polymerase, denn oft existierten Fehler in der Sequenz trotz richtig eingebauter Mutation. Demzufolge mussten bestimmte Mutationsversuche wiederholt werden, um die gewünschte Mutante erfolgreich herzustellen.

Die publizierten Mutationen am  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor geben im Vergleich zu anderen GPCRs nur wenig Informationen über die molekulare Funktionsweise dieses Rezeptors. Die Aminosäure Leu<sup>323</sup> in der Transmembrandomäne sechs wurde zur Generierung von konstitutiv aktiven  $\beta_1$ -Rezeptoren, wie auch schon für andere GPCRs an der gleichen Position gezeigt, durch verschiedene Aminosäuren ersetzt (Lattion et al., 1999). Die Mutation L323K zeigte die deutlichste Erhöhung der Basalaktivität, die neunfach höher war, als am Wildtyprezeptor. Berücksichtigt man die Tatsache, dass in unserer Untersuchung auch mit dieser HEK 293 Zelllinie (Lattion et al., 1999) der Nachweis von endogenen  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren gelang, so wäre hier möglicherweise noch eine höhere prozentuale Stimulation zu erwarten gewesen. Zusammenfassend vermuten die Autoren, dass mit dieser Aminosäure ein wichtiger Schalter für die Aktivierung des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors gefunden wurde. Mit der Position dieser Aminosäure an der intrazellulären Seite der sechsten Transmembrandomäne, steht sie jedoch nicht in Beziehung zu den in dieser Arbeit beschriebenen Mutanten.

### 3.2 Ligand- $\beta$ -Rezeptor Interaktion

Wie bereits in der Einleitung erläutert, existieren für den  $\beta_1$ -Rezeptor im Gegensatz zum  $\beta_2$ -Rezeptor deutlich weniger Daten und Details über die Ligand–Rezeptor-Interaktion. Bindungsexperimente, die am  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor getätigt wurden (Isogaya et al., 1999, Sugimoto et al., 2002), zeigten erstmals anhand von Mutationsstudien Aminosäurepositionen, die für die Bindung von  $\beta_1$ -selektiven Agonisten verantwortlich sind. Die Aminosäuren Leu<sup>110</sup>, Thr<sup>117</sup>, Val<sup>120</sup> und Phe<sup>359</sup> im  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor wurden durch den Austausch zu Alanin an den entsprechenden Positionen als Interaktionspartner der  $\beta_1$ -selektiven Agonisten Denopamine, T-0509 oder (-)-RO363 identifiziert. Einschränkend muss man zu diesen Ergebnissen hinzufügen, dass in beiden Arbeiten COS 7 Zellen zur transienten Transfektion verwendet wurden, die in unseren Händen eine störende Komponente von endogenen adrenergen Rezeptoren enthielten. Aus diesen Ergebnissen folgt jedoch, dass die Transmembrandomänen zwei und sieben bei der Bindung von großmolekularen  $\beta_1$ -selektiven Agonisten von Bedeutung sind. Dies ist im Zusammenhang mit den schon früher detektierten Aminosäuren im  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor zu sehen, die in allen drei  $\beta$ -adrenergen Subtypen konserviert sind und somit nicht für subtypspezifisches Bindungsverhalten verantwortlich sein können. Die Aminogruppe von Catecholaminen interagiert mit Asp<sup>113</sup> in der dritten Transmembrandomäne (Strader et al., 1987a). Ser<sup>203</sup>, Ser<sup>204</sup> und Ser<sup>207</sup> in der fünften Transmembrandomäne interagieren mit den am aromatischen Ring lokalisierten Hydroxylgruppen der Catecholamine (Strader et al., 1989, Wieland et al., 1996). Außerdem wird die Catecholgruppe und die  $\beta$ -Hydroxylgruppe von Catecholaminen als Interaktionspartner der Aminosäuren Phe<sup>290</sup> (Strader et al., 1994) und Asn<sup>293</sup> (Wieland et al., 1996) in der sechsten Transmembrandomäne gesehen.

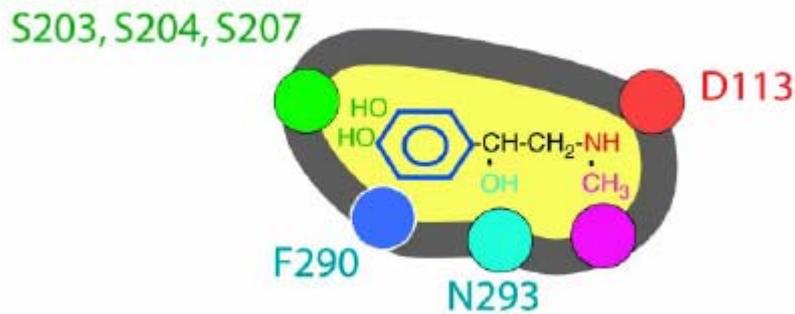


Abbildung 20| **Bindungsmodell eines Agonisten in einem  $\beta$ -adrenergen Rezeptor.** Dargestellt ist ein simplifiziertes Bindungsmodell für ein Catecholamin innerhalb eines Rezeptors aus der Familie der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren (aus Kobilka 2004).

### 3.3 $\beta_1$ -Mutanten dieser Arbeit

Mit der Zielsetzung, den  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor durch eine Punktmutation so zu verändern, dass er sich von einem  $\beta_2$ -Agonisten wie Terbutalin aktivieren lässt, wurden Mutanten gemäß den in der Fragestellung beschriebenen Kriterien konstruiert. Ohne das Bindungsprofil des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors verändert zu haben, ist es in dieser Arbeit gelungen, Punktmutanten im  $\beta_1$ -Rezeptor herzustellen, die sich nun durch die am  $\beta_1$ -Wildtyp antagonistisch wirkenden Liganden Broxaterol und Terbutalin aktivieren lassen.

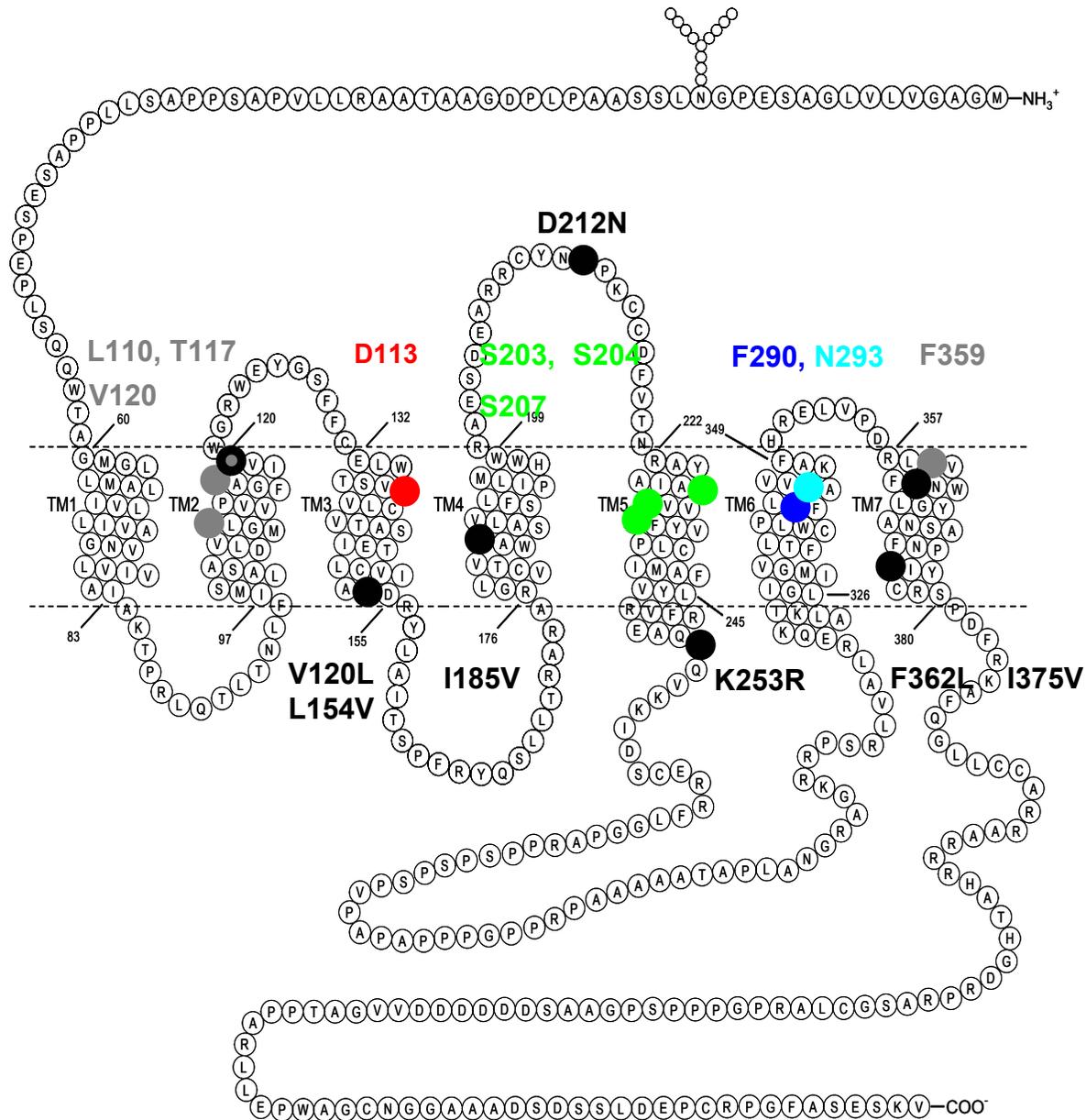


Abbildung 21| **Zweidimensionales Modell des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor mit einer Übersicht der postulierten Bindungspositionen und angefertigten Punktmutationen.** Dargestellt ist ein zweidimensionales Modell des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor. Die am  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor beschriebenen Aminosäurepositionen, welche verantwortlich für die Bindung von Katecholaminen sind, sind farblich hervorgehoben. Die bekannte  $\beta_2$ -Nummerierung wurde hier zur besseren Orientierung belassen. In grau unterlegt sind drei Aminosäuren, welche für die  $\beta_1$ -spezifische Bindung beschrieben wurden und in schwarz, die in dieser Arbeit angefertigten Mutanten am  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor. Alle in dieser Arbeit angefertigten Mutationen mit Wirkung auf die Aktivierbarkeit liegen außerhalb der bindungsrelevanten Regionen.

Die Mutanten I185V und D212N des  $\beta_1$ -Rezeptors können nun durch Broxaterol aktiviert werden. Dies ist auch mit der Substanz Terbutalin möglich, diese aktiviert jedoch interessanterweise außerdem die Mutanten V120L und K253R.

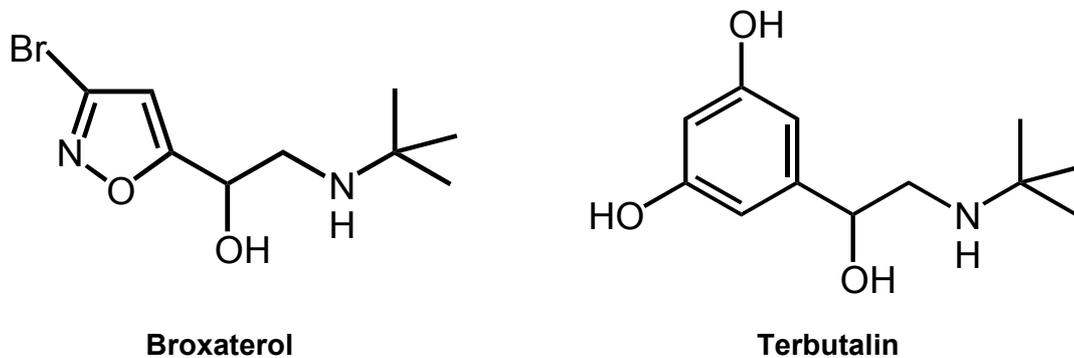


Abbildung 22| **Struktur von Broxaterol und Terbutalin.** Mit der bromsubstituierten Isoxazolgruppe unterscheidet sich Broxaterol von Terbutalin, das an der äquivalenten Position einen Phenylring mit zwei Hydroxylgruppen in den Positionen 3 und 5 hat.

Betrachtet man die unterschiedlichen Strukturformeln der Substanzen im Zusammenhang mit deren aminosäurespezifischen Aktivierungsmuster, so überrascht, dass subtile molekulare Veränderungen, sei es am  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor oder am Liganden, die beschriebenen Effekte nach sich ziehen, obwohl beide Liganden den  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor aktivieren. Die unterschiedliche Beschaffenheit mit der Isoxazolgruppe sowie dem Bromatom beim Broxaterol auf der einen Seite und dem aromatischen Ring mit den zwei Hydroxylgruppen an den Positionen 3 und 5 beim Terbutalin auf der anderen Seite lässt vermuten, dass den Liganden durch die Mutationen im  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor unterschiedliche Erreichbarkeit von Schaltstellen für die Aktivierung desselben zur Verfügung stehen. Eine mögliche Erklärung für die Tatsache, dass mit Terbutalin vier Mutanten aktiviert werden können, im Gegensatz zu nur zwei Mutanten, für die Broxaterol zum Agonisten wird, ist die größere strukturelle Ähnlichkeit des Terbutalins mit einem Katecholamin. Für den  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor konnte gezeigt werden, dass die Katecholstruktur eine große Bedeutung für die Rezeptoraktivierung besitzt (Swaminath et al., 2005).

Zwei der Mutationen dieser Arbeit, V120L und F362L, stehen in räumlicher Beziehung zu den vorgestellten Bindungspositionen von  $\beta_1$ -selektiven Agonisten (Isogaya et al., 1999, Sugimoto et al., 2002). Die Position Val<sup>120</sup> wurde im  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor durch den Austausch mit Alanin als relevante Aminosäure für die Bindung der  $\beta_1$ -selektiven Agonisten T-0509, Denopamin und Xameterol beschrieben (Isogaya et al., 1999). Bei der Messung der Affinitätskonstante  $K_D$  fand sich jedoch bei diesen Mutanten auch keine Veränderung im Vergleich mit dem Wildtyp. Außerdem sind die getesteten Liganden durch ungewöhnliche N-Substitutionen erheblich größer als das Broxaterol und Terbutalin, so dass diese Experimente nicht direkt mit den Daten dieser Arbeit verglichen werden können. Außerdem attestieren die Autoren der Aminosäure Val<sup>120</sup>, genau wie Leu<sup>110</sup>, nur einen indirekten, durch hydrophobe Wechselwirkungen bedingten Einfluss auf die Bindung ihrer ausgewählten selektiven Agonisten. Die Aminosäure Phe<sup>359</sup> im  $\beta_1$ -Rezeptor wurde als relevante Aminosäure für den  $\beta_1$ -selektiven Agonisten (-)-RO363 beschrieben (Sugimoto et al., 2002). Auch hier lässt sich analog zu den Positionen Leu<sup>110</sup> und Val<sup>120</sup> sagen, dass der getestete Ligand sehr groß ist und somit keine Vergleiche mit unseren Experimenten möglich sind.

Für alle bekannten GPCRs liegt die Ligandenbindungsstelle außerhalb der G-Protein aktivierenden Region (Ji et al., 1998). Es muss also zwischen der Bindung eines Liganden und der Aktivierung des G-Proteins ein Signaltransduktionsmechanismus existieren, der als agonisteninduzierte Konformationsänderung des Rezeptors verstanden wird. Die  $\beta_1$ -Rezeptor-mutanten V120L, I185V, D212N und K253R sind außerhalb der bekannten Bindungsregion bestehend aus den Transmembrandomänen drei, fünf und sechs lokalisiert. Die veränderte Aktivierbarkeit dieser Mutanten mit den vorgestellten Liganden lässt den Rückschluss auf eine Beeinflussung der Konformationsänderung im Rezeptor zu.

Betrachtet man ein in Kooperation mit Prof. Gianluca Ottolina, Istituto di Chimica del Riconoscimento Molecolare CNR, Milano angefertigtes Rezeptormodell des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors, so bestätigt sich die aus den Bindungsexperimenten gezogene Schlussfolgerung, dass die Mutationen die

Bindungsstelle für alle untersuchten Agonisten und Antagonisten nicht verändert. Sämtliche mutierten Aminosäuren sind auch in diesem dreidimensionalen, auf der Rhodopsinstruktur basierten Modell zu weit von der bindungsrelevanten Region entfernt.

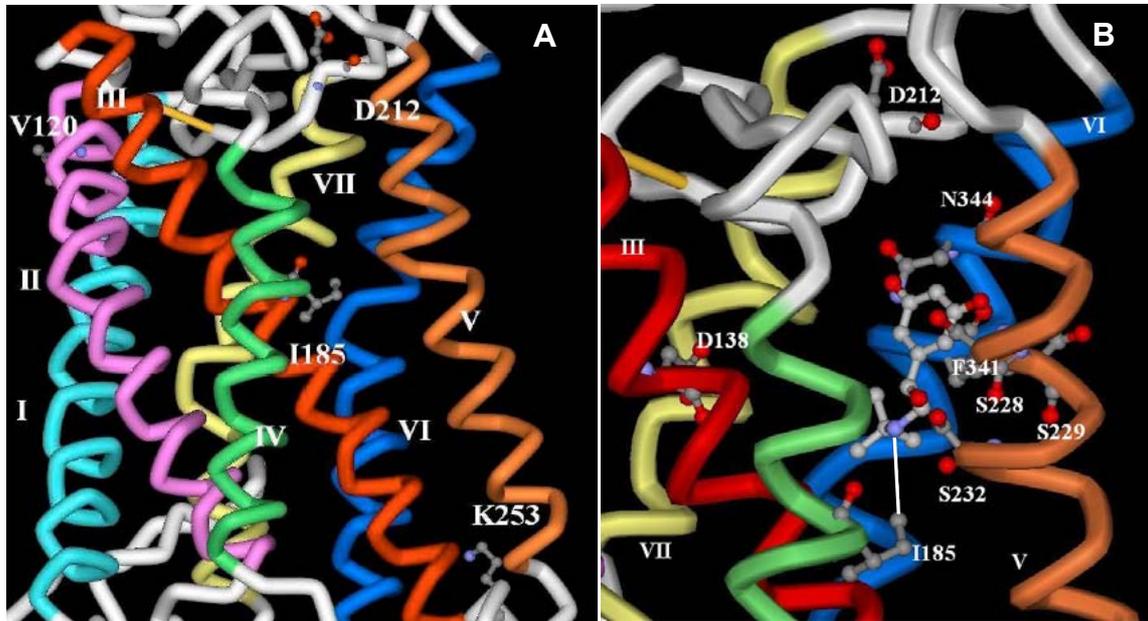


Abbildung 23| Modell des humanen  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors.

**A** Dargestellt sind die Aminosäuren, welche nach der erfolgten Mutation mit Broxaterol und/ oder Terbutalin aktiviert werden können. **B** Dargestellt sind Aminosäuren, für die eine Interaktion in der Bindung von Agonisten vermutet wird. Außerdem sind zwei der mutierten Aminosäuren ( I185 und D212) gezeigt. Die kürzeste Distanz zwischen Terbutalin und einer mutierten Aminosäure ist mit einer weißen Linie zu I185 dargestellt.

Der kürzeste Abstand zwischen dem in die Bindungsstelle gedockten Terbutalin und einer mutierten Aminosäure beträgt 7.7 Å und zeigt sich zwischen Terbutalin und der Aminosäure I185. Somit ist es sehr unwahrscheinlich, dass die mutierten Aminosäuren direkt mit dem Liganden interagieren.

Im  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor konnte mit fluoreszenzspektroskopischen Messungen gezeigt werden, dass während einer agonisteninduzierten Konformationsänderung die Transmembrandomänen drei und sechs (Gether et al., 1997), sowie die Transmembrandomänen fünf und sechs (Ghanouni et al., 2001) miteinander interagieren. In der zuletzt genannten Publikation wurde die Aminosäure Glu<sup>224</sup>, die sich an der intrazellulären Seite der

Transmembrandomäne fünf befindet, mutiert und mit einem fluoreszenzaktivem Reagenz markiert. In der Folge konnten mit der ebenfalls fluoreszenzmarkierten Aminosäure Cys<sup>265</sup> in der Transmembrandomäne sechs Abstände der beiden Aminosäuren während einer Aktivierung gemessen werden.

Bezieht man die gewonnenen Daten aus dieser Arbeit mit ein, so ist es gut vorstellbar, dass die Aminosäureposition Lys<sup>253</sup>, welche sich im  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor nur vier Aminosäuren von der korrespondierenden Aminosäure Glu<sup>224</sup> des  $\beta_2$ -Rezeptors befindet, in den Aktivierungsprozess einbezogen ist und als ein möglicher Schalter für die Aktivierung des G-Proteins agiert.

Das Konzept, dass durch eine Mutation in einem  $\beta$ -adrenergen Rezeptor ein Ligand vom Antagonist zum Agonist wird, ist nicht neu. Granneman et al. (1998) haben im  $\beta_1$ -Wildtyprezeptor der Ratte eine Doppelmutante an der Position 350 und 351 (F350A und F351L) hergestellt. Es wird beschrieben, dass die Affinität, die Potenz und die maximale Wirkung des  $\beta_3$ -Agonisten CL 316,243 (ein voluminöser N-substituierter Ligand) an dieser Doppelmutante gesteigert war. Die Affinitätszunahme wird mit 100fach, die Potenzzunahme mit 1000fach angegeben. Die  $\beta_1$ -Doppelmutante lässt sich nun mit CL 316,243, welches am  $\beta_1$ -Rezeptor antagonistisch wirkt, vergleichbar mit Noradrenalin aktivieren. Somit unterscheidet sich diese Publikation inhaltlich von dem vorliegenden Ergebnis, da hier wie erwähnt, durch die Punktmutationen keine Veränderungen in der Affinität für die eingesetzten Liganden zu verzeichnen ist. Das wesentliche Ergebnis dieser Arbeit, dass der  $\beta_1$ -adrenerge Rezeptor durch Punktmutationen funktionelle Eigenschaften eines  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors erhält, ohne Veränderungen der pharmakologischen Charakteristika des  $\beta_1$ -Subtyps aufzuweisen, wurde bisher noch nicht beschrieben.

## 4. Perspektiven

Mit dem vorliegenden Ergebnis sogenannte reine „gain-of-function“ Mutanten am  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor generiert zu haben ist ein wichtiger Schritt für das Verständnis des bedeutsamen, aber molekular wenig charakterisierten,  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors gelungen.

Ein solches Ergebnis wirft natürlich neue Fragen auf: Wie erklärt man die dramatischen Effekte, die durch biochemisch gesehen sehr konservative Aminosäureaustausche stattfinden? Wieso können subtile Veränderungen in der Struktur des Liganden dazu führen, dass manche Rezeptormutanten aktiviert werden und andere nicht, obwohl sie sich nur in einer einzigen Aminosäure voneinander unterscheiden? Wie funktioniert ein Aktivierungsmechanismus, der neben den bekannten Aminosäuren in der Ligandenbindungsstelle auch solche, welche außerhalb der Bindungsstelle lokalisiert sind, miteinschließt?

Ein Weg zum weiteren Verständnis der gewonnenen Erkenntnisse ist die Generierung von Rezeptormodellen mit diesen Daten. Dockingstudien von funktionell verschiedenen Liganden an dem mutierten Rezeptor könnten weitere Aufschlüsse über die Struktur-Wirkungsbeziehung dieser Liganden an adrenergen Rezeptoren liefern und somit letztendlich auch neue Erkenntnisse für G-Protein gekoppelte Rezeptoren im allgemeinen liefern. Allerdings ist es hierzu nötig, Modelle aktivierter Rezeptoren zu entwickeln, um sie mit den zur Verfügung stehenden Modellen der nicht aktivierten Rezeptoren vergleichen zu können.

So könnte diese Arbeit zu einem besseren Verständnis der Ligand-Rezeptor-Interaktion und der daraus resultierenden molekularen Mechanik der Aktivierung beitragen. Sollte dieser Schritt vollzogen sein wäre ein spezifischeres „Drug Design“ an den  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren möglich.

Eine der wichtigsten unerwünschten Wirkungen von einem  $\beta$ -Blocker ist die Bronchialobstruktion durch gleichzeitige Blockade des  $\beta_2$ -Rezeptors. Umgekehrt zeigen sich bei der Verwendung von  $\beta_2$ -Agonisten in der Asthmatherapie kardiale unerwünschten Wirkungen wie Tachykardie und andere

Herzrhythmusstörungen. Daher wäre es wünschenswert  $\beta$ -Blocker ohne bronchial-obstruktive Nebenwirkungen oder  $\beta_2$ -Agonisten mit  $\beta$ -Blocker Eigenschaften zu entwickeln.

Obwohl die Arbeit zum Ziel hatte, pharmakologische Unterschiede von Liganden an  $\beta$ -Rezeptorsubtypen zu erklären, haben die gewonnenen Erkenntnisse möglicherweise weiterreichende Bedeutung. Die Ergebnisse legen nahe, dass neben den Rezeptor-Liganden-Interaktionen auch strukturelle Elemente außerhalb der Ligandenbindungsstelle die intramolekularen Bewegungen bei der Aktivierung eines Rezeptors beeinflussen.

## V. *Zusammenfassung*

Eine durch Aktivierung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors induzierte Konfirmationsänderung resultiert in einer Signaltransduktion durch das G-Protein zu einem Effektorenzym wie der Adenylylcyclase. In dieser Arbeit konnten Aminosäuren in dem zur G-Protein gekoppelten Rezeptorfamilie zugehörigen  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor identifiziert werden, welche für dessen Aktivierung von Bedeutung sind. Der Analyse von  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptormutanten lag die Erkenntnis zu Grunde, dass therapeutisch genutzte Liganden wie Terbutalin, oder das experimentell eingesetzte Broxaterol Agonisten am  $\beta_2$ - und  $\beta_3$ -adrenergen Rezeptor, jedoch Antagonisten am  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor sind. Dieses Verhalten wurde zum Anlass genommen spezifische Aminosäuren zu identifizieren, welche eine bedeutende Funktion in der Aktivierung von  $\beta$ -Rezeptorsubtypen haben könnten. Nach einem Aminosäurevergleich innerhalb der Familie der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren konnten Aminosäurepositionen identifiziert werden, die identisch im  $\beta_2$ - bzw.  $\beta_3$ -Rezeptor sind und sich von denen des  $\beta_1$ -Rezeptors unterscheiden und damit das Aktivierungsprofil von Broxaterol und Terbutalin widerspiegeln. Mit zielgerichteten Punktmutationen wurden nun insbesondere im Bereich der Transmembranregionen solche Aminosäuren im  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor durch die entsprechende des  $\beta_2$ - ( $\beta_3$ -) Rezeptors ersetzt. Obwohl keine der getesteten Mutanten Unterschiede im pharmakologischen Bindungsprofil zeigten, konnten vier Mutanten gefunden werden, welche partiell oder vollständig durch Broxaterol oder Terbutalin aktiviert wurden. Die beiden Mutanten I185L sowie D212N konnten mit Broxaterol und Terbutalin aktiviert werden, zwei Liganden, die Antagonisten am  $\beta_1$ - Wildtyprezeptor sind. Außerdem konnten zwei weitere Mutanten, V120L und K253R, durch Terbutalin aktiviert werden. Betrachtet man die Struktur von Terbutalin, so ist dieser Ligand den endogenen Katecholaminen ähnlicher als Broxaterol. Ein Rezeptormodell zeigt, dass die vier relevanten Aminosäuren außerhalb der Ligandenbindungsregion liegen und somit eine direkte Interaktion mit dem Liganden unwahrscheinlich erscheint.

Diese These wird durch das im Vergleich zum Wildtyp nicht veränderte Bindungsprofil der  $\beta_1$ -Rezeptormutanten unterstützt. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Aminosäuren V120, I185, D212 und K253 in der ligandeninduzierten Konformationsänderung des  $\beta_1$ -Rezeptors von Bedeutung sind.

## *VI. Literaturverzeichnis*

- Arslan G, Kull B und Fredholm B.B. (1999). Signaling via A2A adenosine receptor in four PC12 cell clones. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 359: 28-32.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248-54
- Bristow, M.R. (2000).  $\beta$ -adrenergic receptor blockade in chronic heart failure. Circulation 101: 558- 69
- Brodde, O.E. und Michel, M.C. (1999). Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. Pharmacol Rev 51: 405-43
- Chen, C. und Okayama, H. (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. Mol Cell Biol 7: 2745-52
- Cheng, Y. und Prusoff, W.H. (1973). Relationship between the inhibition constant ( $K_1$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition ( $I_{50}$ ) of an enzymatic reaction. Biochem Pharmacol 22: 3099-108
- Cheung, A.H., Sigal, I.S., Dixon, R.A. und Strader C.D. (1989). Agonist-promoted sequestration of the  $\beta_2$  adrenergic receptor required regions involved in functional coupling with  $G_s$ . Mol Pharm 34: 138-43
- CIBIS-II Investigators (1999). The cardiac insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial. Lancet 353: 9-13

- Conti, P., Dallanoce, C., De Amici, M., De Micheli, C. und Klotz, K.N. (1998). Synthesis of new  $\delta^2$ -isoxazoline derivatives and their pharmacological characterization as  $\beta$ -adrenergic receptor antagonists. Bioorg Med Chem 6: 401-8
- Daaka, Y., Luttrell, L.M., Lefkowitz, R.J. (1997). Switching of the coupling of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. Nature 390: 88-91
- Dixon, R.A., Kobilka, B.K., Strader, D.J., Benovic, J.L., Dohlmann, H.G., Frielle, T., Bolanowski, M.A., Bennett, C.D., Rands, E., Diehl, R.E., Mumford, R.A., Slater, E.E., Sigal, I.S., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. und Strader C.D. (1986). Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta adrenergic receptor and homology with rhodopsin. Nature (Lond) 321: 75-79
- Dixon, R.A., Sigal, I.S., Rands, E., Register, R.B., Candelore, M.R., Blake, A.D. und Strader, C.D. (1987). Ligand binding to the  $\beta$ -adrenergic receptor involves its rhodopsin-like core. Nature (Lond) 326: 73-77
- Dohlman, H.G., Bouvier, M., Benovic, J.L., Caron, M.G. und Lefkowitz, R.J. (1987). The multiple membrane spanning topography of the  $\beta_2$  adrenergic receptor: Localization of the sites of binding, glycosylation, and regulatory phosphorylation by limited proteolysis. J Biol Chem 262: 14282-288
- Emorine, L.J., Marullo, S., Briand-Sutren, M.M., Patey, G., Tate, K., Kelavierski, Klutchko, C. und Strosberg, A.D. (1989). Molecular characterization of the human  $\beta_3$ -adrenergic receptor. Science (Wash DC) 245: 1118-21
- Farfel, Z., Bourne, H.R., Irir, T. (1999). The Expanding Spectrum of G Protein Diseases New Eng J Medicine 340: 1012-20

- Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M. und Danielsen, M. (1987). Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA transfection procedure. PNAS (USA) 84: 7413-17
- Fowler, M.B. (2004). Carvedilol prospective randomized cumulative survival (COPERNICUS) trial: Carvedilol in severe heart failure. Am J Cardiol 93(suppl):35B-39B
- Frielle, T., Daniel, K., Caron, M.G. und Lefkowitz, B.J. (1987). Cloning of the cDNA from the human  $\beta_1$ -adrenergic receptor. Proc Natl Acad Sci USA 84: 7920-42
- Gao, T., Bünemann, M., Gerhardstein, B.L., Ma, H. und Hosey, M.M. (2000) Role of the C terminus of the  $\alpha_1C$  (CaV1.2) Subunit in Membrane Targeting of Cardiac L-Type Calcium Channels. J Biol Chem 275: 25436-44
- Gauthier, C., Tavernier, G., Charpentier, F., Langin, D. und Le Marec, H. (1996). Functional  $\beta_3$ -adrenoreceptor in the human heart. J Clin Invest 98: 556-62
- Gether, U., Lin, S., Ghanouni, P., Ballesteros, J.A., Weinstein, H. und Kobilka, B.K. (1997). Agonists induce conformational changes in transmembrane domains III and VI of the  $\beta_2$ -adrenoceptor. EMBO Journal 16: 6737-47
- Ghanouni, P., Steenhuis, J.J., Farrens, D. L. und Kobilka, B.K. (2001). Agonist-induced conformational changes in the G-protein-coupling domain of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor. PNAS (USA) 98: 5997-6002
- Gilman, A.G. (1987). G proteins: transducers of receptor-generated signals. Annu Rev Biochem 56: 615-49.

- Granneman, J.G., Lahners, K.N. und Zhai, Y. (1998). Agonist Interactions with Chimeric and Mutant  $\beta_1$ - and  $\beta_3$ -Adrenergic Receptors: Involvement of the Seventh Transmembrane Region in Conferring Subtype Specificity. Mol Pharm 56: 856-61
- Guimarães S. und Moura D. (2001). Vascular Adrenoreceptors : An update Pharmacol Rev 53: 319-56
- Hall, R.A., Premont, R.T., Chow, C.W., Blitzer, J.T., Pitcher, J.A., Claing, A., Stoffel, R.H., Barak, L.S., Shenolikar, S., Weinman, E.J., Grinstein, S. und Hamm, H.E. (1998). The Many Faces of G Protein Signaling. J Biol Chem 273(2): 669-72.
- Hein, L. (2001). Physiological significance of  $\beta_1$ -adrenergic receptor polymorphisms: in-vivo or in-vitro veritas?. Pharmacogenetics 11: 187-89
- Hoffmann, C., Leitz, M.R., Oberdorf-Maas, S., Lohse, M.J. und Klotz K.N. (2004). Cooperative pharmacology of human  $\beta$ -adrenergic receptor subtypes –characterization of stably transfected receptors in CHO cells. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 369: 151-59
- Isogaya, M., Sugimoto, Y., Tanimura, R., Tanaka, R., Kikkawa, H., Nagao, T. und Kurose, H. (1999). Binding Pockets of the  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -Adrenergic Receptors for Subtype-Selective Agonists. Mol Pharm 56: 875-85
- Jakobs, K.H., Saur, W., Schultz, G. (1976). Reduction of adenylate cyclase activity in lysates of human platelets by the alpha-adrenergic component of epinephrine. J Cyclic Nucleotide Res 2: 381-92
- Ji, T. H., Grossmann, M. und Inhae, J. (1998). G-Protein-coupled Receptors J Biol Chem 273(28): 17299-302

- Kaumann, A.J., Hall, J.A., Murray, H.J., Wells, F.C. und Brown, M.J. (1989). A comparison of adrenalin and noradrenaline on human heart: The role of  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenoreceptors in the stimulation of adenylate cyclase and contractile force. Eur Heart J 10(Suppl B): 29-37
- Keown, W.A., Campell, C.R. und Kucherlapati, R.S. (1990). Methods for introducing DNA into Mammalian Cells. Methods in Enzymology 185: 327-37
- Klotz., K.N., Hessling, J., Hegler, J., Owman, C., Kull, B., Fredholm, B.B. und Lohse, M.J (1998) Comparative pharmacology of human adenosine receptor subtypes- characterization of stably transfected receptors in CHO cells. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol 357: 1-9
- Kobilka, B.K. (2004). Agonist Binding: A Multistep Process. Mol Pharm 65: 1060-62
- Krief, S., Lonngqvist, F., Raimbault, S., Baude, B., Van Spronsen, A., Arner, P., Strosberg, A.D., Ricquier, D. und Emorine, L.J. (1993). Tissue distribution of beta 3-adrenergic receptor mRNA in man. J Clin Invest 91: 344-49
- Lands, A.M., Arnold, A., McAuliff, J.P., Luduena, F.P. und Brown, T.G. Jr (1967). Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines Nature 214: 597-98
- Lattion, A.L., Abuin, L., Nenniger-Tosato, M. und Cotecchia, S. (1999). Constitutively active mutants of the  $\beta_1$ -adrenergic receptor. FEBS Letters 457: 302-306

- Lefkowitz, R.J. (1998). The  $\beta_2$ -adrenergic receptor interacts with the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger regulatory factor to control  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange. Nature 392: 626-30
- Liggett, S.B. (2004). Polymorphisms of  $\beta$ -adrenergic Receptors in Heart Failure. Am J Med 2004 117: 525-27
- Lohse, M.J. (1992). Stable overexpression of human  $\beta_2$ -adrenergic receptors in mammalian cells. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 345: 444-51
- Lohse, M.J., S. Engelhardt, et al. (2003). What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? Circ Res 93(10): 896-906.
- MERIT-HF Investigators (1999). Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL randomised intervention trial in congestive heart failure. Lancet 353: 2001-07
- Miura, M., Belvisi, M.G., Stritton, C.D., Yacoub, M.H., und Barnes P.J. (1992). Role of potassium channels in bronchiodialtor responses in human airways Am Rev Respir Diss 146: 132-36
- O'Dowd, B. F., Hnatowich, M., Regan, J.W., Leader, W.M., Caron, M.G. und Lefkowitz, B.J. (1988). Site directed mutagenesis of the cytoplasmic domains of the human  $\beta_2$ -adrenergic receptor. J Biol Chem 263: 15958-92
- Packer M., Fowler, M.B., Roecker, E.B., Coats, A.J., Katus H.A., Krum, H., Mohacsi, P., Rouleau, J.L., Tendera, M., Staiger C. et al. (2002). Carvedilol Prospective Randomized Cumulative Survival (COPERNICUS) Study Group. Effects of initiating carvedilol in patients with severe chronic heart failure: results from the COPERNICUS Study. JAMA 289: 712- 18

- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C.A., Motoshima, H., Fox, B.A., Le Trong, I., Teller, D.C., Okada, T., Stenkamp, R.E. et al., (2000). Crystal structure of Rhodopsin: a G-Protein-coupled receptor. Science 289: 739-745
- Poole-Wilson, P.A., Swedberg, K., Cleland, J. G., Di Lenarda, A., Hanrath, P., Komajda, M., Lubsen, J., Luttiger, B., Metra, M., Remme W.J. et al. (2003). Carvedilol or Metoprolol European Trial Investigators. Comparison of Carvedilol or Metoprolol on clinical outcomes in patients with chronic heart failure in the Carvedilol or Metoprolol European Trial (COMET): randomised control trial. Lancet 362: 7-13
- Sato, T., Kobayashi, H., Nagao, T. und Kurose, H. (1999). Ser203 as well as Ser 204 and Ser 207 in fifth transmembrane domain of the human  $\beta_2$ -adrenoreceptor contribute to agonistic and receptor activation. Br J Pharmacol 128: 272-74
- Strader, C.D., Sigal, I.S., Register, R.B., Candelore, M.R., Rands, E. und Dixon R.A.F. (1987a). Identification of residues required for ligand binding to the  $\beta$ -adrenergic receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 84: 4384- 88
- Strader, C.D., Dixon, R.A.F., Cheung, A.H., Candelone, M.R., Blake, A.D., und Sigal, I.S. (1987b). Mutations that uncouple the  $\beta$  adrenergic receptor from  $G_s$  and increase agonist affinity. J Biol Chem 262: 16439-46
- Strader, C.D., Candelore, M.R., Hill, W.S., Sigal, I.S. und Dixon, R.A.F. (1989). Identification of two serine residues involved in agonist activation of the  $\beta$ -adrenergic receptor. J Biol Chem 264:13572- 78
- Strader, C.D., Fong, T.M., Tota, M.R., Underwood, D. und Dixon, R.A. (1994). Structure and function of G-Protein coupled receptors. Annu Rev Biochem 63: 101-32

- Strader, C.D., Fong, T.M., Graziano, M.P. und Tota, M.R. (1995). The family of G-protein-coupled receptors. Faseb J 9(9): 745-54
- Sunhara, R.K., Dessauer, C.W. und Gilman, A.G. (1996). Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. Ann Rev Pharmacol Toxicol 36: 461-80
- Sugimoto, Y., Fujisawa, R., Tanimura, R., Lattion, A.L., Cotecchia, S., Tsujimoto, G., Nagao, T. und Kurose, H. (2002).  $\beta_1$ -Selective Agonist (-)-1-(3,4-Dimethoxyphenethylamino)-3-(3,4 Dihydroxy)-2-Propanol [(-)-RO363] Differentially Interacts with Key Amino Acid Responsible for  $\beta_1$ -Selective Binding in Resting and Active States. J Pharmacol Exp Ther 301(1):51-8
- Suryanarayana, S. und Kobilka, B.K. (1993). Amino acid substitution at position 312 in the seventh hydrophobic segment of the  $\beta_2$  adrenergic receptor modify ligand binding specificity. Mol Pharm 44: 111-14
- Swaminath, G., Deupi, X., Lee, T.W., Zhu, W., Thias, F.S. Kobilka, T.S. und Kobilka, B. (2005). Probing the beta2 adrenoceptor binding site with catechol reveals differences in binding and activation by agonists and partial agonists. J Biol Chem 280: 22465-71
- Tate, K.M., Briend-Sutren, M.M., Emorine, L.J., Delavier-Klutchko C., Marullo, S. und Strosberg, A.D. (1991). Expression of three human  $\beta$ - adrenergic-receptor subtypes in transfected Chinese hamster ovary cells. Eur J Biochem 445: 1-12
- Waldeck B. (2002)  $\beta$  Adrenoreceptor agonists and asthma- 100 years of development Euro J Pharmacol 445: 1-12

Wess, J. (1997). G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. Faseb J 11(5): 346-354.

Wieland, K., Zuurmond, H.M., Krasel, C., Ijzermann, A.P. und Lohse, M.J. (1996). Involvement of Asn-293 in stereospecific agonist recognition and in activation of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor. PNAS (USA) 93: 9276-81

## *VII. Abkürzungsverzeichnis*

A	kontextabhängig Alanin oder Adenin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
C	kontextabhängig Cystein oder Cytosin
CGP-20712	((±)-2-hydroxy-5-[2-[[2-hydroxy3-[4-[1-methyl-4-(trifluoromethyl)-1H-imidazol-2-yl]phenoxy]propyl]amino]ethoxy]-benzamide)
D	Asparaginsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
E	kontextabhängig Glutaminsäure oder Extrazellullärer Loop
EDTA	Essigsäuredinatriumtetraacetat
F	Phenylalanin
G	kontextabhängig Glycin oder Guanin
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
H	Histidin
I	kontextabhängig Isoleucin oder Intrazellulärer Loop
ICI-118551	((±)-1-[2,3-(dihydro-7-methyl-1H-inden-4-yl)oxy]-3-[(1-methylethyl)amino]-2-butanol)
K	Lysin
L	Leucin
LB-Medium	Liquid-Broth Medium zur Kultivierung von E.Coli
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
Q	Glutamin

R	Arginin
RT	Raumtemperatur
S	Serin
T	kontextabhängig Threonin oder Thymin
TAE-Puffer	Elektrophoresepuffer, enthält Tris, Essigsäure und EDTA
TM	Transmembrandomäne
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

## VIII. Anhang

```
1 TGCTACCCGC GCCCGGGCTT CTGGGGTGTT CCCCAACCAC GGCCCAGCCC TGCCACACCC
61 CCCGCCCCCG GCCTCCGAG CTCGGCATGG GCGCGGGGGT GCTCGTCCTG GGCGCCTCCG
121 AGCCCGGTAA CCTGTCGTCG GCCGCACCGC TCCCCGACGG CGCGGCCACC GCGGCGCGGC
181 TGCTGGTGCC CGCGTCGCCG CCCGCCTCGT TGCTGCCTCC CGCCAGCGAA AGCCCCGAGC
241 CGCTGTCTCA GCAGTGGACA GCGGGCATGG GTCTGCTGAT GGCGCTCATC GTGCTGCTCA
301 TCGTGGCGGG CAATGTGCTG GTGATCGTGG CCATCGCCAA GACGCCGCGG CTGCAGACGC
361 TCACCAACCT CTTCATCATG TCCCTGGCCA GCGCCGACCT GGTATGTTGG CTGCTGGTGG
421 TGCCGTTCCG GGCCACCATC GTGGTGTGGG GCCGCTGGGA GTACGGCTCC TTCTTCTGCG
481 AGCTGTGGAC CTCAGTGGAC GTGCTGTGCG TGACGGCCAG CATCGAGACC CTGTGTGTCA
541 TTGCCCTGGA CCGCTACCTC GCCATCACCT CGCCCTTCCG CTACCAGAGC CTGCTGACGC
601 GCGCGCGGGC GCGGGGCCCTC GTGTGCACCG TGTGGGCCAT CTCGGCCCTG GTGTCTTCC
661 TGCCCATCCT CATGCACTGG TGGCGGGCGG AGAGCGACGA GCGCGCCCGC TGCTACAACG
721 ACCCCAAGTG CTGCGACTTC GTCACCAACC GGGCCTACGC CATCGCCTCG TCCGTAGTCT
781 CCTTCTACGT CCCCCTGTGC ATCATGGCCT TCGTGTACCT GCGGGTGTTC CGCGAGGCCC
841 AGAAGCAGGT GAAGAAGATC GACAGCTGCG AGCGCCGTTT CCTCGGCGGC CCAGCGCGGC
901 CGCCCTCGCC CTCGCCCTCG CCCGTCCCCG CGCCCGCGCC GCCGCCCGGA CCCCCGCGCC
961 CCGCCGCCGC CGCCGCCACC GCCCCGCTGG CCAACGGGCG TGCGGGTAAG CGGCGGCCCT
1021 CGCGCCTCGT GGCCCTACGC GAGCAGAAGG CGCTCAAGAC GCTGGGCATC ATCATGGGCG
1081 TCTTACGCT CTGCTGGCTG CCCTTCTTCC TGGCCAACGT GGTGAAGGCC TTCCACCGCG
1141 AGCTGGTGCC CGACCGCTC TTCGTCTTCT TCAACTGGCT GGGCTACGCC AACTCGGCCT
1201 TCAACCCAT CATCTACTGC CGCAGCCCCG ACTTCCGCAA GGCCTTCCAG GGACTGCTCT
1261 GCTGCGCGCG CAGGGCTGCC CGCCGGCGCC ACGCGACCA CGGAGACCGG CCGCGCGCCT
1321 CGGGCTGTCT GGCCCGGCC GGACCCCGC CATCGCCCGG GGCCGCCTCG GACGACGACG
1381 ACGACGATGT CGTCGGGGCC ACGCCGCCCG CGCGCCTGCT GGAGCCCTGG GCCGGCTGCA
1441 ACGGCGGGGC GCGGCGGAC AGCGACTCGA GCCTGGACGA GCCGTGCCGC CCCGGCTTCG
1501 CCTCGGAATC CAAGGTGTAG GGCCCGGCGC GGGGCGCGGA CTCGGGCAC GGCTTCCCAG
1561 GGAACGAGG AGATCTGTGT TTACTTAAGA CCGATAGCAG GTGAACTCGA AGCCCACAAT
1621 CCTCGTCTGA ATCATCCGAG GCAAAGAGAA AAGCCACGGA CCGTTGCACA AAAAGGAAAG
1681 TTTGGGAAGG GATGGGAGAG TGGCTTGCTG ATGTTCTTG TTG
```

Anhang 1| **DNA-Sequenz des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors** . Dargestellt ist die Basenabfolge des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors, GenBank Eintrag J03019 (Frielle et al., 1987), welche für die Herstellung der Mutanten verwendet wurde.

## *Danksagung*

Herrn Dr. Carsten Hoffmann danke ich für die gute Lehre und Zusammenarbeit in molekularbiologischen Fragen. Für die Einführung in viele Methoden, sowie für die Unterstützung bei der späteren Durchführung sei insbesondere Sonja Kachler, Silke Oberdorf-Maas und Nico Falgner gedankt. Die institutsinternen Seminare werde ich als sehr bereichernde Stunden in Erinnerung behalten. Hier konnte ich viel über wissenschaftliche Strategien lernen und für meine Arbeit aus dem Plenum gute Ideen erhalten. Für diese sehr hilfreichen Diskurse danke ich allen Mitarbeitern des Pharmakologischen Institutes.

Mit Herrn Prof. Dr. Lohse durfte ich einen Wissenschaftler erleben, der mit viel Einsatz und Begeisterung den Fragen seines Gebietes nachgeht. Seinen Enthusiasmus werde ich als vorbildlich in Erinnerung behalten.

Meinen Eltern und dem Evangelischen Studienwerk möchte ich für die großzügige finanzielle und ideelle Unterstützung danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Karl-Norbert Klotz, der mich während der gesamten Promotionsphase stets sehr gewissenhaft und eng betreut hat. Ich hatte alle Freiheiten neue Ideen und Methoden auszuprobieren und konnte mit ihm immer in strategischen Gesprächen meinen eingeschlagenen Kurs überprüfen. Ebenso bedeutend war für mich das von ihm entgegengebrachte Vertrauen bei der Präsentation meiner Ergebnisse auf nationalen und internationalen Kongressen. Jenseits der Wissenschaft war er auch auf der privaten Ebene eine große Bereicherung meines Aufenthaltes in Würzburg. Die großzügige Unterbringung in seinem Haus, die Weinabende im Kreise seiner Familie und den gemeinsam geteilten Humor lassen erahnen, dass ich mich privilegiert fühle, einen besonderen Doktorvater den meinen nennen zu dürfen.

# *Curriculum Vitae*

## PERSÖNLICHE ANGABEN

Geburtsdatum 23. April 1979  
Geburtsort Haan  
Familienstand ledig  
Staatsangehörigkeit deutsch

## SCHULISCHE AUSBILDUNG

1985 bis 1998 Grundschule und Gymnasium in Wuppertal  
Abschluss Abitur

## ERSATZDIENST

Sep. 1998 bis Sep. 1999 Einsatz in der chirurgischen Ambulanz im  
Krankenhaus Bethesda in Wuppertal

## STUDIUM

Okt. 1999 bis Sep. 2001 Humanmedizin an der Heinrich-Heine  
Universität Düsseldorf  
Okt. 2001 bis Nov. 2005 Humanmedizin an der Bayerischen Julius-  
Maximilian Universität Würzburg  
Staatsexamen November 2005  
Jan. 2006 USMLE Step 1  
Sep. 2005 USMLE Step 2 CK

## AUSLANDSSTUDIUM

Juli 2003 bis Sep. 2003 Humanmedizin an der University of Washington,  
Seattle

## PRAKTISCHES JAHR

Okt. 2004 bis Sep. 2005 Innere Medizin King's College London  
University of Sydney  
Chirurgie Universität Würzburg  
Universitätsspital Zürich  
HNO Universität Würzburg

## FORSCHUNGSTÄTIGKEIT

Seit Sep. 2002 Institut für Pharmakologie der Universität Würzburg  
Medizinische Doktorarbeit seit Januar 2004

*Würzburg , im Mai 2006*